

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ПЕЛЕВИНА АННА ВИТАЛЬЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ФОСФАТ-
АККУМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ И ИХ РОЛЬ В МИКРОБНЫХ
СООБЩЕСТВАХ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ**

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
1.5.11. Микробиология

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Пименов Н.В.

Москва – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность работы.....	5
Цель и задачи исследования	6
Научная новизна и теоретическая значимость работы	7
Практическая значимость.....	8
Личный вклад соискателя.....	8
Апробация работы.....	8
Публикации.....	9
Объем и структура диссертационной работы	9
Место проведения работы и благодарности.....	9
Список работ, опубликованных по теме диссертации	10
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
ГЛАВА I. ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИЕ ОРГАНИЗМЫ И ИХ РОЛЬ В УДАЛЕНИИ ФОСФОРА ИЗ СТОЧНЫХ ВОД	13
1.1 История изучения процесса биологического удаления фосфора и выделение группы фосфат-аккумулялирующих микроорганизмов	13
1.2 Основные представители ФАО	16
1.3 Механизмы удаления фосфора ФАО	22
ГЛАВА II. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА МЕТАБОЛИЗМ ФАО И ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ ФОСФОРА	27
2.1 Температура.....	27
2.2 Альтернативные акцепторы электронов (нитраты и нитриты).....	28
2.3 Концентрация фосфатов.....	29
2.4 Источники углерода.....	30
ГЛАВА III. BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УДАЛЕНИЯ ФОСФОРА	33
3.1 Основные технологические процессы биологического удаления фосфора	33
3.1.1 Последовательно-периодические реакторы.....	33
3.1.2 Непрерывные процессы.....	35
3.1.2.1 Непрерывный процесс для биологического удаления фосфора из сточной воды Phoredox (PHOsporus REDuction OXidation).....	35

3.1.2.2	Схема биологического удаления азота и фосфора, разработанная в Кейптаунском университете – UCT (University of Cape Town)	36
3.2	Агрегирование микробного сообщества	38
3.3	Микроорганизмы, влияющие на биологическое удаление фосфора.....	39
3.3.1	Гликоген-аккумулирующие организмы. Отличие ФАО-фенотипа от ГАО.....	39
3.3.2	Факторы, влияющие на исход конкуренции между ФАО и ГАО.....	40
	Заключение к обзору литературы.....	42
	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	44
	ГЛАВА IV. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
4.1	Биореактор для выращивания ФАО в циклическом аэробно-анаэробном режиме культивирования	44
4.2	Условия культивирования.....	45
4.2.1	Отъемно-доливной биореактор	45
4.2.2	Последовательно-периодический биореактор	46
4.3	Активный ил для начальной загрузки биореакторов	47
4.4	Аналитические методы.....	47
4.5	Определение скорости потребления кислорода (СПК)	48
4.6	Определение доступных субстратов.....	49
4.7	Световая и электронная микроскопия	50
4.7.1	Световая микроскопия.....	50
4.7.2	Трансмиссионная электронная микроскопия.....	50
4.7.3	Сканирующая электронная микроскопия.....	51
4.7.4	Спектроскопия комбинационного рассеяния	51
4.8	Молекулярные методы	52
	ГЛАВА V. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА, СПОСОБНОГО УДАЛЯТЬ ФОСФОР ИЗ СРЕДЫ ПРИ ОТЪЕМНО-ДОЛИВНОМ СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	54
5.1	Культивирование микробного сообщества в биореакторе отъемно-доливного типа	54
5.2	Исследование состава микробного сообщества биореактора микроскопическими методами	57
5.3	Исследование состава микробного сообщества биореактора молекулярными методами.....	62

ГЛАВА VI. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩЕГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОМ СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ	67
6.1 Оценка эффективности удаления фосфора фосфат-аккумуляирующим микробным сообществом при длительном культивировании активного ила очистных сооружений г. Москвы	67
6.2 Исследование микробного сообщества биореактора с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния	72
6.3 Динамика микробного сообщества биореактора на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК	75
6.4 Формирование пространственных структур микробным сообществом фосфат-аккумуляирующих бактерий в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия	79
6.5 Метагеномный анализ агрегатов различных морфотипов	90
ГЛАВА VII. ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МИКРОБНЫМ СООБЩЕСТВОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО БИОРЕАКТОРА	95
7.1 Потребление кислорода	95
7.2 Цикл выделения/поглощения фосфора в анаэробных/аэробных условиях	96
7.3 Возможности транспортных систем <i>Ca. Accumulibacter</i>	100
Заключение	104
Выводы	106
Список сокращений и условных обозначений	107
Список использованной литературы	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Фосфор (P) является важнейшим биогенным элементом, играющим ключевую роль в конструктивном и энергетическом метаболизме всех живых организмов (Izadi, Eldyasti, 2021). Однако в повышенных концентрациях фосфор может стимулировать биологическую продуктивность водных экосистем в масштабах, нарушающих их естественное экологическое функционирование. Основным источником фосфора является фосфоритная руда, которая в основном используется при производстве удобрений, считается критическим невозобновляемым ресурсом (Goswami, Rouff, 2022).

Разработка и внедрение технологий извлечения фосфора из сточных вод до экологически безопасного уровня, а также возможность его повторного использования позволит снизить нагрузку на водные объекты и удовлетворить потребности в фосфатах. Среди таких технологий наиболее эффективными и экономически привлекательными считаются технологии, основанные на биологическом удалении фосфора и комбинации биологического удаления с химическим осаждением фосфатов (Hesselmann et al., 1999; Yuan et al., 2012; Wilfert et al., 2015; Stockholm-Bjerregaard et al., 2017; Rajesh Vanu et al., 2021).

Биологическое удаление фосфора – это процесс накопления полифосфата микроорганизмами внутри клеток с последующим удалением обогащенной фосфором избыточной биомассы.

Несмотря на полувековой опыт использования фосфат-аккумулирующих организмов (ФАО) на очистных сооружениях для биологической очистки, таксономический состав фосфат-аккумулирующих бактерий, их взаимодействие с другими компонентами микробного сообщества активного ила и физиологические особенности во многом неизвестны. Основная информация о фосфат-аккумулирующих бактериях получена на основании исследований микробных сообществ лабораторных биореакторов и промышленных очистных сооружений. Одной из наиболее изученных групп

ФАО в системах биологической очистки являются бактерии рода *Candidatus Accumulibacter*, которые способны накапливать в своей биомассе до 38% P от сухого веса, что существенно выше значений содержания фосфатов необходимых для обеспечения жизнедеятельности гетеротрофных бактерий (~2% P) (Schuler, Jenkins, 2003; Welles et al., 2016). До сих пор основные представители ФАО не выделены в чистые культуры. Поэтому поиск новых подходов к культивированию микробных сообществ обогащенных ФАО, осуществляющих биологическое удаление фосфата из сточных вод, а также исследование на физиологическом и молекулярном уровнях особенностей формирования и функционирования этих сообществ является актуальным.

Исследованию ФАО, разработке и оптимизации режимов работы биореакторов, обеспечивающих эффективную очистку сточных вод от фосфора, посвящено большое количество исследований по всему миру (Izadi et al., 2020; Roy et al., 2021; Rajesh Vanu et al., 2021), в России такие исследования начаты впервые.

Цель и задачи исследования

Целью работы являлось получение микробного консорциума, обогащенного фосфат-аккумуляторными бактериями, из активного ила очистных сооружений г. Москвы, определение его видового состава, физиолого-биохимических характеристик и физико-химических условий эффективного удаления фосфора.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить микробный консорциум, обогащенный фосфат-аккумуляторными бактериями, из активного ила очистных сооружений в лабораторном реакторе в условиях последовательно-периодического и отъемно-доливного культивирования и оценить эффективность удаления фосфора.

2. Изучить динамику видового состава микробного сообщества формирующегося при разных режимах работы реакторов.

3. Изучить формирование пространственных структур (агрегатов) микробным сообществом фосфат-аккумулирующих бактерий в лабораторном биореакторе и выявить доминирующих представителей ФАО в агрегатах с использованием микроскопических, молекулярных методов и оценить их метаболический потенциал.

4. Определить спектр органических веществ, используемых в качестве источника углерода и энергии доминирующими представителями ФАО.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

Разработан новый способ культивирования микробного сообщества, обогащенного ФАО, в модифицированном биореакторе последовательно-периодического действия (SBR – Sequencing Batch Reactor). Получено микробное сообщество, в составе которого доминировали новые фосфат-аккумулирующие бактерии родов *Dechloromonas* и *Zoogloea* семейства *Rhodocyclaceae*, которые эффективно удаляли фосфор из среды.

Последовательно-периодическим способом культивирования получено стабильно функционирующее фосфат-аккумулирующее микробное сообщество, высокообогащенное типичным представителем ФАО – *Ca. Accumulibacter*, с высоким накоплением фосфора в биомассе и типичным для ФАО-фенотипа накоплением и высвобождением фосфора в аэробный и анаэробный периоды SBR-цикла биореактора.

Выявлена способность фосфат-аккумулирующего микробного сообщества, длительно функционирующего в режиме биологического удаления фосфора, к спонтанной агрегации и сегрегации биомассы. Установлено, что поэтапное формирование агрегированных структур в процессе работы биореактора – закономерное явление, характерное для развития микробного сообщества ФАО, связанное с изменением таксономического состава и функциональной активности компонентов сообщества.

Показано, что микробное сообщество, обогащенное *Ca. Accumulibacter*, способно использовать широкий спектр органических веществ, оказывающих

различный эффект на анаэробно/аэробное циклическое преобразование фосфатов. Впервые получены новые данные о способности ФАО *Sa. Accumulibacter* использовать пируват и сукцинат в качестве источников углерода.

Практическая значимость

Создана лабораторная установка для исследования удаления фосфора из фосфатсодержащей среды с использованием микробных ассоциаций, обогащенных ФАО; отработан способ культивирования высокоэффективных представителей ФАО, являющихся перспективными биологическими агентами для дальнейшего развития биотехнологий удаления фосфора из водных сред. Кроме того, разработанный способ культивирования может быть использован для селекции и получения новых культур ФАО.

Результаты исследования фосфат-аккумулирующего сообщества, удаляющего более 86% фосфора из лабораторного биореактора, могут быть использованы для оптимизации технологии биологического удаления фосфора на крупномасштабных и локальных очистных сооружениях, а также при разработке новых очистных сооружений.

Личный вклад соискателя

Соискатель лично принимал участие на всех этапах работы, включая планирование и постановку экспериментов, обработку и анализ данных, апробацию основных положений на различных конференциях, подготовку публикаций по теме диссертации.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на: Всероссийской конференции с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019 г.); 3-м Российском микробиологическом конгрессе (Псков, 2021 г.); 13th International Multiconference “Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems

Biology” (Новосибирск, 2022 г.); XIII Молодежной Школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2022 г.) и 4-м Российском микробиологическом конгрессе (Томск, 2023 г.).

Публикации

По материалам работы опубликовано 13 печатных работ, из них 5 экспериментальных статей, 1 патент и 7 тезисов конференций.

Объем и структура диссертационной работы

Диссертация изложена на 131 странице машинописного текста и включает 27 рисунков и 5 таблиц. Работа состоит из введения, 7-ми глав (обзор литературы, материалы и методы, экспериментальная часть – результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы, который содержит 187 наименований.

Место проведения работы и благодарности

Работа была выполнена в лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН с 2019 по 2023 годы. Автор выражает благодарность своему научному руководителю заведующему лабораторией реликтовых микробных сообществ д.б.н. Пименову Н.В. за предоставленную тему, внимание и помощь в планировании экспериментов, при написании статей, тезисов конференций и диссертации, а также к.б.н. Дорофееву А.Г. за практическую и консультативную помощь при выполнении данной работы, д.б.н. Марданову А.В. и сотрудникам его лаборатории за проведение молекулярного анализа. Автор также крайне признателен всем сотрудникам лаборатории реликтовых микробных сообществ за поддержку и прекрасные дружеские отношения в коллективе, а также за практическую помощь, ценные рекомендации и конструктивную критику при выполнении и обсуждении разных этапов работы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Экспериментальные статьи:

1. **Пелевина А.В.**, Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н. В., Марданов А. В. Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании // *Микробиология*. – 2021. – Т. 90. – № 1. – С. 76-89.
2. **Пелевина А.В.**, Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеев А.Г., Слатинская О.В., Максимов Г.В., Каллистова А. Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А. В.. *Candidatus* Accumulibacter sp. – основной представитель фосфат-аккумулирующих бактерий микробного сообщества лабораторного биореактора // *Микробиология*. – 2022. – Т. 91. – № 5. – С. 631-637.
3. **Pelevina A.**, Gruzdev E., Berestovskaya Y., Dorofeev A., Nikolaev Y., Kallistova A., Beletsky A., Ravin N., Pimenov N., Mardanov A. New insight into the granule formation in the reactor for enhanced biological phosphorus removal // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – V. 14. – Art. No. 1297694. doi: 10.3389/fmicb.2023.1297694.
4. Dorofeev A., **Pelevina A.**, Nikolaev Y., Berestovskaya Y., Gruzdev E., Mardanov A., Pimenov N. Oxygen uptake rate as an indicator of the substrates utilized by *Candidatus* Accumulibacter // *Water*. – 2023. – V. 15. – Art. No. 3657. <https://doi.org/10.3390/w15203657>.
5. **Pelevina A.V.**, Berestovskaya Yu.Yu., Dorofeev A.G., Nikolaev Yu.A., Gruzdev E.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V. Aggregate formation by a microbial community developing in a phosphorus-removing laboratory reactor // *Microbiology*. – 2023. – V. 92. – Suppl. 1. – P. 33–S36.

Патент

6. Пименов Н.В., Дорофеев, А.Г., Николаев Ю.А., Грачев В.А., **Пелевина А.В.**, Берестовская Ю.Ю., Марданов А.В. Способ биологической очистки сточных вод от фосфатов. Патент на изобретение 2753657 С1, 19.08.2021. Заявка № 2020125577 от 24.07.2020.

Тезисы конференций:

7. **Пелевина А.В.**, Николаев Ю.А., Грачёв В.А., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Берестовская Ю.Ю., Пименов Н.В., Котляров Р.Ю., Марданов А.В. Новые фосфат аккумулярующие бактерии микробного сообщества лабораторного биореактора. Всероссийская конференция с международным участием «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии». Москва (Россия) 23 – 24 декабря 2019 г. Материалы конференции – С.92.

8. **Пелевина А.В.**, Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Фосфат-аккумулярующее микробное сообщество лабораторного реактора типа SBR. 3-й Российский Микробиологический конгресс. Псков (Россия), 26 сентября – 1 октября 2021 г. Материалы конгресса – С.96.

9. Груздев Е.В., Белецкий А.В., **Пелевина А.В.**, Дорофеев А.Г., Грачев В.А., Пименов Н.В., Равин Н.В., Марданов А.В. Новые фосфат-аккумулярующие микроорганизмы, выявленные в результате метагеномного анализа микробного сообщества лабораторного биореактора, осуществляющего удаление фосфора. 3-й Российский Микробиологический конгресс. Псков (Россия), 26 сентября – 1 октября 2021 г. Материалы конгресса – С.166.

10. **Pelevina A.V.**, Berestovskaya J.J., Dorofeev A.G., Ravin N.V., Mardanov A.V., Pimenov N.V. Development of phosphate-accumulating microbial community in a sequencing batch reactor (SBR) // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth

International Multiconference. Novosibirsk (Russia), 04 – 08 July 2022. Abstract Book, P. 1148.

11. **Пелевина А.В.**, Берестовская Ю.Ю., Груздев Е.В., Сорокин В.В., Слатинская О.В., Марданов А.В. Особенности формирования фосфат-аккумулирующего микробного сообщества в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия. Актуальные аспекты современной микробиологии: XIII молодежная школа-конференция с международным участием. Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН. Москва (Россия), 16 – 18 ноября 2022 г. Сборник тезисов – С. 197-199

12. **Пелевина А.В.**, Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеев А.Г., Груздев Е.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Использование различных источников углерода фосфат-аккумулирующим микробным сообществом лабораторного реактора. 4-ый Российский Микробиологический Конгресс. Томск (Россия), 24 – 29 сентября 2023 г. Материалы конгресса – С. 54-55

13. Груздев Е.В., Белецкий А.В., **Пелевина А.В.**, Пименов Н.В., Равин Н.В., Марданов А.В. Динамика изменения состава микробного сообщества активного ила биореактора, удаляющего фосфат из среды. 4-ый Российский Микробиологический Конгресс. Томск (Россия), 24 – 29 сентября 2023 г. Материалы конгресса – С. 45-46.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЛАВА I. ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИЕ ОРГАНИЗМЫ И ИХ РОЛЬ В УДАЛЕНИИ ФОСФОРА ИЗ СТОЧНЫХ ВОД

1.1 История изучения процесса биологического удаления фосфора и выделение группы фосфат-аккумулятивных микроорганизмов

Биологическое удаление фосфора основано на способности микроорганизмов при определенных условиях накапливать фосфор в количестве, существенно превышающем потребности микробной клетки в фосфоре. Впервые это явление было описано группой исследователей из Индии в 1959 году (Srinath et al., 1959). Было установлено, что при аэрации активный ил очистных сооружений способен удалять фосфор из фосфорсодержащей среды. Было показано, что кратковременный нагрев до 50-60°C и обработка малыми концентрациями хлорида ртути ингибируют этот процесс (Srinath et al., 1959).

Позднее аналогичные наблюдения были сделаны в США и Южной Африке (Levin, Shapiro, 1965; Barnard 1976) и была разработана базовая гипотеза, объясняющая механизм избыточного поглощения фосфора микроорганизмами – чередование анаэробно-аэробных условий с наличием легкодоступного органического вещества и аэробных условий без легкодоступного органического вещества. Традиционное понимание того, что ФАО обладают способностью удалять фосфор из сточных вод путем накопления фосфора внутри клеток в форме полифосфатов, определило механизмы удаления фосфора, когда поступающие сточные воды последовательно проходят через анаэробные и аэробные зоны в присутствии активного ила.

Потребовалось несколько десятилетий, чтобы наиболее полно описать метаболизм организмов, осуществляющих биологическое удаление фосфора. На основании исследования активных илов крупномасштабных очистных сооружений и обогащенных лабораторных культур было установлено, что ФАО

– аэробные гетеротрофные бактерии. Но в анаэробных условиях они способны поглощать субстрат (преимущественно ЛЖК – ацетат и пропионат), и запасать их в виде поли- β -гидроксиалканоатов (ПГА) таких как поли- β -гидроксибутират (ПГБ), поли- β -гидроксивалерат (ПГВ), поли- β -гидрокси-2-метилвалерат (ПГ2МВ) и поли- β -гидрокси-2-метилбутират (ПГ2МБ) (Wentzel et al., 1985; Comeau et al., 1986; Mino et al., 1987). Энергия в основном вырабатывается за счет расщепления внутриклеточного полифосфата и высвобождения ортофосфата через цитоплазматическую мембрану (ЦПМ). НАДН, необходимый для синтеза ПГА в анаэробных условиях, и дополнительная энергия образуются при гликолизе гликогена, запасаемого клеткой в аэробную или аноксидную (при наличии альтернативного акцептора электронов – NO_2 , NO_3) стадию (Mino et al., 1987; Smolders et al., 1994). Этот уникальный метаболизм дает ФАО конкурентное преимущество перед аэробными организмами, которые не способны поглощать органическое вещество в анаэробных условиях. В аэробной (аноксидной) фазе происходит катаболизм внутриклеточных ПГА, синтез на продуктах их распада «обычной» биомассы ФАО и регенерация гликогена. Также в этот период происходит поглощение ортофосфатов, сопряженное с переносом ионов Mg^{2+} и K^+ , и создание внутриклеточного пула полифосфатов. Как только фосфат накапливается в клетках ФАО, возникают возможности для его удаления с избыточной биомассой или извлечение фосфата стимулированием высвобождения фосфора путем добавления ЛЖК (Дорофеев и соавт., 2019). Этой общей теории механизма биологического удаления фосфора было достаточно для того, чтобы разработать и внедрить первые технологии биологической очистки сточных вод от фосфора, часть из которых не потеряла актуальность до сих пор.

Исследование биохимических процессов ФАО продолжается, поскольку выделить представителей ФАО с циклическим типом метаболизма до сих пор никому не удалось в связи со сложностью организации и большим разнообразием микробных сообществ активных илов, в которых бактерии локализируются в слизистом матриксе (Дорофеев и соавт., 2019). Источниками

информации о ФАО являются исследования обогащенных ФАО лабораторных культур, которые наращивают в циклических условиях в лабораторных реакторах, а также метагеномный анализ микробных консорциумов, осуществляющих биологическое удаление фосфатов в крупномасштабных очистных сооружениях (Wu et al., 2019; Nierychlo et al., 2020; Dueholm et al., 2021; Begmatov et al., 2022).

Несмотря на активное использование традиционных и современных молекулярных методов для изучения микробных консорциумов, осуществляющих удаление фосфора, их экофизиология и разнообразие всё ещё остаются недостаточно изученными. Исследование Глобального консорциума водного микробиома (GWMC) включало очистные сооружения из 23 стран на шести континентах и охватывало Северную Америку, Западную и Центральную Европу, Восточную Азию, Австралию и некоторые города Южной Америки и Южной Африки (Wu et al., 2019). В этом исследовании *Ca. Accumulibacter* были идентифицированы в большинстве образцов активных илов по всему миру, в то время как *Tetrasphaera* была основным представителем ФАО на очистных сооружениях Центральной Европы (Wu et al., 2019). Проект MiDAS проанализировал пробы из 740 очистных сооружений с использованием различных технологий очистки. В ходе этого исследования была получена полноразмерная справочная база генов 16S рРНК, MiDAS 4, представляющая собой полный каталог прокариот в системах очистки сточных вод и их таксономию от доменного до видового уровня (Nierychlo et al., 2020; Dueholm et al., 2021). Оба этих проекта охватывали в основном одни и те же географические регионы. Очистные сооружения России в рамках этих проектов не изучались. В недавно выполненном исследовании был проанализирован состав микробных сообществ на девяти очистных сооружениях города Москвы, на которых реализованы различные технологии очистки (Begmatov et al., 2022). В составе сообществ в разных долях были идентифицированы такие ФАО как *Ca. Accumulibacter*, *Dechromonas*, *Tauera*, *Zoogloea* и *Thiothrix*. Авторы выяснили, что в большей мере на состав микробных сообществ очистных

сооружений влияют характеристики, связанные с культурными, социальными и экологическими факторами, а не технологии очистки.

1.2 Основные представители ФАО

Несмотря на общую метаболическую способность ФАО в определенных циклических условиях аккумулировать фосфор и запасать органическое вещество, филогенетически эта группа микроорганизмов неоднородна, и в результате исследования микрофлоры активных илов обнаруживаются все новые и новые кандидаты на принадлежность к ФАО (Stokholm-Bjerregaard et al., 2017; Tarayre et al., 2017).

Считается, что биологическое удаление фосфора осуществляют главным образом бактерии рода *Ca. Accumulibacter* (класс *Betaproteobacteria*) и представители рода *Tetrasphaera* (*Actinobacteriota*) (Fernando et al., 2019; Дорофеев и соавт., 2020). Однако существуют и другие ФАО, также играющие существенную роль в этом процессе (Stokholm-Bjerregaard et al., 2017; Petriglieri et al., 2021; Diaz et al., 2022).

В 1975 году было предположено, что бактерии рода *Acinetobacter* играют существенную роль в процессе биологического удаления фосфора (Fuhs, Chen, 1975). Из активного ила очистных сооружений были выделены несколько штаммов бактерий рода *Acinetobacter*. Было показано, что эти микроорганизмы облигатные аэробы, использующие в качестве источников углерода и энергии низкомолекулярные промежуточные органические соединения (ацетат, этанол), образующиеся анаэробно. Была описана способность этих микроорганизмов к агрегации (Fuhs, Chen, 1975).

Однако, выделенные акинетобактерии имели ряд отличий от основной метаболической модели ФАО. В анаэробных условиях в присутствии ацетата выделение ортофосфата штаммами *Acinetobacter* происходило в малых количествах, а в аэробных условиях поглощение ортофосфата наблюдалось только совместно с ацетатом. Также эти бактерии имели высокие удельные скорости роста (приблизительно 1 ч^{-1}) (Deinema et al., 1985), в то время как для

биологического удаления фосфора активному илу требуется время удержания твердых частиц минимум три дня (максимальная удельная скорость роста $0,0125 \text{ ч}^{-1}$) (Mamais, Jenkins, 1992). Это указывает на то, что максимальная скорость роста бактерий, накапливающих фосфат, намного ниже.

Ca. Accumulibacter является наиболее изученным ФАО и на сегодняшний день считается основным фосфат-аккумулятором в реакторах биологического удаления фосфора (Crocetti et al., 2000; Martin et al., 2006; He, McMahon, 2011; Camejo et al., 2019; Tomás-Martínez et al., 2021). С помощью высокопроизводительного секвенирования гена полифосфаткиназы I (*ppkI*) линия *Ca. Accumulibacter* была разделена на две основные клады (тип I и II), каждая из которых состояла из нескольких отдельных подклад. Использование гена полифосфаткиназы *ppkI* в качестве филогенетического маркера позволило идентифицировать несколько подгрупп *Ca. Accumulibacter*. Клады типа I включают IA, IB, IC, ID, IE, а типа II – IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, IIG, IIH и III (Camejo et al., 2016; He et al., 2007; Mao et al., 2015). Бактерии, входящие в кладу IA, могут осуществлять поглощение фосфора, используя нитрат в качестве акцептора электронов, в отличие от бактерий клады IIA (Kim et al., 2013). В других исследованиях было обнаружено, что члены клады IA, IIA, IIC и IIF способны к денитрификации, однако акцептором электронов являлся нитрит, а не нитрат (Kim et al., 2013; Saad et al., 2016; Guo et al., 2018). В некоторых исследованиях отмечена способность *Ca. Accumulibacter* восстанавливать нитраты с помощью либо дыхательной нитратредуктазы (*Nar*), либо периплазматической нитратредуктазы (*Nap*), где первая обеспечивает рост с помощью нитрата, а вторая поддерживает только окислительно-восстановительный баланс, а не дыхание в бескислородных условиях (Camejo et al., 2019). Однако данные недавних исследований не подтверждают предположения о том, что эти гены одинаково присутствуют или отсутствуют у всех членов конкретной клады *Ca. Accumulibacter* (Gao et al., 2019; Rubio-Rincón et al., 2019). Точно так же регуляторные белки NosR и NosX были идентифицированы только в кладе I *Ca. Accumulibacter*, и предполагается, что

они приводят к различиям в регуляции гена редуктазы закиси азота (*nosZ*) между двумя ветвями *Ca. Accumulibacter* (Gao et al., 2019).

Микроорганизмы, способные в качестве акцепторов электронов использовать нитраты и нитриты и таким образом совместно с удалением фосфора проводить удаление азота получили название денитрифицирующих ФАО (ДФАО). Однако биохимия процесса сопряжения денитрификации с фосфат-аккумуляцией еще не до конца понятна и требует дальнейших исследований. Способность ФАО использовать альтернативные акцепторы электронов в дополнение к кислороду имеет решающее значение для реализации экономичных и энергоэффективных процессов биологического удаления фосфора. Нитраты и нитриты обычно образуются в процессе нитрификации и денитрификации на очистных сооружениях и служат акцепторами электронов для ФАО (Roy et al., 2021).

Исследования экспрессии генов цикла трикарбоновых кислот выявили значительные расхождения в анаэробном и аэробном метаболизме различных популяций *Ca. Accumulibacter* (Wexler et al., 2009). Было показано, что представители *Ca. Accumulibacter* имеют как общие пути центрального метаболизма углерода и фосфора, так и специфические, связанные со спектром используемых органических субстратов и акцепторов электронов (Skennerton et al., 2015). На основании протеомного анализа было установлено, что анаэробная деградация гликогена у всех изученных *Ca. Accumulibacter* осуществляется по пути Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (Wilmes et al., 2008). Результаты исследований изменения метатранскриптома в ходе анаэробно/аэробного цикла показали первостепенное значение для *Ca. Accumulibacter* регуляции на уровне транскрипции и возможность использовать более широкий спектр источников углерода, чем предполагалось ранее (Oyserman et al., 2016).

На сегодняшний день ФАО *Ca. Accumulibacter* является некультивируемым микроорганизмом, и в чистой культуре его до сих пор выделить не удалось. Исследования физиологических и метаболических

особенностей проводятся на обогащенных культурах. Некоторым исследователям удалось получить микробное сообщество, обогащенное *Ca. Accumulibacter* до уровней более 90% (Lu et al., 2006). Такого высокого уровня обогащения удалось достичь при чередовании источников углерода – ацетата и пропионата – и поддерживая рН среды биореактора между 7,0 и 8,0. В биореакторах, в которых пропионат использовался в качестве единственного источника углерода, содержание *Ca. Accumulibacter* достигало 89% (Carvalho et al., 2007), а в реакторах с добавлением только ацетата, обогащение этим организмом составляло от 40 до 80% (Hesselmann et al., 1999; Crocetti et al., 2000). Таким образом, летучие жирные кислоты, такие как пропионат и ацетат, а также рН играют решающую роль в обогащении популяций *Ca. Accumulibacter*.

Поиск фосфат-аккумулирующих бактерий в активных илах очистных сооружений позволил выявить ряд новых организмов, имеющих отличия от классической метаболической модели *Ca. Accumulibacter*. Потенциальных ФАО в составе микробных сообществ идентифицируют, в том числе, по наличию внутриклеточных включений полифосфатов (Crocetti et al., 2000). Ряд исследователей отмечают важную роль представителей рода *Dechloromonas* в процессе удаления фосфора из фосфорсодержащей среды (Petriglieri et al., 2020). Эти бактерии широко распространены в системах биологического удаления фосфора и считаются потенциальными организмами, накапливающими полифосфаты, но их роль в удалении фосфатов до сих пор неясна. Рядом ученых было показано, что *Dechloromonas* способны накапливать полифосфаты и ПГА (Yuan et al., 2016; Acevedo et al., 2017), а анализ геномов культивируемых штаммов *Dechloromonas* выявил наличие генов полифосфаткиназы (*ppk1*) и экзополифосфатазы (*ppx1*), необходимых для накопления полифосфата (Salinero et al., 2009).

Бактерии рода *Dechloromonas* sp. семейства *Rhodocyclaceae* способны удалять фосфор в условиях низких (0,3%, 0,6% и 1,2%) концентраций растворенного кислорода (Goel et al., 2005). *Dechloromonas* были

идентифицированы как денитрифицирующие ФАО (He et al., 2018; Lin et al., 2019; Yuan et al., 2020), способные использовать как нитраты, так и нитриты в качестве акцепторов электронов для поглощения фосфора (Wang et al., 2020). При исследовании полномасштабных очистных сооружений г. Омехатиман (Япония) было показано, что именно *Dechloromonas* sp. играет существенную роль в удалении биогенных элементов – азота и фосфора (Terashima et al., 2016). Анализ микробных сообществ 20 очистных сооружений Дании показал, что *Dechloromonas* был вторым наиболее многочисленным родом среди хорошо известных и предполагаемых ФАО (Nierychlo et al., 2020).

Исследование физиологии *Dechloromonas* показало, что они могут расти на летучих жирных и казामीновых кислотах (Horn et al., 2005). Использование пропионата в качестве источника углерода при низких температурах ($10\pm 1^\circ\text{C}$) привело к обогащению активного ила бактериями рода *Dechloromonas* до 60,5% (Wang et al., 2014). Чередование анаэробных/аноксидных (акцептор электронов NO_2 или NO_3) условий и наличие источников с низким содержанием углерода обеспечивает условия для обогащения активных илов *Dechloromonas* sp. (Figdore et al., 2018; Lin et al., 2019). Также было показано, что концентрации нитритов ниже 8 мг/л в сочетании с чередованием анаэробных/аноксидных режимов работы усиливают рост *Dechloromonas*, и дают основание отнести этих микроорганизмов к группе денитрифицирующих ФАО (Dai et al., 2017).

Еще одним ФАО считаются бактерии рода *Tetrasphaera*, относящиеся к классу *Actinomycetes*, семейству *Intrasporangiaceae*. Род включает бактерии, способные осуществлять накопление фосфора и денитрификацию (ДФАО) в системах биологического удаления фосфора. По экофизиологии эти бактерии сходны с *Ca. Accumulibacter* в способности внутриклеточно накапливать полифосфат, а также могут осуществлять ферментацию гликогена и денитрификацию (Kristiansen et al., 2013). Шесть видов рода *Tetrasphaera* sp. были выделены из активных илов очистных сооружений: *T. australiensis* (штаммы Ben 109 и Ben 110), *T. japonica* штаммы T1-X7 (Maszenan et al., 2000), *T. elongata* штамм Lp2 (Hanada et al., 2002), штамм ASP12 (Onda, Takii, 2002), *T.*

jenkinsii, *T. veronensis* и *T. vanveenii* (McKenzie et al., 2006). Род *Tetrasphaera* состоит из трех клад. Клада 1 включает клоны, обнаруживающие сходства с последовательностями геномов *T. elongata* и *T. duodecadis*. Клада 2 включает четыре изолированных вида: *T. jenkinsii*, *T. veronensis*, *T. australiensis* и нитевидный *Ca. Nostocoida limicola*. Клада 3 включает некультивируемых *Tetrasphaera*. Существует, по крайней мере, шесть различных морфотипов *Tetrasphaera* spp.: короткие палочки, разветвленные палочки, мелкие кокки, кокки в виде тетрад, нитей и тонких нитей.

В анаэробных условиях *Tetrasphaera* spp. используют различные источники углерода, такие как аминокислоты, сахара и ЛЖК (Marques et al., 2018). *Tetrasphaera* spp. могут синтезировать гликоген. Но в отличие от *Ca. Accumulibacter*, *Tetrasphaera* spp. не могут запасать углерод в виде ПГА (Christiansen et al., 2013; Marques et al., 2017). Гены ацетил-КоА-ацетилтрансферазы (*phaA*) и ацетоацетил-КоА-редуктазы (*phaB*) были идентифицированы в геномах у *Tetrasphaera* spp., но ПГА-синтаза (*phaC*) была обнаружена только в геноме *T. japonica*. Некоторые виды *Tetrasphaera* spp. могут использовать ЛЖК в качестве субстрата, но в этих условиях они не способны осуществлять цикл «поглощение – выброс» фосфора. При культивировании только в анаэробных условиях некоторые виды *Tetrasphaera* spp. способны продуцировать ЛЖК и другие метаболиты, которые могут потребляться в качестве субстрата другими ФАО. Метаболическая универсальность *Tetrasphaera* spp. делает их важным компонентом сообщества, эффективно удаляющего органические вещества (Nielsen et al., 2012).

Кандидатом на роль ФАО могут быть сульфидокисляющие бактерии рода *Thiothrix*, обладающие хемоорганогетеротрофным или миксотрофным типом метаболизма, использующие внутриклеточный пул серы в качестве источника энергии (Chernousova et al., 2009; Rubio-Rincón et al., 2017). В циклических аэробно/анаэробных условиях метаболизм *T. caldifontis* сходен с *Ca. Accumulibacter*. В анаэробных условиях *T. caldifontis* способен накапливать ЛЖК в виде ПГА. В аэробных условиях *T. caldifontis* может запасать сульфид в

виде элементной серы (Rubio-Rincón et al., 2017). Дополнительным источником энергии для роста и образования полифосфат и гликогена в аэробный период может быть окисление внутриклеточной серы до сульфата (Дорофеев и соавт., 2020).

К потенциальным представителям ФАО относят также ряд других прокариот, роль которых в биологическом удалении фосфора надежно не установлена – *Microlunatus phosphovor* (Nakamura et al., 1995), *Ca. Accumulimonas* (Nguyen et al., 2012), *Methanosarcina mazei* (Paula et al., 2019), *Malikia granosa* и *M. spinosa* (Spring et al., 2005), *Thauera* (Yun et al., 2019), а также некультивируемые цианобактерии *Ca. Obscuribacter phosphatis* (Soo et al., 2014).

1.3 Механизмы удаления фосфора ФАО

Детали биохимических процессов, связанных с ФАО, до конца не изучены из-за отсутствия чистых культур основных представителей ФАО и разнообразия метаболических путей микроорганизмов этой группы. Однако на основе ранних исследований активного ила промышленных сооружений, а также лабораторных экспериментов с обогащенными ФАО культурами были разработаны основные биохимические модели метаболизма ФАО. Впервые общепризнанная в настоящее время классическая метаболическая модель ФАО была предложена Mino (Arun et al., 1988).

Наиболее детально механизм удаления фосфора рассмотрен для *Ca. Accumulibacter*. Это связано с тем, что результаты исследований микробных сообществ активного ила промышленных очистных сооружений и обогащенных ФАО лабораторных культур указывают на доминирующую роль именно *Ca. Accumulibacter* в процессе биологического удаления фосфора (Дорофеев и соавт., 2020).

На рисунке 1 представлена схема метаболической модели удаления фосфора этими микроорганизмами.

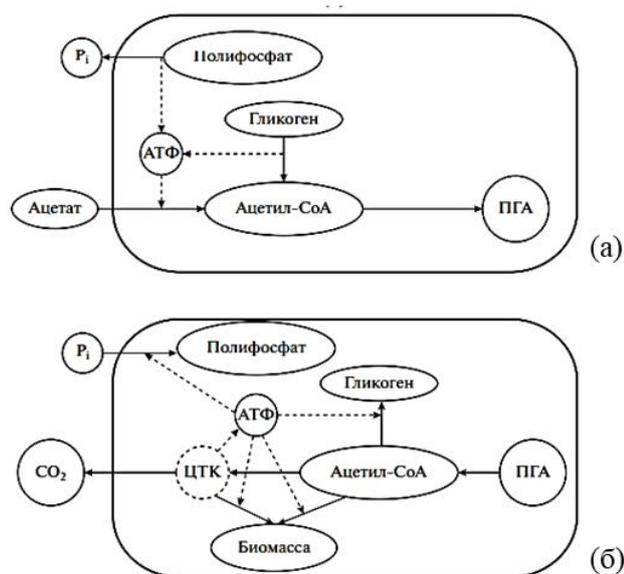


Рисунок 1. Основная модель метаболизма ФАО: а – анаэробный, б – аэробный период (цитировано по Дорофеев и соавт., 2020).

В анаэробный период в клетках *Ca. Accumulibacter* происходит гидролиз полифосфата и фосфат ($\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$) выбрасывается из клеток параллельно с выходом контр-ионов (Mg^{2+} и K^+) в соотношении $\text{P} : \text{Mg}^{2+} : \text{K}^+ = 1 : 0,33 : 0,33$. Энергия, выделяемая при гидролизе полифосфата, используется для поглощения легко разлагаемых низкомолекулярных органических веществ (преимущественно ЛЖК) клеткой, что приводит к синтезу ПГА, сопровождающемуся ферментацией гликогена для получения энергии. В аэробный период, используя кислород в качестве акцептора электронов, происходит поглощение ортофосфатов, сопряженное с переносом ионов Mg^{2+} и K^+ , и создание внутриклеточного пула полифосфатов, катаболизм ранее запасенных ПГА и регенерация гликогена клетками.

Интересно отметить, что у некоторых представителей *Ca. Accumulibacter* был обнаружен неполный метаболический путь удаления фосфора с использованием нитратного азота в качестве акцептора электронов (Flowers et al., 2009). У *Ca. Accumulibacter* (тип II) отсутствует нитратредуктаза (*NAR*), вследствие чего эти организмы не способны удалять фосфор, используя в качестве акцептора электронов нитрат (Martin et al., 2006).

На основании метагеномного анализа удалось идентифицировать множество функциональных генов, связанных с процессом удаления фосфора у *Ca. Accumulibacter*, включая полифосфаткиназу (*ppk*), экзополифосфатазу (*ppx*), полигидроксиалканоатсинтазу (*PhaC*) и поли(3-гидроксибутират)деполимеразу (*PhaZa1*). Содержание полифосфата в *Ca. Accumulibacter* в основном контролируется генами *ppk1* и *ppk2*. Полифосфат может гидролизоваться экзополифосфатазой, тогда как полигидроксиалканоатсинтаза и поли(3-гидроксибутират)деполимераза связаны с синтезом и разложением ПГА. Субстрат-связывающий белок системы транспорта фосфатов (*PstS*), АТФ-связывающий белок системы транспорта фосфатов (*PstB*) и белок-пермеаза системы транспорта фосфатов (*PstA*) играют важную роль в превращении полифосфата в другие формы фосфора и использовании его в качестве источника энергии (Campos et al., 2019; Lonetti et al., 2011).

Заметно отличаются от классической метаболической модели предполагаемые ФАО – представители филума *Actinomycetota* рода *Tetrasphaera*. Эти микроорганизмы могут аэробно поглощать фосфат и хранить его внутриклеточно в виде полифосфата, а также ассимилировать ряд субстратов в анаэробных условиях (Kristiansen et al., 2013) (рис. 2).

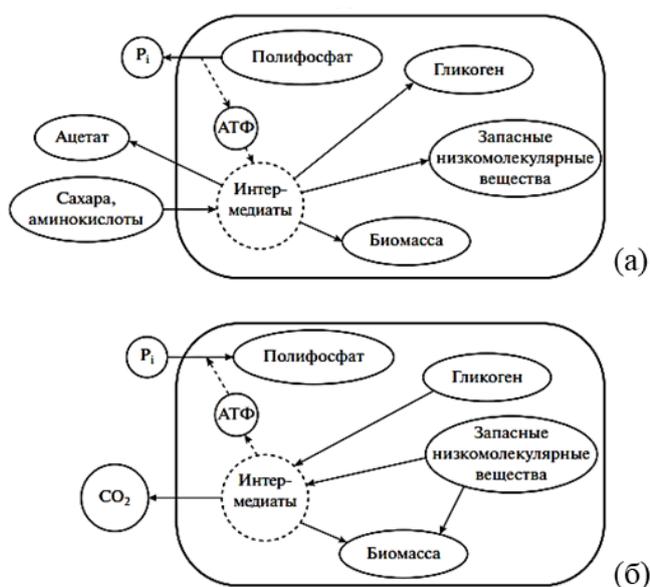


Рисунок 2. Метаболическая модель *Tetrasphaera* и других ферментирующих ФАО в анаэробный (а) и аэробный (б) период (цитировано по Дорофеев и соавт., 2020).

Tetrasphaera не способны использовать ЛЖК для анаэробного высвобождения фосфора. Однако могут расщеплять макромолекулярные соединения, такие как глюкоза или аминокислоты, путем ферментации в сочетании с высвобождением фосфора.

Было обнаружено, что в анаэробных условиях *Tetrasphaera* не накапливают ПГА, а превращают глюкозу в гликоген, используя энергию гидролиза полифосфатов и ферментации субстрата. В аэробной фазе гликоген разлагается с получением энергии для поглощения фосфора. При использовании аминокислот в качестве единственного источника углерода, ПГА и гликоген не были обнаружены в клетках *Tetrasphaera*, но были обнаружены свободные аминокислоты и был предложен альтернативный путь удаления фосфора (Kristiansen et al., 2013). По сравнению с *Ca. Accumulibacter*, *Tetrasphaera* имеет более широкий набор субстратов и может напрямую поглощать и использовать глюкозу или аминокислоты в качестве источника углерода для метаболизма.

Исследования механизмов удаления фосфора ФАО с помощью микроскопических методов показали, что наряду с внутриклеточным запасанием полифосфатов, внеклеточные полимерные вещества – экзополисахариды (ЭПС) также играют важную роль в поглощении фосфора (Li et al., 2015). ЭПС представляют собой высокомолекулярную смесь полимеров (состоящие преимущественно из остатков сахаров), секретируемых микроорганизмами, которые влияют на поверхностный заряд клетки, могут действовать как защитный барьер, и известны своей адсорбционной способностью и проницаемостью (Shen et al., 2010).

Накопление фосфора на поверхности клеток микроорганизмов активного ила из реакторов биологического удаления фосфора наблюдали Cloete и Oosthuizen при анализе клеток с помощью сканирующей электронной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР-спектроскопия) (Cloete, Oosthuizen, 2001). Это исследование показало, что наряду с внутриклеточным запасанием, ЭПС микроорганизмов активного ила также

могут быть резервуаром для хранения фосфора. В ЭПС может содержаться до 30% удаленного фосфора. Более поздние исследования также выявили и подтвердили присутствие больших количеств фосфора в ЭПС из активных илов установок, осуществляющих биологическое удаление фосфора с общим содержанием фосфора до 10,5%. Основные виды фосфатов в этом исследовании были идентифицированы как ортофосфат, пирофосфат и полифосфат (Zhang et al., 2013). Однако механизмы накопления фосфора в ЭПС не были установлены и роль экзополисахаридов в системах биологического удаления фосфора не ясна.

ГЛАВА II. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА МЕТАБОЛИЗМ ФАО И ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКОГО УДАЛЕНИЯ ФОСФОРА

Существование ФАО в консорциуме микроорганизмов активного ила и успешность биологического удаления фосфора на очистных сооружениях определяется многими факторами: наличием и природой легкодоступных источников углерода и энергии, природой акцепторов электронов, режимом циклов, температурой, кислотностью среды, наличием необходимых микроэлементов (Дорофеев и соавт., 2020).

Следует отметить, что в связи с отсутствием чистых культур основных представителей ФАО изучение физиологических особенностей этой группы проводится с использованием обогащенных ФАО лабораторных микробных сообществ или активных илов сооружений биологической очистки, причем находящихся в агрегированном состоянии. В такой ситуации на результаты исследований существенное влияние оказывает как жизнедеятельность не относящихся к ФАО групп микробного сообщества, так и пространственная организация микробных сообществ, что может приводить к получению противоречивых результатов. Например, в связи с низкими скоростями роста ФАО снижение ФАО-активности сообщества при изменении условий культивирования может быть связано не с их физиологическими особенностями, а с вытеснением этой группы быстрорастущими конкурентами.

2.1 Температура

Для ФАО оптимальной, как правило, является температура около 20°C, однако достаточно высокая активность наблюдается даже при 5°C (Brdjanovic et al., 1998; Helmer, Kunst, 1998). Со снижением температуры с 20 до 5°C эффективность биологического удаления фосфора после кратковременного падения может даже возрастать, превышая в несколько раз величины, характерные для 20-градусных условий (Erdal et al., 2003). По этой причине

некоторые авторы относят ФАО к психроактивным или даже психрофильным микроорганизмам (Panswad et al., 2003; Zheng et al., 2014). Повышение температуры культивирования до 30-35°C ведет к снижению активности ФАО (Tian et al., 2013).

Вместе с тем, имеются сообщения о стабильном и эффективном процессе удаления фосфора (в результате метаболизма ФАО) и при температурах 28-30°C, характерных для очистных сооружений в тропическом климате (Ong et al., 2013; Ong et al., 2016; Law et al., 2016; Cao et al., 2017). Было показано устойчивое удаление фосфора при повышении температуры с 24 до 32°C. Авторы исследования предполагают, что *Ca. Accumulibacter* тип PF обладает высокой устойчивостью к воздействию тепла, что и позволяет вести процесс удаления фосфора даже при 32°C. Стабильное удаление фосфора при высоких температурах удалось получить и при использовании «стратегии мультицикла» – многократном чередовании анаэробных/аэробных условий в ходе одного цикла удаления фосфора (Shen et al., 2017).

2.2 Альтернативные акцепторы электронов (нитраты и нитриты)

Преобладание и предпочтение различных акцепторов электронов является решающим фактором, определяющим кинетику поглощения фосфора фосфат-аккумулирующими организмами. Последовательность биохимических реакций при денитрификации позволяет членам микробного сообщества использовать промежуточные продукты денитрификации и, таким образом, формировать общую структуру сообщества (Gao et al., 2019). Последствия использования различных акцепторов электронов фосфат-аккумулирующим микробным сообществом и стабильность процессов при различных операционных, пространственных и временных условиях в инженерных системах требуют дальнейших исследований.

Оценка способности к использованию нитратов или нитритов в качестве акцепторов электронов ДФАО – важнейшее научно-практическое направление исследований, связанное с экономическими преимуществами использования

денитрификации в технологиях очистки сточных вод от биогенных элементов. ДФАО на удаление фосфора и азота используют меньше легкодоступного органического вещества, находящегося в дефиците в сточных водах, и зачастую ограничивающего глубину удаления этих элементов (Kuba et al., 1996).

Несмотря на способность использовать нитриты в качестве акцептора электронов, при высоких концентрациях нитрита наблюдается ингибирование метаболических процессов ФАО (Meinhold et al., 1999; Saito et al., 2004; Zeng et al., 2016). В настоящее время установлено, что ингибирующее воздействие оказывает не столько нитрит, сколько свободная азотистая кислота, подавляющая метаболическую активность ФАО как в аэробный (или аноксидный), так и в анаэробный период. В ряде исследований показано, что в аэробной фазе уже в диапазоне концентраций 0,36-0,52 мкг N-HNO₂/л происходит 50% снижение скорости поглощения ФАО ортофосфатов, образования гликогена и скорости роста, причем ингибирующий эффект проявляется сильнее на процессах анаболизма, чем на катаболических реакциях окисления полигидроксиалканоатов. При концентрациях 2-10 мкг N-HNO₂/л происходило полное ингибирование этих процессов (Pijuan et al., 2010; Zhou et al., 2012). В условиях денитрификации поглощение фосфатов ингибировалось азотистой кислотой при концентрациях менее 2 мкг N-HNO₂/л, а при концентрации 20 мкг N-HNO₂/л - полностью подавлялось (Zhou et al., 2007). При содержании 44 мкг N-HNO₂/л в среде в аноксидный период наблюдалось «переключение» денитрифицирующих ФАО на анаэробный метаболизм – выброс фосфора и распад гликогена, несмотря на присутствие акцепторов электронов (Zhou et al., 2010). Показано, что в анаэробном периоде скорость поглощения органического вещества падает вдвое при концентрациях азотистой кислоты 1-2 мкг N-HNO₂/л (He et al., 2018).

2.3 Концентрация фосфатов

Еще одним важным фактором, оказывающим существенное влияние на структуру и обилие микробного сообщества ФАО, является концентрация

фосфата в среде. В работах Welles и соавторами установлено, что при лимите по фосфору (менее 5 мг P/л) доминируют клады *Ca. Accumulibacter* типа II (Welles et al., 2016). Эти результаты подтверждены японскими исследователями (Nurmiyanto et al., 2017), установившими, что избыточная концентрация фосфора (50-500 мг P/л) ингибирует активность ФАО, причем ингибирующий эффект более выражен у представителей *Ca. Accumulibacter* типа II, чем у типа I.

2.4 Источники углерода

Ключевой особенностью метаболизма ФАО является способность к поглощению и запасанию углерода в анаэробных условиях. ФАО были в первую очередь дифференцированы на основе их предпочтения конкретных источников углерода. Классическая модель ФАО была тщательно изучена в биореакторах, обогащенных *Ca. Accumulibacter*, с использованием летучих жирных кислот в качестве источника углерода, однако многие аспекты их метаболизма были идентифицированы только недавно. Анализ эволюционной основы приобретения признаков у *Ca. Accumulibacter* показал, что такие пути, как метаболизм полифосфатов и цикл трикарбоновых кислот, подвергаются минимальному горизонтальному переносу генов, в отличие от путей, участвующих в синтезе и метаболизме полигидроксиалконоатов, гликогена, НАДН/НАДФН, пирувата, неорганических соединений. Транспорт ионов и регуляторные механизмы, вероятно, улучшили приспособленность *Ca. Accumulibacter* к условиям очистных сооружений (Oyserman et al., 2016b). Кроме того, анализ баланса потоков биогенных элементов показал, что окислительно-восстановительный кофактор ацетоацетил-КоА-редуктазы у *Ca. Accumulibacter* был НАДН-зависимым, а не НАДФН-зависимым, как предполагалось в предыдущих исследованиях (Verhagen et al., 2020; Guedes da Silva et al., 2020). Эта адаптация снижает энергетические затраты и увеличивает сохранение углерода в *Ca. Accumulibacter*, тем самым придавая большую гибкость для выживания в динамических условиях на очистных сооружениях.

Основными источниками углерода для *Ca. Accumulibacter* и большинства ФАО являются низкомолекулярные ЛЖК - ацетат и пропионат.

Несмотря на то, что бутират – один из основных продуктов анаэробного сбраживания (Ahn, Speese, 2006), его роль в биологическом удалении фосфора и метаболизме *Ca. Accumulibacter* остается не выясненной, а результаты противоречивы. Levantesi и соавторами удалось получить обогащенную *Ca. Accumulibacter* культуру, стабильно удалявшую фосфор на смеси ацетат/пропионат/бутират (Levantesi et al., 2002). При исследовании конкуренции между фосфат-аккумулирующими и гликоген-аккумулирующими микроорганизмами (ГАО) при выращивании на бутирате в качестве единственного источника углерода, была получена культура, обогащенная ФАО (*Ca. Accumulibacter*) и ГАО (*Defluviicoccus* sp.). Однако сообщество функционировало нестабильно, а скорость потребления бутирата и выделения фосфора в анаэробной фазе цикла была низкой (Begum, Batista, 2014). Сукцинат – один из медиаторов центральных путей метаболизма, образуется в анаэробных условиях в качестве конечного продукта метаболизма многими микроорганизмами. Известно, что его образование происходит при анаэробном сбраживании органических отходов (Song, Lee, 2006; Wainaina et al., 2019; Putri et al., 2020). Однако исследований его возможного участия в биологическом удалении фосфора и обеспечении цикла поглощения – высвобождения фосфата у *Ca. Accumulibacter* ранее не проводилось.

Вопрос о способности *Ca. Accumulibacter* и других ФАО использовать аминокислоты также остается открытым.

При использовании аминокислот в качестве источника углерода, доминирующими ФАО обычно были представители рода *Tetrasphaera* (Maszenan et al., 2000). Существенные различия в метаболизме ФАО с использованием аминокислот по сравнению с ЛЖК связаны со снижением высвобождения фосфора (Nguyen et al., 2011). Однако до сих пор нет единого мнения относительно точного метаболизма и продуктов внутриклеточного накопления, образующихся в связи с поглощением аминокислот (Nguyen et al.,

2015; Liu et al., 2019). В дополнение к утилизации аминокислот *Tetrasphaera* было показано, что *Ca. Accumulibacter* типа IIF (SCELSE -1) способна метаболизировать 11 из 24 аминокислот. Причем при использовании аспарагиновой и глутаминовой кислот показана наибольшая эффективность удаления фосфора (Qiu et al., 2019a).

ФАО, такие как *Microthrix phovorox* и *Tetrasphaera*, могут ферментировать сахара и накапливать внутриклеточные метаболиты *in situ*, однако, сопутствующее поглощение фосфора не было связано с их углеродным метаболизмом (Kawakoshi et al., 2012; Rubio-Rincón et al., 2019). Тем не менее, возможность утилизации сахара, приводящая к стабильному процессу удаления фосфора, остается неизвестной и требует дальнейшего анализа.

ГЛАВА III. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ УДАЛЕНИЯ ФОСФОРА

Циклическое культивирование микроорганизмов является эффективным методом для создания условий, способствующих успешному развитию фосфат-аккумулирующих организмов (ФАО) и проведению биологического удаления фосфора. Данный метод основан на последовательном чередовании фаз выращивания с различными условиями роста и продолжительностью цикла, которая сопоставима или меньше продолжительности цикла клеточного деления. Такая последовательность фаз роста способствует конкурентоспособности ФАО и обеспечивает эффективное удаление фосфора (Дорофеев и соавт., 2020).

Циклическое культивирование микроорганизмов позволяет оптимизировать условия для успешного функционирования ФАО и эффективного биологического удаления фосфора. Этот метод может быть применен в различных системах очистки сточных вод и других процессах.

3.1 Основные технологические процессы биологического удаления фосфора

Создание условий для эффективного развития обогащенного ФАО микробного сообщества и проведения процесса удаления фосфора связано с использованием циклических реакторов типа SBR (Sequencing Batch Reactor или последовательно-периодический реактор), а также с организацией внутренних рециклов в проточных биореакторах (Tchobanoglous et al., 2004).

3.1.1 Последовательно-периодические реакторы

На малых и средних сооружениях для очистки сточных вод от фосфора и проведения лабораторных исследований обычно используют реакторы последовательно-периодического типа – SBR. Эти реакторы позволяют провести культуру ФАО или активный ил через серию фаз, составляющих единый цикл очистки сточной воды, в одной емкости. Также как и в случае с

обычным периодическим культивированием, цикл очистки воды в SBR начинается с заполнения реактора исходной средой (сточной водой) и заканчивается удалением использованной среды (рис. 3).

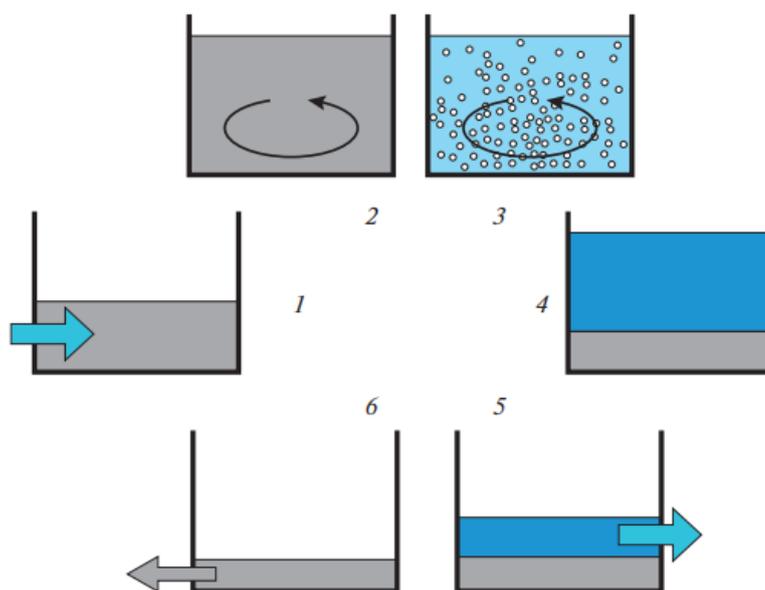


Рисунок 3. Один цикл работы биореактора типа SBR: 1 – подача в биореактор с активным илом сточной воды; 2 – анаэробная фаза; 3 – аэробная фаза; 4 – отстаивание; 5 – удаление очищенной сточной воды; 6 – удаление избыточного активного ила, обогащенного полифосфатами. (цитировано по Дорофеев и соавт., 2020).

Циклическое культивирование в реакторах SBR позволяет обеспечить оптимальные условия для развития активного ила и повысить его способность к удалению фосфора из сточной воды. Этот подход эффективно применяется не только на промышленных очистных сооружениях, но и в системах коммунальной очистки сточных вод, где проблема удаления фосфора является важной. Таким образом, использование циклических реакторов SBR является эффективным подходом для обогащения активного ила фосфат-аккумулирующими бактериями и удаления фосфора из сточной воды. Эта технология имеет широкий спектр применения и играет важную роль в достижении экологической устойчивости и соблюдении требований по качеству воды.

3.1.2 Непрерывные процессы

В непрерывных процессах для создания циклических условий необходимых для удаления фосфора в биореакторах организуют зоны, обедненные или обогащенные кислородом и органическим веществом путем регулирования интенсивности аэрации и перемешивания, а также созданием рециклов – возврата части потока сточной воды и (или) иловой смеси из одной зоны биореактора в другую.

В настоящее время разработаны и внедрены в практику разнообразные варианты непрерывных процессов удаления фосфора. Ниже рассмотрены два наиболее часто используемых процесса: простейший процесс Phoredox (PHOsphorus REDuction OXidation) и широко распространенный на очистных сооружениях процесс UCT (University of Cape Town) (Tchobanoglous et al., 2014). Данная технология используется на очистных сооружениях г. Москвы

3.1.2.1 Непрерывный процесс для биологического удаления фосфора из сточной воды Phoredox (PHOsphorus REDuction OXidation)

Первый простейший непрерывный процесс для биологического удаления фосфора из сточной воды, известный как Phoredox, был разработан в 1970-х годах. Этот процесс осуществляется путем прохождения иловой смеси через две последовательно расположенные зоны (рис. 4), обеспечивая цикличность условий благоприятных для развития ФАО. Первая зона является анаэробной, в ней происходит смешивание возвратного активного ила и сточной воды. Вместе со сточной водой поступают легкодоступные органические вещества, подвергающиеся ферментации в отсутствие или при низких концентрациях кислорода с образованием летучих жирных кислот. В этой зоне ФАО потребляют органическое вещество и выделяют фосфаты в среду. Затем иловая смесь перемещается в аэробную зону, где происходит принудительная аэрация и обогащение ее кислородом. В этой зоне ФАО поглощают фосфаты, а иловая смесь отправляется в илоотделитель. После отделения ила часть обогащенного

фосфором активного ила выводится из процесса, а остальная часть возвращается в анаэробную зону, и цикл удаления фосфора повторяется. Продолжительность пребывания в каждой зоне и концентрация активного ила регулируются таким образом, чтобы концентрация фосфора на выходе из аэробной зоны была ниже, чем в поступающей воде, и соответствовала проектным значениям.

Процесс Phoredox предназначен для очистки сточных вод без окисления аммония, поэтому в возвратном активном иле отсутствуют нитраты. Это позволяет избежать поступления акцепторов электронов в голову биореактора и обеспечивает там анаэробные условия.

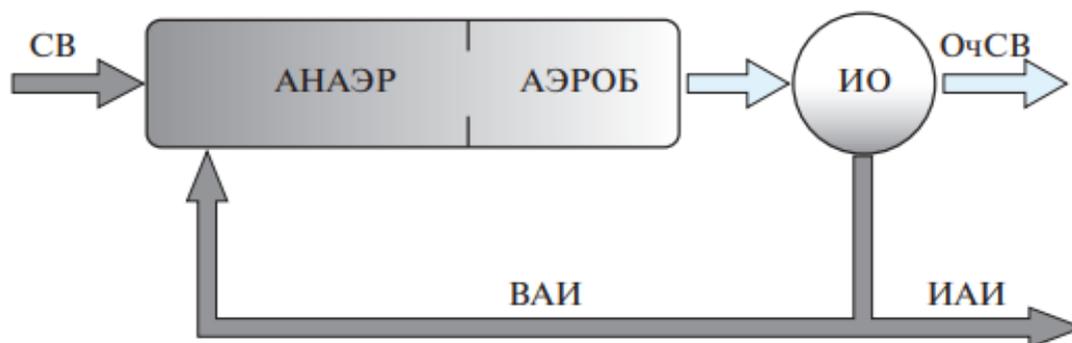


Рисунок 4. Схема процесса Phoredox. СВ – сточная вода; АНАЭР – анаэробная зона биореактора; АЭРОБ – аэробная зона биореактора; ИО – отделитель ила; ОчСВ – очищенная сточная вода; ВАИ – возвратный активный ил; ИАИ – избыточный активный ил (цитировано по Дорофеев и соавт., 2020).

3.1.2.2 Схема биологического удаления азота и фосфора, разработанная в Кейптаунском университете – UCT (University of Cape Town)

В настоящее время сточные воды часто требуют очистки от органических веществ, фосфора и азота. Для этого используются более сложные и многоступенчатые технологические схемы. Одной из таких технологий является технология, разработанная в Кейптаунском университете и получившая название «UCT - процесс» (University of Cape Town). UCT-процесс

является эффективным технологическим решением для очистки сточных вод от органического вещества, фосфора и азота. В этой технологии органическое вещество окисляется посредством денитрификации в аноксидной зоне, а затем в аэробной зоне (рис. 5). Удаление азота происходит за счет последовательной нитрификации (в аэробной зоне) и денитрификации (в аноксидной зоне). Технология также использует нитратный рецикл, который возвращает некоторую долю образующихся нитратов из аэробной зоны обратно в аноксидную зону, что предотвращает попадание нитратов в анаэробную зону, где начинается процесс удаления фосфора. Фосфаты поглощаются последовательно в аноксидной зоне денитрифицирующими ФАО, а затем в аэробной зоне (Tchobanoglous et al., 2014).

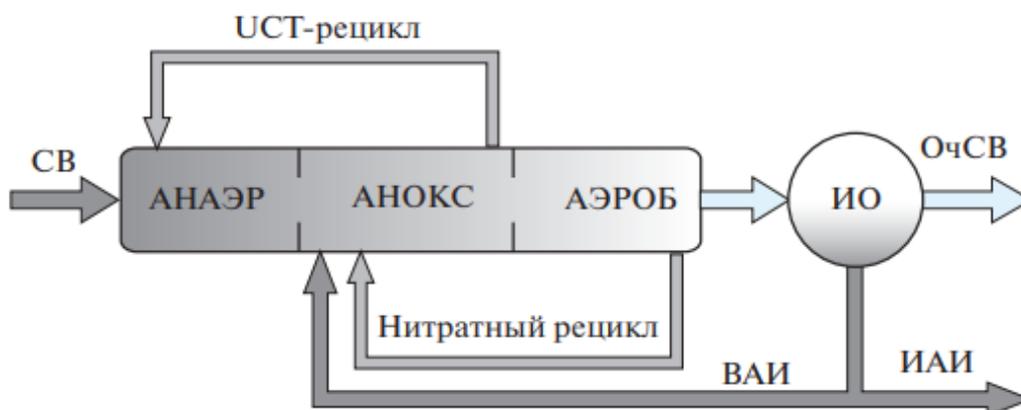


Рисунок 5. Схема УСТ-процесса. СВ – сточная вода; АНАЭР – анаэробная зона биореактора; АНОКС – аноксидная зона биореактора; АЭРОБ – аэробная зона биореактора; ИО – отделитель ила; ОчСВ – очищенная сточная вода; ВАИ – возвратный активный ил; ИАИ – избыточный активный ил (цитировано по Дорофеев и соавт., 2020).

Накопление группы ФАО при использовании данной технологии достигается с помощью нитратного рецикла и поддержанием возраста ила 7,5-20 суток (Ekama, Wentzel, 2004).

УСТ-процесс является примером эффективного сочетания различных процессов для удаления органических веществ, фосфора и азота. Эта технология широко используется и доказала свою эффективность в очистке сточных вод на промышленных и коммунальных очистных сооружениях.

3.2 Агрегирование микробного сообщества

Технологии биологической очистки сточных вод с использованием аэробного гранулированного активного ила получают активное распространение (Hamza et al., 2022). По сравнению с технологиями на основе обычного флокулированного активного ила они имеют ряд существенных преимуществ: очистные сооружения занимают меньшую площадь и требуют меньших капитальных и эксплуатационных затрат (De Kreuk et al., 2005; Nancharaiah et al., 2018). Механизмы гранулообразования изучены недостаточно. Известно, что процесс формирования гранул, их размеры и биохимические свойства зависят от многих факторов: конфигурации и режима работы биореактора (гидродинамические процессы, температура, состав среды, продолжительность периодов отстаивания и голодания и т.д.), доминирующих видов (Weissbrodt et al., 2013; Hamza et al., 2022). Имеются сообщения о том, что эффективность биологического удаления фосфора связана с геометрией гранул и снижается с увеличением их размера (Wu et al., 2010; Li et al., 2019). Между обычным флокулированным и гранулированным илом выявлены существенные различия на уровне протеома (Barr et al., 2016). В ряде работ показано, что различия в микробном составе гранул влияют на их седиментационные свойства (Winkler et al., 2011). Для увеличения эффективности удаления фосфора предложена селекция гранул с большим содержанием ФАО (Winkler et al., 2011; Bassin et al., 2012; Henriot et al., 2016). Обогащенные ФАО гранулы имеют высокую плотность и содержание золы, они тяжелее и лучше оседают в реакторе. Поэтому удаление избыточной биомассы из верхних слоев ила позволяет увеличить количество ФАО и повысить эффективность удаления фосфора (Pelevina et al., 2023).

3.3 Микроорганизмы, влияющие на биологическое удаление фосфора

3.3.1 Гликоген-аккумулирующие организмы. Отличие ФАО-фенотипа от ГАО

Биологическое удаление фосфора (Enhanced biological phosphorus removal – EBPR) включает циклическое перемещение биомассы в условиях обогащения углеродом (пир) и дефицита углерода (голод), способствуя активности фосфат-аккумулирующих организмов. Однако ряд других микроорганизмов обладает несколькими альтернативными метаболическими стратегиями без накопления полифосфата и могут конкурировать с ФАО за источники углерода (McIlroy et al., 2018). Часто на очистных сооружениях фосфат-аккумулирующие организмы сосуществуют с организмами, накапливающими гликоген (ГАО) (Mino et al., 1998; Schuler, Jenkins 2003). Бактерии с фенотипом ГАО привлекли значительное внимание как потенциальные конкуренты ФАО (Oehmen et al., 2007). Как и ФАО, эти организмы также способны развиваться при чередовании анаэробных/аэробных (аноксидных) условий. Превращения углерода, осуществляемые этими организмами, аналогичны процессам, осуществляемым фосфат-аккумулирующими микроорганизмами. Однако они не способны к анаэробному высвобождению фосфора и их поглощению из среды в аэробный (аноксидный) период (Yuan et al., 2012).

В качестве источника энергии и для поглощения ЛЖК в анаэробных условиях гликоген-аккумулирующие организмы (ГАО) используют гликоген и, следовательно, поглощение ЛЖК, а также накопление гликогена в биомассе и синтез ПГА выше, когда в микробном сообществе присутствуют ГАО, что приводит к более низким соотношениям P/C (Schuler, Jenkins, 2003). В отличие от метаболизма ФАО, ГАО зависят исключительно от потребления гликогена для выработки АТФ и НАДН₂, необходимых для поглощения ЛЖК и хранения ПГА (Rubio-Rincón, 2017; Diaz et al., 2022).

Было обнаружено, что в системах биологического удаления фосфора ГАО сосуществуют с ФАО (Diaz et al., 2022). К ГАО относят гаммапротеобактерии

Ca. Competibacter phospheticus, *Defluviicoccus* (López-Gutiérrez et al., 2004; Wong, Liu, 2007), а также актинобактерии *Micropruina glycogenica* (Shintani et al., 2000), чей анаэробный фенотип сильно отличается от фенотипа всех других известных ГАО.

В анаэробных условиях *M. glycogenica* ассимилирует сахара и аминокислоты, которые затем, как полагают, ферментируются с образованием лактата, ацетата, этанола и пропионата. Эти продукты ферментации частично сохраняются в виде гликогена, который затем действует как источник углерода и энергии в последующих аэробных условиях (Shintani et al., 2000). Таким образом, считается, что эти микроорганизмы анаэробно конкурируют за субстраты с *Tetrasphaera* (Stokholm-Bjerregaard et al., 2017).

Как и в случае с ФАО, ГАО также метаболически разнообразны. Неспособность ГАО поглощать фосфор делает их нежелательными микроорганизмами в процессе биологического удаления фосфора, поскольку они конкурируют с ФАО за аналогичные источники углерода, такие как гликоген и некоторые формы ЛЖК.

3.3.2 Факторы, влияющие на исход конкуренции между ФАО и ГАО

Производительность систем биологического удаления фосфора зависит от преобладания ФАО в активном иле. Многие исследования были сосредоточены на условиях, которые дают ФАО конкурентное преимущество перед обычными гетеротрофными организмами и ГАО, чтобы поддержать плотность популяции ФАО и тем самым повысить эффективность процесса.

Важнейший фактор – наличие нелимитирующего количества фосфатов в среде (высокое отношение Р/ХПК). Низкая концентрация ХПК в среде, дает преимущество ФАО по сравнению с ГАО из-за более высокой пермеазной активности летучих жирных кислот ФАО (Burow et al., 2008). Снижение скорости подачи ХПК и поддержание низкой концентрации поступающей ХПК в сообществе с преобладанием ГАО может стимулировать увеличение доли ФАО (Tu, Schuler, 2013).

Учитывая уникальный метаболизм ФАО, важно соблюдение чередования анаэробной стадии, когда сточные воды содержат высокие концентрации ЛЖК, с последующей аэробной (аноксидной) стадией. При поступлении нитрата и/или кислорода в анаэробной стадии, процесс биологического удаления фосфора ухудшается из-за прямой конкуренции между гетеротрофами и ФАО за субстрат (Barnard et al., 1976; Hascoet, Florentz, 1985). Другие факторы, такие как присутствие магния (Mg^{2+}) и калия (K^+), которые служат противоионами PO_4^{3-} также имеют значение для развития биомассы ФАО (Brdjanovic et al., 1998).

С момента открытия ФАО (Mino et al., 1987) многие исследования были сосредоточены на факторах окружающей среды, влияющих на конкуренцию между ФАО и ГАО. Температура, рН, источник углерода, возраст активного ила, концентрация растворенного кислорода и накопление нитритов важные факторы в конкуренции между ФАО и ГАО (Oehmen et al., 2007; Lopez-Vazquez et al., 2009). ГАО способны конкурировать с ФАО за субстрат при температуре выше $20^{\circ}C$, при понижении температуры культивирования с 20 до $10^{\circ}C$ в изначально обогащенной ГАО циклической культуре наблюдалось постепенное вытеснение ГАО представителями ФАО (Brdjanovic et al., 1997). Наоборот, при повышении температуры ФАО вытесняются из системы мезофильными ГАО. Основанием для такого вывода служат факты увеличения доли ГАО при температурах выше $20^{\circ}C$, а также зависимость от температуры скоростей выделения фосфора и потребления ацетата в анаэробных условиях (Brdjanovic et al., 1997; Lopez-Vazquez et al., 2007).

При температуре ниже $20^{\circ}C$ в питательной среде должен присутствовать не только ацетат, но и пропионат, способствующий росту ФАО независимо от значения рН. В случае, когда в качестве источника углерода используется только ацетат или пропионат, рН должен быть выше $7,5$, чтобы способствовать росту ФАО (Lopez-Vazquez et al., 2009). В другом исследовании было продемонстрировано, что свободная азотистая кислота (которая является одной

из форм нитрита) может негативно влиять на метаболизм ФАО, что приводит к ухудшению процесса биологического удаления фосфора (Pіjuan et al., 2010).

Низкое отношение химической потребности в кислороде к азоту (ХПК/N) и высокая концентрация растворенного кислорода могут способствовать накоплению ГАО по сравнению с ФАО. На основе данных, полученных с помощью секвенирования генов 16S рРНК, было установлено, что снижение соотношения ХПК/N способствует накоплению ГАО и ДФАО, тогда как рост ФАО подавляется (He et al., 2018).

Аэрация также является фактором, влияющим на конкуренцию между ФАО и ГАО. Показано, что снижение интенсивности аэрации (He et al., 2017) и времени аэрации (He et al., 2018) может ингибировать рост ГАО и стимулировать накопление в микробном сообществе микроорганизмов с ФАО-метаболизмом. В этих исследованиях было показано, что за счет сокращения времени аэрации со 120 до 60 минут, доля ГАО значительно снижается.

Низкая концентрация субстрата дает конкурентное преимущество ФАО перед ГАО, поскольку ФАО могут использовать энергозатратный активный транспорт для анаэробного поглощения ацетата (Schuler, Jenkins, 2003). В этом исследовании было установлено, что ФАО производят примерно 1 моль АТФ/моль поглощенного ацетата во время анаэробной фазы, что превышает внутренние метаболические потребности для трансформации ацетата в ПГБ. Для переноса ацетата в клетку могут использовать активный транспорт. У ГАО нет избытка АТФ, доступного для анаэробного транспорта ацетата, и его переноса осуществляется посредством диффузии – гораздо более медленного процесса при низких концентрациях субстрата за пределами клетки.

Заключение к обзору литературы

Анализ литературы свидетельствует о том, что, несмотря на 65-летнюю историю исследования микробиологического процесса аккумуляции фосфата, длительный опыт использования фосфат аккумулярующих микроорганизмов в

процессах очистки сточных вод и большой экспериментальный материал по таксономическому и функциональному разнообразию фосфат-аккумулирующих прокариот, многие вопросы физиологии, метаболизма и геномики этих микроорганизмов остаются не исследованными.

Очевидно, что стандартные методы культивирования на жидких или твердых питательных средах не подходят для получения накопительных и чистых культур ФАО. Для получения высокообогащенных ФАО микробных сообществ, требуется разработка специальных биореакторов с автоматическим чередованием кислородных и бескислородных условий. Причем из-за относительно низкой скорости роста для получения накопительной культуры ФАО с содержанием целевого микроорганизма более 70% требуется обеспечить непрерывный режим работы биореактора в течение продолжительного времени (не менее 1 месяца). В современной литературе нам не удалось найти примеров лабораторий в РФ, где бы в последние годы проводились исследования ФАО в условиях непрерывного культивирования в лабораторных биореакторах.

Несмотря на длительный опыт использования и большое количество исследований, связанных с изучением этой группы микроорганизмов, их таксономический состав, физиологические особенности, а также взаимодействие с микроорганизмами в консорциуме активного ила требуют дальнейшего изучения для увеличения эффективности удаления фосфора и возможности применения на очистных сооружениях. В этой связи нами была поставлена задача разработать способ длительного культивирования ФАО в лабораторном биореакторе непрерывного действия в условиях, имитирующих реальные очистные сооружения. Такой биореактор позволит проследить за формированием микробного сообщества ФАО, а также исследовать закономерности его функционирования при изменении разных физико-химических параметров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА IV. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Биореактор для выращивания ФАО в циклическом аэробно-анаэробном режиме культивирования

Лабораторный биореактор для циклического культивирования микробного сообщества (рис. 6б), был создан на основе биореактора BIOSTAT В (фирмы «SARTORIUS»), имеющего рабочий объем 2 л, снабженного перемешивающим устройством и внешней рубашкой для термостатирования. Схема биореактора для культивирования представлена на рисунке 6а.

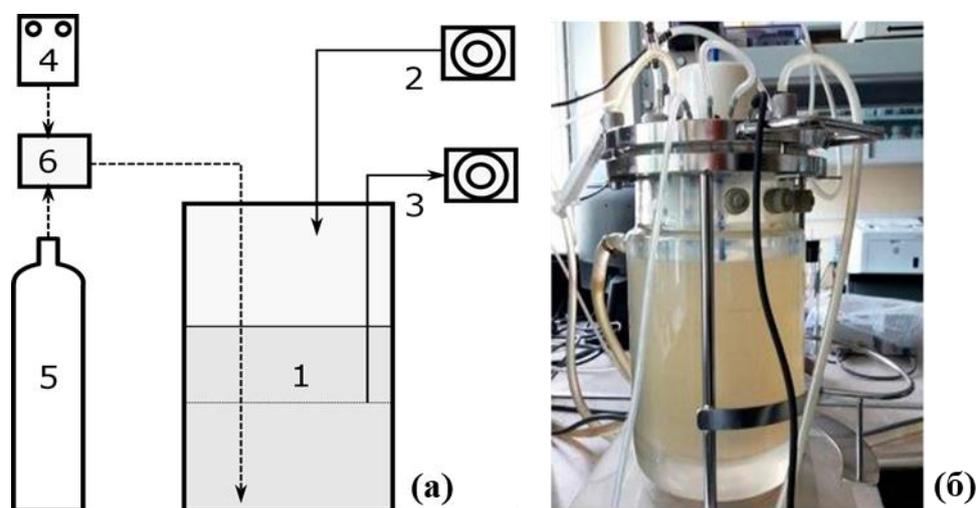


Рисунок 6. Биореактор для отъемно-доливного анаэробно/аэробного культивирования микроорганизмов. а – схема биореактора: 1 – биореактор; 2 – насос подачи среды; 3 – насос отведения культуры; 4 – воздушный компрессор; 5 – источник газообразного азота б – система регулирования подачи газов (цитировано по Пелевина и соавт., 2021); б – лабораторный биореактор.

Цикличность культивирования заключалась в чередовании анаэробных условий с присутствием ацетата (легкодоступного источника углерода и энергии) и аэробных условий без ацетата (после его потребления в анаэробный период). Подача свежей среды в биореактор и слив культуры осуществляли с помощью двух перистальтических насосов. Аэробные и анаэробные условия создавали за счет подачи в биореактор воздуха или азота, очищенного от следов кислорода, с использованием системы регулирования подачи газов (ООО

«ЭЛТОЧПРИБОР», РФ). Управление газовыми потоками и перистальтическими насосами осуществляли в автоматическом режиме с использованием универсального логического модуля LOGO (SIEMENS).

4.2 Условия культивирования

4.2.1 Отъемно-доливной биореактор

Каждый цикл культивирования микробного сообщества в отъемно-доливном биореакторе длился 6 ч и состоял из нескольких последовательных этапов (Пелевина и соавт., 2021):

(1) создание анаэробных условий продувкой реактора азотом в течение 5 минут со скоростью 5 л/мин (за это время концентрация O_2 в культуре падала ниже 0,05 мг O_2 /л), после чего в биореактор подавали питательную среду в объёме 0,5 л. Общая продолжительность этого этапа – 10 мин.

(2) анаэробный период, в течение которого культуру перемешивали мешалкой со скоростью 200 об/мин. Продолжительность анаэробного периода составляла 2 ч 50 мин.

(3) аэробный период, в течение которого микробное сообщество аэрировали воздухом. Продолжительность аэробного периода – 3 ч.

Через каждые четыре цикла выращивания (24 ч) в конце аэробного периода (за 5 мин до его окончания) прекращали подачу воздуха и 0,5 л культуры сливали из биореактора, обеспечивая тем самым удельную скорость протока системы $0,29 \text{ ч}^{-1}$, что в квазистационарном состоянии соответствовало возрасту культуры 3,4 сут (время генерации – 2,4 сут).

Для получения обогащенного ФАО активного ила выращивание в биореакторе проводили в нестерильных условиях, регулярно промывая подающие исходную среду шланги во избежание их обрастания, а также еженедельно перед заполнением промывая емкости для исходной среды кипяченой водой с температурой 90-95°C (Пелевина и соавт., 2021).

Питательная среда для отъемно-доливного способа культивирования, подобранная на основании мирового опыта лабораторного выращивания ФАО, имела следующий состав (г/л водопроводной воды): $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,708; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,046; KH_2PO_4 – 0,109; дрожжевой экстракт – 0,009; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,135 (Tchobanoglous et al., 2014).

4.2.2 Последовательно-периодический биореактор

Последовательно-периодический режим культивирования (SBR) включал период отстаивания, что обеспечило получение высокой плотности биомассы. Каждый SBR-цикл включал пять последовательных этапов:

(1) создание анаэробных условий – продувка реактора азотом в течение 5 минут со скоростью 5 л/мин (концентрация O_2 в культуре падала ниже 0,05 мг O_2 /л), подача питательной среды в объёме 0,8 л. Общая продолжительность этого этапа – 30 мин;

(2) анаэробная стадия, в течение которой культуру перемешивали мешалкой со скоростью 200 об/мин. Продолжительность – 2 ч 25 мин;

(3) аэробная стадия, в течение которой микробное сообщество аэрировали воздухом. Продолжительность – 2 ч 30 мин;

(4) стадия отстаивания – 30 мин;

(5) слив надосадочной жидкости – 5 мин.

В каждом SBR-цикле проводили замену 0,8 л среды, обеспечивая гидравлическое время пребывания 15 ч. Для удаления избыточной биомассы, в каждом 28-ом SBR-цикле исключали период отстаивания и отводили часть биомассы вместе со сливной жидкостью, поддерживая среднее время удержания биомассы 17,5 сут. Выращивание проводили при оптимальных для развития ФАО условиях: температура 18°C, pH 7,5–8,2, источник углерода и энергии – ацетат, соотношение фосфора к ацетату в среде – 0,09 P-моль/С-моль (McMahon et al., 2010).

Питательная среда для SBR-реактора имела следующий состав (г/л): $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,670; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,139; KH_2PO_4 – 0,109; дрожжевой

экстракт – 0,009; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,150; раствор микроэлементов – 1 мл/л. Состав раствора микроэлементов (г/л): $2Na$ -ЭДТА – 10; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 1,5; H_3BO_3 – 0,15; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,03; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,12; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,06; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,12; KI – 0,18; $CoCl \cdot 6H_2O$ – 0,15. Для предотвращения образования нитратов и развития денитрифицирующих бактерий, конкурирующих с ФАО за субстрат, в среду добавляли тиомочевину до конечной концентрации 2,5 мг/л. pH поддерживали 0,5 М раствором HCl.

4.3 Активный ил для начальной загрузки биореакторов

Образцы активного ила для загрузки биореакторов были отобраны из аэробного реактора блока удаления биогенных элементов Люберецких очистных сооружений (ЛОС) (рис. 7) в котором реализована технология Кейптаунского университета (УСТ), основанная на чередовании аэробного и анаэробного периодов.

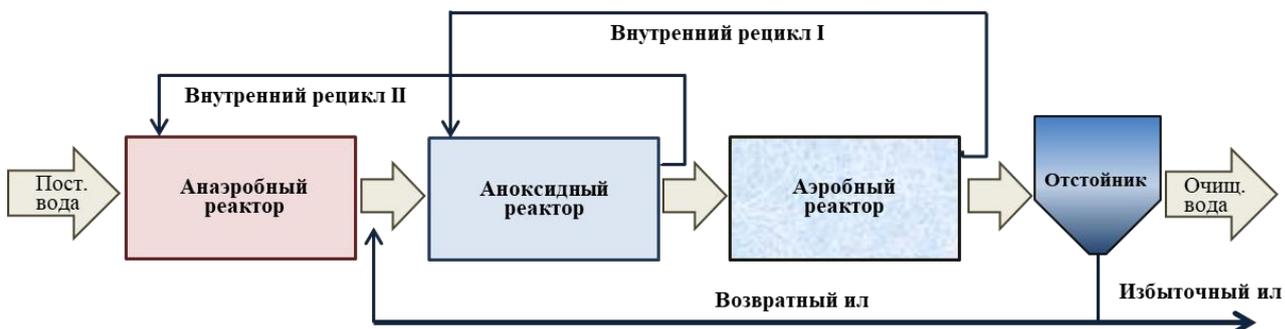


Рисунок 7. Технологическая схема блока удаления биогенных элементов ЛОС (цитировано по Данилович, 2014).

4.4 Аналитические методы

Значение pH среды измеряли с помощью pH-метра-иономера «Эксперт-001» (ООО Эконикс-Эксперт, Россия). В процессе культивирования в реакторе значение pH находилось в пределах 8,5-8,7.

Температуру культивирования микробного сообщества 18-20°C задавали с помощью термостата Haake® WKL 26 (Thermo Fisher Scientific, США).

Концентрацию фосфора определяли фотометрически с молибдатом аммония (ПНДФ 14.1:2:4.248-07) в подающейся в биореактор питательной

среде, на выходе из биореактора в конце аэробной и анаэробной фаз культивирования.

Балансовый расчет содержания фосфора в биомассе (P%) проводили по формуле:

$$P\% = 100 * (P_{in} - P_{out}) * SRT / (CB * HRT),$$

Где P_{in} и P_{out} – концентрация фосфора в подающейся и отводящейся из SBR среде соответственно; SRT – время удержания биомассы (сут); HRT – гидравлическое время пребывания (сут); CB – общее количество взвешенного вещества (г/л).

Концентрацию растворенного кислорода измеряли электрохимически с использованием кислородомера Oxi 197 (WTW, Германия).

Ацетат определяли на ВЭЖХ хроматографе Стайер (Аквилон, Россия). Образец центрифугировали, супернатант подкисляли 5 М H_2SO_4 до значений pH равных 2 и вводили в хроматограф. Разделение проводили на колонке Aminex HPX-87H (BioRad, США) в изократическом режиме с элюентом 25 мМ H_2SO_4 и расходом 0,6 мл/мин. Регистрацию сигнала проводили ультрафиолетовым детектором при 210 нм.

Общее количество беззольного взвешенного вещества ((БСВ), г/л) определяли гравиметрическим методом (ПНДФ 14,1:2:4.254-09) в отобранной из реактора пробе после её фильтрования и высушивания до постоянного веса при 105°C; рассчитывали как разницу по весу между массой высушенного ила и зольным остатком, определенным при сжигании (550°C) сухого образца в муфельной печи до постоянной массы.

4.5 Определение скорости потребления кислорода (СПК)

Для получения культуры в стандартном физиологическом состоянии с преобладанием эндогенного метаболизма, из последовательно-периодического биореактора в конце аэробного периода отбирали 800 мл культуры и хранили в холодильнике в течение 20 ч. Затем культуру аэрировали в течение 2 ч при 20°C. 100 мл культуры разбавляли в 5 раз солевым раствором (среда без ацетата

и дрожжевого экстракта) и добавляли 1 мл фосфатного буфера (конечный pH 7,1). Полученный образец помещали в герметичный стеклянный флакон без воздушной фазы и измеряли динамику эндогенного потребления O_2 , а затем – потребление O_2 после добавления источника углерода и энергии. Исходная концентрация субстратов, за исключением триптон, составляла 200 мг ХПК/л. Триптон добавляли до конечной концентрации 2 г/л. Были использованы соли ЛЖК (ацетат, пропионат, бутират, формиат), аминокислоты (глутаминовая кислота, аланин, серин, треонин, аспарагиновая кислота, лизин, глицин), глюкоза, этанол, сукцинат, пируват, глицерин, а также триптон.

Эксперименты проводили при температуре $20 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Концентрацию кислорода измеряли электрохимически с использованием кислородомера inoLab® Oxi 7310 с датчиком StirrOx G (“WTW”, Германия). Скорость поглощения кислорода рассчитывали на прямолинейном участке падения концентрации растворенного O_2 с дальнейшим пересчетом на удельную скорость потребления кислорода (СПК). За исключением оговоренных случаев, в дальнейшем использовали величины СПК за вычетом эндогенного дыхания:

$$\text{СПК} = \text{СПК}_{\text{sum}} - \text{СПК}_{\text{end}}, \text{ где}$$

СПК_{sum} – суммарная удельная скорость потребления кислорода

СПК_{end} – эндогенная удельная скорость потребления кислорода.

4.6 Определение доступных субстратов

Определение динамики потребления субстрата и фосфора проводили в острых опытах. Из последовательно-периодического биореактора в конце аэробной фазы отбирали 200 мл культуры и помещали в стеклянные сосуды емкостью 500 мл и закрывали пластиковыми крышками с отводами для подачи и вывода газа и среды. Для создания анаэробных условий в течение 10 мин через сосуды пропускали азот (0,3 л/мин), затем добавляли субстрат до конечной расчетной концентрации 200 мг ХПК/л. ХПК рассчитывали в соответствии с химической реакцией полного окисления органического вещества кислородом. Через 2 ч для создания аэробных условий культуру

барботировали воздухом (2 л/мин), обеспечивая концентрацию кислорода не ниже 2,0 мг O₂/л. В течение эксперимента прослеживали динамику концентрации фосфора и субстрата в среде. Температуру поддерживали 20±0,2°C.

4.7 Световая и электронная микроскопия

4.7.1 Световая микроскопия

Морфологию клеток исследовали на микроскопе «Olympus CX41» с фазовым контрастом («Olympus», Япония). Количество клеток (% от состава клеток всего сообщества), имеющих в своем составе различные включения, определяли на основании среднего значения, полученного при подсчете клеток в 80 полях зрения (Пелевина и соавт., 2021).

Микроскопические исследования агрегатов проводили после их разделения на 2 морфотипа. Агрегаты разделяли вручную с применением микроигл и микропипеток под бинокулярной лупой (Микромед MC-5-ZOOM-LED, Россия).

4.7.2 Трансмиссионная электронная микроскопия

Электронно-микроскопические исследования тотальных препаратов проводили на микроскопе JEM 100 (“JEOL”, Япония). Для приготовления препаратов клетки фиксировали 2,5% (масса/объем) глутаровым альдегидом в 0,05 М какодилатном буфере (pH 6,5) в течение 1 ч при 4°C, а затем фиксировали в 1% (масса/объем) OsO₄ в том же буфере в течение 4 ч при 20°C (Vasilyeva et al, 2006).

Метод рентгеновского микроанализа позволяет проводить быстрое определение элементного состава микробных объектов, как отдельных клеток, так и их скоплений, что позволяет получить информацию по содержанию интересующего нас фосфора и других элементов в сравнительном количественном соотношении друг к другу. Применение режима картирования

программы AZtec дает возможность увидеть наглядную картину распределения элементов в образце (Пелевина и соавт., 2021).

Рентгеновский микроанализ препаратов клеток проводили на микроскопе JEM-1400 (“JEOL”, Япония), оснащенный рентгеновским микроанализатором (“Oxford Instruments”, Великобритания), при ускоряющем напряжении 80 кэВ; угол наклона образца – 15°. Получаемые спектры анализировали с применением программы AZtec (“Oxford Instruments”, Великобритания). Эту же программу использовали для элементного картирования образцов.

Образцы для рентгеновского микроанализа готовили с использованием медных сеток для электронной микроскопии с нанесенной формваровой пленкой, напыленной углеродом, на которые наносили нативные препараты клеток. Сеточки высушивали и использовали для анализа (Пелевина и соавт., 2021).

4.7.3 Сканирующая электронная микроскопия

Тотальные препараты исследовали в сканирующем электронном микроскопе JSM-IT200 (“JEOL”, Япония). Препараты готовили следующим образом: образцы наносили на покровные стёкла и проводили фиксацию в спиртах восходящей концентрации (30% – 5 мин, 50% – 5 мин, 70% – 5 мин, 96% – 10 мин.), высушивали в течение суток. После напыления золотом образцы исследовали при напряжении 20 кВ.

4.7.4 Спектроскопия комбинационного рассеяния

Содержание и конформационное состояние молекул внутри клеток исследовали с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (Рамановская спектроскопия, КР) (Carey, 1999). Регистрацию сигнала КР осуществляли на конфокальном микроскоп-спектрометре NTEGRA-SPECTRA (NT-MDT, Россия) в диапазоне частотного сдвига 200-3000 см⁻¹ с шагом измерения 1 см⁻¹, охлаждение CCD камеры – 60°C, объектив 5× с апертурой

0,15, решетка 600, мощность лазера на образце 3мВт, длина волны возбуждения 532 нм. Для регистрации сигнала КР, 5 мкл раствора наносили на предметное стекло и накрывали вторым предметным стеклом, после чего помещали на предметный столик прибора. Через 5 минут после нанесения образца проводили регистрацию спектров с выбранных областей. Время регистрации одного спектра – 30 секунд. Количество повторов – не менее 10. После получения сигнала, спектр КР обрабатывали в программе Origin2017 (Origin Lab Corporation, США). Обработка сигнала включала в себя вычитание базовой линии и сглаживание спектра.

4.8 Молекулярные методы

Для выделения ДНК использовали набор DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Германия). Вариабельный V3-V4 регион гена 16S рРНК амплифицировали с использованием универсальных праймеров 341F (CCTAYGGGDBGCWSCAG) и 806R (GGACTACNVGGGTHTСТААТ) (Frey et al., 2016). Полученные ПЦР фрагменты использовали для приготовления библиотек для секвенирования с помощью наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) по протоколам производителя. Мультиплексовали с помощью наборов Nextera XT Index Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA). Фрагменты ПЦР были очищены с помощью магнитных частиц Agencourt AMPure beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Количество продуктов ПЦР определяли с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). ПЦР фрагменты секвенировали с использованием Illumina MiSeq (2 × 300 п.о. с обоих концов). Для каждого образца получали не менее 8 тысяч последовательностей фрагментов генов 16S рРНК. Парные перекрывающиеся чтения были объединены с помощью FLASH v1.2.11 в более длинные чтения (Magoc, Salzberg, 2011). Чтения из всех образцов были объединены вместе, исключены низкокачественные чтения, синглтоны и химеры. Оставшиеся чтения были кластеризованы в ОТЕ с минимальной идентичностью в 97%. Для определения доли ОТЕ в каждом из образцов, на репрезентативные последовательности ОТЕ были наложены

исходные чтения (включая низкокачественные и синглтоны) с минимальной идентичностью в 97% на всей длине чтения. Для выполнения всех этих процедур использовался пакет программ usearch (Edgar, 2010). Таксономическую идентификацию микроорганизмов по последовательностям генов 16S рРНК проводили с использованием usearch v2.14.1 SINTAX и базы данных Silva v138.1.

Метагеномные чтения были собраны *de novo* с использованием MetaSPAdes v3.15.4. Собранные контиги были кластеризованы в MAG с использованием трех различных программ биннинга: MaxBin v2.2.7, MetaBAT v2.15 и concoct v1.1.0. Оптимизированная схема бинирования была определена с помощью DAS Tool v1.1.4 на основе результатов трех программ биннинга. Полноту и загрязненность MAG оценивали с помощью CheckM v1.1.3, для присвоения таксономической классификации MAG использовался набор инструментов GTDB-Tk v2.0.0. Аннотация MAG KEGG была выполнена с использованием сервера аннотаций KAAS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА V. ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБНОГО КОНСОРЦИУМА, СПОСОБНОГО УДАЛЯТЬ ФОСФОР ИЗ СРЕДЫ ПРИ ОТЪЕМНО-ДОЛИВНОМ СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

5.1 Культивирование микробного сообщества в биореакторе отъемно-доливного типа

Микробные сообщества, обогащенные ФАО получают в лабораторных реакторах последовательно-периодического действия, принцип работы которых основан на чередовании анаэробных и аэробных фаз. Важным этапом является стадия отстаивания, которая обуславливает агрегацию микробного сообщества. Агрегаты имеют такую же сложную и многокомпонентную структуру, как активный ил очистных сооружений. Однако агрегирование микробного сообщества затрудняет проведение физиологических экспериментов. Получить микробное сообщество с минимальным количеством компонентов, в котором доминируют ФАО, в таких реакторах очень сложно.

Для получения микробного сообщества, обогащенного ФАО, был выбран циклический отъемно-доливной способ культивирования с перемешиванием в модифицированном биореакторе последовательно-периодического типа, обеспечивающем чередование аэробных и анаэробных условий (Пелевина и соавт., 2021). Существенным отличием от традиционного последовательно-периодического способа культивирования было постоянное перемешивание и отсутствие периода отстаивания культуры, обеспечивающее минимизацию образования агрегированных структур и получение гомогенного микробного сообщества.

Развитие фосфат-аккумулирующего микробного сообщества в биореакторе прослеживали в течение 22 суток после его инокулирования активным илом московских очистных сооружений. За этот период условия работы реактора поддерживали стабильными по основным показателям: составу и расходу подающейся питательной среды (в том числе содержанию

фосфора), температуре, интенсивности перемешивания, режиму подачи азота и воздушной смеси.

Концентрация биомассы (СБ) в биореакторе после его инокуляции активным илом составляла 3,43 г СБ/л, рН 8,5. В течение первых 15 суток происходило уменьшение массы взвеси до 0,2 г СБ/л за счёт ее вымывания и незначительное изменение рН до 8,9. За это время снижалось количество грубодисперсной примеси, после чего взвешенное вещество практически полностью было представлено микробной биомассой. С 15 до 22 суток концентрация микробной биомассы, а также значение рН водной фазы реактора держались на постоянном уровне, что свидетельствовало о стабилизации его работы. Одновременно с этим происходило постепенное уменьшение содержания фосфора в водной фазе реактора. Концентрация фосфора в подающейся в биореактор среде поддерживалась в пределах 22,2 – 23,5 мг/л. На 5 сутки культивирования была 4,9 мг/л, эффективность удаления фосфора составляла 21%. К 22 суткам разница между количеством фосфора в поступающей среде и среде биореактора в конце аэробного периода составила 11-12 мг P-PO₄/л, что соответствовало 50% эффективности удаления фосфора из поступающей среды (рис. 8) (Пелевина и соавт., 2021).

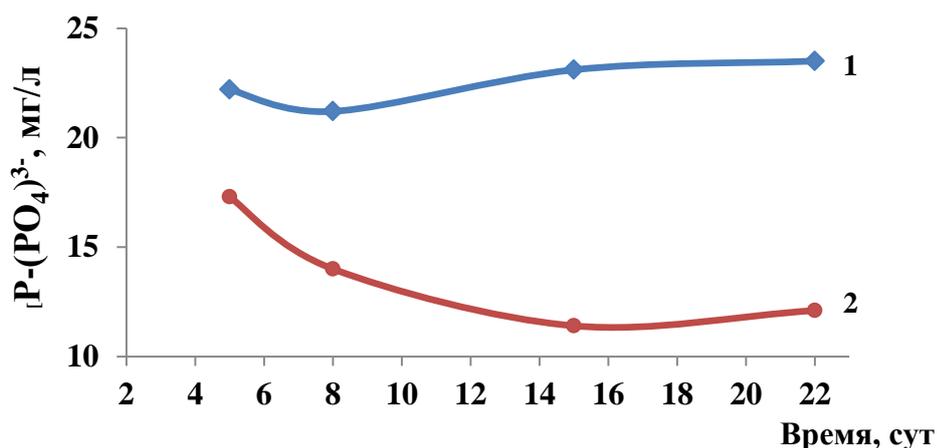


Рисунок 8. Динамика содержания фосфора в среде, подающейся в биореактор (1) и на выходе из биореактора в конце аэробного периода культивирования (2).

Динамика концентрации фосфора (рис. 9) свидетельствовала о цикличности процесса, при которой в анаэробный период содержание фосфора

увеличивалось до 21,5 мг/л, а в аэробный происходило уменьшение его концентрации до 10,5 мг/л в соответствии с известным механизмом биологического удаления фосфора.

Характер динамики концентрации фосфора указывал на то, что его удаление из среды было обусловлено работой ФАО, развивающихся в условиях циклического культивирования при высокой скорости роста (среднее время удержания биомассы 3,4 суток).

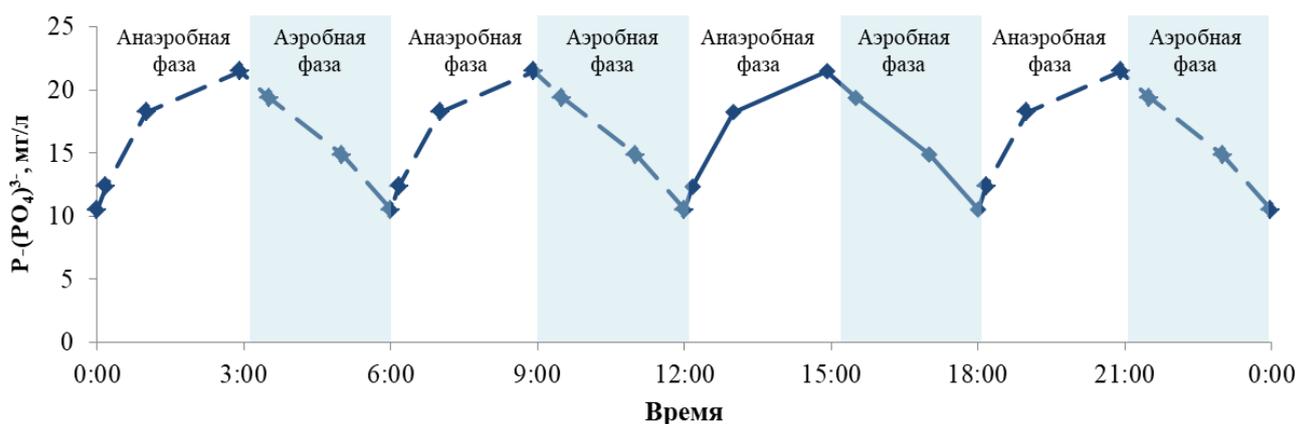


Рисунок 9. Динамика концентрации фосфора в отъемно-доливном биореакторе на 22 сутки культивирования.

Отъемно-доливной способ культивирования позволил получить фосфат-аккумулирующее микробное сообщество, отличающееся от сообщества флокулированного активного ила промышленного аэротенка, использованного в качестве инокулята, большей гомогенностью и низкой плотностью популяции. Количественные изменения концентрации фосфора в анаэробный и аэробный периоды и итоговое снижение содержания фосфора в среде указывали на развитие в биореакторе бактерий, которые отвечают за удаление фосфора аналогично процессам биологического удаления фосфора активным илом в очистных сооружениях. Обычно содержание фосфора в сточных водах составляет 4–8 мг/л (Qasim, Zhu, 2017) и снижается до концентрации менее 1 мг/л. При этом концентрация активного ила в промышленных реакторах, как правило, находится в пределах 2–4 г СБ/л. В наших экспериментах при концентрации биомассы на порядок меньше (0,2 г СБ/л), чем в промышленных очистных сооружениях, удаление фосфора достигало 12 мг/л, что по удельным

показателям удаления фосфора на единицу биомассы активного ила существенно выше.

5.2 Исследование состава микробного сообщества биореактора микроскопическими методами

Микроскопическое исследование микробного сообщества биореактора выявило морфологическое разнообразие бактериальных форм в его составе. Большинство (до 85%) клеток содержало включения (рис. 10). В целом, в сообществе доминировали вытянутые округлые клетки размером $(1-1,5) \times (2-3,5)$ мкм, которые содержали преломляющие свет структуры разного размера, расположенные вдоль клеток (рис. 10а). Крупные палочковидные клетки размером $(2-3) \times (3-5)$ мкм содержали мелкие плотные тёмные включения (рис. 10б). Наряду с ними в сообществе развивались клетки округлой формы размером $2,4 \times 3,3$ мкм со светящимися круглыми внутриклеточными структурами, которые располагались равномерно по всему объёму клетки (рис. 10в). Электронно-микроскопическое исследование подтвердило наличие в микробном сообществе клеток с разными включениями (рис. 10г, д) (Пелевина и соавт., 2021).

Для определения химического состава включений было сделано картирование микробного сообщества методом рентгеновского микроанализа, а также проведен анализ элементного состава отдельных бактериальных клеток. В клетках палочковидной формы размером $0,5 \times 2$ мкм были обнаружены электронно-плотные структуры, которые были идентифицированы, как включения фосфора (рис. 11а, б, таблица 1). Для подтверждения результатов картирования микробного сообщества, был проведён элементный анализ отдельных клеток сообщества, который показал, что содержание фосфора в клетках (спектры 51-54) было выше по сравнению с фоновым количеством этого элемента (таблица 1).

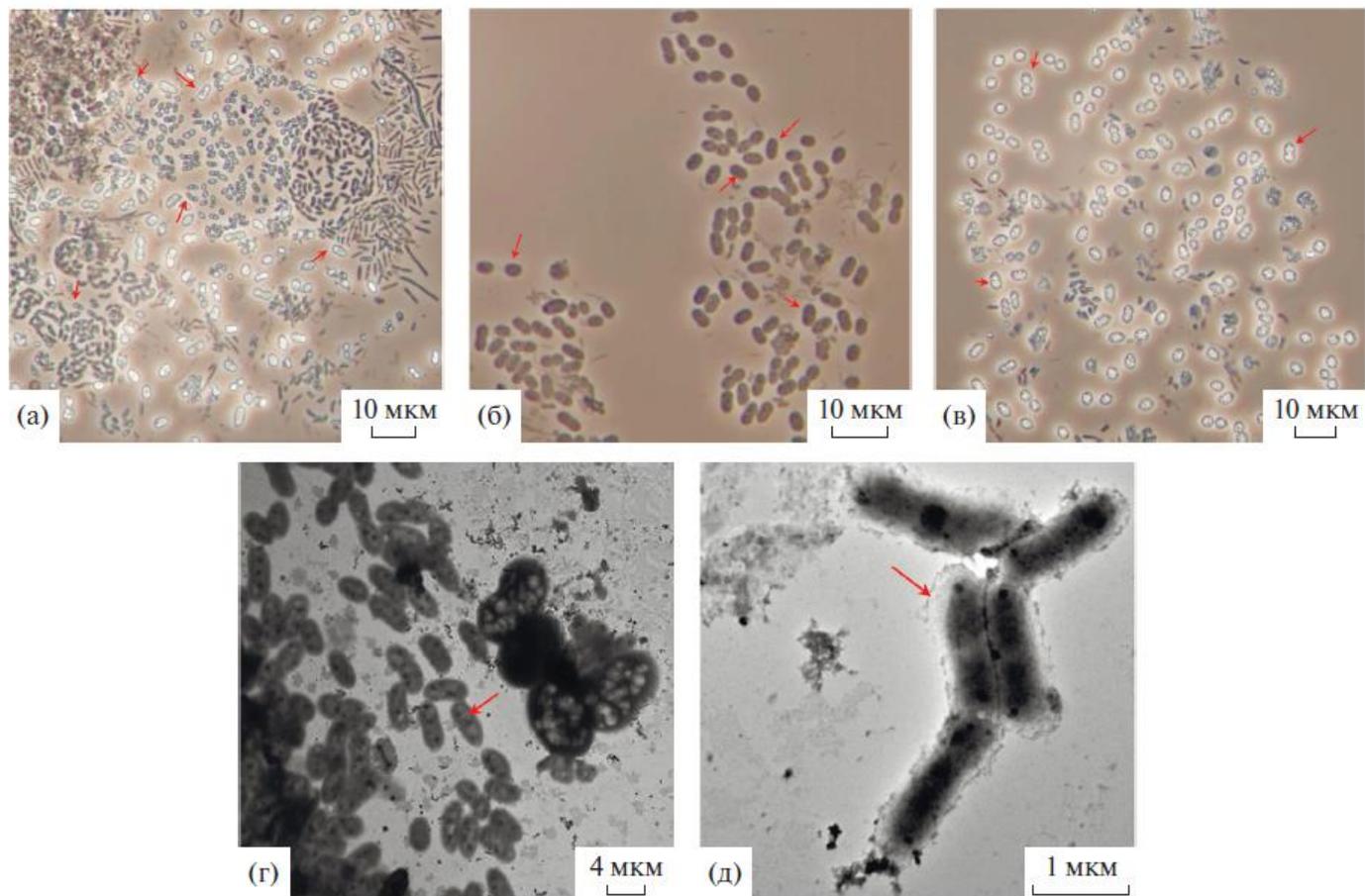


Рисунок 10. Морфологическое разнообразие клеток микробного сообщества в биореакторе: а–в – фазовый контраст, $\times 1000$; г – электронная микроскопия, $\times 800$; д – электронная микроскопия, $\times 1700$. Стрелками показаны клетки с включениями (Пелевина и соавт., 2021).

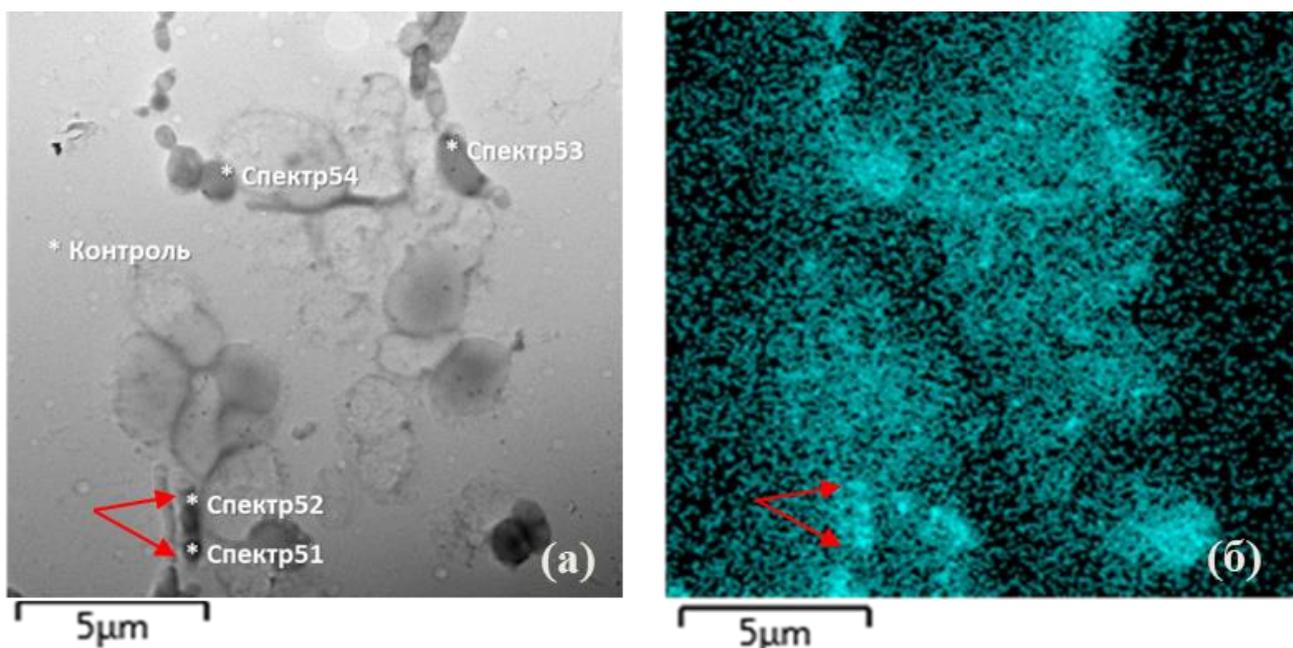


Рисунок 11. Элементный состав бактериальных клеток фосфат-аккумулирующего сообщества методом картирования с применением рентгеновского микроанализа. а – электронная фотография клеток; б – распределение фосфора в клетках сообщества; стрелками показаны обогащенные фосфором гранулы. Стрелками отмечены пики фосфора (Пелевина и соавт., 2021).

Включения фосфора (спектры 51 и 52) в палочковидных клетках содержали в 10 раз больше этого элемента по сравнению с контролем, а включения в изогнутых клетках (спектр 53) содержали в 8 раз больше этого элемента. Максимальное количество фосфора находилось в клетках кокковидной формы (спектр 54) (Пелевина и соавт., 2021).

Таблица 1. Содержание химических элементов в точках анализа, выраженное в процентах от общего содержания элементов

Номер спектра	Контроль (подложка без клеток)	Спектр			
		51	52	53	54
Содержание фосфора, %	0,15	1,63	1,59	1,31	3,16
Отношение концентраций фосфора в исследуемой точке к контролю	1	10,87	10,6	8,73	21,07

Картирование микробного сообщества методом рентгеновского микроанализа также позволило установить, что распределение отдельных химических элементов было неоднородно: часть элементов содержались внутри клеток, часть сорбировалась в межклеточном пространстве. В палочковидных клетках размером $(1-1,5) \times (2-3,3)$ мкм такие химические элементы как углерод, калий, сера и кальций были равномерно распределены в клетках, а фосфор, натрий и магний находились не только внутри клеток, но в межклеточном пространстве (рис. 12) (Пелевина и соавт., 2021).

Таким образом, было показано, что фосфор находился как на поверхности, так и внутри клеток фосфат-аккумулирующего микробного сообщества. Распределение этого элемента внутри клеток было неравномерным. Микроскопические методы исследования показали накопление фосфора в клетках разной морфологии, что свидетельствовало о развитии разных представителей группы ФАО в микробном сообществе биореактора.

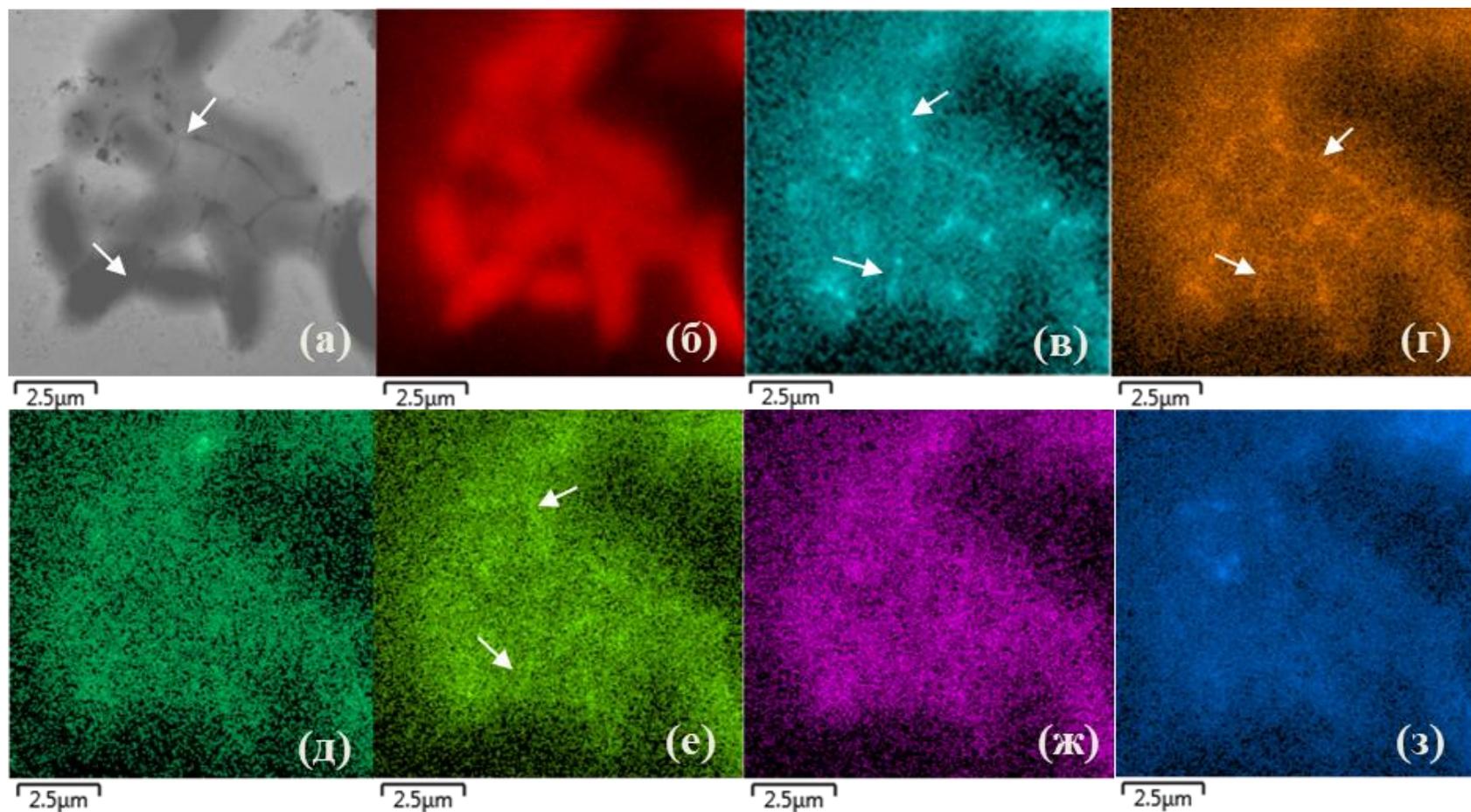


Рисунок 12. Элементный анализ микробного сообщества методом картирования с применением рентгеновского микроанализа. Цветом показано распределение отдельных химических элементов: (а) – электронная фотография сообщества; (б) – распределение углерода; (в) – распределение фосфора; (г) – распределение натрия; (д) – распределение калия; (е) – распределение магния; (ж) – распределение серы; (з) – распределение кальция, стрелками показано накопление химических элементов в межклеточном пространстве (цитировано по Пелевина и соавт., 2021).

5.3 Исследование состава микробного сообщества биореактора молекулярными методами

Таксономический анализ последовательностей фрагментов генов 16S рРНК (рис.13) показал, что в процессе своего развития микробное сообщество претерпевало изменения. На начальном этапе работы биореактора в составе микробного сообщества активного ила были обнаружены последовательности представителей доменов бактерий и архей. Доля архей составляла небольшую часть – 1,17% от общего количества последовательностей. Среди них доминировали метаногены порядка *Methanosarcinales* и представители некультивируемого кандидатного филума *Wosearchaeota*. Ближайшие гомологи найденных последовательностей генов 16S рРНК были обнаружены в очистных сооружениях, сбрасывающих осадки в анаэробных условиях, и метантенках (Kirkegaard et al., 2017).

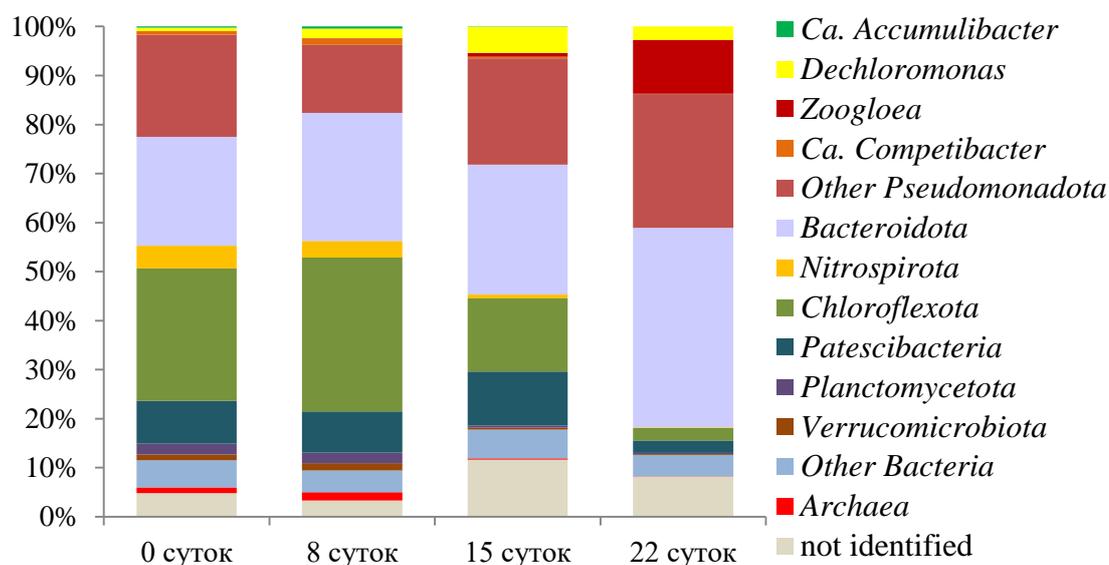


Рисунок 13. Таксономический состав микробного сообщества биореактора на основе анализа V3–V4 региона гена 16S рРНК.

Бактериальные последовательности относились к 19 различным филумам, среди которых доминировали представители филумов *Bacteroidota* (22,4%), *Pseudomonadota* (22,3%), *Patescibacteria* (8,8%), *Chloroflexota* (27,2%) и *Nitrospirota* (4,7%). Суммарно их доля от всех последовательностей генов 16S

рРНК составляла 85,4%. Филумы *Acidobacteriota*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota* и соавт. составляли минорную часть микробного сообщества (Пелевина и соавт., 2021).

Около 4,8% всех последовательностей фрагментов генов 16S рРНК относилось к неизвестным глубоким линиям и не были классифицированы даже на уровне филума. Большинство идентифицированных филумов ранее обнаруживались в биореакторах по очистке сточных вод (Wu et al., 2019).

По мере культивирования сообщества менялся его состав и снижалось таксономическое разнообразие. Доля архей в ходе работы биореактора снизилась до 0,01% (рис. 13). Доля остальных доминирующих в момент загрузки филумов *Patescibacteria* (8,8%), *Chloroflexota* (27,2%) и *Nitrospirota* (4,7%), в ходе работы биореактора значительно снизилась, до 2,66, 2,63 и 0,15%, соответственно. Филум *Patescibacteria* был описан совсем недавно на основании молекулярных данных (Hug et al., 2016; Parks et al., 2018) и в настоящее время не имеет представителей, полученных в чистых культурах. Основные метаболические особенности бактерий этого филума были предсказаны только на основании метагеномного анализа микробных сообществ. *Patescibacteria* имеют, как правило, небольшие геномы, при этом многие метаболические пути у них отсутствуют или они неполные. На основании этих данных предполагается, что бактерии этого филума являются либо паразитами, либо симбионтами.

В ходе работы биореактора большинство минорных групп микроорганизмов были элиминированы, среди них представители филумов *Fusobacteriota*, *Ca. Margulisiibacteriota*, *Ca. Latescibacterota*, *Spirochaetota*, *Elusimicrobiota*, *Gemmatimonadota*, *Armatimonadota* и *Ca. Omniphica*. Доли остальных минорных групп также снижались (Пелевина и соавт., 2021).

Число обнаруженных ОТЕ сократилось с 445 до 184. К 22 суткам культивирования 61% (10 наиболее многочисленных ОТЕ) всех последовательностей составляли ОТЕ, которые на начальном этапе работы биореактора составляли всего 1% сообщества.

Доли двух доминирующих при загрузке биореактора филумов *Bacteroidota* (22,4%) и *Pseudomonadota* (22,3%) в ходе культивирования в циклически изменяющихся условиях увеличились. Доля *Bacteroidota*, которые способны к разложению сложного органического вещества, возросла почти в два раза до 42,8% (Thomas et al., 2011; Fernández-Gómez et al., 2013; Hahnke et al., 2016). При этом основной рост приходился на виды, относящиеся к порядкам *Chitinophagales*, *Cytophagales* и *Sphingobacteriales*.

Бетапротеобактерии, доминирующие в большинстве исследованных микробных сообществ активных илов промышленных очистных сооружений (Yu, Zhang, 2012; Wu et al., 2019), в составе сообщества нашего биореактора были представлены семейством *Rhodocyclaceae*. В процессе развития микробного сообщества биореактора соотношение долей родов внутри этого семейства претерпевало существенные изменения. В частности, снижалась доля представителей рода *Thauera* (с 3,6 до 0,1% от общего числа чтений). Известно, что эти микроорганизмы способны разлагать широкий спектр органических кислот и ароматических соединений (Mechichi et al., 2002; Mao et al., 2010). В тоже время, увеличились доли представителей рода *Zoogloea* (с 0,09 до 11,5%), который встречается в составе большинства микробных сообществ активных илов (Zhang et al., 2012; Wu et al., 2019) и представителей рода *Dechloromonas* – с 0,74 до 11,1% от всех последовательностей гена 16S рРНК. Родственные им микроорганизмы были найдены в микробных сообществах различных очистных сооружений, в частности, ближайшие последовательности генов 16S рРНК были найдены в аэробном ферментере в Китае (LT841763 – 99%, LT842295 – 99% идентичности) (Dasgupta et al., 2019).

В лабораторном биореакторе в момент загрузки активным илом очистных сооружений бактерии *Ca. Accumulibacter* ожидаемо идентифицировались и были представлены двумя ОТЕ, доли которых составляли 0,01% и 0,2% и имели высокое сходство с последовательностями гена 16S рРНК, выявленных в SBR-реакторе по удалению фосфора (идентичность генов 16S рРНК 96%, NM046420) и биореакторах по очистке сточных вод (99% идентичности с

LR637422) (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015). Однако в процессе культивирования доли этих организмов снижались, и к 22 суткам работы биореактора они не были обнаружены в составе микробного сообщества.

Молекулярные методы не только подтвердили наличие фосфат-аккумулирующих бактерий в составе сообщества, но и позволили проследить динамику развития сообщества ФАО в целом и определить доминирующих представителей этой группы микроорганизмов. Хотя в активном иле очистных сооружений, который использовали как инокулянт, были идентифицированы известные фосфат-аккумулирующие бактерии семейства *Rhodocyclaceae* – *Ca. Accumulibacter*, которые считаются типичными для очистных сооружений (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015; Barr et al., 2016; Дорофеев с соавт., 2019), в процессе работы лабораторного биореактора доля этих организмов снижалась. В момент наиболее эффективного удаления фосфора микробным сообществом эти микроорганизмы не были идентифицированы в его составе. Доминирующими группами в этот момент были представители семейства *Rhodocyclaceae*, относящиеся к родам *Dechloromonas* и *Zoogloea*, доля последовательностей гена 16S рНК которых увеличилась за время работы реактора максимально по сравнению с долей последовательностей других бактерий. Эти микроорганизмы часто встречаются в активных илах очистных сооружений (Mao et al., 2015, Barr et al., 2016, Dasgupta et al., 2019, Wu et al., 2019) и у некоторых представителей этих родов были обнаружены внутриклеточные гранулы волютина (Roinestad, Yall, 1970).

Таким образом, в сконструированном биореакторе в процессе циклического отъемно-доливного культивирования развивались представители ФАО, которые не были характерны для крупномасштабных очистных сооружений (Artan, Orhon, 2005)

Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности использования отъемно-доливного способа культивирования активного ила очистных сооружений для получения фосфат-аккумулирующего микробного сообщества, но таксономическое разнообразие микробного сообщества в таком

биореакторе существенно отличается от активного ила очистных сооружений, который использовался в качестве посевного материала. Поэтому циклический отъемно-доливной способ культивирования оказался непригодным для лабораторного моделирования процессов фосфат-аккумуляции, происходящих на промышленных очистных сооружениях, и нам пришлось использовать другой способ непрерывного циклического последовательно-периодического культивирования.

По результатам данной работы была опубликована статья Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфора в циклическом аэробно-анаэробном культивировании // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – № 1. – С. 76-89.

ГЛАВА VI. ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩЕГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ПРИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОМ СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

6.1 Оценка эффективности удаления фосфора фосфат-аккумуляционным микробным сообществом при длительном культивировании активного ила очистных сооружений г. Москвы

Длительное культивирование микробного сообщества проводили в условиях непрерывной культуры в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия (SBR), работа которого основана на циклическом чередовании анаэробной и аэробной фаз. В течение 400 суток была прослежена динамика формирования микробного сообщества, способного удалять фосфор из среды, с использованием микробиологических и молекулярных методов.

В ходе длительного культивирования условия работы последовательно-периодического биореактора поддерживали стабильными по основным показателям: составу и расходу подающейся питательной среды (в том числе содержанию фосфора), температуре, интенсивности перемешивания, режиму подачи азота и воздушной смеси. Концентрация биомассы в реакторе в процессе культивирования изменялась в диапазоне 3,1 – 4,5 г СБ/л.

В течение анаэробной фазы каждого цикла (первые определения были проведены через 10 суток после начала эксперимента) наблюдали полное потребление ацетата в течение первых 60 мин анаэробной стадии. Циклического поглощения и выброса фосфора микробным сообществом в среду не наблюдалось (рис. 14а), что свидетельствовало о преобладании гетеротрофных бактерий, не участвующих в процессах фосфат-аккумуляции. К 40 суткам наблюдалась адаптация микробного сообщества активного ила к селективным условиям культивирования в реакторе, о чем свидетельствовало

наличие цикличности процесса полного потребления ацетата в анаэробной фазе с одновременным выделением в среду фосфора (рис. 14б).

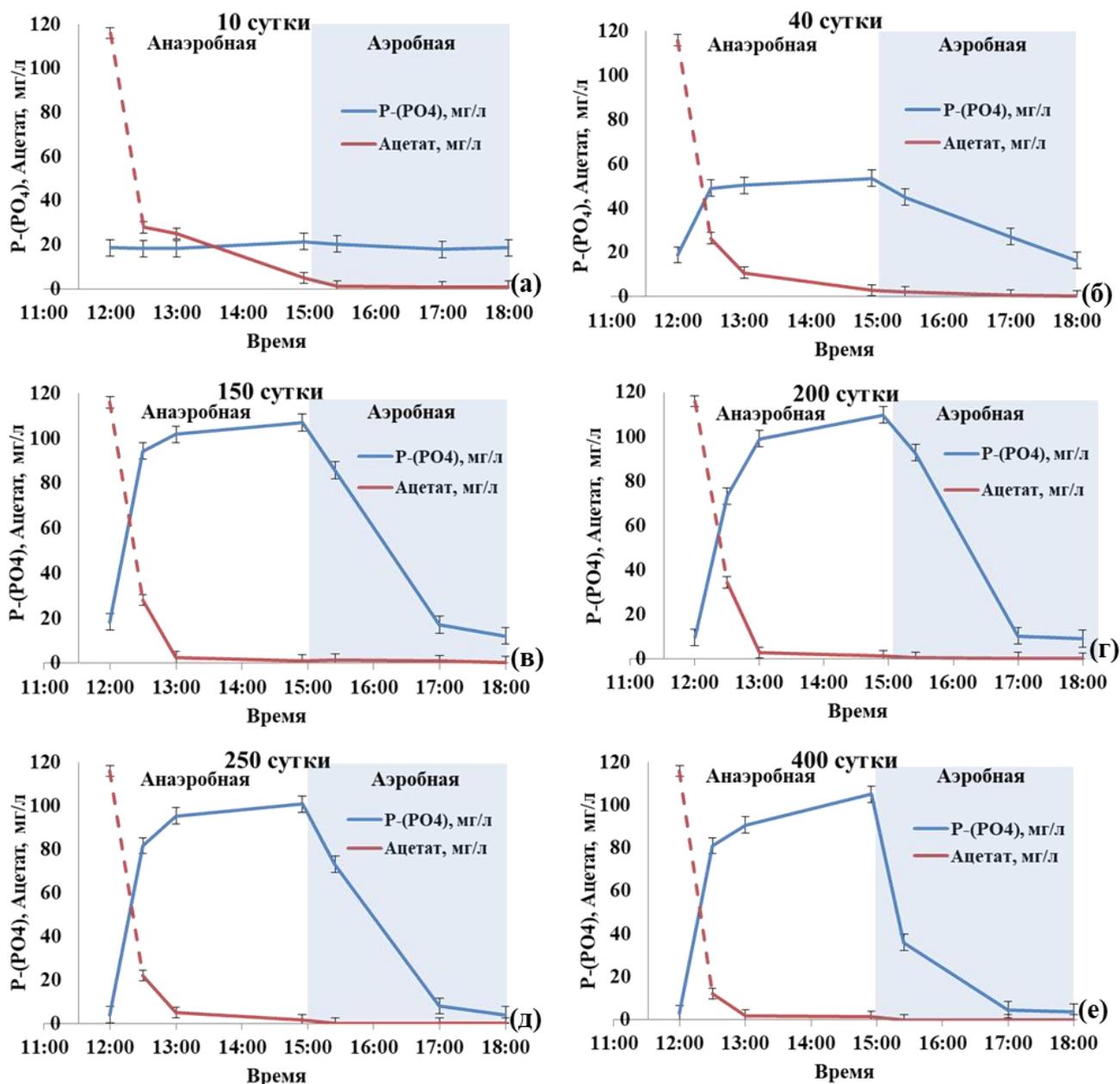


Рисунок 14. Динамика концентрации фосфора и ацетата в течение одного SBR-цикла: а – 10 сут, б – 40 сут, в – 150 сут, г – 200 сут; д – 250 сут, е – 400 сут культивирования.

Количественные показатели (таблица 2) концентрации фосфора в среде реактора в анаэробной фазе (максимум 55 мг P-PO₄/л) и концентрации фосфора в конце аэробной фазы цикла в среде ферментера – 16,3 мг P-PO₄/л, а также количество высвободившегося фосфора на единицу поглощенного ацетата

(отношение P/Ацетат) – 0,28 P-моль/С-моль свидетельствовали о невысокой эффективности процесса фосфат-аккумуляции и частичном использовании ацетата фосфат-аккумуляционными представителями микробного сообщества ферментера. Эффективность процесса фосфат-аккумуляции в этот период была невысокой и составляла всего 29,6% (таблица 2) – ацетат лишь частично использовался ФАО. Концентрация биомассы в реакторе (СБ) после 40 суток эксперимента варьировала в диапазоне 3,5–4,4 г СБ/л.

Таблица 2. Характеристики эффективности работы последовательно-периодического биореактора с момента запуска до 400 суток культивирования

	Сутки культивирования					
	10	40	150	200	250	400
Концентрация P в поступающей среде, мг/л	25	25	25	25	25	25
Содержание P в очищенной воде, мг/л	18,7	17,6	15,1	9,4	3,9	3,3
Эффективность удаления P, %	25,3	29,6	39,5	62,4	84,3	86,8
P _{max} , мг/л	21,5	53,6	106,9	109,8	100,7	105,0
P/Ац, P- моль /С-моль	<0,1	0,28	0,73	0,77	0,72	0,76
Ац/P, мг/мг	47,0	40	29,9	19,0	14,0	13,6
Концентрация биомассы г СБ/л ($\pm 10\%$)	3,1	3,6	4,1	3,5	3,6	4,4
Содержание в биомассе фосфора% от сухого веса (расчет)	4,5	8,1	8,5	12,0	16,0	13,8

Дальнейшее культивирование микробного сообщества в SBR реакторе к 150 суткам приводило к увеличению эффективности удаления фосфора из среды реактора до 39.5% (таблица 2).

В анаэробный период SBR-цикла ацетат так же, как и в предыдущий период, полностью потреблялся, но происходило существенное увеличение концентрации фосфора в среде (рис. 14в). В конце анаэробной фазы

концентрация фосфора достигала 100-110 мг P-PO₄/л, а в конце аэробной фазы падала до 10-15 мг P-PO₄/л. Количество высвободившегося фосфора на один поглощенный ацетат составляло 0,73 P-моль/С-моль и в дальнейшем существенно не изменялось.

Концентрация фосфора в конце анаэробного и аэробного периодов к 200 сут составляла 100-110 и 9 мг P-PO₄/л, соответственно (рис. 14г), отношение количества выделившегося фосфора к потребленному ацетату в анаэробную фазу цикла – 0,77 (P-моль/С-моль). Зольность биомассы в конце аэробной фазы SBR-цикла к 200 сут составила 36,0±1,0% от СБ. Содержание в биомассе фосфора было 10,6 ±0,1% от СБ. Балансовый расчет содержания фосфора в биомассе показал значения, близкие к экспериментальным данным (в среднем 12% СБ). Эффективность удаления фосфора в этот период составляла 62,4%.

В период 250-400 сут работа SBR была стабильной (рис.14д, е, таблица 2). Концентрация фосфора в конце анаэробного и аэробного периодов составляла 100-105 и 3-4 мг P-PO₄/л, соответственно. Эффективность удаления фосфора из среды увеличилась в 3.4 раза по сравнению с началом работы реактора и достигла 84-87%. Отношение количества делившегося фосфора к потребленному ацетату в анаэробную фазу цикла было в пределах 0,72-0,76 (P-моль/С-моль). Среднее расчетное содержание фосфора в биомассе составило 13,8% СБ. Количество ацетата, расходуемое на удаление фосфора, снизилось до 13,6-14,0 мг С/мг P.

На основании динамики фосфора в SBR-цикле можно заключить, что к 150 суткам в SBR сформировалось микробное сообщество, характеризующееся высокой степенью обогащения фосфат-аккумулирующими организмами и эффективно удаляющее фосфор из поступающей среды. Изменение концентрации ацетата и выброс фосфора в течение каждого SBR-цикла происходили в соответствии с биохимическими реакциями, характерными для фосфат-аккумулирующих бактерий. В анаэробных условиях при наличии субстрата и в отсутствие акцептора электронов происходило потребление ацетата и выброс фосфора из клеток. В аэробных условиях наблюдалось

поглощение фосфора из среды. На высокую степень обогащения ФАО через 150 суток работы SBR указывало высокое отношение P/Ацетат ($0,76 \pm 0,05$ Р-моль/С-моль), близкое к теоретически рассчитанным величинам в диапазоне рН 8-8,5 (Smolders et al., 1994). Рядом исследователей показано, что это отношение не связано с температурой культивирования, и по его величине предложено определять соотношение фракции ФАО и ГАО в культурах, включая биореакторы с гранулированной биомассой. У высокообогащенных фосфат-аккумулирующими организмами культур отношение P/Ацетат более 0,5 Р-моль/С-моль (Brdjanovic et al., 1997; Schuler, Jenkins, 2003; Bassin et al., 2012; Acevedo et al., 2017). В соответствии с этим критерием, полученное нами в лабораторном биореакторе микробное сообщество можно отнести к высокообогащенному фосфат-аккумулирующими бактериями, потребляющими практически весь субстрат (ацетат).

Также на высокую степень обогащения культуры фосфат-аккумулирующими организмами указывает высокая зольность биомассы (36% от сухого веса) и высокое содержание в ней фосфора (10,6% от сухого веса или 15,6% от беззольного вещества) (Schuler, Jenkins, 2003; Welles et al., 2015a). Близкое содержание золы (до 40%) выявлено в SBR с аэробным гранулированным активным илом с высоким содержанием ФАО (Bassin et al., 2012). Manas и соавторами показали, что при рН 7,8-8,8 высокая зольность и содержание фосфора в гранулах могут быть связаны с химическим осаждением части фосфора в виде гидроксилапатита ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) (Manas et al., 2011). Однако в ходе микроскопических исследований мы не наблюдали никаких внеклеточных минеральных частиц во взвешенном веществе биореактора. Это свидетельствует о том, что фосфор находился главным образом в виде внутриклеточных полифосфатов

6.2 Исследование микробного сообщества биореактора с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния

Микроскопическое исследование микробного сообщества биореактора выявило большое разнообразие морфологических форм. Среди них четко выделялись овальные клетки с крупными включениями, большинство из которых формировали агрегаты (рис. 15а). Исследование этих клеток с помощью метода КР-спектроскопии позволило обнаружить полосы, характерные для колебания различных связей органических соединений и фосфора (рис. 15б, таблица 3). Были выявлены полосы колебаний, характерные для белков и жирных кислот, а также для связей О-Р-О, фосфатных групп PO, PO₄, С-Н деформации PO₄³⁻, антисимметричные растяжения PO₂ и полоса колебаний растяжения связи Р-ОН (таблица 3).

Таблица 3. Характеристика полос КР-спектра

Положение пика, см ⁻¹	Характеристика*
478	колебания О-Р-О
748	колебания фосфатных групп PO
1004	карбонат ион CO ₃ ²⁻ или CH ₃ -колебания
1082	колебания PO ₄ , полоса F2
1128	С-Н деформации, PO ₄ ³⁻ v ₃ колебание
1152	Колебания С-С связи, антисимметричные растяжения PO ₂
1180	С-Н деформации
1440	N=N растяжения
1510	Колебания С=С связи
1583	Колебания амида I
2435	Колебания растяжения связи Р-ОН
2880, 2930, 2960	белки и липиды, С-Н группы жирных кислот и белков или воды

* Zhang, Silva, 2010; Jillavenkatesa, Condrate, 1998; Penkov, 2021; Frost et al. 2014

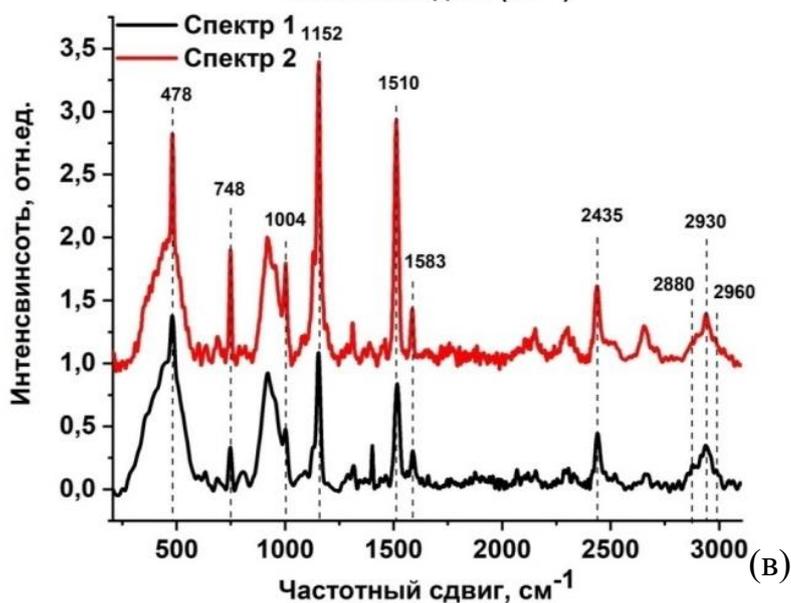
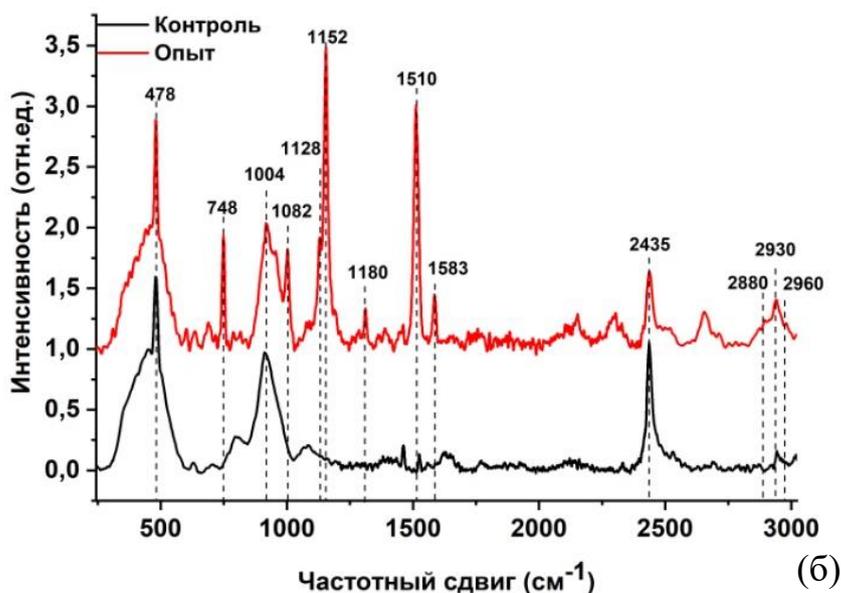
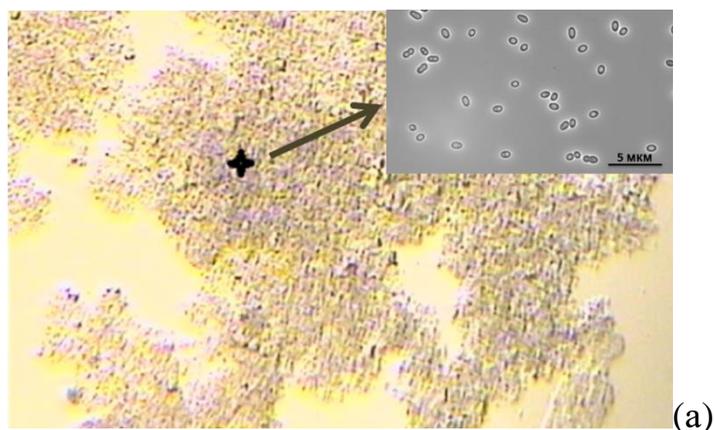


Рисунок 15. КР-спектроскопия клеток с включениями: а – микрофотография с обозначением места проведения анализа; б – КР спектр исследуемых клеток на 150 сутки культивирования; в – КР спектр исследуемых клеток в конце анаэробного периода (спектр 1) и в конце аэробного периода SBR-цикла (спектр 2). Представленные графики нормированы на максимум интенсивности полосы стекла — 916 см^{-1} .

Наличие полос КР спектра, характерных для С-Н, С-С -связей органических соединений и связей PO_4 (полоса 1128 см^{-1} - С-Н деформации, PO_4^{3-} ν_3 колебание, 1152 см^{-1} -колебания С-С связи, антисимметричные растяжения PO_2), указывает на существование центров связывания фосфатов с молекулами клетки. На рисунке 15в представлены КР спектры образцов клеток, отобранных в разных фазах SBR-цикла. Сравнение интенсивности полос 478 см^{-1} , 748 см^{-1} и 1152 см^{-1} , полученных для клеток, находящихся в различных фазах SBR-цикла, показало, что содержание фосфора в клетках в конце аэробного периода (спектр 2) существенно выше, чем в конце анаэробного периода SBR-цикла (спектр 1) (рис. 15в). Эти результаты полностью соответствуют данным по динамике концентрации фосфора в среде биореактора. Несмотря на то, что интенсивность полос спектра изменялась, их смещения не происходило, что свидетельствовало об отсутствии конформационных изменений внутриклеточных фосфора при их потреблении клетками или высвобождении в среду. Отметим, что при минимальном содержании в клетках фосфора в спектрах КР выявлена полоса 1440 см^{-1} , характеризующая N=N растяжения в молекулах (рис. 15в, таблица 3), которой не наблюдается в клетках при максимальном содержании фосфора. Этот сопряженный с динамикой фосфора процесс требует дальнейшего исследования.

По результатам данной работы была опубликована статья Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеев А.Г., Слатинская О.В., Максимов Г.В., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. *Candidatus* Accumulibacter sp. – основной представитель фосфат-аккумулирующих бактерий микробного сообщества лабораторного биореактора // Микробиология. – 2022. – Т. 91. – № 5. – С. 631-637.

6.3 Динамика микробного сообщества биореактора на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК

Изменение разнообразия микробного сообщества в процессе работы реактора в режиме SBR представлено на рисунке 16. В начале эксперимента в реакторе наблюдалось наибольшее разнообразие микробного сообщества, состав которого соответствовал составу микробного сообщества активного ила, использованного для загрузки биореактора (таблица 4).

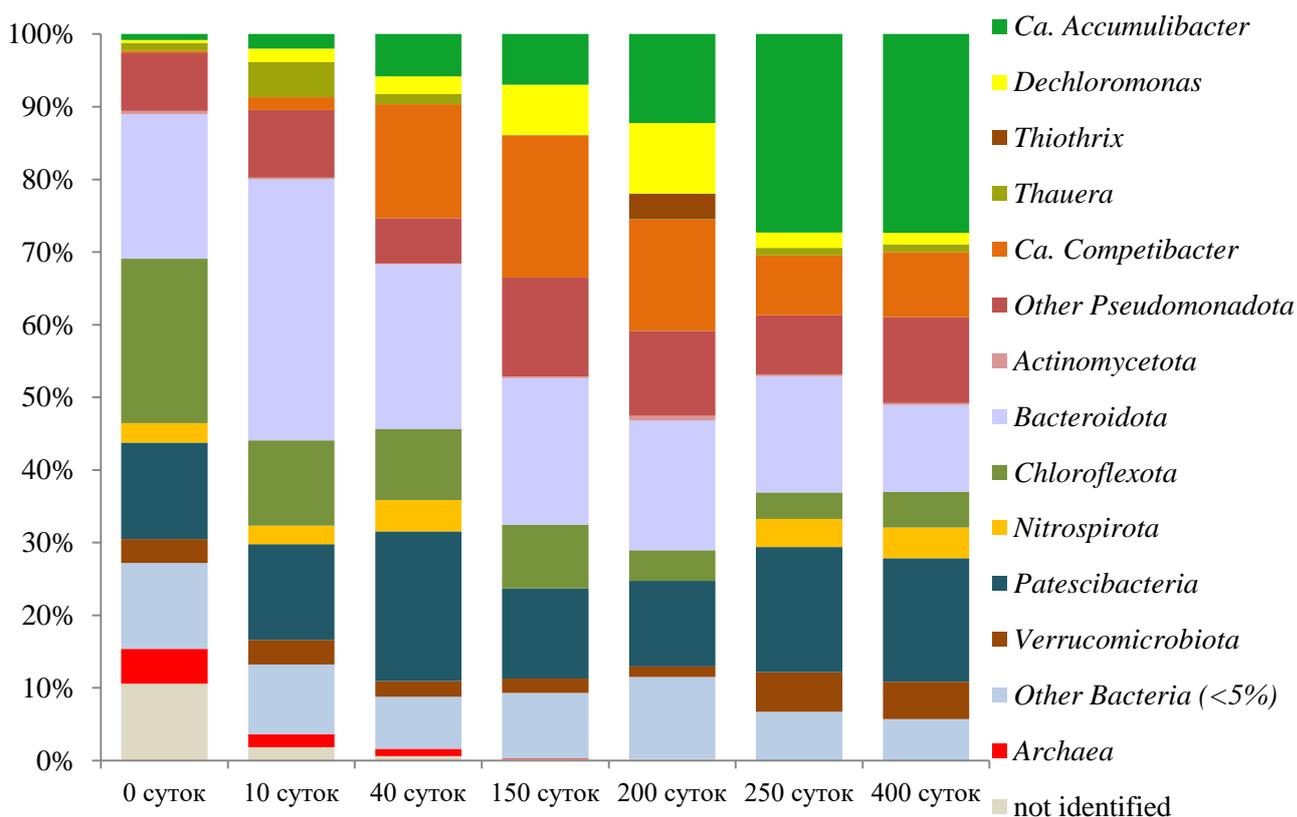


Рисунок 16. Изменение таксономического разнообразия микробного сообщества в процессе работы реактора в режиме SBR.

Таблица 4. Альфа-разнообразие микробного сообщества SBR на разных этапах культивирования

Время, сутки	chao1	shannon_10
0	775,1	2,27
10	733,1	2,34
40	522,6	2,11
150	396,3	1,92
200	349,8	1,82
400	319,1	1,65

Самыми многочисленными в составе микробного сообщества активного ила были представители филума *Chloroflexota* с долей 19,50% в составе сообщества. В меньших количествах были обнаружены представители филумов *Bacteroidota* (17,80%), *Patescibacteria* (11,90%), *Pseudomonadota* (9,49%). В долях от 1% до 5% присутствовали: представители *Muxococcota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota*, *Bdellovibrionota*, *Nitrospirota* и *Nanoarchaeota*. Филум *Chloroflexota* был преимущественно представлен микроорганизмами семейства *Anaerolineaceae* (15,50%). Основной представитель этого семейства – некультивируемый организм (UTCFX1) – 10,29%, ближайшие гомологи которого обнаружены в активном иле муниципальных сточных вод в Китае (Wang et al., 2014).

Филум *Bacteroidota* в основном был представлен некультивируемыми организмами класса *Bacteroidia*, принадлежащими порядкам *Chitinophagales*, *Cytophagales*, *Sphingobacteriales*. Основная доля бактерий филума *Patescibacteria* приходилась на представителей *Parcubacteria* (9,04%), а филума *Pseudomonadota* на представителей порядка *Burkholderiales* (5,64%). В состав *Burkholderiales* входят, в том числе представители фосфат аккумулярующих бактерий (ФАО) – *Ca. Accumulibacter* – 0,71%) и гликоген аккумулярующих бактерий (ГАО) – *Ca. Competibacter* 0,29%. Доля ещё одного предполагаемого представителя ФАО – *Dechloromonas* (Petriglieri et al., 2021) составляла 0,35%. Среди отдельных ОТЕ стоит выделить класс *Nitrospira*, представители которого составили 2,21% от общего числа организмов. *Nitrospira* способны участвовать в процессах удаления азота из сточных вод (Abbas et al., 2022).

На 10 сутки культивирования в составе сообщества произошли изменения – доли *Bacteroidota* и *Pseudomonadota* увеличились практически в два раза относительно стартовой точки, составив 33,28% и 18,69% соответственно. Несмотря на то, что доля фосфат аккумулярующих бактерий – *Ca. Accumulibacter* выросла в ~ 2,5 раза, она оставалась невысокой и составила 1,76%, что не способствовало значительному потреблению фосфора из среды.

Доля *Ca. Competibacter* увеличилась более чем в 5 раз и составила 1,62%. Таким образом, доли потенциальных ФАО и ГАО были практически одинаковыми.

Количество *Chloroflexota* сократилось в 2 раза и составило 10,69%. Доли менее представленных филумов *Acidobacteriota*, *Bdellovibrionota*, *Мухосoccota*, *Nitrospirota*, *Planctomycetota*, *Verrucomicrobiota* и *Nanoarchaeota* остались в пределах 1-5% от всего сообщества. К 10 суткам увеличилась доля *Elusimicrobiota*, которая в момент запуска составляла 0,30% и возросла до 1,11%.

Среди отдельных ОТЕ стоит отметить сокращение доли *Anaerolineaceae* с 15,50% до 7,94%, обусловленное падением ОТЕ UTCFX1 до 4,60%. Значительно увеличилась доля ОТЕ *Ca. Kaiserbacteria* - с 0,80% (на этапе запуска биореактора) до 5,35% к 10 суткам культивирования.

Дальнейшее культивирование микробного сообщества в лабораторном реакторе привело к последующим изменениям в составе сообщества (рис. 17). К 40 суткам увеличилось количество представителей филумов *Pseudomonadota* и *Patescibacteria*, достигнув 31,21% и 20,50% соответственно. Доли *Chloroflexota* и *Bacteroidota* уменьшились до 9,36% и 22,00%. К числу наиболее представленных отдельных ОТЕ относились два представителя *Ca. Competibacter* с долями 5,28% и 7,37%. Суммарно на *Ca. Competibacter* приходится 15,22% сообщества, в то время как на *Ca. Accumulibacter* – 5,41%. Таким образом, с момента запуска биореактора доля представителей *Ca. Competibacter* возросла почти в 50 раз, а доля *Ca. Accumulibacter* возросла более чем в 7 раз. Другими таксономическими группами со сравнительно крупной долей в микробном сообществе были *Sphingobacteriales* OPS_17 – 3,89%, *Nitrospira* – 4,15%, *Gracilibacteria* – 4,21%, *Ca. Moranbacteria* – 3,48% и *Ca. Kaiserbacteria* – 6,23%.

К 150 суткам культивирования доля представителей филума *Pseudomonadota* возросла более чем в четыре раза по сравнению с инокулятом и достигла 45,34%. Увеличение представителей филума *Pseudomonadota* было связано с увеличением доли ГАО *Ca. Competibacter*, которая возросла до

18,54%, тогда как доля ФАО *Ca. Accumulibacter* увеличилась незначительно (до 6,43%). Доли представителей клады *Patescibacteria* и филумов *Bacteroidota* и *Chloroflexota* относительно предыдущей точки (40 суток) снизились до 9,38%, 19,62% и 8,18% соответственно. Из отдельных ОТЕ наблюдалось увеличение доли некультивируемых *Kapabacteriales* sp. – 2,91% и *Holophagaceae* sp. – 2,21%.

За время с 150 до 200 суток работы реактора доля представителей *Pseudomonadota* продолжала увеличиваться и достигла 52,16% от всего микробного сообщества. Соотношение представителей *Pseudomonadota* перераспределялось. На *Ca. Competibacter* приходилось 14,54%, что указывало на снижение их доли в сообществе, а доля *Ca. Accumulibacter*, напротив, возросла почти в 2 раза и составила 11,37%. На данном этапе работы биореактора *Ca. Competibacter* и *Ca. Accumulibacter* стали доминирующими микроорганизмами в составе сообщества. Вторыми по представленности в биореакторе в этот период стали бактерии филума *Patescibacteria* – 11,43%. Как и в предыдущий период доли представителей филумов *Bacteroidota* и *Chloroflexota* продолжали снижаться и составили 18,14% и 4,16%, соответственно.

К 250 суткам в микробном сообществе наблюдалось продолжение роста доли представителей филума *Pseudomonadota* (59,13%), в частности на долю представителей класса *Gammaproteobacteria* приходилось 53,19%. На данном этапе доля представителей *Ca. Accumulibacter* составляла 14,72%, а *Ca. Competibacter* возросла до 19,35%. Сохранилась тенденция к снижению количества представителей филума *Bacteroidota* относительно предыдущих суток – 13,90%. Относительное количество представителей *Chloroflexota* увеличилось и достигло 9,89%. На 250 сутки наблюдалось резкое падение доли представителей клады *Patescibacteria* до 1,70%.

Суммарная доля представителей филума *Pseudomonadota* в сообществе к 400 суткам работы реактора изменилась незначительно и составила 48,76%. В это время доля представителей *Ca. Accumulibacter* достигла наибольшего

значения и составила 26,28%, а *Ca. Competibacter* – 7,80%. Следует отметить, что доля бактерий филума *Bacteroidota* снизилась до 13,58%, в то время как доля *Patescibacteria* увеличилась до 16,30%. Необычным является увеличение доли представителей филума *Nitrospirota*, представленных исключительно бактериями рода *Nitrospira* (3,84%), способными окислять соединения азота до нитрата.

6.4 Формирование пространственных структур микробным сообществом фосфат-аккумулирующих бактерий в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия

В процессе развития в реакторе фосфат-аккумулирующего микробного сообщества из активного ила очистных сооружений, который использовали в качестве загрузки, происходило формирование хорошо выраженных структур – агрегатов (рис. 17).

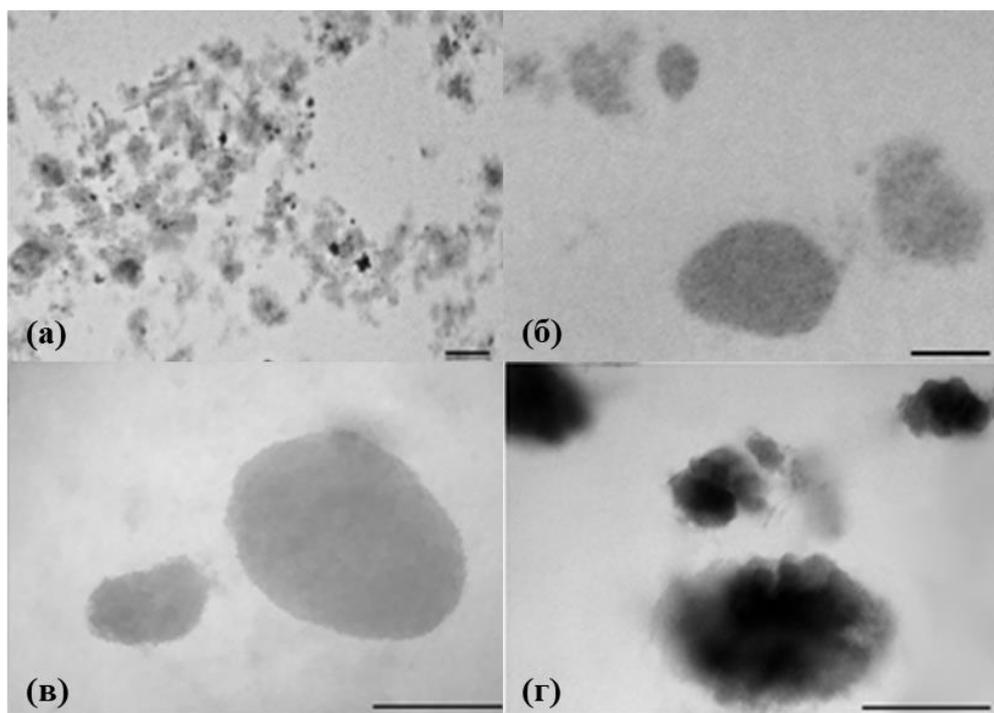


Рисунок 17. Агрегаты, формирующиеся микробным сообществом в реакторе: а – активный ил, которым был инокулирован реактор (загрузка); б – агрегаты, сформированные фосфат-аккумулирующим микробным сообществом к 400 суткам; в и г – агрегаты, морфотип I; – морфотип II. Масштабная линейка – 0,2 мм.

На рисунке 17а представлен флокулированный активный ил, которым был инокулирован реактор. В процессе его культивирования и адаптации микробного сообщества ила к селективным условиям реактора наблюдалось изменение видового состава сообщества и к 400 суткам культивирования происходило формирование им структуры, которая морфологически отличалась от структуры ила (рис. 17б). В ходе работы реактора и развития фосфат-аккумулирующего микробного сообщества изменялась морфология ила и к моменту начала аккумуляции фосфора в реакторе сформировались 2 морфологически разные структуры агрегатов, которые были обозначены нами как – морфотип I (рис. 17в) и морфотип II (рис. 17г). Агрегаты I морфотипа представляли собой однородные плоские округлые образования белого цвета с ровными краями, размеры которых варьировали от 0,1 мм до 0,7 мм (рис. 18г). Агрегаты II морфотипа были представлены структурами неправильной формы коричнево-серого цвета с неровными краями и размерами от 0,1 до 0,5 мм (рис. 19е). Соотношение агрегатов первого типа ко второму на 250 сутки составляло 3:1. С помощью электронно-микроскопических методов был исследован каждый тип этих агрегатов.

Исследование агрегатов с использованием сканирующей электронной микроскопии показало, что в агрегатах I морфотипа доминировали однородные по морфологии бактерии овальной формы, которые находились практически в одной плоскости. Для идентификации фосфат-аккумулирующих бактерий в составе сформированных агрегатов было проведено исследование элементного состава клеток сообщества с использованием рентгеновского микроанализа. Сообщество агрегатов I морфотипа было достаточно однородным и состояло из овальных клеток размером $1,0 \times 1,7$ мкм (рис. 18а, б). Картирование показало, что каждая овальная клетка содержала одно включение, занимающее почти весь ее объем (рис. 18в). Анализ элементного состава этих включений показал наличие в них высокого содержания фосфора, а также наличие калия и магния (рис. 18д).

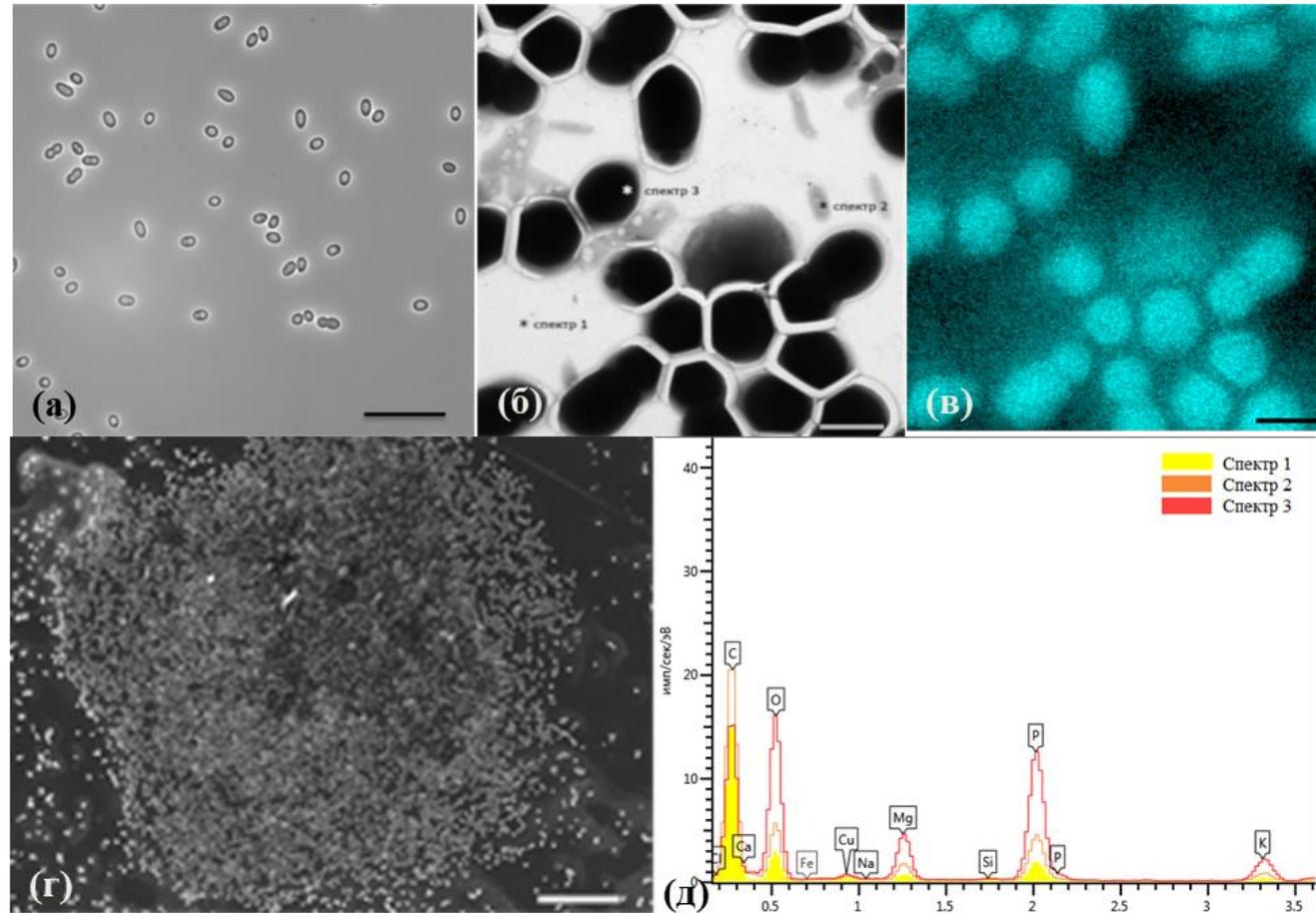


Рисунок 18. Исследование агрегатов морфотипа I, 250 сут культивирования: а – фазово-контрастная микроскопия (масштаб 10 мкм); б - электронная фотография тотальных препаратов клеток (масштаб 2 мкм); в – рентгеновский анализ образца Б в режиме картирования, голубым цветом показано распределение фосфора; г – поверхность агрегата в сканирующем режиме (масштаб 50 мкм); д – рентгеновский анализ клеток: спектр 1 – контроль (фоновое внеклеточное содержание химических элементов); спектр 2 – содержание химических элементов в мелких клетках без включений; спектр 3 – содержание химических элементов в крупных овальных клетках с включениями.

Клетки в агрегатах II морфотипа находились в слизистом полимерном матриксе и содержали в своем составе большое разнообразие форм: кокков и палочек разных размеров, нитчатых бактерий (рис. 19 а, д, е). Картирование агрегатов (рис. 19б) показало, что клетки двух морфологических форм (крупные овальные и палочковидные) имели включения фосфора. Овальные клетки были идентичны клеткам доминирующим в агрегатах I морфотипа, и содержал одно большое включение. Палочковидные клетки были меньшего размера (0,7-1,5 мкм) и имели в своем составе 2 небольших круглых включения. Анализ элементного состава включений обоих типов клеток показал, что их включения содержали высокое содержание фосфора по сравнению с контролем. Содержание фосфора в клетках с единичным включением было в 2 раза выше о содержания фосфора в клетках с двойными включениями (рис. 19в, г). Таким образом, выявлено несколько морфологических форм клеток, накапливающих фосфор, что указывает на их принадлежность к ФАО.

К 400 суткам культивирования было обнаружено, что произошла селекция агрегатов микробного сообщества биореактора, в результате которой остался один тип агрегатов – сходный с агрегатами морфотипа I (рис. 20в, г). Микроскопические исследования подтвердили доминирование в них овальных клеток размером 1,0×1,7 мкм, доминирующих в агрегатах морфотипа I. Картирование и анализ элементного состава крупных клеток овальной формы также показали наличие одного включения с высоким содержанием фосфора (рис. 20б, д).

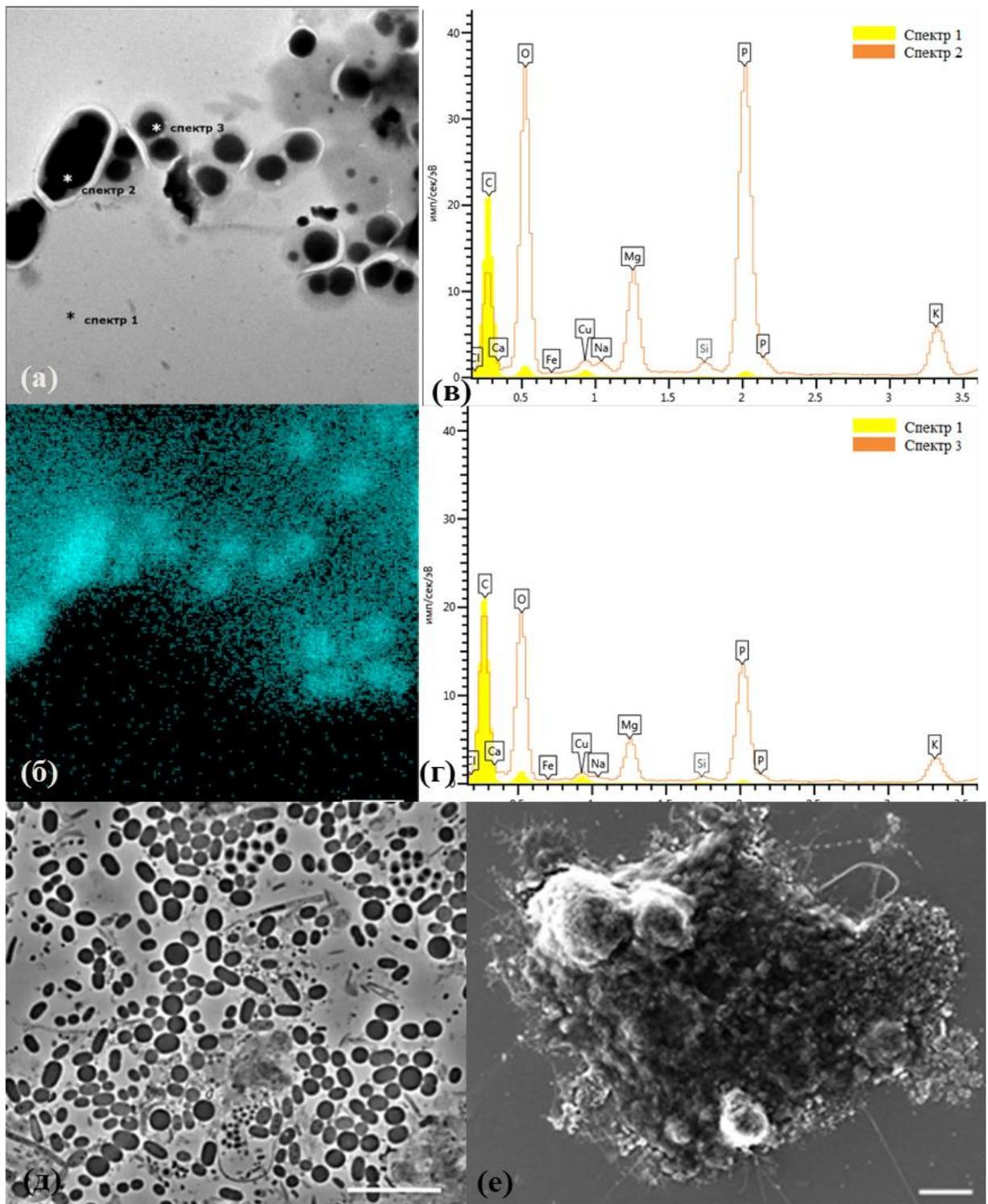


Рисунок 19. Исследование агрегатов морфотипа II, 250 сут культивирования: а – электронная фотография тотальных препаратов клеток (масштаб 2 мкм); б – рентгеновский анализ образца (а) в режиме картирования, голубым цветом показано распределение фосфора; в, г – рентгеновский анализ клеток: спектр 1 – контроль (фоновое внеклеточное содержание химических элементов); спектр 2 - содержание химических элементов в крупных овальных клетках, спектр 3 – содержание химических элементов в клетках с 2 включениями; д – фазово-контрастная микроскопия (масштаб 10 мкм); е – поверхность агрегата в сканирующем режиме (масштаб 50 мкм).

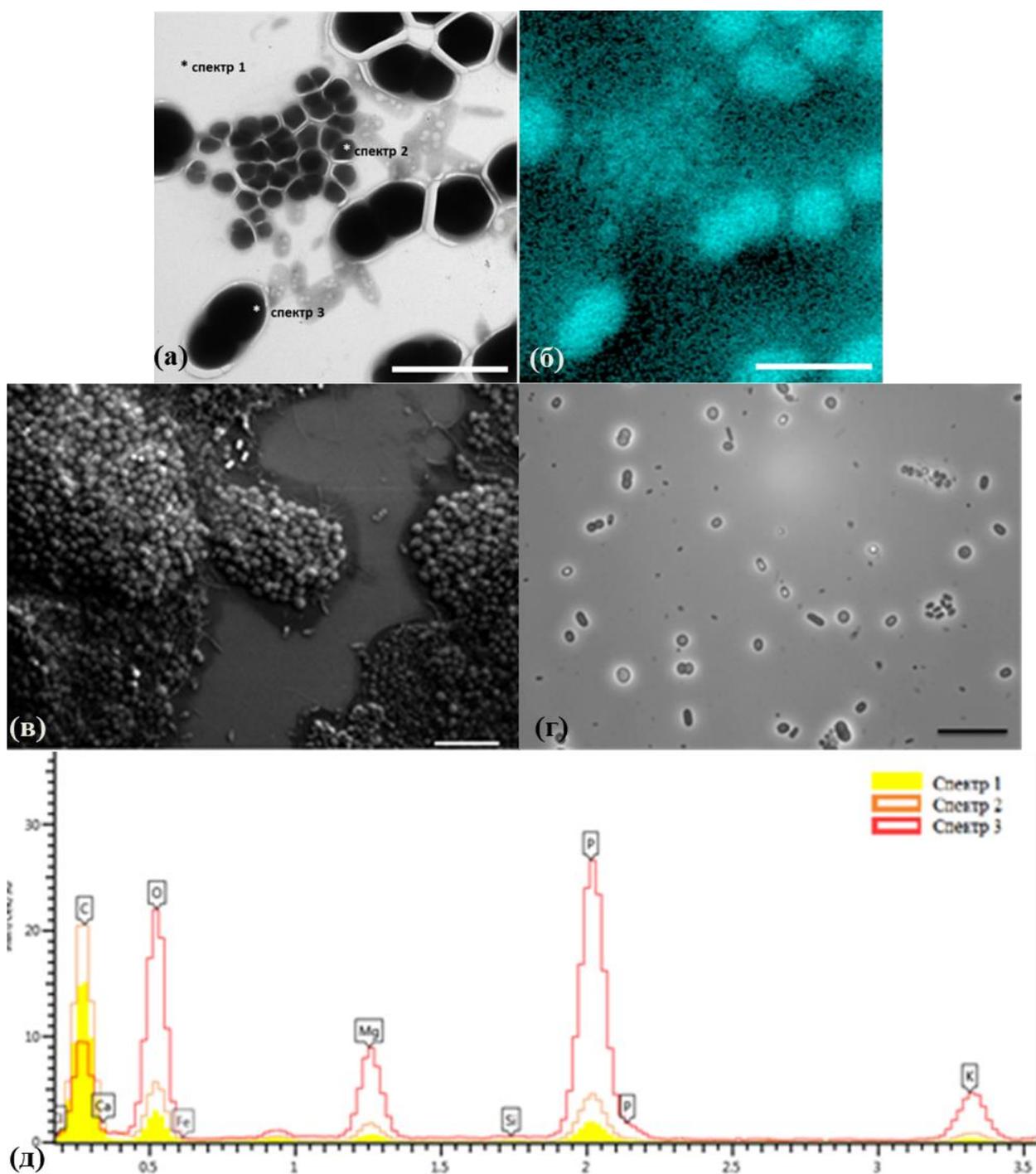


Рисунок 20. Исследование агрегатов на 400 сутки культивирования: а – электронная фотография тотальных препаратов клеток (масштаб 5 мкм); б – рентгеновский анализ образца (а) в режиме картирования, голубым цветом показано распределение фосфора; в – поверхность агрегата в сканирующем режиме (масштаб 10 мкм); г – фазово-контрастная микроскопия (масштаб 2 мкм); д – рентгеновский анализ клеток: спектр 1 – контроль (фоновое внеклеточное содержание химических элементов); спектр 2 – содержание химических элементов в мелких клетках без включений; спектр 3 – содержание химических элементов в крупных овальных клетках с включениями.

Таксономический анализ агрегатов I и II морфотипа показал, что их таксономическая структура на уровне филумов, за исключением *Patescibacteria*, была сходной (рис. 21). В сообществах двух типов агрегатов приблизительно в равных долях присутствуют *Pseudomonadota* (67,40% и 66,30%), *Bacteroidota* (17,70 и 14,00%), *Chloroflexota* (5,36 и 4,73%), *Мухосoccota* (3,09 и 3,99%) и *Verrucomicrobiota* (0,85 и 0,74%) соответственно. В агрегатах морфотипа I доля *Patescibacteria* составляла 1,82%, в агрегатах II типа они были представлены обширнее – 6,19%.

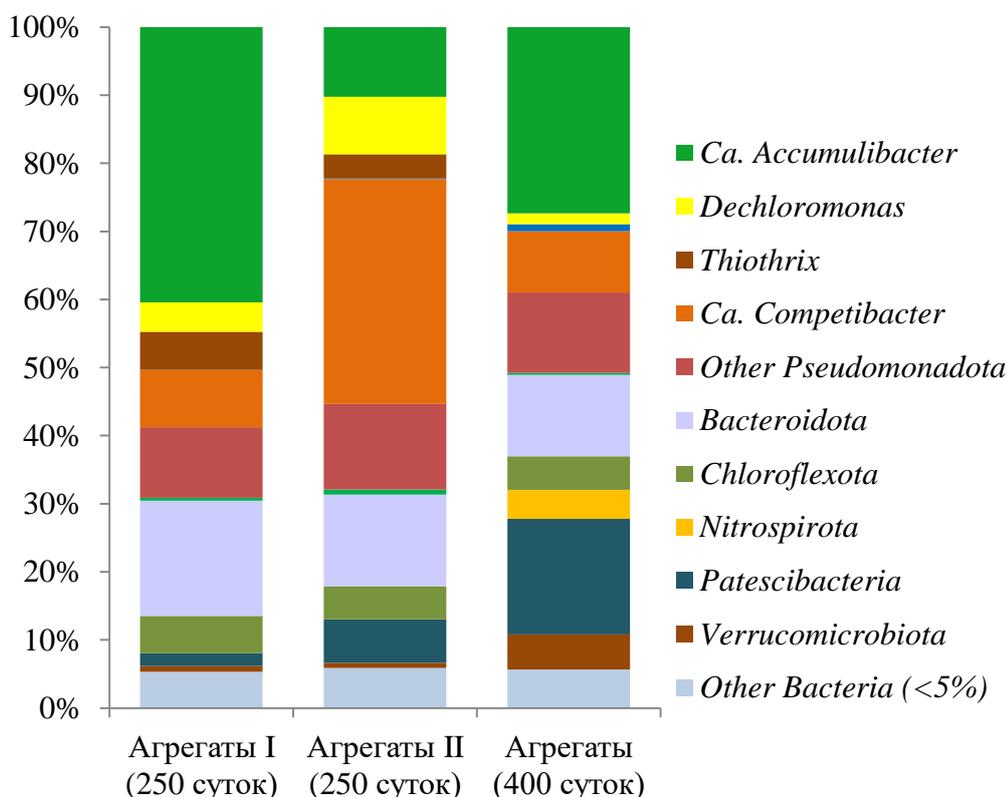


Рисунок 21. Таксономический состав агрегатов микробного сообщества.

Несмотря на то, что представители филума *Pseudomonadota*, к которому относятся ФАО и ГАО в агрегатах представлены практически в равных долях, в агрегатах морфотипа I доминировали типичные для очистных сооружений представители ФАО – *Ca. Accumulibacter* (37,33%), а также присутствовали потенциальные ФАО – *Thiothrix* (5,28%). Доля гликоген-аккумулирующих организмов семейства *Competibacteraceae* – *Ca. Competibacter* была значительно меньше ФАО и составляла 8,08%. В агрегатах II морфотипа

доминировали ГАО – *Ca. Competibacter*, доля которых составляла 30,69%, ФАО представлены *Ca. Accumulibacter* (9,18%) и нитчатым организмом *Thiothrix* (3,41%).

По результатам таксономического анализа агрегаты первого типа характеризовались меньшим разнообразием, что коррелирует с результатами микроскопии, показавшей их более однородными.

Анализ агрегатов, сформированных к 400 суткам работы реактора, выявил некоторые незначительные отличия от агрегатов I морфотипа, сформированных к 200 суткам. Суммарная доля *Pseudomonadota*, а также доли *Bacteroidota* и *Chloroflexota* были сопоставимы с тем, что ранее наблюдалось в агрегатах I и II морфотипов. Доля представителей филума *Muchomycota* снизилась почти до 0 (0,65%), доля *Verrucomicrobiota* достигла 4,83%, а *Patescibacteria* 16,60%. Филум *Patescibacteria*, также как и на 200 сутки работы реактора, был преимущественно представлен бактериями рода *Gracilibacteria* (13,82%). В этом сообществе также были обнаружены представители филума *Nitrospirota*. ФАО в данных агрегатах были представлены преимущественно *Ca. Accumulibacter* (26,22%), а *Thiothrix* – отсутствовал. Доля ГАО *Ca. Competibacter* была сопоставима с ее содержанием в агрегатах I морфотипа (8,15%).

Изменение состава микробного сообщества характеризовалось возрастанием количества фосфат-аккумулирующих микроорганизмов и снижением доли ГАО. К 150 суткам доля типичного представителя ФАО - *Ca. Accumulibacter*, а также *Thiothrix*, *Dechloromonas*, *Thauera* – потенциальных представителей этой физиологической группы составляла в сумме 14,03%, а к 400 суткам достигла 30,16%. Вместе с тем, доля фрагментов гена 16S рРНК типичного представителя ГАО – *Ca. Competibacter*, который считается основным конкурентом ФАО за субстрат в сообществе, сначала возросла, достигнув 19,7%, но затем к 400 суткам упала до 8,24%. Так как основная часть подающегося в SBR ацетата начиная со 150 суток потреблялась в соответствии с ФАО-метаболизмом, высокая численность ГАО указывает на то, что эти

бактерии имели другой источник углерода и энергии, обеспечивающий их рост. Известно, что *Ca. Competibacter* характеризуются определенным метаболическим разнообразием (McIlroy et al., 2014) и способны использовать ацетат, пропионат, пируват и некоторые аминокислоты (Kong et al., 2006) в качестве источников углерода и энергии. Эти соединения могут быть продуктами метаболизма бактерий, входящих в состав сообщества, образовываться в результате гидролиза внеклеточных биополимеров, автолиза отмирающих клеток. Возможно, что функции гидролитиков в ФАО-сообществе играли представители *Bacteroidota* и *Chloroflexota*, обеспечивая деградацию высокомолекулярных соединений, образующихся в результате жизнедеятельности других микроорганизмов или при распаде микробной биомассы (Fernández-Gómez et al., 2013; Speirs et al., 2019). На это указывает высокая численность фрагментов генов 16S рРНК этих микроорганизмов на протяжении всего эксперимента. В сообществе наблюдалась высокая численность фрагментов генов 16S рРНК представителей *Patescibacteria*. Однако известно, что *Patescibacteria* обитают в бедных органическим веществом местообитаниях, характеризуются низким метаболическим потенциалом и малым размером клетки (Tian et al., 2020).

Несмотря на отсутствие условий в биореакторе для образования гранул (время осаждения составляло 30 мин, инокулятом служил флокулированный активный ил, отношение высоты биореактора к диаметру (H/D) составляло 1.0, вывод избыточной биомассы из биореактора проводился при перемешивании вместе со сливом среды), в процессе развития фосфат аккумулирующего сообщества в реакторе происходил переход от флокулированного активного ила (инокулята) к гранулоподобным агрегатам и сегрегация агрегатов с образованием 2-х морфотипов. Оба морфотипа содержали клетки ФАО и ГАО. Однако в I морфотипе доминировали представители *Ca. Accumulibacter*, а во II морфотипе доминировали *Ca. Competibacter*. Агрегаты II-го морфотипа характеризовались большим морфологическим разнообразием, более сложной

физической структурой и имели сходство с активным илом очистных сооружений.

Ранее при культивировании фосфат-аккумулирующих микробных сообществ уже отмечался спонтанный переход морфологии активного ила от флоккул к гранулоподобным агрегатам в условиях без жесткого отбора гранул (Dulekgurgen et al., 2003; Barr et al., 2010; Weissbrodt et al., 2013; Yun et al., 2019). К спонтанному гранулообразованию способны культуры, обогащенные как ФАО, так и ГАО.

По-видимому, спонтанное образование агрегатов обусловлено наличием экзополисахаридов (ЭПС), играющих ключевую роль в агрегации активного ила (Liu et al., 2010). Микроскопические наблюдения показали, что бактериальные клетки в образовавшихся агрегатах находятся в матриксе, вероятно, состоящем из ЭПС, образующихся при росте ФАО и «склеивающих» клетки. Несмотря на то, что ЭПС изучены недостаточно детально, показано, что внеклеточные биополимеры выполняют важные функции в аэробно-анаэробном цикле потребления-высвобождения фосфора.

Агрегированию микробного сообщества также могло способствовать и развитие нитчатых бактерий филума *Chloroflexota*. Эти организмы во многом определяют структуру и седиментационные свойства флоккул активного ила на сооружениях биологической очистки сточных вод (WWTP) (Nierychlo et al., 2019).

Интерес вызывают причины, способствующие длительному сосуществованию двух типов агрегатов. Поскольку в настоящее время ГАО считаются главными конкурентами ФАО за органический субстрат в условиях биологического удаления фосфора, увеличение доли ГАО считается одной из основных причин падения эффективности биологического удаления фосфора на очистных сооружениях. На основании полученных данных, вероятно, длительное сосуществование ФАО и ГАО связано с различными источниками «питания» консорциумов микроорганизмов в агрегатах разных типов. Первичным источником углерода и энергии микробного сообщества ФАО

служит главным образом ацетат, поступающий вместе с подающейся в реактор средой. Плоская форма агрегатов I морфотипа (более высокое отношение площади поверхности к объему) и доминирование в них ФАО способствуют потреблению в анаэробный период основной части ацетата. На это указывает высокое количество высвободившегося фосфора на потребленный ацетат в анаэробной фазе, характерное для ФАО. Основными первичными источниками питания для агрегатов, в которых доминируют ГАО, могут служить метаболиты и органические вещества, образующегося при распаде ФАО и других микроорганизмов, развивающихся в системе.

На завершающем этапе культивирования присутствовали только агрегаты I морфотипа. Однако, несмотря на доминирование *Sa. Accumulibacter* (40%), эти агрегаты содержали около 8% *Sa. Competibacter*, и элиминирования ГАО с течением времени не наблюдалось. Что могло свидетельствовать о стабильном сосуществовании групп ФАО и ГАО в одних и тех же агрегатах. Вероятно, что взаимоотношения ФАО и ГАО в условиях биологического удаления фосфора значительно сложнее, чем простая конкуренция за субстрат.

Спонтанная агрегация и сегрегация гранул в циклических условиях последовательно-периодического культивирования не является следствием простого физического отбора тяжелых быстрооседающих частиц или следствием воздействия неучтенных факторов, связанных с работой реактора (например, несоблюдение строгих анаэробных условий в период присутствия ЛЖК). Неоднократное выявление спонтанной агрегации и сегрегации биомассы в SBR при использовании сред различного состава и инокуляцией различными активными илами указывает на то, что эти явления являются характерным этапом развития фосфат-аккумулирующего микробного сообщества при биологическом удалении фосфора.

По результатам данной работы была опубликована статья
Pelevina A.V., Verestovskaya Yu.Yu., Dorofeev A. G., Nikolaev Yu.A., Gruzdev E.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V. Aggregate formation by a microbial community

developing in a phosphorus-removing laboratory reactor // Microbiology. – 2023. – V. 92. – Suppl. 1. – P. S33–S36.

6.5 Метагеномный анализ агрегатов различных морфотипов

На основании метагеномных данных для сформированных на 250 сутки агрегатов II морфотипа – ГАО-агрегатов и сформированных на 400 сутки зрелых агрегатов – ФАО-агрегатов, близких к I морфотипу был проведен функциональный анализ по базе данных COG (рис. 22). Полученные результаты показали высокую гомологию между геномным набором в обоих метагеномах. В метагеноме агрегатов II морфотипа обнаружено большее количество транспозонов и фагов, что косвенно подтверждает данные анализа ампликона фрагмента гена 16S rRNA о большем таксономическом разнообразии микроорганизмов в агрегатах II морфотипа. Сравнение агрегатов по общему набору ключевых для ФАО генов показало, что большинство генов представлено в приблизительно равных количествах. Однако в метагеноме агрегатов II морфотипа в меньшем количестве был представлен ген низкоаффинного транспортера фосфата (*pit*), что косвенно может свидетельствовать о присутствии большей доли ГАО, нежели в агрегатах I морфотипа. Так же в метагеноме агрегатов I морфотипа в меньшем количестве представлен ген кодирующий ацетил-КоА синтетазу, что свидетельствовало о присутствии организмов менее зависимых от потребления ацетата (рис. 23).

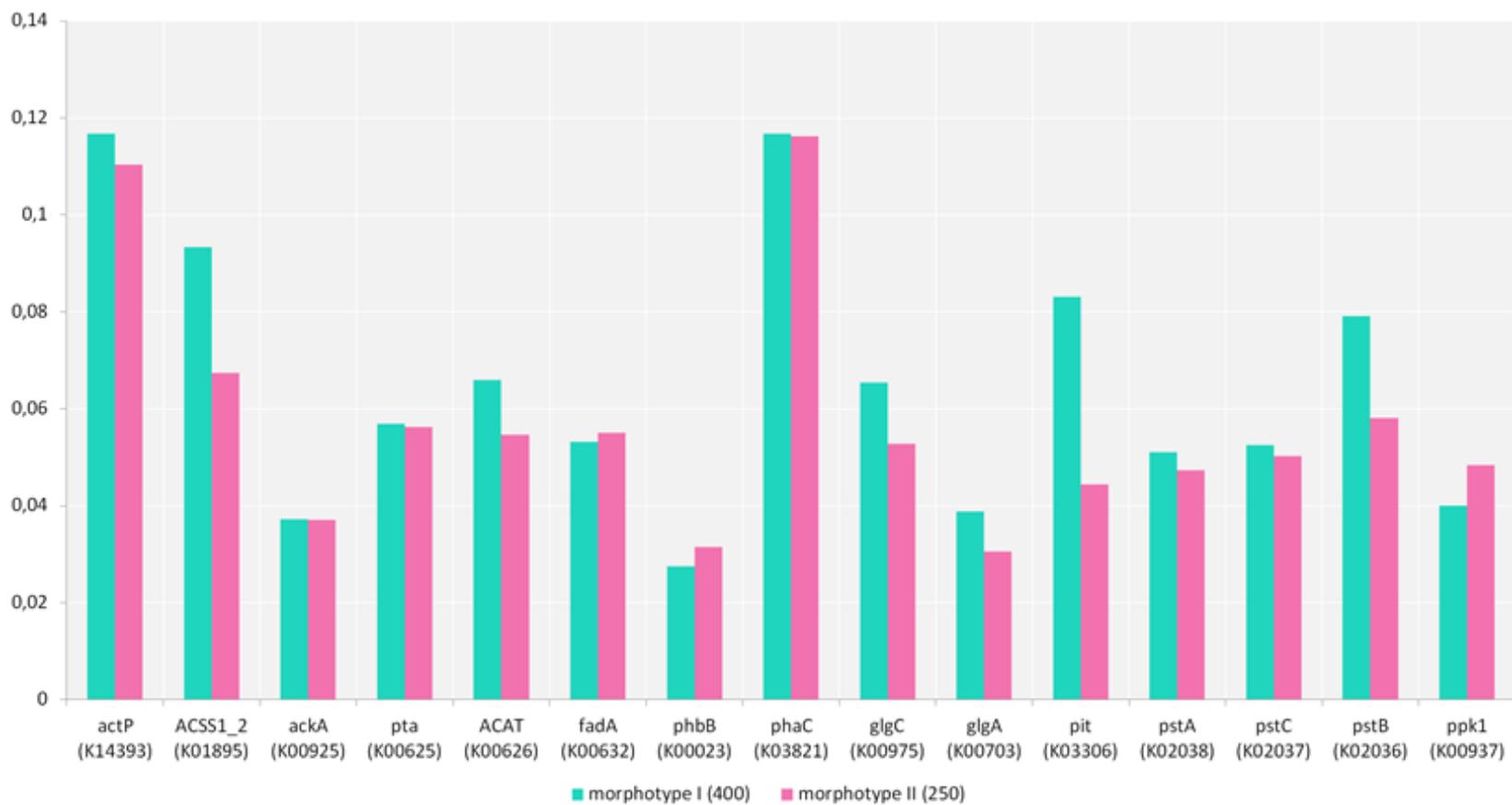


Рисунок 22. Процент основных генов KEGG, отвечающих за метаболизм ФАО, среди всех аннотированных генов KEGG. Каждый ген подсчитывали столько же раз, сколько средний охват контига, в котором находился ген. 142738 и 171060 генов были аннотированы KEGG для совокупности образцов I и II морфотипов, соответственно.

Для более детального понимания особенностей метаболизма организмов участвующих в процессах фосфат аккумуляции в рассмотренных образцах была проведена сборка геномов из метагеномных данных. Было получено 14920753 парных прочтений объёмом 8982293306 для агрегатов II типа (250 сутки) и 12142670 парных чтений объёмом 7309887340 оснований для метагенома агрегатов I (400 суток). Для агрегатов I морфотипа было собранно 8 драфт-геномов с покрытием >90%, и контаминацией <5% и 16 драфт-геномов с покрытием $\geq 50\%$ и контаминацией <10%, для агрегатов II морфотипа – 7 и 12 – соответственно (Bowers et al., 2017). Из метагеномных данных были собраны 3 генома *Ca. Accumulibacter*. По последовательности гена *ppk1*, используемого для таксономии *Accumulibacter* было установлено, что в агрегатах морфотипа I *Ca. Accumulibacter* был представлен типами IC и IIC, а в агрегатах морфотипа II – IIB, что могло свидетельствовать о преобладании разных клад в разных агрегатах.

На основании содержания генов ключевых метаболических путей, характерных для ФАО и ГАО, таких как транспорт ЛЖК (*actP*), преобразование ЛЖК в ПГА (*actP*, *asc*, *ackA*, *pta*, *phaA* (*atoB*), *phaB*, *phaC* (*phbC*), *phaZ*), транспорт фосфатов (*pstA*, *pstB*, *pstC*, *pstS*), синтез и расщепление полифосфатов (*ppk1*, *ppx*) и гликогена (*glgA*, *glgB*, *glgC*, *glgP*) были отобраны геномы, принадлежащие ФАО (или потенциальным ФАО) и ГАО (Ni M. et al., 2022). Маркером дифференциации ФАО и ГАО служил ген низко аффинного транспортера фосфата (*pit*) (McIlroy et al., 2014). В результате были отобраны геномы принадлежащие потенциальным фосфат-аккумулирующим бактериям: для агрегатов I морфотипа – *Ca. Accumulibacter* IC и IIC, *Azonexus*, *Thauera* и *Zoogloea*, а для агрегатов II морфотипа *Ca. Accumulibacter* IIB и *Siculibacillus*.

Геномы с отсутствующим геном *pit* были отнесены к потенциальным ГАО, в их число вошли: *Ca. Competibacter*, *Amaricoccus*, *Thiothrix*, *Rhodospirillales* (UXAT02).

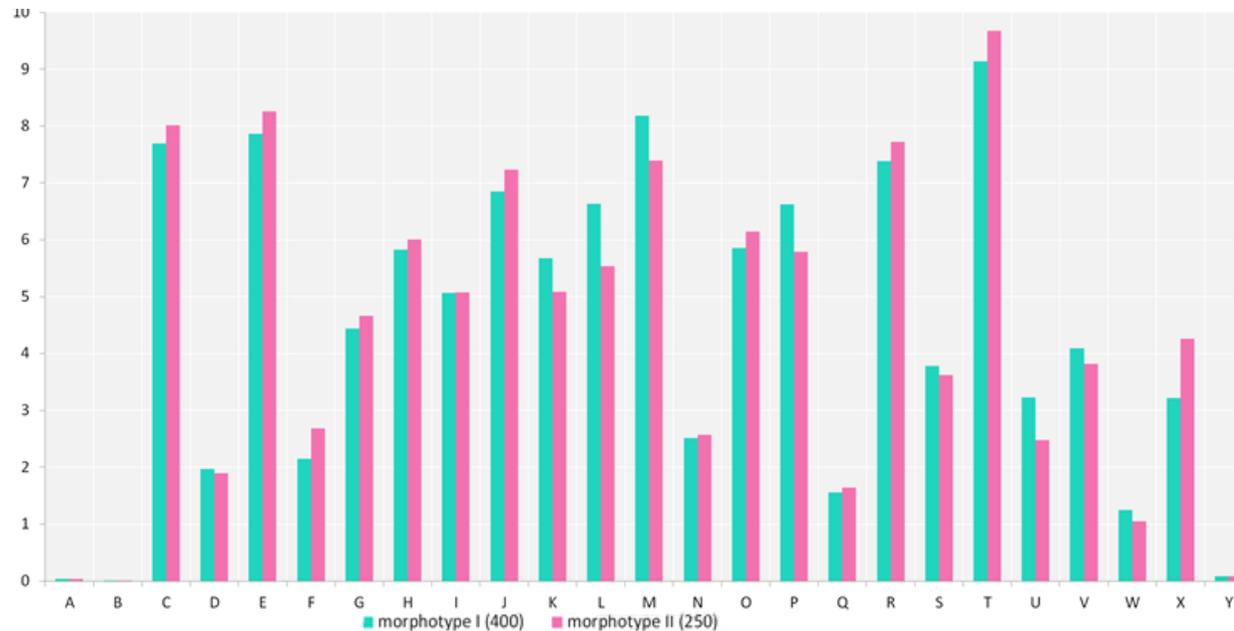


Рисунок23. Процент генов, относящихся к каждой категории COG, из всех генов, аннотированных COG. Каждый ген подсчитывали столько же раз, сколько среднее покрытие контига, в котором находится ген. 129529 и 152663 гена были аннотированы терминами COG для совокупности образцов I и II морфотипов, соответственно. А – Процессинг и модификация РНК, В – структура и динамика хроматина, С – Производство и преобразование энергии, D – Контроль клеточного цикла, деление клеток, разделение хромосом, Е – Транспорт и метаболизм аминокислот, F - Транспорт и метаболизм нуклеотидов, G – Транспорт и метаболизм углеводов, Н – Транспорт и метаболизм коферментов, I – Транспорт и метаболизм липидов, J – Трансляция, структура рибосом и биогенез, К – Транскрипция, L – Репликация, рекомбинация и репарация, М – Биогенез клеточной стенки/мембраны/оболочки, N – Подвижность клеток, O – Посттрансляционная модификация, обмен белков, шапероны, P – Транспорт и метаболизм неорганических ионов, Q – Биосинтез, транспорт и катаболизм вторичных метаболитов, R – Прогнозирование общей функций, S – Белки с неизвестной функцией, Т – Механизмы передачи сигнала, U – Внутриклеточный транспорт, секреция и везикулярный транспорт, V – Защитные механизмы, W – внеклеточные структуры, X – Мобильные генетические элементы: профаги, транспозоны, Y – Цитоскелет.

Собранные геномы потенциальных ФАО: *Ca. Accumulibacter* IC, *Azonexus*, *Zoogloea* в агрегатах I морфотипа и *Siculibacillus* в агрегатах II морфотипа содержали набор генов необходимых для осуществления процессов денитрификации (*napA*, *napB*, *nirS*, *norB*, *norC* и *norZ*), что позволяет рассматривать их как ДФАО. Среди геномов, не отнесенных к ФАО, ни один не содержал полного набора генов денитрификации. Найдены гены пути диссимиляторной нитрат редукции в MAG принадлежащих *Ca. Accumulibacter*, *Azonexus*, *Zoogloea*, *Siculibacillus Bacteroidota* (UBA8401), *Thiothrix* в различном сочетании генов (*narG*, *narH*, *narI*, *napA*, *napB*, *nirB*, *nirD*, *nrfA*, *nrfH*).

Также среди собранных геномов обнаружены гены путей преобразования серы. В MAG *Azonexus* и *Zoogloea* найдены гены пути окисления тиосульфата (SOX комплекс) (*soxA*, *soxX*, *soxY*, *soxZ*, *soxB*, *soxC*, *soxD*). MAG принадлежащие семейству *Thiotrichaceae* (*Thiothrix* и *Thiolinea*) содержали гены ассимиляторной сульфат редукции (*sat*, *cysNC*, *cysN*, *cysD*, *cysC*, *cysH*, *cysJ*, *cysI*), в геноме *Thiothrix* найден путь диссимиляторной сульфат редукции (*dsrA*, *dsrB*, *aprA*, *aprB*, *sat*, *dsrC*).

Совокупность метагеномных и таксономических данных указывает на преобладание представителей рода *Ca. Accumulibacter* среди других ФАО.

По результатам данной работы была опубликована статья Pelevina A., Gruzdev E., Berestovskaya Y., Dorofeev A., Nikolaev Y., Kallistova A., Beletsky A., Ravin N., Pimenov N., Mardanov A. New insight into the granule formation in the reactor for enhanced biological phosphorus removal // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – V. 14. – Art. No. 1297694. doi: 10.3389/fmicb.2023.1297694

ГЛАВА VII. ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ МИКРОБНЫМ СООБЩЕСТВОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО БИОРЕАКТОРА

Известно, что для *Sa. Accumulibacter* и большинства ФАО основными источниками углерода являются низкомолекулярные ЛЖК – ацетат и пропионат, однако результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что эти бактерии способны метаболизировать более широкий спектр соединений, включая аминокислоты и глюкозу (Ziliani et al., 2023).

В работе были определены органические вещества, используемые в качестве источника углерода и энергии микробным сообществом, обогащенным *Sa. Accumulibacter*, которое развивалось в биореакторе последовательно-периодического действия, и влияние этих веществ на цикл выделения/поглощения фосфора при смене анаэробных и аэробных периодов.

7.1 Потребление кислорода

Эндогенное дыхание ($СПК_{end}$) перед проведением экспериментов составляло в среднем $1,65 \pm 0,48$ мг O_2 /г СВ/ч. После внесения субстратов скорость потребления O_2 возрастала в течение 2-3 мин, достигала максимума и стабилизировалась. Максимальная СПК для ацетата составляла $32,2 \pm 2,8$ мг O_2 /г СВ/ч ($50,3 \pm 4,4$ мг O_2 /г БСВ/ч). Начальная СПК для триптона незначительно отличалась от СПК на ацетате, однако затем быстро снижалась, и через 20 мин составила 35-40% от исходной. Среди других использованных моносубстратов СПК убывала в ряду пируват – пропионат – бутират – сукцинат – аспаратат – глутамат – аланин. Для остальных субстратов СПК составляла менее 10% от СПК в присутствии ацетата (рис. 24).

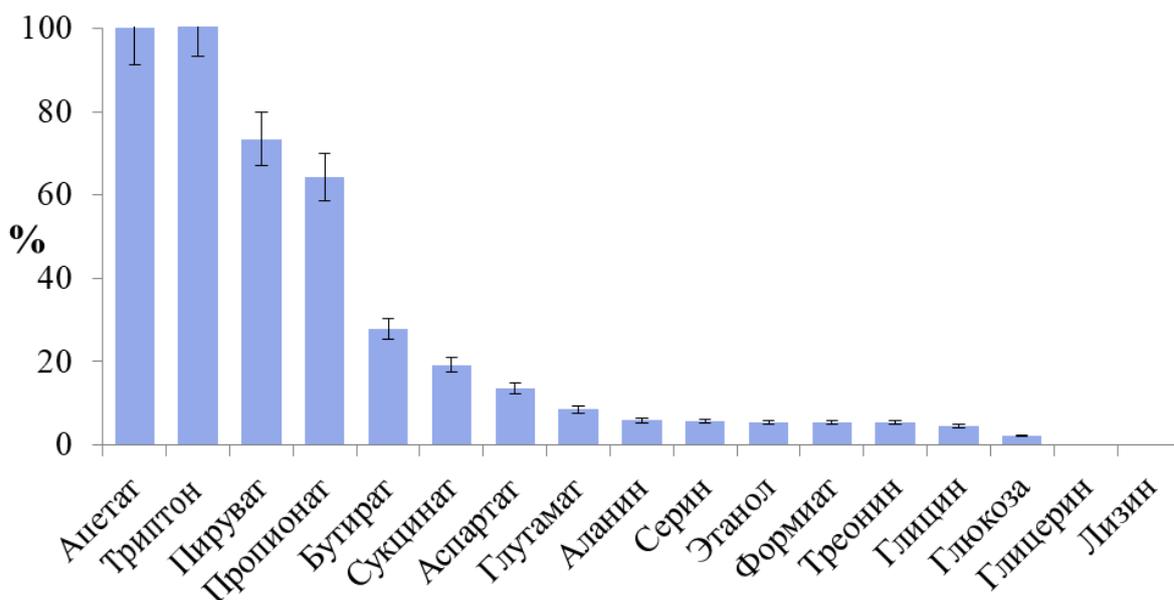


Рисунок 24. Скорость потребления кислорода (СПК) микробным сообществом SBR-реактора, обогащенным ФАО *Ca. Accumulibacter* после добавления различных субстратов. Величина СПК после добавления ацетата принята за 100%.

7.2 Цикл выделения/поглощения фосфора в анаэробных/аэробных условиях

Несмотря на то, что в микробном сообществе последовательно-периодического биореактора доминировали *Ca. Accumulibacter*, вклад в суммарную скорость потребления кислорода вносили и другие аэробные микроорганизмы. Для исследования влияния внешнего источника углерода и энергии на цикл выделения – поглощения фосфора были выбраны субстраты, обеспечивающие наиболее высокие СПК, а также этанол и глюкоза – субстраты, широко распространенные в естественных и искусственных системах.

По заметному эффекту на цикл выделения – поглощения фосфора использованные субстраты были разделены на 3 группы.

К первой группе были отнесены жирные кислоты: ацетат, пропионат, пируват, бутират и сукцинат. Добавление этих соединений вначале анаэробного периода сопровождалось существенным выбросом фосфора в этот период и последующим его потреблением в аэробный на 60 - 90% (рис. 25а, б). В

анаэробный период ацетат и пропионат полностью потреблялись в течение первых 30 мин. Скорость потребления пирувата, сукцината и бутирата была ниже, и к концу анаэробного периода их концентрация снижалась на 92, 78 и 74% соответственно. Наибольший эффект был обнаружен для ацетата, пропионата и пирувата, наименьший – у сукцината. Бутират вызывал быстрый выброс фосфора в среду, однако скорость его поглощения в аэробной фазе была низкой.

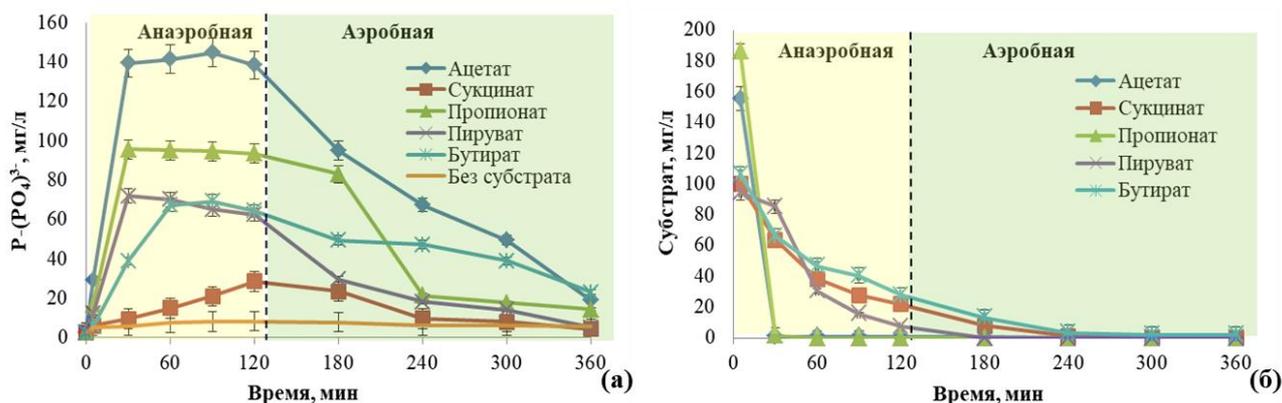


Рисунок 25. Динамика фосфора и субстрата: а – цикл выделения/ поглощения фосфора после добавления органических кислот, б – динамика потребления субстрата в анаэробно-аэробном цикле культивирования.

Субстраты второй группы – аминокислоты глутамат, аспартат и аланин – вызывали выделение фосфора, однако потребление фосфора в аэробной фазе было ниже, чем у субстратов первой группы (рис. 26а). Наибольший эффект был получен для глутамата и аспартата.

Заметного эффекта на циклические преобразования фосфора при добавлении глюкозы и этанола обнаружено не было. Добавление этанола приводило к возрастанию концентрации фосфора как в анаэробной, так и в аэробной фазе (рис. 26б).

По результатам эксперимента для субстратов первой и второй группы были рассчитаны количество высвободившегося фосфора на единицу поглощенного субстрата (отношение $P/\text{субстрат} - \Delta P_{\text{max}}/\Delta s$) (табл. 5).

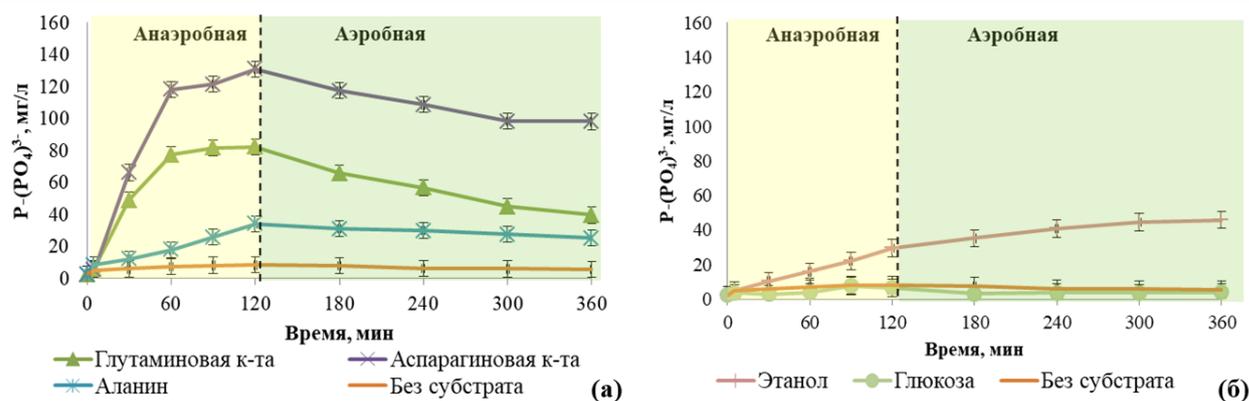


Рисунок 26. Цикл выделения – поглощения фосфора культурой обогащенной ФАО после добавления: а – аминокислот, б – этанола и глюкозы.

Таблица 5. СПК и показатели цикла выделения/поглощения фосфора в анаэробной и аэробной фазах цикла

Субстрат	СПК после добавления субстрата (за вычетом эндогенного дыхания) мг O ₂ /г БСВ/ч	Анаэробная фаза			Аэробная фаза
		P _{max} , мг/л	ΔP/Δs (P-моль/S-моль)	Начальная скорость выделения P, мгP/л/ч	P _{max} - P _{min} (мг/л)
Ацетат	32,2	144,7	1,4	273,6	125,9
Пируват	23,6	65,0	1,7	138,8	60
Пропионат	20,7	94,5	1,6	186,2	80,2
Бутират	8,9	69,1	2,1	72,8	46,2
Сукцинат	6,2	28,5	1,3	13,7	24,1
Аспартат	4,4	131,1	2,0*	127,3	32,9
Глутамат	2,7	82,3	2,1*	93,1	42,8
Аланин	1,9	34,2	3,6*	19,2	9

* – рассчитано из предположения полного потребления субстратов в анаэробный период

Для ФАО этот показатель отражает эффективность транспортных систем потребляемых субстратов. При прочих равных условиях, чем ниже отношение P-моль/моль субстрата, тем выше энергоэффективность транспортных процессов. При pH 7 этот показатель приближается к 1. Величины ΔP_{max}/Δs

для ЛЖК варьировали в диапазоне 1,3 – 2,1 Р-моль/S-моль. Для аминокислот этот показатель составил 2,0 – 3,6 и был несколько выше приводимых в литературе (Qiu et al., 2019).

Динамика высвобождения – поглощения фосфата и потребления ацетата и пропионата соответствовала известным метаболическим особенностям *Ca. Accumulibacter*: именно эти субстраты традиционно используются в качестве источника углерода для получения обогащенных ФАО культур.

Использование бутирата приводило к циклическому преобразованию фосфора, однако скорости выброса фосфора и потребления субстрата в анаэробный период были существенно ниже, чем для ацетата и пропионата. Учитывая более низкие, чем для ацетата и пропионата скорости метаболических процессов (высвобождение фосфора и субстрата в анаэробный период и поглощение фосфора в анаэробный), для успешного выращивания ФАО и проведения биологического удаления фосфора продолжительность фаз цикла и время пребывания биомассы в биореакторе должны быть скорректированы.

Скорость выброса фосфора в среду и максимальная их концентрация в анаэробный период при использовании пирувата была ниже, однако в целом была близка к ацетату и пропионату, что вполне ожидаемо, так как пируват – один из центральных интермедиатов метаболизма микроорганизмов. Высокая СПК и низкое отношение $\Delta P/\Delta s$ (1,7 Р-моль/S-моль) указывали на эффективную систему транспорта пирувата в клетки.

Добавление сукцината в анаэробной фазе приводило к его потреблению, сопровождавшемуся заметным выбросом фосфора. При этом скорость выделения фосфора была существенно ниже, чем у остальных использованных ЛЖК. Вместе с тем, отношение $\Delta P_{max}/\Delta s$ для сукцината оказалось минимальным и составило 1,3 Р-моль/S-моль, что указывает на высокую эффективность его транспорта. Возможно, что сукцинат потребляется другими микроорганизмами с образованием побочных продуктов, которые используются *Ca. Accumulibacter*.

Полученные результаты показывают также стимулирующий эффект глутамата и аспартата на выброс фосфора в анаэробных условиях. Однако в аэробных условиях скорости потребления фосфора были низкие, и значительного его потребления не происходило.

7.3 Возможности транспортных систем *Ca. Accumulibacter*

Анализ таксономического состава показал, что основным ФАО, участвующим в цикле потребления/высвобождения фосфора исследуемого микробного консорциума являлся *Ca. Accumulibacter*. Анализ двух MAG *Ca. Accumulibacter* IC и ПС, собранных из метагеномных данных, полученных для агрегатов I морфотипа, выявил гены основных путей метаболизма ацетата, ПГА, гликогена и фосфора (Глава 6, разд. 6,4), в том числе гены необходимые для потребления и преобразования ЛЖК в ПГА.

В переносе ЛЖК участвует ацетат-пермеаза, кодируемая геном *actP*. Продукт данного гена осуществляет не только транспорт ацетата, но и в меньшей степени пропионата и бутирата (Gimenez et al., 2003; Jolkver et al., 2009). Поглощённые в ходе транспорта жирные кислоты преобразуются до ацетил-КоА при участии ацетил-КоА синтетазы (*acs*) либо ацетаткиназы (*ackA*) и фосфат ацетилтрансферазы (*pta*) (Barr et al., 2016). Гены транспорта и преобразования ацетата до ацетил-КоА идентифицированы не только в MAG *Ca. Accumulibacter* IC и ПС, но и в геномах принадлежащих *Ca. Competibacter*, *Siculibacillus*, *Azonexus*, *Мухососсасеа*. Однако гены пути превращений ацетил-КоА до ПГА обнаружены только в *Ca. Accumulibacter* IC и ПС (рис. 27).

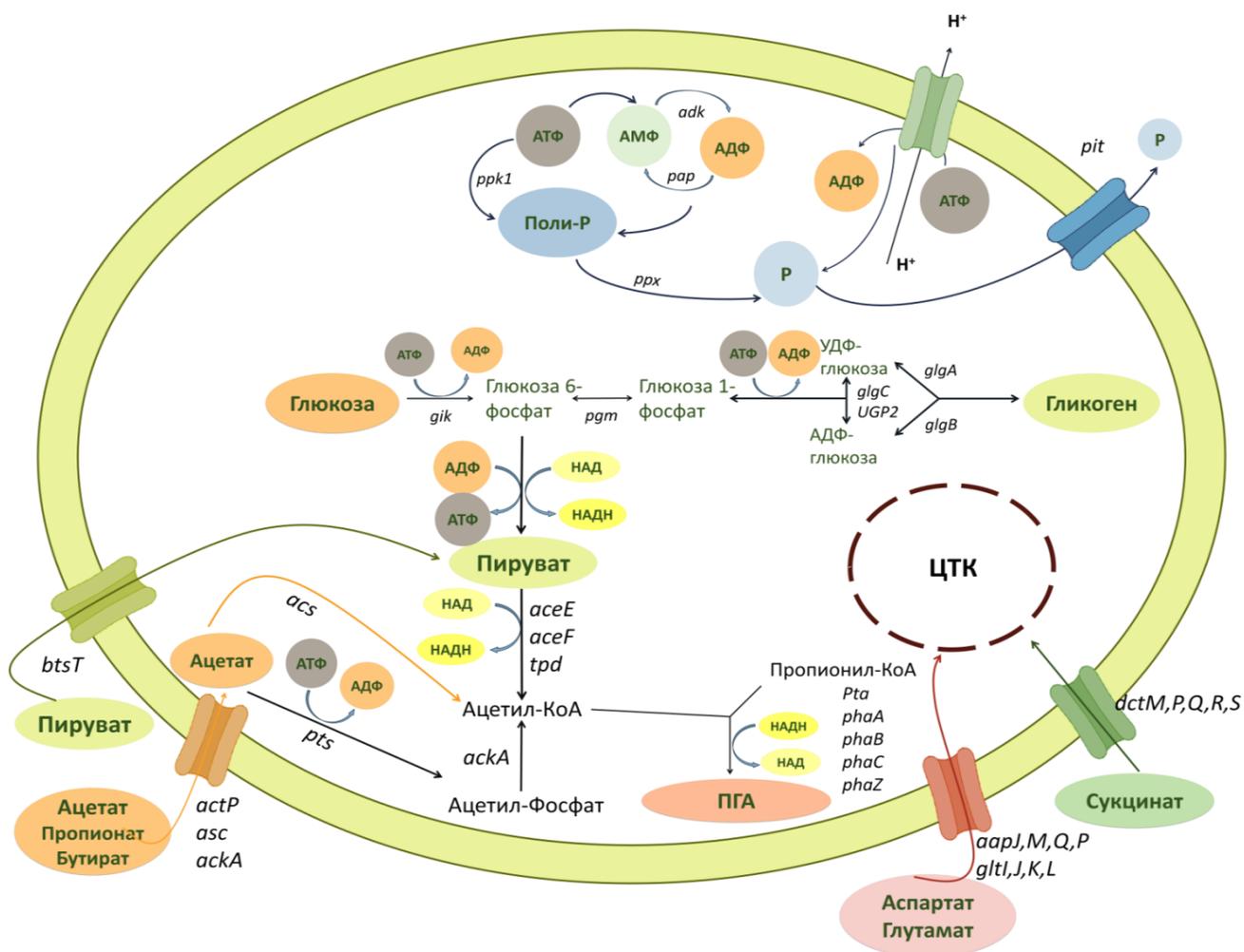


Рисунок 27. Метаболическая модель *Ca. Accumulibacter* с различными источниками углерода, построенная на основании характеристик кинетики и стехиометрии высвобождения/поглощения фосфора и метагеномного анализа микробного сообщества лабораторного биореактора.

Эффективность потребления ЛЖК *Ca. Accumulibacter* посредством ацетат-пермеазы является определяющим фактором интенсивности поглощения и выброса фосфора. Специфического транспортера для пропионата, кодируемого геном *pprP* не обнаружено ни в одном из MAG *Ca. Accumulibacter*. Другим фактором меньшей эффективности пропионата и бутирата является необходимость дополнительных преобразований для формирования ацетил КоА, требующих участия пропионил-КоА синтетазы (*pprE*) (Liu et al, 2009).

Относительно высокая эффективность циклических преобразований фосфора при использовании в качестве субстрата пирувата можно связать с

наличием в MAG *Ca. Accumulibacter* симпортера пирувата/ H^+ (*btsT*), а также переносчика лактата (*jenI*) способного к переносу пирувата и пропионата меньшей эффективностью чем лактата (Skory et al, 2010).

Транспорт сукцината и аспартата в клетку *Ca. Accumulibacter* обусловлен наличием в MAG переносчика C4-декарбоксилатов (*dctM*, *dctP*, *dctQ*, *dctR*, *dctS*).

Детерминантами потребления аспартата и глутамата можно рассматривать гены транспортной системы глутамата/аспартата (*gltI*, *gltK*, *gltJ*, *gltL*) (Hosie, Poole, 2001). В MAG *Ca. Accumulibacter* также были обнаружены гены транспорта разветвленных аминокислот (*livK*, *livH*, *livM*, *livG*, *livF*).

Измерение динамики концентраций аминокислот не проводилось, однако количество высвободившегося фосфора на один поглощенный ацетат при использовании глутамата и аспартата было несколько выше значений, приводимых в литературе для *Ca. Accumulibacter* (1,2 и 1,4 P-моль/S-моль соответственно) (Qiu et al., 2019) и составило 2,0 и 2,1 P-моль/S-моль соответственно, что является косвенным свидетельством полноты потребления этих субстратов в анаэробной фазе. Вместе с тем, при использовании глутамата и аспартата в периодических экспериментах в аэробных условиях скорости потребления фосфора были низкими, и значительного его потребления не происходило.

Эффект аланина на циклические преобразования фосфора оказался значительно меньше. В геноме *Ca. Accumulibacter* были обнаружены гены транспортной системы аминокислот с разветвленной цепью, указывающие на способность *Ca. Accumulibacter* к транспорту аланина. Однако учитывая низкие скорости процесса поглощения фосфора, низкую величину количества высвободившегося фосфора на один поглощенный аланин (0,3 P-моль/S-моль), можно полагать, что потребление аланина в анаэробный период было незначительным, и этот субстрат не является легкодоступным для *Ca. Accumulibacter*.

По результатам данной работы была опубликована статья
Dorofeev A., Pelevina A., Nikolaev Y., Berestovskaya Y., Gruzdev E., Mardanov A.,
Pimenov N. Oxygen uptake rate as an indicator of the substrates utilized by
Candidatus Accumulibacter // Water. – 2023. – V. 15. – Art. No. 3657. <https://doi.org/10.3390/w15203657>.

Заключение

Современные технологии очистки сточных вод от фосфора основаны на биологической очистке с использованием активного ила, формирующегося в биореакторах непрерывного или последовательно-периодического действия (SBR). Основу активного ила составляют сложные микробные сообщества с доминированием фосфат-аккумулирующих организмов. Именно сложный жизненный цикл фосфат-аккумулирующих бактерий в составе многокомпонентных микробных сообществ затрудняет выделение чистых культур представителей этой физиологической группы прокариот. В зарубежной литературе имеется информация о получении высокообогащенных накопительных культур ФАО. Наши работы стали первым примером успешного получения в РФ накопительных культур ФАО, способных в непрерывном режиме в биореакторе последовательно-периодического типа осуществлять биологическую очистку вод от фосфатов с эффективностью по фосфору более 86%. Использование широкого спектра физико-химических, микробиологических, микроскопических и молекулярных методов для изучения фосфат-аккумулирующего сообщества, длительно поддерживаемого в непрерывном режиме культивирования, позволило проследить динамику развития ФАО и гликоген-аккумулирующих микроорганизмов (ГАО), стадии образования морфологически разных агрегированных структур, а также расширить спектр органических субстратов, которые наряду с ацетатом могут использоваться ФАО.

Отъемно-доливной способ культивирования позволил получить фосфат-аккумулирующее микробное сообщество, однако оказался неблагоприятным для развития *Ca. Accumulibacter* и давал преимущество для роста других представителей этой физиологической группы. Этот способ культивирования не позволил добиться высокой плотности биомассы, при которой была бы возможна стабильная работа с высокой эффективностью удаления фосфора.

В ходе культивирования микробного сообщества в последовательно-периодическом биореакторе (SBR) установлено, что особенностью длительного функционирования фосфат-аккумулирующего микробного сообщества в режиме биологического удаления фосфора является спонтанная агрегация и сегрегация агрегированных структур. Эти явления не объяснимы простым физическим отбором быстрооседающих частиц или воздействием неучтенных факторов, связанных с работой реактора. Неоднократное выявление спонтанной агрегации и сегрегации биомассы в реакторах при использовании сред разного состава и инокуляцией различными активными илами в лабораториях указывает на то, что эти явления являются закономерным этапом развития фосфат-аккумулирующего микробного сообщества при биологическом удалении фосфора.

Проведенные исследования спектра возможных источников углерода и энергии для культур, обогащенных ФАО, имеют важное фундаментальное и прикладное значение. До сих пор не изучено распространение основных ФАО и их роль в естественных средах обитания, для которых характерно наличие множества субстратов – источников углерода и энергии. Реальная сточная вода и технологические воды, образующиеся при очистке – мультисубстратные компоненты. В ходе проведенных исследований было показано, что не только ацетат, но и другие органические субстраты могут потребляться и сохранять высокую активность фосфат-аккумулирующего сообщества, обогащенного *Ca. Accumulibacter*, в циклическом процессе выделения/поглощения фосфатов при смене анаэробных и аэробных периодов в лабораторном биореакторе типа SBR.

Результаты проведенной работы представляют интерес не только для развития фундаментальных знаний о закономерностях функционирования циклического метаболизма ФАО, но и могут найти практическое применение на действующих промышленных установках биологической очистки сточных вод от соединений фосфора для выработки оптимального режима выхода биореакторов на рабочий режим и их длительной эксплуатации.

Выводы

1. Путем использования отъемно-доливного и последовательно-периодического культивирования получены фосфат-аккумулирующие микробные сообщества, различающиеся по составу представителей, плотности биомассы и эффективности удаления фосфора.

2. Отъемно-доливым способом культивирования получено фосфат-аккумулирующее микробное сообщество, характеризующееся отсутствием агрегированных структур и доминированием ФАО родов *Dechloromonas* и *Zoogloea* (сем. *Rhodocyclaceae*), обеспечивающее удаление 50% фосфора из среды биореактора.

3. В лабораторном реакторе последовательно-периодического действия (SBR) получено стабильно функционирующее фосфат-аккумулирующее микробное сообщество с высоким накоплением фосфора в биомассе (до 16% от сухой биомассы) и удалением до 86% P из культуральной среды. Доминирующим ФАО в составе сообщества был *Ca. Accumulibacter* (сем. *Rhodocyclaceae*).

4. Формирование фосфат-аккумулирующего микробного сообщества в SBR-реакторе сопровождалось спонтанным образованием двух типов агрегатов – I и II морфотипы, с доминированием в них ФАО и ГАО соответственно. Длительное культивирование (более 250 суток) приводило к элиминированию ГАО-, но сохранению ФАО-агрегатов.

5. Из микробного сообщества SBR собраны геномы микроорганизмов, содержащих полный набор генов, позволяющих участвовать в процессах аккумуляции фосфора. Наряду с *Ca. Accumulibacter* в их число вошли представители семейства *Rhodocyclaceae* (*Gammaproteobacteria*): *Azonexus*, *Thauera*, *Zoogloea* и представители класса *Alphaproteobacteria* – *Siculibacillus*.

6. Использование молекулярных методов, а также физиологических и ростовых экспериментов показало, что *Ca. Accumulibacter*, наряду с ацетатом и пропионатом, способен использовать широкий спектр субстратов, таких как пируват, бутират, сукцинат и некоторые аминокислоты. Возможность использовать пируват и сукцинат в качестве источников углерода показана впервые.

Список сокращений и условных обозначений

- БСВ – общее количество беззольного взвешенного вещества
- ГАО – гликоген-аккумулирующие организмы
- ДФАО – денитрифицирующие фосфат-аккумулирующие организмы
- ЛЖК – летучие жирные кислоты
- ЛОС – Люберецкие очистные сооружения
- ПГА – поли- β -гидроксиалканоат
- ПГБ – поли- β -гидроксibuтират
- ПГВ – поли- β -гидроксивалерат
- ПГ2МБ – поли- β -гидрокси-2-метилбутират
- ПГ2МВ – поли- β -гидрокси-2-метилвалерат
- СБ – общее количество взвешенного вещества
- СПК – скорость потребления кислорода
- ФАО – фосфат-аккумулирующие организмы
- ХПК – химическое потребление кислорода
- ЦПМ – цитоплазматическая мембрана
- ЭПС – экзополисахариды
- EBPR – биологическое удаление фосфора
- FISH – Флуоресцентная гибридизация *in situ*
- HRT – гидравлическое время пребывания
- OTE – операционная таксономическая единица
- SBR – реактор последовательно-периодического действия
- SRT – время удержания биомассы
- UCT – технология Кейптаунского университета
- WWTP – технология биологической очистки сточных вод

Список использованной литературы

1. Данилович Д.А. Блок удаления биогенных элементов Люберецких очистных сооружений г. Москвы-этапы внедрения современных технологий // Наилучшие доступные технологии водоснабжения и водоотведения. – 2014. – №. 2. – С. 20-37.
2. Дорофеев А.Г. Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пименов Н.В. Циклический метаболизм как способ существования микроорганизмов // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – №. 4. – С. 401-416.
3. Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пименов, Н.В. Роль фосфат-аккумулирующих бактерий в биологической очистке сточных вод от фосфора // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56. – №. 1. – С. 3-18.
4. Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачёв В.А., Дорофеева И.К., Сорокин В.В., Дорофеев А.Г., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Котляров Р.Ю., Белецкий А.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В.. Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании // Микробиология. – 2021. – Т. 90. – №. 1. – С. 76-89.
5. Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачев В.А., Дорофеев А.Г., Слатинская О.В., Максимов Г.В., Каллистова А.Ю., Николаев Ю.А., Груздев Е.В., Равин Н.В., Пименов Н.В., Марданов А.В. Микробное сообщество, аккумулирующее фосфат в лабораторном биореакторе с доминированием “*Candidatus Accumulibacter*” // Микробиология. – 2022. – Т. 91. – №. 5. – С. 631-637.
6. ПНД Ф 14.1:2:4.248-07 Методика измерений массовых концентраций ортофосфатов, полифосфатов и фосфора общего в пробах питьевых, природных и сточных вод фотометрическим методом (Издание 2016 года).

7. ПНД Ф 14.1:2:4.254-2009 Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовых концентраций взвешенных веществ и прокаленных взвешенных веществ в пробах питьевых, природных и сточных вод гравиметрическим методом (Издание 2012 года).
8. Abbas S.K., Al-Ajeel S.A.H. Effect of Acetate and Phosphorous Spraying on Some Vegetative and Chemical Growth Characteristics of *Ocimum Basilicum* *Vare Viride* // *HIV Nursing*. – 2022. – Т. 22. – №. 2. – С. 408-412.
9. Acevedo B., Murgui M., Borrás L., Barat R. New insights in the metabolic behaviour of PAO under negligible poly-P reserves // *Chemical Engineering Journal*. – 2017. – Т. 311. – С. 82-90.
10. Ahn Y.H., Speece R.E. Elutriated acid fermentation of municipal primary sludge // *Water research*. – 2006. – Т. 40. – №. 11. – С. 2210-2220.
11. Artan N., Orhon D. Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal. *Scientific and Technical Report Series* // IWA Publishing, London. – 2005. – V. 19. – P. 116.
12. Arun V., Mino T., Matsuo T. Biological mechanism of acetate uptake mediated by carbohydrate consumption in excess phosphorus removal systems // *Water Research*. – 1988. – Т. 22. – №. 5. – С. 565-570.
13. Barr J.J., Cook A.E., Bond P.L Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – Т. 76. – №. 22. – С. 7588-7597.
14. Barr J.J., Dutilh B.E., Skennerton C.T., Fukushima T., Hastie M.L., Gorman J.J., Bond P.L. Metagenomic and metaproteomic analyses of *Accumulibacter phosphatis*-enriched floccular and granular biofilm // *Environmental microbiology*. – 2016. – Т. 18. – №. 1. – С. 273-287.
15. Barnard J. L. A review of biological phosphorus removal in the activated sludge process // *Water sa*. – 1976. – Т. 2. – №. 3. – С. 136-144.
16. Bassin J.P., Winkler M.-K.H., Kleerebezem R., Dezotti M., van Loosdrecht M.C.M., Improved phosphate removal by selective sludge discharge in

aerobic granular sludge reactors // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2012. – T. 109. – №. 8. – C. 1919-1928.

17. Begmatov S., Dorofeev A.G., Kadnikov V.V., Beletsky, A.V., Pimenov N.V., Ravin N.V., Mardanov A.V. The structure of microbial communities of activated sludge of large-scale wastewater treatment plants in the city of Moscow // *Scientific Reports*. – 2022. – T. 12. – №. 1. – C. 3458.

18. Begum S.A., Batista J.R. Microbial selection on enhanced biological phosphorus removal systems fed exclusively with glucose // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2012. – T. 28. – C. 2181-2193.

19. Bond P.L., Hugenholtz P., Keller J., Blackall L.L. Bacterial community structures of phosphate-removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors // *Applied and environmental microbiology*. – 1995. – T. 61. – №. 5. – C. 1910-1916.

20. Brdjanovic D., Logemann S., Van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Alaerts G.J., Heijnen J.J. Influence of temperature on biological phosphorus removal: process and molecular ecological studies // *Water Research*. – 1998. – T. 32. – №. 4. – C. 1035-1048.

21. Brdjanovic D., van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Alaerts G.J., Heijnen JJ. 1997. Temperature effects on physiology of biological phosphorus removal // *Journal of environmental engineering*. – 1997. – T. 123. – №. 2. – C. 144-153.

22. Burow L.C., Mabbett A.N., McEwan A.G., Bond P.L., Blackall L.L. Bioenergetic models for acetate and phosphate transport in bacteria important in enhanced biological phosphorus removal // *Environmental microbiology*. – 2008. – T. 10. – №. 1. – C. 87-98.

23. Camejo P.Y., Oyserman B.O., McMahon K.D., Noguera D.R. Integrated omic analyses provide evidence that a “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” strain performs denitrification under microaerobic conditions // *Msystems*. – 2019. – T. 4. – №. 1. – C. e00193-18.

24. Campos F., Álvarez J.A., Ortiz-Severín J., Varas M.A., Lagos C.F., Cabrera R., Chávez F. P. Fluorescence enzymatic assay for bacterial polyphosphate kinase 1 (*PPK1*) as a platform for screening antivirulence molecules // *Infection and Drug Resistance*. – 2019. – C. 2237-2242.
25. Cao Y., Kwok B.H., van Loosdrecht M.C., Daigger G.T., Png H.Y., Long W.Y., Chye C.S., Ghani Y.A. The occurrence of enhanced biological phosphorus removal in a 200,000 m³/day partial nitrification and Anammox activated sludge process at the Changi water reclamation plant, Singapore // *Water Science and Technology*. – 2017. – T. 75. – №. 3. – C. 741-751.
26. Carey P.R. Raman spectroscopy, the sleeping giant in structural biology, awakes // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – T. 274. – №. 38. – C. 26625-26628.
27. Carvalho G., Lemos P.C., Oehmen A., Reis M.A. Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure // *Water research*. – 2007. – T. 41. – №. 19. – C. 4383-4396.
28. Chernousova E., Gridneva E., Grabovich M., Dubinina G., Akimov V., Rossetti S., Kuever J. *Thiothrix caldifontis* sp. nov. and *Thiothrix lacustris* sp. nov., gammaproteobacteria isolated from sulfide springs // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2009. – T. 59. – №. 12. – C. 3128-3135.
29. Cloete T.E., Oosthuizen D.J. The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge // *Water Research*. – 2001. – T. 35. – №. 15. – C. 3595-3598.
30. Comeau Y., Hal K.J., Hancock R.E., Oldham W.K. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal // *Water Research*. – 1986. – T. 20. – №. 12. – C. 1511-1521.
31. Crocetti G.R., Hugenholtz P., Bond P.L., Schuler A., Keller J., Jenkins D., Blackall L.L. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation // *Applied and environmental microbiology*. – 2000. – T. 66. – №. 3. – C. 1175-1182.

32. Dai H., Wu Y., Peng L., Dai Z., Li X., Lu X. Effects of calcium on the performance, bacterial population and microbial metabolism of a denitrifying phosphorus removal system // *Bioresource Technology*. – 2017. – T. 243. – C. 828-835.
33. Dasgupta S., De Clippeleir H., Goel R. Short operational differences support granulation in a lab scale reactor in comparison to another conventional activated sludge reactor // *Bioresource technology*. – 2019. – T. 271. – C. 417-426.
34. De Kreuk M.K., Heijnen J.J., Van Loosdrecht M.C.M. Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge // *Biotechnology and bioengineering*. – 2005. – T. 90. – №. 6. – C. 761-769.
35. Deinema M.H., Van Loosdrecht M.C.M., Scholten A. Some physiological characteristics of *Acinetobacter* spp. accumulating large amounts of phosphate // *Water Science and Technology*. – 1985. – T. 17. – №. 11-12. – C. 119-125.
36. Diaz R., Mackey B., Chadalavada S., Heck P., Goel R. Enhanced Bio-P removal: Past, present, and future—A comprehensive review // *Chemosphere*. – 2022. – C. 136518.
37. Dulekgurgen E., Ovez S., Artan N., Orhon D. Enhanced biological phosphate removal by granular sludge in a sequencing batch reactor // *Biotechnology letters*. – 2003. – T. 25. – C. 687-693.
38. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics*. – 2010. – V. 26. – P. 2460-2461.
39. Ekama G.A., Wentzel M.C. A predictive model for the reactor inorganic suspended solids concentration in activated sludge systems // *Water Research*. – 2004. – T. 38. – №. 19. – C. 4093-4106.
40. Erdal U.G., Erdal Z.K., Randall C.W. The competition between PAOs (phosphorus accumulating organisms) and GAOs (glycogen accumulating organisms) in EBPR (enhanced biological phosphorus removal) systems at different temperatures and the effects on system performance // *Water Science and Technology*. – 2003. – T. 47. – №. 11. – C. 1-8.

41. Fernández-Gómez B., Richte M., Schüle M., Pinhas J., Acina S.G., González J.M. Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach // The ISME journal. – 2013. – T. 7. – №. 5. – C. 1026-1037.
42. Fernando E.Y., McIlroy S.J., Nierychlo M., Herbst F-A., Petriglieri F., Schmid M.C., Wagner M., Nielsen J.L., Nielsen P.H. Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological phosphorus removal with Raman-FISH // The ISME journal. – 2019. – T. 13. – №. 8. – C. 1933-1946.
43. Figdore B. A., Stensel H.D., Winkler M.K.H. Comparison of different aerobic granular sludge types for activated sludge nitrification bioaugmentation potential // Bioresource technology. – 2018. – T. 251. – C. 189-196.
44. Flowers J.J., He S., Yilmaz S., Noguera D.R., McMahon K.D. Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different '*Candidatus Accumulibacter*' clades // Environmental microbiology reports. – 2009. – T. 1. – №. 6. – C. 583-588.
45. Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // FEMS microbiology ecology. – 2016. – T. 92. – №. 3. – C. fiw018.
46. Frost R.L., Scholz R., López A., Xi Y. A vibrational spectroscopic study of the phosphate mineral whiteite $\text{CaMn}^{++} \text{Mg}_2\text{Al}_2 (\text{PO}_4)_4 (\text{OH})_2 \cdot 8 (\text{H}_2\text{O})$ // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2014. – T. 124. – C. 243-248.
47. Fuhs G.W., Chen M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater // Microbial Ecology. – 1975. – T. 2. – C. 119-138.
48. Gao H., Mao Y., Zhao X., Liu W.-T., Zhang T., Wells G. Genome-centric metagenomics resolves microbial diversity and prevalent truncated denitrification pathways in a denitrifying PAO-enriched bioprocess // Water research. – 2019. – T. 155. – C. 275-287.

49. Gimenez R., Nuñez M.F., Badia J., Aguilar J., Baldoma L. The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli* // Journal of bacteriology. – 2003. – T. 185. – №. 21. – C. 6448-6455.
50. Goel R.K., Sanhueza P., Noguera D.R. Evidence of *Dechloromonas* sp. participating in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) in a bench-scale aerated-anoxic reactor // Proceedings of the Water Environment Federation. – 2005. – T. 12. – C. 3864-3871.
51. Goswami O., Rouff A.A. Policy memo: a national framework for establishing a circular economy for phosphorus // The Journal of Science Policy & Governance – 2022 – T. 1 – C. 20.
52. Guedes da Silva L., Olavarria Gamez K., Castro Gomes J., Akkermans K., Welles L., Abbas B., van Loosdrecht M.C.M., Wahl S.A. Revealing the metabolic flexibility of “*Candidatus* *Accumulibacter phosphatis*” through redox cofactor analysis and metabolic network modeling // Applied and Environmental Microbiology. – 2020. – T. 86. – №. 24. – C. e00808-20.
53. Guo Y., Zeng W., Li N., Peng Y. Effect of electron acceptor on community structures of denitrifying polyphosphate accumulating organisms in anaerobic-anoxic-oxic (A2O) process using DNA based stable-isotope probing (DNA-SIP) // Chemical Engineering Journal. – 2018. – T. 334. – C. 2039-2049.
54. Hahnke R.L., Meier-Kolthoff J.P., García-López M., Mukherjee S., Huntemann M., Ivanova N.N., Woyke T., Kyrpides N.C., Klenk H.P., Göker M. Genome-based taxonomic classification of *Bacteroidetes* // Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 2003.
55. Hamza R., Rabii A., Ezzahraoui F.Z., Morgan G., Iorhemen O.T. A review of the state of development of aerobic granular sludge technology over the last 20 years: Full-scale applications and resource recovery // Case Studies in Chemical and Environmental Engineering. – 2022. – T. 5. – C. 100173.
56. Hascoet M.C., Florentz M., Granger P. Biochemical aspects of enhanced biological phosphorus removal from wastewater // Water science and technology. – 1985. – T. 17. – №. 11-12. – C. 23-41.

57. He S., Gall D.L., McMahon K.D. “*Candidatus Accumulibacter*” population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes // Applied and environmental microbiology. – 2007. – T. 73. – №. 18. – C. 5865-5874.
58. He S., McMahon K.D. Microbiology of ‘*Candidatus Accumulibacter*’ in activated sludge // Microbial biotechnology. – 2011. – T. 4. – №. 5. – C. 603-619.
59. He Q., Zhang W., Zhang S., Wang H. Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, endogenous denitrification and phosphorus removal with low superficial gas velocity // Chem. Eng. J.- 2017 – 326 – C. 1223-1231.
60. He Q., Chen L., Zhang S., Wang L., Liang J., Xia W., Wang H., Zhou J. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in aerobic granular sequencing batch reactors with high aeration intensity: Impact of aeration time // Bioresource technology. – 2018. – T. 263. – C. 214-222.
61. Helmer C., Kunst S. Low temperature effects on phosphorus release and uptake by microorganisms in EBPR plants // Water Science and Technology. – 1998. – T. 37. – №. 4-5. – C. 531-539.
62. Henriot O., Meunier C., Henry P., Mahillon J. Improving phosphorus removal in aerobic granular sludge processes through selective microbial management // Bioresource technology. – 2016. – T. 211. – C. 298-306.
63. Hesselmann R.P.X., Werlen C., Hahn D., van der Meer J.R., Zehnder A.J.B. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge // Systematic and Applied Microbiology. – 1999. – T. 22. – №. 3. – C. 454-465.
64. Horn M.A., Ihssen J., Matthies C., Schramm A., Acker G., Drake H.L. *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericanus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2005. – T. 55. – №. 3. – C. 1255-1265.

65. Hosie A.H.F., Poole P.S. Bacterial ABC transporters of amino acids // Research in microbiology. – 2001. – T. 152. – №. 3-4. – C. 259-270.
66. Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K., Brown C.T., Probst A.J., Castelle C.J., Banfield J.F. A new view of the tree of life // Nature microbiology. – 2016. – T. 1. – №. 5. – C. 1-6.
67. Izadi P., Eldyasti A.A review of biochemical diversity and metabolic modeling of EBPR process under specific environmental conditions and carbon source availability // Journal of Environmental Management. – 2021. – T. 288. – C. 112362.
68. Jilavenkatesa A., Condrate Sr R.A. The infrared and Raman spectra of β - and α -tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) // Spectroscopy letters. – 1998. – T. 31. – №. 8. – C. 1619-1634.
69. Jolkver E., Emer D., Ballan S., Krämer R., Eikmanns B.J., Marin K. Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum* // Journal of Bacteriology. – 2009. – T. 191. – №. 3. – C. 940-948.
70. Kawakoshi H., Nakazawa J., Fukada M., Sasagawa Y., Katano S., Nakamura A., Hosoyama H., Sasaki N., Ichikawa S. Hanada Deciphering the genome of polyphosphate accumulating actinobacterium *Microthrix phosphovorus* // DNA research. – 2012. – T. 19. – №. 5. – C. 383-394.
71. Kirkegaard R.H., McIlroy S.J., Kristensen J. M., Nierychlo M., Karst S.M., Dueholm M.S., Nielsen P.H The impact of immigration on microbial community composition in full-scale anaerobic digesters // Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 9343.
72. Kim J.M., Lee H.J., Lee D.S., Jeon C.O. Characterization of the denitrification-associated phosphorus uptake properties of “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” clades in sludge subjected to enhanced biological phosphorus removal // Applied and environmental microbiology. – 2013. – T. 79. – №. 6. – C. 1969-1979.

73. Kristiansen R., Nguyen H.T.T., Saunders A.M., Nielsen J. L., Wimmer R., Le V.Q., Nielsen P.H. A metabolic model for members of the genus *Tetrasphaera* involved in enhanced biological phosphorus removal // *The ISME journal*. – 2013. – T. 7. – №. 3. – C. 543-554.
74. Kong Y.H., Beer M., Rees G.N., Seviour R.J. Functional analysis of microbial communities in aerobic–anaerobic sequencing batch reactors fed with different phosphorus/carbon (P/C) ratios // *Microbiology*. – 2002. – T. 148. – №. 8. – C. 2299-2307.
75. Kong Y.H., Xia Y., Nielsen J.L., Nielsen P.H. Ecophysiology of a group of uncultured Gammaproteobacterial glycogen-accumulating organisms in full-scale enhanced biological phosphorus removal wastewater treatment plants // *Environmental microbiology*. – 2006. – T. 8. – №. 3. – C. 479-489.
76. Kuba T., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J. Phosphorus and nitrogen removal with minimal COD requirement by integration of denitrifying dephosphatation and nitrification in a two-sludge system // *Water research*. – 1996. – T. 30. – №. 7. – C. 1702-1710.
77. Law Y., Kirkegaard R.H., Cokro A.A., Liu X., Arumugam K., Xie C., Stockholm-Bjerregaard M., Drautz-Moses D.I., Nielsen P.H., Wuertz S., Williams R.B.H. Integrative microbial community analysis reveals full-scale enhanced biological phosphorus removal under tropical conditions // *Scientific Reports*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 25719.
78. Levantesi C., Serafim L.S., Crocetti G.R., Lemos P.C., Rossetti S., Blackall L.L., Reis M.A.M., Tandoi V. Analysis of the microbial community structure and function of a laboratory scale enhanced biological phosphorus removal reactor // *Environmental microbiology*. – 2002. – T. 4. – №. 10. – C. 559-569.
79. Levin G. V., Shapiro J. Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms // *Journal (Water Pollution Control Federation)*. – 1965. – C. 800-821.
80. Li C., Liu S., Ma T., Zheng M., Ni J. Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in a sequencing batch reactor (SBR) under low temperature // *Chemosphere*. – 2019. – T. 229. – C. 132-141.

81. Li W.W., Zhang H.L., Sheng G.P., Yu H.Q. Roles of extracellular polymeric substances in enhanced biological phosphorus removal process // *Water Research*. – 2015. – T. 86. – C. 85-95.
82. Lin Z., Wang Y., Huang W., Wang J., Chen L., Zhou J., He Q. Single-stage denitrifying phosphorus removal biofilter utilizing intracellular carbon source for advanced nutrient removal and phosphorus recovery // *Bioresource technology*. – 2019. – T. 277. – C. 27-36.
83. Liu R., Hao X., Chen Q., Li J. Research advances of *Tetrasphaera* in enhanced biological phosphorus removal: a review // *Water research*. – 2019. – T. 166. – C. 115003.
84. Liu X.M., Sheng G.P., Luo H.W., Zhang F., Yuan S.J., Xu J., Zeng R.J., Wu J.G., Yu H.Q., Contribution of extracellular polymeric substances (EPS) to the sludge aggregation // *Environmental science & technology*. – 2010. – T. 44. – №. 11. – C. 4355-4360.
85. Lonetti A., Sziogyarto Z., Bosch D., Loss O., Azevedo C., Saiardi A. Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – T. 286. – №. 37. – C. 31966-31974.
86. Lopez-Vazquez C.M., Song Y.I., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Moussa M.S., Gijzen H.J., van Loosdrecht M.M. Short-term temperature effects on the anaerobic metabolism of glycogen accumulating organisms // *Biotechnology and bioengineering*. – 2007. – T. 97. – №. 3. – C. 483-495.
87. Lopez-Vazquez C.M., Oehmen A., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Gijzen H.J., Yuan Z., van Loosdrecht M.C. Modeling the PAO–GAO competition: effects of carbon source, pH and temperature // *Water Research*. – 2009. – T. 43. – №. 2. – C. 450-462.
88. López-Gutiérrez J.C., Toro M., López-Hernández D. Seasonality of organic phosphorus mineralization in the rhizosphere of the native savanna grass, *Trachypogon plumosus* // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2004. – T. 36. – №. 10. – C. 1675-1684.

89. Lu H., Oehmen A., Viridis B., Keller J., Yuan Z. Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources // *Water Research*. – 2006. – T. 40. – №. 20. – C. 3838-3848.
90. Magoč T., Salzberg S.L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies // *Bioinformatics*. – 2011. – T. 27. – №. 21. – C. 2957-2963.
91. Mamais D., Jenkins D. The effects of MCRT and temperature on enhanced biological phosphorus removal // *Water science and technology*. – 1992. – T. 26. – №. 5-6. – C. 955-965.
92. Manas A., Biscans B., Sperandio M. Biologically induced phosphorus precipitation in aerobic granular sludge process // *Water research*. – 2011. – T. 45. – №. 12. – C. 3776-3786.
93. Mao Y., Graham D.W., Tamaki H., Zhang T. Dominant and novel clades of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in 18 globally distributed full-scale wastewater treatment plants // *Scientific Reports*. – 2015. – T. 5. – №. 1. – C. 11857.
94. Mao Y., Zhang X., Xia X., Zhong H., Zhao L. Versatile aromatic compound-degrading capacity and microdiversity of *Thauera* strains isolated from a coking wastewater treatment bioreactor // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2010. – T. 37. – №. 9. – C. 927-934.
95. Martin H.G., Ivanova N., Kunin V., Warnecke F., Barry K.W., McHardy A.C., Hugenholtz P. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities // *Nature biotechnology*. – 2006. – T. 24. – №. 10. – C. 1263-1269.
96. Marques R., Ribera-Guardia A., Santos J., Carvalho G., Reis M.A.M., Pijuan M., Oehmen A. Denitrifying capabilities of *Tetrasphaera* and their contribution towards nitrous oxide production in enhanced biological phosphorus removal processes // *Water research*. – 2018. – T. 137. – C. 262-272.
97. Maszenan A.M., Seviour R.J., Patel B.K.C., Schumann P., Burghardt J., Tokiwa Y., Stratton H.M. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera*

gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2000. – T. 50. – №. 2. – C. 593-603.

98. McIlroy S.J., Albertsen M., Andresen E.K., Saunders A.M., Kristiansen R., Stokholm-Bjerregaard M., Nielsen K.L., Nielsen P.H. ‘*Candidatus* Competibacter’-lineage genomes retrieved from metagenomes reveal functional metabolic diversity // The ISME journal. – 2014. – T. 8. – №. 3. – C. 613-624.

99. McIlroy S.J., Onetto C.A., McIlroy B., Herbst F.A., Dueholm M.S., Kirkegaard R.H., Nielsen P.H. Genomic and in situ analyses reveal the *Micropruina* spp. as abundant fermentative glycogen accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal systems // Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 1004.

100. McKenzie C.M., Seviour E.M., Schumann P., Maszenan A.M., Liu J.R., Webb R.I., Seviour R.J. Isolates of ‘*Candidatus* Nostocoida limicola’ should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – T. 56. – №. 10. – C. 2279-2290.

101. McMahon K.D., He S., Oehmen A. The microbiology of phosphorus removal // Microbial Ecology of Activated Sludge / Eds. Seviour R., Nielsen P.H. London: IWA. – 2010. – C. 668.

102. Mechichi T., Stackebrandt E., Gad'on N., Fuchs G. Phylogenetic and metabolic diversity of bacteria degrading aromatic compounds under denitrifying conditions, and description of *Thauera phenylacetica* sp. nov., *Thauera aminoaromatica* sp. nov., and *Azoarcus buckelii* sp. nov // Archives of microbiology. – 2002. – T. 178. – C. 26-35.

103. Meinhold J., Arnold E., Isaacs S. Effect of nitrite on anoxic phosphate uptake in biological phosphorus removal activated sludge // Water Research. – 1999. – T. 33. – №. 8. – C. 1871-1883.

104. Mino T., Arun V., Tsuzuki Y., Matsuo T. Effect of phosphorus accumulation on acetate metabolism in the biological phosphorus removal process // Biological phosphate removal from wastewaters. – Pergamon. – 1987. – C. 27-38.

105. Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawaharasaki M., Masuda K., Kamagata Y. *Microthrix phosphovorans* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge // International journal of systematic bacteriology. – 1995. – T. 45. – №. 1. – C. 17-22.

106. Nancharaiyah Y.V., Reddy G.K.K. Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications // Bioresource technology. – 2018. – T. 247. – C. 1128-1143.

107. Nguyen H.T.T., Le V.Q., Hansen A.A., Nielsen J.L., Nielsen P.H. High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating Tetrasphaera-related bacteria in activated sludge systems // FEMS microbiology ecology. – 2011. – T. 76. – №. 2. – C. 256-267.

108. Nguyen H.T.T., Nielsen J.L., Nielsen P.H. ‘*Candidatus* Halomonas phosphatis’, a novel polyphosphate-accumulating organism in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants // Environmental Microbiology. – 2012. – T. 14. – №. 10. – C. 2826-2837.

109. Nguyen H.T.T., Kristiansen R., Vestergaard M., Wimmer R., Nielsen P.H. Intracellular accumulation of glycine in polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge, a novel storage mechanism under dynamic anaerobic-aerobic conditions // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – T. 81. – №. 14. – C. 4809-4818.

110. Nielsen P.H., Saunders A.M., Hansen A.A., Larsen P., Nielsen J.L. Microbial communities involved in enhanced biological phosphorus removal from wastewater—a model system in environmental biotechnology // Current opinion in biotechnology. – 2012. – T. 23. – №. 3. – C. 452-459.

111. Nierychlo M., Andersen K.S., Xu Y., Green N., Jiang C., Albertsen M. MiDAS 3: an ecosystem-specific reference database, taxonomy and knowledge platform for activated sludge and anaerobic digesters reveals species-level

microbiome composition of activated sludge // *Water Research*. – 2020. – T. 182. – C. 115955.

112. Nierychlo M., Milobedzka A., Petriglieri F., McIlroy B., Nielsen P.H., McIlroy S.J. The morphology and metabolic potential of the *Chloroflexi* in full-scale activated sludge wastewater treatment plants // *FEMS microbiology ecology*. – 2019. – T. 95. – №. 2. – C. fiy228.

113. Nurmiyanto A., Koderia H., Kindaichi T., Ozaki N., Aoi Y., Ohashi A. Dominant *Candidatus Accumulibacter phosphatis* enriched in response to phosphate concentrations in EBPR process // *Microbes and environments*. – 2017. – T. 32. – №. 3. – C. 260-267.

114. Oehmen A., Lemos P. C., Carvalho G., Yuan Z., Keller J., Blackall L. L., Reis M. A. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale // *Water research*. – 2007. – T. 41. – №. 11. – C. 2271-2300.

115. Onda S., Takii S. Isolation and characterization of a Gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium // *The Journal of General and Applied Microbiology*. – 2002. – T. 48. – №. 3. – C. 125-133.

116. Ong Y.H., Chua A.S.M, Huang Y.N., Ngoh G.C., You S.J. The microbial community in a high-temperature enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process // *Sustainable Environment Research*. – 2016. – T. 26. – №. 1. – C. 14-19.

117. Ong Y.H., Chua A.S.M., Lee B.P., Ngoh G.C. Long-term performance evaluation of EBPR process in tropical climate: start-up, process stability, and the effect of operational pH and influent C: P ratio // *Water science and technology*. – 2013. – T. 67. – №. 2. – C. 340-346.

118. Oyserman B.O., Noguera D.R., del Rio T.G., Tringe S.G., McMahon K.D. Metatranscriptomic insights on gene expression and regulatory controls in *Candidatus Accumulibacter phosphatis* // *The ISME journal*. – 2016a. – T. 10. – №. 4. – C. 810-822.

119. Oyserman B.O., Moya F., Lawson C.E., Garcia A.L., Vogt M., Heffernan M., Noguera D.R., McMahon K.D. Ancestral genome reconstruction

identifies the evolutionary basis for trait acquisition in polyphosphate accumulating bacteria // The ISME journal. – 2016b. – T. 10. – №. 12. – C. 2931-2945.

120. Panswad T., Doungchai A., Anotai J. Temperature effect on microbial community of enhanced biological phosphorus removal system // Water Research. – 2003. – T. 37. – №. 2. – C. 409-415.

121. Paula F.S., Chin J.P., Schnürer A., Müller B., Manesiotis P., Waters N., O’Flaherty V. The potential for polyphosphate metabolism in Archaea and anaerobic polyphosphate formation in *Methanosarcina mazei* // Scientific Reports. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 1-12.

122. Pelevina A., Gruzdev E., Berestovskaya Y., Dorofeev A., Nikolaev Y., Kallistova A., ... Mardanov A. New insight into the granule formation in the reactor for enhanced biological phosphorus removal // Frontiers in Microbiology. – 2023. – T. 14. – C. 1297694.

123. Penkov N.V. Relationships between molecular structure of carbohydrates and their dynamic hydration shells revealed by terahertz time-domain spectroscopy // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 21. – C. 11969.

124. Petriglieri F., Singleton C., Peces M., Petersen J.F., Nierychlo M., Nielsen P.H. “*Candidatus* Dechloromonas phosphatis” and “*Candidatus* Dechloromonas phosphovora”, two novel polyphosphate accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems // BioRxiv. – 2020. – C. 2020.11.05.369777.

125. Petriglieri F., Singleton C., Peces M., Petersen J.F., Nierychlo M., Nielsen P.H. “*Candidatus* Dechloromonas phosphoritropha” and “*Ca.* D. phosphorivorans”, novel polyphosphate accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems // The ISME Journal. – 2021. – T. 15. – №. 12. – C. 3605-3614.

126. Pijuan M., Ye L., Yuan Z. Free nitrous acid inhibition on the aerobic metabolism of poly-phosphate accumulating organisms // Water research. – 2010. – T. 44. – №. 20. – C. 6063-6072.

127. Putri D.N., Sahlan M., Montastruc L., Meyer M., Negny S., Hermansyah H. Progress of fermentation methods for bio-succinic acid production using agro-industrial waste by *Actinobacillus succinogenes* // *Energy Reports*. – 2020. – T. 6. – C. 234-239.
128. Qasim S.R., Zhu G. Wastewater treatment and reuse, theory and design examples, volume 1: Principles and basic treatment. – CRC press. – 2017.
129. Qiu G., Liu X., Saw N.M.M.T., Law Y., Zuniga-Montanez R., Thi S.S., Ngoc Nguyen T.Q., Nielsen P.H., Williams R.B.H., Wuertz S. Metabolic traits of *Candidatus Accumulibacter* clade IIF strain SCELSE-1 using amino acids as carbon sources for enhanced biological phosphorus removal // *Environmental Science & Technology*. – 2019a. – T. 54. – №. 4. – C. 2448-2458.
130. Rajesh Banu J., Merrylin J., Kavitha S., Yukesh Kannah R., Selvakumar P., Gopikumar S., Sivashanmugam P., Do K., Kumar G. Trends in biological nutrient removal for the treatment of low strength organic wastewaters // *Current Pollution Reports*. – 2021. – T. 7. – №. 1. – C. 1-30.
131. Roinestad F.A., Yall I. Volutin granules in *Zoogloea ramigera* // *Applied Microbiology*. – 1970. – T. 19. – №. 6. – C. 973-979.
132. Roy S., Guanglei Q., Zuniga-Montanez R., Williams R.B., Wuertz S. Recent advances in understanding the ecophysiology of enhanced biological phosphorus removal // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2021. – T. 67. – C. 166-174.
133. Rubio-Rincón F.J., Welles L., Lopez-Vazquez C.M., Nierychlo M., Abbas B., Geleijnse M., ... Brdjanovic D. Long-term effects of sulphide on the enhanced biological removal of phosphorus: the symbiotic role of *Thiothrix caldifontis* // *Water research*. – 2017. – T. 116. – C. 53-64.
134. Rubio-Rincón F.J., Weissbrodt D.G., Lopez-Vazquez C.M., Welles L., Abbas B., Albertsen M., Nielsen P.H., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. “*Candidatus Accumulibacter delftensis*”: A clade IC novel polyphosphate-accumulating organism without denitrifying activity on nitrate // *Water research*. – 2019. – T. 161. – C. 136-151.

135. Saad S., Welles L., Abbas B., Lopez-Vazquez C., van Loosdrecht M.C.M. Brdjanovic D. Denitrification of nitrate and nitrite by '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' clade IC // *Water Research*. – 2016. – T. 105. – C. 97-109.
136. Saito T., Brdjanovic D., Van Loosdrecht M.C.M. Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate accumulating organisms // *Water Research*. – 2004. – T. 38. – №. 17. – C. 3760-3768.
137. Salinero K.K. Keller K., Feil W.S., Feil H., Trong S., Di Bartolo G., Lapidus A. Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation // *BMC genomics*. – 2009. – T. 10. – C. 1-23.
138. Schuler A.J., Jenkins D. Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents, part II: Anaerobic adenosine triphosphate utilization and acetate uptake rates // *Water environment research*. – 2003. – T. 75. – №. 6. – C. 499-511.
139. Shen T., Qiu Y., Shi H. Mathematical simulation of feedforward control for nutrient removal in anaerobic–anoxic–oxic processes // *Environmental Engineering Science*. – 2010. – T. 27. – №. 8. – C. 633-641.
140. Shen N., Chen Y., Zhou Y. Multi-cycle operation of enhanced biological phosphorus removal (EBPR) with different carbon sources under high temperature // *Water research*. – 2017. – T. 114. – C. 308-315.
141. Shintani T., Liu W.T., Hanada S., Kamagata Y., Miyaoka S., Suzuki T., Nakamura K. *Micropruina glycogenica* gen. nov., sp. nov., a new Gram-positive glycogen-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*. – 2000. – T. 50 – Pt 1. – C. 201-207.
142. Skennerton C.T., Barr J.J., Slater F.R., Bond P.L., Tyson G.W. Expanding our view of genomic diversity in *Candidatus Accumulibacter* clades // *Environmental microbiology*. – 2015. – T. 17. – №. 5. – C. 1574-1585.

143. Skory C.D., Hector R.E., Gorsich S.W., Rich J.O. Analysis of a functional lactate permease in the fungus *Rhizopus* // Enzyme and microbial technology. – 2010. – T. 46. – №. 1. – C. 43-50.
144. Smolders G.J.F., van der Meij J., van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: stoichiometry and pH influence // Biotechnology and bioengineering. – 1994. – T. 43. – №. 6. – C. 461-470.
145. Srinath E.G., Sastry C.A. and Pillai S.C. Rapid removal of phosphorus from sewage by activated sludge // Experientia. – 1959. – T. 15. – C. 339-340.
146. Stokholm-Bjerregaard M., McIlroy S.J., Nierychlo M., Karst S.M., Albertsen M., Nielsen P.H.A. A critical assessment of the microorganisms proposed to be important to enhanced biological phosphorus removal in full-scale wastewater treatment systems // Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 718.
147. Song H., Lee S.Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation // Enzyme and microbial technology. – 2006. – T. 39. – №. 3. – C. 352-361.
148. Soo R. M., Skennerton C.T., Sekiguchi Y., Imelfort M., Paech, S.J., Dennis P.G., ... Hugenholtz P. An expanded genomic representation of the phylum *Cyanobacteria* // Genome biology and evolution. – 2014. – T. 6. – №. 5. – C. 1031-1045.
149. Speirs L.B.M., Rice D.T.F., Petrovski S., Seviour R.J. The phylogeny, biodiversity, and ecology of the *Chloroflexi* in activated sludge // Frontiers in microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 2015.
150. Spring S., Wagner M., Schumann P., Kämpfer P. *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a novel polyhydroxyalkanoate-and polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge, and reclassification of *Pseudomonas spinosa* as *Malikia spinosa* comb. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2005. – T. 55. – №. 2. – C. 621-629.
151. Tarayre C., Charlier R., Delepierre A., Brognaux A., Bauwens J., Francis F., ... Delvigne F. Looking for phosphate-accumulating bacteria in activated sludge

processes: a multidisciplinary approach // Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – T. 24. – C. 8017-8032.

152. Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse // Metcalf and Eddy, McGraw Hill, New York, USA – 2014. – C. 2044.

153. Terashima M., Yama A., Sato M., Yumoto I., Kamagata Y., Kato S. Culture-Dependent and -Independent Identification of Polyphosphate-Accumulating *Dechloromonas* spp. Predominating in a Full-Scale Oxidation Ditch Wastewater Treatment Plant // Microbes Environ. – 2016. – T. 31. – №. 4. – C. 449-455

154. Thomas F., Hehemann J.-H., Rebuffet E., Czjzek M., Michel G., Environmental and gut bacteroidetes: the food connection // Frontiers in microbiology. – 2011. – T. 2. – C. 93.

155. Tian W., Lopez-Vazquez C.M., Li W., Brdjanovic D., van Loosdrecht M.C.M. Occurrence of PAOI in a low temperature EBPR system // Chemosphere. – 2013. – T. 92. – №. 10. – C. 1314-1320.

156. Tian R., Ning D., He Z., Zhang P., Spencer S. J., Gao S., Zhou J. Small and mighty: adaptation of superphylum Patescibacteria to groundwater environment drives their genome simplicity // Microbiome. – 2020. – T. 8. – C. 1-15.

157. Tu Y., Schuler A.J. Low acetate concentrations favor polyphosphate-accumulating organisms over glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal from wastewater // Environmental science & technology. – 2013. – T. 47. – №. 8. – C. 3816-3824.

158. Vasilyeva L.V. Omelchenko M.V., Berestovskaya Y.Y., Lysenko A.M., Abraham W.R., Dedysh S.N., Zavarzin G.A. *Asticcacaulis benevestitus* sp. nov., a psychrotolerant, dimorphic, prosthecate bacterium from tundra wetland soil // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2006. – T. 56. – №. 9. – C. 2083-2088.

159. Verhagen K.J.A., van Gulik W.M., Wahl S.A. Dynamics in redox metabolism, from stoichiometry towards kinetics // Current opinion in biotechnology. – 2020. – T. 64. – C. 116-123.

160. Wainaina S., Lukitawesa, Kumar Awasthi M., Taherzadeh M.J. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: a critical review // *Bioengineered*. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 437-458.
161. Wang D., Xu Q., Yang W., Chen Y., Li X., Liao D., Yang G., Yang Q., Zeng G. A new configuration of sequencing batch reactor operated as a modified aerobic/extended-idle regime for simultaneously saving reactor volume and enhancing biological phosphorus removal // *Biochemical engineering journal*. – 2014. – T. 87. – C. 15-24.
162. Wang B., Jiao E., Guo Y., Zhang L., Meng Q., Zeng W., Peng Y. Investigation of the polyphosphate-accumulating organism population in the full-scale simultaneous chemical phosphorus removal system // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2020. – T. 27. – C. 37877-37886.
163. Welles L., Lopez-Vazquez C.M., Hooijmans C.M. Impact of salinity on the aerobic metabolism of phosphate-accumulating organisms // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2015. – T. 99. – C. 3659-3672.
164. Welles L., Lopez-Vazquez C.M., Hooijmans C.M., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Prevalence of '*Candidatus Accumulibacter phosphatis*' type II under phosphate limiting conditions // *Amb Express*. – 2016. – T. 6. – №. 1. – C. 1-12.
165. Wentzel M.C., Dold P.L., Ekama G.A., Marais G.V.R. Kinetics of biological phosphorus release // *Water Science and Technology*. – 1985. – T. 17. – №. 11-12. – C. 57-71.
166. Weissbrodt D.G., Schneiter G.S., Fürbringer J.M., Holliger C. Identification of trigger factors selecting for polyphosphate-and glycogen-accumulating organisms in aerobic granular sludge sequencing batch reactors // *Water research*. – 2013. – T. 47. – №. 19. – C. 7006-7018.
167. Wexler M., Richardson D.J., Bond P.L. Radiolabelled proteomics to determine differential functioning of *Accumulibacter* during the anaerobic and aerobic phases of a bioreactor operating for enhanced biological phosphorus removal // *Environmental microbiology*. – 2009. – T. 11. – №. 12. – C. 3029-3044.

168. Wilfert P., Kumar P.S., Korving L., Witkamp G.-J., van Loosdrecht M.C.M. The relevance of phosphorus and iron chemistry to the recovery of phosphorus from wastewater: a review // *Environmental science & technology*. – 2015. – T. 49. – №. 16. – C. 9400-9414.
169. Wilmes P., Andersson A.F., Lefsrud M.G., Wexler M., Shah M., Zhang B., Hettich R.L., Bond P.L., VerBerkmoes N.C., Banfield J.F. Community proteogenomics highlights microbial strain-variant protein expression within activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal // *The ISME journal*. – 2008. – T. 2. – №. 8. – C. 853-864.
170. Winkler M., Coats E.R., Brinkman C.K. Advancing post-anoxic denitrification for biological nutrient removal // *Water research*. – 2011. – T. 45. – №. 18. – C. 6119-6130.
171. Wong M.T., Liu W.T. Ecophysiology of *Deffluviicoccus*-related tetrad-forming organisms in an anaerobic–aerobic activated sludge process // *Environmental microbiology*. – 2007. – T. 9. – №. 6. – C. 1485-1496.
172. Wu C.Y., Peng Y.Z., Wang S.Y., Ma Y. Enhanced biological phosphorus removal by granular sludge: from macro-to micro-scale // *Water research*. – 2010. – T. 44. – №. 3. – C. 807-814.
173. Wu L., Ning D., Zhang B., Li Y., Zhang P., Shan X., Ling F. Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants // *Nature microbiology*. – 2019. – T. 4. – №. 7. – C. 1183-1195.
174. Yu K., Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge // *PloS one*. – 2012. – T. 7. – №. 5. – C. e38183.
175. Yuan Y., Liu J., Ma B., Liu Y., Wang B., Peng Y. Improving municipal wastewater nitrogen and phosphorous removal by feeding sludge fermentation products to sequencing batch reactor (SBR) // *Bioresource technology*. – 2016. – T. 222. – C. 326-334.

176. Yuan Z., Pratt S., Batstone D.J. Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes // *Current opinion in biotechnology*. – 2012. – T. 23. – №. 6. – C. 878-883.
177. Yuan C., Wang B., Peng Y., Li X., Zhang, Q., Hu T. Enhanced nutrient removal of simultaneous partial nitrification, denitrification and phosphorus removal (SPNDPR) in a single-stage anaerobic/micro-aerobic sequencing batch reactor for treating real sewage with low carbon/nitrogen // *Chemosphere*. – 2020. – T. 257. – C. 127097.
178. Yun G., Lee H., Hong Y., Kim S., Daigger G.T., Yun Z. The difference of morphological characteristics and population structure in PAO and DPAO granular sludges // *Journal of Environmental Sciences*. – 2019. – T. 76. – C. 388-402.
179. Zeng W, Li B., Wang X., Bai X., Peng Y. Influence of nitrite accumulation on “*Candidatus Accumulibacter*” population structure and enhanced biological phosphorus removal from municipal wastewater // *Chemosphere*. – 2016. – T. 144. – C. 1018-1025.
180. Zhang M., Gao B., Yao Y., Inyang M. Phosphate removal ability of biochar/MgAl-LDH ultra-fine composites prepared by liquid-phase deposition // *Chemosphere*. – 2013. – T. 92. – №. 8. – C. 1042-1047.
181. Zhang W., Silva S.R.P. Raman and FT-IR studies on dye-assisted dispersion and flocculation of single walled carbon nanotubes // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2010. – T. 77. – №. 1. – C. 175-178.
182. Zhang A.-N., Mao Y., Wang Y., Zhang T. Mining traits for the enrichment and isolation of not-yet-cultured populations // *Microbiome*. – 2019. – T. 7. – C. 1-13.
183. Zheng X., Sun P., Han J., Song Y., Hu Z., Fan H., Lv S. Inhibitory factors affecting the process of enhanced biological phosphorus removal (EBPR)—A mini-review // *Process biochemistry*. – 2014. – T. 49. – №. 12. – C. 2207-2213.

184. Zhou Y., Pijuan M., Yuan Z. Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2007. – T. 98. – №. 4. – C. 903-912.
185. Zhou Y., Ganda L., Lim M., Yuan Z., Kjelleberg S., Ng W. Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs) // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2010. – T. 88. – C. 359-369.
186. Zhou Y., Ganda L., Lim M., Yuan Z., Ng W.J. Response of poly-phosphate accumulating organisms to free nitrous acid inhibition under anoxic and aerobic conditions // *Bioresource Technology*. – 2012. – T. 116. – C. 340-347.
187. Dueholm M.S., Nierychlo M., Andersen K.S., Rudkjøbing V., Knutsson S., Albertsen M., Nielsen P.H. MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants // *Nature communications*. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 1908.