

На правах рукописи

ПЕЛЕВИНА АННА ВИТАЛЬЕВНА

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

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории реликтовых микробных сообществ Института микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: **Пименов Николай Викторович**,
доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией реликтовых микробных сообществ ФИЦ Биотехнологии РАН

Официальные оппоненты: **Намсараев Зоригто Баирович**,
Кандидат биологических наук, начальник лаборатории синтетической биологии, Центр геномных исследований "Курчатовский геномный центр", Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий, НИЦ "Курчатовский институт"

Щеголькова Наталия Михайловна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры географии почв, факультета почвоведения Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Защита диссертации состоится 07 июня 2024 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.233.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН (117312, г. Москва, пр-т 60-летия Октября д.7, корп.2.) и на сайте ФИЦ Биотехнологии РАН: https://www.fbras.ru/materialyi-k-zashhite-dissertatsii_pelevina-a-v.html

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 года

Ученый секретарь
диссертационного совета

доктор биологических наук
Хижняк Татьяна Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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; Stokholm-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 Banu 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-аккумуляторных 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-аккумуляторные бактерии родов *Dechloromonas* и *Zoogloea* семейства *Rhodocyclaceae*, которые эффективно удаляли фосфор из среды.

Последовательно-периодическим способом культивирования получено стабильно функционирующее фосфат-аккумуляторное 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-аккумуляторного 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Биореактор. Лабораторный биореактор для циклического культивирования микробного сообщества, был создан на основе биореактора BIOSTAT В (фирмы «SARTORIUS»), имеющего рабочий объемом 2 л, снабженного перемешивающим устройством и внешней рубашкой для термостатирования. Схема биореактора для культивирования представлена на рисунке 1.

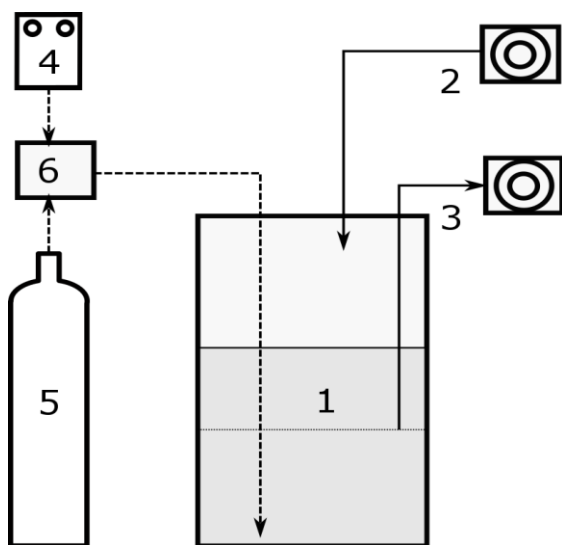


Рисунок 1. Схема установки для отъемно-доливного культивирования микроорганизмов: 1 – биореактор; 2 – насос подачи среды; 3 – насос отведения культуры; 4 – воздушный компрессор; 5 – источник газообразного азота; 6 – система регулирования подачи газов (цитировано по Пелевина и соавт., 2021).

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).

Условия культивирования. Отъемно-доливной биореактор

Каждый цикл культивирования микробного сообщества в отъемно-доливном биореакторе длился 6 ч и состоял из нескольких последовательных этапов:

(1) создание анаэробных условий – продувка реактора азотом в течение 5 мин со скоростью 5 л/мин (концентрация O_2 в биореакторе $<0,05$ мг O_2 /л), подача питательной среды – 0,125 л. Общая продолжительность этапа – 10 мин.

(2) анаэробный период, перемешивание – 200 об/мин. Продолжительность – 2 ч 50 мин.

(3) аэробный период, продувка реактора воздухом. Продолжительность – 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. Удельная скорость протока системы составляла $0,29$ ч⁻¹, что соответствовало возрасту культуры 3,4 суток.

Температуру культивирования поддерживали 18°C , pH 7,5–8,2, соотношение фосфора к ацетату в среде составляло 0,09 моль/моль.

Состав питательной среды (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.

Последовательно-периодический биореактор (SBR)

Каждый SBR-цикл включал пять последовательных этапов:

(1) создание анаэробных условий – продувка реактора азотом в течение 5 мин со скоростью 5 л/мин (концентрация O_2 в биореакторе $<0,05$ мг O_2 /л), подача питательной среды – 0,125 л. Общая продолжительность этапа – 30 мин.

(2) анаэробный период, перемешивание – 200 об/мин, продолжительность – 2 ч 25 мин;

(3) аэробный период, продувка реактора воздухом – 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. Удельная скорость протока системы составляла $0,06$ ч⁻¹, что соответствовало возрасту культуры 17,5 суток. Для удаления избыточной биомассы, в каждом 28-ом SBR-цикле исключали период отстаивания, и отводили часть биомассы вместе со сливной жидкостью.

Температуру культивирования поддерживали 18 – 20°C , pH 5,5–8,7, соотношение фосфора к ацетату в среде составляло 0,09 моль/моль.

Состав питательной среды (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; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,150; раствор микроэлементов – 1мл/л, тиомочевина – 2,5 мг/л.

Состав раствора микроэлементов (г/л): 2Na-ЭДТА – 10; $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 1,5; H_3BO_3 – 0,15; $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,03; $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,12; $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,06; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,12; KI – 0,18; $\text{CoCl}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,15.

Аналитические методы

Значение pH среды измеряли с помощью pH-метра-иономера «Эксперт-001» (ООО Эконикс-Эксперт, Россия).

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

Количество взвешенного вещества определяли гравиметрическим методом в отобранной из реактора пробе после её фильтрования и высушивания (ПНДФ 14,1:2:4.254-09).

Концентрацию фосфатов определяли фотометрически с молибдатом аммония как в подающейся в биореактор питательной среде, так и на выходе из биореактора в конце аэробной и анаэробной фаз культивирования (ПНДФ 14.1:2:4.248-07). Активность ФАО оценивали по скорости высвобождения и поглощения иловой смесью фосфатов, соответственно, в анаэробных и аэробных условиях.

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

Физико-химические характеристики сточной, очищенной воды и активного ила определяли стандартными методами: дозу активного ила (г сухого вещества (СВ)/л) – высушиванием образцов ила до постоянного веса при 105°C; беззольное (органическое) вещество – как разницу по весу между массой высушенного ила и зольным остатком, определенным при сжигании (550°C) сухого образца в муфельной печи до постоянной массы.

Определение доступных субстратов. Определение динамики потребления субстрата и фосфатов проводили в периодических экспериментах. Из биореактора в конце аэробной фазы отбирали 200 мл культуры и помещали в сосуды емкостью 500 мл. 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 O_2 /л. В течение эксперимента прослеживали динамику концентрации фосфатов и субстрата в среде. Температуру поддерживали $20\pm 0,2^\circ\text{C}$.

Микроскопические методы. Морфологию клеток исследовали на микроскопе «Olympus CX41» с фазовым контрастом («Olympus», Япония). 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, затем фиксировали в 1% (масса/объем) OsO₄ в том же буфере в течение 4 ч при 20°C (Vasilyeva et al., 2006).

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.

Молекулярные методы

Метагеномную ДНК из образцов активного ила выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Германия) по протоколам производителя. 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. Мультиплексировали с помощью наборов Nextera XT Index Kit v2. ПЦР фрагменты секвенировали с использованием Illumina MiSeq. Для каждого образца получали не менее 8 тысяч последовательностей фрагментов генов 16S рРНК. Таксономическую идентификацию микроорганизмов по последовательностям генов 16S рРНК проводили с использованием usearch и базы данных Silva.

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 concost 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

Получение микробного консорциума, способного удалять фосфор из среды при отъемно-доливном способе культивирования

Циклический отъемно-доливной режим работы биореактора, с использованием активного ила из блока удаления биогенных элементов Люберецких очистных сооружений, был выбран для минимизации образования гранул и получения гомогенного микробного сообщества, обогащенного ФАО. Развитие фосфат-аккумулирующего микробного сообщества в биореакторе прослеживали в течение 22 сут. В первые 15 сут культивирования происходило уменьшение биомассы с 3,43 г/л до

0,2 г/л за счет ее вымывания. С 15 до 22 сут концентрация микробной биомассы была постоянной (0,2 г/л), что свидетельствовало о стабилизации работы биореактора. Одновременно с этим происходило постепенное увеличение эффективности удаления фосфора, которая к 22 сут достигала 50%.

Динамика фосфора (рис. 2) носила циклический характер: в анаэробной стадии содержание фосфора увеличивалось, а в аэробной происходило уменьшение его концентрации, что указывало на то, что удаление фосфора из среды биореактора было обусловлено работой ФАО, развивающихся в условиях циклического культивирования при высокой скорости роста.

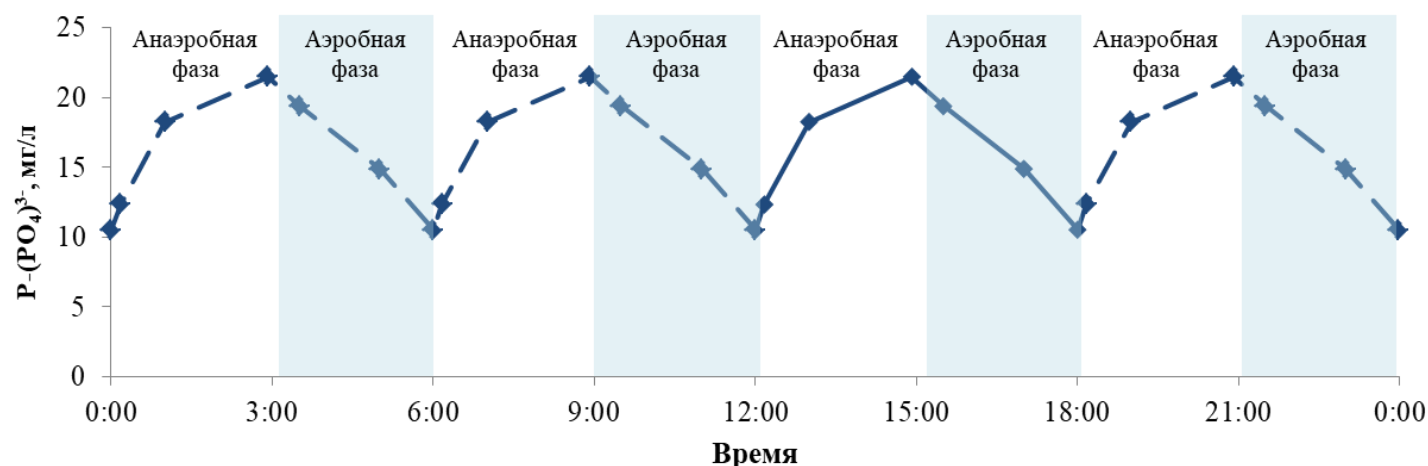


Рисунок 2. Динамика концентрации фосфора в отъемно-доливном биореакторе на 22 сут культивирования.

Микроскопическое исследование микробного сообщества биореактора выявило морфологическое разнообразие бактериальных форм в его составе. Большинство (до 85%) клеток содержало включения (рис. 3а). При картировании микробного сообщества методом рентгеновского микроанализа, в клетках палочковидной формы размером 0,5×2 мкм были обнаружены электронно-плотные структуры, которые были идентифицированы как включения фосфора (рис. 3б, в).

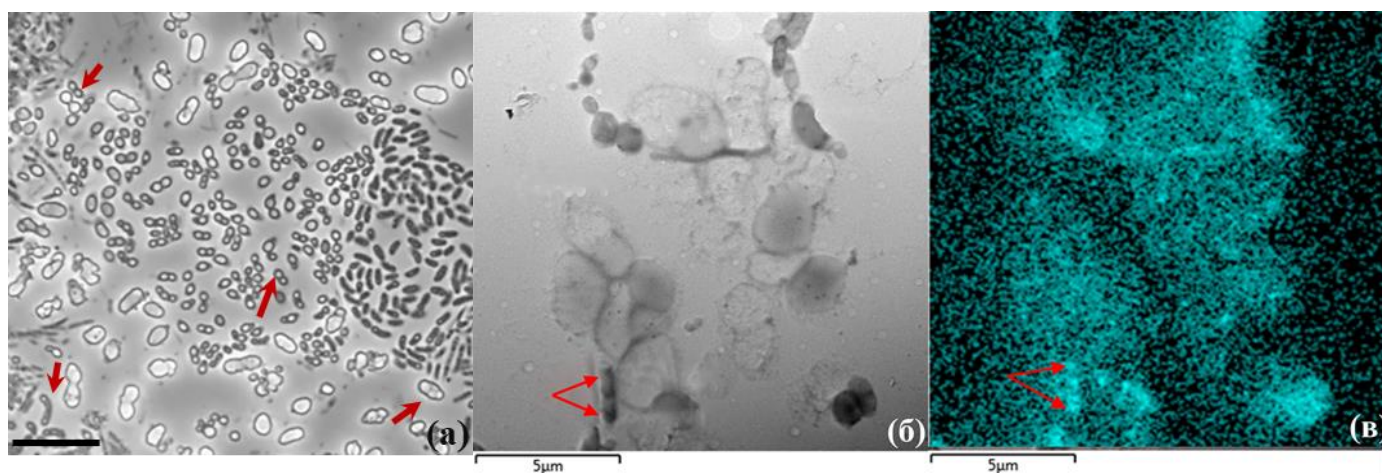


Рисунок 3. Бактериальное разнообразие в составе микробного сообщества биореактора: а – фазовый контраст, стрелками показаны клетки с включениями (масштаб 10 мкм); б – электронная микрофотография тотальных препаратов клеток; в – рентгеновский анализ образца (б) в режиме картирования, голубым цветом показано распределение фосфора (цитировано по Пелевина и соавт., 2021).

Профилирование по гену 16S рРНК показало, что в ходе развития микробного сообщества существенно изменялось соотношение представителей ФАО (рис. 4). Снижалась доля представителей рода *Thauera* (с 3,6 до 0,1%), Увеличились доли представителей рода *Zoogloea* (с 0,09 до 11,5%) и представителей рода *Dechloromonas* семейства *Rhodocyclaceae* – с 0,74 до 11,1%. Бактерии *Ca. Accumulibacter* в момент загрузки биореактора были ожидаемо идентифицированы и представлены двумя ОТЕ, доли которых составляли всего 0,01% и 0,2%. Однако в процессе культивирования доля этих организмов снижалась, и к концу работы биореактора они не были обнаружены в составе микробного сообщества. Таким образом, в биореакторе в процессе циклического культивирования развивались представители ФАО, которые не были характерны для крупномасштабных очистных сооружений (Artan, Orhon, 2005; Пелевина и соавт., 2021)

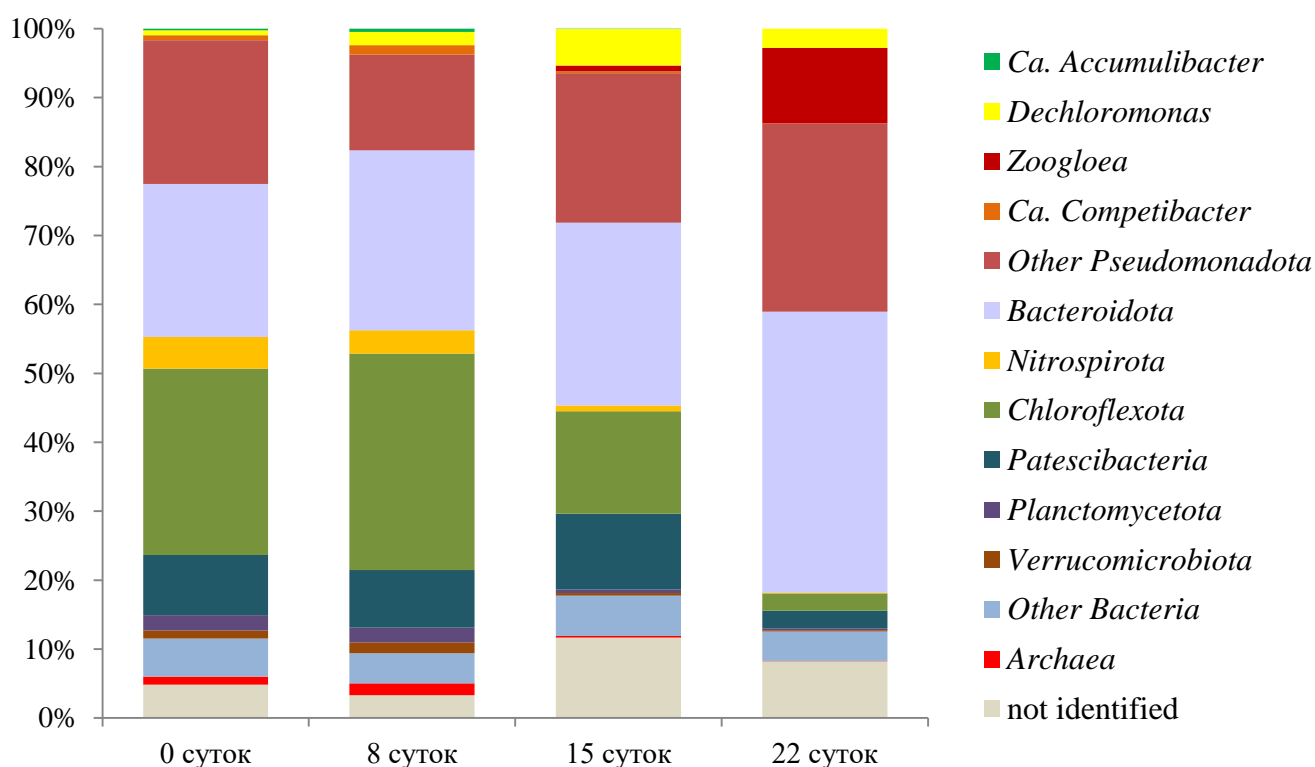


Рисунок 4. Таксономический состав микробного сообщества биореактора на основе анализа V3–V4 региона гена 16S рРНК.

Исследование особенностей формирования фосфат-аккумулирующего микробного сообщества при последовательно-периодическом способе культивирования

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 сут была прослежена динамика формирования микробного сообщества, способного удалять фосфор из среды.

В ходе исследования было получено микробное сообщество, обогащенное ФАО, которое эффективно удаляло фосфор. В течение первых 60 мин анаэробной фазы каждого цикла работы реактора наблюдалось полное потребление ацетата с одновременным высвобождением фосфора. В течение первых 10 сут культивирования циклического поглощения и выброса фосфора микробным сообществом в среду не наблюдалось (таблица 1).

Таблица 1. Характеристики эффективности работы последовательно-периодического биореактора с момента запуска до 400 сут культивирования

	Сутки культивирования					
	10	40	150	200	250	400
Концентрация Р в поступающей среде, мг/л	25	25	25	25	25	25
Содержание Р в очищенной воде, мг/л	18,7	17,6	15,1	9,4	3,9	3,3
Эффективность удаления Р, %	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
Р/Ац, Р- моль /С-моль	<0,1	0,28	0,73	0,77	0,72	0,76
Ац/Р, мг/мг	47,0	40	29,9	19,0	14,0	13,6
Концентрация биомассы г СВ/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 приводило к увеличению эффективности удаления фосфора из среды реактора. Количество выделившегося в среду биореактора фосфора в конце анаэробной фазы в течение одного цикла было 100-110 мг/л, а в конце аэробной фазы – 10-15 мг/л. Концентрация биомассы в реакторе составляла $3,5 \pm 0,3$ г СВ/л. Содержание фосфора в биомассе было $10,6 \pm 0,1\%$ от сухого веса. Эффективность удаления фосфора к 200 сут культивирования составила 63%.

К 400 сут работы биореактора эффективность удаления фосфора достигала 86,4%. Среднее содержание фосфора в биомассе составляло 14% от сухого веса.

Молекулярный анализ состава микробного сообщества ила, который использовали для загрузки реактора, показал, что в нём доминировали представители четырех филумов – *Chloroflexota*, *Bacteroidota*, *Pseudomonadota* (ранее *Proteobacteria*) и *Patescibacteria*. В ходе работы биореактора происходило изменение таксономического

состава микроорганизмов и уменьшение разнообразия форм. Снижалась доля *Chloroflexota* и *Patescibacteria* и было утеряно большинство минорных групп микроорганизмов (рис.5).

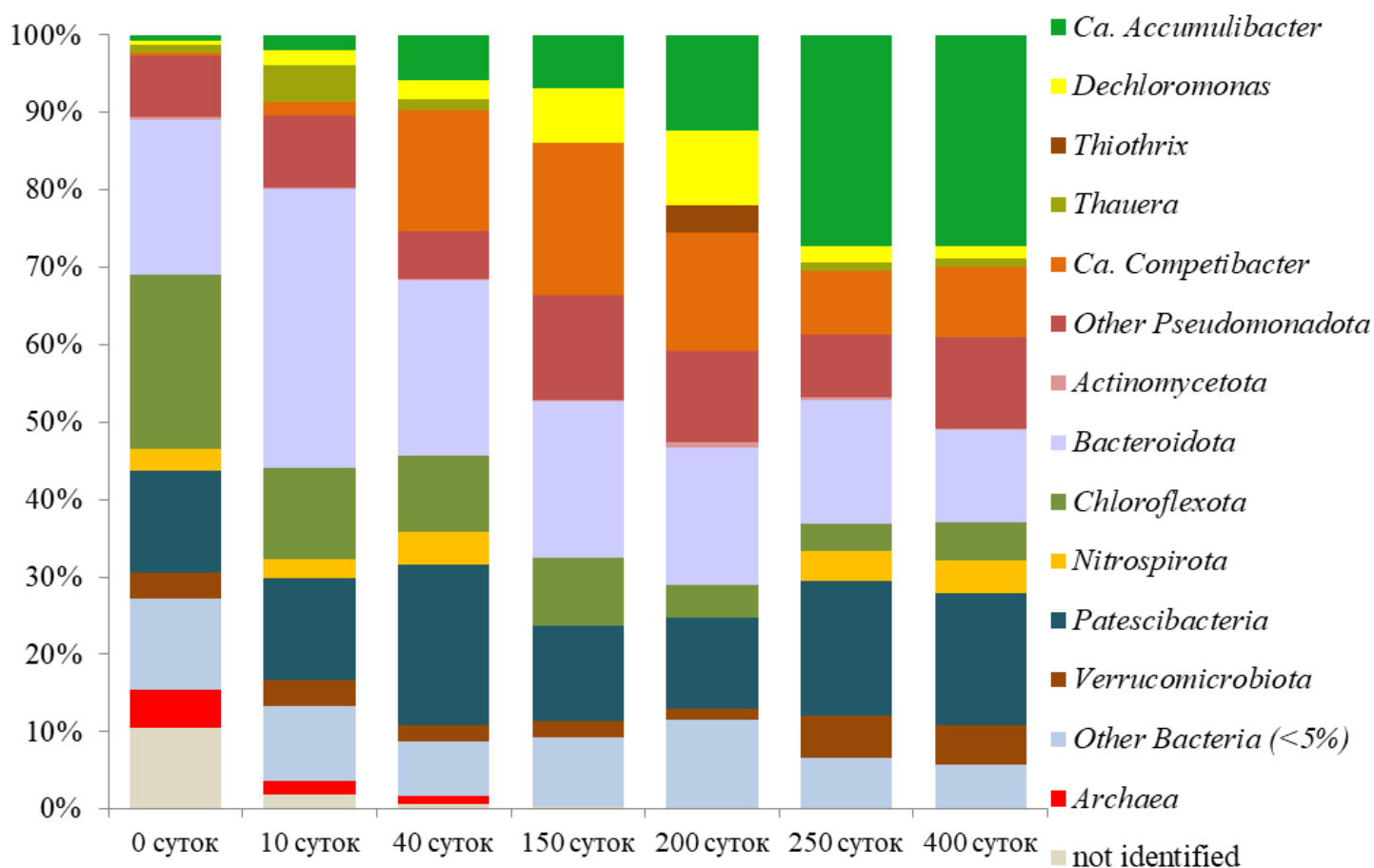


Рисунок 5. Изменение таксономического разнообразия микробного сообщества в процессе работы реактора в режиме SBR на основе анализа V3–V4 региона гена 16S рРНК.

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

Микроскопическими и молекулярными методами было установлено, что в течение эксперимента в реакторе происходило не только изменение видового разнообразия состава микробного сообщества, но и изменение пространственной организации (морфологии) клеток. Реактор был инокулирован однородным по своей структуре флокулированным активным илом. В ходе работы реактора и развития фосфат-аккумулирующего микробного сообщества на 150-250 сут в реакторе сформировались две морфологически разные структуры агрегатов, которые были обозначены как I морфотип и II морфотип (рис. ба, г).

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. ба).

Агрегаты II морфотипа были представлены структурами неправильной формы коричнево-серого цвета с неровными краями и размерами от 0,1 до 0,5 мм (рис. 6г). Соотношение агрегатов первого типа ко второму на 250 сутки составляло 3:1.

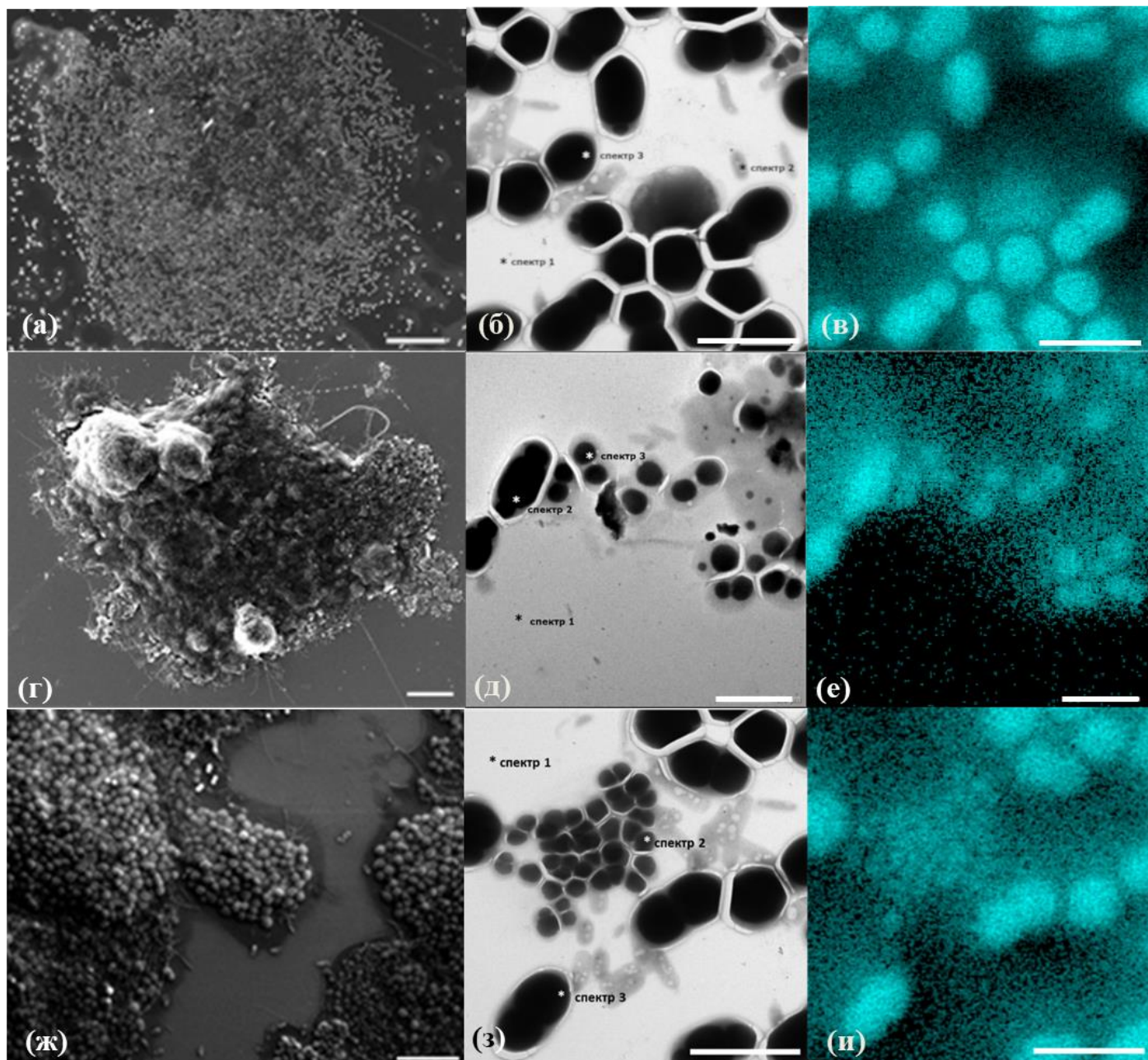


Рисунок 6. Исследование агрегатов:

I морфотип, 250 сут: а – поверхность агрегата в сканирующем режиме (линейка 50 мкм); б – электронная фотография тотальных препаратов клеток (линейка 2 мкм); в – рентгеновский анализ образца (б) в режиме картирования, голубым цветом показано распределение фосфора; II морфотип, 250 сут: г – поверхность агрегата в сканирующем режиме (линейка 50 мкм); д – электронная фотография тотальных препаратов клеток (линейка 2 мкм); е – рентгеновский анализ образца (д) в режиме картирования, голубым цветом показано распределение фосфора; агрегаты на 400 сут культивирования: ж – поверхность агрегата в сканирующем режиме (линейка 10 мкм); з – электронная фотография тотальных препаратов клеток (линейка 2 мкм); и – рентгеновский анализ образца (з) в режиме картирования, голубым цветом показано распределение фосфора.

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 ФАО в составе сформированных агрегатов было проведено исследование элементного состава клеток с использованием рентгеновского микроанализа. Сообщество агрегатов I морфотипа (рис. 6б) было достаточно однородным и состояло из овальных клеток размером $1,0 \times 1,7$ мкм. Картирование показало, что каждая овальная клетка содержала одно включение, занимающее почти весь ее объем (рис. 6в). Элементный анализ этих включений показал высокое содержание фосфора, а также наличие калия и магния.

Клетки в агрегатах II морфотипа находились в слизистом полимерном матриксе и содержали в своем составе большое разнообразие форм: кокки и палочки разных размеров, нитчатые бактерии. В агрегатах также присутствовали овальные клетки, морфологически сходные с клетками, доминирующими в агрегатах I морфотипа. Среди них также были клетки с включениями (рис. 6д). Картирование агрегатов (рис. 6е) показало, что клетки двух морфологических форм (крупные овальные и палочковидные) имели включения фосфора. Крупные овальные клетки были идентичны клеткам, доминирующим в агрегатах I морфотипа, и содержали одно большое включение. Палочковидные клетки были меньшего размера ($0,7 \times 1$ мкм) и имели в своем составе 2 небольших круглых включения. Таким образом, выявлено несколько морфологических форм клеток, накапливающих фосфор, что указывает на их принадлежность к ФАО.

К 400 сут культивирования произошла селекция микробного сообщества, в результате которой в последовательно-периодическом реакторе остался один тип агрегатов, морфологически близкий к I морфотипу (рис. 6ж). Микроскопические исследования подтвердили доминирование в этих агрегатах крупных овальных клеток размером $1,0 \times 1,7$ мкм, доминирующих в агрегатах I морфотипа (рис. 6з). Картирование микробного сообщества и анализ элементного состава клеток также показали наличие одного включения с высоким содержанием фосфора (рис. 6и).

Молекулярный анализ агрегатов I и II морфотипа показал, что их таксономическая структура на уровне филумов была сходной (рис. 7). В сообществах агрегатов примерно в равных долях присутствовали представители филума *Pseudomonadota* (66,08% в агрегатах I морфотипа и 64,83% – II морфотипа), *Bacteroidota* (17,16 и 13,53%), *Chloroflexota* (5,16 и 4,52%), *Muxococcota* (2,80 и 2,96%) и *Verrucomicrobiota* (0,82 и 0,71%). В агрегатах I морфотипа доля представителей клады *Patescibacteria* составляла 1,59%, в агрегатах II морфотипа – 5,75%.

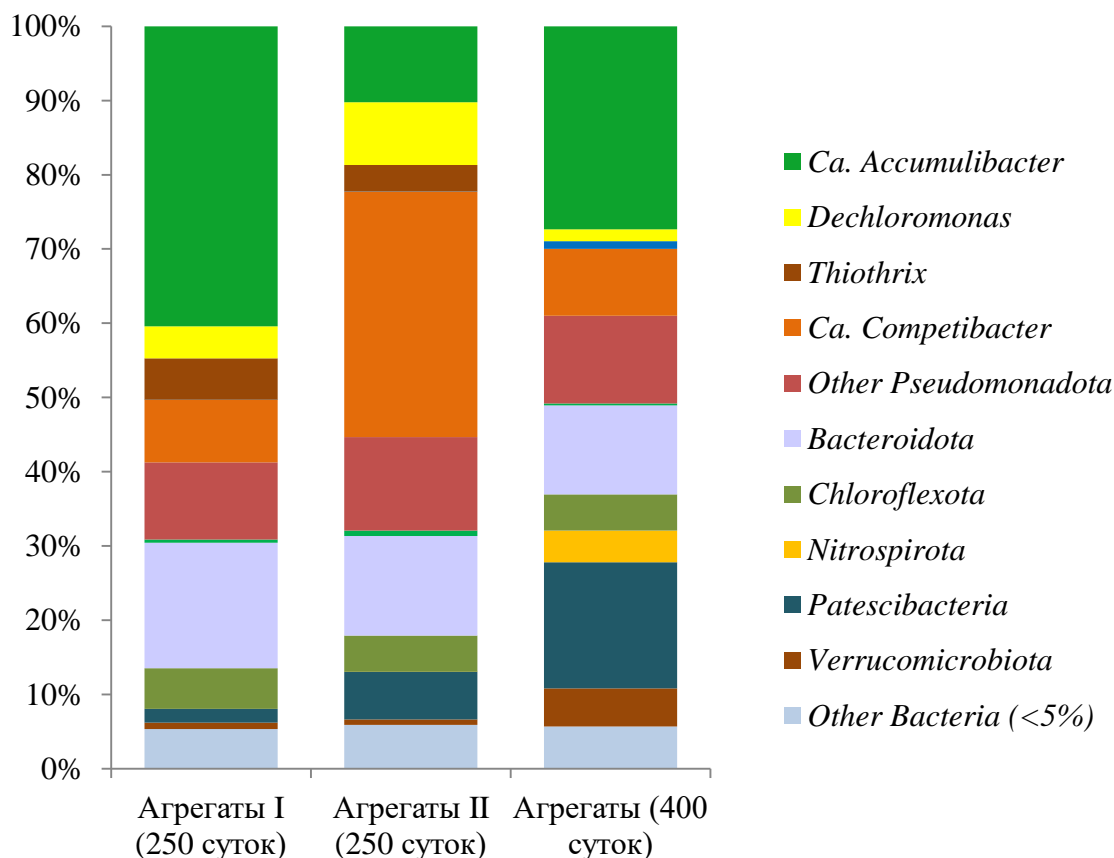


Рисунок 7. Таксономический состав агрегатов микробного сообщества на основе анализа V3–V4 региона гена 16S рРНК.

В агрегатах I морфотипа доминировали типичные представители ФАО – *Ca. Accumulibacter* (37,81%), а также присутствовали потенциальные ФАО рода *Thiothrix* (5,07%). Доля ГАО – *Ca. Competibacter* была значительно меньше, чем ФАО, и составляла 7,85%. В агрегатах II морфотипа, наоборот, доминировали ГАО – *Ca. Competibacter*, доля которых составляла 30,26%. ФАО были представлены *Ca. Accumulibacter* (9,07%) и потенциальным ФАО *Thiothrix* sp. (3,23%). Для агрегатов I морфотипа было характерно меньшее разнообразие микроорганизмов по сравнению с агрегатами II морфотипа.

Анализ агрегатов, сформированных к 400 сут работы реактора, выявил незначительные отличия от агрегатов I морфотипа, сформированных к 250 сут. Доля представителей филума *Pseudomonadota*, а также доли *Bacteroidota* и *Chloroflexota* были сопоставимы с тем, что ранее наблюдалось в агрегатах I и II морфотипов. Доля представителей филума *Mucococcota* снизилась до 0,59%, доли *Verrucomicrobiota*, *Nitrospirota* и *Patescibacteria* увеличились до 4,70, 4,11 и 16,30% соответственно. ФАО в данных агрегатах были представлены преимущественно *Ca. Accumulibacter* (26,15%); бактерии рода *Thiothrix* отсутствовали. Доля представителей *Ca. Competibacter* была также сопоставима с их содержанием в агрегатах I морфотипа (7,89%).

Для более детального понимания особенностей метаболизма организмов участвующих в процессах фосфат-аккумуляции в рассмотренных образцах была

проведена сборка геномов из метагеномных данных. Для агрегатов I морфотипа было собрано 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 драфт-геномов – соответственно. Из метагеномных данных были собраны 3 генома *Ca. Accumulibacter*. По последовательности гена *ppk1*, используемого для таксономии *Ca. Accumulibacter*, было установлено, что в агрегатах морфотипа I *Ca. Accumulibacter* был представлен типами IC и IIC, а в агрегатах морфотипа II – IIB, что свидетельствует 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 et al., 2022). Маркером дифференциации ФАО и ГАО служил ген низкоаффинного транспортера фосфата (*pit*) (McIlroy et al., 2014). В результате к фосфат-аккумулирующим бактериям в агрегатах I морфотипа были отнесены *Ca. Accumulibacter* IC и IIC, *Azonexus*, *Thauera* и *Zoogloea*, а в агрегатах II морфотипа – *Ca. Accumulibacter* IIB и *Siculibacillus*.

В геномах *Ca. Competibacter*, *Amaricoccus* и *Rhodospirillales* отсутствовал ген *pit*, что позволило отнести этих бактерий к потенциальным ГАО.

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

Источники углерода, используемые микробным сообществом последовательно-периодического биореактора

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

Эндогенное дыхание (СПК_{end}) перед проведением экспериментов составляло в среднем $1,65 \pm 0,48$ мг O₂/г СВ/ч. После внесения субстратов скорость потребления O₂ возрастала в течение 2-3 мин, достигала максимума и стабилизировалась. Максимальная СПК для ацетата составляла $32,2 \pm 2,8$ мг O₂/г СВ/ч ($50,3 \pm 4,4$ мг O₂/г БСВ/ч). Среди других использованных моносубстратов СПК убывала в ряду пируват – пропионат – бутират – сукцинат – аспартат – глутамат – аланин. Для остальных субстратов СПК составляла менее 10% от СПК в присутствии ацетата (рис. 8).

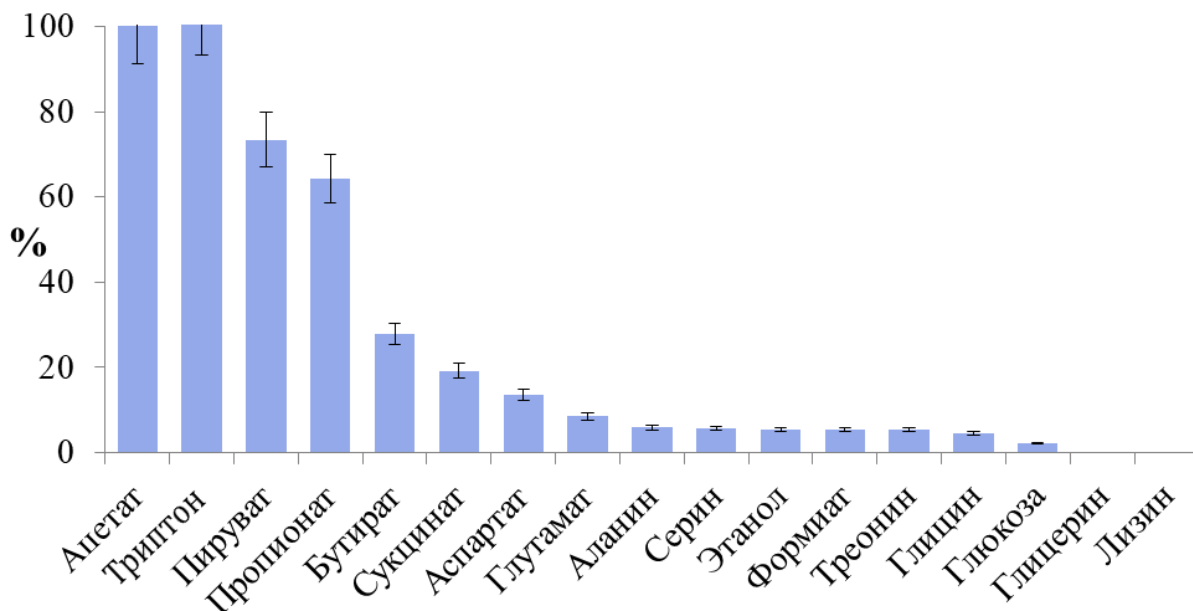


Рисунок 8. Скорость потребления кислорода (СПК) микробным сообществом SBR-реактора, обогащенным ФАО *Sa. Accumulibacter* после добавления различных субстратов. Величина СПК после добавления ацетата принята за 100%.

Несмотря на то, что в микробном сообществе биореактора доминировали *Sa. 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 эффекту на цикл выделения/поглощения фосфора использованные субстраты условно были разделены на 3 группы. К первой группе были отнесены ацетат, пропионат, пируват и сукцинат, внесение которых сопровождалось высвобождением фосфора в анаэробный период с последующим его потреблением в аэробный период на 60-90% (рис. 9а). Наибольший эффект был обнаружен у ацетата, пропионата и пирувата, наименьший – у сукцината. В анаэробный период ацетат и пропионат полностью потреблялись в течение первых 30 мин (рис. 9б), что сопровождалось высвобождением из биомассы фосфора до концентрации 145 и 95 мг P-PO₄/л, соответственно. В аэробный период фосфаты поглощались, и их концентрация падала до 19 и 14 мг P-PO₄/л, соответственно. По сравнению с ацетатом и пропионатом, скорость потребления пирувата, сукцината и бутирата была ниже, и циклические преобразования фосфора в анаэробный/аэробный периоды было менее выражено. Бутират вызывал быстрое выделение фосфор до концентрации 69 мг P-PO₄/л, однако скорость его поглощения в аэробной фазе была низкой. К концу аэробного периода концентрация фосфора при использовании пирувата, сукцината и бутирата снизилась до 5, 4 и 23 мг P-PO₄/л соответственно (рис. 9а).

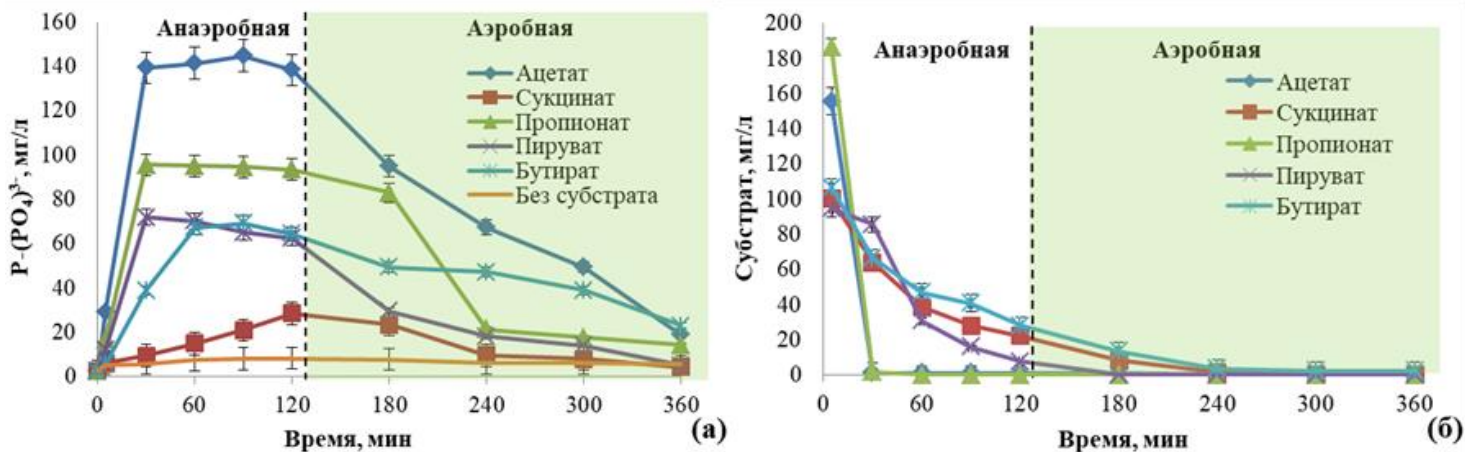


Рисунок 9. Динамика фосфора и субстрата: а – цикл выделения – поглощения фосфора культурой, обогащенной ФАО, после добавления органических кислот, б – динамика потребления субстрата в анаэробно-аэробном цикле культивирования.

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 10а). Наибольший эффект был получен для глутамата и аспартата.

Заметных циклических преобразований фосфора не обнаружили при добавлении субстратов третьей группы – глюкозы и этанола (рис. 10б). Добавление этанола приводило к монотонному возрастанию концентрации фосфора, как в анаэробной, так и в аэробной фазе. Глюкоза по сравнению с контролем не оказала заметного влияния на динамику фосфора.

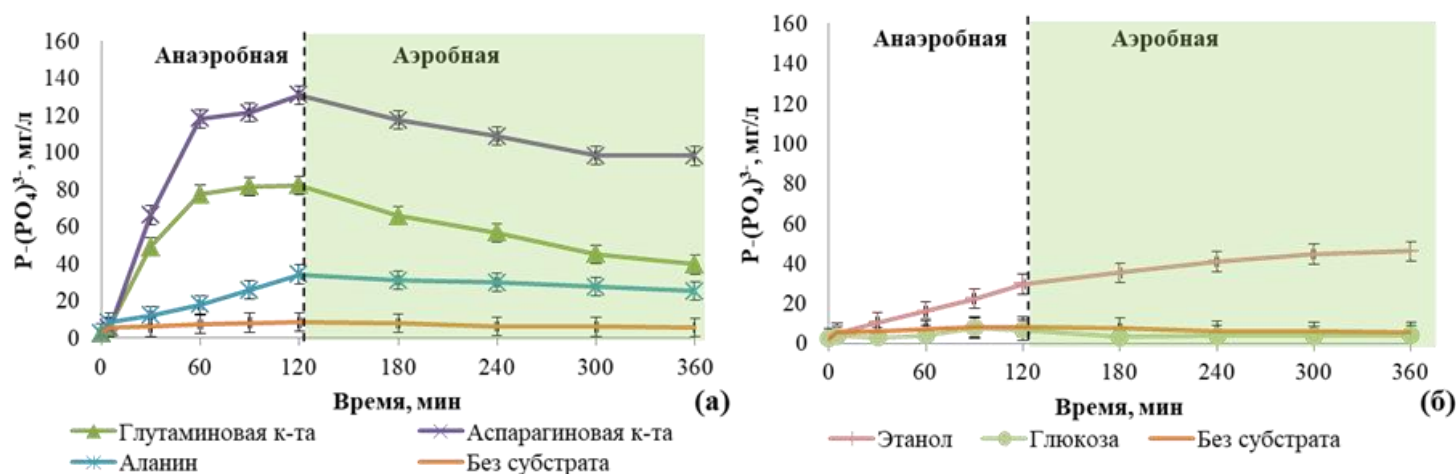


Рисунок 10. Цикл выделения – поглощения фосфора микробным сообществом последовательно-периодического биореактора после добавления: а – аминокислот, б – этанола и глюкозы.

По результатам эксперимента для субстратов первой и второй группы было рассчитано отношение количества высвободившегося фосфора на единицу поглощенного субстрата (отношение $P/\text{субстрат} - \Delta P_{\max}/\Delta s$) (таблица 2).

Таблица 2. СПК и показатели цикла выделения/поглощения фосфора в анаэробной и аэробной фазах цикла

Субстрат	СПК после добавления субстрата (за вычетом эндогенного дыхания) мг О ₂ /г БСВ/ч	Анаэробная фаза			Аэробная фаза
		P _{max} , мг/л	$\Delta P/\Delta s$ (P-моль/S-моль)	Средняя скорость выделения P в течение первых 30 мин, мг P/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
D,L-Аспаргат	4,4	131,1	2,0**	127,3	32,9
L-Глутамат	2,7	82,3	2,1**	93,1	42,8
D,L-Аланин	1,9	34,2	0,3**	19,2	9
D-Глюкоза	1,1	7,7	–	–	3,7

* Добавлено 100 мг ХПК/л.

** Рассчитано из предположения полного потребления субстратов в анаэробный период.

При использовании ЛЖК максимальное значение $\Delta P_{\max}/\Delta s$ было получено для бутирата – 2,1 P-моль/S-моль. Для аспартата и глутамата этот показатель составил соответственно 2,0, 2,1 P-моль/S-моль. Для аланина $\Delta P_{\max}/\Delta s$ оказалось значительно ниже – 0,3 P-моль/S-моль.

Как показал анализ таксономического состава, основным ФАО, участвующим в цикле потребления/высвобождения фосфатов исследуемого микробного консорциума, являлся *Sa. Accumulibacter*. Метагеномный анализ *Sa. Accumulibacter* выявил гены основных путей метаболизма, характерных для ФАО (рис. 12).

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 МАГ *Ca. Accumulibacter*, но и в геномах, принадлежащих *Ca. Competibacter*, *Siculibacillus*, *Azonexus* и *Мухососсаса*. Однако гены пути превращений ацетил-КоА до ПГА обнаружены только в *Ca. Accumulibacter*.

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

Относительно высокую эффективность циклических превращений фосфора при использовании в качестве субстрата пирувата можно связать с наличием в МАГ *Ca. Accumulibacter* симпортера пирувата/ H^+ (*btsT*), а также переносчика лактата (*jenI*), способного к переносу пирувата и пропионата с меньшей эффективностью, чем лактата (Skory et al, 2010).

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

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

Эффект аланина на циклические превращения 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 единицу поглощенного аланина (0,3 Р-моль/S-моль), можно полагать, что потребление аланина в анаэробный период было незначительным, и этот субстрат не является легкодоступным для *Ca. Accumulibacter*.

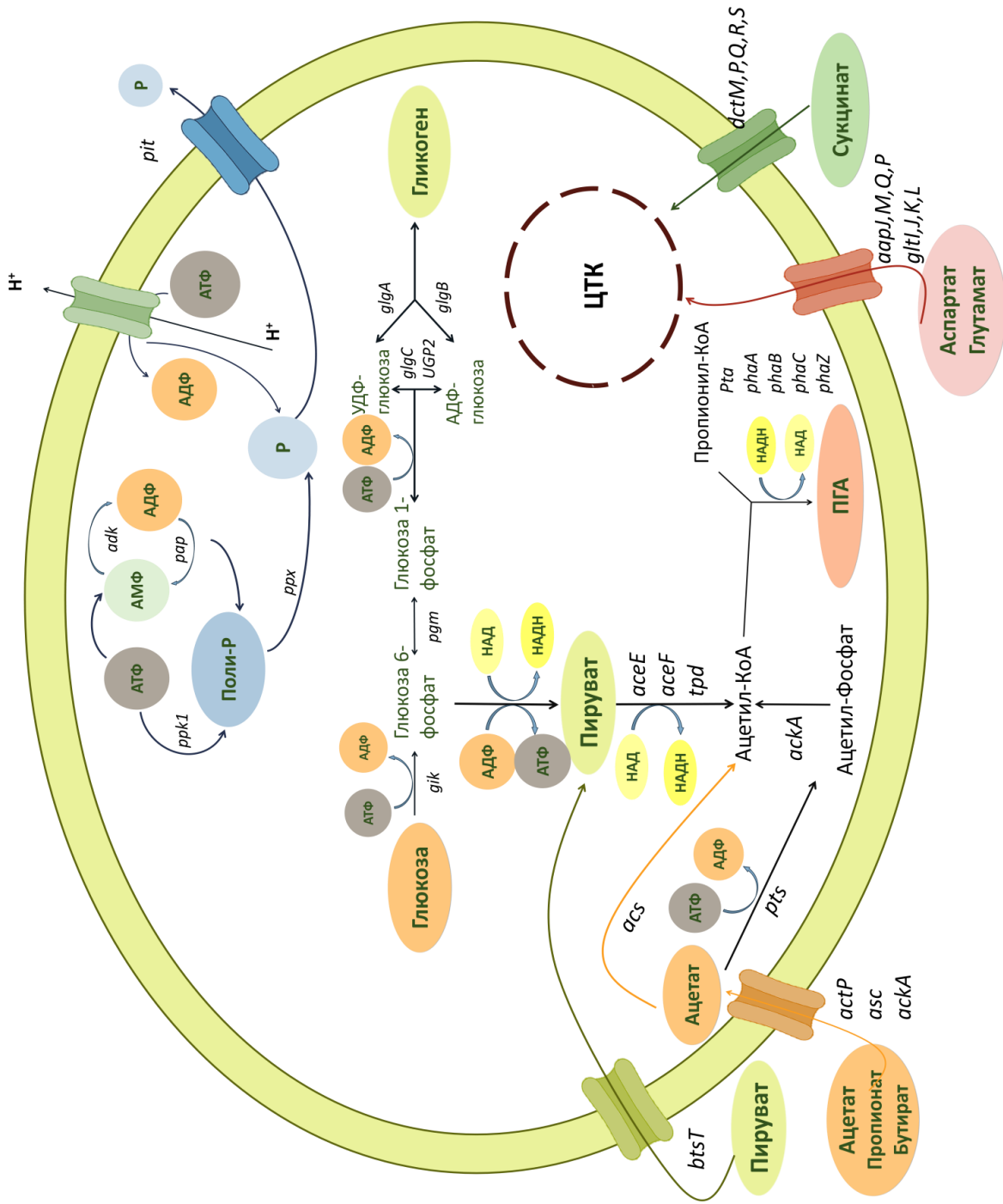


Рисунок 11. Метаболическая модель *Sa*. Ассимилибастер с различными источниками углерода, построенная на основании характеристик кинетики и стехиометрии высвобождения/поглощения фосфора и метагеномного анализа микробного сообщества лабораторного биореактора.

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 фосфора 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 *Sa. 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-доливным 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 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. S33–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-аккумулирующее 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-аккумулирующие 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., Грачев 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.