

## НОВЫЕ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ, ОБНАРУЖЕННЫЕ В УСТАНОВКЕ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ОТ ФОСФАТОВ

© 2019 г. Р. Ю. Котляров<sup>а</sup>, А. В. Белецкий<sup>а</sup>, А. Ю. Каллистова<sup>б</sup>, А. Г. Дорофеев<sup>б</sup>,  
Ю. А. Николаев<sup>б</sup>, Н. В. Пименов<sup>б</sup>, Н. В. Равин<sup>а</sup>, А. В. Марданов<sup>а</sup>, \*

<sup>а</sup>Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

\*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 18.04.2019 г.

После доработки 13.05.2019 г.

Принята к публикации 20.05.2019 г.

В настоящее время для очистки сточных вод от фосфатов применяются биотехнологии, основанные на использовании фосфат-аккумулирующих организмов, “собирающих” неорганические фосфаты из среды в виде полифосфатов при циклическом росте в анаэробных и аэробных условиях. В большинстве систем очистки сточных вод функцию фосфат-аккумуляции выполняют бета-протеобактерии кандидатного рода ‘*Candidatus Accumulibacter*’. Однако, до настоящего момента ни один из представителей ‘*Ca. Accumulibacter*’ не выделен в чистую культуру. Мы провели метагеномный анализ микробного консорциума, сформировавшегося в лабораторной установке по очистки сточных вод от фосфатов и обеспечивающего удаление до 80% фосфора из среды. В сообществе преобладали представители филумов *Proteobacteria* (82.5%), *Bacteroidetes* (10.5%) и *Chloroflexi* (1.6%). Среди протеобактерий были обнаружены *Betaproteobacteria*, среди которых преобладали представители рода ‘*Ca. Accumulibacter*’, и *Gammaproteobacteria* (26.8%), большинство из них относилось к семейству ‘*Ca. Comptribacteraceae*’. На основе метагеномных данных получен геном доминирующей в сообществе фосфат-аккумулирующей бактерии, который представляет новый вид рода ‘*Ca. Accumulibacter*’. Исследуемое микробное сообщество является перспективным объектом как для дальнейших фундаментальных исследований метаболизма фосфат-аккумулирующих организмов, так и для совершенствования биотехнологий очистки сточных вод от фосфора.

**Ключевые слова:** фосфат-аккумулирующие организмы, биореактор, удаление фосфора, микробное сообщество

DOI: 10.1134/S0026365619060053

Фосфор является одним из биогенных элементов и входит в состав биомассы всех живых организмов, выполняя важную роль в конструктивном и энергетическом метаболизме (Butusov, Jernelov, 2013). Соединения фосфора, в основном фосфаты, широко используются в различных областях промышленности и аграрном секторе, вследствие чего они оказываются компонентом сточных вод коммунального хозяйства и агропромышленного комплекса. Поступление избыточных количеств фосфора в реки и озера нарушает сбалансированность этих экосистем и приводит к их эвтрофикации. Таким образом, очистка сточных вод от фосфатов является важной практической задачей.

В последнее время активно разрабатываются биотехнологии удаления фосфатов из сточных вод. Эти технологии основаны на способности организмов к внутриклеточному накоплению полифосфатов, которая встречается среди про- и эукариот (Kulaev et al., 2004; Rehm, 2010). В резуль-

тате исследований активных илов биореакторов в системе очистки сточных вод, были обнаружены фосфат-аккумулирующие микроорганизмы (ФАО), “извлекающие” неорганические фосфаты из среды и включающие их в свою биомассу в виде полифосфатов при циклическом росте в анаэробных и аэробных условиях. В анаэробной фазе роста ФАО используют в качестве источника углерода ацетат, запасают полигидроксипутират, а АТФ получают в результате расщепления полифосфатов. В аэробных условиях бактерии используют ранее накопленный полигидроксипутират, при этом с высокой эффективностью поглощая фосфаты из среды и запасая их в форме полифосфатов. Такой тип адаптации к циклической смене аэробных и анаэробных условий дает ФАО конкурентные преимущества перед обычными гетеротрофами и обеспечивает эффективное удаление фосфора из сточных вод (Wentzel et al., 1988, 2008).

Проведенные ранее исследования микробных сообществ активного ила промышленных установок по очистке сточных вод, а также обогащенных ФАО лабораторных культур указывают на то, что в большинстве случаев основную роль в удалении фосфора играют бета-протеобактерии, относящиеся к роду "*Candidatus Accumulibacter*" (Zilles et al., 2002; Kong et al., 2004; Lu et al., 2006; He et al., 2008). Исследования "*Ca. Accumulibacter*" показали, что входящие в эту группу микроорганизмы значительно различаются генетически и физиологически (Peterson et al., 2008; Flowers et al., 2009). Однако до настоящего момента ни один из известных представителей "*Ca. Accumulibacter*" не выделен в чистую культуру.

В 2017 году в ФИЦ Биотехнологии РАН была запущена пилотная установка по очистке сточных вод от фосфатов. Для культивирования ФАО использовали реактор последовательно-периодического действия (реактор типа SBR, sequencing-batch reactor) с рабочим объемом 15 л. Состав среды (мг/л):  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O} - 670$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} - 50$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 54.3$ ;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 56.7$ ; дрожжевой экстракт — 8.6 мг/л (концентрации компонентов среды подбирали экспериментально). Цикл продолжительностью 6 ч включал стадии заполнения биореактора свежей средой (30 мин), анаэробного роста (110 мин), роста в условиях аэрации (180 мин), оседания активного ила (30 мин) и слива отработанной среды (10 мин). Активный ил в этих условиях стабильно удалял 75–80% фосфора из среды.

Целью настоящего сообщения является представление результатов метагеномного анализа сформировавшегося в биореакторе микробного консорциума, ответственного за удаление фосфатов из среды.

Выделение суммарной ДНК из образцов активного ила проводили с помощью набора DNeasy power soil ("*Qiagen*") по протоколам фирмы-производителя. Библиотеку случайных фрагментов метагеномной ДНК готовили с помощью NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit ("*NEB*"). Полученную библиотеку секвенировали на Illumina HiSeq 2500 ("*Illumina*"). В результате было получено около 50 млн чтений длиной 250 нт. Сборку последовательностей в контиги осуществляли с помощью программы metaSPAdes 3.7.1. Для проведения таксономического анализа состава микробного сообщества в собранных контигах использовали программу CheckM (Parks et al., 2015) искали последовательности варибельного региона V3 генов 16S рРНК. Отобранные последовательности таксономически идентифицировали с использованием SINA online сервиса и базы данных SILVA (Quast et al., 2013). Долю каждого генотипа в метагеноме определяли на основе кратности покрытия соответствующего контига с геном 16S рРНК. Также собранные контиги разбивали на кластеры (бины), представляющие ге-

номы отдельных штаммов/видов микроорганизмов, с помощью программы CONCOCT (Alneberg et al., 2014). Значения ДНК–ДНК гибридизации *in silico* вычисляли с помощью сервиса GGDC 2.1 (Meier-Kolthoff et al., 2013), используя рекомендованную формулу 2.

В исследуемом микробном сообществе доминировали представители филума *Proteobacteria*, на долю которых приходилось более 82.5% полученных фрагментов гена 16S рРНК. Большинство протеобактерий относились к классу *Betaproteobacteria* (52%), в основном к семейству *Rhodocyclaceae* (49%). Как и ожидалось, среди них преобладали микроорганизмы рода "*Candidatus Accumulibacter*", а еще около 18% последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий семейства *Rhodocyclaceae* не удалось классифицировать до уровня рода.

Вторым по численности классом протеобактерий являлись *Gamma*протеобактерии (26.8%), большинство из которых относилось к семейству "*Candidatus Competibacteraceae*" (20.6%). Эти гликоген-аккумулярующие бактерии часто встречаются вместе с ФАО в установках по очистке сточных вод, функционирующих в условиях циклической смены анаэробных и аэробных условий (McIlroy et al., 2014).

Среди минорных групп обнаружены представители филумов *Bacteroidetes* (10.5%) и *Chloroflexi* (1.6%). Суммарная доля всех остальных филумов бактерий составляла около 5%, среди них были обнаружены представители *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, *Elusimicrobia*, *Nitrospirae*, *Spirochaetes*, *Patescibacteria* и *Verrucomicrobia*. Все эти группы встречаются в биореакторах по очистке сточных вод от фосфатов (Kamika et al., 2018).

В результате кластеризации полученных в результате секвенирования метагенома контигов был получен геном доминирующей в сообществе бактерии, обозначенный Bin19. Этот геном был представлен 246 контигами, суммарная длина которых составляла 4.88 млн нт. Относительная доля этого генотипа в микробном сообществе, определяемая по доле генома Bin19 во всем метагеноме, составляла 21%. Оценка качества сборки этого генома по наличию набора консервативных однокопийных маркерных генов с помощью программы CheckM (Parks et al., 2015) показала, что полнота генома составляет 98%. Филогенетический анализ с использованием полноразмерных последовательностей генов 16S рРНК показал, что бактерия Bin19 относится к роду "*Candidatus Accumulibacter*" семейства *Rhodocyclaceae* класса *Betaproteobacteria*. Ближайшим родственником Bin19 микроорганизмом является некультивируемая бактерия LV1\_A12 (99.5% идентичности последовательностей генов 16S рРНК, GenBank EF565160), ранее найденная в активном иле биореактора по

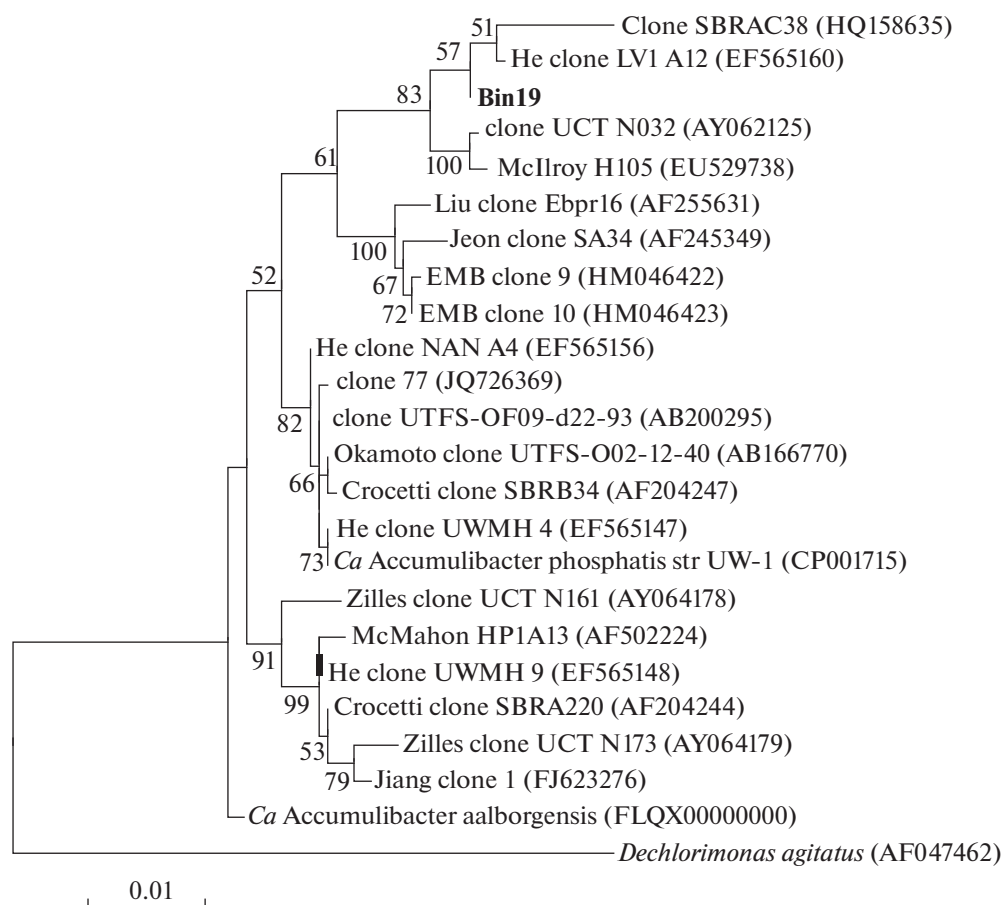


Рис. 1. Положение “*Ca. Accumulibacter*” Bin19 на филогенетическом дереве, построенном методом Maximum-Likelihood по последовательностям генов 16S рРНК.

удалению фосфатов (He et al., 2007), однако до настоящего момента ее геном не секвенирован (рис. 1).

Поиск родственных Bin19 микроорганизмов на основе сходства геномов показал, что ближайшими к нему являются геномы “*Ca. Accumulibacter*” sp. SK-02 и “*Ca. Accumulibacter*” isolate HKU-2 (Mao et al., 2015), значения ДНК–ДНК гибридизации *in silico* с которыми оцениваются, соответственно, в 92.9 и 94.3% (табл. 1). Эти геномы были получены в результате метагеномного анализа образцов активного ила биореакторов по очистке сточных вод в Австралии и Гонконге. Отсутствие в этих двух драфт геномах контигов с генами 16S рРНК не позволяет оценить их филогенетическую близость к Bin19 по этому маркеру. Уровни ДНК–ДНК гибридизации с другими доступными в GenBank геномами представителей рода “*Ca. Accumulibacter*” не превышают 60%.

Поскольку считается, что штаммы с уровнем ДНК–ДНК гибридизации выше 70% относятся к одному виду (Auch et al., 2010; Tindall et al., 2010), можно сделать вывод о том, что Bin19, SK-02 и HKU-2 представляют новый вид рода “*Ca. Accumulibacter*”, отличный от ранее описанного кан-

дидатного вида “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (Oyserman et al., 2016). Исследуемое микробное сообщество является перспективным объектом как для дальнейших фундаментальных исследований метаболизма ФАО, так и для совершенствования биотехнологий очистки сточных вод от фосфора.

Нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК бактерии “*Ca. Accumulibacter*” Bin19 и последовательность ее генома депонированы в NCBI GenBank под номерами MK803089 и SWAD000000000.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 18-34-00627) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

**Таблица 1.** Уровни ДНК–ДНК гибридизации *in silico* (DDH) между геномом Bin19 и другими доступными геномами бактерий рода “*Ca. Accumulibacter*”

Геном	DDH, %	GenBank ID	Вероятность, DDH > 70%
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. SK-02	92.9	GCA_000584975	96.69
<i>Ca. Accumulibacter</i> isolate HKU-2	94.3	GCA_000987395	97.03
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA5574	52.7	GCA_002425405	27.16
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. BA-91	37.3	GCA_000585035	1.31
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> str. UW-1	24.4	GCA_000024165	0.01
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA11064	24	GCA_003538495	0.01
<i>Ca. Accumulibacter aalborgensis</i> clone 3	23.2	GCA_900089955	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA11070	22.7	GCA_003535635	0
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. SK-11	22.7	GCA_000584995	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA8770	22.5	GCA_003487685	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA9001	22.1	GCA_003542235	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA2327	22.1	GCA_002345025	0
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. BA-94	21.7	GCA_000585095	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> isolate HKU-1	21.5	GCA_000987445	0
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. BA-92	21.4	GCA_000585055	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UW-LDO-IC	21.3	GCA_003332265	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA2315	21.2	GCA_002345285	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA2783	21	GCA_002352265	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA6585	21	GCA_002433845	0
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. BA-93	20.9	GCA_000585075	0
<i>Ca. Accumulibacter phosphatis</i> clone UBA6658	20.8	GCA_002455435	0
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. SK-12	20.8	GCA_000585015	0
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. 66-26	19.6	GCA_001897745	0
<i>Ca. Accumulibacter</i> sp. UBA704	18.5	GCA_002304785	0

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

**Вклад авторов:** Р.Ю. Котляров, А.В. Белецкий, Н.В. Равин, А.В. Марданов – получение и анализ метагеномных данных, А.Ю. Каллистова, А.Г. Дорофеев, Ю.А. Николаев, Н.В. Пименов – сборка и запуск установки по очистке сточных вод от фосфора, подбор оптимальных условий культивирования микроорганизмов, обеспечивающих наилучшее удаление фосфора.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

Alneberg J., Bjarnason B.S., de Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., Lahti L., Loman N.J., Andersson A.F., Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. P. 1144–1146.  
 Auch A.F., von Jan M., Klenk H.P., Göker M. Digital DNA–DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // *Stand. Genomic Sci*. 2010. V. 2. P. 117–134.

Butusov M., Jernelov A. Phosphorus: An element that could have been called Lucifer. New York: Springer, 2013. 101 p. P. 13–17.

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 // *Environ. Microbiol. Rep*. 2009. V. 1. P. 583–588.

He S., Gall D.L., McMahon K.D. “*Candidatus Accumulibacter*” population structure in enhanced biological phosphorus removal sludges as revealed by polyphosphate kinase genes // *Appl. Environ. Microbiol*. 2007. V. 73. P. 5865–5874.

He S., Gu A.Z., McMahon K.D. Progress toward understanding the distribution of *Accumulibacter* among full-scale enhanced biological phosphorus removal systems // *Microb. Ecol*. 2008. V. 55. P. 229–236.

Kamika I., Azizi S., Tekere M. Comparing bacterial diversity in two full-scale enhanced biological phosphate removal reactors using 16S amplicon pyrosequencing // *Pol. J. Environ. Stud*. 2018. V. 27. № 2. P. 1–37.

- Kong Y.H., Nielsen J.L., Nielsen P.H. Microautoradiographic study of *Rhodocyclus*-related polyphosphate accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 5383–5390.
- Kulaev I.S., Vagabov V.M., Kulakovskaya T.V. The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. 2nd edn. John Wiley & Sons, Ltd., 2004. P. 273.
- Lu H., Oehmen A., Viridis B., Keller J., Yuan Z. Obtaining highly enriched cultures of *Candidatus Accumulibacter phosphatis* through alternating carbon sources // Water Res. 2006. V. 40. P. 3838–3848.
- 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 // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 11857. <https://doi.org/10.1038/srep11857>
- 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 // ISME J. 2014 V. 8. P. 613–624.
- Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // BMC Bioinform. 2013. V. 14. P. 60.
- 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* // ISME J. 2016. V. 10. P. 810–822.
- Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // Genome Res. 2015. V. 25. P. 1043–1055.
- Peterson S.B., Warnecke F., Madejska J., McMahon K.D., Hugenholtz P. Environmental distribution and population biology of *Candidatus Accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal // Environ. Microbiol. 2008. V. 10. P. 2692–2703.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. D1. P. D590–D596.
- Rehm B.H.A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications // Nature Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 578–592.
- Tindall B.J., Rossello-Mora R., Busse H.J., Ludwig W., Kämpfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 249–266.
- Wentzel M.C., Comeau Y., Ekama G.A., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Enhanced biological nutrient removal // Biological Wastewater Treatment Principles, Modelling and Design / Eds. Henze M., van Loosdrecht M.C.M., Ekama G.A., Brdjanovic D. London: IWA Pub., 2008. P. 155–220.
- Wentzel M.C., Loewenthal R.E., Ekama G.A., Marais G.V.R. Enhanced polyphosphate organism cultures in activated sludge systems – Part 1: Enhanced culture development. Water S.A. 1988. V. 14. № 2. P. 81–92.
- Zilles J.L., Peccia J., Kim M., Hung C., Noguera D.R. Involvement of *Rhodocyclus*-related organisms in phosphorus removal in full-scale wastewater treatment plants // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. P. 2763–2769.

## A Novel Phosphate-Accumulating Bacterium Identified in a Bioreactor for Phosphate Removal from Wastewater

R. Yu. Kotlyarov<sup>1</sup>, A. V. Beletsky<sup>1</sup>, A. Yu. Kallistova<sup>2</sup>, A. G. Dorofeev<sup>2</sup>, Yu. A. Nikolaev<sup>2</sup>, N. V. Pimenov<sup>2</sup>, N. V. Ravin<sup>1</sup>, and A. V. Mardanov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>2</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: mardanov@biengi.ac.ru

Received April 18, 2019; revised May 13, 2019; accepted May 20, 2019

**Abstract**—Biotechnologies involving phosphate-accumulating microorganisms, which collect inorganic phosphates from the medium as polyphosphates during cyclic growth under aerobic and anaerobic conditions, are presently applied for phosphorus removal from wastewater. Betaproteobacteria of the candidate genus ‘*Candidatus Accumulibacter*’ carry out phosphate accumulation in most systems for wastewater treatment. However, no member of ‘*Candidatus Accumulibacter*’ has been isolated in pure culture. Metagenomic analysis of the microbial consortium formed in a laboratory setup for phosphate removal from wastewater and removing up to 80% phosphorus from the medium was carried out. Members of the phyla *Proteobacteria* (82.5%), *Bacteroidetes* (10.5%), and *Chloroflexi* (1.6%) predominated in the community. Among the proteobacteria, *Betaproteobacteria* were revealed, among which ‘*Candidatus Accumulibacter*’ predominated, as well as *Gammaproteobacteria* (26.8%), which mainly belonged to the family ‘*Candidatus Competibacteraceae*’. Metagenomic data were used to obtain the genome of the dominant phosphate-accumulating bacterium, which belonged to a new ‘*Candidatus Accumulibacter*’ species. The studied community was promising both for further basic research on metabolism of phosphate-accumulating microorganisms and for improvement of existing biotechnologies for phosphorus removal from wastewater.

**Keywords:** phosphate-accumulating organisms, bioreactor, phosphorus removal, microbial community