

МИКРОБНЫЙ КОНСОРЦИУМ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИЙ УДАЛЕНИЕ ФОСФАТОВ В ЦИКЛИЧЕСКОМ АЭРОБНО-АНАЭРОБНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

© 2021 г. А. В. Пелевина^{а, *}, Ю. Ю. Берестовская^а, В. А. Грачёв^а, И. К. Дорофеева^а,
В. В. Сорокин^а, А. Г. Дорофеев^{а, b}, А. Ю. Каллистова^а, Ю. А. Николаев^а, Р. Ю. Котляров^с,
А. В. Белецкий^с, Н. В. Равин^с, Н. В. Пименов^а, А. В. Марданов^с

^аИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

^бАО “Мосводоканал”, Москва, 105005 Россия

^сИнститут биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия

*e-mail: annie.pelevina@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.08.2020 г.

После доработки 24.09.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

Исследованы особенности формирования сообщества фосфат-аккумулирующих микроорганизмов в лабораторном биореакторе последовательно-периодического действия (sequencing batch reactor, SBR), обеспечивающим чередование аэробных и анаэробных условий при периодическом сливе и добавлении среды. Биореактор обеспечивал удаление 50% фосфора из поступающей среды уже через 22 сут с момента запуска. Методами микроскопии и рентгеновского микроанализа показано наличие клеток разной морфологии, которые содержали обогащенные фосфором гранулы. Методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК выявлены изменения в составе микробного сообщества активного ила в процессе его культивирования в биореакторе. Показана смена форм бактерий в сообществе, связанная с увеличением относительного вклада представителей порядка *Bacteroidetes* (до 43% от всех последовательностей гена 16S рРНК), а также представителей классов *Alpha*- и *Betaproteobacteria* (до 15 и 27% соответственно). В момент запуска биореактора в посевном материале (активный ил очистных сооружений) доля типичных представителей активного ила фосфат-аккумулирующих микроорганизмов – бактерий рода “*Candidatus Accumulibacter*” класса *Betaproteobacteria* была низкой – 0.2% от общего количества последовательностей гена 16S рРНК, и они полностью элиминировались из сообщества в ходе работы биореактора. К моменту максимального удаления фосфора из поступающей среды произошло увеличение доли других представителей этого класса – бактерий родов *Dechloromonas* и *Zoogloea* семейства *Rhodocyclaceae* с (0.7 до 11.1%) и с (0.09 до 11.5%) соответственно. По-видимому, эффективное удаление фосфатов связано с развитием бактерий семейства *Rhodocyclaceae*, которые ранее не относили к типичным представителям ФАО.

Ключевые слова: фосфат-аккумулирующие организмы, активный ил, бактерии с циклическим типом метаболизма, волютиновые гранулы, семейство *Rhodocyclaceae*, род *Dechloromonas*, *Zoogloea*, “*Candidatus Accumulibacter*”

DOI: 10.31857/S0026365621010092

Микроорганизмы группы фосфат-аккумулирующих организмов (ФАО), способные к внутриклеточному накоплению полифосфатов, осуществляют биологическую очистку сточных вод от фосфора. Они развиваются в активном иле очистных сооружений при обязательной цикличности условий роста: периодической смене отсутствия и наличия акцепторов электронов (в первую очередь кислорода) и, соответственно, присутствия и отсутствия легкодоступных органических веществ (Van Loosdrecht et al., 1997; Mino et al., 1998; Seviour et al., 2003; Wentzel et al., 2008). Периодиче-

ская смена условий роста определяет направленность основных метаболических путей ФАО. В анаэробных условиях (без акцепторов электронов) ФАО поглощают органические соединения (главным образом, летучие жирные кислоты (ЛЖК)) и запасают их в форме внутриклеточных полимеров с одновременной деградацией внутриклеточных полифосфатов и выбросом ортофосфата из клеток. В аэробных условиях (или) при наличии альтернативного акцептора электронов (нитратов или нитритов) ФАО способны расти, поглощать ортофосфаты и синтезировать

внутриклеточные полифосфаты, используя для этих процессов энергию от разложения внутриклеточных источников углерода и энергии, накопленных в анаэробных условиях. Таким образом, представители ФАО относятся к микроорганизмам, обладающим циклическим типом метаболизма (Дорофеев и соавт., 2019).

Группа ФАО не является монофилетичной, т.е. способность к аккумуляции фосфатов выявлена у представителей различных филогенетических групп микроорганизмов, как бактерий, так и архей. В настоящее время к истинным ФАО относят представителей кандидатного рода “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (сем. *Rhodocyclaceae*, *Betaproteobacteria*) (Hesselmann et al., 1999; Nguyen et al., 2012; Stockholm-Bjerregaard et al., 2017; Zeng et al., 2018; Qiu et al., 2019), которые в качестве субстрата используют летучие жирные кислоты (ацетат, пропионат). В зависимости от используемых акцепторов электронов внутри этого фенотипа выделяют две основные филогенетические группы “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (тип I и тип II), каждая из которых в свою очередь подразделяется на клады (тип I – на клады от IA до IE и тип II на клады от IIA до II I) (Rubio-Rincon et al., 2017). ФАО I используют в качестве акцепторов электронов нитрат и нитрит, а ФАО II – только кислород (Figdore et al., 2018; Dasgupta et al., 2019). К потенциальным представителям ФАО относят широко распространенные в очистных сооружениях аэробные актинобактерии *Tetrasphaera* (Maszenan et al., 2000; Nielsen et al., 2019), а также ряд других прокариот, роль которых в биологическом удалении фосфора надежно не установлена – *Thiothrix caldifontis* (Rubio-Rincón et al., 2017), *Microthrix phosphovorans* (Nakamura et al., 1995), “*Ca. Accumulimonas*” (Nguyen et al., 2012), новая группа органофильных бактерий семейства *Comamonadaceae* (Ge et al., 2015), *Dechloromonas* (Ren et al., 2020), *Methanosarcina mazei* (Paula et al., 2019).

Несмотря на полувековой опыт использования ФАО в процессах очистки сточных вод и огромное количество исследований, посвященных этой группе бактерий, физиология фосфат-аккумулялирующих бактерий до сих пор детально не изучена. Основная причина заключается в том, что в связи со сложностью организации и большим разнообразием микробных сообществ активных илов, в которых бактерии тесно связаны слизистым матриксом, выделить представителей ФАО с циклическим типом метаболизма в чистую культуру до сих пор никому не удалось (Дорофеев и соавт., 2019). Источниками информации о ФАО являются метагеномный анализ микробных консорциумов, осуществляющих биологическое удаление фосфатов в крупномасштабных очистных сооружениях, и лабораторных культур фосфат-аккумулялирующих организмов. На основании исследования метагенома ила, обогащенного “*Ca.*

Accumulibacter phosphatis”, было установлено, что представители ФАО II имеют полный набор генов фиксации азота и CO₂ (Flowers et al., 2013). Исследования экспрессии генов цикла трикарбонных кислот выявили значительные расхождения в анаэробном и аэробном метаболизме различных популяций “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” (Wexler et al., 2009). Было показано, что представители ФАО имеют как общие пути центрального метаболизма углерода и фосфора, так и специфические, связанные со спектром используемых органических субстратов и акцепторов электронов (Skenner et al., 2015). На основании протеомного анализа было установлено, что анаэробная дегградация гликогена у всех изученных “*Ca. Accumulibacter phosphatis*” осуществляется по пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (Wilmes et al., 2008).

Выращивание обогащенных ФАО культур проводят, как правило, в реакторах типа SBR (Sequencing Batch Reactor) (Artan et al., 2005; Liu et al., 2020; Fan et al., 2020), воспроизводящих технологические условия крупномасштабных очистных сооружений. Эта технология имеет ряд недостатков. В частности, для получения в SBR культур с высокой плотностью (несколько граммов в литре) прибегают к удержанию в биореакторе части биомассы, в результате чего развитие культур происходит в виде флокул, которые имеют такую же сложную многокомпонентную структуру, как активный ил очистных сооружений. Получить микробное сообщество с минимальным количеством компонентов, в котором доминируют ФАО, в таких реакторах практически невозможно. Существенный прогресс в исследовании ФАО авторы видят в развитии и совершенствовании альтернативных способов циклического культивирования, поддерживающих оптимальные условия для роста ФАО в гомогенной культуре и дающих преимущество по сравнению с традиционным SBR-культивированием. В гомогенной культуре проще проводить физиологические исследования и выделять чистые культуры ФАО традиционными микробиологическими методами.

В настоящей работе для минимизации образования флокул и получения гомогенного микробного сообщества, обогащенного ФАО, был выбран циклический отъемно-доливной способ культивирования с перемешиванием в модифицированном биореакторе SBR-типа, обеспечивающем чередование аэробных и анаэробных условий. Целью исследования было изучение развивающегося в этих условиях фосфат-аккумулялирующего микробного консорциума, его описание и изучение видового состава.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование в биореакторе. 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 рис. 1.

Цикличность культивирования заключалась в чередовании анаэробных условий с присутствием ацетата (легкодоступного источника углерода и энергии) и аэробных условия 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”, Россия). Управление газовыми потоками и перистальтическими насосами осуществляли в автоматическом режиме с использованием универсального логического модуля LOGO (“Siemens”).

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

1) создание анаэробных условий продувкой реактора азотом в течение 5 мин 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 объеме 0.125 л. Общая продолжительность этого этапа составляла 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 (остаточный объем культуры в реакторе составлял 1.5 л).

Таким образом, усредненная удельная скорость протока системы составила 0.29 л/сут, что в квазистационарном состоянии соответствует возрасту культуры 3.4 сут (время генерации – 2.4 сут).

Для предотвращения зарастания емкости с питательной средой и подающих ее в реактор шлангов, эти части установки еженедельно промывали стерильной водопроводной водой, нагретой до 95°C.

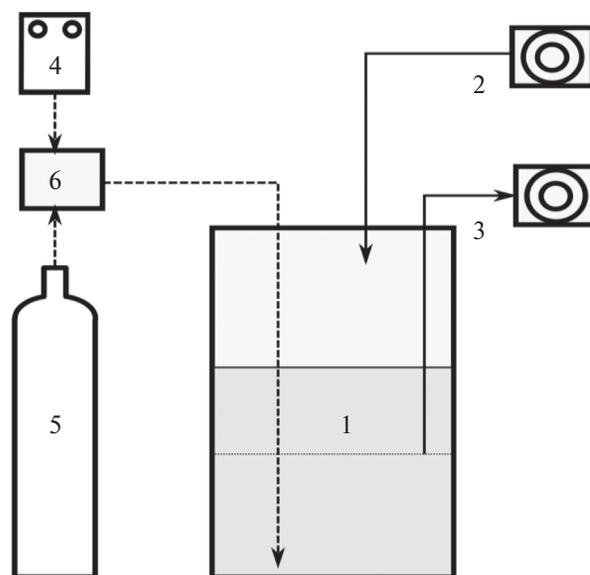


Рис. 1. Схема установки для отъемно-доливного аэробно/анаэробного выращивания микроорганизмов: 1 – биореактор; 2 – насос подачи среды; 3 – насос отведения культуры; 4 – воздушный компрессор; 5 – источник газообразного азота; 6 – система регулирования подачи газов.

Посевным материалом (инокулянт), который вносили в биореактор, служил ил аэротенков Люберецких очистных сооружений (г. Москва).

Питательная среда, подобранная на основании мирового опыта лабораторного выращивания ФАО (Onuki et al., 2002; Welles et al., 2017) имела следующий состав (г/л водопроводной воды): $CH_3COONa (3H_2O)$ – 0.708; $(NH_4)_2SO_4$ – 0.046; KH_2PO_4 – 0.109; дрожжевой экстракт – 0.009; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.135. В качестве основного источника углерода и энергии был использован ацетат (Artan et al., 2005; Tchobanoglous et al., 2014).

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).

Количество взвешенного вещества в отобранной из реактора пробе после ее фильтрования и высушивания определяли гравиметрически (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).

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

Исследование культуры фосфат-аккумулирующих бактерий. Морфологию клеток исследовали на микроскопе Olympus CX41 с фазовым контрастом ("Olympus", Япония).

Фосфат-аккумулирующие бактерии в составе микробного сообщества определяли по наличию в составе клеток гранул, состоящих из соединений фосфора, о чем судили по результатам рентгеновского микроанализа препаратов.

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.

Электронно-микроскопические исследования тотальных препаратов проводили на микроскопе JEM 100 ("Jeol", Япония) по методике описанной ранее (Vasilyeva et al., 2006). Для приготовления препаратов клетки фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом. Дофиксацию проводили раствором тетраоксида осмия.

Рентгеновский микроанализ препаратов клеток проводили на микроскопе JEM-1400 ("Jeol", Япония), оснащенного рентгеновским микроанализатором ("Oxford Instruments", Великобритания), при ускоряющем напряжении 80 кВ; 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. Сетки высушивали и использовали для анализа.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2007.

Исследуемые образцы. Для исследования состава развивающегося микробного консорциума в лабораторном биореакторе отбирали четыре образца активного ила:

1) Образец активного ила из промышленного биореактора по удалению органического вещества, аммония и фосфора. В биореакторе реализована технология Кейптаунского университета (Burton et al., 2014), основанная на чередовании аэробной и анаэробной зон (в аэротенке карусельного типа). Данный образец использовался для загрузки лабораторного биореактора.

2) Образец активного ила, отобранного из лабораторного биореактора на 8 сут с момента его пуска.

3) Образец активного ила, отобранного из лабораторного биореактора на 15 сут с момента его пуска.

4) Образец активного ила, отобранного из лабораторного биореактора на 22 сут с момента его пуска.

Выделение ДНК для метагеномного анализа, амплификация и секвенирование фрагментов генов 16S рРНК. 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 CCTAYGGGDBGCWS-CAG и 806R GGACTACNVGGGTHTCTAAT (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.

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 и базы данных Silva.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование ФАО. Разработана методика выращивания ФАО в биореакторе, основанная на периодическом (циклическом) изменении условий культивирования. Содержание взвешенного вещества в биореакторе после его инокуляции активным илом составляло 3.43 г/л, рН 8.5. В течение первых 15 сут происходило уменьшение массы взвеси до 0.2 г/л за счет 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 сут концентрация микробной биомассы, а также значение рН водной фазы реактора держались на постоянном уровне, что свидетельствовало о стабилизации его работы. Одно-

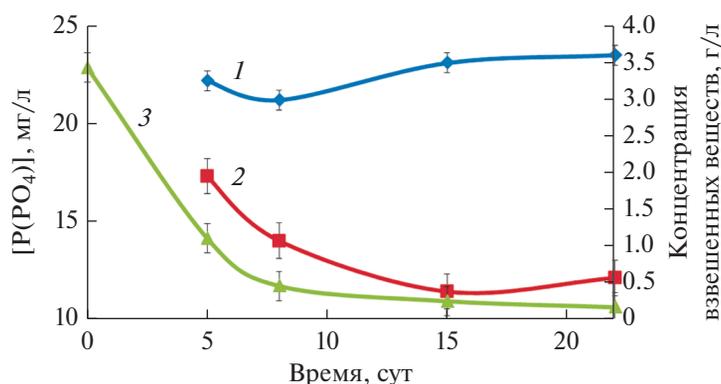


Рис. 2. Изменение содержания растворимых фосфатов в биореакторе: 1 — концентрация P-PO₄ в среде, поступающей в реактор; 2 — концентрация P-PO₄ на выходе из биореактора; 3 — концентрация взвешенных веществ в биореакторе.

временно с этим происходило постепенное уменьшение содержания фосфатов в водной фазе реактора. Если на 5 сут культивирования разница между количеством фосфатов в исходной среде и сливной воде биореактора составляла 4.9 мг/л, то к 8 сут эта цифра возрастала в 1.5 раза (до 7.2 мг/л), а к 22 сут она составила 11–12 мг P-PO₄/л, что соответствовало 50% удалению фосфора из поступающей среды (рис. 2).

Для выяснения природы удаления фосфора, нами было исследовано изменение количества фосфатов в среде в течение одного цикла работы, включающего аэробную и анаэробную фазы. Количественные данные о содержании фосфатов в течение одного цикла культивирования на 8, 15 и 22 сут работы реактора представлены в табл. 1. Необходимо отметить, что в соответствии с биохимическими реакциями, протекающими у ФАО, в анаэробных условиях в отсутствие окислителей и при наличии ацетата происходит выброс фосфатов из клеток. При попадании в аэробные условия клетки ФАО окисляют накопленные углеродные субстраты и при этом поглощают фосфата из среды (Terashgima et al., 2016).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что в процессе культивирования активного ила очистных сооружений в лабораторной установке развивалось микробное сообщество, включающее физиологически активных представителей ФАО. Также важно, что концентрация фосфатов на выходе из реактора была всегда ниже, чем в поступающей воде.

Исследование клеток ФАО методами микроскопии и рентгеновского микроанализа. Микроскопическое исследование микробного сообщества биореактора выявило морфологическое разнообразие бактериальных форм в его составе. Большинство (до 85%) клеток содержало включения (рис. 3). В целом, в сообществе доминировали вытянутые округлые клетки размером (1–1.5) × (2–3.5) мкм, которые содержали преломляющие свет структуры разного размера, расположенные вдоль клеток (рис. 3а). Крупные палочковидные клетки размером (2–3) × (3–5) мкм содержали мелкие плотные темные включения (рис. 3б). Наряду с палочковидными клетками в сообществе развивались клетки округлой формы размером 2.4 × 3.3 мкм со светящимися круглыми внутриклеточными структурами, которые располагались

Таблица 1. Изменение концентрации фосфатов в ходе одного цикла культивирования микробного сообщества на 8, 15 и 22 сут работы биореактора

Время культивирования, сут	Концентрация P-PO ₄ , мг/л			
	начало цикла	конец анаэробной фазы	конец аэробной фазы	Δ, мг/л
8	14.6 ± 1.18	17.0 ± 1.19	14.0 ± 1.35	3.0
15	12.3 ± 1.18	14.7 ± 1.19	11.4 ± 1.35	3.3
22	13.0 ± 1.18	15.3 ± 1.19	12.1 ± 1.35	3.2

Примечание. Δ — разность концентраций фосфора в среде между анаэробной и аэробной фазами.

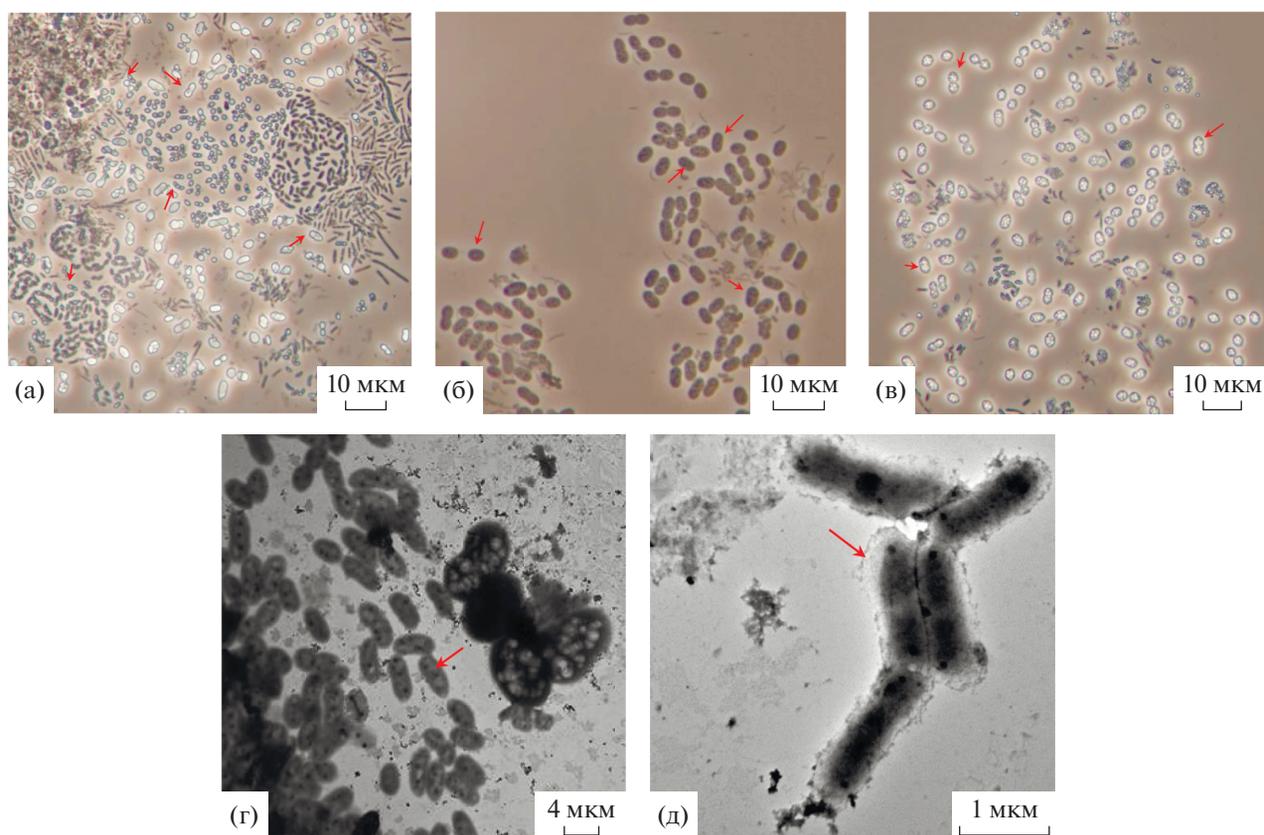


Рис. 3. Бактериальное разнообразие в составе микробного сообщества биореактора: а–в – фазовый контраст, $\times 1000$; г – электронная микроскопия, $\times 800$; д – электронная микроскопия, $\times 1700$. Стрелками показаны клетки с включениями.

равномерно по всему объему клетки (рис. 3в). Электронно-микроскопическое исследование подтвердило наличие в микробном сообществе клеток с разными включениями (рис. 3г, 3д).

Для определения химического состава включений нами было сделано картирование микробного сообщества в целом методом рентгеновского микроанализа, а также проведен точечный анализ элементного состава бактериальных клеток. 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.

Картирование позволило установить, что химические элементы, включая фосфор, распределялись внутри представителей сообщества поразному. Часть элементов содержались внутри клеток, часть сорбировалась в межклеточном пространстве на поверхности клеток сообщества.

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. 4). В клетках палочковидной формы размером 0.5×2 мкм нами были обнаружены электронно-плотные структуры, которые были идентифицированы как включения фосфора (рис. 5а, 5б). Для подтверждения результатов картирования микробного сообщества в целом, нами был проведен точечный элементный анализ отдельных клеток сообщества. Наиболее характерные для этих клеток спектры показаны на рис. 5в. Процентное содержание химических элементов в точках анализа представлено в табл. 2. Точечный анализ показал, что содержание фосфора в клетках (спектры 51–54) было выше, по сравнению с фоновым количеством этого элемента. Включения фосфора (спектры 51 и 52) в палочковидных клетках содержали в 10 раз больше этого элемента, по сравнению с контролем. Включения в изогнутых клетках (спектр 53) содержали в 8 раз больше этого элемента. Максимальное количе-

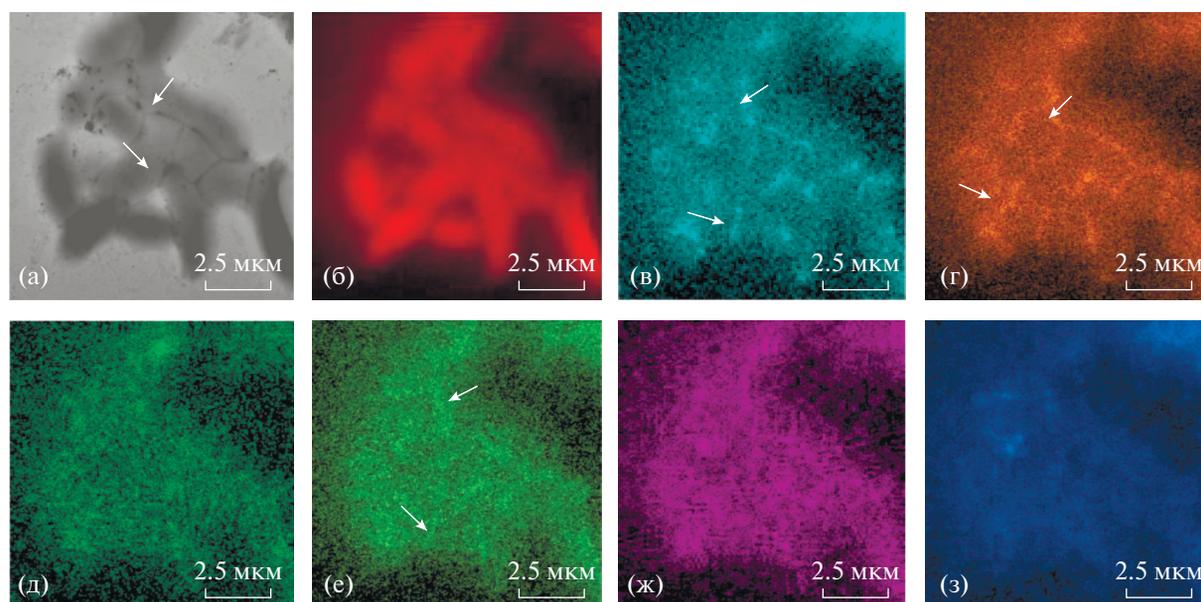


Рис. 4. Элементный анализ микробного сообщества в целом методом картирования с применением рентгеновского микроанализа. Цветом показано распределение отдельных химических элементов; а – электронная фотография сообщества; б – распределение углерода; в – распределение фосфора; г – распределение натрия; д – распределение калия; е – распределение магния; ж – распределение серы; з – распределение кальция. Стрелками показано накопление химических элементов в межклеточном пространстве.

ство фосфора находилось в кокковидных клетках (спектр 54).

Таким образом, было показано, что фосфор находился как на поверхности, так и внутри клеток. Распределение этого элемента внутри клеток было разным. Часть бактерий микробного сообщества биореактора содержали фосфорные гранулы и могли быть представителями ФАО.

Изменение таксономического состава микробного консорциума в процессе его культивирования. 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).

Бактериальные последовательности относились к 19 различным филумам, среди которых доминировали представители филумов *Bacteroidetes* (22.4%), *Proteobacteria* (22.3%), *Patescibacteria* (8.8%), *Chloroflexi* (27.2%) и *Nitrospirae* (4.7%). Суммарно их доля от всех последовательностей генов 16S рРНК составляла 85.4%. Филумы *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* и др. составляли минорную часть микробного сообщества (рис. 6).

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 раз-

Таблица 2. Содержание химических элементов в точках анализа, выраженное в процентах от общего содержания элементов

Номер спектра	Контроль (подложка без клеток)	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

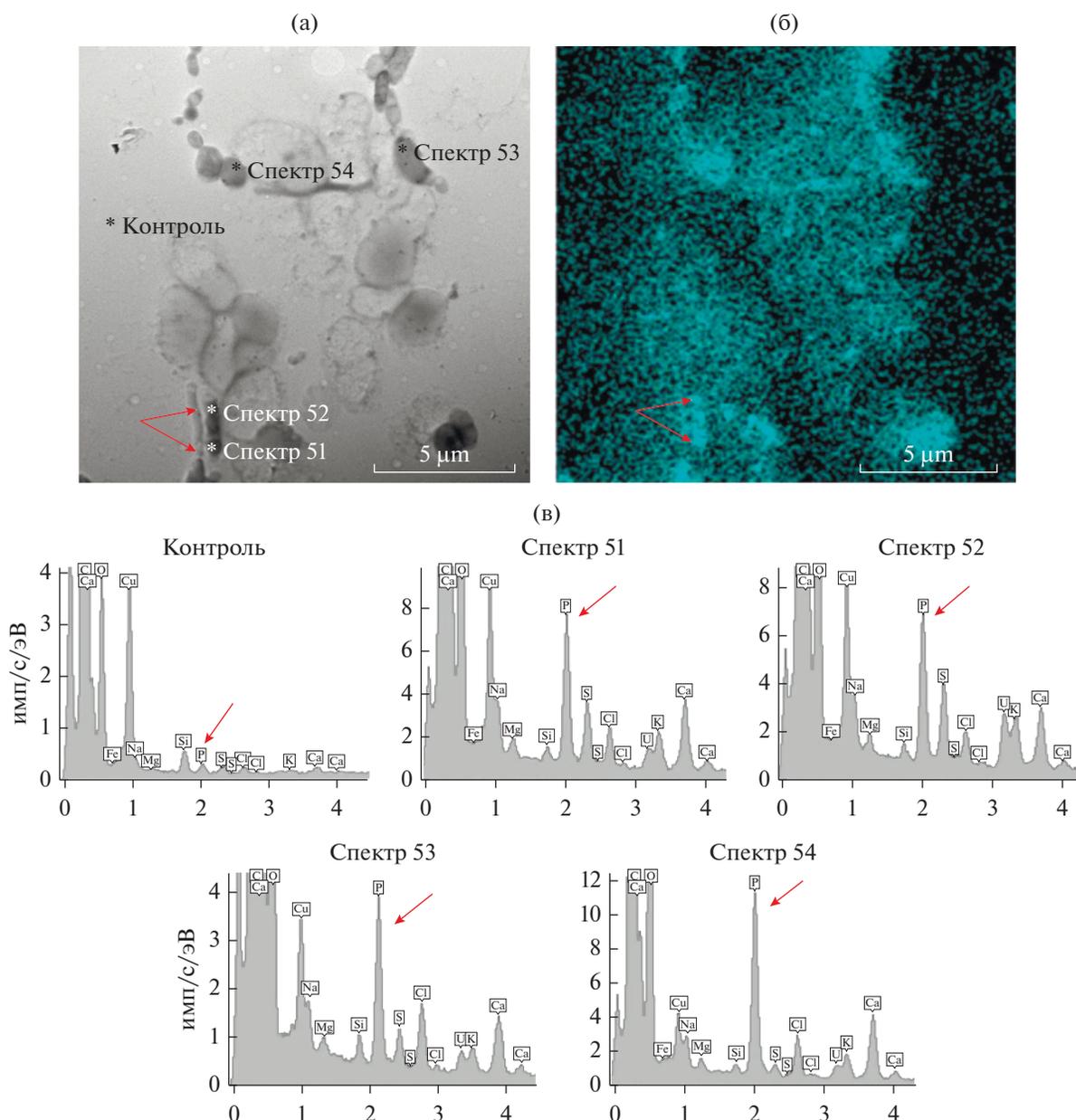


Рис. 5. Точечный анализ элементного состава бактериальных клеток фосфат-аккумулирующего сообщества методом картирования с применением рентгеновского микроанализа: (а) – электронная фотография клеток; (б) – распределение фосфора в клетках сообщества; стрелками показаны обогащенные фосфором гранулы. (в) – контроль – фоновое внеклеточное содержание фосфора; содержание химических элементов: в гранулах палочковидных клеток (спектры 51 и 52); в гранулах изогнутых клеток (спектр 53); в кокковидных клетках (спектр 54). Стрелками отмечены пики фосфора.

нообразии. Так доля архей в ходе работы биореактора снизилась до 0.01% (рис. 6). Доля остальных доминирующих в момент загрузки филумов *Patescibacteria* (8.8%), *Chloroflexi* (27.2%) и *Nitrospirae* (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 име-

ет культивируемых представителей. Метаболизм бактерий этого филума был предсказан 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.

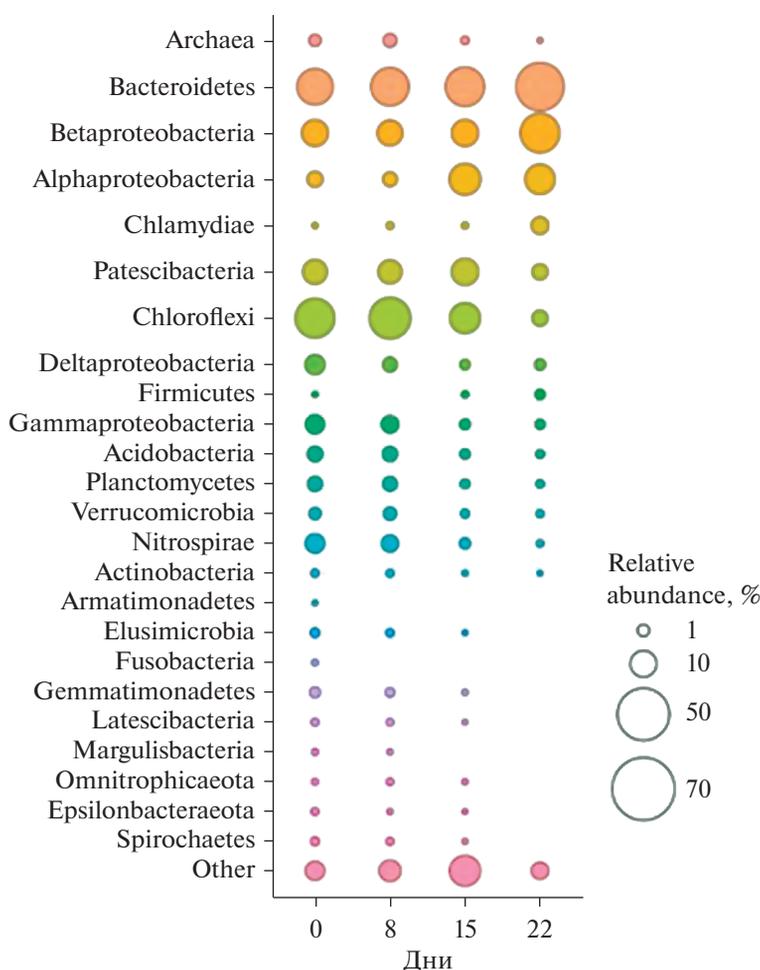


Рис. 6. Таксономический состав микробного сообщества биореактора.

В ходе работы биореактора большинство минорных групп микроорганизмов были элиминированы, среди них представители филумов *Fusobacteria*, *Ca. Margulisbacteria*, *Ca. Latescibacteria*, *Spirochaetes*, *Elusimicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes* и *Omnitrophica*. Доли остальных минорных групп также снижались (рис. 6).

Число обнаруженных ОТЕ сократилось с 445 до 184. На заключительном этапе 61% (10 наиболее многочисленных ОТЕ) всех прочтений составляли ОТЕ, которые на начальном этапе работы биореактора составляли всего 1% сообщества.

Доли двух доминирующих в загрузке филумов *Bacteroidetes* (22.4%) и *Proteobacteria* (22.3%) в ходе культивирования в циклически изменяющихся условиях увеличились. Доля *Bacteroidetes*, 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*.

В ходе работы биореактора доля протеобактерий возросла с 22.3 до 43.2%, что было связано с увеличением численности представителей двух классов α - и β -*Proteobacteria* (с 2.7 до 14.8% и с 10.7 до 27.3% соответственно), в то время как доля γ -, δ -, ϵ -протеобактерий снизилась с 9.5 до 1.4%. Среди альфапротеобактерий в биореакторе существенно возрастала доля микроорганизмов, относящихся к порядку *Microvibrionales* (с 0.28 до 7.4%), близкие последовательности 16S рРНК к которым были обнаружены ранее в биопленке аноксигенного гибридного реактора по очистке сточных вод от азота и фосфора (последовательность JN391746, идентична на 98% с OTU1), а также доля бактерий рода *Gemmobacter* с 0.04 до 3.7%, в который входят гетеротрофные бактерии, являющиеся факультативным анаэробами (Rothe et al., 1987).

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*. Следует отметить, что в ходе развития микробного сообщества существенно изменялось соотношение долей родов внутри этого семейства. 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 то же 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* семейства *Rhodocyclaceae* – с 0.74 до 11.1% от всех последовательностей гена 16S рНК. Родственные им микроорганизмы были найдены в микробных сообществах различных очистных сооружений, в частности, ближайшие последовательности генов 16S были найдены в аэробном ферментере в Китае (LT841763 – 99%, LT842295 – 99% идентичность) (Dasgupta et al., 2019). В состав семейства *Rhodocyclaceae* входят фосфат-аккумулирующие организмы, в частности, вид “*Ca. Accumulibacter*”, который доминирует в большинстве микробных сообществ промышленных сооружений по очистке сточных вод от соединений фосфора (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015; Barr et al., 2016; Дорофеев и соавт., 2019). В лабораторном биореакторе в момент загрузки активным илом очистных сооружений бактерии *Ca. Accumulibacter* ожидаемо идентифицировались и были представлены двумя ОТЕ, доли которых составляли всего 0.01 и 0.2% и имели высокое сходство с последовательностями гена 16S рНК, выявленных в SBR-реакторе по удалению фосфора (идентичность генов 16S рНК 96%, HM046420) и биореакторах по очистке сточных вод (99% идентичности с LR637422) (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015). Однако в процессе культивирования доля этих организмов снижалась, и к концу работы биореактора они не обнаруживались в составе микробного сообщества. Таким образом, в сконструированном биореакторе в процессе циклического культивирования развивались представители ФАО, которые не были характерны для крупномасштабных очистных сооружений (Artan, Orhon, 2005).

В заключение следует отметить, что использованное нами последовательно-периодическое культивирование позволило 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 фосфатов 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/л. В наших экспериментах при концентрации биомассы на порядок меньше (0.2 г/л), чем в промышленных очистных сооружениях, удаление фосфора достигало 12 мг/л, что на порядок выше по удельным показателям удаления фосфора на единицу биомассы активного ила. Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффективности использования последовательно-периодического способа культивирования активного ила очистных сооружений, в процессе которого в лабораторном биореакторе развивалось микробное сообщество с высоким содержанием фосфат-аккумулирующих бактерий.

Микроскопические методы исследования показали накопление фосфора в виде гранул в клетках разной морфологии, что свидетельствовало о развитии разных представителей группы ФАО в микробном сообществе. Молекулярно-биологические 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. Интересно отметить, что в активном иле очистных сооружений, который использовали как инокулянт, были идентифицированы известные бактерии семейства *Rhodocyclaceae* – “*Ca. Accumulibacter*”, которые считаются типичными для очистных сооружений. Они были представлены двумя ОТЕ, близкими к последовательностям гена 16S рНК, ранее обнаруженным в SBR-реакторе по удалению фосфора (идентичность генов 16S рНК 96%, HM046420) и биореакторах по очистке сточных вод (99% идентичности с LR637422) (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015; Barr et al., 2016; Welles et al., 2017; Дорофеев и соавт., 2019). Однако в процессе работы лабораторного биореактора доля этих организмов снижалась. В момент наиболее эффективного удаления фосфора микробным сообществом бактерии “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” 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 сравне-

нию с долей последовательностей других бактерий.

Бактерии рода *Zoogloea* часто встречаются в активных илах очистных сооружений (Barr et al., 2016; Wu et al., 2019). В ряде работ сообщалось о совместном накоплении представителей родов *Zoogloea* и *Dechloromonas* в биореакторах по удалению фосфора в денитрифицирующих условиях (denitrifying phosphorus removal) (Bond et al., 1995). Были высказаны предположения о том, что бактерии рода *Zoogloea* могут быть потенциальными ФАО (Shao et al., 2009). Так у единственного вида *Zoogloea ramigera* были обнаружены внутриклеточные гранул волютин (Roinestad, Yall, 1970). Микроорганизмы, родственные бактериям рода *Dechloromonas*, были найдены в микробных сообществах различных очистных сооружений, в частности, ближайшие к этому роду последовательности генов 16S были идентифицированы в аэробном ферментере в Китае (LT841763 – 99%, LT842295 – 99% идентичность) (Bond et al., 1995; Mao et al., 2015; Welles et al., 2017; Dasgupta et al., 2019).

Таким образом, режим работы лабораторного биореактора с циклическим последовательно-периодическим способом культивирования микробного сообщества активного ила очистных сооружений оказался неблагоприятным для развития типичных для очистных сооружений *Candidatus* “*Accumulibacter phosphatis*” семейства *Rhodocyclaceae* и давал преимущество для роста других представителей этой физиологической группы. В составе сообщества были идентифицированы представители двух других родов этого семейства – родов *Dechloromonas* и *Zoogloea*, которые эффективно удаляли фосфор из среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проектов 18-29-25016 (разработка ЦТМ и сбор установки, морфологический анализ микробного сообщества, микроскопирование, химический анализ, молекулярный анализ микробного сообщества в ходе работы биореактора) и 18-34-00627 (анализ состава микробного сообщества активного ила), а также, частично, при финансовой поддержке Минобрнауки РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

В.А. Грачёв, А.Г. Дорофеев – сборка и поддержание лабораторной установки по культивированию ФАО; В.В. Сорокин, И.К. Дорофеева – электронная микроскопия и элементный анализ; Ю.Ю. Берестовская, А.В. Пелевина, Ю.А. Николаев, Н.В. Пименов – химический анализ, микроскопирование, анализ данных, написание статьи; Р.Ю. Котляров, А.В. Белецкий, Н.В. Равин, А.В. Марданов – выделение метагеномной ДНК, секвенирование и анализ последовательностей генов 16S рРНК, подготовка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дорофеев А.Г., Николаев Ю.А., Марданов А.В., Пименов Н.В.* Циклический метаболизм как способ существования микроорганизмов // Микробиология. 2019. Т. 88. С. 401–416.
- Dorofeev A.G., Nikolaev Y.A., Pimenov N.V., Mardanov A.V.* Cyclic metabolism as a mode of microbial existence // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. P. 402–415.
- Artan N., Orhon D.* Mechanism and design of sequencing batch reactors for nutrient removal // London: IWA Publishing, 2005. 116 p.
- Barr J.J., Dutilh B.E., Skennerton C.T., Fukushima T., Hastie M.L., Gorman J.J., Tyson G.W., Bond P.L.* Metagenomic and metaproteomic analyses of *Accumulibacter phosphatis* enriched floccular and granular biofilm // Environ. Microbiol. 2016. V. 18. P. 273–287.
- 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 // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 1910–1916.
- Burton F.L., Stensel H.D., Tchobanoglous G.* Wastewater engineering: treatment and reuse / 5th ed. revised by G. Tchobanoglous, F.L. Burton, H.D. Stensel. Metcalf and Eddy, New York–London: McGraw Hill, 2014. P. 2044.
- 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 Technol. 2019. V. 271. P. 417–426.
- Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. P. 2460–2461.
- Fan Z., Zeng W., Wang B., Guo Y., Meng Q., Peng Y.* Transcriptional responses of “*Candidatus* *Accumulibacter*” clades to environmental dynamics in enhanced biological phosphorus removal // Bioresource Technol. 2020. V. 306. P. 123108.
- Fernández-Gómez B., Richter M., Schüller M., Pinhassi J., Acinas S.G., González J.M.* Ecology of marine *Bacteroidetes*: a comparative genomics approach // ISME. 2013. V. 7. P. 1026–1037.
- Figdore B.A., Stensel H.D., Winkler M.K.H.* Comparison of different aerobic granular sludge types for activated sludge nitrification bioaugmentation potential // Bioresource Technol. 2018. V. 251. P. 2189–2196.

- Flowers J.J., He S., Malfatti S., del Rio T.G., Tringe S.G., Hugenholtz P., McMahon K.D. Comparative genomics of two “*Candidatus Accumulibacter*” clades performing biological phosphorus removal // ISME J. 2013. V. 7. P. 2301–2314.
- Frey B., Rime T., Phillips M., Stierli B., Hajdas I., Widmer F., Hartmann M. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers // FEMS Microbiol. Ecol. 2016. V. 92. fiw018.
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw018>
- 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* // Front. Microbiol. 2016. V. 20. P. 2003.
- 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 // Syst. Appl. Microbiol. 1999. V. 22. P. 454–465.
- Hug L.A., Baker B.J., Anantharaman K., Brown C.T., Probst A.J., Castelle C. A new view of the tree of life // Nat. Microbiol. 2016. V. 1. P. 16048.
- Kirkegaard R.H., McIlroy S.J., Kristensen J.M. The impact of immigration on microbial community composition in full-scale anaerobic digesters // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 9343.
- Liu S., Daigger G. T., Liu B., Zhao W., Liu J. Enhanced performance of simultaneous carbon, nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater in an anaerobic-aerobic-anoxic sequencing batch reactor (AOA-SBR) system by alternating the cycle times // Bioresource Technol. 2020. V. 301. P. 122750.
- 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.
- 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 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 37. P. 927–934.
- 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. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 593–603.
- 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. // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. P. 26–35.
- Mino T., Van Loosdrecht M.C.V., Heijnen J.J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process // Wat. Res. 1998. V. 32. P. 3193–3207.
- Nakamura K., Hiraishi A., Yoshimi Y., Kawaharasaki M., Masuda K., Kamagata Y. *Microlunatus phosphovorius* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge // Int. J. Syst. Bacteriol. 1995. V. 45. P. 17–22.
- Nguyen H.T., Nielsen J.L., Nielsen P.H. “*Candidatus Halomonas phosphatis*”, a novel polyphosphate-accumulating organism in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. P. 2826–2837.
- Nielsen P.H., McIlroy S.J., Albertsen M., Nierychlo M. Re-evaluating the microbiology of the enhanced biological phosphorus removal process // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 57. P. 111–118.
- Onuki M., Satoh H., Mino T. Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate // Water Sci. Technol. 2002. V. 46. P. 145–153.
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.A. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life // Nat. Biotechnol. 2018. V. 36. P. 996–1004.
- Paula F.S., Chin J.P., Schnürer A., Müller B., Manesiotis P., Waters N., McGrath J.W. The potential for polyphosphate metabolism in Archaea and anaerobic polyphosphate formation in *Methanosarcina mazei* // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 1–12.
- Qasim S.R., Zhu G. Wastewater Treatment and Reuse, Theory and Design Examples. V. 1. Principles and Basic Treatment. CRC Press, 2017.
- Qiu G., Zuniga-Montanez R., Law Y., Thi S.S., Nguyen T.Q.N., Eganathan K., Liu X., Nielsen P.H., Williams R.B.H., Wuertz S. Polyphosphate-accumulating organisms in full-scale tropical wastewater treatment plants use diverse carbon sources // Water Res. 2019. V. 149. P. 496–510.
- Ren S., Li X., Yin X., Luo C., Liu F. Characteristics of intracellular polyphosphate granules and phosphorus-absorption of a marine polyphosphate-accumulating bacterium, *Halomonas* sp. YSR-3 // J. Oceanol. Limnol. 2020. V. 38. P. 195–203.
- Roinestad F.A., Yall I. Volutin granules in *Zoogloea ramigera* // Appl. Microbiol. 1970. V. 19. P. 973–979.
- Rothe B., Fischer A., Hirsch P., Sittig M., Stackebrandt E. The phylogenetic position of the budding bacteria *Blastobacter aggregatus* and *Gemmobacter aquatilis* gen. nov., sp. nov. // Arch. Microbiol. 1987. V. 147. P. 92–99.
- Rubio-Rincon F.J., Lopez-Vazquez C.M., Welles L., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Cooperation between *Candidatus Competibacter* and *Candidatus Accumulibacter* clade I, in denitrification and phosphate removal processes // Water Res. 2017. V. 120. P. 156–164.
- Rubio-Rincón F.J., Welles L., Lopez-Vazquez C.M., Nierychlo M., Abbas B., Geleijnse M., Nielsen P.H., van Loosdrecht M.C.M., Brdjanovic D. Long-term effects of sulphide on the enhanced biological removal of phospho-

- rus: The symbiotic role of *Thiothrix caldifontis* // Water Res. 2017. V. 116. P. 53–64.
- Seviour R.J., Mino T., Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems // FEMS Microbiol. Rev. 2003. V. 27. P. 99–127.
- Shao Y., Chung B.S., Lee S.S., Park W., Lee S.S., Jeon C.O. *Zoogloea caeni* sp. nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 526–530.
- 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 // Environ. Microbiol. 2015. V. 17. P. 1574–1585.
- Stokholm-Bjerregaard M., McIlroy S.J., Nierychlo M., Karst S.M., Albertsen M., Nielsen P.H. A critical assessment of the microorganisms proposed to be important to enhanced biological phosphorus removal in full-scale wastewater treatment systems // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 718.
- 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. V. 31. P. 449–455.
- Thomas F., Hehemann J.-H., Rebuffet E., Czejek M., Michel G. Environmental and gut *Bacteroidetes*: the food connection // Front. Microbiol. 2011. V. 2. P. 93.
- Van Loosdrecht M.C.M., Hooijmans C.M., Brdjanovic D., Heijnen J.J. Biological phosphorus removal processes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 48. P. 289–296.
- 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 // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 2083–2088.
- Welles L., Abbas B., Sorokin D.Y., Lopez-Vazquez C.M., Hooijmans C.M., van Loosdrecht M., Brdjanovic D. Metabolic response of “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” clade II C to changes in influent P/C ratio // Front. Microbiol. 2017. V. 7. P. 2121.
- 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.
- 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 // Environ. Microbiol. 2009. V. 11. P. 3029–3044.
- 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 // ISME J. 2008. V. 2. P. 853–864.
- 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 // Nat. Microbiol. 2019. V. 4. P. 1183–1195.
- Yu K., Zhang T. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of microbial community structure and gene expression of activated sludge // PLoS One. 2012. V. 7. e38183.
- Zeng W., Zhang L., Fan P., Guo J., Peng Y. Community structures and population dynamics of “*Candidatus Accumulibacter*” in activated sludges of wastewater treatment plants using *ppk1* as phylogenetic marker // J. Environ. Sci. 2018. V. 67. P. 237–248.
- Zhang T., Shao M.-F., Ye L. 454 pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants // ISME J. 2012. V. 6. P. 1137–1147.

Phosphates Removal by a Microbial Consortium under Conditions of Cyclic Aerobic-Anaerobic Cultivation

A. V. Pelevina^{1,*}, Yu. Yu. Berestovskaya¹, V. A. Grachev¹, I. K. Dorofeeva¹, V. V. Sorokin¹,
A. G. Dorofeev^{1,2}, A. Yu. Kallistova¹, Yu. A. Nikolaev¹, R. Yu. Kotlyarov³,
N. V. Pimenov¹, and A. V. Mardanov³

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

²Mosvodokanal Co., Moscow, 105005 Russia

³Institute of Bioengineering, Research Center of Biotechnology RAS, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: annie.pelevina@yandex.ru

Received August 5, 2020; revised September 24, 2020; accepted September 29, 2020

Abstract—Formation of a community of phosphate-accumulating microorganisms (PAO) in a laboratory sequential batch bioreactor ensuring altered aerobic and anaerobic conditions during periodic removal and addition of the medium were investigated. The bioreactor removed 50% phosphorus from the incoming medium after 22 days from the start-up. Microscopy and X-ray microassay revealed the of cells of diverse morphology that contained phosphorus-enriched granules. High-throughput sequencing of the 16S rRNA gene fragments carried out on days 0, 8, 15, and 22 showed changes in the community composition and its de-

ing diversity. On day 22, approximately twofold increase of the relative abundancies of *Bacteroidetes* (up to 43% of the 16S rRNA gene sequences) and *Proteobacteria* of the classes alpha (up to 15%) and beta (up to 27%) was observed. While at the onset of the reactor operation, typical PAOs related to “*Candidatus Accumulibacter*” (class *Betaproteobacteria*) constituted 0.2% of the community, they were not detected on day 22. The most likely PAO candidates were beta-proteobacteria of the genus *Dechloromonas*, the share of which increased from 0.7 to 11% by the time of the highest phosphorus removal from the inflowing medium. The relative abundance of denitrifying heterotrophs of the genus *Zoogloea* (family *Rhodocyclaceae*) increased from 0.1 to 11.5%. Apparently, the operation mode of the bioreactor provided favorable conditions for the process of denitrifying phosphorus removal and selection of the appropriate PAO.

Keywords: phosphate-accumulating organisms, activated sludge, bacteria with a cyclic type of metabolism, volutin granules, family *Rhodocyclaceae*, *Dechloromonas*, *Zoogloea*, “*Candidatus Accumulibacter*”