

Действие различных физико-химических факторов на активность фосфат-аккумулирующих бактерий в лабораторных биореакторах, имитирующих промышленные очистные сооружения

Пименов Н.В.^{1*}, Пелевина А.В.¹, Дорофеев А.Г.¹, Берестовская Ю.Ю.¹, Груздев Е.В.², Марданов А.В.²

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

² ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

* npimenov@mail.ru

Ключевые слова: лабораторные биореакторы; активный ил очистных сооружений; фосфат-аккумулирующие бактерии; циклический метаболизм; гранулообразование; 16S рРНК профилирование микробного сообщества; анализ полных геномов

Процесс биогенного удаления фосфор известен с середины прошлого столетия и широко используется в биотехнологиях очистки сточных вод от соединений фосфора. Но до сих пор основные представители фосфатаккумулирующих бактерий (ФАО) не выделены в чистую культуру. Возможно, это связано с особенностями метаболизма ФАО, для развития которых необходимо чередовании анаэробной и аэробной фаз культивирования (циклический метаболизм). На очистных сооружениях динамика формирования ФАО-сообщества и его активность обусловлены конфигурацией и режимом работы реакторов, а также количеством и составом органического вещества. В природных экосистемах ФАО обычно обнаруживают на границе окисленных и восстановленных условий, где также происходит быстрая смена кислородного и бескислородного режимов. Выяснение особенностей формирования микробного сообщества ФАО, спектра используемых субстратов и путей их метаболизма позволит определить функциональные особенности ФАО, их место в микробном сообществе очистных сооружений, что может способствовать улучшению технологии удаления фосфора. Целью работы было выяснение особенностей гранулообразования, сукцессии ФАО-сообществ, спектра и путей метаболизма используемых ими органических субстратов.

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

Нами был создан лабораторный биореактор для циклического культивирования микробного сообщества на основе биореактора BIOSTAT В (фирмы "SARTORIUS"), имеющего рабочий объемом 2 л, снабженного перемешивающим устройством и внешней рубашкой для термостатирования. 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). 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). В процессе длительного культивирования сообщества ФАО осуществляли непрерывный контроль физико-химических параметров, морфологических изменений структуры сообщества с использованием световой и электронной микроскопии с рентгеновским микроанализом, таксономического состава методом профилирования гена 16S рРНК, а также осуществили сборку полных геномов доминирующих микроорганизмов в составе сообщества ФАО.

В процессе культивирования ФАО сообщества в лабораторном биореакторе выявлено спонтанное образование гранулоподобных агрегатов разной морфологии. Электронно-микроскопические и молекулярные исследования закономерностей формирования и таксономического состава микроорганизмов гранулоподобных структур свидетельствует о том, что гранулообразование – естественный этап развития ФАО-сообщества. Таким образом отпадает необходимость в специфических технологиях получения гранулированного активного ила, что позволяет существенно упростить технологический процесс и снизить эксплуатационные затраты на процесс очистки сточных вод от фосфора.

В сравнении с ацетатом проведены исследования возможности использования ФАО-сообществом, обогащенным Са. *Accumulibacter*, 17 органических соединений, которые наряду с ацетатом присутствуют в сточных водах. Выявлено их влияние на цикл выделения/поглощения фосфатов при смене анаэробных и аэробных периодов. В частности, установлено, что наряду с ацетатом, пропионатом и пируватом, полноценным субстратом для ФАО являются бутират, аспарагиновая и глутаминовая кислоты. С помощью метагеномного подхода были описаны основные метаболические пути *Ca. Accumulibacter*. Результаты работы могут быть использованы для разработки новых эффективных технологий очистки сточных вод от фосфора в России.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ № 21-64-00019 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Effect of physicochemical factors on activity of phosphate-accumulating bacteria in laboratory bioreactor models of industrial waste treatment facilities

Pimenov N.V.^{1*}, Pelevina A.V.¹, Dorofeev A.G.¹, Berestovskaya Yu.Yu.¹,
Grouzdev E.V.², Mardanov A.V.²

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

² *Institute of Bioengineering, Federal Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

* *npimenov@mail.ru*

Key words: laboratory bioreactors; activated sludge of waste treatment facilities; phosphate-accumulating bacteria; cyclic metabolism; granule formation; 16S rRNA profiling of microbial communities; complete genome analysis

Biological phosphorus removal has been known since the mid-20th century and is widely used in biotechnologies for phosphorus removal from wastewater. The major representatives of phosphate-accumulating organisms (PAO) have not been, however, obtained as pure cultures. This is probably due to the properties of PAO metabolism, since development of these bacteria requires alternations of the oxic and anoxic phases of cultivation (cyclic metabolism). Dynamics of formation and activity of the PAO communities of waste treatment plants are determined by the configuration and operation mode of their bioreactors and by the amount and composition of organic matter. In natural environments, PAO are usually detected at the redox interface, where rapid shifts between oxic and anoxic conditions also occur. Determination of the characteristics of formation of the PAO microbial communities, the spectrum of utilized substrates, and the pathways of their metabolism will result in elucidation of the PAO functional properties and their place in the communities of waste treatment facilities, which may help in improvement of the phosphorus removal technology. The goal of the present work was to determine the patterns of granule formation, succession of the PAO communities, and the spectrum of utilized substrates and the relevant metabolic pathways.

The bioreactors were loaded with activated sludge samples collected from an aerobic digester (aerotank) of the block for biogenic elements removal at the Lyubertsy waste treatment plant (Moscow), in which the University of Cape Town (UCT) technology based on alternation of aerobic and anaerobic cultivation was implemented.

The laboratory bioreactor for cyclic cultivation of the microbial community was constructed by modification of a BIOSTAT B reactor (Sartorius) with 2-L working volume, equipped with an agitator and an external thermostat jacket. Cyclic cultivation was achieved by switching from anoxic conditions with acetate as an easily available source of carbon and energy to oxic conditions without acetate (after its consumption during the anoxic phase). Oxic and anoxic conditions were established by bubbling the bioreactor with air or oxygen-free nitrogen, respectively by means of the regulated gas supply system (Eltochpribor, Russia). Gas flows and the operation of peristaltic pumps were controlled automatically using the LOGO universal logical module (Siemens). In the course of long-term cultivation of PAO communities, the physicochemical parameters were monitored continuously. Morphological changes in the community structure were studied by light microscopy and electron microscopy coupled to X-ray microanalysis. The taxonomic composition of the community was determined by the 16S rRNA gene profiling. Whole genomes of the dominant members of the PAO microbial community were assembled.

During cultivation of the PAO community in a laboratory bioreactor, spontaneous formation of granule-like aggregates of diverse morphology was observed. Electron microscopic and molecular investigation of formation patterns of the granule-like structures and of their taxonomic composition showed granule formation to be a natural stage of development for PAO communities. Thus, since no specific technologies to obtain granulated activated sludge are required, the technological process may be simplified considerably, with decreased operating costs for phosphorus removal from wastewater.

Apart from acetate, the possible utilization of 17 organic compounds also occurring in wastewater by the PAO community enriched with *Ca. Accumulibacter* was investigated. The effect of these compounds on the phosphate release/consumption cycle during alternating oxic and anoxic phases was studied. Thus, it was found that, apart from acetate, propionate, and pyruvate, butyrate, aspartate, and glutamate were adequate substrates for PAO. The metagenomic approach was used to describe the main metabolic pathways of *Ca. Accumulibacter*.

The results of this work may be used to develop new efficient technologies for phosphorus removal from wastewater at Russian waste treatment plants.

Funding: The study was supported by the Russian Science Foundation (No. 21-64-00019) and by the Russian Federation Ministry of Science and Higher Education.