

УДК 57.083.13:579.66+579.222

ВЛИЯНИЕ СДВИГА pH НА ОБОГАЩЕННОЕ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ СООБЩЕСТВО В БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

© 2024 г. А. Г. Дорофеев^{a, *}, А. В. Пелевина^a, Е. В. Груздев^b,
А. В. Марданов^b, Н. В. Пименов^a

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

^bИнститут биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071, Россия

*e-mail: dorofeevag@mail.ru

Поступила в редакцию 03.04.2024 г.

После доработки 30.04.2024 г.

Принята к публикации 02.05.2024 г.

В биореакторе последовательно-периодического действия прослежены изменения структуры и свойств обогащенного фосфат-аккумуляирующими микроорганизмами (ФАО) сообщества после сдвига pH в слабокислую область (pH 6.7–7.1). Доля *Candidatus Accumulibacter* снизилась с 43.6 до 13.9%, тогда как возросло количество потенциальных ФАО, относящихся к *Dechloromonas* и *Thauera*. При этом доля суммарного количества ФАО изменилась незначительно и составила 40–43%. Доля основных конкурентов ФАО – гликоген-аккумуляирующих микроорганизмов (ГАО) в течение эксперимента оставалась незначительной: фрагменты гена 16S рРНК *Competibacter* до и после изменения pH составили 2–4%. Снижение pH привело к падению количества выделяемых в анаэробной фазе фосфатов, однако количество фосфора в биомассе и его удаление оставалось высоким – 15–17 и 92–94% соответственно.

Ключевые слова: биологическое удаление фосфора, фосфат-аккумуляирующие бактерии (ФАО), очистка воды, *Ca. Accumulibacter*, *Dechloromonas*, *Thauera*

DOI: 10.31857/S0026365624050124

Жизнедеятельность осуществляющих биологическое удаление фосфора фосфат-аккумуляирующих организмов (ФАО) зависит от многих факторов: температуры, pH, состава и концентрации органических и неорганических субстратов, концентрации кислорода, режима работы биореактора (Zhao et al., 2022). Один из важнейших факторов, определяющих эффективность биологических процессов очистки сточных вод от биогенных элементов, – кислотность среды. В биореакторах с активным илом значение pH лежит, как правило, в пределах 6–9. В этом диапазоне влияние кислотности на эффективность удаления органического вещества и денитрификацию не критично, тогда как ФАО и нитрифицирующие микроорганизмы более чувствительны к варьированию кислотности (Metcalf, Eddy, 2018). Следует отметить, что при высоких концентрациях аммонийных соединений и нитритов влияние pH может быть связано не с внеклеточной концентрацией протонов, а с ингибированием биологических процессов аммиаком

или недиссоциированной формы азотистой кислоты, доля которых возрастает, соответственно, с повышением или понижением значения pH (Liu et al., 2019; Andreadakis et al., 2021).

В ряде работ показано, что биологическое удаление фосфора (P) в интервале pH 6.5–8.6 возрастает с увеличением pH, и оптимум лежит, как правило, в слабощелочных условиях (pH 7.1–8.0) (Schuler, Jenkins, 2002; Pijuan et al., 2004; Zhang et al., 2005; Chen, Gu, 2006). Считается, что основная причина снижения фосфат-аккумуляирующей способности консорциума – результат конкуренции за субстрат между гликоген-аккумуляирующими организмами (ГАО) и ФАО, и при снижении pH преимущество получают ГАО. Эти микроорганизмы имеют сходный с ФАО циклический тип метаболизма, но не обладают способностью к циклированию фосфатов при смене анаэробно/аэробных условий (Serafim et al., 2002; Oehmen et al., 2005). В отличие от ФАО, ГАО в анаэробный период цикла поглощают органическое вещество не за счет энергии

гидролиза полифосфатов, а за счет использования внутриклеточного гликогена. В работах (Filipe et al., 2001a, 2001b) было показано, что в анаэробной фазе SBR-цикла с повышением pH преимущество получают ФАО за счет поддержания высокой скорости потребления ацетата, сопряженным с гидролизом полифосфатов. В аэробной фазе при снижении pH до 6.5 активность ФАО (прирост биомассы, расход полигидроксикарбоновых кислот) падает, тогда как у ГАО активность в этом диапазоне практически неизменна. Увеличение преимущества ФАО при повышении pH установлено на примере активного ила и культур, обогащенных такими представителями ФАО как *Ca. Accumulibacter* и *Tetrasphaera* (Nguyen et al., 2023), причем эта закономерность проявлялась при использовании не только ацетата, но и других субстратов, используемых ФАО (Oehmen et al., 2005; Chen, Gu., 2006; Zhang et al., 2007).

Для биологического удаления фосфора наиболее нестабильной оказалась область значений pH 6.5–7.0. Даже при незначительном сдвиге pH в эту область наблюдались радикальные изменения состава сообщества и падение эффективности удаления фосфора (Zhang et al., 2005; Tu, Schuler, 2013). Несмотря на то, что слабокислые условия характерны для биореакторов очистки сточных вод, функциональные свойства и структура сообщества ФАО в этой области остаются малоизученными.

Учитывая, что pH может иметь критическое значение для существования в микробном сообществе ФАО и эффективности удаления фосфора, в настоящей работе мы исследовали реакцию обогащенной ФАО культуры на сдвиг pH из благоприятной в неблагоприятную для ФАО слабукислую область. Исходной культурой было обогащенное *Ca. Accumulibacter* сообщество, сформировавшееся в лабораторном реакторе последовательно-периодического действия (SBR – Sequencing Batch Reactor) в течение длительного времени культивирования (более 2 лет) в слабощелочных условиях.

Выращивание микробного сообщества проводили в SBR с рабочим объемом 2 л в циклических условиях, способствующих развитию ФАО, при температуре $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Один SBR-цикл продолжительностью 6 ч включал последовательные фазы: подача свежей среды, анаэробная и аэробная фазы, отстаивание и вывод избыточной (приросшей) биомассы. Время удержания биомассы составило 17.5 сут. Экзогенным источником углерода и энергии служил ацетат (Ац). Отношение ацетат/фосфор в исходной среде составляло 12 мг Ац/мг Р. Для регулирования pH в исходную среду добавляли 0.1 н HCl. В пробах из биореактора определяли вес сухой биомассы (СБ), концентрации растворенных фосфатов и ацетата. Основные характеристики биореактора, состав среды и методы исследования детально описаны нами ранее (Pelevina et al., 2023). Таксономический состав сообщества определяли

методом высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, описанным ранее (Пелевина и соавт., 2021).

Содержание фосфора в биомассе рассчитывали по формуле

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

где P_{in} и P_{out} – концентрации $P-PO_4$ в подающейся и отводящейся среде (мг/л), SRT – время удержания биомассы (ч), HRT – гидравлическое время пребывания в биореакторе (ч).

В исходной культуре до изменения кислотности в течение SBR-цикла pH циклически изменялся от близкого к нейтральному (pH 7.0–7.1) в анаэробной фазе до 7.5–8.3 в аэробной фазе, что соответствовало типичной динамике pH, характерной для обогащенных ФАО культур. Известно, что без pH-корректировки изменение pH в биореакторе связано с потреблением ацетата, а также с циклом поглощения/выделения фосфатов и выбросом углекислоты (Serralta et al., 2006). В этот период культура проявляла типичный ФАО-фенотип: в анаэробную фазу весь ацетат потреблялся, что сопровождалось выходом фосфатов в среду, в аэробную фазу фосфаты почти полностью поглощались (рис. 1). Отношение выделенного в анаэробной фазе фосфора к потребленному ацетату (Р/Ац) составило 1.1–1.6 Р-моль/Ац-моль.

После изменения кислотности значения pH в анаэробной и аэробной фазах снизились до 6.6–6.8 и 6.9–7.4 соответственно. Ацетат в анаэробной фазе полностью потреблялся, однако количество выделенного фосфата снизилось вдвое, и Р/Ац понизилось до 0.5–0.6 Р-моль/Ац-моль. Этот факт соответствует существующим представлениям о снижении расхода энергии на транспорт ацетата при более низких pH и, соответственно, снижении гидролиза внутриклеточных полифосфатов и выбросу ортофосфата из клеток ФАО (Filipe et al., 2001c). Вместе с тем содержание фосфора в биомассе в конце аэробной фазы оставалась высоким (15–16%), и эффективность удаления фосфатов в течение эксперимента существенно не изменилась, составив 92–94%.

После сдвига pH произошли изменения таксономического состава сообщества (рис. 2).

Доля *Ca. Accumulibacter* в течение 58 сут снизилась с 43.6 до 13.9 %, тогда как доли двух других таксонов, включающих представителей ФАО, – *Dechloromonas* и *Thauera* возросли с 2.24 до 11.83 и с 0.82 до 17.58% соответственно. Замещения ФАО типичными представителями группы ГАО мы не наблюдали: в течение эксперимента доля фрагментов гена 16S рРНК основного представителя ГАО – *Ca. Competibacter* была незначительной и составляла 1–4%. Подобное частичное замещение *Ca. Accumulibacter* представителями *Dechloromonas*

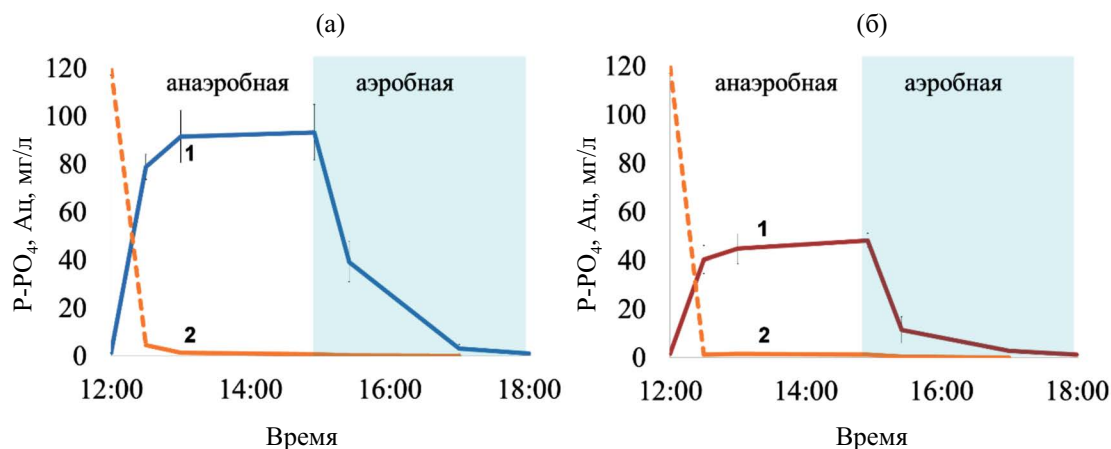


Рис. 1. Динамика концентрации фосфатов (1) и ацетата (2) в биореакторе в течение одного SBR-цикла: а – до снижения pH; б – через 39–58 сут после снижения pH. Концентрация ацетата в первой точке (12:00) рассчитана с использованием концентрации ацетата в подающей среде.

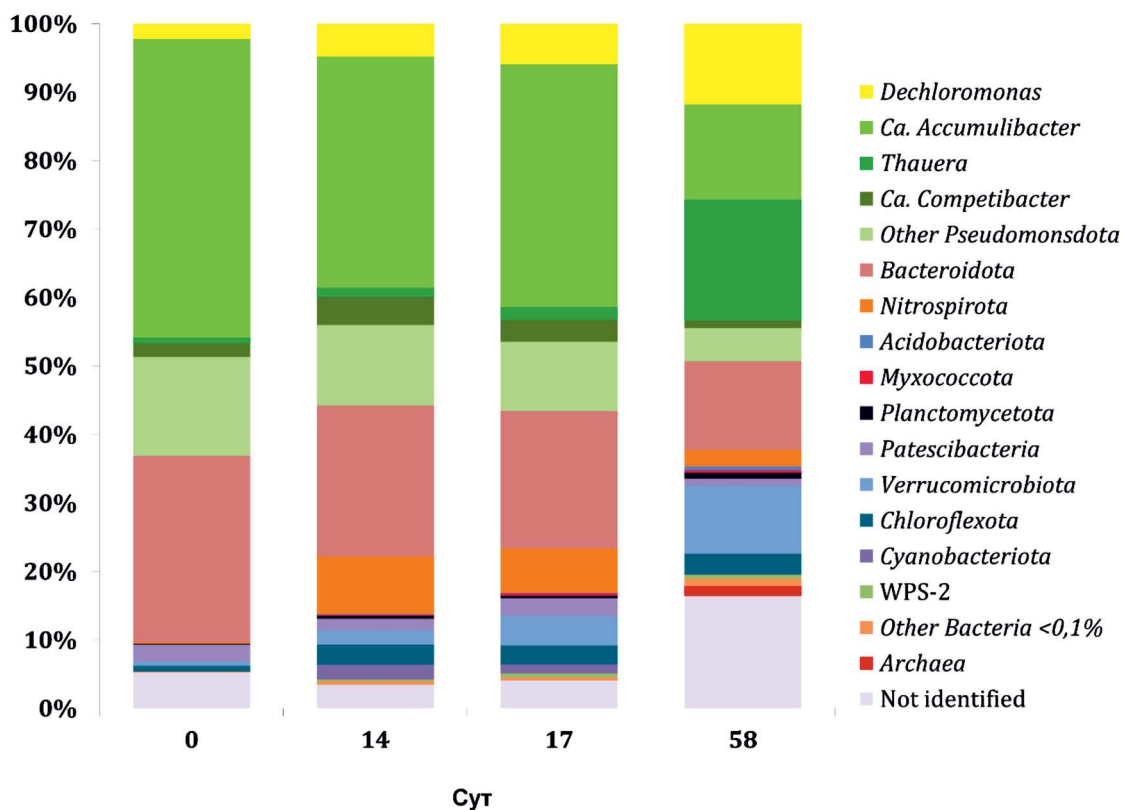


Рис. 2. Изменение таксономического состава сообщества после смены pH.

в слабокислой области отмечено в работе (Tu, Schuler, 2013): выращивание ФАО-сообщества при pH 6.4–7.0 (но при обязательном условии низкой концентрации ацетата в биореакторе) привело к снижению доли ОТЕ *Ca. Accumulibacter* с 80 до 60%, тогда как доля *Dechloromonas* увеличилась

до 16%. При этом в сумме представители этих таксонов составили 76–80%, и сохранился ФАО-фенотип культуры.

Dechloromonas и *Thauera* обычно относят к денитрифицирующим ФАО, способным использовать в качестве конечных акцепторов электронов

как кислород, так и нитраты и нитриты (Wang, He, 2020; Petriglieri et al., 2021). Однако протекание значимой для материального баланса денитрификации в наших экспериментах маловероятно: концентрация нитратов в подающейся в биореактор среде не превышала 2 мг N-NO₃/л, для ингибирования нитрификации (как основного продуцента нитратов и нитритов) мы добавляли в среду тиомочевину, а концентрация кислорода на протяжении 80% аэробного периода превышала 3 мг O₂/л (рис. 3).

Мы полагаем, что *Dechloromonas* и *Thauera* проявляли типичный ФАО-фенотип, используя кислород в качестве акцептора электронов, что обеспечило сохранение высокой эффективности удаления фосфора после сдвига pH. Участие *Thauera* в анаэробно/аэробном удалении фосфора подтверждается в работах Wang and He (2020) и Ren et al. (2021), установивших, что выделенные ими штаммы *Thauera* были способны к ФАО-фенотипу, используя в качестве акцептора электронов кислород. На участие *Thauera* в циклировании фосфатов косвенно указывает и значительное снижение отношения Р/Ац в анаэробной фазе SBR-цикла после сдвига pH. Ожидаемое, в соответствии с существующими представлениями о “классическом” метаболизме ФАО, расчетное падение отношения Р/Ац, не должно превысить 15–25% (Filipe et al., 2001), тогда как реальное снизилось вдвое. Это можно объяснить “разбавлением” *Ca. Accumulibacter* представителями *Thauera*, имеющими более низкое отношение Р/Ац (Ren et al., 2021). Таким образом, в наших экспериментах после снижения pH произошло частичное замещение *Ca. Accumulibacter* другими представителями ФАО – *Dechloromonas* и *Thauera*, при этом суммарная доля ФАО в сообществе изменилась незначительно и составляла 40–43%.

Результаты нашей работы указывают на то, что в слабокислых условиях способные к денитри-

фикации представители ФАО *Dechloromonas* и *Thauera* при использовании в качестве акцептора электронов кислорода становятся более конкурентоспособными по отношению к *Ca. Accumulibacter* и ГАО.

Наши результаты расходятся с результатами ряда работ, выполненных в этом направлении. Было показано, что снижение значения pH с 7 до 6.5 в течение 14 сут привело к потере ФАО-фенотипа и падению способности накапливать и удалять фосфор с 99.9 до 17% (Zhang et al., 2005). При этом авторы отметили кардинальную смену состава сообщества. В работе (Fukushima et al., 2010) снижение уровня pH в кислую область привело к снижению популяции *Ca. Accumulibacter* и падению фосфат-аккумулирующей способности культуры. Эти расхождения могут быть связаны с различиями в условиях проведения экспериментов и в составе изучаемых микробных сообществ:

(1) в экспериментах (Zhang et al., 2005) и (Oehmen et al., 2005) на протяжении SBR-цикла pH поддерживался на постоянном уровне, тогда как в нашей работе в течение SBR-цикла pH не контролировался, и диапазон варьирования pH составил в среднем 6.7–7.1 единиц. В связи с этим следует отметить публикации, свидетельствующие о том, что для ФАО оптимальными являются условия с переменным (неконтролируемым) pH, тогда как при фиксированном на протяжении SBR-цикла pH преимущества получают ГАО (Jeon et al., 2001; Serafim, 2002);

(2) результаты ряда работ указывают на то, что для доминирования ФАО pH в аэробный период должен превышать 7.0 (Filipe et al., 2001a). Возможно, что значение pH 6.5 – критическая точка для анаэробного периода, ниже которой происходит быстрая смена ФАО-сообщества на ГАО-сообщество, тогда как в нашей работе pH 6.5 не достигался.

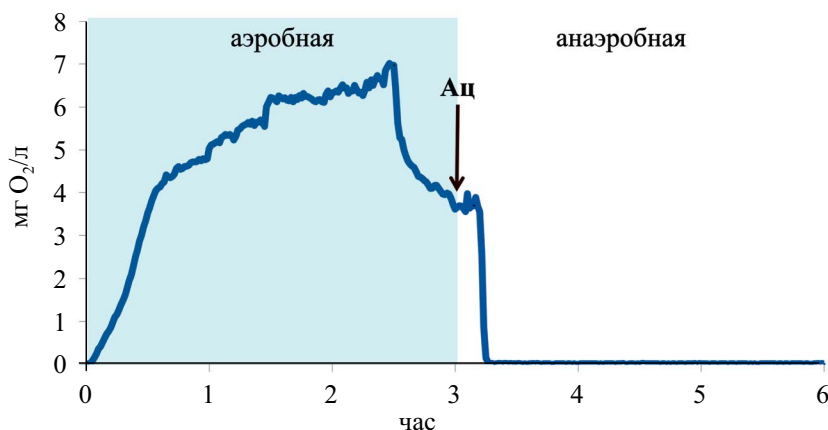


Рис. 3. Динамика концентрации растворенного O₂ в течение одного SBR-цикла. 0–3 ч – аэробный период; 3–6 ч – анаэробный период. Стрелкой отмечено начало подачи субстрата (ацетата).

Таким образом, даже незначительный сдвиг pH в слабокислую область в течение 1–2 мес. приводит к существенному изменению состава обогащенного ФАО микробного сообщества, однако доля ФАО (по крайней мере, при pH выше 6.5) в значительной мере сохраняется, и замещения ФАО конкурентной группой ГАО не происходит. При этом содержание фосфора в биомассе и эффективность удаления фосфора остаются на постоянном высоком уровне.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00019) 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.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пелевина А.В., Берестовская Ю.Ю., Грачев 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. С. 76–89.
- Pelevina A.V., Berestovskaya Y.Y., Grachev V.A., Dorofeeva I.K., Sorokin V.V., Dorofeev A.G., Kallistova A.Y., Nikolaev Y.A., Pimenov N.V., Kotlyarov R.Y., Beletskii A.V., Ravin N.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V. A microbial consortium removing phosphates under conditions of cyclic aerobic-anaerobic cultivation // *Microbiology (Moscow)*. 2021. V. 90. P. 66–77.
- Andreidakis D., Noutsopoulos C., Fragkiskatos G., Mamais D., Misirli T., Argyropoulou K., Themeli E., Malamis S. Inhibition of free nitrous acid and free ammonia on polyphosphate accumulating organisms: Evidence of insufficient phosphorus removal through nitrification-denitrification // *J. Environ. Manage.* 2021. V. 297. Art. 113390.
- Chen Y., Gu G. Effect of changes of pH on the anaerobic/aerobic transformations of biological phosphorus removal in wastewater fed with a mixture of propionic and acetic acids // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2006. V. 81. P. 1021–1028.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady Jr. C.P.L. Effects of pH on the rates of aerobic metabolism of phosphate-accumulating and glycogen-accumulating organisms // *Water Environ. Res.* 2001a. V. 73. P. 213–222.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady Jr. C.P.L. pH as a key factor in the competition between glycogen-accumulating organisms and phosphorus-accumulating organisms // *Water Environ. Res.* 2001b. V. 73. P. 223–232.
- Filipe C.D.M., Daigger G.T., Grady Jr. C.P.L. Stoichiometry and kinetics of acetate uptake under anaerobic conditions by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms at different pHs // *Biotechnol. Bioeng.* 2001c. V. 76. P. 32–43.
- Fukushima T., Onuki M., Satoh H., Mino T. Effect of pH reduction on polyphosphate- and glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal processes // *Water Sci. Technol.* 2010. V. 62. P. 1432–1439.
- Liu Y., Ngo H.H., Guo W., Peng L., Wang D., Ni B. The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: a review // *Environ. Int.* 2019. V. 123. P. 10–19.
- Metcalf & Eddy Inc., Tchobanoglous G., Stensel H.D., Tsuchihashi R., Burton F.L., Abu-Orf M., Bowden G., Burton F.L., Pfarr W. Wastewater engineering: treatment and resource recovery. McGraw-Hill, New York, 2014. 5th edn. 2018 p.
- Nguyen P.Y., Marques R., Wang H., Reis M.A., Carvalho G., Oehmen A. The impact of pH on the anaerobic and aerobic metabolism of *Tetrasphaera*-enriched polyphosphate accumulating organisms // *Water. Res.* X. 2023. V. 19. Art. 100177.
- Oehmen A., Teresa Vives M., Lu H., Yuan Z., Keller J. The effect of pH on the competition between polyphosphate-accumulating organisms and glycogen-accumulating organisms // *Water. Res.* 2005. V. 39. P. 3727–3737.
- 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 // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 1297694.
- Petriglieri F., Singleton C., Peces M., Petersen J.F., Nierychlo M., Nielsen P.H. “*Candidatus* Dechloromonas phosphorotropha” and “*Ca. D. phosphorivorans*”, novel polyphosphate accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems // *ISME J.* 2021. V. 15. P. 3605–3614.
- Pijuan M., Saunders A., Guisasola A., Baeza J., Casas C., Blackall L. Enhanced biological phosphorus removal in a sequencing batch reactor using propionate as the sole carbon source // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. V. 5. P. 56–67.
- Ren T., Chi Y., Wang Y., Shi X., Jin X., Jin P. Diversified metabolism makes novel *Thauera* strain highly competitive in low carbon wastewater treatment // *Water. Res.* 2021. V. 206. Art. 117742.

- Schuler A.J., Jenkins D. Effects of pH on enhanced biological phosphorus removal metabolisms // Water Sci. Technol. 2002. V. 46. P. 171–178.
- Serafim L.S., Lemos P.C., Reis M.A.M. Effect of pH control on EBPR stability and efficiency // Water Sci. Technol. 2002. V. 46. P. 179–184.
- Serralia J., Ferrer J., Borrás L., Seco A. Effect of pH on biological phosphorus uptake // Biotechnol. Bioeng. 2006. V. 95. P. 875–882.
- Tu Y., Schuler A.J. Low acetate concentrations favor polyphosphate-accumulating organisms over glycogen-accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal from wastewater // Environ. Sci. Technol. 2013. V. 47. P. 3816–3824.
- Wang Q., He J. Complete nitrogen removal via simultaneous nitrification and denitrification by a novel phosphate accumulating *Thauera* sp. strain SND5 // Water Res. 2020. V. 185. Art. 116300.
- Jeon C.O., Lee D.S., Lee M.W., Park J.M. Enhanced biological phosphorus removal in an anaerobic–aerobic sequencing batch reactor: effect of pH // Water Environ. Res. 2001. V. 73. P. 301–306.
- Zhang T., Liu Y., Fang H. Effect of pH change on the performance and microbial community of enhanced biological phosphate removal process // Biotechnol. Bioeng. 2005. V. 92. P. 173–182.
- Zhang C., Chen Y., Liu Y. The long-term effect of initial pH control on the enrichment culture of phosphorus- and glycogen-accumulating organisms with a mixture of propionic and acetic acids as carbon sources // Chemosphere. 2007. V. 69. P. 1713–1721.
- Zhao W., Bi X., Peng Y., Bai M. Research advances of the phosphorus-accumulating organisms of *Candidatus Accumulibacter*, *Dechloromonas* and *Tetrasphaera*: metabolic mechanisms, applications and influencing factors // Chemosphere. 2022. V. 307. Art. 135675.

SHORT COMMUNICATIONS

Influence of pH Shift on the Community Enriched in Phosphate-Accumulating Microorganisms in a Sequential-Periodic Action Bioreactor

A. G. Dorofeev^{1, *}, A. V. Pelevina¹, E. V. Gruzdev², A. V. Mardanov², N. V. Pimenov¹

¹ Winogradsky Institute of Microbiology, FRC Fundamentals of Biotechnology RAS, Moscow, 119071, Russia

² Skryabin Institute of Bioengineering, FRC Fundamentals of Biotechnology RAS, Moscow, 119071, Russia
*e-mail: dorofeevag@mail.ru

Abstract. In a sequentially periodic bioreactor, changes in the structure and properties of a community enriched with phosphate-accumulating microorganisms (PAO) after a shift in pH to more acidic values (pH 6.7–7.1) were traced. The proportion of *Candidatus Accumulibacter* decreased from 43.6 to 13.9%, while the number of potential FAOs belonging to *Dechloromonas* and *Thauera* increased. At the same time, the share of the total amount of FAO changed slightly and amounted to 40–43%. The share of the main competitors of FAO – glycogen-accumulating microorganisms (GAM) during the experiment remained insignificant: *Competibacter* 16S rRNA gene fragments before and after pH changes amounted to 2–4%. A decrease in pH led to a drop in the amount of phosphates released in the anaerobic phase, but the amount of phosphorus in the biomass and its removal remained high – 15–17 and 92–94%, respectively.

Keywords: biological phosphorus removal, phosphate accumulating bacteria (PAB), water treatment, *Ca. Accumulibacter*, *Dechloromonas*, *Thauera*