

На правах рукописи

Бочкова Екатерина Александровна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНОГО АНАММОКС-СООБЩЕСТВА
ЛАБОРАТОРНОГО UP-FLOW РЕАКТОРА**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского.

Научный руководитель: **Ножевникова Алла Николаевна,**
доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии имени С. Н. Виноградского

Официальные оппоненты: **Котова Ирина Борисовна,**
доктор биологических наук, профессор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования (ФГБОУ ВО) «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Щербакова Виктория Артуровна,
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения науки (ФГБУН) «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина» РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования (ФГБОУ ВПО) «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

Защита состоится 14 марта 2017 г. в 15.30 ч. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп. 12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел. 8 (495) 939-54-83, e-mail: npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Анаммокс-бактерии – хемолитоавтотрофные микроорганизмы, осуществляющие процесс анаэробного окисления аммония нитритом с образованием молекулярного азота. С момента открытия анаммокс-бактерий процесс анаммокс привлёк большое внимание микробиологов и биотехнологов. В настоящее время процесс широко используется во всём мире для биологической очистки стоков, богатых азотсодержащими и бедных органическими загрязняющими веществами.

Для повышения эффективности существующих и создания новых систем очистки сточных вод важны комплексные фундаментальные исследования процесса анаммокс и анаммокс-бактерий, обнаружение новых видов анаммокс-бактерий, активных в широком диапазоне концентраций азотных субстратов и других условий среды, способных очищать стоки разного происхождения, с различной концентрацией азотсодержащих загрязняющих веществ и при меняющихся абиотических условиях. Процесс анаммокс во всём мире находит наибольшее применение для очистки стоков с высокой концентрацией азота и низким содержанием органических веществ, в частности, иловых вод метантенков, стоков предприятий, выпускающих минеральные удобрения, стоков птицефабрик, и др. (Van Hulle et al., 2010; Ножевникова и др., 2011; Lackner et al., 2014). Кроме того, разработаны эффективные технологические схемы, предполагающие использование поступающих на очистку вод для получения энергии с помощью микробных топливных элементов. Процесс анаммокс в таких схемах используется для эффективной доочистки стоков от азотсодержащих веществ, находящихся в них в низкой концентрации (Kuenen et al., 2011; Wu et al., 2015).

В естественных природных и антропогенных местах обитания все анаммокс-бактерии функционируют в составе сообществ. Такие сообщества могут состоять из сотен и даже тысяч видов микроорганизмов, связанных между собой взаимоотношениями на основе протокооперации или конкуренции, которые чрезвычайно важны для эффективности функционирования сообщества, для поддержания его стабильности в течение длительного времени на фоне меняющихся условий среды (Guo et al., 2016; Speth et al., 2016).

Анаммокс-бактерии имеют ярко выраженную тенденцию к прикреплённому росту и формированию биоплёнок. Эти биоплёнки являются мультивидовыми и включают, помимо анаммокс-бактерий, разнообразных микроорганизмов-спутников. Слабо исследованными остаются такие аспекты, как микробный состав,

структура и динамика формирования мультивидовых микробных биоплёнок. Изучение их представляет как фундаментальный, так и практический интерес, поскольку на использовании мультивидовых биоплёнок анаммокс-бактерий основаны эффективные методы биологической очистки сточных вод (Tsushima et al., 2007; Persson et al., 2013).

Сообщество анаммокс-бактерий и микробных спутников, ставшее объектом исследования в настоящей работе, получено в результате длительного культивирования на минеральной среде в вертикальном проточном лабораторном биореакторе с подачей среды снизу (up-flow). Реактор был инокулирован активным илом из реактора-денитрификатора станции очистки сточных вод в долине р. Мзымта (Сочи), где процесс анаммокс впервые в мире был применен для глубокой очистки от азота низко-концентрированных хозяйственно-бытовых сточных вод. Биотехнология и станции комплексной очистки стоков (КОС) были разработаны Компанией «ЭКОС» и ИНМИ РАН специально для поселков строителей объектов зимней олимпиады Сочи-2014. К моменту начала настоящей работы лабораторный реактор функционировал при нагрузке 0,25 г N/л сут. Особенность работы реактора заключается в том, что свежая среда поступает в реактор не постоянно, а циклами по 6-8 минут каждые полтора часа. Таким образом, в реакторе формируются стратифицированные условия, при которых в нижней части реактора, выше концентрация субстратов и ниже рН, что доказывают многолетние измерения. Не все виды микроорганизмов, могут с одинаковой эффективностью функционировать в столь различающихся условиях. Это позволило предположить возможность сосуществования в верхней и нижней частях биореактора, разных видов или штаммов анаммокс-бактерий, адаптированных к различным уровням содержания нитрита и аммония и активных при разных значениях рН, или развития анаммокс-бактерии, способной расти в достаточно широком диапазоне концентраций субстратов и кислотной реакции среды.

Цель работы – охарактеризовать сообщество анаммокс-бактерий и их спутников, сформировавшееся в лабораторном проточном вертикальном up-flow биореакторе со стратифицированными условиями, при увеличении концентрации азотных субстратов, используя комплекс микробиологических, биотехнологических и молекулярно-генетических методов; идентифицировать ведущую форму анаммокс-бактерий, а также исследовать возможность применения отселекционированного анаммокс-сообщества для очистки стоков с высоким содержанием азотных загрязнений.

Задачи:

1. Идентифицировать и описать ведущую форму анаммокс-бактерий микробного сообщества биореактора, функционировавшего в течение длительного времени (более 5 лет) на минеральной среде в условиях повышающейся нагрузки по азотсодержащим субстратам (аммонию и нитриту).
2. Определить состав сообщества микроорганизмов-спутников анаммокс-бактерий и определить их возможные функции в микробном сообществе биореактора.
3. Описать строение, структуру и динамику формирования биоплёнок микробным сообществом биореактора.
4. Определить эффективность использования сообщества анаммокс-бактерий для очистки модельной и реальной иловой воды в лабораторной установке, включающей аэробные реакторы частичной нитрификации и анаэробный анаммокс-реактор.

Научная новизна.

Проведён длительный (более 5 лет) эксперимент по культивированию микробного сообщества анаммокс-бактерий и их спутников в проточном лабораторном up-flow анаэробном биореакторе при повышении нагрузки по субстратам (аммонию и нитриту). Получено сообщество, представленное, в основном, анаммокс-бактериями, с высокой эффективностью осуществляющее процесс анаэробного окисления аммония нитритом и стабильно функционирующее в условиях постепенного повышения концентрации основных субстратов в течение длительного времени. Проведён мониторинг динамики состава сообщества анаммокс-бактерий, исследовано, как он менялся во времени. К 5 году в реакторе получена монокультура анаммокс-бактерии *Candidatus 'Jettenia asiatica'* флотипесоси, которая по визуальной оценке различными микроскопическими методами составляла более 80% биомассы реактора. Исследована морфология и ультраструктура клеток анаммокс-бактерий биореактора, а также определён липидный состав мембран и время удвоения в проточных условиях. Показано, что монокультура активна в широком диапазоне концентраций субстратов и pH. Проведено описание морфологии, ультраструктуры клеток анаммокс-бактерий этого флотипа, липидного состава их мембран, определение скорости роста, филогении. Впервые исследована динамика формирования биоплёнок de novo сообществом анаммокс-бактерий и их спутников в условиях проточного анаэробного биореактора

с использованием авторской модификации метода «стёкол обрастания». Выяснено, что анаммокс-бактерии вместе с другими микроорганизмами активно вовлечены в формирование биоплёнок уже на ранних этапах. Биоплёнки, сформированные сообществом в проточных условиях, изучали с применением комплексного подхода, включающего современные культуральные, аналитические, микроскопические и молекулярно-биологические методы, что позволило получить достаточно полную картину развития, строения и структуры биоплёнок.

Получены важные сведения, касающиеся состава микроорганизмов-спутников, сосуществующих с анаммокс-бактериями в биореакторе, их морфологии и ультраструктуры. Выяснено, что спутники принадлежат к филумам Proteobacteria, Chloroflexi, Chlorobi и другим

Теоретическая и практическая значимость.

В ходе проведения работы получены ценные теоретические данные о филогенетическом составе микробного сообщества биореактора, структуре и динамике формирования биоплёнок анаммокс-бактериями и их спутниками в проточных условиях. Показано, что сообщество анаммокс-бактерий и их спутников может стабильно функционировать в течение длительного времени в стратифицированных условиях, с высокой эффективностью удаляя азотсодержащие загрязняющие вещества как в высокой (до 8,5 г N/л), так и в низкой (до 0,1 г N/л) концентрации, что существенно для очистки реальных стоков различного состава, в частности, хозяйственно-бытовых и городских сточных вод, а также концентрированных стоков, в частности, иловых вод метантенков. Эти сведения станут основой новых рекомендаций, которые позволят усовершенствовать уже имеющиеся и разработать новые эффективные системы очистки стоков с различной концентрацией азотсодержащих загрязняющих веществ, основанных на применении биоплёнок анаммокс-бактерий. Продемонстрировано, что микробное сообщество, накопленное в биореакторе, может быть успешно использовано для запуска нового лабораторного реактора, являющегося частью системы реакторов с частичной нитрификацией-анаммокс для очистки иловой воды.

Личный вклад соискателя. Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: разработке и апробации экспериментальных методов, проведении экспериментов, обработке и обобщении полученных результатов, написании статей и тезисов конференций.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту.

1. В ходе длительного культивирования в анаэробном проточном лабораторном биореакторе со стратификацией условий получено микробное сообщество с доминирующим флототипом анаммокс-бактерий - *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*, активным в широком диапазоне концентраций субстратов и pH.

2. Помимо анаммокс-бактерий, в состав сообщества входит большое количество микроорганизмов спутников, относящихся к различным филогенетическим и физиологическим группам: нитрифицирующие, денитрифицирующие микроорганизмы, нитчатые бактерии филума Chloroflexi и др.

3. Анаммокс-бактерии имеют тенденцию к прикрепленному росту. В условиях биореактора сообщество формирует 2 типа биоплёнок (в виде гранул и тонких слоев), которые имеют сходный филогенетический состав и структуру. Анаммокс-бактерии, наряду с нитчатыми формами, участвуют в формировании тонкослойных биоплёнок *de novo* уже на ранних этапах.

4. Гранулы анаммокс-бактерий сформированные в лабораторном биореакторе, использованы в качестве инокулята для запуска нового анаммокс-реактора являющегося частью лабораторной установки для очистки иловой воды с эффективным удалением азота, включающей также реактор частичной нитрификации.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были изложены на Международной молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», 29-31 октября 2012 г., 27-30 октября 2015 г. и 1-2 ноября 2016 г. (г. Москва, Россия); Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 19-22 марта 2013 г. и 17-20 марта 2015 г. (г. Москва, Россия); Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», 8-13 апреля 2013 г. и 13-17 апреля 2015 г. (г. Москва, Россия); Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни», 18-20 марта 2014 г. (г. Москва, Россия); Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвящённой 55-летию Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и 80-летию со дня рождения акад. Ю.А. Овчинникова, 15-19 сентября 2014 г. (г. Москва, Россия); XXVII Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 9-12 февраля 2015 г. (г. Москва, Россия); 19-й

Международной пушинской молодёжной школе-конференции молодых учёных «Биология — наука XXI века», 20-24 апреля 2015 г. (г. Пушино, Россия); Международном конгрессе 6th Congress of European Microbiologists FEMS, 7-11 июня 2015 г., (г. Маастрихт, Нидерланды).

Публикации. По теме работы опубликовано 17 печатных работ, в том числе, 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 1 статья в зарубежном журнале, цитируемом в Scopus, 1 патент, 12 тезисов докладов.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, обсуждение результатов, выводы, и список литературы, включающий 252 наименования, в том числе, 8 на русском и 244 на английском языке. Работа изложена на 182 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц и 40 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – микробное анаммокс-сообщество, сформированное в ходе длительного (более 5 лет) культивирования в проточных условиях на минеральной среде в биореакторе.

Культивирование анаммокс-сообщества и получение (автоселекцию) монокультуры *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi* осуществляли при температуре 29-30° С в проточном лабораторном анаэробном вертикальном биореакторе из стеклопластика с рабочим объёмом 0,8 л, с подачей среды снизу, на минеральной среде в условиях повышающейся нагрузки по субстратам. Для защиты от света реактор закрыт фольгой и помещён в тёмную комнату. С целью иммобилизации микробной биомассы в биореакторе использован полимерный носитель «ерш».

Состав среды для культивирования анаммокс-бактерий (в г/л): NaHCO_3 – от 0,9 до 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,12; $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,18; KH_2PO_4 – 0,027; 1 мл/л раствора микроэлементов (г/л): ЭДТА – 1,5; H_3BO_3 – 0,004; $\text{CoCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,078; ZnSO_4 – 0,128; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,324; CuCl_2 – 0,051; Na_2MoO_4 – 0,009; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,057; Na_2SeO_3 – 0,034. В качестве субстратов для анаммокс-процесса в среду добавляли хлористый аммоний и нитрит натрия в соотношении 1:1,23 в возрастающей концентрации от 0,12 до 8,5 г общего N/л. Исходный pH среды 7,3 – 7,8.

Для кратковременных экспериментов использовали метод периодического культивирования в анаэробных условиях в стеклянных флаконах на этой среде с необходимой концентрацией азотных субстратов.

Динамику формирования биоплёнок изучали методом стёкол обрастания в авторской модификации в условиях проточного культивирования, с последующим окрашиванием образцов дифференциальными красителями (нефлуоресцентными — кристалвиолет, диметилметиленовый синий; флуоресцентными — DAPI, набором реагентов для выявления живых и мёртвых клеток Live/dead) и их визуализацией в микроскопе Zeiss Lab.A1 (Германия), с цифровой камерой AxioCamHR.

Морфологию микробной биомассы из анаммокс-реактора исследовали на микроскопе Zeiss Lab.A1 (Германия).

Концентрацию ионов аммония, нитрита и нитрата в среде определяли фотоколориметрически на спектрофотометре Nach Lange DR 5000 (Германия) по стандартным методикам производителя, записанным в памяти прибора, с использованием коммерческих наборов реагентов Nach Lange для определения соответствующих ионов (аммоний — с использованием реактива Несслера, нитрит — с сульфатом железа, нитрат — восстановлением кадмия). Значение pH измеряли с помощью pH-метра HANNA pH-211 (Германия).

Вес сухой биомассы измеряли гравиметрически после высушивания при 105°C в течение 24 ч.

Состав газовой фазы определяли на газо-жидкостном хроматографе Кристалл 5000.2 (ЗАО ХРОМАТЕК, г. Йошкар-Ола).

Липидный состав мембран клеток исследовали методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе Trace GC Ultra DSQ II (Thermo Scientific) (Hopmans et al., 2006). Калибровку проводили по стандартным смесям жирных кислот (Supelco), идентификацию соединений — по базе данных NIST MS Search 3.0.

Флуоресцентную гибридизацию in situ (FISH) фиксированных образцов биомассы, а также стёкол обрастания с флуоресцентными олигонуклеотидными зондами, мечеными цианином 3(Cy3) проводили по стандартной методике (Amann et al., 1990) с последующим просмотром препаратов в эпифлуоресцентном микроскопе Zeiss Lab.A1 с цифровой камерой AxioCamHR с светофильтром Zeiss 20 для Cy3-меченых зондов. Использовали зонды разной специфичности: домен-, филум-, род-, и видоспецифичные.

Микрорельеф поверхности биоплёнок исследовали методом атомно-силовой микроскопии с использованием комплекса NTEGRA SPECTRA (NT-MDT, MDT) и программы NOVA (NT-MDT). Обработку АСМ-изображений проводили с использованием программы SPIP 6.0 (Image Metrology A/S, “Horsholm”, Дания) (Zhurina et al., 2013).

Ультраструктуру клеток микроорганизмов изучали с помощью электронного трансмиссионного микроскопа «JEOL» (Япония) марки JEM 100С.

Строение ультратонких срезов сферических биоплёнок-гранул, полученных с помощью крио-ультрамикротомы Leica CM1850UV-Cryostat (Германия), изучали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии на прямом микроскопе Nikon A1 (Япония) с использованием цифровой цветной камеры Nikon DS-Fi1c. Визуализацию и обработку полученных изображений осуществляли с помощью стандартного программного обеспечения NIS-Elements ver. 4.20.

Выделение ДНК из образцов биомассы производили по ранее описанному методу, с использованием Wizard-технологии фирмы Promega (США) (Birnboim and Doly, 1979; Zhou et al., 1996; Krsek and Wellington, 1999). Для амплификации нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК использовали универсальные бактериальные 11F-1492R (Lane, 1991) и планктомицет-специфичные Pla 46F-1385R (Schmid et al., 2000) пары праймеров. Клоны *E.coli* были трансформированы плазмидой pGEM-T с интегрированными ПЦР-фрагментами. Выделение ДНК из клонов осуществляли тем же методом, что и выделение ДНК из образцов.

Секвенирование осуществляли по Сэнгеру (Sanger et al., 1977) с использованием Big Dye Terminator v. 3.1 kit (Applied Biosystems, Inc., United States) на секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., United States). Полученные последовательности проверяли на отсутствие химерных с помощью сервиса Find Chimeras, редактировали и выравнивали с помощью редактора BioEdit, сравнивали с последовательностями базы данных GenBank с помощью программы NCBI Blast. Сиквенсы с уровнем сходства 97% и выше объединяли между собой в группы. Для построения филогенетических деревьев использовали программу MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Получение и описание монокультуры анаммокс-бактерий *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*

1.1. Получение анаммокс-сообщества, активного в широком диапазоне концентраций и рН, в результате длительного культивирования в проточном реакторе

Эксперимент по получению анаммокс-сообщества, продолжался в течение 5 лет. В лабораторном биореакторе были созданы элективные условия для развития анаммокс-бактерий: анаэробные условия; минеральная среда, высокая концентрация азотных субстратов, аммония и нитрита в соотношении 1:1,23. Концентрацию субстратов в среде постепенно увеличивали, когда эффективность их удаления превышала 85%. Максимальная нагрузка по азотным субстратам составила 8,5 г общего N/л в сутки, а эффективность удаления - 96% (Рис.1).

Особенность работы реактора состоит в том, что свежая среда поступает в реактор циклами, что создаёт стратифицированные условия для существования микроорганизмов. В табл. 1 приведены средние значения рН и концентраций субстратов в пробах из верхней и нижней частей реактора в период с 1910 по 2065 сутки. В нижней части реактора удаляется значительная часть азотных субстратов из среды, однако их эффективное удаление осуществляется и в верхней части реактора. Значения рН между верхней и нижней частями реактора также значительно различаются. Это позволило предположить возможность сосуществования в реакторе 2-х разных видов анаммокс-бактерий с различными потребностями в концентрациях субстратов и рН, или одного организма, способного расти в широком спектре концентрации субстратов и рН.

Таблица. 1. Сравнение условий в верхней и нижней частях реактора к 5 году культивирования

	Нижняя часть реактора	Верхняя часть реактора
рН	7,2	8,3
N-NH ₄ ⁺ /л	400	45
N-NO ₂ ⁻ /л	400	15

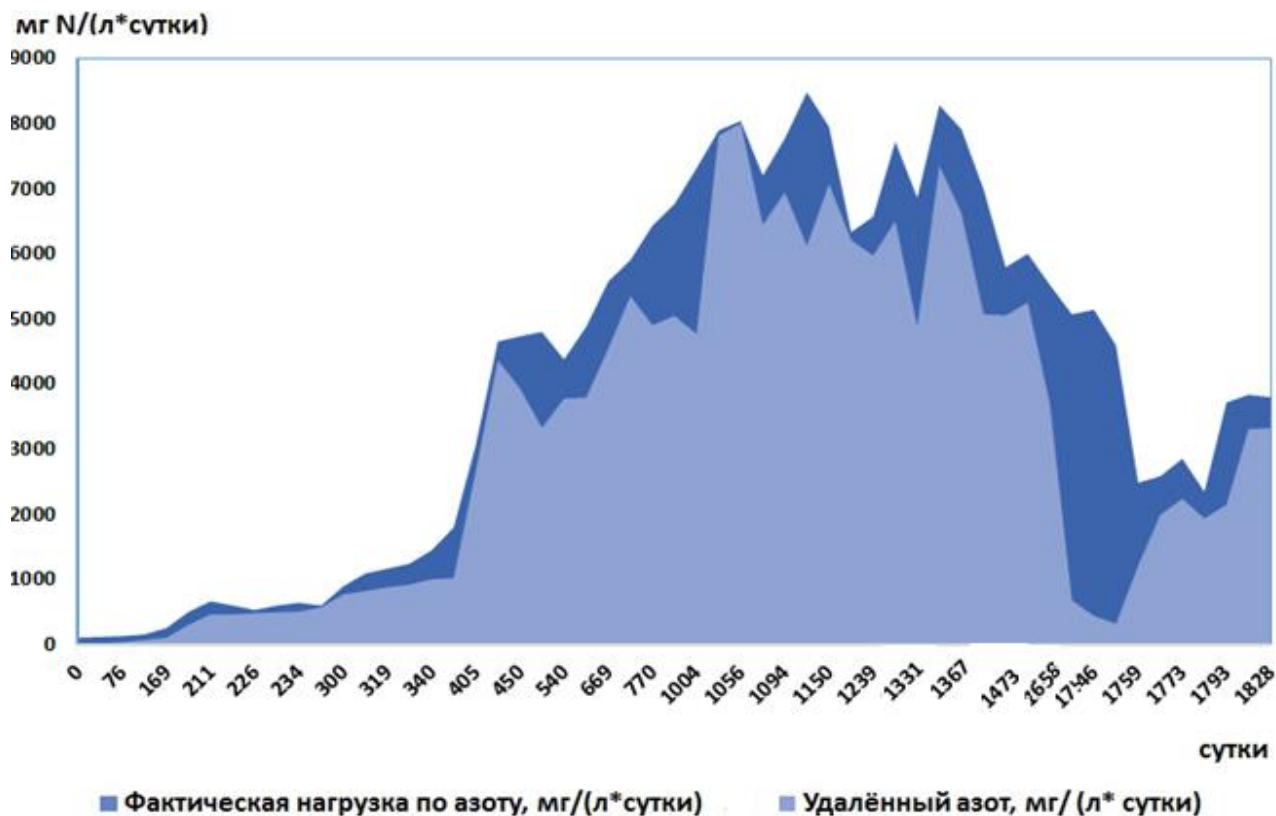


Рис. 1. Изменение нагрузки по азоту (аммоний+нитрит) и его удаление анаммокс-бактериями биореактора в период с 1 по 1828 сутки.

1.2 Изменение состава анаммокс-сообщества биореактора в ходе длительного культивирования

Исследование состава микробного сообщества реактора методом секвенирования гена 16S рРНК проводили трижды: во 2-й, 4-й и 5-й годы с момента запуска реактора. К моменту проведения первого исследования, в реакторе уже было накоплено значительное количество биомассы, иммобилизованной на волокнах ершей-носителей. Биомасса имела типичную для анаммокс-бактерий кирпично-красную окраску. Сообщество анаммокс-бактерий включало 3 фило типа. Доминирующий фило тип имел 98% сходство с известным видом анаммокс-бактерий *Candidatus* 'Jettenia asiatica' и был описан как фило тип *Candidatus* 'Jettenia asiatica' *ecosi* (номер в базе данных GENBANK KU847471). Он был обнаружен как в сообществе нижней, так и верхней части реактора. Два минорных фило типа имели по 96% сходства с *Candidatus* 'Brocadia fulgida' (KR003825) и *Candidatus* 'Brocadia caroliniensis' (KR003826) соответственно (Рис. 2). Оба минорных фило типа присутствовали только в сообществе нижней части реактора и, вероятно, представляли новые виды анаммокс-бактерий.

К 4-му году с момента начала культивирования наблюдалась очень высокая

концентрация биомассы не только на волокнах ершей-носителей, но и в осадке на дне и на стенках биореактора. Доминирующим филоотипом в нижней части реактора оставался *Candidatus* 'Jettenia asiatica' *ecos*i. В верхней части реактора это был единственный филоотип анаммокс-бактерий. В сообществе нижней части реактора кроме него присутствовал филоотип с 96% сходством с *Candidatus* 'Brocadia fulgida'.

К 5-му году культивирования биомасса состояла преимущественно (не менее чем на 80%) из клеток с типичной для анаммокс-бактерий морфологией и ультраструктурой. Клетки гибридизовались со специфичными олигонуклеотидными зондами на анаммокс-бактерий (amx368). В нижней части биореактора наблюдалось формирование более крупных агрегатов диаметром до 13 мм с кирпично-красной окраской, а также формирование значительных пристеночных обрастаний.

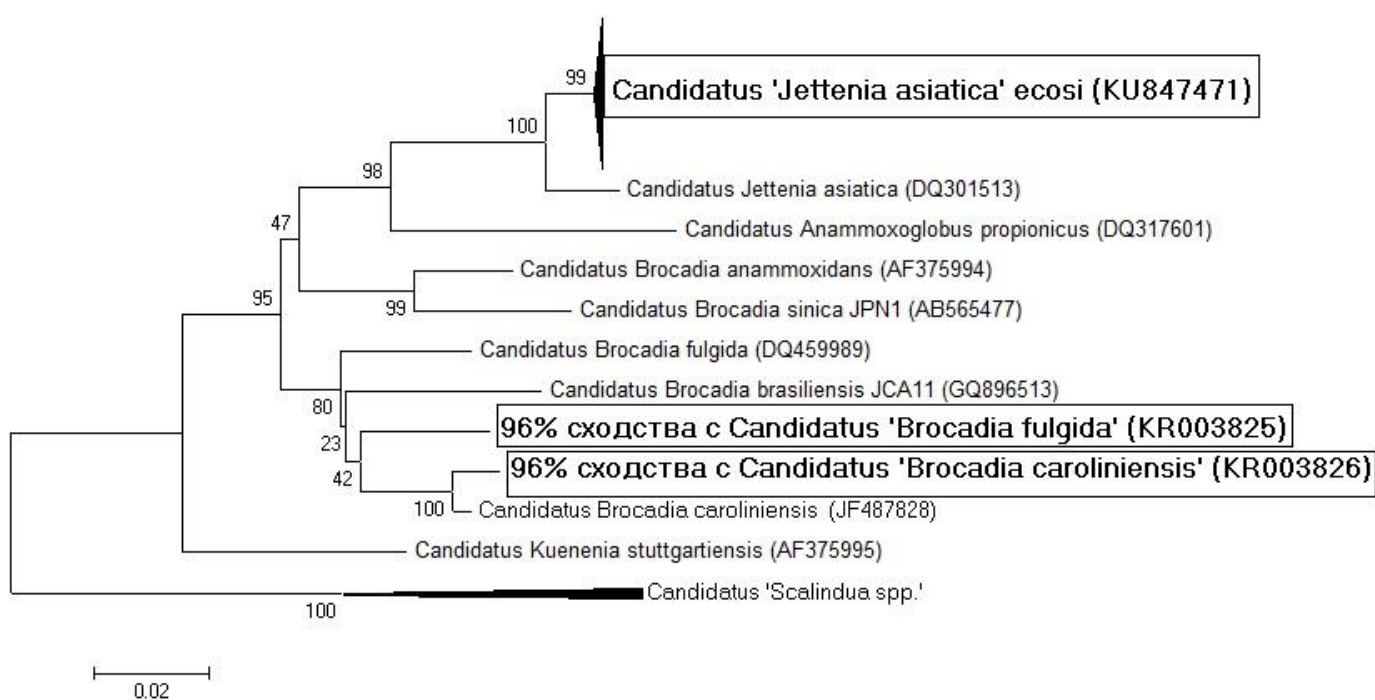


Рис. 2 Филогенетическое дерево отражающее положение анаммокс-бактерий биореактора (взяты в рамку) относительно известных видов анаммокс-бактерий. (середина второго года культивирования).

Ни одна из минорных групп планктомицетов не обнаруживалась в составе сообщества – присутствовали только *Candidatus* 'Jettenia asiatica' *ecos*i. Таким образом, в ходе длительного культивирования в условиях селективности в проточном биореакторе была получена монокультура анаммокс-бактерий *Candidatus* 'Jettenia asiatica' *ecos*i, растущих в широком диапазоне концентраций субстратов и остающаяся стабильным компонентом сообщества в течение длительного времени.

1.3. Описание нового филоטיפа анаммокс-бактерии *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*

Монокультура анаммокс-бактерий *Candidatus 'Jettenia asiatica'*, филотип *ecosi* была получена в ходе длительного культивирования в элективных условиях в проточном биореакторе. Особенностью монокультуры является активность в широком диапазоне концентраций азотных субстратов ($N-NH_4^+/N-NO_2^-$) от 10 мг/л каждый в верхней части реактора до 400 мг/л каждый в нижней части реактора. Также монокультура активна в широком диапазоне значений pH: от 7,3 до 8,8. В экспериментах по периодическому культивированию биомассы из верхней и нижней частей реактора, обогащённой клетками *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*, в условиях нагрузки по субстратам 200, 400 и 700 мг N/л наибольшая активность проявлялась при 0,4 г N/л: средняя скорость потребления нитрита составила 2,4 мг $N-NO_2^-$ /л/сут, аммония 1,9 мг $N-NH_4^+$ /л/сут.

Также, в экспериментах по периодическому культивированию в течение 24 ч исследовали эффективность удаления субстратов анаммокс-бактериями из верхней и нижней частей реактора. Выяснилось, что как при низкой (0,1 г N/л), так и при высокой (1 г N/л) концентрации азотных субстратов эффективность очистки различалась незначительно (Табл. 2), что свидетельствует о том, что анаммокс бактерии из нижней и верхней частей реактора достаточно эффективно функционируют при различных нагрузках.

При проточном культивировании время удвоения анаммокс-бактерий составило 13 дней, что сравнимо с данными по времени удвоения других анаммокс-бактерий, которое составляет от 11 до 30 дней (Strous et al., 1998; Hu et al., 2011).

Таблица 2. Эффективность удаления субстратов биомассой верхней и нижней частей реактора при периодическом культивировании в течение 24 ч.

	Средняя эффективность удаления субстратов при концентрации 0,1 г N/л	Средняя эффективность удаления субстратов при концентрации 1 г N/л
Биомасса из нижней части реактора	47%	62%
Биомасса из верхней части реактора	52%	55%

Фракция ладдеран-содержащих соединений, являющихся уникальным компонентом клеточных мембран, присущих только анаммокс-бактериям, составляла 19,3% от общей липидной фракции образцов. В числе выявленных жирных кислот C18-[3]-, C18-[5]-, C20-[3]-, C20-[5]-ладдерановые кислоты. Их состав идентичен как в пробах из верхней, так и из нижней части реактора. Подобный жирнокислотный состав описан для сообщества, включавшего *Ca. Jettenia* и *Ca. Brocadia*, исходно полученного из заболоченной почвы и накопленного в лабораторном SBR-реакторе (Hu et al., 2011). Также в мембранах у анаммокс-бактерий были обнаружены гопаноиды (Sinninghe Damste et al., 2004). В исследованных образцах биомассы из нашего реактора они составляют 10,8% от общей фракции липидов.

Морфологически клетки *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi* представляют собой кокки диаметром ок. 1 мкм, растущие в виде микроколоний, погружённых в слой внеклеточного полимерного матрикса. На микрофотографиях ультратонких срезов выявляется типичная для клеток анаммокс-бактерий ультраструктура: большую часть объёма клетки (более 80%) занимает анаммоксосома, ограниченная мембраной, а также имеются ещё 2 клеточных компартмента, рибоплазма и парифоплазма (Рис. 3).

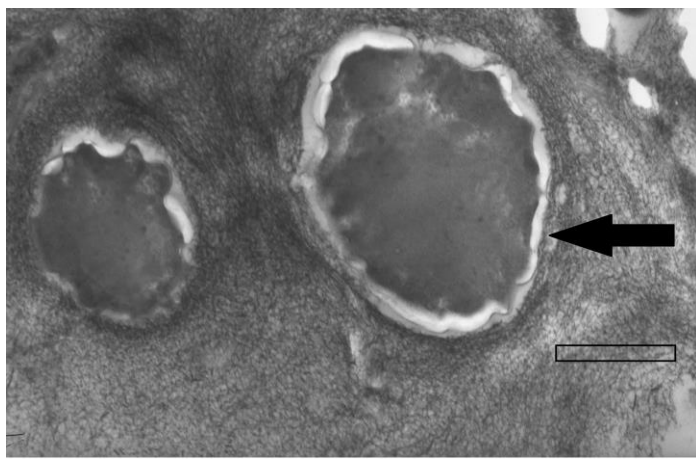


Рис. 3. Микрофотография клеток анаммокс-бактерий (указано стрелкой). Электронная микроскопия. Масштаб 0,5 мкм

2. Разнообразие микроорганизмов, сопутствующих анаммокс-бактериям в сообществе биореактора.

Помимо анаммокс-бактерий, сообщество биореактора включает большое количество представителей других групп микроорганизмов, что подтверждается данными микроскопии и молекулярно-генетических анализов. По всей видимости, между анаммокс-бактериями и другими микроорганизмами существуют тесные симбиотические взаимоотношения, поскольку даже к концу 5-го года культивирования при элективности по отношению к анаммокс-бактериям (в

условиях, способствующих накоплению анаммокс-бактерий и препятствующих росту других групп микроорганизмов) сообщество биореактора включало представителей 12 фило типов, относящихся к 8 филумам (Рис. 4). Такая картина типична для микробиоты полномасштабных, пилотных и лабораторных анаэробных анаммокс-реакторов, работающих на смеси аммония и нитрита. Три четверти из обнаруженных в исследуемом сообществе микробных фило типов находятся в весьма отдалённом родстве (сходство менее 85%) с известными бактериальными видами. Сложно установить, какие процессы осуществляют представители этих групп микроорганизмов-спутников какую роль в микробном сообществе они играют. По всей видимости, большинство из них являются гетеротрофами, использующими органические вещества отмерших клеток или вещества внеклеточного полимерного матрикса анаммокс-бактерий.

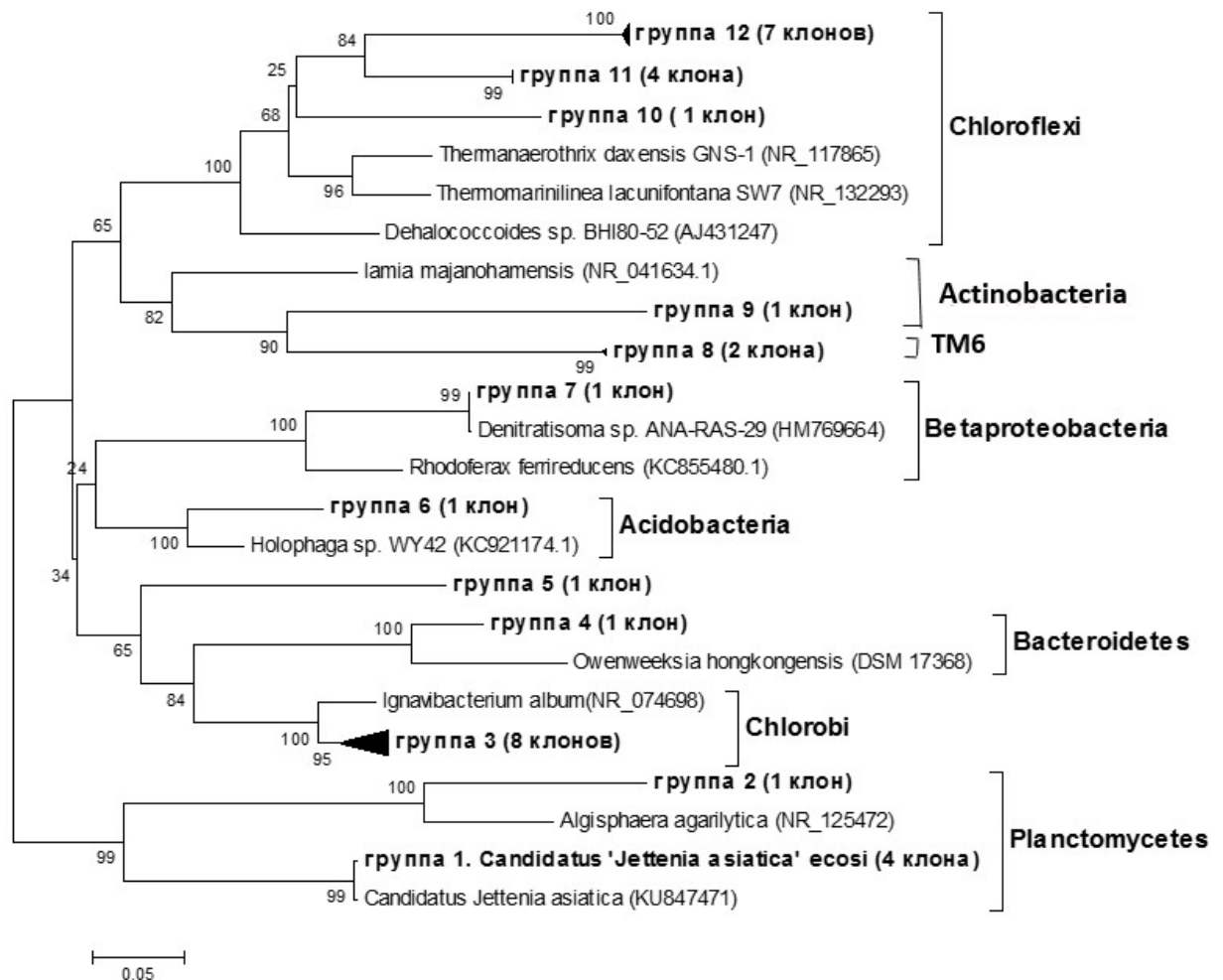


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное по результатам секвенирования с универсальными бактериальными праймерами 11F-1100R к началу 5-го года культивирования. Группы клонов, полученных в данном исследовании, выделены жирным шрифтом.

При исследовании образцов биомассы как из верхней, так и из нижней части реактора на всех этапах его работы регистрировалось присутствие в биоплёнках значительного количества микроорганизмов трихомной морфологии по периферии микроколоний анаммокс-бактерий. По численности они занимают 2-е место после коккоидных клеток анаммокс-бактерий. Все нитчатые формы локализируются близ слоя внеклеточного матрикса, могут прорасти отдельные колонии насквозь, что наглядно видно на электронных микрофотографиях.

Подобная картина сосуществования анаммокс-бактерий и бактерий трихомной морфологии почти всегда наблюдается в микробных сообществах анаммокс-реакторов (Kragelund et al., 2007; Cho et al., 2010; Kindaichi et al., 2012). Выделяются 3 морфотипа нитчатых микроорганизмов в биоплёнках: тонкие нити диаметром ок. 0,5-0,7 мкм, достигающие длины 100-120 мкм; толстые нити диаметром 1-1,2 мкм, длиной в среднем 10-15 мкм; толстые сегментированные нити диаметром 1-1,2 мкм и длиной до 20 мкм, визуальнo напоминающие нитку бус. Все три группы бактерий обнаруживаются как в верхней, так и в нижней частях реактора.

На основании результатов FISH-анализа с зондами, специфичными к представителям филума *Chloroflexi*, представители второго и третьего морфотипа могут быть отнесены к этому филуму (Рис. 5 А-Г). В то же время, микроорганизмы первого, наиболее многочисленного морфотипа, не гибридизовались ни с одним из зондов, специфичных к *Chloroflexi*, однако гибридизовались с универсальным бактериальным зондом, что доказывает бактериальную природу этих нитей, однако говорит о том, что они, вероятно, не относятся к филуму *Chloroflexi*.

В сообществе присутствуют также микроорганизмы, которые, как и анаммокс-бактерии, участвуют в процессах цикла азота: денитрификаторы и нитрификаторы. К денитрифицирующим микроорганизмам относятся бактерии рода *Denitratisoma*, обнаруженные в пробах из нижней части реактора. В подобных сообществах популяции анаммокс-бактерий и денитрификаторов находятся в динамическом равновесии: при смене условий в реакторе (попадание значительных порций органических веществ или, наоборот, их потребление) могут превалировать как первые, так и вторые (van Hulle et al., 2010).

По результатам FISH с зондом на *Nitrospira* было обнаружено присутствие небольшого количества этих бактерий в гранулах в сообществе нижней части реактора (Рис. 5 Д-Е). Они образуют скопления немногочисленных клеток. Сосуществование анаммокс-бактерий и *Nitrospira* в условиях микроаэрофильных и

анаэробных реакторов было недавно показано (van Kessel et al., 2015). Возможно, в изучаемом нами сообществе нитроспирры осуществляют не только нитрификацию, но и недавно открытый процесс комаммокс (Daims et al., 2015).

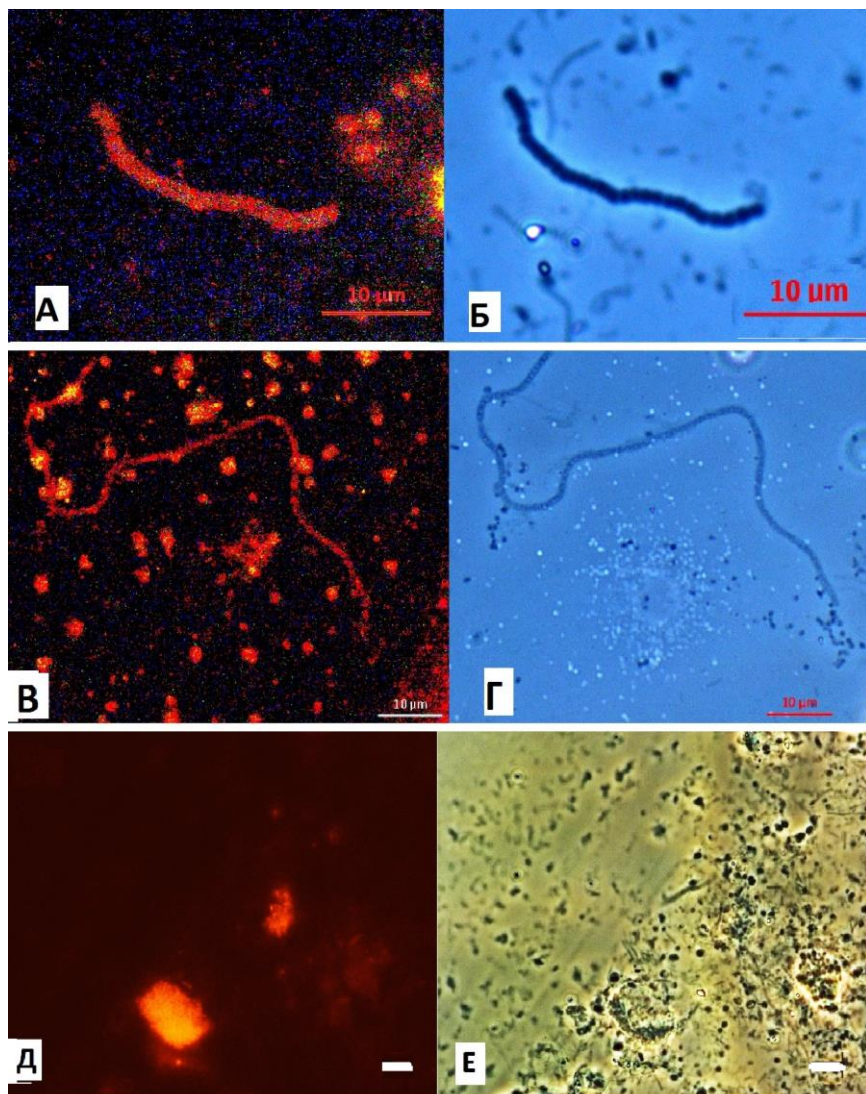


Рис. 5. Гибридизация с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами: А, Б - cfx1223, масштаб 10 мкм; В, Г - gnsb941, масштаб 10 мкм; Д, Е - Ntspa662, масштаб 5 мкм. Слева – гибридизация, справа – фазовый контраст

3. Биоплёнки, сформированные сообществом биореактора в проточных условиях

3.1. Два типа биоплёнок, сформированных в ходе длительного проточного культивирования

В условиях проточного культивирования микробное сообщество анаммокс-реактора формирует 2 типа биоплёнок: в виде гранул и тонкослойных биопленок.

На волокнах носителей-ершей и на дне биореактора образуются сферические биоплёнки-гранулы, диаметром до 8 мм, имеющие ригидную оболочку. При исследовании ультратонких срезов гранул с помощью электронной и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было установлено, что эти биоплёнки состоят

из микробных клеток, погруженных в толстый слой внеклеточного полимерного матрикса, в состав которого входят преимущественно полисахариды и липиды, что было показано благодаря использованию дифференциальных красителей. Микробные клетки в основном представлены большим количеством скоплений микроколоний анаммокс-бактерий. По периферии кластеров встречаются скопления микроорганизмов трихомной морфологии. В некоторых случаях, трихомы прорастают кластеры анаммокс-бактерий насквозь. Часть нитчатых форм принадлежит микроорганизмам филума *Chloroflexi*. По-видимому, нитчатые микробные формы потребляют вещество матрикса или отмершие клетки. Кроме того, они могут выполнять роль каркаса при формировании объёмной структуры биоплёнок (Kindaichi et al., 2012). По периферии матрикса гранул, ближе к поверхности, также выявляются отдельные немногочисленные палочковидные клетки. К 5-му году культивирования в нижней части биореактора наблюдалось объединение отдельных гранул в агрегаты (макроколонии) диаметром до 13 мм.

Биоплёнки второго типа, тонкослойные обрастания с отдельными вкраплениями небольших (до 1 мм в диаметре) гранул, формировались на стенках биореактора, шлангах и на дне и стенках сосуда-коллектора для отработанной среды. Оба типа биоплёнок имели сходную ультраструктуру и филогенетический состав.

3.2. Динамика формирования тонкослойных биоплёнок *de novo* при проточном культивировании

Для изучения особенностей формирования тонкослойных биоплёнок *de novo* был использован модифицированный метод стёкол обрастания. Стерильные стёкла закрепляли в вертикальном положении в верхней части реактора, функционировавшего в обычном режиме. Первые явные признаки формирования биоплёнок *de novo* обнаруживаются на 10-12 сут.

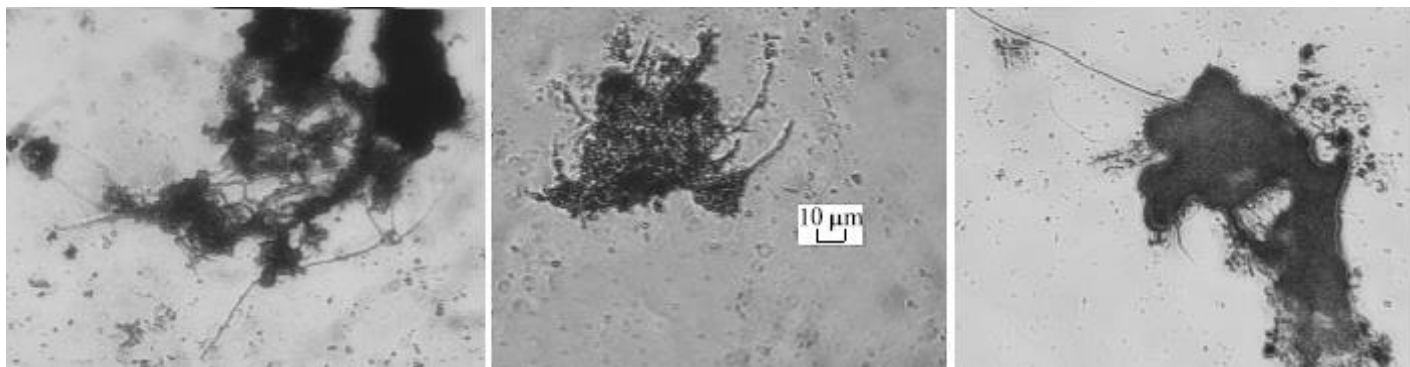


Рис. 6 Тонкослойные биоплёнки, сформированные на стёклах обрастания в проточном реакторе, окрашивание 1,9-диметилметиленовым синим. Слева направо: биоплёнки возрастом 14, 35 и 70 суток.

Процесс происходит при участии как нитчатых форм, так и анаммокс-бактерий, присутствие которых в формирующихся биоплёнках выявляется методом FISH уже на раннем этапе, к 14 суткам. Дальнейший рост биоплёнки обуславливается синтезом и накоплением внеклеточного полимерного матрикса и увеличением количества входящих в состав биоплёнки микробных клеток (Рис. 6). Зрелые биоплёнки возрастом 90 суток состоят преимущественно из живых клеток. По морфологии они неотличимы от клеток из сферических и тонкослойных биоплёнок реактора: кластеры клеток анаммокс-бактерий; трихомы, достигающие значительной протяжённости (до 100 мкм); а также немногочисленные палочковидные клетки. Микрорельеф поверхности таких биоплёнок изучен с помощью атомно-силового микроскопа (Рис. 7). На изображении отчётливо видны скопления коккоидных микроколоний, а также крупные трубчатые структуры, по всей видимости, представляющие собой клетки *Chloroflexi*.

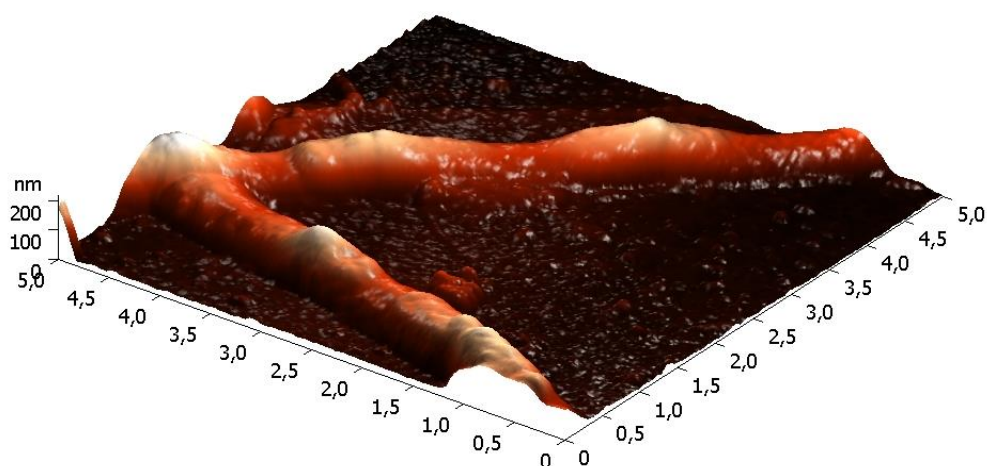


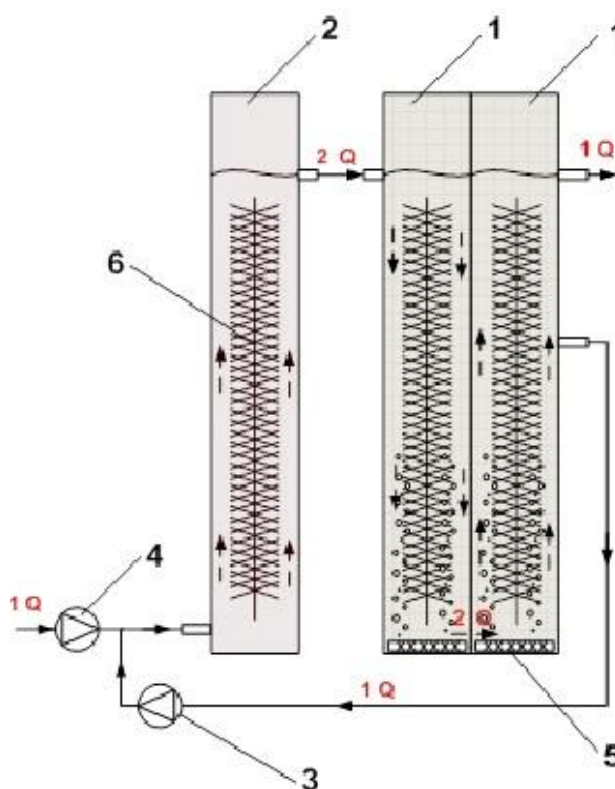
Рис.7.Трёхмерное изображение микрорельефа поверхности тонкослойной биоплёнки возрастом 90 суток.

4. Использование активных гранул для пуска нового лабораторного реактора для очистки иловой воды.

Активные биоплёнки-гранулы были успешно использованы в качестве посевного материала для запуска нового лабораторного анаммокс-реактора, являющегося частью системы из 2-х сопряжённых вертикальных реакторов: в первом осуществляется процесс частичной нитрификации, а во втором — анаммокс (Рис.8). В качестве посевного материала для реактора частичной нитрификации использован активный ил из аэротенка Курьяновских очистных сооружений. После инкубационного периода, составившего около 180 сут, система вышла на стабильный режим работы (эффективность удаления азота 85%) на минеральной среде – модельной иловой воде.

В настоящее время система тестируется для очистки иловой воды, получаемой после обезвоживания сброженной модельной органической фракции ТБО (пищевые отходы и комбикорм). Эффективность удаления аммонийного и общего азота из иловой воды достигала 93% и 84%, соответственно, и в среднем составляла 73 и 57%. По молекулярно-генетическим данным, в составе микробного сообщества реактора с частичной нитрификацией — представители 11 филумов, в том числе нитрифицирующие бактерии филумов *Proteobacteria* и *Nitrospinae*. Филогенетический состав сообщества анаммокс-реактора не претерпел значительных изменений с момента запуска и идентичен таковому анаммокс-реактора, откуда был отобран посевной материал.

Рис.8. Схема потоков очищаемой воды после подсоединения реактора анаммокс к реактору частичной нитрификации: 1 - реакторы частичной нитрификации; 2 - реактор анаммокс; 3 - насос рециркуляции; 4 - насос подачи инфлюента; 5 - распылитель маломощный; 6- ершовая насадка.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день анаммокс-бактерии остаются одной из наиболее интенсивно исследуемых групп микроорганизмов. Столь большой интерес к ним связан, в первую очередь, с широкими возможностями практического применения. В нашей стране процесс анаммокс впервые в мире применен для глубокой очистки от азота низко-концентрированных хозяйственно-бытовых сточных вод в разработанной специально для поселков строителей объектов зимней олимпиады Сочи-2014 технологии и станций комплексной очистки стоков (КОС – БХ-Ерш)

(Ножевникова и др., 2012). Активный ил одной из таких станций был использован в качестве источника анаммокс-сообщества для настоящего исследования. На Курьяновских очистных сооружениях г. Москвы для очистки от азота высококонцентрированных иловых вод метантенков, в которых производят метаногенное сбразивание смеси первичного и вторичного осадков сточных вод, отрабатывается технология с использованием анаммокс-бактерий и нитрификаторов в одном реакторе. Одной из важных задач является усовершенствование уже имеющихся и создание новых систем очистки стоков различного состава и происхождения на основе процесса анаммокс. Для этого необходим поиск новых видов анаммокс-бактерий, способных эффективно функционировать как при низких, так и при высоких концентрациях азотсодержащих веществ, а также при меняющихся абиотических условиях. Результатом нашей работы стало получение монокультуры анаммокс-бактерий *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*, способной эффективно осуществлять процесс анаммокс в широком диапазоне концентраций субстратов и pH и стабильной в течение длительного периода времени. Полученная монокультура перспективна для использования в очистке стоков различного происхождения, в частности, иловой воды. Активные биоплёнки-гранулы из лабораторного биореактора, обогащённые клетками *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*, были успешно использованы в качестве инокулята для запуска нового анаммокс-реактора, ставшего частью системы реакторов частичной нитрификации-анаммокс. Система эффективно удаляет азот из модельной и реальной иловой воды, что создаёт перспективы для внедрения подобных систем в полномасштабных установках.

Несмотря на большое количество исследований во всём мире, посвящённых анаммокс-бактериям, многие особенности этой группы остаются слабо изученными. В частности, почти неисследованным остаётся характер взаимосвязей между анаммокс-бактериями и их спутниками в сообществах ввиду большой сложности и многокомпонентности таких сообществ (Speth et al., 2016). В нашей работе показано присутствие в сообществе, наряду с анаммокс-бактериями, представителей разнообразных физиологических и филогенетических групп микроорганизмов, выполняющих важные функции в сообществе и имеющих большое значение для стабильного и эффективного функционирования сообщества.

Мультивидовые биоплёнки являются одним из самых распространённых типов микробных сообществ в природе (Николаев и Плакунов, 2007). Анаммокс-бактерии также имеют склонность к прикрепленному росту. Биоплёнки анаммокс-бактерий

используются во многих системах очистки сточных вод. Несмотря на это, данные, касающиеся строения и функционирования биоплёнок, крайне скудны. Нами были получены новые данные, касательно структуры и филогенетического состава биоплёнок. Также изучена динамика их формирования, показано, что в анаэробном реакторе анаммокс-бактерии вовлечены в образование биоплёнок *de novo* уже на ранних этапах, в отличие от реакторов с чередованием аэробно-анаэробных фаз работы, где роль «первопроходцев» принадлежит нитрифицирующим бактериям и гетеротрофам, а анаммокс-бактерии заселяют формирующуюся биоплёнку позднее (Almstrand et al., 2014).

ВЫВОДЫ

1. В результате длительного (5 лет) культивирования в лабораторном биореакторе в условиях повышающейся нагрузки по азотсодержащим субстратам получено микробное сообщество, активно осуществляющее процесс анаммокс. Доминирующим видом сообщества является анаммокс-бактерия *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*. Особенностью полученной монокультуры является её активность в широком диапазоне концентраций субстратов (от 0,1 г N_{общ}/л до 8,5 г N_{общ}/л) и pH (от 7 до 8,8).

2. Охарактеризован филогенетический состав микроорганизмов-спутников анаммокс-бактерий. Показано, что даже к 5-му году культивирования в селективных условиях, способствующих накоплению анаммокс-бактерий, состав сообщества микроорганизмов-спутников отличается разнообразием и включает представителей различных физиологических и филогенетических групп, в том числе, денитрифицирующих представителей Proteobacteria, нитрифицирующих *Nitrospira*, гетеротрофных нитчатых Chloroflexi.

3. В проточных условиях при повышающихся нагрузках по аммонии и нитриту сообщество биореактора формирует биоплёнки двух типов: гранулы на ершах и тонкослойные пристеночные плёнки, имеющие сходную структуру и микробный состав.

4. Впервые определены особенности динамики формирования тонкослойных биоплёнок анаммокс-бактерий *de novo* в ходе проточного культивирования в анаэробном реакторе. Начало формирования биоплёнок *de novo* обнаруживается на 10-12 сут, процесс происходит при участии анаммокс-бактерий и нитчатых микробных форм. Дальнейший рост биоплёнок обусловлен увеличением числа входящих в их состав клеток и накоплением внеклеточного полимерного матрикса.

5. В системе последовательно соединённых реакторов частичной нитрификации и анаммокс микробное сообщество удаляет аммонийный азот из модельной иловой воды с высокой эффективностью. Максимальная эффективность удаления аммонийного и общего азота из иловой воды достигала 93% и 84%, соответственно, и в среднем составляла 73% и 57%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Botchkova E.A., Plakunov V.K., Nozhevnikova A.N. Dynamics of biofilm formation on microscopic slides submerged in an anammox bioreactor // *Microbiology*. 2015. V. 84. № 3. P. 456-460. (<http://link.springer.com/article/10.1134%2FS0026261715030029>)
2. Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К. Мультивидовые биоплёнки в экологии, медицине и биотехнологии // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 6. С. 623-644. (<http://elibrary.ru/item.asp?doi=10.7868/S0026365615060117>)

Статьи, опубликованные в других научных изданиях:

1. Ножевникова А.Н., Зубов М.Г., Куликов Н.И., Литти Ю.В., Бочкова Е.А. Процесс анаэробного окисления аммония (анаммокс) и применение анаммокс-бактерий в очистке сточных вод // в кн. «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Сборник научных трудов. Гл. ред. Э.И. Коломиец. Минск, «Беларуская навука». 2013. Т. 5. С. 587-598. (http://mbio.bas-net.by/wp-content/uploads/2011/12/InMi_Proceedings_Vol-5_2013.pdf)
2. Botchkova E.A., Litt Y.V., Kuznetsov B.B., Nozhevnikova A.N. Microbial biofilms formed in a laboratory-scale anammox bioreactor with flexible brush carrier // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2014. V. 5. № 2. P. 76-82. ([http://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=44392](http://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=44392))

Тезисы докладов

1. Бочкова Е.А., Колганова Т.В., Литти Ю. В., Кострикина Н.А., Кузнецов Б.Б., Ножевникова А.Н. Филогенетическая принадлежность анаммокс-бактерий станции очистки сточных вод в долине реки Мзымта (г.Сочи) // Сборник тезисов VIII Международной молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», 29-31 октября 2012 г., Москва. С. 38
2. Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Кострикина Н.А., Кузнецов Б.Б., Ножевникова А. Н. Анаммокс-бактерии станции очистки сточных вод в долине реки Мзымта (Сочи) // Сборник тезисов VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 19-22 марта 2013 г., Москва. С. 318-320.
3. Бочкова Е.А., Литти Ю.В. Характеристика анаммокс-бактерий станции очистки сточных вод в долине реки Мзымта (г. Сочи) // Сборник тезисов XX

Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», 8-13 апреля 2013 г., Москва. С.187.

4. Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. Биоплёнки и состав азотобразующего сообщества анаммокс-бактерий, сформировавшегося при длительном проточном культивировании // Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни», 18-20 марта 2014 г., Москва. С. 421-422.

5. Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. Формирование биоплёнок сообществом анаммокс-бактерий при проточном культивировании в анаэробном биореакторе // Сборник тезисов Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвящённой 55-летию Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и 80-летию со дня рождения акад. Ю.А. Овчинникова, 15-19 сентября 2014 г., Москва. С. 57-58.

6. Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. Динамика формирования биоплёнок анаммокс-бактерий в условиях проточного культивирования в анаэробном лабораторном биореакторе // Сборник тезисов XXVII Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 9-12 февраля 2015 г., Москва. С. 118.

7. Бочкова Е.А., Ножевникова А.Н. Формирование биоплёнок анаммокс-бактерий при культивировании в анаэробном проточном биореакторе // Сборник тезисов VIII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 17-20 марта 2015г., Москва. С. 360-361.

8. Бочкова Е.А. Формирование микробных биоплёнок в проточном анаэробном анаммокс-биореакторе на минеральной среде // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2015», XXII Международной молодёжной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015», 13—17 апреля 2015 г., Москва. (https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2015/data/6948/uid54570_4012556a6479a21c01223ca57bbc955a1666765a.doc).

9. Бочкова Е.А., Ножевникова А. Н. Биоплёнки, сформированные микробным сообществом лабораторного анаммокс-биореактора при проточном культивировании // Сборник тезисов 19-й Международной пушинской молодёжной школы-конференции молодых учёных «Биология — наука XXI века», 20 – 24 апреля 2015 г., Пущино. С. 164.

10. Botchkova E., Litty Yu., Kuznetsov B., Nozhevnikova A. Biofilms formation in laboratory-scale anammox bioreactor during prolonged cultivation // 6th Congress of European Microbiologists FEMS, 7-11 июня 2015, г. Маастрихт (Нидерланды). (<http://fems-microbiology.kenes.com/scientific-information/scientific-programe>).

11. Бочкова Е. А., Литти Ю.В. Микробные биоплёнки, сформированные в анаэробном лабораторном проточном анаммокс-биореакторе // Сборник тезисов X Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», 27-30 октября 2015 г., Москва. С. 32-34 (http://www.inmi.ru/upload/export-1_files/molcof2015_abstracts.pdf).

12. Бочкова Е.А., Литти Ю.В., Ножевникова А.Н. Новый штамм анаммокс-бактерии *Candidatus 'Jettenia asiatica' ecosi*, отселекционированный в ходе

длительного культивирования в проточных условиях, и активный в широком диапазоне концентрации субстратов и pH // Сборник тезисов XI Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», 1-2 ноября 2016 г., Москва. С. 34-36.

Патенты:

Н.И. Куликов, Ю.В. Литти, Е.Н. Куликова, Е.А. Бочкова, А.А. Ермошин, А.Н. Ножевникова. Биоторная очистная установка для удаления азота аммония и органических веществ из иловой воды метантенков // Заявка на полезную модель №2015151688 от 02.12.2015 г.

Благодарности:

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н. зав. лабораторией антропогенных местообитаний А.Н. Ножевниковой за научное руководство и помощь в работе, благодарит сотрудников ФИЦ Биотехнологии РАН к.б.н. Ю.В. Литти, к.б.н. С.Н. Паршину, к.б.н. А.Ю. Каллистову, В.К. Некрасову, А.А. Никитину, А. Ермошина, Н.А. Кострикину, д.б.н. В.К. Плакунова и весь коллектив лаборатории нефтяной микробиологии, к.б.н. Б.Б. Кузнецова и весь коллектив лаборатории молекулярной диагностики, к.б.н. А.А. Новикова и всех сотрудников лаборатории биотехнологии РГУ нефти и газа им. Губкина, сотрудников кафедры биофизики и кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за практическую помощь в работе, ценные советы и поддержку.