

Научная статья
УДК 574.635
EDN: PCUTZF
DOI: 10.21285/achb.912



Изучение способности бактерий активного ила к образованию биопленок *in vitro*

А.А. Хасанова✉, А.С. Сироткин, Е.В. Перушкина

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань, Российская Федерация

Аннотация. Целью работы являлась сравнительная характеристика биопленкообразования в условиях *in vitro* бактериальных культур, выделенных из активного ила, а также музейных культур, способных к биодеструкции ксенобиотиков: *Alcaligenes faecalis* 2, *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Rhodococcus erythropolis* ИЛБИО, *Achromobacter pulmonis* ПНОС. Согласно результатам анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК идентифицированы штаммы, выделенные из активного ила: *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis* и *Bacillus proteolyticus*. Исследовано формирование биопленок микроорганизмами на среде LB и синтетической питательной среде (источник углерода – ацетат натрия). При росте клеток на среде LB биомасса биопленки увеличивается у бактерий *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* ПНОС. Продолжительность стадии культивирования 72 и 144 часа и дополнительное дозирование субстратов оказали влияние на процесс биопленкообразования: к 144 часам культивирования показатели биомассы составили 0,6–1,3 опт. ед. Отмечено, что для клеток *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* наблюдается увеличение биомассы биопленок в среднем на 63–77% по сравнению с 72-часовым процессом. На заключительном этапе культивирования (144 часа) содержание экзополисахаридов в матриксе для микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* составило более 0,02 опт. ед. Метаболическая активность бактерий активного ила, формирующих биопленку, достигла 628–3609 Фл./ОП₅₄₀. Таким образом, показано, что в процессе роста микроорганизмы активного ила в составе биопленки сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: микробная биопленка, сточная вода, активный ил, экзополисахариды, метаболическая активность

Для цитирования: Хасанова А.А., Сироткин А.С., Перушкина Е.В. Изучение способности бактерий активного ила к образованию биопленок *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 2. С. 207–214. DOI: 10.21285/achb.912. EDN: PCUTZF.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Study on the ability of activated sludge bacteria to form biofilms *in vitro*

Aigul A. Khasanova✉, Aleksandr S. Sirotkin, Elena V. Perushkina

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

Abstract. The study aims to comparatively characterize *in vitro* biofilm formation in bacterial cultures isolated from activated sludge, as well as archival cultures capable of xenobiotics biodegradation: *Alcaligenes faecalis* 2, *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Rhodococcus erythropolis* ILBIO, and *Achromobacter pulmonis* PNOS. An analysis of the 16S rRNA nucleotide sequence identified strains isolated from activated sludge: *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis*, and *Bacillus proteolyticus*. The formation of biofilms by microorganisms was studied on LB medium and synthetic culture medium (with sodium acetate as a carbon source). With cell growth

© Хасанова А.А., Сироткин А.С., Перушкина Е.В., 2024

on LB medium, an increase in biofilm biomass was observed in *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* 2, and *Achromobacter pulmonis* PNOS. The cultivation stage duration (72 and 144 h), as well as the additional dosing of substrates, had an effect on the biofilm formation process: by 144 h of cultivation, the biomass values amounted to 0.6–1.3 optical units. An average 63–77% increase in biofilm biomass was noted for *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus odorifer* cells as compared to the 72-hour process. At the final stage of cultivation (144 h), the values of exopolysaccharides in the matrix amounted to over 0.02 optical units for *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus odorifer*. The metabolic activity of activated sludge bacteria forming the biofilm reached 628–3609 FI./OD₅₄₀. Thus, activated sludge microorganisms forming the biofilm were shown to retain viability and metabolic activity during growth under *in vitro* conditions.

Keywords: microbial biofilm, wastewater, activated sludge, exopolysaccharides, metabolic activity

For citation: Khasanova A.A., Sirotkin A.S., Perushkina E.V. Study on the ability of activated sludge bacteria to form biofilms *in vitro*. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(2):207-214. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.912. EDN: PCUTZF.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что биопленка состоит из высокоструктурированного микробного сообщества, заключенного в матрикс [1]. Механизм экспрессии генов клеток, находящихся в толще биопленки, отличается от их планктонных аналогов. Структурный каркас биопленок в основном связан со свойствами внеклеточного полимерного вещества [2]. Основным компонентом матрицы биопленки является водная фаза (до 97%), в состав которой включены белки, экзополисахариды, нуклеиновые кислоты (РНК, внеклеточная ДНК) и липиды. Свойства матрицы внеклеточных полимерных веществ обеспечивают хороший баланс между структурной гибкостью и адаптивностью, что позволяет создать стабильные микробные сообщества [3]. Микроорганизмы биопленки отличаются повышенной устойчивостью к факторам окружающей среды и измененной по сравнению с планктонной формой физиологической активностью [4].

С точки зрения практического использования биопленок в настоящее время следует отметить широкое разнообразие методов очистки поступающих сточных вод с применением агрегированных форм микроорганизмов (FBBR- [5], MBBR- [6], MBfR-технологии [7]). Реакторы с биопленкой позволяют точнее регулировать динамику роста популяции микроорганизмов и скорость реакции, в результате чего улучшается гибкость работы биофильтрационных установок и сокращается время гидравлического удерживания [8–10]. Одними из главных преимуществ применения микробных агрегатов является метаболическая интеграция и интенсивный перенос генов микроорганизмов в системе с биопленкой. Увеличение скорости переноса генов в сообществе микробных биопленок способствует повышению уровня приспособленности бактериальных клеток к неблагоприятным факторам окружающей среды. На межвидовой обмен субстратом оказывает влияние близкое расположение видов бактерий, что приводит к развитию синтрофизма внутри микробных ассоциаций. В связи с различной концентрацией кислорода и питательных компонентов в слоях биопленки создаются оптимальные условия для развития многообразных видов микроорганизмов [11].

Бактерии являются доминирующей группой микроорганизмов в биопленке. Структура биопленок формируется прежде всего за счет экзополисахаридов, продуцируемых клетками бактерий. Преобладание бактерий связано со скоростью их роста, качественным составом

поступающих сточных вод и факторов внешней среды (концентрация органического субстрата и растворенного кислорода, температура) [12].

Гетеротрофные бактерии составляют основную долю от общего количества микроорганизмов. К ним относятся бактерии родов *Sphaerotilus*, *Zoogloea*, *Thiobacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Micrococcus*, *Nitrosations*, *Bacillus*, *Streptococcus faecalis* и *Escherichia coli* [13].

При изменении состава органического вещества в сточных водах, увеличении нагрузки, понижении температуры появляются нитчатые бактерии (*Subbaromyces splendens*) [14].

Среди представителей водорослей основными являются бактерии родов *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Oscillatoria*, *Stigeoclonium* и *Circumfili*, среди простейших – *Amoeba*, *Vahlkampfia*, *Arcella*, *Vorticella* и т.д. [15].

Особый интерес представляет изучение способности бактериальных культур активного ила к биопленкообразованию с целью формирования перспективных мультивидовых биопленок в процессах интенсивной биодеструкции загрязняющих компонентов сточных вод.

Цель проведенной работы состояла в сравнительной характеристике биопленок бактериальных культур, выделенных из активного ила, и культур, способных к биодеструкции ксенобиотиков, в условиях культивирования *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования и условия культивирования. В качестве объектов исследования использовались различные бактериальные культуры микробных сообществ очистных сооружений сточных вод промышленного и коммунально-бытового характера, а именно штаммы микроорганизмов, обладающих нитрилгидролизующей активностью: *Alcaligenes faecalis* 2 [16], *Acinetobacter guillouiae* 11h [16], *Rhodococcus erythropolis* ИЛБИО [17], *Achromobacter pulmonis* ПНОС [18], полученные из музейной коллекции лаборатории молекулярной биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ПФИЦ УрО РАН, г. Пермь), а также бактериальные культуры *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis* и *Bacillus proteolyticus*, выделенные из активного ила биологических очистных сооружений г. Зеленодольска (Республика Татарстан), осуществляющих очистку коммунально-бытовых сточных вод.

Для получения инокулята осуществляли периодическое культивирование микроорганизмов в питательной среде LB на роторной качалке со скоростью перемешивания 120 об/мин в течение 24 часов при 30 °С.

Биопленки микроорганизмов выращивали в 96-луночном полистироловом планшете «Медполимер» (г. Санкт-Петербург, Россия), в среде LB [19] и синтетической питательной среде следующего состава, г/л: ацетат натрия – 20,00, K_2HPO_4 – 0,02, NH_4Cl – 0,08.

В лунки планшета вносили 150 мкл питательной среды и 10 мкл инокулята микроорганизмов согласно методике, описанной в источнике [20]. Планшетное культивирование проводили в термостате при 30 °С в течение 72–144 часов.

В качестве контроля использовали стерильную среду LB и синтетическую питательную среду, внесенные в ячейки планшета в аналогичных условиях постановки эксперимента.

Для контрольных ячеек планшета проводили измерение оптической плотности биомассы в составе культуральной жидкости, биомассы биопленки, содержания экзополисахаридов и метаболической активности микроорганизмов биопленки. Полученные значения учитывали при расчетах показателей культивирования бактериальных культур.

Материалы и методы исследований. Для идентификации культур активного ила определяли нуклеотидную последовательность 16S рПНК в компании ЗАО «Евроген» (г. Москва, Россия) с праймерами 27fm и 1492R (5'-ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3').

Анализ содержания биомассы микроорганизмов в процессе периодического культивирования проводили путем измерения оптической плотности культуральной жидкости на микропланшетном ридере Tecan Infinite M1000 Pro при длине волны 540 нм (Tecan, Швейцария [20]).

Для определения биомассы биопленки использовали метод, основанный на удалении питательной среды и планктонных клеток после проведения периодического культивирования, а также окрашивании образцов биопленки 0,1%-м кристаллическим фиолетовым [21]. При этом способность к биопленкообразованию бактериальными культурами оценивали путем измерения оптической плотности раствора красителя при длине волны 540 нм на микропланшетном ридере.

Для определения содержания экзополисахаридов в составе образцов биопленки окрашивали красителем Congo Red (Россия) (конечная концентрация красителя 40 мкг/мл). Содержание экзополисахаридов оценивали с помощью измерения оптической плотности раствора на микропланшетном ридере при длине волны 490 нм [22].

Для анализа метаболической активности исследуемых микроорганизмов в составе биопленок клетки окрашивали красителем PrestoBlue HS Viability Reagent (Invitrogen, США). Данный реагент содержит резазурин в соответствующем буферном растворе. При взаимодействии живых клеток с реагентом резазурин восстанавливается в резофурин – соединение с интенсивной флуоресценцией. Резазурин представляет собой окислительно-восстановительный индикатор и подходит для детекции жизнеспособности клеток в популяции. Флуоресценцию клеток определяли на планшетном ридере при длине волны возбуждения/эмиссии 560/590 нм [23]. Условные единицы флуоресценции красителя PrestoBlue HS Viability Reagent относили к биомассе биопленки, измеренной при длине волны 540 нм (Фл./ОП₅₄₀).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе исследований проводилась видовая идентификация микроорганизмов активного ила. По результатам секвенирования нуклеотидной последовательности 16S рПНК было установлено, что бактериальные культуры принадлежат видам *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis* и *Bacillus proteolyticus*.

Известно, что более 90% идентифицированных бактерий обладают способностью к формированию биопленок [24]. Для оценки биопленкообразующей способности для каждой исследуемой бактериальной культуры определяли биомассу биопленки с использованием метода окраски кристаллическим фиолетовым и определением оптической плотности отмытого красителя после его поглощения биопленкой (табл. 1).

На первом этапе исследований оценивали способность микроорганизмов к формированию биопленок на среде LB и питательной среде с минимальным содержанием макро- и микроэлементов (синтетической питательной среде).

Таблица 1. Биопленкообразующая способность бактериальных культур (ОП₅₄₀) в процессе периодического культивирования в течение 72 часов на питательных средах различного состава

Table 1. Biofilm-forming ability of bacterial cultures during periodic cultivation for 72 hours on nutrient media of various compositions (OD₅₄₀)

	Среда LB	Синтетическая питательная среда
Бактериальные культуры, выделенные из активного ила		
<i>Bacillus subtilis</i>	0,350±0,010	0,4000±0,0200
<i>Paenibacillus odorifer</i>	0,270±0,010	0,1100±0,0050
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0,090±0,004	0,0200±0,0010
<i>Bacillus proteolyticus</i>	0,080±0,004	0,0100±0,0005
Бактериальные культуры, полученные из коллекции ПФИЦ УрО РАН		
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	0,410±0,020	0,2900±0,0100
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ИЛБИО	0,150±0,007	0,3100±0,0100
<i>Acinetobacter guillouiae</i> 11h	0,180±0,009	0,1900±0,0090
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	0,210±0,010	0,2700±0,0100

Отмечено, что в процессе роста микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter guillouiae* 11h и *Achromobacter pulmonis* ПНОС на питательных средах, отличающихся по источнику углерода в составе комплексной и синтетической питательных сред, образуется устойчивая микробная биопленка вне зависимости от состава среды. Для указанных культур показатель биопленкообразующей способности превышал 0,2 опт. ед. и разница между значениями ОП₅₄₀ на различных питательных средах составила не более 0,01–0,06 опт. ед.

Для бактерий *Micrococcus yunnanensis* и *Bacillus proteolyticus* установлена минимальная способность к формированию биопленок на указанных питательных средах. Это может быть связано с низкой скоростью роста штаммов, более длительной адаптивной реакцией клеток к составу среды и, следовательно, агрегированию их с образованием биопленки.

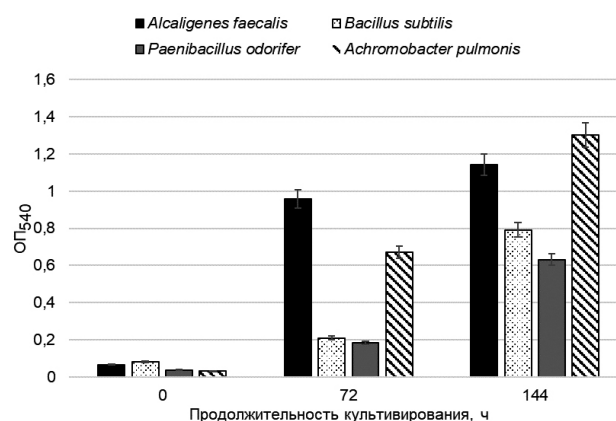
Для бактерий *Paenibacillus odorifer* и *Alcaligenes faecalis* 2 увеличение массивности биопленки наблюдалось при культивировании клеток на среде LB по сравнению с синтетической питательной средой (см. табл. 1). Отмеченные культуры характеризуются высокой скоростью роста и их метаболической активностью, поэтому необходимой является повышенная концентрация углеродного субстрата в составе полноценной питательной среды. В связи с этим следует отметить, что на синтетической питательной среде с минимальным содержанием ацетата натрия возможное истощение субстрата в процессе культивирования послужило стрессирующим фактором для микроорганизмов и оказало ингибирующее воздействие на рост и формирование биопленок культурами *Paenibacillus odorifer* и *Alcaligenes faecalis* 2.

При культивировании штамма *Rhodococcus erythropolis* ИЛБИО на синтетической питательной среде массивность биопленок увеличивалась в среднем в 2 раза, что может быть связано с физиологической особенностью этих бактерий. При этом известно [25], что микроорганизмы рода *Rhodococcus* эффективны в биопленках смешанных культур и менее стабильны в биопленке, образованной соответствующей монокультурой.

Экспериментально было установлено, что наибольшая активность по образованию микробных биопленок при периодическом культивировании на среде LB наблюдается у бактерий активного ила *Paenibacillus odorifer* и *Bacillus subtilis*, а также у бактериальных культур *Alcaligenes faecalis* 2 и *Achromobacter pulmonis* ПНОС. В связи с этим рассматриваемые объекты были выбраны для проведения дальнейшего этапа исследований.

Далее оценивали биопленкообразующую способность бактериальных культур на среде LB при увеличении продолжительности культивирования до 144 часов. При этом через 72 часа роста микроорганизмов удаляли культуральную жидкость из опытных планшетов и добавляли свежую питательную среду LB с целью уменьшения ингибирующего воздействия продуктов метаболизма на микробные клетки.

В ходе проведения экспериментальных исследований анализировали рост бактериальных культур с измерением оптической плотности культуральной жидкости. Результаты анализа отображены на рисунке.



Количество биомассы, опт. ед., в культуральной жидкости при периодическом *in vitro* культивировании *Alcaligenes faecalis* 2, *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis* и *Achromobacter pulmonis* ПНОС

Biomass amount, OD, in the culture liquid during periodic *in vitro* cultivation of *Alcaligenes faecalis* 2, *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis* and *Achromobacter pulmonis* ПНОС

Установлено, что начальное содержание биомассы в культуральной жидкости варьировало в диапазоне от 0,03 до 0,10 опт. ед. В процессе аэробного периодического культивирования отмечено увеличение количества суспендированной биомассы на 72-й и 144-й часы роста, оптическая плотность культур увеличивается до 0,6–1,3 опт. ед. Рост клеток в суспензии свидетельствует о благоприятных условиях культивирования бактерий *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus odorifer*, штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 и *Achromobacter pulmonis* ПНОС. Известно, что при формировании биопленок важно обеспечить в системе значительное количество биомассы для процессов самоиммобилизации клеток и их агрегирования [26].

Увеличение продолжительности периодического культивирования в опытных планшетах с 72 до 144 часов с подпиткой субстратом способствовало значительному приросту бактерий активного ила *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* на 75 и 70% соответственно по сравнению с 72-часовым культивированием указанных культур.

Повышение концентрации биомассы в культуральной жидкости в указанных опытных системах привело к увеличению количественных показателей массивности образцов биопленок исследуемых культур. С целью дополнительной характеристики биопленок было проанализировано содержание экзополисахаридов в их составе на 144-й час роста микроорганизмов (табл. 2).

Установлено, что для формирования агрегатов бактериальных клеток активного ила важным является длительность предварительного этапа накопления биомассы в культуральной жидкости.

Высокая концентрация клеток в суспензии и подпитка субстратом позволили создать условия для колонизации поверхности полистирольного планшета и самоиммобилизации клеток *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer*, увеличение массивности биопленок составило в среднем 63 и 77% соответственно.

Таблица 2. Показатели образования биопленок для бактериальных культур *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* при периодическом культивировании на питательной среде LB

Table 2. Indicators of biofilm formation for bacterial cultures *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* PNOS, *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus odorifer* during periodic cultivation on LB nutrient medium

	Биопленкообразующая способность (ОП ₅₄₀)		Содержание экзополисахаридов в составе биопленки (ОП ₄₉₀), 144 ч
	72 ч	144 ч	
Бактериальные культуры, полученные из коллекции ПФИЦ УрО РАН			
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	0,41±0,02	0,52±0,02	0,0072±0,0003
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	0,20±0,01	0,43±0,02	0,0045±0,0002
Бактериальные культуры, выделенные из активного ила			
<i>Bacillus subtilis</i>	0,31±0,01	0,83±0,04	0,0257±0,0010
<i>Paenibacillus odorifer</i>	0,18±0,01	0,78±0,04	0,0238±0,0010

Таблица 3. Метаболическая активность микроорганизмов биопленки, Фл./ОП₅₄₀, оцененная с помощью красителя PrestoBlue HS Viability Reagent

Table 3. Metabolic activity of biofilm microorganisms, Fl./OD₅₄₀, assessed using PrestoBlue HS Viability Reagent

Бактериальные культуры, полученные из коллекции ПФИЦ УрО РАН		Бактериальные культуры, выделенные из активного ила	
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Paenibacillus odorifer</i>
628,0±31,4	3609,3±180,4	1227,3±61,3	1120,0±56,0

Анализ количества экзополисахаридов показал высокие значения для указанных бактерий активного ила на 144-й час периодического культивирования. Полученные данные коррелируют с результатами измерения массивности биопленки бактериальных культур.

Результаты оценки метаболической активности микроорганизмов в составе биопленки на 144-й час периодического культивирования приведены в табл. 3.

Установлено, что клетки *Achromobacter pulmonis* ПНОС проявляют высокую метаболическую активность в составе биопленок при их незначительной биомассе и содержании экзополисахаридов.

На процесс формирования биопленок бактериями *Alcaligenes faecalis* 2 оказывают влияние состав питательной среды (см. табл. 1) и – в меньшей степени – продолжительность культивирования клеток и подпитка субстратом (см. рисунок). Метаболическая активность биопленки к 144 часам эксперимента составила 628 Фл./ОП₅₄₀, что сравнительно ниже значений для других анализируемых штаммов (см. табл. 3). Это может быть связано с высокой чувствительностью культуры *Alcaligenes faecalis* 2 к колебанию концентрации кислорода и питательных веществ, приводящему к изменению метаболической активности клеток в глубинных слоях биопленки [27], а также с гибелью большей части популяции за данный промежуток времени в связи с высокими скоростями роста этой культуры.

Для бактериальных культур активного ила *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* отмечены высокие значения, отражающие биомассу биопленок и содержание экзополисахаридов. Показатель жизнеспособности и мета-

болической активности клеток этих культур составляет 1100–1250 Фл./ОП₅₄₀. Таким образом, в составе биопленки клетки сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По итогам проведенной работы можно сделать следующие выводы:

1. В результате анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК идентифицированы микроорганизмы, выделенные из активного ила коммунально-бытовых очистных сооружений г. Зеленодольска: *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis*.

2. В ходе проведения экспериментальных исследований доказано, что увеличение продолжительности стадии культивирования и дополнительное дозирование субстрата в среду оказывают значительное влияние на процесс формирования бактериальной биопленки. Установлено, что в результате культивирования наибольшая степень образования биопленки и экзополисахаридов наблюдается у бактериальных культур активного ила *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer*.

3. Полученные результаты являются основанием для организации процессов биопленкообразования доминирующими бактериальными культурами в составе природных ассоциаций микроорганизмов и создания перспективных бинарных и многокомпонентных агрегатов микробных клеток с целью использования в процессах биообезвреживания сточных вод.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Nicolella C., von Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors // Journal of Biotechnology. 2000. Vol. 80, no. 1. P. 1–33. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00229-7.

2. Seviour T., Derlon N., Dueholm M.S., Flemming H.-C., Girbal-Neuhauser E., Horn H., et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: suffering from an identity crisis // Water Research. 2019. Vol. 151. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.watres.2018.11.020.

3. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life // *Nature Reviews Microbiology*. 2016. Vol. 14. P. 563–575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
4. Шагинурова Г.И., Гиниятуллин М.А., Перушкина Е.В., Сироткин А.С. Интенсификация работы биологических очистных сооружений производства полисульфидных каучуков // *Экология и промышленность России*. 2006. N 6. С. 6–10. EDN: JWMGJV.
5. Mallikarjuna C., Dash R.R. Statistical analysis of treatment of rice mill wastewater using the aerobic inverse fluidized bed biofilm reactor (AIFBBR) // *Process Safety and Environmental Protection*. 2023. Vol. 171. P. 470–481. DOI: 10.1016/j.psep.2023.01.031.
6. Abdelfattah A., Hossain M.I., Cheng L. High-strength wastewater treatment using microbial biofilm reactor: a critical review // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 36. P. 75. DOI: 10.1007/s11274-020-02853-y.
7. He H., Wagner B.M., Carlson A.L., Yang C., Daigger G.T. Recent progress using membrane aerated biofilm reactors for wastewater treatment // *Water Science and Technology*. 2021. Vol. 84, no. 9. P. 2131–2157. DOI: 10.2166/wst.2021.443.
8. Jang Y., Lee S.-H., Kim N.-K., Ahn C.H., Rittmann B.E., Park H.-D. Biofilm characteristics for providing resilient denitrification in a hydrogen-based membrane biofilm reactor // *Water Research*. 2023. Vol. 231. P. 119654. DOI: 10.1016/j.watres.2023.119654.
9. Murshid S., Antonyamy A.J., Dhakshinamoorthy G.P., Jayaseelan A., Pugazhendhi A. A review on biofilm-based reactors for wastewater treatment: Recent advancements in biofilm carriers, kinetics, reactors, economics, and future perspectives // *Science of the Total Environment*. 2023. Vol. 892. P. 164796. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164796.
10. Перушкина Е.В., Садыкова З.О., Сироткин А.С., Мубаракшина Л.Ф. Очистка промышленных сточных вод от восстановленных соединений серы с использованием иммобилизованных микробных культур // *Вода: химия и экология*. 2013. N 10. С. 39–44. EDN: ROVYIP.
11. Preda V.G., Săndulescu O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention // *Discoveries*. 2019. Vol. 7, no. 3. P. e10. DOI: 10.15190/d.2019.13.
12. Radojević I., Jakovljević V., Grujić S., Ostojić A., Ćirković K. Biofilm formation by selected microbial strains isolated from wastewater and their consortia: mercury resistance and removal potential // *Research in Microbiology*. 2024. Vol. 175, no. 3. P. 104092. DOI: 10.1016/j.resmic.2023.104092.
13. Kim L.H., Jung Y., Yu H.-W., Chae K.-J., Kim I.S. Physicochemical interactions between rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers // *Environmental Science & Technology*. 2015. Vol. 49, no. 6. P. 3718–3726. DOI: 10.1021/es505803c.
14. Song T., Zhang X., Li J. The formation and distinct characteristics of aerobic granular sludge with filamentous bacteria in low strength wastewater // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 360. P. 127409. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127409.
15. Singh D., Goswami R.K., Agrawal K., Chaturvedi V., Verma P. Bio-inspired remediation of wastewater: A contemporary approach for environmental clean-up // *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2022. Vol. 5. P. 100261. DOI: 10.1016/j.crgsc.2022.100261.
16. Демаков В.А., Васильев Д.М., Максимова Ю.Г., Павлова Ю.А. Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот // *Микробиология*. 2015. Т. 84. N 3. С. 369–378. DOI: 10.7868/S0026365615030039. EDN: TQQVBB.
17. Максимова Ю.Г., Быкова Я.Е., Зорина А.С., Никулин С.М., Максимов А.Ю. Влияние немодифицированных многостенных нанотрубок на формирование и разрушение бактериальных биопленок // *Микробиология*. 2022. Т. 91. N 4. С. 507–516. DOI: 10.31857/S0026365621100694. EDN: PXWGD0.
18. Максимова Ю.Г., Сергеева А.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. Деградация пиридина суспензиями и биопленками штаммов *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Burkholderia dolosa* БОС, выделенных из активного ила очистных сооружений // *Биотехнология*. 2020. Т. 36. N 2. С. 86–98. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-86-98. EDN: IYFZFI.
19. Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Дисперсия моно- и смешанных биопленок *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* gt 1 // *Вестник Пермского университета. Серия Биология*. 2019. N 2. С. 153–158. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-2-153-158. EDN: KAORCR.
20. Maksimova Y., Bykova Y., Maksimov A. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes changes their antibiofilm and probiofilm effects on environmental Bacteria // *Microorganisms*. 2022. Vol. 10, no. 8. P. 1627. DOI: 10.3390/microorganisms10081627.
21. Singh P., Srivastava S., Malhotra R., Mathur P. Identification of *Candida auris* by PCR and assessment of biofilm formation by crystal violet assay // *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2023. Vol. 46. P. 100421. DOI: 10.1016/j.ijmm.2023.100421.
22. Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods // *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2006. Vol. 24, no. 1. P. 25–29. DOI: 10.1016/S0255-0857(21)02466-X.
23. Luzak B., Siarkiewicz P., Boncler M. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells // *Toxicology in Vitro*. 2022. Vol. 83. P. 105407. DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105407.
24. Wei Y., Shen D., Lukwambe B., Wang Y., Yang W., Zhu J., et al. The exogenous compound bacteria alter microbial community and nutrients removal performance in the biofilm unit of the integrated aquaculture wastewater bioremediation systems // *Aquaculture Reports*. 2022. Vol. 27. P. 101414. DOI: 10.1016/j.aqrep.2022.101414.
25. Зорина А.С., Максимова Ю.Г., Демаков В.А. Biofilm formation by monocultures and mixed cultures of *Alcaligenes faecalis* 2 and *Rhodococcus ruber* gt 1 // *Microbiology*. 2019. Vol. 88. P. 164–171. DOI: 10.1134/S0026261719020140.
26. Nicolella C., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors // *Journal of Biotechnology*. 2000. Vol. 80, no. 1. P. 1–33. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00229-7.
27. Zhao J., Liu T., Meng J., Hu Z., Lu X., Hu S., et al. Ammonium concentration determines oxygen penetration

depth to impact the suppression of nitrite-oxidizing bacteria inside partial nitrification and anammox biofilms //

Chemical Engineering Journal. 2023. Vol. 455. P. 140738. DOI: 10.1016/j.cej.2022.140738.

REFERENCES

1. Nicolella C., von Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*. 2000;80(1):1-33. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00229-7.
2. Seviour T., Derlon N., Dueholm M.S., Flemming H.-C., Girbal-Neuhausser E., Horn H., et al. Extracellular polymeric substances of biofilms: suffering from an identity crisis. *Water Research*. 2019;151:1-7. DOI: 10.1016/j.watres.2018.11.020.
3. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14:563-575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
4. Shaguinurova G.I., Guiniyatullin M.A., Perushkina E.V., Seerotkin A.S. Intensification of biological purification plants functioning in manufacture of polysulfide rubbers. *Ecology and Industry of Russia*. 2006;6:6-10. (In Russian). EDN: JWMGJV.
5. Mallikarjuna C., Dash R.R. Statistical analysis of treatment of rice mill wastewater using the aerobic inverse fluidized bed biofilm reactor (AIFBBR). *Process Safety and Environmental Protection*. 2023;171:470-481. DOI: 10.1016/j.psep.2023.01.031.
6. Abdelfattah A., Hossain M.I., Cheng L. High-strength wastewater treatment using microbial biofilm reactor: a critical review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020;36:75. DOI: 10.1007/s11274-020-02853-y.
7. He H., Wagner B.M., Carlson A.L., Yang C., Daigger G.T. Recent progress using membrane aerated biofilm reactors for wastewater treatment. *Water Science and Technology*. 2021;84(9):2131-2157. DOI: 10.2166/wst.2021.443.
8. Jang Y., Lee S.-H., Kim N.-K., Ahn C.H., Rittmann B.E., Park H.-D. Biofilm characteristics for providing resilient denitrification in a hydrogen-based membrane biofilm reactor. *Water Research*. 2023;231:119654. DOI: 10.1016/j.watres.2023.119654.
9. Murshid S., Antonyamy A.J., Dhakshinamoorthy G.P., Jayaseelan A., Pugazhendhi A. A review on biofilm-based reactors for wastewater treatment: Recent advancements in biofilm carriers, kinetics, reactors, economics, and future perspectives. *Science of the Total Environment*. 2023;892:164796. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.164796.
10. Perushkina E.V., Sadykova Z.O., Sirotkin A.S., Mubarakshina L.F. Treatment of industrial waste water from reduced sulfur compounds using immobilized microbial cultures. *Water: chemistry and ecology*. 2013;10:39-44. (In Russian). EDN: ROVYIP.
11. Preda V.G., Săndulescu O. Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*. 2019;7(3):e10. DOI: 10.15190/d.2019.13.
12. Radojević I., Jakovljević V., Grujić S., Ostojić A., Ćirković K. Biofilm formation by selected microbial strains isolated from wastewater and their consortia: mercury resistance and removal potential. *Research in Microbiology*. 2024;175(3):104092. DOI: 10.1016/j.resmic.2023.104092.
13. Kim L.H., Jung Y., Yu H.-W., Chae K.-J., Kim I.S. Physicochemical interactions between rhamnolipids and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. *Environmental Science & Technology*. 2015;49(6):3718-3726. DOI: 10.1021/es505803c.
14. Song T., Zhang X., Li J. The formation and distinct characteristics of aerobic granular sludge with filamentous bacteria in low strength wastewater. *Bioresource Technology*. 2022;360:127409. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127409.
15. Singh D., Goswami R.K., Agrawal K., Chaturvedi V., Verma P. Bio-inspired remediation of wastewater: A contemporary approach for environmental clean-up. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2022;5:100261. DOI: 10.1016/j.crgsc.2022.100261.
16. Demakov V.A., Vasil'ev D.M., Pavlova Y.A., Ovechkina G.V., Maksimov A.Y., Maksimova Y.G. Activated sludge bacteria transforming cyanopyridines and amides of pyridinecarboxylic acids. *Mikrobiologiya*. 2015;84(3):369-378. (In Russian). DOI: 10.7868/S0026365615030039. EDN: TQQVBB.
17. Maksimova Yu.G., Bykova Ya.E., Zorina A.S., Nikulin S.M., Maksimov A.Yu. Effect of pristine multi-walled carbon nanotubes on formation and degradation of bacterial biofilms. *Mikrobiologiya*. 2022;91(4):507-516. (In Russian). DOI: 10.31857/S0026365621100694. EDN: PXWGDO.
18. Maksimova Yu.G., Sergeeva A.A., Ovechkina G.V., Maksimov A.Yu. Pyridine degradation by suspensions and biofilms of *Achromobacter pulmonis* PNOS and *Burkholderia dolosa* BOS strains isolated from activated sludge of sewage treatment plants. *Biotechnologiya*. 2020;36(2):86-98. (In Russian). DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-86-98. EDN: IYFZFI.
19. Zorina A.S., Maksimova Yu.G. The dispersion of mono- and mixed *Alcaligenes faecalis* 2 and *Rhodococcus ruber* gt 1 biofilms. *Bulletin of Perm University. Biology*. 2019;2:153-158. (In Russian). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-2-153-158. EDN: KAORCR.
20. Maksimova Y., Bykova Y., Maksimov A. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes changes their antibiofilm and probiofilm effects on environmental Bacteria. *Microorganisms*. 2022;10(8):1627. DOI: 10.3390/microorganisms10081627.
21. Singh P., Srivastava S., Malhotra R., Mathur P. Identification of *Candida auris* by PCR and assessment of biofilm formation by crystal violet assay. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2023;46:100421. DOI: 10.1016/j.ijmm.2023.100421.
22. Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2006;24(1):25-29. DOI: 10.1016/S0255-0857(21)02466-X.
23. Luzak B., Siarkiewicz P., Boncler M. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2022;83:105407. DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105407.
24. Wei Y., Shen D., Lukwambe B., Wang Y., Yang W., Zhu J., et al. The exogenous compound bacteria alter microbial community and nutrients removal performance in the biofilm unit of the integrated aquaculture wastewater bioremediation systems. *Aquaculture Reports*. 2022;27:101414. DOI: 10.1016/j.aqrep.2022.101414.

25. Zorina A.S., Maksimova Yu.G., Demakov V.A. Biofilm formation by monocultures and mixed cultures of *Alcaligenes faecalis* 2 and *Rhodococcus ruber* gt 1. *Microbiology*. 2019;88:164-171. DOI: 10.1134/S0026261719020140.

26. Nicolella C., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology*. 2000;80(1):1-33. DOI: 10.1016/S0168-1656(00)00229-7.

27. Zhao J., Liu T., Meng J., Hu Z., Lu X., Hu S., et al. Ammonium concentration determines oxygen penetration depth to impact the suppression of nitrite-oxidizing bacteria inside partial nitrification and anammox biofilms. *Chemical Engineering Journal*. 2023;455:140738. DOI: 10.1016/j.cej.2022.140738.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Хасанова Айгуль Айратовна,

аспирант,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
✉ hasanovaigul@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-3730-4080>

Сироткин Александр Семенович,

д.т.н., профессор, заведующий кафедрой,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Перушкина Елена Вячеславовна,

к.т.н., доцент,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, 68,
Российская Федерация,
perushkina_elena@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Вклад авторов

А.А. Хасанова – проведение экспериментальных исследований, обработка полученных данных, обсуждение полученных результатов, написание текста статьи.

А.С. Сироткин – разработка концепции исследований, развитие методологии, обсуждение полученных результатов, редактирование текста статьи.

Е.В. Перушкина – разработка концепции исследований, развитие методологии, обсуждение полученных результатов, редактирование текста статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 09.10.2023.
Одобрена после рецензирования 05.12.2023.
Принята к публикации 31.05.2024.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aigul A. Khasanova,

Postgraduate Student,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
✉ hasanovaigul@mail.ru
<https://orcid.org/0009-0004-3730-4080>

Aleksandr S. Sirotkin,

Dr. Sci. (Engineering), Professor,
Head of the Department,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
asirotkin66@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-4480-9907>

Elena V. Perushkina,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Kazan National Research Technological University,
68, Karl Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
perushkina_elena@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>

Contribution of the authors

Aigul A. Khasanova – conducting experiments, data processing, results discussion, preparing the manuscript.

Aleksandr S. Sirotkin – research concept and methodology development, results discussion, editing the manuscript.

Elena V. Perushkina – research concept and methodology development, results discussion, editing the manuscript.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

Information about the article

The article was submitted 09.10.2023.
Approved after reviewing 05.12.2023.
Accepted for publication 31.05.2024.