

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»

На правах рукописи



ХАСАНОВА АЙГУЛЬ АЙРАТОВНА

**ПРОЦЕССЫ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ
ФОСФАТНАККУМУЛИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В
СООБЩЕСТВАХ АКТИВНОГО ИЛА И БИОПЛЕНКИ**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук,
профессор Сироткин А.С.

Казань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Фосфор в сточных водах и методы его удаления	13
1.2 Микробная дефосфатация и фосфат-аккумуляция в процессах очистки сточных вод	21
1.3 Агрегированные формы микробных сообществ	36
1.4 Инженерное обеспечение процессов дефосфатации сточных вод с применением агрегированных форм микроорганизмов	42
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	56
2.1 Объекты исследования	56
2.2 Методы исследований	56
2.3 Постановка эксперимента	62
ГЛАВА 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА АКТИВНОГО ИЛА В БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО-ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ	69
3.1 Оценка фосфатаккумулялирующей способности микроорганизмов активного ила	69
3.2 Электронно-микроскопический анализ образцов активного ила в процессе культивирования в SBR реакторе	72
3.3 Таксономический анализ микробного сообщества	75
ГЛАВА 4. АНАЛИЗ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА	83
4.1 Оценка биопленкообразующей способности монокультур активного ила	84
4.2 Анализ влияния физико-химических факторов среды на устойчивость биопленки монокультур активного ила	90

4.3 Оценка биопленкообразующей способности бинарных культур активного ила	100
4.4 Анализ влияния физико-химических факторов среды на устойчивость биопленки бинарных бактериальных культур активного ила	102
ГЛАВА 5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ БИОМАССЫ АКТИВНОГО ИЛА В БИОФИЛЬТРЕ	113
5.1 Сравнительный анализ суспендированной и иммобилизованной биомассы в процессе биологической дефосфатации сточных вод	113
5.2 Интродукция фосфатаккумулялирующих микроорганизмов в систему с иммобилизованной биомассой активного ила	120
5.3 Технологический расчет биофильтра для очистки сточных вод	126
5.4 Технологическая схема биологической очистки сточных вод с использованием биофильтра	129
ГЛАВА 6. ЭКОЛОГО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ БИОФИЛЬТРОВ В ОЧИСТКЕ КОММУНАЛЬНО- БЫТОВЫХ СТОЧНЫХ ВОД	133
6.1 Расчет экономических показателей процесса биофильтрационной очистки сточных вод	133
6.2 Расчет фонда заработной платы	134
6.3 Расчет предотвращенного экологического ущерба окружающей природной среде	137
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	143
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148
ПРИЛОЖЕНИЕ А	185
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	186

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Одним из главных инициаторов процесса эвтрофикации является сброс недостаточно очищенных коммунально-бытовых сточных вод в водные экосистемы. Фосфор является одним из основных биогенных элементов в составе сточных вод, стимулирующий рост сине-зеленых водорослей, что в дальнейшем приводит к заторфовыванию природных водоемов. Содержание общего фосфора в сточных водах, поступающих на городские очистные сооружения, варьирует, в среднем, в диапазоне от 4 до 12 мг/дм³.

Технология химического удаления фосфора из поступающих стоков является высокоэффективной и способствует восстановлению запасов соединений фосфора. Однако способ является экономически нецелесообразным в связи с использованием дорогостоящих химических реагентов и сложностью многостадийного процесса извлечения и обработки образующихся осадков в виде гидроксиапатитов, фосфата магния и аммония.

На очистных сооружениях широко применяются биологические способы дефосфатации сточных вод (биореакторы последовательно-периодического действия, технологии с созданием анаэробных/аэробных зон для обогащения микробного сообщества группой фосфатаккумуляирующих микроорганизмов, в частности, р.р. *Thiotrix*, *Sa. Accumulibacter*, *Sa. Competibacter*. В связи с тем, что реализуемые системы водоочистки способствуют увеличению эксплуатационных расходов за счет внедрения дополнительных зон, чувствительны к колебаниям концентрации органических веществ, рециркуляции нитрит- и нитрат-ионов в анаэробной фазе, эффективность дефосфатации сточных вод не превышает 50-60 %. В связи с этим актуальным является исследование инновационных технологий водоподготовки, обеспечивающих развитие специализированного микробного сообщества для реализации процесса глубокого удаления фосфора из сточных вод.

Перспективным направлением в развитии технологий глубокого удаления соединений фосфора является использование биопленочных реакторов с различными видами загрузочных материалов: биопленочные реакторы периодического действия, реакторы с псевдоожиженным слоем, мембранные реакторы с биопленкой, интегрированные реакторы с фиксированной пленкой активного ила и многие другие. В биореакторе с подвижным слоем с применением полиуретановых губок эффективность удаления фосфора достигла 90 %. В процессе культивирования биопленки в реакторе с загрузкой цеолитом наблюдалась высокая степень удаления соединений азота и фосфора (83 % и 80 %, соответственно).

Применение иммобилизованных клеток для очистки сточных вод является актуальным с точки зрения обеспечения высокой плотности биомассы и предотвращения вымывания клеток, механической прочности биопленки и генетической стабильности микроорганизмов, высокой степени устойчивости к токсикантам в составе сточных вод. Следует отметить, что воздействие различных негативных факторов окружающей среды также стимулирует рост и увеличивает массивность бактериальной биопленки.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время особый интерес представляет исследование механизмов процесса фосфатаккумуляции и биологической дефосфатации сточных вод микробным сообществом. Значительный вклад в изучение видового разнообразия фосфатаккумулялирующих микроорганизмов и их метаболических путей внутриклеточного накопления фосфора, исследование процессов удаления фосфора из сточных вод внесли российские и зарубежные ученые – Т.В. Кулаковская, И.С. Кулаев, А.В. Смирнов, Н.В. Пименов, А.Г. Дорофеев, Y. Zhang, T. Mino, A. Oehmen, и другие.

Целью работы являлась интенсификация процессов очистки сточных вод путем создания условий для развития фосфатаккумулялирующих микроорганизмов в составе микробных сообществ активного ила и биопленки.

Задачи исследования состояли в следующем:

1. Проанализировать особенности формирования микробного сообщества активного ила в условиях культивирования фосфатаккумулирующих микроорганизмов в его составе в отъемно-доливном реакторе с целью глубокого удаления фосфора из среды культивирования. Установить взаимосвязь между структурой микробного сообщества и эффективностью биологической очистки сточных вод от фосфора.

2. Исследовать способность к образованию биопленки микробных культур *Alcaligenes faecalis* 2, *Acinetobacter guillouiae* 11h, *Rhodococcus erythropolis* ИЛБИО, *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis* и *Bacillus proteolyticus*, участвующих в очистке коммунально-бытовых и промышленных сточных вод.

3. Проанализировать влияние физико-химических факторов среды (температуры, pH, содержания синтетического ПАВ в качестве поллютанта) на структурную устойчивость моно- и бинарных бактериальных биопленок и ферментативную активность микроорганизмов в их составе.

4. Провести сравнительный анализ эффективности очистки сточных вод от фосфат-ионов в процессе культивирования активного ила и биопленки на его основе с созданием условий для развития фосфатаккумулирующих микроорганизмов в их составе.

5. Оценить влияние биоаугментации микробного сообщества биопленки с интродукцией фосфатаккумулирующей культуры *Alcaligenes faecalis* 2 на эффективность удаления фосфора и азота в биофильтре.

6. Разработать и обосновать техническое предложение по внедрению биофильтрационной установки для очистки сточных вод с глубоким удалением фосфора.

Научная новизна работы.

Установлены закономерности сукцессии микробного сообщества в циклическом реакторе при реализации процесса глубокого удаления фосфора и определены доминирующие функциональные группы

фосфатаккумуляирующих микроорганизмов. Идентифицирована культура, отнесенная к роду *Azonexus*, определены её доля в сообществе (до 24 %), а также высокое содержание внутриклеточного фосфора (до 12 %) в абсолютно сухой биомассе.

Доказано, что активное формирование биопленок в ответ на стрессирующее воздействие отдельных внешних факторов среды характерно в большей степени для бинарных культур по сравнению с монокультурами, а именно:

- массивность биопленки бинарной культуры *Bacillus subtilis* и *Achromobacter pulmonis* ПНОС в кислых (рН 5,0) и щелочных условиях среды (рН 10,0) выше в среднем на 46 % и 45 %, соответственно;

- массивность биопленки бинарной культуры *Alcaligenes faecalis* 2 и *Bacillus subtilis* в присутствии додецилсульфата натрия в диапазоне концентраций от 5 до 10 мг/дм³, в среднем, на 22 % выше.

Установлено, что пусковой период в условиях циклического (отъемно-доливного) режима биофльтрации сточной воды по сравнению с использованием активного ила сокращается вдвое за счет интенсивного накопления массы биопленки и устойчивого структурного формирования функциональных микробных групп в её составе. По сравнению с активным илом процесс удаления из модельного раствора сточных вод фосфатов и аммонийного азота в системе с биопленкой отличается большей эффективностью на 20-25 % на 30-35 %, соответственно.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в обобщении представлений о механизмах фосфатаккумуляции микроорганизмами активного ила и биопленки, формировании подходов к разработке перспективных технологий в области глубокого удаления соединений фосфора из сточных вод.

Разработана методика диагностики фосфатаккумуляирующей способности активного ила в технологии очистки сточных вод в рамках договора с ФСИ 17133ГУ/2021 от 15.12.2021 г., которую можно применять на очистных

сооружениях для оперативной оценки влияния физико-химических факторов среды на активный ил в процессе удаления фосфат-ионов из сточных вод.

Разработана технологическая схема биологической очистки коммунально-бытовых сточных вод для очистных сооружений малой производительности (400,0 м³/сут) с попеременным поступлением сточной воды на последовательно работающие биофильтры.

Получен акт о практическом использовании результатов диссертационной работы от МУП «Водоканал» г. Казани по интенсификации биофильтрационной очистки с глубоким удалением фосфатов из сточных вод жилого массива «Крутушка» (исх. № 8224/16-21 от 24.04.2026 г.).

Определено, что срок окупаемости затрат на строительство и эксплуатацию сооружений составит около 5 лет, а общее снижение платы за сверхнормативный сброс соединений азота и фосфора в водные объекты составит более 1 млн. 750 тыс. руб. в год.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования состоит в применении комплекса экспериментальных методов сравнительного анализа микробных сообществ активного ила и биопленки в процессах глубокого удаления фосфатов, а также соединений азота и углерода из сточных вод. В работе использованы методы проведения технологических экспериментов по культивированию микробных сообществ с использованием реактора последовательно-периодического действия и биофильтрационных установок. Кинетика и динамика изменения основных показателей процесса очистки модельных растворов сточных вод анализировались с помощью стандартных спектрофотометрических и титриметрических методик. В качестве дополняющей оценки фосфатаккумулирующей способности использованы электронно-микроскопические исследования и рентгеновский (рентгеноспектральный) микроанализ. Таксономический состав микробиоценоза и идентификацию чистых бактериальных культур осуществляли профилированием по гену 16S рРНК.

Положения, выносимые на защиту:

1. Сукцессия микробного сообщества активного ила в процессе глубокого удаления фосфора в реакторе последовательно-периодического действия проявляется сменой доминирующих групп микроорганизмов в соответствии со стадиями фосфатаккумуляции и дефосфатации. Развитие сообщества, включающего культуру фосфатаккумулялирующих микроорганизмов рода *Azonexus* в количестве 24 %, обеспечивает эффективность дефосфатации среды на 51 % и сопровождается значительным увеличением содержания внутриклеточного фосфора до 12 % от сухой массы клеток.

2. Выраженной способностью к образованию биопленки обладают большинство исследованных штаммов бактерий. Перспективными штаммами для формирования развитой устойчивой биопленки в составе бинарной культуры являются *Alcaligenes faecalis* 2 и *Bacillus subtilis*.

3. При воздействии физико-химических факторов среды в широком диапазоне значений (рН от 5,0 до 10,0; температуры от 10 до 30°C, додецилсульфата натрия в диапазоне концентраций от 5 до 10 мг/дм³) микробные биоплёнки сохраняют структурную устойчивость и ферментативную активность; при этом все исследованные бинарные биоплёнки бактериальных культур характеризуются более высокой устойчивостью и активностью по сравнению с монокультурами.

4. Имобилизованное микробное сообщество активного ила в биофильтре обеспечивает интенсификацию процессов очистки сточных вод с глубоким удалением фосфора. Эффективность удаления фосфат-ионов из среды в биофильтре составила, в среднем, 95 % по сравнению с суспендированной биомассой (78 %), что реализовано в техническом решении по интенсификации процесса биофильтрации сточных вод.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследований обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных результатов, использованием комплекса стандартных методик их аналитического контроля и анализа, а также использованием современных

методов и оборудования для проведения экспериментальных работ. Обработка результатов экспериментов проводилась с помощью пакета прикладных программ Microsoft Excel 2019 с оценкой достоверности по критерию Стьюдента-Фишера. Использовали параметрический t-критерий Стьюдента. Различие считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$.

Материалы диссертации были представлены и обсуждены на: XIII Международной конференции ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2022» (г. Пермь, 2022), Всероссийском форуме молодых исследователей «ХимБиоSeasons – 2023» (г. Кемерово, 2023), XVIII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии» (г. Казань, 2023), Международном экологическом конгрессе «Экология и безопасность жизнедеятельности промышленно-транспортных комплексов ЕLPIT» (г. Самара, 2023, г. Тольятти, 2025), Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (г. Пущино, 2024), XIV Молодежной конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (г. Москва, 2024), Международной научной конференции «Актуальные аспекты и перспективы развития современной биотехнологии» (г. Белгород, 2026).

Публикации. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, были опубликованы в 14 работах, из них 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России по специальности, 1 статья в научном журнале, индексируемом в международной базе данных и системе цитирования Scopus, 11 публикаций в сборниках Международных и Всероссийских научных конференциях.

Финансирование.

Диссертационное исследование выполнялось при поддержке следующих грантов и программ выполнения научно-исследовательских работ:

- фонда содействия инновациям УМНИК по теме «Разработка уникальной методики диагностики фосфатаккумулялирующей способности

активного ила в технологии очистки сточных вод, договор №17133ГУ/2021 от 15.12.2021» (2022-2024 г.г.);

- стипендиальной программы «Алгарыш» Правительства и Минобрнауки Республики Татарстан для выполнения исследований в Институте экологии и генетики микроорганизмов ФИЦ УрО РАН (г. Пермь) по теме «Агрегированные формы микроорганизмов (био пленки, микробные гранулы) в процессах биологической дефосфатации сточных вод» (2022 г.) и в ФИЦ биотехнологии РАН (г. Москва) по теме «Фосфатаккумулирующие и азоттрансформирующие микроорганизмы в составе микробного сообщества и био пленки в технологиях биологической очистки сточных вод» (2024 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Проведенное исследование соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (технические науки), а именно пункту 7: «Разработка новых технологических процессов на основе микробиологического синтеза, биотрансформации, биокатализа, иммуносорбции, биодеструкции, биоокисления, и создания систем биокомпостирования различных отходов, очистки техногенных отходов (сточных вод, газовых выбросов и др.), создание замкнутых технологических систем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 6 глав, заключения, списка литературы. Работа изложена на 186 страницах машинописного текста, содержит 37 рисунков, 21 таблицу, 2 приложения. Библиографический список включает 269 наименований цитируемых работ зарубежных и российских авторов.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в обсуждении цели и задач диссертационного исследования, поиске и анализе литературных данных, выполнении экспериментальных работ на всех этапах исследования, обработке и обсуждении результатов исследований, формулировании выводов, написании публикаций по теме диссертации и представлении результатов диссертационного исследования на конференциях и конкурсах.

Автор выражает благодарность заведующему кафедрой промышленной биотехнологии ФГБОУ ВО КНИТУ, д.т.н. Сироткину Александру Семеновичу за научное руководство, постановку целей и задач исследования, консультирование и обсуждение научных результатов; д.б.н. Максимовой Юлии Геннадьевне, заведующей лабораторией молекулярной биотехнологии Пермского Федерального исследовательского центра УрО РАН, к.б.н. Дорофееву Александру Геннадьевичу, к.б.н. Пелевиной Анне Витальевне, научным сотрудникам ФИЦ Биотехнологии РАН за помощь в ходе проведения исследовательской работы и обсуждения ее результатов.

ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фосфор в сточных водах и методы его удаления

Фосфор в сточных водах. В составе сточных вод фосфор может быть представлен различными формами, различающимися по растворимости и доступности для микробной трансформации. Основной биодоступной формой фосфора является ортофосфат. Конденсированные поли- и пирофосфаты также встречаются в составе сточных вод, и в условиях очистки они первоначально подвергаются гидролизу с образованием ортофосфата [1,2].

Растворённый органический фосфор присутствует в составе сточных вод в форме разнообразных соединений: фосфоэфиров, фосфонатов, нуклеотидов и фосфолипидов. Данные ядерной магнитной резонансной-спектроскопии (^{31}P) показывают, что растворенный органический фосфор может составлять значительную часть общего растворённого фосфора в сточных водах. Основная доля соединений минерализуется с высвобождением ортофосфатов, однако стабильные формы способны проходить через очистные сооружения и формировать остаточную нагрузку по фосфору в сточных водах [3,4].

Существенное количество фосфора в сточных водах находится в твёрдой фазе. К ней относятся внутриклеточные полифосфаты, структурные компоненты клеток (фосфолипиды), а также неорганические соединения, сорбированные или осаждённые на минеральных поверхностях. В условиях низкого содержания кислорода и щелочной среды при обработке и стабилизации осадка значительная часть фосфора отмечается в форме минерального соединения – вивианита ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) [5,6]. В аэробных зонах очистных сооружений наблюдается образование кальций-фосфатных соединений, тогда как при обработке возвратных потоков, обогащённых аммонием и магнием, типичным процессом является кристаллизация струвита ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) [7].

Особое внимание уделяется коллоидному фосфору, представленному органоминеральными наночастицами, фрагментами биополимеров (экзополисахаридов), остатками клеток и мелкодисперсными фосфатными минералами. Данная фракция не задерживается при стандартной фильтрации и составляет основу «остаточного» фосфора в биологически очищенных сточных водах [8]. Это обстоятельство существенно осложняет достижение нормативных показателей очистки, поэтому внедряются дополнительные стадии доочистки стоков (ультрафильтрация, сорбция, мембранное отделение).

В таблице 1.1 представлены данные о содержании форм фосфора в сточных водах [7].

Таблица 1.1 – Содержание различных форм фосфора в сточных водах

Форма фосфора	Доля от общего содержания фосфора, %	Нахождение в технологической линии процесса очистки сточных вод
ортофосфаты (PO_4^{3-})	50-80	в поступающей сточной воде
конденсированные фосфаты (поли-, пирофосфаты)	5-15	в поступающей сточной воде
растворённый органический фосфор	30-80	биологически очищенных сточных водах
коллоидный фосфор	10-30	биологически очищенных сточных водах
взвешенный органический фосфор	20-40	в поступающей сточной воде, первичный осадок
минерализованный фосфор (Fe-, Al-, Ca-связанный)	10-35	осадок, линия стабилизации

Химические и комбинированные методы удаления фосфора. Одним из распространенных химических методов является осаждение ортофосфатов с помощью реагентов – солей трёхвалентного железа, алюминия и кальция. Введение Fe(III) и Al(III) приводит к образованию аморфных фосфатных осадков и к соосаждению растворённых и коллоидных форм фосфора. В оптимальных условиях процесса обработки достигается удаление более 90 % поступающего фосфора, а концентрация общего фосфора в очищенной воде

снижается до 0,2-0,3 мг/дм³. Однако метод сопровождается значительным образованием осадка и повышенной щёлочностью среды [1, 9].

Принцип метода электрокоагуляции основан на том, что коагулянт генерируется *in situ* на поверхности электродов, что снижает потребность в реагентах и позволяет гибко управлять процессом [10]. Исследования показывают, что электрокоагуляция обеспечивает эффективное удаление ортофосфатов и частично органических форм фосфора. Внедрение метода ограничивается энергозатратами и необходимостью оптимизации использования электродов.

Значительное внимание уделяется адсорбционным технологиям, основанным на применении железо- и алюмосодержащих материалов (гидроксид железа, активированный оксид алюминия), а также лантано-модифицированных сорбентов [11]. Они проявляют высокую эффективность при удалении низких концентраций фосфора, устойчивы к колебаниям состава стока и пригодны для регенерации. Материалы используются на стадии доочистки, обеспечивая концентрацию фосфора в среде менее 0,1 мг/дм³.

Современные химические методы удаления фосфора всё чаще позиционируются как технологии его целенаправленного извлечения. Наибольший интерес представляют процессы контролируемой кристаллизации струвита ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и формирования вивианита ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), обеспечивающие получение вторичных продуктов, пригодных для применения в аграрном секторе и химической промышленности [1].

Среди последних достижений следует отметить разработку нового фотокаталитического метода удаления органических соединений фосфора из сточных вод с использованием фотокатализатора UCN/CdS NP, активируемого под воздействием света, который расщепляет органические соединения фосфора, такие как глифосат, путем разрыва углерод-фосфорных связей (C-P), что приводит к превращению органических соединений фосфора с образованием ортофосфат-ионов [12].

Электро-фентонный процесс является одним из перспективных методов для окисления органических веществ и соединений фосфора. Метод основан на использовании пероксида водорода, который вводится извне, а Fe^{2+} образуется в процессе анодного восстановления. Продуктом взаимодействия H_2O_2 и Fe^{2+} являются гидроксильные радикалы ($\text{OH}\cdot$), окисляющие загрязнители до углекислого газа и неорганических ионов [13].

Удаление загрязняющих веществ, в том числе соединений фосфора, из сточных вод с помощью фотокатализа, в первую очередь, связано с поглощением света фотокатализатором – диоксидом титана, что приводит к образованию электронно-дырочных пар под действием ультрафиолетового облучения. Эти носители заряда инициируют окислительно-восстановительные реакции на поверхности катализатора [14].

Фотокаталитический метод был использован для окисления фосфорорганического инсектицида с использованием TiO_2 , что доказывает потенциал использования процесса для обезвреживания сточных вод.

Биологическое удаление фосфора. Биологический способ глубокого удаления фосфора из сточных вод (Enhanced Biological Phosphorus Removal, EBPR) основан на способности специализированных микроорганизмов – фосфатаккумулирующих бактерий (ФАО) к накоплению внутриклеточного фосфора в форме полифосфатов. Рассматриваемый процесс реализуется в условиях чередования анаэробной и аэробной фаз и требует наличия легкоусвояемого органического субстрата, преимущественно летучих жирных кислот (ЛЖК) [15].

В отсутствие кислорода и нитрат-ионов ФАО используют энергию, полученную в результате гидролиза накопленных полифосфатов для транспорта и накопления ЛЖК. При этом осуществляется высвобождение ортофосфатов во внешнюю среду, синтез полигидроксиалканоатов (ПГА) с расщеплением внутриклеточного гликогена как дополнительного источника энергии. Таким образом, анаэробная стадия сопровождается выбросом фосфата в среду и формированием энергетического запаса в виде ПГА.

В присутствии растворенного кислорода (или нитратов для денитрифицирующих ФАО, ДФАО) микроорганизмы окисляют накопленные ПГА, и освободившаяся энергия используется для сверхстехиометрического поглощения ортофосфата из окружающей среды, а также восстановления запасов гликогена [16].

Подробно метаболические процессы биотрансформации соединений фосфора и ЛЖК будут рассмотрены в разделе 1.2.2.

В полномасштабных очистных сооружениях типа EBPR эффективность удаления фосфора достигает 80-95 %, что соответствует остаточной концентрации общего фосфора 0,3-1,0 мг/л в очищенной воде. В оптимальных условиях (поддержание рН в диапазоне 7,0-7,5, контроля уровня растворённого кислорода и исключения поступления нитратов в анаэробную зону) возможно достижение низких значений фосфора в среде. Однако в очищенной воде присутствуют соединения фосфора, менее доступные для биологической трансформации, что определяет необходимость процесса доочистки [17].

Разновидности технологий процесса EBPR:

- процессы Anaerobic/Oxic (A/O) и Anaerobic/Anoxic/Oxic (A2/O)

Процессы A/O и A2/O предназначены для одновременного удаления азота и фосфора из сточных вод. В соответствующих технологических схемах возвратный ил вместе со сточной водой поступает в анаэробную зону, затем направляются в аэробную стадию и уходят во вторичный отстойник (рисунок 1.1) [18].



Рисунок 1.1 – Схема процесса A2/O

Данные процессы очистки характеризуется стабильной работой и сравнительно высокой эффективностью удаления как азота, так и фосфора, однако чувствительны к колебаниям концентрации органического углерода в поступающей воде.

- процесс University of Cape Town (UCT)

В рассматриваемой технологической схеме возвратный активный ил поступает в аноксидную зону. Вследствие этого отмечается внутриклеточное накопление ПГА в клетках ФАО. В дальнейшем для снижения концентрации нитрат-ионов в анаэробной зоне осуществляется дополнение схемы конфигурацией А2/О. Отмечено, что большее высвобождение фосфат-ионов в анаэробных условиях привело к повышению эффективности поглощения соединений фосфора в последующей аэробной фазе.

В модифицированном UCT-процессе реализуется внутренняя подсистема рециркуляции активного ила. Это приводит к минимизации влияния нитратов и нитритов на высвобождение фосфат-ионов и дальнейшего их удаления из сточных вод (рисунок 1.2).

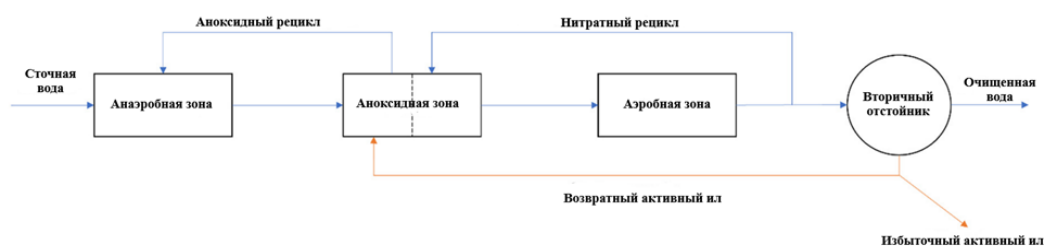


Рисунок 1.2 – Схема UCT-процесса

Было исследовано использование технологии А/О в схеме UCT-процесса [19]. В ходе экспериментальных исследований была обеспечена высокая эффективность удаления азота (в среднем 88 %) и фосфора (до 93 %).

Технология глубокого удаления фосфора с дополнительным потоком (Sidestream Enhanced Biological Phosphorus Removal, S2EBPR) представляет собой усовершенствованный вариант классического процесса EBPR,

предназначенный для повышения устойчивости и эффективности систем при низком содержании органических веществ и нестабильной гидравлической нагрузке. Основное отличие S2EBPR от традиционных схем заключается во включении в схему вспомогательного анаэробного реактора, в котором создаются оптимальные условия для активации ФАО и образования ЛЖК [20].

Концепция процесса S2EBPR направлена на частичное перераспределение потоков активного ила из основного контура очистки в вспомогательный реактор. В дополнительном потоке происходит внутреннее сбраживание органического вещества и гидролиз осадка, что обеспечивает образование ЛЖК, необходимых для метаболической активности ФАО в анаэробной фазе. Микроорганизмы из вспомогательного (бокового) реактора возвращаются в основной реактор (аэротенк), где они утилизируют ортофосфаты в аэробных условиях (рисунок 1.3).



Рисунок 1.3 – Схема процесса с S2EBPR

Согласно недавним исследованиям [21], в S2EBPR-системах достигается повышение концентрации внутриклеточных запасов ПГА на 15-25 %, а эффективность удаления фосфора возрастает до 95-98 %, при этом процесс характеризуется устойчивостью к колебаниям C/N-соотношения.

Технологии, основанные на активности денитрифицирующих ФАО (ДФАО), представляют собой развитие классических схем EBPR и направлены на совместное удаление фосфора и азота [22]. В отличие от традиционных систем, где восстановление фосфора осуществляется

исключительно в аэробных условиях с использованием кислорода в качестве конечного акцептора электронов, ДФАО используют нитрат- или нитрит-ионов для восстановления и аккумуляции фосфора.

Основные процессы можно описать уравнениями:



В случае необходимости дополнительного удаления органических веществ или нитрификации процесс очистки может включать короткую аэробную стадию, где происходит финальное поглощение фосфора и восстановление энергетического потенциала клеток (рисунок 1.4).



Рисунок 1.4 – Конфигурация с использованием ДФАО

Результаты молекулярных исследований [23, 24] показали, что процесс денитрификации с ФАО реализуется с участием специализированных ферментативных систем – нитратредуктазы (*narGHIJ*), нитритредуктазы (*nirS*), и N_2O -редуктазы (*nosZ*), обеспечивающих полное восстановление азота. В то же время метаболизм углерода и фосфора аналогичен классическим ФАО. Эффективность удаления фосфора достигает 90-95 %, соединений азота – 80-85 %.

Наконец, одной из перспективных ресурсно-восстановительных технологий является комбинация EBPR с последующим извлечением и восстановлением фосфора из осадков или жидкой фазы сточных вод [25]. На линии брожения осадка происходит высвобождение фосфатов в жидкую фазу,

где их концентрация может достигать 200-1000 мг P/дм³. Далее среда с высоким содержанием фосфора целевым образом используется для процессов химической или кристаллизационной рекуперации фосфора, при которых образуются нерастворимые фосфатные соли (струвит, апатиты и др.).

Рассмотренные системы биологической очистки сточных вод от соединений фосфора основаны на чередовании аэробных и анаэробных зон в биореакторах. Факторами, определяющими эффективность процесса биодефосфатации сточных вод, являются:

- соотношение содержания углеродных субстратов и биогенных элементов – фосфора и азота;
- степень аэрации системы культивирования;
- природа и свойства носителя для закрепления активной биомассы;
- продолжительность контакта биоценоза и жидкой фазы.

1.2 Микробная дефосфатация и фосфат-аккумуляция в процессах очистки сточных вод

Основные группы фосфатаккумулялирующих микроорганизмов. Способность к внутриклеточному накоплению соединений фосфора выявлена у различных филогенетических групп микроорганизмов. Их характеризуют как аэробные гетеротрофные бактерии, способные на стадии анаэробно-анаэробно-анаэробно преобразовывать легкоусвояемые органические соединения в полимеры – ПГА. Энергия, необходимая для усвоения ПГА, вырабатывается в результате гидролиза фосфодиэфирных связей, входящих в состав полифосфатов [26].

В первых исследованиях, посвященных выделению изолятов фосфатаккумулялирующих микроорганизмов, были идентифицированы бактерии рода *Acinetobacter* класса *Gammaproteobacteria* [27]. На основе результатов количественного учета жизнеспособных бактериальных колоний, растущих на селективных питательных средах, выдвигалось предположение о том, какие культуры микроорганизмов являются ответственными за

биоаккумуляцию соединений фосфора, и, согласно данным Barker и Dold [28], бактерии *p. Acinetobacter* впервые были предложены в качестве типичных представителей ФАО. В дальнейшем с помощью методов флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH), библиотеки клонов на основе 16S рРНК и денатурирующего градиентного гель-электрофореза было доказано, что состав микробиоценоза активного ила характеризуется большим разнообразием филогенетических групп микроорганизмов, биоаккумулирующих фосфаты [29] (рисунок 1.5).

В исследованиях с применением специфических зондов FISH представлены результаты незначительного содержания в промышленных активных илах бактерий *p. Acinetobacter* по сравнению с представителями других филогенетических групп, отнесенных к классам *Betaproteobacteria* и *Actinobacteria* [30].

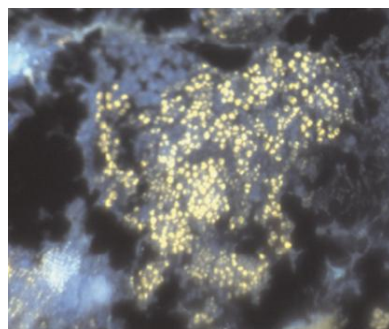


Рисунок 1.5 – Микрофотография фосфатаккумулирующих бактерий. Клетки ФАО флуоресцируют ярким желтым цветом

К микроорганизмам, принадлежащим к группе ФАО, предположительно относят *Micrococcus phosphovorans* – аэробные грамположительные кокки с хемоорганотрофным типом обмена. Для них характерно содержание внутриклеточного фосфора более 10 %. Однако метаболизм *M. phosphovorans* характеризуется усвоением сахаров, но не летучих жирных кислот (например, ацетата), что не соответствует типичному фенотипу фосфатаккумулирующих микроорганизмов [31].

а также небольшое количество глутамина, серина и аланина, запасующиеся внутриклеточно в анаэробных условиях [36]. Отмечено, что некоторые виды бактерий в присутствии соединений азота способны поглощать фосфат-ионы и восстанавливать нитраты до нитритов. Бактерии р. *Tetrasphaera* используют аминокислоты как основной углеродный субстрат, поэтому наличие определенных легкоусвояемых органических соединений в среде является ключевым фактором для их использования в очистке сточных вод с высоким содержанием белков.

В настоящее время основным представителем ФАО считается *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, филогенетически связанный с семейством *Rhodocyclaceae* класса *Betaproteobacteria*, относящийся к некультивируемым видам [37] (рисунок 1.7).

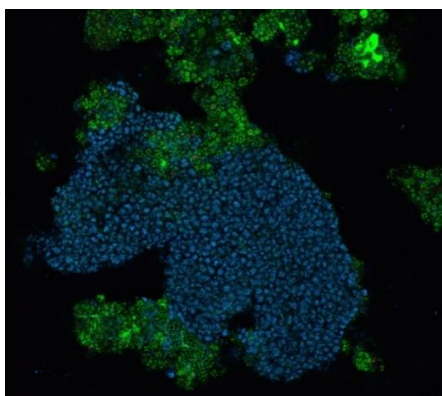


Рисунок 1.7 – Микрофотография *Candidatus Accumulibacter phosphatis*, окрашенных синим цветом

Crocetti с соавторами [38] разработали три флуоресцентных зонда, специфичных для ФАО. Согласно литературным данным бактерии р. *Accumulibacter* в больших количествах представлены в полномасштабных очистных сооружениях и участвуют в процессе биологической дефосфатации сточных вод. Тип метаболизма, характерный для микроорганизмов, аккумулирующих фосфат-ионы, соответствует описанному для микроорганизмов р. *Accumulibacter*. Показано, что помимо ацетата представители р. *Accumulibacter* способны

ассимилировать пропионат, пируват, глутамат, олеиновую кислоту и несколько видов аминокислот: лейцин, глицин и аспаратат [39].

На основании характеристики гена полифосфаткиназы *ppk1* р. *Accumulibacter* был разделен на два основных подтипа (тип I и II), каждый из которых состоит из нескольких различных консорциумов IA-IE, IIА-II I [40]. Проведенный метагеномный анализ показал, что для р. *Accumulibacter* характерно присутствие генов, отвечающих за фиксацию азота и диоксида углерода. В результате экспериментальных исследований выявлены экофизиологические отличия между представителями р. *Accumulibacter*. Две отдельные популяции указанных типов микроорганизмов обогащались путем использования в составе питательной среды нескольких источников углеродного субстрата. Обнаружено, что бактерии обладают различной способностью к восстановлению нитрат-ионов [41]. Впоследствии было обнаружено [42], что консорциум IA может сочетать процессы поглощения соединений фосфора с восстановлением нитратов, в то время как у консорциума IIА этого не наблюдается. Исследования, связанные с изучением экспрессии генов цикла трикарбоновых кислот, показали существенные различия в анаэробном и аэробном путях метаболизма у двух популяций р. *Accumulibacter* [43]. При этом опубликованы научные работы, демонстрирующие влияние концентрации запасенных веществ на развитие р. *Accumulibacter*: при снижении количества внутриклеточных полифосфатов у консорциума IIА, происходит переход метаболизма на аккумуляцию гликогена, что в дальнейшем не способствует удалению фосфат-ионов из системы [44].

Schreiber с соавторами описывает способность к накоплению соединений фосфора у *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida* и *P. fluorescens*, которые, тем не менее, не охарактеризованы как истинные представители фосфатаккумулялирующих бактерий [45]. В исследованиях по изучению микроорганизмов *Corynebacterium glutamicum* в условиях насыщения среды растворенным кислородом выявлен высокий уровень полифосфатов внутри клеток (600 мМ единиц фосфора в цитозоле или 3 % фосфора) [46]. С помощью

электронной микроскопии в клетках мутантного штамма *Escherichia coli* были обнаружены гранулы волютина размером около 20 нм [47]. В других работах сообщается о штамме *Rhodospirillum rubrum*, содержащем полифосфаты размером около 100 нм, как в случае *P. aeruginosa*. Seufferheld и соавторами отмечено [48], что фосфат-ионы накапливаются в ацидокальцисомах у *Agrobacterium tumefaciens*.

В отличие от обычных ФАО, денитрифицирующие ФАО используют нитрат- и нитрит-ионы в качестве акцепторов электронов для поглощения фосфатов и синтеза гликогена при чередовании анаэробных и аноксидных условий [49]. ДФАО восстанавливают нитрат- или нитрит-ионы до молекулярного азота (N_2) (рисунок 1.8).

В этом процессе ПГА служат не только источником энергии для поглощения фосфора и синтеза полифосфата, но и источником углерода для денитрификации [50], что приводит к конкуренции за углеродный субстрат.

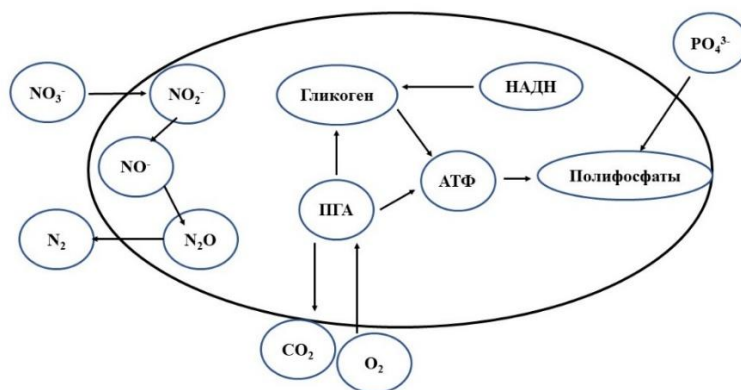


Рисунок 1.8 – Принципиальная схема метаболизма денитрифицирующих ФАО в аэробном/аноксидном периоде

Следует отметить, что у представителейДФАО с укороченным путем процесса денитрификации – микроорганизмов, использующих нитрит-ионы напрямую как акцептор электронов или с образованием конечного продукта

N_2O без дальнейшего восстановления до N_2 , обнаружена способность к повышенному накоплению фосфора, чем у классических ДФАО (клады ПА и ПС микроорганизмов *Candidatus Accumulibacter*) [51].

Одним из актуальных направлений в изучении процесса глубокого удаления фосфора является исследование сероокисляющих ФАО (С-ФАО), использующих соединения серы в качестве акцепторов и доноров электронов (рисунок 1.9).

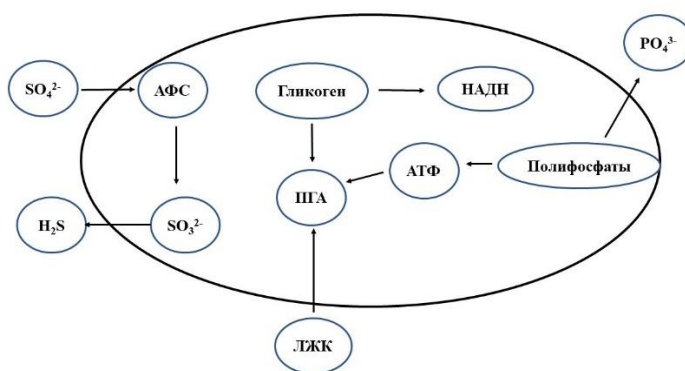


Рисунок 1.9 – Принципиальная схема метаболизма сероокисляющих ФАО в анаэробном периоде (АФС – аденозин-5'-фосфосульфат, ЛЖК – летучие жирные кислоты)

В анаэробном периоде осуществляется высвобождение фосфора и накопление ПГА. На этой стадии сульфат-ионы восстанавливаются микроорганизмами до сульфид-ионов. В аноксидной фазе С-ФАО поглощают фосфор из среды, используя энергию, получаемую при окислении ПГА, и одновременно окисляют сульфид-ионы в сульфаты, тем самым замыкая цикл серы [52]. За счет фосфатаккумулирующей способности двух семейств бактерий родов *Desulfobacteraceae* и *Rhodobacteraceae* эффективность удаления фосфора достигается в среднем 50 % [53]. Потенциальными представителями С-ФАО являются бактерии родов *Thiothrix*, *Thiomicrospira*, *Beggiatoa*, *Thiobacillus* [54].

Метаболические пути внутриклеточного накопления и высвобождения фосфора. Рассмотрим существующие эмпирические модели, описывающие механизм биоаккумуляции соединений фосфора в процесс их потребления из сточных вод.

В подавляющем большинстве исследований в качестве углеродного субстрата используются соли уксусной кислоты, так как она является одной из известных летучих жирных кислот, присутствующих в сточных водах очистных сооружений [55-59]. В большинстве описанных моделей процесс интенсивного удаления фосфатов в процессе биоаккумуляции объясняется тем, что в биореакторах создаются режимы анаэробной/аэробной рециркуляции биомассы в процессе очистки стоков. В результате такого стрессирования стимулируется внутриклеточное запасание полифосфатов с удалением фосфат-ионов из среды, и увеличивается доля ФАО в составе сообщества по сравнению с другими бактериальными популяциями.

В аэробной стадии ацетат как легкоокисляемое органическое соединение трансформируется с образованием внутриклеточных биополимеров – ПГА, в частности, наиболее распространенных полигидроксibuтирата (ПГБ) и полигидроксивалерата (ПГВ) [59], а фосфаты запасаются в виде полифосфатов (рисунок 1.10).

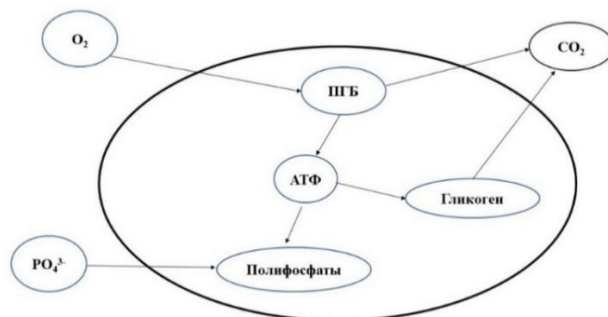


Рисунок 1.10 – Принципиальная схема процесса фосфатаккумуляции микроорганизмов в аэробной стадии

Далее в анаэробной стадии летучие жирные кислоты преобразуются до ацетил-КоА. Рассматриваемый процесс сопровождается протеканием окислительно-восстановительной реакции, где аденозиндифосфат (АДФ) преобразуется в аденозинтрифосфат (АТФ) путем переноса фосфорной группы от полифосфатов и поглощения 7,4 ккал/моль энергии [60]. В результате гидролиза полифосфатов образуются катионы K^+ , Mg^{2+} и анион PO_4^{3-} , высвобождаемые во внешнюю среду (рисунок 1.11).

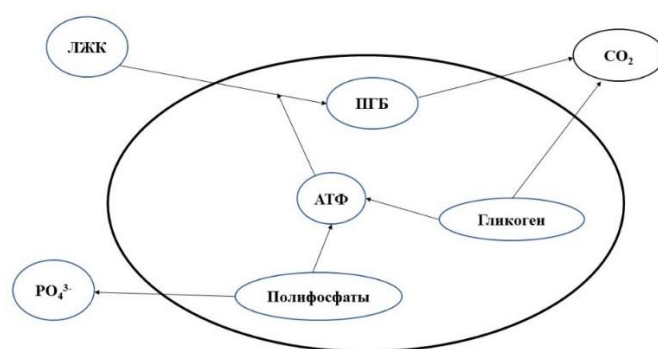


Рисунок 1.11 – Принципиальная схема процесса фосфатаккумуляции микроорганизмов в анаэробной стадии

Две молекулы ацетил-КоА конденсируются с образованием ацетоацетил-КоА. Образовавшееся соединение восстанавливается НАДН с образованием 3-гидроксибутирил-КоА, который в дальнейшем полимеризуется до ПГБ [61].

Важно отметить, что внутриклеточный полифосфат является основным источником энергии для микроорганизмов при анаэробном поглощении ЛЖК [62, 63]. Рассматриваемые полимеры ранее были обнаружены у бактерий и одноклеточных эукариот, обозначаемые как метахроматические или волютиновые гранулы. В дальнейшем было доказано, что полифосфаты являются одними из основных компонентов микроорганизмов и стали называться полифосфатными гранулами или ацидокальцисомами [64].

Полимеризация полифосфатов в клетках бактерий осуществляется при участии фермента полифосфаткиназа (*ppk1*; полифосфат: АДФ-фосфотрансфераза) [65]. Гены фермента полифосфаткиназа обнаружены у *E. coli* [66], *Klebsiella aerogenes* [67], *Neisseria meningitidis* [68], *Pseudomonas aeruginosa* [69], *Acinetobacter* sp., *V. cholerae* [70], *Rhodocyclus tenuis* [71] и многих других бактерий.

Некоторые микоризные грибы накапливают большое количество полифосфатов, растворяя минеральный фосфор из почвы. Далее запасы этих соединений локально гидролизуются в клетках грибов, чтобы обеспечить фосфатом симбиотическое растение [72]. Кроме того, хлорофитная микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* аккумулирует полифосфаты в ацидокальцисомах в ответ на недостаток соединений серы, фосфора или азота [73]. Бактерии способны накапливать полифосфаты при росте на несбалансированной среде. Например, клетки *E. coli* или *Acetobacter xylinum* (рисунок 1.12) [74] концентрируют избыток внеклеточных фосфат-ионов в виде гранул полифосфата при аминокислотном или азотном дефиците [75]. Бактерии активного ила из таких таксонов, как *Mycobacteria*, *Corynebacteria* и *Eubacteria*, аккумулируют значительное количество полифосфатов (до 30 % от сухой массы).

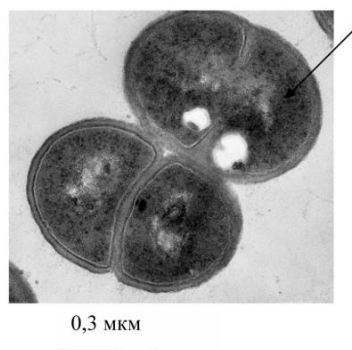


Рисунок 1.12 – Внутриклеточные полифосфаты в клетках *Acetobacter xylinum*

Таким образом, биологическая аккумуляция фосфатов – распространенный процесс клеточного метаболизма микроорганизмов.

Преимущественное накопление внутриклеточных волютиновых гранул или ацидокальцисом характерно для представителей родов *Accumulibacter* и *Tetrasphaera*. На процесс клеточного метаболизма при биодефосфатации среды оказывают влияние состав органических источников углерода и восстанавливающих эквивалентов, механизм транспорта фосфатов и ЛЖК через клеточную мембрану, активность ферментов, участвующих в синтезе полифосфатов, и взаимодействие волютиновых гранул с катионами металлов.

Факторы, определяющие эффективность процесса фосфатаккумуляции.

Влияние источника углерода.

В инженерных системах различные источники углерода влияют на фосфатаккумулялирующие бактерии активного ила. Как показали исследования [76], ацетат и пропионат широко применяются в экспериментах по обогащению ФАО. Следует отметить, что использование нескольких источников углерода (например, глюкозы, ацетата натрия и гидролизата казеина) увеличивают долю бактерий родов *Tetrasphaera*, тем самым обеспечивая высокую эффективность удаления фосфора (85 %) и азота (80 %) [77].

Некоторые аминокислоты также могут являться потенциальными источниками углерода для реализации процесса глубокого удаления фосфатов. Исследования подтверждают, что *Accumulibacter sp.*, *Tetrasphaera sp.* и *Rhodocyclus sp.* способны накапливать полифосфаты при использовании аспарагиновой или глутаминовой кислот [78].

Глюкоза является одним из распространенных веществ в бытовых сточных водах, которое не оказывает влияние на обогащение микробного сообщества фосфатаккумулялирующими бактериями. Однако, недавние исследования показали, что EBPR-процесс на основе ацетата/глюкозы (1:1) способствует увеличению доли бактерий р. *Accumulibacter* на 65 % [79].

В системе с отъемно-доливным реактором (SBR-реактором), где в качестве источника углерода использовали крахмал, была достигнута эффективность дефосфатации, в среднем, 80 %. Авторы выдвинули предположение, что крахмал подвергается ферментативному превращению с

образованием молочной кислоты, и именно её использование способствует более интенсивному удалению фосфора [80].

Использование длинноцепочечных жирных кислот в качестве источника углерода для интенсификации EBPR-процесса возможно, поскольку было показано, что они не оказывают ингибирующего действия/токсичности на ФАО. Применение смеси ЛЖК (уксусной и пропионовой кислот) и среднецепочечных жирных кислот (миристиновой и пальмитиновой) в соотношении 2:3 обеспечило успешное высвобождение и поглощение фосфора при соотношении P/C от 0,1 до 0,4 [81].

Таким образом, согласно результатам проведенных исследований, ацетат и пропионат являются наиболее важными и эффективными субстратами для обогащения сообщества активного ила бактериями рода *Accumulibacter*.

Влияние pH среды. Роль pH в процессах фосфатаккумуляции и дефосфатации проявляется в нескольких аспектах. Оптимальный диапазон pH для фосфатаккумуляции составляет 6,0-8,0, так как поддержание pH в этих пределах подавляет гликоген-аккумулирующие организмы (ГАО) со снижением скорости поглощения ацетата и обеспечивает конкурентное преимущество ФАО [82].

Показано [83], что в анаэробной стадии скорость удаления фосфатов была выше при поддержании pH в диапазоне 6,4-7,2. Кроме того, активность ферментов, связанных с процессами удаления фосфора – полифосфаткиназы и аденилаткиназы увеличивается с ростом pH, что способствует синтезу полифосфатов [84].

В других работах показано, что от pH среды зависят соотношения между различными фосфатаккумулирующими бактериями. Так, в интервале значений pH от 9,0 до 10,0 в инженерных системах обнаруживались только *Acinetobacter* sp. и *Pseudomonas* sp., а при pH 5,0-6,0 – классические ФАО *Alcaligenes* sp [85].

Влияние температуры среды. Для большинства штаммов ФАО (семейств *Rhodobacteraceae*, *Desulfobacteraceae*, бактерий родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*) максимальная продуктивность процесса фосфатаккумуляции достигается при температуре 20-30 °С. Это может объясняться активностью ряда ключевых ферментов, участвующих в процессах удаления фосфора, таких как экзополифосфатаза и полифосфаткиназа [86].

С открытием психрофильных бактерий, например *Acinetobacter johnsonii*, эффективность удаления фосфора может достигать 80 % [33]. Однако EBPR-системы с активным илом при низких температурах не обеспечивают эффективную дефосфатацию сточных вод.

Следует учитывать, что ГАО активны при повышенных температурах (>40 °С), получая конкурентное преимущество в EBPR-системах [87]. Тем не менее, в некоторых странах EBPR-технологии широко применяются для очистки сточных вод, где температура зимой значительно ниже 20 °С [88]. Это указывает на то, что в этих случаях такие параметры среды, как растворённый кислород (pO_2), источник углерода и время контакта с микроорганизмами компенсируют негативное влияние низких температур, что не оказывает значительного влияния на активность ФАО.

Влияние концентрации растворенного кислорода. Растворённый кислород (pO_2) также является важным фактором, влияющим на активность фосфатаккумулялирующих организмов. Низкий уровень растворенного кислорода в анаэробной фазе (ниже 0,3 мг/дм³) способствует уменьшению скорости потребления легкоразлагаемого органического вещества, благодаря чему ФАО могут синтезировать больше ПГБ. Напротив, в аэробной фазе требуется достаточное количество pO_2 (выше 2,0 мг/дм³) для осуществления разложения запасенного ПГБ и для поглощения фосфатов из среды [89].

Влияние тяжелых металлов. Для реализации эффективного технологического процесса удаления фосфора из сточных вод необходимо осуществлять контроль за составом и концентрацией тяжелых металлов.

Согласно литературным исследованиям, присутствие соединений олова в сточной воде вызывают ингибирование EBPR-процесса. Снижение эффективности EBPR-процесса наблюдалось в случае, когда суммарная концентрация олова превышала 4 г/дм^3 . Было сделано предположение [90], что именно органические формы олова уменьшают эффективность дефосфатации сточных вод.

Медь (Cu^{2+}) – один из наиболее распространённых тяжёлых металлов, присутствующих в сточных водах гальванических производств. Влияние ионов меди на активность ФАО было исследовано Wang и соавт. [91] с точки зрения внутриклеточных превращений запасных соединений, включая полифосфаты, ПГА и гликоген. В частности, подавление реакции расщепления полифосфатов приводило к дефициту энергии, необходимой для восстановления ПГА, что в конечном итоге ухудшало удаление фосфора. Аналогичные результаты получили Tsai и соавт. [92]: в присутствии Cu^{2+} ФАО не способны синтезировать ПГА, так как медь ингибирует активность ферментов ацетил-КоА-синтетазы и полифосфаткиназы.

Chen и соавт. [93] исследовали влияние различных концентраций серебра (Ag^+) ($0\text{-}5 \text{ мг/дм}^3$) на EBPR-процесс. Результаты показали, что при концентрации Ag^+ 1 мг/дм^3 эффективность EBPR-процесса снижалась до 48 %, а при концентрациях выше 2 мг/дм^3 удаление фосфора полностью прекращалось. Дальнейший анализ показал, что снижение анаэробного высвобождения фосфора под действием Ag^+ связано с подавлением активности экзополифосфатазы, ответственного за гидролиз полифосфатов. При этом введение Ag^+ не вызывало повреждения клеточной мембраны, что указывает на то, что основной механизм токсичности связан с ферментативным ингибированием.

Хром (Cr^{6+}) известен как один из наиболее токсичных элементов, присутствующий в сточных водах. Влияние соединений Cr^{6+} на систему EBPR было исследовано Fang и соавт. [94]. Результаты показали, что при концентрации Cr (VI) выше 5 мг/дм^3 процесс удаления фосфора полностью

прекращается. При этом ГАО и другие группы микроорганизмов проявляли меньшую чувствительность к Cr(VI), чем ФАО.

Влияние нитрит/нитрат-ионов. Нитрит-ионы являются промежуточным продуктом в процессах нитрификации и денитрификации. В некоторых случаях нитриты могут снижать или полностью останавливать активность микроорганизмов, а также изменять состав микробного сообщества [95,96]. Предполагается, что нитриты подавляют активность полифосфаткиназы и ингибируют гидролиз ПГА [97]. Saito и др. [98] также сообщили, что нитриты негативно влияют на поглощение фосфора и образование полифосфатных гранул.

Стоит отметить, что микробное сообщество в мембранном биореакторе (MBR) более устойчиво к повышенным концентрациям нитритов, чем активный ил в SBR-реакторах [99], что может быть связано с защитными механизмами клеточных агрегатов [100].

Накопление нитратов в сточной воде городских очистных сооружений, где осуществляется одновременное удаление углерода, азота и фосфора, как правило, приводит к сбоям в EBPR-процессе. Нитрат-ионы в анаэробной среде могут ингибировать активность ФАО или усиливать конкуренцию между ФАО и денитрифицирующими микроорганизмами за органический субстрат [101]. Установлено, что в присутствии нитратов соотношение высвобождения фосфора к поглощению углерода значительно снижается.

Guerrero и соавт. [102] изучили влияние конфигурации очистных установок на ингибирующее действие нитрата. Их результаты показали, что в анаэробно-аноксидно-аэробной (A₂/O) системе требовалось достаточное количество активных ФАО, устойчивых к нитратам и способных конкурировать с денитрификаторами за углеродный субстрат. В то же время в анаэробно-аэробных SBR-системах нитраты оказывали отрицательное воздействие на эффективность EBPR, снижая способность ФАО к накоплению и поглощению фосфора.

Таким образом, метаболические особенности фосфатаккумуляции позволяют интенсифицировать процесс глубокого удаления фосфора на действующих очистных сооружениях. Однако процесс чувствителен к физико-химическим условиям среды, соотношению конкурирующих за субстрат групп микроорганизмов, содержанию металлов и других компонентов, находящихся в поступающих стоках. В связи с этим актуальным остаются исследования, посвященные изучению путей внутриклеточного накопления соединений фосфора, представителей ФАО в активном иле, факторов, обеспечивающих высокоэффективную дефосфатацию сточных вод.

1.3 Агрегированные формы микробных сообществ

Активный ил: морфология и функциональная роль. Активный ил – это сообщество бактерий, дрожжей, грибов, простейших, окруженных полимерным матриксом, выделяемым гель-продуцирующими микроорганизмами. С физико-химической точки зрения активный ил – гетерогенная коллоидная система, где механизм агрегирования клеток осуществляется посредством флокулообразования с участием внеклеточных полимеров [103].

В микробиоценозе активного ила насчитывается в среднем 10^{18} бактериальных клеток на 1 мл. Организмы активного ила представлены разнообразными филогенетическими группами: бактерии, археи, эукариоты (грибы, водоросли, простейшие) и вирусы. Бактерии играют основную роль в процессах биологической очистки сточных вод от загрязняющих веществ [104, 105].

Современные методы молекулярно-генетической идентификации позволили обнаружить большое количество новых таксономических групп, включая группы микроорганизмов, некультивируемые в лабораторных условиях микроорганизмов.

Помимо общего описания микробных сообществ был проведен ряд исследований по каталогизации функциональных групп микроорганизмов,

играющих основную роль в процессах очистки сточных вод от загрязняющих веществ. К ним относятся нитрификаторы (аммонийоокисляющие (АОБ)) [106] и нитритоокисляющие бактерии (НОБ) [107], денитрификаторы [105], ФАО и нитчатые бактерии [108].

В настоящее время известна таксономия автотрофных нитрифицирующих бактерий и их количественное соотношение в хозяйственно-бытовых илах. Так, нитрификаторы, в среднем, составляют от 5,3-11,5 % от общего числа микробного сообщества [109]. В больших количествах присутствуют денитрификаторы (р.р. *Curvibacter*, *Azoarcus*, *Thauera*, *Zoogloea*), фосфатаккумуляторы (р.р. *Tetrasphaera*, *Acinetobacter*, *Accumulibacter*) и нитчатые бактерии (р.р. *Microthrix*, *Gorodonia*).

Численность и процентное соотношение указанных групп микроорганизмов представлено в таблице 1.2.

Таблица 1.2 – Процентное содержание таксономических групп микроорганизмов в активном иле хозяйственно-бытовых сточных вод

Функциональная группа	Род, вид микроорганизма	Процентное соотношение	Ссылка на литературный источник
АОБ	<i>Nitrosomonas oligotropha</i>	1,7	106
	<i>Betaproteobacteria</i>	0,01-2,8	106
НОБ	<i>Nitrospira</i>	1,27	109
	<i>Nitrospira</i> , <i>Nitrobacter</i>	4,02	109
	<i>Nitrospira</i>	8,6	110
денитрификаторы	<i>Curvibacter</i>	10-30	111
	<i>Azoarcus</i>	3-16	111
	<i>Thauera</i>	2-11	111
	<i>Zoogloea ramigera</i>	более 10	112
	<i>Dechloromonas</i>	6-24	113
ФАО	<i>Accumulibacter</i>	1,0-10,8	112
	<i>Acinetobacter</i>	3,1-5,4	112
	<i>Tetrasphaera</i>	20-30	108
	<i>Microthrix parvicella</i>	1-3	114
	<i>Gordonia</i>	10,3-23,5	115
нитчатые бактерии	<i>Chloroflexi</i>	10,1	108
	TM 7 (phylum)	5	108

Особое значение представляют протозойные организмы (р.р. *Paramecium*, *Vorticella*, *Carchesium*, а также колероватки, брюхохоресничные, черви), участвующие в процессе биологической очистки сточных вод и в образовании хлопьев активного ила. Ряд гидробионтов выступают в качестве индикаторных микроорганизмов. По их физиологическому состоянию можно определять состояние и способность активного ила к восстановлению после залповых сбросов загрязнителей [116].

Биопленки: состав, устойчивость и роль в процессах удаления фосфора. Биоплёнка представляет собой сообщество микробных клеток, прочно прикреплённых к поверхности и/или инкапсулированных в матрицу, которая сформирована внеклеточными полимерными веществами (ЭПС, англ. EPS - extracellular polymeric substances). В состав ЭПС входят экзополисахариды, нуклеиновые кислоты (внеклеточная ДНК и РНК [117]), белки, липиды и другие биомолекулы. ЭПС способствуют прикреплению микроорганизмов к биотическим и абиотическим поверхностям. Далее формируется матрица, которая окружает и скрепляет клетки между собой, удерживая их в тесной близости и обеспечивая межклеточные взаимодействия в ограниченном пространстве [117]. Помимо структурной стабильности и функциональной среды, ЭПС повышают устойчивость биоплёнки к факторам окружающей среды и антимикробным веществам [118,119].

Одним из перспективных направлений в области экобиотехнологии является применение биопленочных систем в процессе биоремедиации загрязнённых сточных вод. Благодаря развитому механизму экспрессии генов, иммобилизованные, защитной функции экзополисахаридов, «чувству кворума» - контролируемому механизму передачи клеточных сигналов и синтеза экзоферментов, микробные сообщества демонстрируют более эффективное окисление загрязнителей, чем свободноплавающий микробиоценоз [120] (таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Традиционные биоплёнки для удаления различных загрязняющих веществ

Состав биопленок	Загрязняющие вещества	Ссылка на источник
водорослево-бактериальная биоплёнка	азот	121
	фосфор	
бактериальная биопленка	Cr(VI)	122
	Zn (II)	
	фосфор	123
водорослево-бактериальная биоплёнка	азот	124
биопленка из водорослей	сульфаниламиды	125
биопленка грибов	загрязняющие вещества фармацевтических препаратов	126
микробная биопленка	полициклические ароматические углеводороды	127
грибово-бактериальная биоплёнка	сырая нефть	128
бактериальная биопленка	углеводороды	129
биопленка грибов	ртуть	130
биопленка грибов	Cr(VI)	131
грибово-бактериальная биоплёнка	Cd ²⁺ и Pb ²⁺	132
грибово-бактериальная биоплёнка	Cr(VI)	133

В настоящее время наблюдается повышенный интерес к технологиям очистки сточных вод с биоплёнкой, рассматриваемым как одно из наиболее перспективных направлений интенсификации биологической очистки сточных вод от биогенных элементов, прежде всего, от азота и фосфора. За счёт развитой градиентной структуры микроорганизмов в биоплёнке могут одновременно протекать процессы нитрификации, денитрификации и фосфатаккумуляции, что делает иммобилизованную биомассу перспективной по сравнению с классическими методами очистки [117, 134].

Таким образом, системы с биопленкой отличаются способностью эффективно удалять фосфор с участием ФАО [135]. Биоплёнки создают оптимальные условия для чередования анаэробных и аэробных микрозон, необходимых для метаболизма ФАО. Более того, биоплёнки с участием микроводорослей или смешанных консорциумов дополнительно обеспечивают фиксацию углекислого газа, производство кислорода и

сопутствующее поглощение биогенных элементов, что делает такие системы экологически значимыми и энергетически выгодными [136].

Множество исследований посвящены изучению пространственных слоёв биоплёнок с использованием метагеномных подходов. Установлено [137], что денитрифицирующие бактерии наиболее многочисленны в самом внешнем слое и их количество уменьшается по мере продвижения к более глубоким слоям биоплёнки. Напротив, количество организмов, накапливающих фосфор (ФАО), было самым высоким во внутренних слоях биопленки.

Дополнительным доказательством распределения групп микроорганизмов в биопленке являлась изучение распределения генов, необходимых для метаболизма фосфора. Наблюдался четкий градиент гена полифосфаткиназы (pkk), участвующего в метаболизме полифосфатов, с увеличением по толщине биопленки [137]. Таким образом, немаловажным фактором фосфатаккумуляции является толщина биопленки, определяющая активность и состав микробного сообщества бактерий, накапливающих фосфор [138]. Из представленных выше исследований выявлено, что развитые биоплёнки характеризовались повышенной численностью (40-58 %) потенциальных накопителей фосфора из родов *Zoogloea*, *Acinetobacter*, *Dechloromonas* и *Ca. Accumulibacter*. Напротив, в тонких биопленках преобладали бактерии рода *Ferribacterium* (34-60 %), которые, возможно, конкурировали с ФАО, о чём свидетельствуют относительно высокие показатели поглощения ацетата в этих биопленках.

Экзополимерные вещества и их роль в формировании агрегатов и удалении фосфора. В настоящее время активное внимание уделяется изучению механизмов транспорта соединений фосфора через ЭПС, а также роли ЭПС в защите ФАО от воздействия токсикантов органической и неорганической природы [139]. Предполагается, что анионный обмен в матриксе ЭПС формирует градиент, облегчающий транспорт ЛЖК.

Известно, что внутри клеток ФАО наблюдается накопление сферических гранул, обогащённых фосфором [140, 141]. В то же время фосфор был обнаружен и в геле ЭПС. Исследования Zhang и др. [142,143] показали, что полифосфаты и пирофосфаты значительно преобладают в матриксе ЭПС.

Микробные ЭПС содержат отрицательно заряженные функциональные группы: карбоксильные, фосфорильные, сульфгидрильные, фенольные и гидроксильные, которые легко связываются с катионами металлов. Значимыми являются ионы Ca^{2+} , которые могут образовывать поперечные связи между отрицательно заряженными бактериальными полисахаридами [144], участвующими в формировании структуры микробных агрегатов [145].

Гранулированный активный ил характеризуется высоким содержанием нерастворимых соединений, образованных фосфатами и ионами Ca^{2+} [146]. Liu и др. [147] установили, что нерастворимые фосфаты составляют 6,1-8,5 % от общего количества фосфора, аккумулированного в микробных гранулах.

Zhang и др. [142] предложили гипотетическую модель трансформации и транспорта фосфора в иле, обеспечивающую глубокое удаление фосфора из сточных вод, с учётом роли ЭПС (рисунок 1.14).

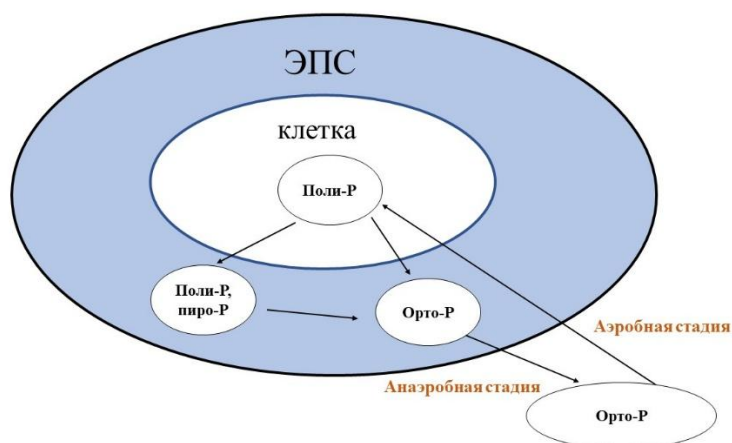


Рисунок 1.14 – Модель взаимосвязи ЭПС активного ила в EBPR процессах

Согласно данной модели, ФАО в анаэробной фазе разрушают длинноцепочечный полифосфат до короткоцепочечных поли-, пиро- и

ортофосфатов, используя энергию, полученную при расщеплении гликогена [148]. Часть короткоцепочечного полифосфата, а также основная доля образующихся пиро- и ортофосфатов выходят во внеклеточное пространство и накапливаются в матриксе ЭПС. Среди высвобождаемых форм фосфора ортофосфат способен относительно легко проходить через матрикс ЭПС в среду, тогда как поли- и пирофосфаты в основном адсорбируются или задерживаются на ЭПС. После перехода к аэробным условиям ФАО начинают поглощать ортофосфаты из жидкой фазы и синтезировать полифосфаты, что приводит к увеличению их содержания как в клетках, так и в составе ЭПС [142].

1.4 Инженерное обеспечение процессов дефосфатации сточных вод с применением агрегированных форм микроорганизмов

Биопленочные системы в очистке сточных вод. Капельные биофильтры. Биофильтр капельного типа представляет собой реактор с фиксированной биопленкой на поверхности инертных носителей (рисунок 1.15) [149]. Сточная вода фильтруется через слой загрузки биофильтра сверху вниз. Капельные биофильтры обеспечивают высокие показатели по удалению органических соединений, однако, они отличаются низкой эффективностью процесса нитрификации. В связи с этим капельные биофильтры проектируют с целью предварительной очистки высококонцентрированных сточных вод.

Так, Forbis-Stokes с соавт [150] использовали лабораторные капельные биофильтры для удаления азотсодержащих и органических веществ. В ходе исследования эффективность биологической очистки стоков составила в среднем 79 и 90 %, соответственно.

В других исследованиях биофильтры использовались для обработки сточных вод с содержанием органических веществ и аммонийного азота в среднем 4500 и 3000 мг/дм³, соответственно [151].

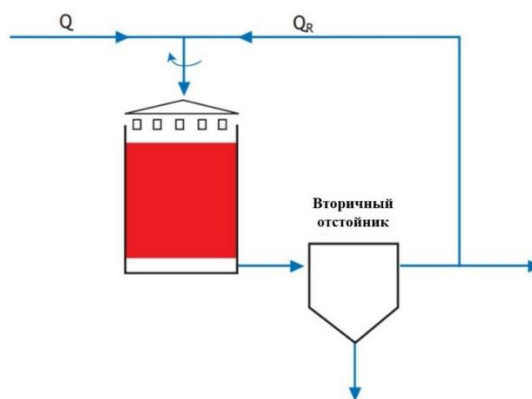


Рисунок 1.15 – Принципиальная схема капельного биофильтра

Эффективность процесса удаления органических соединений, соединений азота и фосфора достигла в среднем 84 %, 69 % и 89 %, соответственно. Кроме того, технология очистки сточных вод биофильтрацией обеспечивала извлечение струвита ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) – фосфатного минерала, применяемого в качестве сельскохозяйственного удобрения пролонгированного действия.

Мембранный биопленочный реактор (MBfR). В мембранном биопленочном реакторе используется газопроницаемая мембрана, обеспечивающая подачу газообразного субстрата (например, водорода, метана) к биопленке, которая формируется на ее поверхности. В отличие от традиционных биопленочных систем, MBfR обеспечивает встречную диффузию доноров и акцепторов электронов [152].

В классических технологических схемах MBfR с помощью биопленки перхлоратвосстанавливающих и денитрифицирующих микроорганизмов из сточных вод удаляли нитрат- и перхлорат-ионы, где в качестве донора электронов являлся молекулярный водород [153]. В дальнейшем был разработан мембранный биопленочный реактор периодического действия (SBMBfR) для одновременного удаления углерода, азота и фосфора из сточных вод (рисунок 1.16) [154]. Реактор состоял из двух функциональных частей: газопроницаемой мембраны, на поверхности которой формировалась нитрифицирующая биопленка, и зоны со свободноплавающими ДФАО. Во

время анаэробного периода ДФАО потребляли органический углерод, что сопровождалось высвобождением фосфатов в среду. Во время последующего периода мембранной аэрации нитрифицирующие бактерии использовали кислород, подаваемый непосредственно к ним из внутренней части мембраны. В результате образующиеся нитрит и нитрат-ионы диффундировали в жидкость, где ДФАО использовали их как акцепторы электронов для поглощения фосфатов.

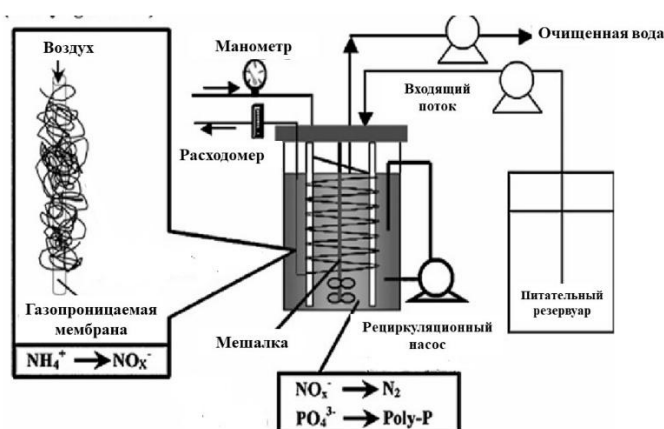


Рисунок 1.16 – Принципиальная схема реактора SBMBfR

Эффективность удаления органического углерода, соединений азота и фосфора в SBMBfR составила 99 %, 96 % и 90 %, соответственно. При этом было установлено [154], что аммонийокисляющие бактерии группы *Nitrosomonas* доминировали в области, прилегающей к мембране. Доля ФАО *Candidatus Accumulibacter phosphatis* во взвешенном активном иле постепенно увеличивалась и достигла максимального значения 37 %.

Анаэробно-аноксидный реактор (АнохАн). Одной из современных разработок для биологической дефосфатации с использованием гранулированного активного ила является система АнохАн, работающая в анаэробно-аноксидных условиях (рисунок 1.17) [155]. В биореакторе объединены анаэробные и аноксидные зоны, что является экономически

выгодным, затрачивается меньше энергии на перемешивание за счет работы с восходящим потоком.

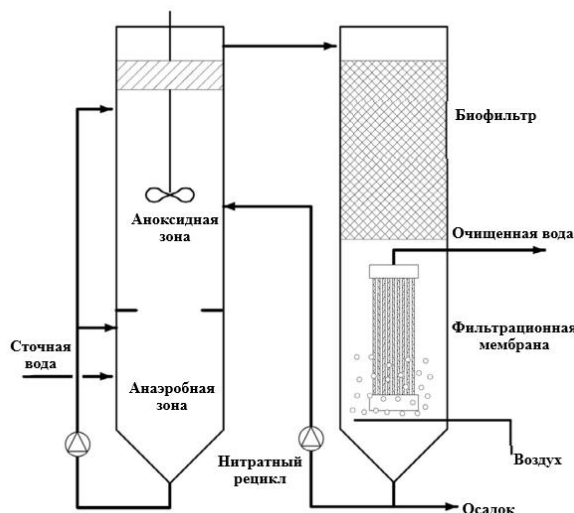


Рисунок 1.17 – Принципиальная схема биореактора AnoxAn

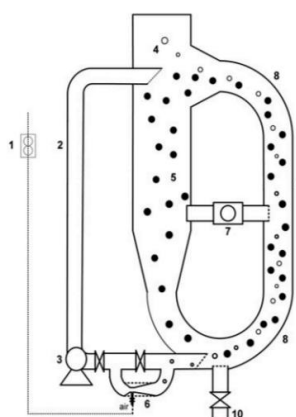
Гидродинамические свойства биореактора были оптимизированы введением перегородки из поливинилхлорида между аноксидной и анаэробной зонами. Аэробный мембранный биофильтр был заполнен поливинилиденфторидным волокнистым носителем, на поверхности которого формировалась биопленка губчатого типа. Общая эффективность процесса биологической дефосфатации сточных вод составила в среднем 89 %.

Биореакторы с псевдооживленным слоем (FBBR). В биореакторах FBBR используются носители, которые находятся во взвешенном состоянии под действием восходящего потока поступающих сточных вод [156]. Во многих исследованиях FBBR реактор демонстрировал интенсивный процесс нитрификации коммунально-бытовых стоков с эффективностью удаления соединений азота до 99 %. Использование FBBR реактора упоминается для одновременного удаления соединений углерода, азота и фосфора.

Li с соавт. [157] разработали биоплёночный FBBR реактор, работающий в режиме SBR с использованием волокнистого носителя для очистки

модельного раствора сточных вод. Эффективность биологической дефосфатации составила в среднем 90 %.

Yongsheng Lu и соавт. [158] рассматривали эффективность нового биореактора с псевдооживленным слоем с дополнительным контуром циркуляции (EFBVR) и общей продолжительностью цикла 12 часов. В качестве носителя биоплёнки использовалась поливинилхлорид-трубка (рисунок 1.18).



(1 – расходомер; 2 – циркуляционный трубопровод; 3 – циркуляционный насос; 4 – зона разделения; 5 – нисходящий канал; 6 – эжектор Вентури; 7 – сливной трубопровод; 8 – соединительный элемент; 9 – восходящий канал; 10 – выпуск ила)

Рисунок 1.18 – Принципиальная схема EFBVR реактора

Продолжительность экспериментальных исследований с EFBVR реактором составила около 300 дней. В течение этого периода эффективность удаления органических веществ достигла 90 %, аммонийного азота и фосфора – 95 % и 100 %, соответственно. Таким образом, EFBVR является перспективной технологией для реализации интенсивного процесса нитрификации и одновременного удаления соединений углерода и фосфора из сточных вод.

Реактор с подвижным биопленочным слоем (MBBR). Для MBBR реактора используют носитель биоплёнки с плотностью, близкой к плотности воды [159]. Носители изготавливаются в различных формах и имеют крупные

размеры, чтобы удерживаться внутри реактора с помощью сит или проволочных перегородок.

MBBR реакторы могут работать в двух режимах:

1. Без рециркуляции биомассы активного ила (рисунок 1.19а): микробная биопленка образуется на инертных носителях, взвешенная биомасса практически отсутствует;

2. С рециркуляцией биомассы активного ила (рисунок 1.19б): в системе функционируют прикрепленные и свободноплавающие клетки микроорганизмов.

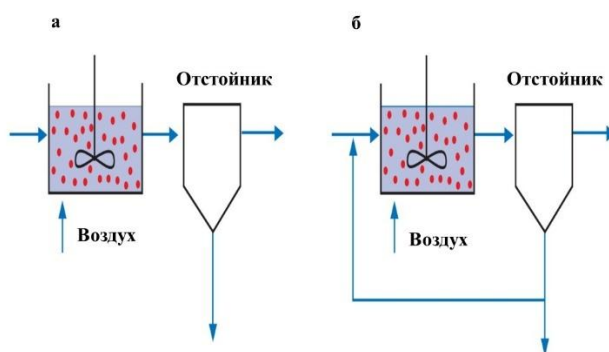


Рисунок 1.19 – Принципиальная схема MBBR реактора (а – без рециркуляции биомассы; б – с рециркуляцией биомассы активного ила)

Основными преимуществами технологии MBBR являются низкие гидравлические потери, эффективные процессы денитрификации/нитрификации и обеспечение роста медленно растущих микроорганизмов [160].

Poojashri R.N. с соавт. [161] изучали удаление биогенных элементов в системе MBBR с использованием пенополиуретана в качестве носителя биопленки. Эффективность удаления органических веществ, фосфат-ионов, аммонийного азота составила 97 %, 94 % и 95 %, соответственно.

Биореакторы с гранулированным активным илом. Во многих исследованиях доказана высокая эффективность дефосфатации сточных вод гранулированным активным илом (AGS) (рисунок 1.20) [135].



Рисунок 1.20 – Принципиальная схема реактора с гранулированным активным илом

Как и в биопленочных системах, в структуре гранул ила создаются условия с анаэробными/аэробными зонами, что обеспечивает возможность развития ФАО. Отмечено, что в AGS-реакторах степень удаления фосфора из среды варьирует в диапазоне от 55 % до 77 % [162, 163].

На эффективность процесса дефосфатации в AGS-системах влияют ряд факторов: источник углерода, pH и температура среды, соотношение C/P и режим подачи субстрата в реактор [164]. Так, в исследованиях de Kreuk M. K. с соавт. установлено [165], что при медленной скорости подачи субстрата в анаэробных условиях была достигнута высокая удельная скорость поглощения и высвобождения соединений фосфора. Эффективность биологической дефосфатации гранулированным илом составила в среднем 97 %.

Основными филумами бактерий в системе являлись *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*. Доминирующими ФАО были представители класса *Betaproteobacteria*, а также родов *Paracoccus* и *Thauera*.

Эксплуатационные параметры и факторы управления эффективностью биофильтров. Параметры работы биопленочных систем имеют ключевое значение для очистки сточных вод. При проектировании технологий необходимо учитывать вид инертного носителя, режим аэрации, коэффициент заполнения реактора носителем, гидравлическую нагрузку и скорость движения потока.

Коэффициент заполнения биореактора носителем. В качестве материалов для иммобилизации микроорганизмов применяют полимерные и композитные материалы. Эффективность использования носителя определяется удельной поверхностью ($\text{м}^2/\text{м}^3$), поскольку она прямо влияет на развитие биоплёнки и общее качество очистки [166]. Следует отметить, что для формирования быстрорастущей гетеротрофной биоплёнки в аэробных системах предпочтительны носители с увеличенным размером пор, тогда как развитие медленно растущих автотрофных микробных сообществ, напротив, требует носителей с малыми порами и большой эффективной площадью поверхности.

Важным эксплуатационным параметром как для систем MBBR, так и для IFAS (биореактор с активным илом и неподвижной биопленкой) является доля заполнения биореактора носителем. В зависимости от концентрации загрязняющих веществ во входящих сточных водах и характера присутствующих органических и неорганических соединений данный показатель варьирует в пределах 10-60 % [167].

Madan S. С соавт. [168] провели исследование технологии MBBR для очистки городских сточных вод. В экспериментах использовали материал с заполнением биореактора на 20 %, 35 % и 50 %. Эффективность очистки стоков по показателям ХПК и БПК₅ составили в среднем 86 % и 91 %, соответственно, при заполнении системы носителем на 35 %.

Для очистки сточных вод с помощью наночастиц серебра использовали технологию IFAS-SBR со степенью заполнения реактора носителем на 20 % [169]. Эффективность очистки стоков по показателям ХПК, соединений азота

и фосфора составила в среднем 96 %, 99 % и 99 %, соответственно. Содержание наночастиц серебра не оказывало негативного влияния на процесс удаления поллютантов из сточных вод.

Гидравлическое время удерживания (HRT). Рассматриваемый параметр является ключевым, определяющим эффективность работы биопленочных систем. Установлено, что для сточных вод с низкой концентрацией загрязняющих веществ HRT варьирует от 3 до 12 часов. Однако величина HRT определяется составом стоков, параметрами эксплуатации и особенностями технологических процессов [170].

В исследованиях Dereng Wang и др. лабораторная установка IFAS-MBR функционировала в течение 110 дней при HRT 10 ч и температуре 20-25 °С. Установлено, что эффективность удаления соединений азота и фосфора составила в среднем 78 % и 93 %, соответственно [171].

Лю с соавт. исследовали удаление соединений азота и фосфора в биопленочном реакторе с использованием волокнистого носителя. При общем гидравлическом времени удерживания 20 часов и температуре 10 °С эффективность биологической дефосфатации стоков составила в среднем 92 % [172].

Содержание растворенного кислорода. Во многих исследованиях изучалось влияние концентрации растворённого кислорода на биотрансформацию фосфора в биопленочной системе [173]. Два биопленочных реактора отъемно-доливного действия (BSBR) эксплуатировались в течение 90 суток при различных концентрациях растворенного кислорода: высокой (6 мг/дм³, BSBR-H) и низкой (2 мг/дм³, BSBR-L). В BSBR-H преобладали бактерии рода *Pseudomonas*, тогда как в BSBR-L доминирующими ФАО являлись микроорганизмы р. *Tetrasphaera*.

В другом исследовании осуществлялась эксплуатация биопленочного реактора, разделённого на две зоны с различной концентрацией растворенного кислорода – 4 и 6 мг/дм³, соответственно [174]. Установлено, что при повышении кислорода с 4 до 6 мг/дм³ количество фосфора увеличивается как внутри биопленки, так и в экзополисахаридном матриксе. Состав микробного

сообщества изменялся в сторону увеличения доли микроорганизмов из группы протеобактерий. Таким образом, регулирование концентрации растворённого кислорода в системе позволяет обеспечить условия для интенсификации процессов высвобождения/поглощения фосфора микробной биоплёнкой при пониженных значениях ХПК в сточных водах.

Температура среды. Температура влияет на скорость биохимических реакций, протекающих в микробной клетке, а также на процессы биопленкообразования и закрепления биомассы на инертных носителях [166]. При более низких температурах может затрудняться формирование биоплёнки и протекание биологических процессов. В связи с этим в холодное время года требуется оптимизация технологических параметров, как, например, увеличение рециркуляции активного ила или показателя HRT.

Rudi K. с соавт. исследовали процесс глубокого удаления фосфора и изменением состава микробного сообщества в MBBR реакторе [175]. Установлено, что температура среды оказывало значительное влияние на состав микробиоты и процесс удаления фосфора. При понижении температуры эффективность биологического удаления фосфора снижалась. Микробное сообщество формировало стабильную экосистему, однако содержание ФАО, отвечающих за EBPR-процесс, оставалось низким.

Гидродинамические характеристики биореактора. Функционирование биореакторов в большой степени зависит от физических характеристик биопленки. Так, тонкая, равномерно распределенная биопленка обеспечит эффективный массоперенос поступающего субстрата. Для формирования такой морфологии биопленки необходима оптимальная скорость потока для сохранения определенной толщины биопленки, отделения от носителя избыточной биомассы и создания пространства для развития новых клеток. Дополнительные факторы, такие как гидрофобность, заряд и эластичность, также влияют на прикрепление микроорганизмов [176].

Гидродинамические условия оказывают значительное влияние на структуру, формирование, выработку внеклеточного полисахаридного матрикса, метаболическую активность и толщину биопленки [177].

Совместные биологические процессы очистки сточных вод с их дефосфатацией. В настоящее время активно изучаются биопленочные системы, сочетающие в себе процессы глубокого удаления фосфора, нитрификации и денитрификации (SNDPR-технологии) [178].

Комбинированная технология анаэробно-мембранного биореактора (ABR-MBR) способна обеспечить процесс денитрифицирующей дефосфатации с низким соотношением C/N [179]. Перспективность технологии доказана высокой степенью удаления соединений азота (88 %), фосфора (89 %) и органического углерода (90 %) (рисунок 1.21).

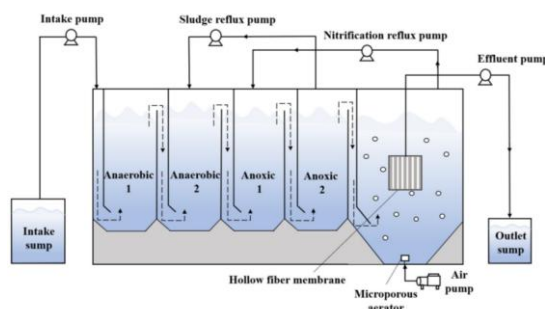


Рисунок 1.21 – Принципиальная схема установки ABR-MBR (ABR – анаэробный и аноксидные зоны, а MBR – аэробная зона)

Кроме того, разработана технология SNADPR – трехстадийного процесса денитрифицирующей дефосфатации, частичной нитрификации и денитрификации [180]. На первой стадии модельная сточная вода подавалась в SBR реактор для удаления органических веществ и высвобождения фосфора. Затем сточные воды направлялись в SBRR для реализации частичной нитрификации и денитрификации. В реактор SBR возвращался нитратный поток, где осуществлялся процесс денитрифицирующей дефосфатации сточных вод. Эффективность удаления соединений азота и фосфора составила в среднем 89 % и 92 %, соответственно.

Сочетание традиционных технологий с биоплёночными системами позволяет реализовать процесс денитрифицирующей дефосфатации [181-183] (рисунок 1.22).

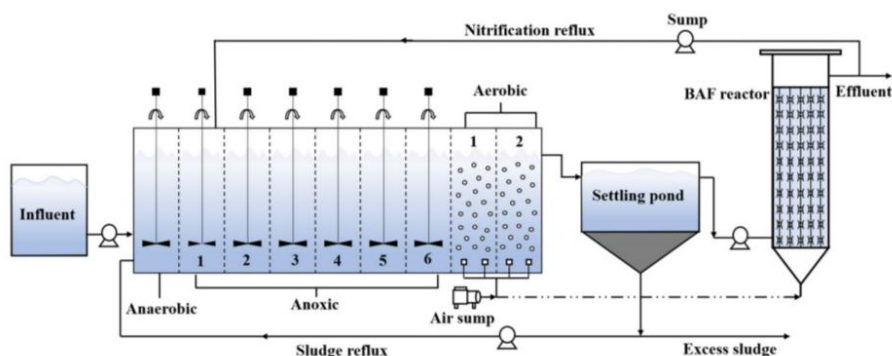


Рисунок 1.22 – Принципиальная схема процесса A2O-BAF

Технология A2O (анаэробно-аноксидная технология) может быть интегрирована с биологическим аэрируемым фильтром (BAF). Качество очищенной воды в данной системе стабильно соответствует нормативным требованиям, а степень удаления соединений азота и фосфора достигает в среднем 92 % и 81 %, соответственно.

Технология A2O реализуется совместно с реактором MBBR [184]. По сравнению с системой A²O-BAF, реактор MBBR не требует обратной промывки и не подвержен засорению, что упрощает эксплуатацию и управление процессом, а также позволяет интенсивно удалять азот и фосфор при низком соотношении C/N. Эффективность удаления азота и фосфора в таких системах во многом определяется содержанием ДФАО и зависит от соотношения N/P: при низких значениях в анноксидной зоне наблюдается ограничение процесса удаления фосфора вследствие недостатка акцепторов электронов.

Процесс денитрифицирующей дефосфатации объединяет денитрификацию с удалением фосфора, что позволяет сократить расход органического углерода и уменьшить образование избыточного ила, а также

является одной из перспективных инженерных предложений в области очистки сточных вод. Использование иммобилизованных микроорганизмов в сочетании со свободноплавающей биомассой способствует разработке энергоэффективных, высокопроизводительных технологий, соответствующих принципам устойчивого развития.

Таким образом, эвтрофикация водоёмов является одной из ключевых экологических проблем, обусловленная избыточным поступлением соединений фосфора со сточными водами. Биологические методы очистки стоков от соединений фосфора рассматриваются как одни из перспективных и альтернативных направлений, обеспечивающих снижение реagentных затрат, экологичности и возможности интеграции в действующие технологические схемы очистных сооружений.

Фосфатаккумулялирующие бактерии являются важным биообъектом для усовершенствования процесса биодефосфатации. Литературные данные свидетельствуют о высоком потенциале данных микроорганизмов для глубокой очистки сточных вод, а также о возможности целенаправленного управления их метаболизмом за счёт регулирования технологических режимов, что делает ФАО перспективным объектом для дальнейших прикладных и инженерных исследований.

Использование биоплёночных систем в процессах глубокого удаления фосфора способствуют повышению устойчивости и стабильности работы очистных сооружений. Биоплёнки обеспечивают высокую концентрацию активной биомассы, формирование микронзон с различными окислительно-восстановительными условиями и устойчивость микроорганизмов к гидравлическим и токсическим нагрузкам, что особенно важно для эффективного протекания процесса биологической дефосфатации.

Современные инженерные решения, основанные на применении агрегированных форм микроорганизмов, позволяют повысить удельную скорость удаления фосфора, сократить площадь сооружений и повысить

эксплуатационную надёжность систем очистки, что делает данные технологии перспективными для внедрения в практику очистки сточных вод.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования выступали:

1. Штаммы микроорганизмов, обладающих нитрилгидролизующей активностью: *Alcaligenes faecalis* 2 [185], *Acinetobacter guillouiae* 11h [185], *Rhodococcus erythropolis* ИЛБИО [186], *Achromobacter pulmonis* ПНОС [187], полученные из музейной коллекции лаборатории молекулярной биотехнологии Института экологии и генетики микроорганизмов – филиала Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН;

2. Бактериальные культуры *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis* и *Bacillus proteolyticus*, выделенные из активного ила биологических очистных сооружений города Зеленодольска (Республика Татарстан);

3. Образцы активного ила биологических очистных сооружений, г. Иннополис, Республика Татарстан.

2.2 Методы исследований

1. Условия культивирования микробной биопленки. Для получения инокулята осуществляли периодическое культивирование микроорганизмов на роторной качалке со скоростью перемешивания 120 об/мин в течение 24 ч при 30 °С [190] на питательной среде LB следующего состава (г/дм³): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5.

Образцы биопленки микроорганизмов получали в 96-луночном полистироловом планшете «Медполимер» (г. Санкт-Петербург), в среде LB и синтетической питательной среде следующего состава (г/л): ацетат натрия – 20, K₂HPO₄ – 0,02, NH₄Cl – 0,08.

В лунки планшета вносили 150 мкл питательной среды и 10 мкл инокулята микроорганизмов согласно методике [191]. Планшетное культивирование проводили в термостате при 30 °С от 1 до 5 суток.

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

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.

2. Оценка биопленкообразующей способности микроорганизмов. Для определения количества (массы) биопленки использовали метод оценки массивности биопленки, основанный на удалении питательной среды и планктонных клеток после проведения периодического культивирования и окрашивании образцов биопленки 0,1 % кристаллическим фиолетовым [192]. При этом способность к биопленкообразованию бактериальными культурами оценивали путем измерения оптической плотности раствора красителя при длине волны 540 нм на микропланшетном ридере.

3. Определение количества экзополисахаридов в составе биопленки. Конго красный широко применяется для качественного выявления внеклеточных полисахаридов матрикса биопленок. Краситель связывается с экзополисахаридами, в частности с целлюлозой и β -глюканами, что позволяет использовать его для оценки продукции ЭПС и способности микроорганизмов к формированию биопленок. Однако метод не является строго специфичным ко всем компонентам внеклеточного полимерного матрикса.

Для определения содержания экзополисахаридов (ЭПС) в составе образцов биопленки их окрашивали красителем Congo Red (конечная концентрация красителя 40 мкг/мл). Содержание ЭПС оценивали с помощью измерения оптической плотности раствора на микропланшетном ридере при длине волны 490 нм [193].

4. Анализ метаболической активности микроорганизмов в составе биопленки. Для анализа метаболической активности исследуемых микроорганизмов в составе биопленок клетки окрашивали красителем PrestoBlue HS Viability Reagent («Invitrogen», США). Реагент содержит резазурин в соответствующем буферном растворе. При взаимодействии живых клеток с реагентом резазурин восстанавливается в резозурин – 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 [194]. Условные единицы флуоресценции красителя PrestoBlue HS Viability Reagent относили к биомассе биопленки, измеренной при длине волны 540 нм (Фл./ОП540).

5. Идентификация музейных культур кафедры промышленной биотехнологии. Для идентификации культур активного ила определяли нуклеотидную последовательность 16S рРНК в компании ЗАО Евrogen (г.Москва, РФ) с праймерами 27fm и 1492R (5'- ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3').

Полноразмерный фрагмент гена 16S rRNA был амплифицирован с помощью праймеров 27fm (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') и 1522R (5'- AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA -3'). Для получения лизата биомассу культуры количеством со спичечную головку собирали с поверхности чашки Петри и ресуспендировали в 100 мкл μ Q воды. Суспензию замораживали при -80 °С в течении 20 мин, а затем прогревали при 95 °С в течении 5 минут. Суспензию центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость использовали в качестве матрицы для ПЦР. Для амплификации готовили смесь объемом 50 мкл, которая содержала x1 буфера для Taq-полимеразы, 0,2 мМ всех четырех нуклеотидов, 1 рМ/мкл каждого из праймеров, 10 мкл лизата культуры, полученного как описано выше, 5 единиц

HS Taq-полимеразы. Реакцию проводили в следующем режиме: смесь прогревали до 95 °С в течение 3 минут для активации полимеразы, затем проводили 30 циклов в режиме 95 °С в течение 10 секунд, 54 °С в течение 20 секунд и 72 °С в течение 1 минуты. Для достройки фрагментов смеси выдерживали еще 5 минут при 72 °С.

Полученный фрагмент разгоняли в агарозном геле (1 %) в буфере 0,5xTBE и очищали из геля с помощью набора CleanUp Mini (ЗАО Евроген, Москва, РФ). Определение нуклеотидной последовательности производили в компании ЗАО Евроген (Москва, РФ) с праймерами 27fm и 1492R (5'-ACG GYT ACC TTG TTA CGA CTT-3'). Последовательности объединяли с помощью программы Clon Manager 9.0 (США) и анализировали в системе BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Штамм идентифицировали по наибольшему совпадению последовательностей со штаммами известных видов в коллекции GenBank [195].

6. Аналитические методы для оценки эффективности биологической дефосфатации сточных вод суспендированными и иммобилизованными клетками.

Количественное определение ионов аммония, нитрит-, нитрат- и фосфат-ионов производилось по стандартным методикам ПНД Ф 14.1.1-95, ПНД Ф 14.1:2.3-95, ПНД Ф 14.1:2.4.-95, ПНД Ф 14.1:2.112-97 [196-199]. Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли методом бихроматной окисляемости [200]. Измерение массовой концентрации растворенного кислорода осуществляли с помощью оксиметра Ulab UP-7041O. Кинетика роста биомассы оценивалась по разности количества биомассы образцов биопленки до и после ее сжигания [201].

7. Аналитические методы и расчеты в процессе культивирования активного ила в SBR-реакторе. Значения рН среды измеряли с помощью рН-метра «Эксперт-001» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия). Концентрацию растворенного кислорода измеряли с помощью кислородомера Oxi 197 (WTW,

Германия). Массовую концентрацию фосфора в среде определяли фотометрическим методом ПНДФ 14.1:2:4.248-07. Количество абсолютно сухой биомассы (АСБ) и содержание золы определяли гравиметрически [202]. Концентрацию ацетата определяли на ВЭЖХ хроматографе Стайер (Аквилон, Россия).

Содержание фосфора в биомассе P , %, рассчитывали по формуле 2.1:

$$P = 100 \cdot (P_{in} - P_{out}) \cdot SRT / (TSS \cdot HRT), \quad (2.1)$$

где P_{in} и P_{out} – концентрация фосфатов в подающейся и отводящейся из SBR среде соответственно, мг/дм³;

SRT – время удержания биомассы, сут;

HRT – гидравлическое время пребывания, сут.

Удельную скорость потребления фосфора микроорганизмами активного ила (q) рассчитывали по падению концентрации фосфатов в первый час аэробной стадии SBR-цикла.

Выход биомассы по субстрату Y , гАСБ/г ацетата, рассчитывали по формуле 2.2:

$$Y = АСБ \cdot HRT / S_0 / SRT, \quad (2.2)$$

где S_0 – концентрация ацетата в подающейся среде, г/дм³;

АСБ – абсолютно сухая биомасса, г/дм³.

8. Профилирование сообщества активного ила по гену 16S рРНК. Отбор проб микробного сообщества активного ила из биореактора для метагеномного анализа осуществляли на 0, 19, 29, 64 и 83 сутки культивирования.

Экстракция ДНК проводилась из образцов активного ила с использованием набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя [203]. Амплификация гена 16S рРНК была выполнена с применением универсальных праймеров 341F

(CCTAYGGGDBGCWSCAG) и 806R (GGACTACNVGGGTHTCTAAT), нацеленных на переменный регион V3-V4. Полученные ПЦР-продукты использовались для подготовки библиотек секвенирования с использованием набора Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina). Мультиплексирование проводилось с помощью Nextera XT Index Kit v2. Секвенирование выполнялось на платформе Illumina MiSeq, что позволило получить не менее 8 тыс. прочтений на образец. Биоинформатическая обработка данных включала: объединение чтений из всех образцов, фильтрацию низкокачественных чтений, синглетонов и химер, кластеризацию в ОТЕ (операционные таксономические единицы) с порогом сходства 97 % (с использованием usearch, Edgar, 2010). Для таксономического анализа репрезентативные последовательности ОТЕ аннотировались по базе данных SILVA с использованием usearch.

9. Определение элементного состава в образцах активного ила. Элементный состав клеток определяли методом рентгеновского микроанализа с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония), оснащённого энергодисперсионной системой микроанализа производства Oxford Instruments (Великобритания). Исследования выполняли при ускоряющем напряжении 80 кэВ и угле наклона образца 15°.

Для проведения микроанализа нативные клеточные препараты наносили на медные сетки для электронной микроскопии, покрытые формваровой плёнкой с углеродным напылением. После нанесения образцов сетки высушивали при комнатной температуре до полного удаления влаги, после чего использовали для регистрации рентгеновских спектров и элементного картирования.

Обработку и интерпретацию полученных рентгеновских спектров осуществляли с помощью программного обеспечения AZtec (Oxford Instruments, Великобритания). Данное программное обеспечение также использовали для построения карт пространственного распределения химических элементов в исследуемых объектах.

Цветовое отображение элементов на микрофотографиях распределения используется для визуализации результатов рентгеновского микроанализа. Интенсивность окраски отражает относительное содержание соответствующего элемента в исследуемой области: более яркие участки соответствуют зонам повышенной концентрации элемента, тогда как тёмные области характеризуются низкой интенсивностью сигнала или отсутствием данного элемента.

Содержание химических элементов выражали в процентах, характеризующей вклад каждого элемента в суммарное содержание зарегистрированных элементов в области анализа.

2.3 Постановка эксперимента

Экспериментальные исследования проводились поэтапно, как указано на рисунке 2.1.

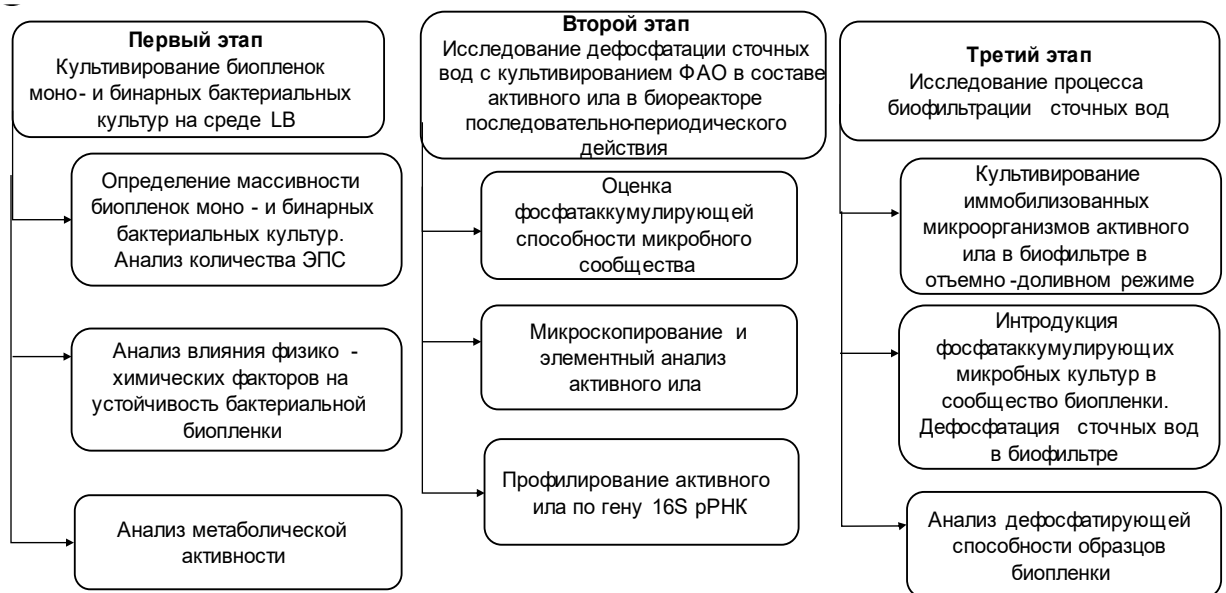


Рисунок 2.1 – Этапы экспериментальных работ

1. Анализ влияния физико-химических факторов на устойчивость бактериальной биопленки.

Для оценки устойчивости бактериальных биопленок под влиянием внешних факторов среды были выбраны следующие параметры: температура (10 и 50 °С), рН среды (5,0 и 10,0) и содержание ПАВ (додецилсульфата натрия) в концентрациях 5, 10 и 50 мг/дм³.

Экспериментальное исследование биопленкообразования монокультурами и воздействие температурного режима (10 и 50 °С) на устойчивость полученной биопленки состояло из нескольких этапов, а именно:

1. В 96-луночные полистирольные планшеты вносили 150 мкл питательной среды LB и инокулят микроорганизмов в количестве 10 мкл. Культивирование проводили в термостате в течение 72 ч при 30 °С.

2. По истечении 3 суток культивирования из лунок планшета осуществляли удаление культуральной жидкости декантацией и дважды отмывали биопленку от остатков питательной среды 200 мкл стерильным калий-фосфатным буфером.

3. Затем в опытные лунки планшета с микробной биопленкой добавляли стерильную свежую питательную среду LB и термостатировали при 10 и 50 °С в течение 24 ч.

4. Для оценки устойчивости биопленок при неблагоприятном температурном воздействии (10 и 50 °С) дальнейшее культивирование проводили в оптимальных условиях при 30 °С в течение 48 ч.

5. В качестве контрольного образца использовали биопленку бактериальной монокультуры, выращенную в лунках планшета с соблюдением вышеупомянутых стадий при 30 °С без изменения температурного режима.

Для оценки влияния активной реакции среды на развитие биопленки осуществлялось культивирование бактериальной биопленки в щелочной (рН $10,0 \pm 0,2$) и кислой (рН $5,0 \pm 0,2$) питательной среде LB. Стерильными растворами гидроксида натрия и соляной кислоты доводили рН среды до необходимых значений. Экспериментальное исследование на данном этапе состояло в осуществлении следующих процедур:

1. Первоначально проводили планшетное культивирование трехсуточной микробной биопленки в подкисленной (рН $5,0 \pm 0,2$) и щелочной (рН $10,0 \pm 0,2$) среде LB в течение 24 ч при $30\text{ }^\circ\text{C}$.

2. Далее осуществляли удаление культуральной жидкости и двукратное промывание лунок планшета стерильным калий-фосфатным буфером.

3. Проводили периодическое культивирование микробной биопленки с добавлением свежей питательной среды LB объемом 150 мкл с нейтральным значением рН среды $7,0 \pm 0,2$ при $30\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. В контрольных лунках планшета осуществляли культивирование в питательной среде LB с рН среды $7,0 \pm 0,2$.

С целью оценки воздействия еще одного фактора внешней среды – ПАВ на устойчивость микробной биопленки осуществляли добавление раствора додецилсульфата натрия в питательную среду с конечной концентрацией додецилсульфата натрия 5, 10 и 50 мг/дм^3 по следующему алгоритму:

1. В опытные лунки планшета с 3-суточной микробной биопленкой добавляли 150 мкл стерильной питательной среды LB, содержащей додецилсульфат натрия. Инкубирование биопленок проводили в термостате в течение 24 ч при $30\text{ }^\circ\text{C}$.

2. Далее удаляли культуральную жидкость и обрабатывали лунки планшета стерильным калий-фосфатным буфером.

3. С целью анализа ответной реакции бактериальной биопленки на стрессовый фактор – содержание ПАВ проводили периодическое культивирование микроорганизмов в стерильной питательной среде LB при отсутствии раствора додецилсульфата натрия в течение 48 ч при $30\text{ }^\circ\text{C}$.

4. В контрольных планшетах культивирование биопленок осуществляли с соблюдением предыдущих стадий без добавления в питательную среду LB раствора додецилсульфата натрия.

2. Исследование дефосфатации сточных вод активного ила в биореакторе последовательно-периодического действия.

Питательная среда для культивирования фосфатаккумулирующих микроорганизмов в последовательно-периодическом (SBR)-реакторе в

качестве основного источника углерода содержала ацетат натрия. Для подавления нитрификации в среду добавляли аллилтиомочевину до конечной концентрации 10 мг/дм³. Для поддержания рН в среду добавляли 0,5 М раствор HCl в количестве 7,5 мл/дм³ (таблица 2.1). [188].

Таблица 2.1 – Состав питательной среды для культивирования фосфатаккумулялирующих микроорганизмов в SBR-реакторе

Компонент	мг/дм ³
CH ₃ COONa·3H ₂ O	670,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	139,0
KH ₂ PO ₄	109,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	150,0
аллилтиомочевина	10,0
дрожжевой экстракт	8,6
0,5 н HCl мл/дм ³	7,5

В экспериментальных работах по исследованию фосфатаккумулялирующей способности активного ила был использован биореактор последовательно-периодического действия (SBR – реактор) (ООО «ЭЛТОЧПРИБОР», Россия) с рабочим объемом 2 дм³ (рисунок 2.2).

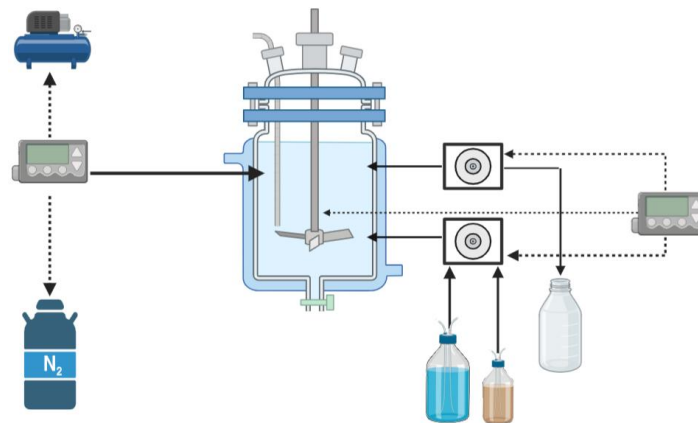


Рисунок 2.2 – Принципиальная схема биореактора последовательно-периодического действия

Один цикл работы SBR-реактора составлял 6 часов и включал последовательные анаэробный и аэробный периоды. В анаэробной фазе

концентрация растворенного кислорода составляла $<0,2$ мг/дм³, в аэробной фазе в среднем $7,5$ мг/дм³. В начальный анаэробный период процесса продолжительностью 2 часа 55 мин в течение первых 30 мин добавляли $0,8$ л свежей питательной среды. Затем проводилась смена анаэробного периода на аэробный продолжительностью 3 часа 05 мин. В конце аэробного периода на 30 мин прекращали перемешивание и в течение 5 мин удаляли $0,8$ л надосадочной жидкости. HRT составляло 15 часов. Удаление избыточной биомассы активного ила периодически осуществляли вместе с очищенной водой, поддерживая средний возраст ила (SRT) $8,75$ суток. Подача и вывод среды осуществлялись с помощью перистальтических насосов. Аэробные и анаэробные условия создавали подачей в биореактор соответственно воздуха или азота ($0,3$ л/мин) с использованием системы регулирования подачи газов (ООО “Элточприбор”, Россия). За исключением фаз отстаивания и слива очищенной воды, для предотвращения осаждения активного ила культуру постоянно перемешивали с помощью магнитной мешалки IKA C-MAG MS7 (Германия). С помощью логического модуля LOGO (SIEMENS, Китай) обеспечивалось автоматическое управление перистальтическими насосами, мешалкой, подачей азота или воздуха. Температура среды поддерживалась на уровне $20 \pm 0,2$ °С., значения рН составляли $7,8-7,9$. В процессе инкубации микробного сообщества в SBR-реакторе проводился регулярный анализ динамики концентрации фосфатов и ацетата.

3. Исследование процесса биофильтрации сточных вод.

Модельный раствор сточной воды для экспериментального исследования биологической дефосфатации сточных вод, который содержал в своем составе комплекс легкодоступных органических субстратов, соли аммония (источник азота и серы), однозамещенный фосфат калия (источник фосфора), а также другие макро- и микроэлементы, необходимые для энергетического и конструктивного обмена клетки (таблица 2.2) [189].

Таблица 2.2 – Состав модельного раствора сточной воды

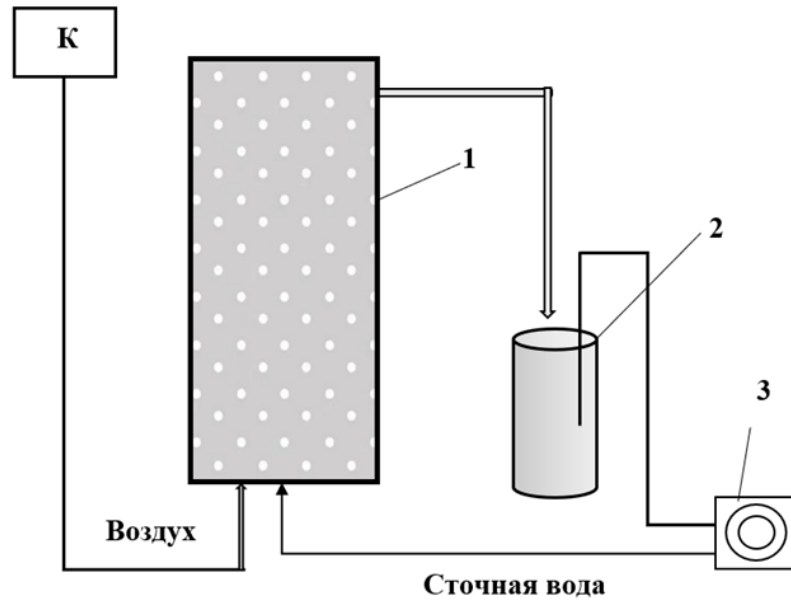
Компонент	Количество, мг/дм ³	Компонент	Количество, мг/дм ³
Na ₂ CO ₃	40,0	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005
(NH ₄) ₂ SO ₄	60,0	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,004
NH ₄ Cl	30,0	K ₂ Cr ₂ O ₇	0,001
KH ₂ PO ₄	15,0	крахмал	50,0
CaCl ₂ ·6H ₂ O	5,0	сахароза	125,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,0	глицерин	50,0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,0	ацетат натрия	50,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,005		

Образцы биопленки, полученной из микробиоценоза активного ила биологических очистных сооружений г. Иннополис, Республика Татарстан для исследования биологического удаления фосфат-ионов и ионов аммония из модельного раствора сточных вод в процессе его биофильтрации. Экспериментальные исследования проводили в лабораторной биофильтрационной установке (рисунок 2.3).

Лабораторный биофильтр представлял собой цилиндрическую емкость с носителем для биопленки объемом 500 мл, связанную с емкостью объемом 200 мл с модельным раствором сточной воды. Модельный раствор циркулировал через биофильтр с помощью перистальтического насоса LS 301 (ЗАО «Лабораторное оборудование и приборы», Санкт-Петербург, Россия) со скоростью потока 0,5 мл/мин. Подача воздуха для аэрации среды осуществлялась компрессором в нижнюю часть биофильтра.

В качестве носителя микроорганизмов использовали керамзит с средним диаметром частиц 10-12 мм и плотностью 345 г/дм³.

Культивирование иммобилизованных микроорганизмов активного ила проводили в циклическом отъемно-доливном режиме; замена культуральной жидкости модельным раствором сточной воды в объеме от 30 до 40 % проводилась ежедневно.



(1 – биофильтр с носителем, 2 – емкость для подачи модельного раствора сточной воды, 3 – перистальтический насос, К – компрессор для подачи воздуха)

Рисунок 2.3 – Принципиальная схема лабораторной биофильтрационной установки

Описанный способ культивирования был выбран для анализа динамики роста и развития бактериальной биопленки и изучения процесса внутриклеточного накопления соединений фосфора из среды.

В качестве контроля осуществлялось культивирование суспендированной биомассы активного ила в аналогичной установке в отсутствии носителя для микроорганизмов.

ГЛАВА 3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА АКТИВНОГО ИЛА В БИОРЕАКТОРЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНО- ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

3.1 Оценка фосфатаккумулирующей способности микроорганизмов активного ила

Инокулятом служил активный ил, отобранный из городских очистных сооружений г. Иннополис. Исходное количество биомассы активного ила в инокуляте составляло 3,7 гАСБ/дм³. В начальный момент времени концентрация биомассы активного ила в биореакторе достигала 0,9 гАСБ/дм³.

В течение первых 2 недель культивирования концентрация биомассы в SBR-реакторе возросла от 1,0 до 1,4 г/дм³ и составила, в среднем, 1,48 г/дм³. Высокая степень вариабельности концентрации биомассы была связана с выносом биомассы на стенки биореактора и образованием на них биопленки, которую регулярно снимали и возвращали в объем биореактора [204].

На вторые сутки культивирования активного ила эффективность потребления ацетата из среды в конце анаэробной фазы равнялась, в среднем, 79 %. Длительное и неполное усвоение органического субстрата свидетельствует о периоде адаптации микроорганизмов к компонентам питательной среды. При начальной концентрации фосфора в среде 25 мг P-PO₄/дм³ к концу аэробной стадии наблюдалось снижение фосфора до 19 мг P-PO₄/дм³.

На 13-е сутки культивирования некоторое количество ацетата усваивается к концу аэробной стадии эксперимента и отмечено уменьшение фосфора, в среднем, до 21,6 мг P-PO₄/дм³ (рисунок 3.1а).

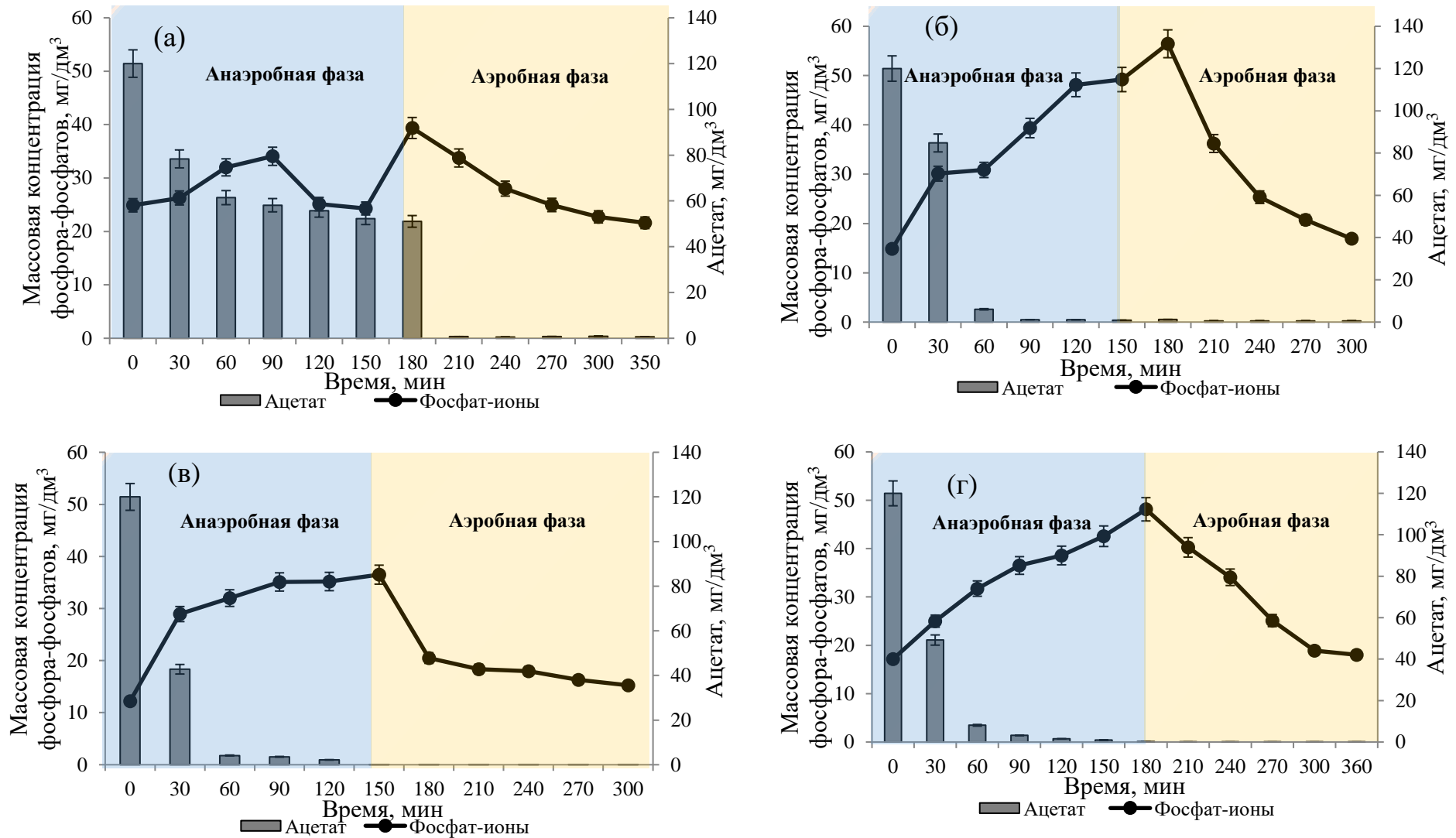


Рисунок 3.1 – Динамика содержания ацетата и соединений фосфора при культивировании активного ила в реакторе SBR в режиме 6-ти часового аэробного/анаэробного цикла (а – 13 сутки, б – 22 сутки, в – 57 сутки, г – 76 сутки культивирования)

По истечению 22-х суток культивирования активного ила при начальной концентрации фосфора $25,0 \text{ мг P-PO}_4/\text{дм}^3$ к концу аэробной стадии наблюдалось его уменьшение до $14,8 \text{ мг P-PO}_4/\text{дм}^3$ (рисунок 3.1б). В течение анаэробной фазы наблюдался устойчивый рост концентрации фосфора и достигло $50,8 \text{ мг P-PO}_4/\text{дм}^3$. Данный процесс свидетельствует о деполимеризации внутриклеточных полифосфатов, накопленных в аэробных условиях, что характерно для ФАО. В анаэробной стадии наблюдается интенсивное уменьшение ацетата в среде, что свидетельствует о его быстрой ассимиляции микроорганизмами активного ила.

На 57-е сутки культивирования активного ила общая степень поглощения фосфора в период аэробной фазы составила, в среднем, 51 % по сравнению с начальным значением ($25,0 \text{ мг P-PO}_4/\text{дм}^3$) (рисунок 3.1в). В условиях низкого содержания растворенного кислорода в течение 110 минут осуществляется потребление ацетата и высвобождение фосфора ФАО, и его концентрация достигает $36,5 \text{ мг P-PO}_4/\text{дм}^3$.

В течение следующего месяца (76 сутки культивирования) существенного изменения эффективности удаления фосфора не наблюдалось (рисунок 3.1г). Отмечено полное потребление ацетата в анаэробной фазе и возрастание концентрации фосфора до $35,0\text{-}50,0 \text{ мг P-PO}_4/\text{л}$. Концентрация фосфатов в очищенной воде варьировала в пределах $17,0\text{-}18,0 \text{ мг P-PO}_4/\text{л}$, что соответствовало эффективности очистки от фосфора 25-30 %.

Основные показатели работы биореактора и свойства культуры представлены в таблице 3.1.

Отношение количества высвободившегося фосфора к потребленному ацетату ($P_{\text{rel}}/A_{\text{супт}}$) в анаэробный период в интервале 22-34 суток эксперимента достигло максимума – $0,28\text{-}0,37 \text{ P-моль/С-моль}$, но через 2 месяца снизилось до $0,15\text{-}0,17$, и к концу эксперимента составило $0,25 \text{ P-моль/С-моль}$. Эффективность удаления фосфора к концу эксперимента (83 сутки культивирования) также снизилась на 20 %.

Таблица 3.1 – Основные показатели работы биореактора и характеристики активного ила

Параметры	Продолжительность культивирования, сутки						
	13	22	27	34	57	71	83
Концентрация фосфора в конце аэробной стадии (в очищенной воде), мг P-PO ₄ /дм ³	21,6	14,8	15,9	13,2	12,2	18,2	17,2
Концентрация фосфора в конце анаэробной стадии, мг P-PO ₄ /дм ³	24,3	50,8	60,8	50,0	36,5	37,9	48,1
Эффективность удаления фосфора, %	13,5	40,6	36,4	47,2	51,1	27,2	31,4
P _{rel} /A _{супт} , P-моль/С-моль	0,01	0,28	0,37	0,29	0,17	0,15	0,25
Расчетное содержание P в биомассе (%)	3,2	9,6	8,6	11,1	12,1	6,4	7,3
q, мгP/(ч*г TSS)	7,6	21,0	23,4	14,6	10,8	4,2	4,6

Удельная скорость потребления фосфатов q достигла максимума 21-23 мг P/ч/г TSS на 22-27 сутки, затем снизилась, и к концу эксперимента составляла 4,2-4,6 мг P/ч/гАСБ.

В ходе эксперимента расчетное содержание фосфора в биомассе возрастало, и в период от 22 до 57 суток составляло 8,6-12,1 %, однако в последующем снизилось до 6,4-7,3 %. Содержание золы в биомассе на 57 сутки составило 33 % от веса сухой биомассы (TSS).

3.2 Электронно-микроскопический анализ образцов активного ила в процессе культивирования в SBR реакторе

Электронно-микроскопическое исследование с элементным картированием методом рентгеновского микроанализа позволило визуализировать распределение химических элементов в клетках микроорганизмов активного ила (рисунок 3.2б, в, е, г, з, ж, 3.3). На 7-е культивирования в микробном сообществе преобладали палочковидные (рисунок 3.2а), а на 25-е сутки – кокковидные формы клеток микроорганизмов,

содержащие внутриклеточные включения различной электронной плотности (рисунок 3.2д).

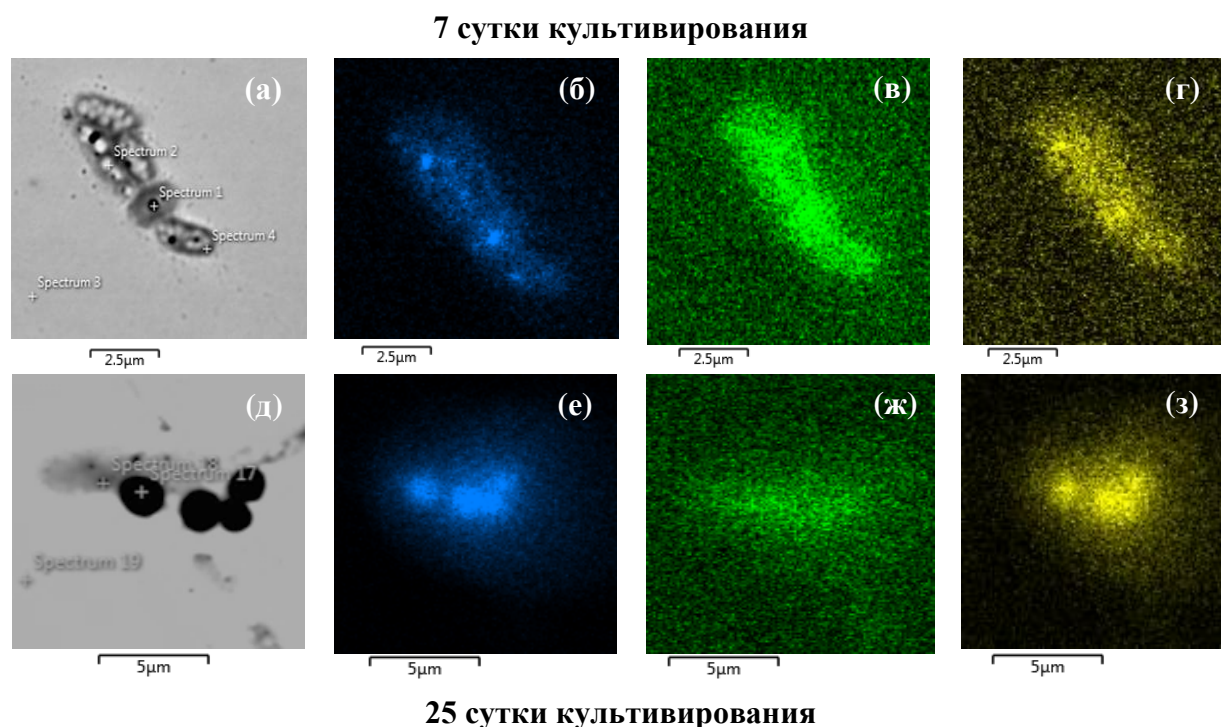


Рисунок 3.2 – Элементный анализ образцов активного ила методом картирования на 7 и 25 сутки культивирования. Синим, зеленым и желтым цветами изображено распределение фосфора, азота и магния, соответственно: электронные фотографии активного ила (а, д); распределение фосфора (б, е); распределение азота (в, ж); распределение магния (г, з).

По данным точечного рентгеновского микроанализа в исследуемых участках клеток наряду с основными биогенными элементами были обнаружены фосфор, азот и магний. В процессе культивирования микробного сообщества на 25-е сутки наблюдается увеличение содержания фосфора в 14,5 раза, по сравнению с начальной стадией эксперимента, что может свидетельствовать о накоплении фосфатов и образовании полифосфатных гранул.

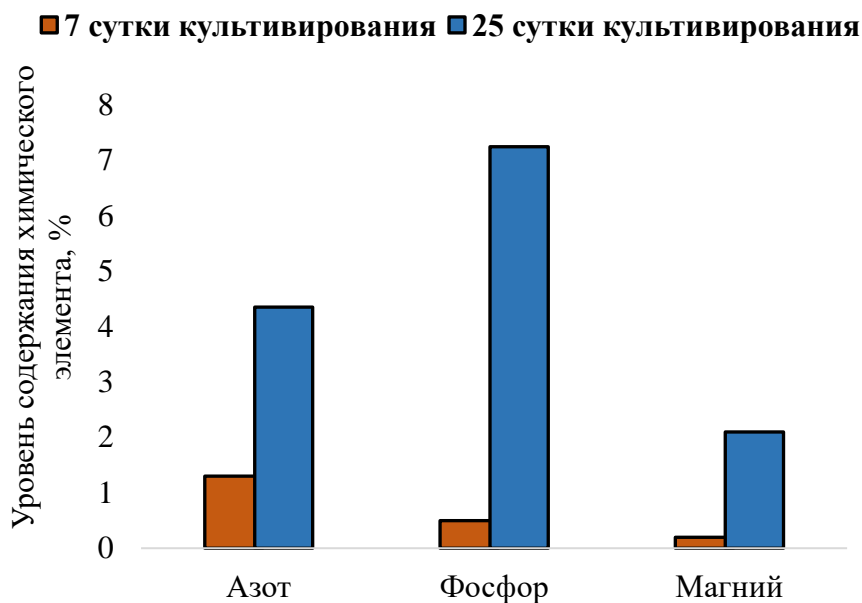


Рисунок 3.3 – Содержание химических элементов в точках анализа, выраженное в процентах от общего содержания элементов

Аналогичные результаты наблюдаются для азота (увеличение в 3,2 раза), включающийся в структурные компоненты клетки. Функциональной ролью магния преимущественно является его включение в состав ферментов, АТФ-комплексов. Однако катионы магния обладают способностью связываться с полифосфатными цепями. В связи с этим совместное высокое содержание магния и фосфора в электронно-плотных структурах клетки может рассматриваться как дополнительный признак накопления полифосфатов микроорганизмами активного ила.

Согласно исследованиям Liu et al., (2016) [205] биоценоз активного ила в условиях чередования аэробных и анаэробных фаз демонстрируют повышенное содержание азота (3-5 %) и фосфора (4-12 %), что связано с их активным участием в синтезе биомассы и энергетическом метаболизме клеток. Присутствие магния (0,1-3,0 %) и калия (0,5-1,2 %) также согласуется с авторами Wang et al., 2021 [206], где подчеркивается их роль в работе ферментов и поддержании ионного баланса в клетках.

3.3 Таксономический анализ микробного сообщества

Отбор проб микробного сообщества активного ила из биореактора для анализа микробного разнообразия по варибельной последовательности фрагмента гена 16S рРНК осуществляли на 0, 19, 29, 64 и 83 сутки культивирования. Полученные данные были депонированы в базу GeneBank под номером PRJNA1418447.

В результате прочтения ампликонов варибельных участков 16S рРНК было получено 564066 чтений, 176783 из которых было кластеризовано в ОТЕ (Операционная Таксономическая Единица). Суммарно идентифицировано 1830 ОТЕ.

Отмечено, что в начальный период культивирования доминировали представители двух филумов: *Pseudomonadota* (33,14 %) и *Bacteroidota* (28,62 %). Более половины данных 16S, относящихся к *Pseudomonadota*, принадлежало ОТЕ некультивируемому *Moraxellaceae* (16,83 %), близкому к *Agitococcus* и *Alkanindiges*. На данном этапе наблюдалось высокое, относительно последующих этапов культивирования, число нитрифицирующих бактерий, преимущественно рода *Nitrospira* (10,80 %), что характерно для традиционных систем очистки сточных вод [205]. Характерные представители фосфатаккумулялирующих бактерий – *Ca. Accumulibacter* составляли минорную долю микробного сообщества (0,05 %), также как типичные представители ГАО – *Ca. Competibacter* (0,12 %) (рисунок 3.4).

На 19-е сутки культивирования наблюдались значительные изменения микробного сообщества. Ключевой группой стали *Rhodocyclaceae* (30,18 %), а наиболее представленным ОТЕ – некультивируемый *Rhodocyclaceae*, близкий к *Ferribacterium* и *Azonexus* (ранее *Dechloromonas*) [207] – 23,80 %. *Candidatus Accumulibacter* сохранили минорное положение – 0,98 %. Количество *Ca. Competibacter* возросло до 5,61 %. Особенностью микробного состава активного ила на данном этапе являлась высокая доля хищных бактерий,

принадлежащих к родам *Bdellovibrio* (13,51 %), *Bacteriovorax* (2,99 %) [207, 208].



Рисунок 3.4 – Тепловая карта динамики разнообразия микробного сообщества в процессе культивирования активного ила

Отмечено, что *Bdellovibrio* способны участвовать в формировании агрегатов, выделяя в среду полисахариды [209]. За счет увеличения доли единичных ОТЕ возросла представленность некультивируемых *Parcubacteria* (7,17 %) и некультивируемых *Beijerinckiaceae* (4,49 %). Доля представителей

Nitrospira значительно сократилась и составила 1,87 %. Далее, было предположено, что важную роль в формировании структуры агрегатов за счет синтеза внеклеточных полимерных соединений играют представители рода *Zoogloea*, доля которых на данном этапе культивирования составляла 1,62 %.

На 29-е сутки основным организмом микробного сообщества по-прежнему оставался некультивируемый представитель *Rhodocyclaceae* с более низкой относительно предыдущего этапа долей – 17,92 %. Широко представлены были ОТЕ некультивируемой *Alphaproteobacteria* (11,64 %). Наблюдалось накопление *Patescibacteria*, достигших максимума на этом этапе работы биореактора – 14,14 %. Доля *Ca. Accumulibacter* составила 1,89 %, а *Ca. Competibacter* – 5,31 %. Значительно снизилось количество хищных бактерий *Bdellovibrio* (2,18 %) и *Bacteriovorax* (0,30 %). Представительство *Zoogloea* практически не претерпело изменений и составило 1,68 %.

К 60-м суткам было отмечено радикальное уменьшение доли преобладающего ранее ОТЕ некультивируемого *Rhodocyclaceae* до 0,70 %; возросла доля представителей *Pseudomonadota* семейств *Comamonadaceae* (21,98 %), *Competibacteraceae* (9,01 %) и *Thiotrichaceae* (4,32 %).

К 90-м суткам доля *Comamonadaceae* снизилась до 9,06 %, в то время как *Competibacteraceae* (16,05 %) и *Thiotrichaceae* (15,21 %) стали доминирующими группами микроорганизмов. Увеличилась доля представителей *Rhodocyclaceae* (11,04 %) и представителей *Ca. Accumulibacter* (8,13 %). Доля *Zoogloea* снизилась до 0,14 %.

На основе данных метагеномного анализа было идентифицировано 3 генома высокого качества, два из которых принадлежали представителям *Bdellovibrionaceae* (UBA2316 sp002345205) и один – *Azonexus* sp016705475. Таксономическое положение и представленность в метагеноме позволяют предположить, что геном *Azonexus* (полнота 100 %, контаминация 3 %) соответствует наиболее представленной ОТЕ, соответствующей некультивируемой *Alphaproteobacteria*. Набор генов, идентифицированных в собранном геноме *Azonexus*, указывает на потенциальную способность

данного организма к накоплению фосфатов [210]. Идентифицированы ключевые гены как высокоаффинной системы транспорта фосфатов *pst* (*pstSCAB*), так и низкоаффинный транспортер *pit*, определяющий эффективность потребления фосфатов в высоких концентрациях, а также гены синтеза (*ppk1*, *ppk2*) и расщепления (*ppx*, *pap*) полифосфатов. В геноме определены гены регуляции транспортера *pst*: *phoU*, *phoRB*, а также гены транспорта ЛЖК *actP* и пути запасания полигидроксиалканоатов *atoB* (*phaA*, *phbA*, *ACAT*), *phbB*, *phbC*. Кроме того, идентифицирован полный набор генов путей денитрификации: (*narA*, *narB*, *nirS*, *norB*, *norC*, *nosZ*).

Как следует из показателей работы биореактора (SBR) и данных молекулярно-генетического анализа, развитие микробного сообщества можно условно разделить на три периода:

1. 15-20 сут – период адаптации и развития сообщества с выраженным ФАО-фенотипом;
2. 20 сут-2 месяца – период функционирования ФАО-сообщества, обладающего высокой эффективностью удаления фосфора;
3. более 2 месяцев после начала эксперимента – период развития сообщества с менее выраженным ФАО-фенотипом по сравнению со вторым периодом.

В течение первого периода наблюдалось увеличение амплитуды выделения/поглощения фосфатов; отношение Р/Ацетат достигло 0,28 Р-моль/С-моль, а эффективность удаления фосфора выросла до 40 %. Результаты молекулярно-генетического анализа показали, что к концу адаптационного периода сформировалось сообщество с доминированием представителя семейства *Azonexaceae*, доля которого на 19 сутки достигла 23,80 %. Таксономическое положение и представленность в метагеноме позволяют предположить, что данная ОТЕ соответствует р. *Azonexus*, геном которого соответствует профилю ФАО.

В течение второго периода в SBR установилось псевдостационарное состояние с типичным для ФАО циклированием фосфатов и полным

потреблением ацетата в анаэробной фазе. Биомасса характеризовалась высоким содержанием золы (33 %), существенно превышающим содержание фосфора в «обычной» биомассе микроорганизмов активного ила (2-3 %). Удаление фосфора достигло максимума, составив 36-51 %. Профилирование по гену 16S рРНК показало, что на этом этапе продолжал доминировать *Azonexus* (23-18 %), тогда как доля типичного ФАО *Ca. Accumulibacter* составила менее 2 %.

Известно [211], что *Azonexus* (ранее *Dechloromonas*) – типичный обитатель микробных сообществ активного ила очистных сооружений. Ранее было показано [212], что некоторые представители *Azonexus* входят в группу денитрифицирующих ФАО, способных использовать в качестве акцептора электронов как кислород, так и нитраты. Проведенный анализ метагенома выявил наличие у доминирующего в сообществе *Azonexus* всех основных генов, характерных для ФАО: гены транспорта фосфатов и синтеза полифосфатов, гены транспорта ЛЖК и синтеза полигидроксиалканоатов.

По результатам анализа метагеномных данных определено, что обнаруженный в исследуемом активном иле *Azonexus* является потенциальным денитрификатором, и, таким образом, может быть отнесен к группе ДФАО. Сделан вывод, что основную роль в циклическом процессе выделения и удаления фосфора во втором периоде эксперимента выполнял *Azonexus*, тогда как *Ca. Accumulibacter* и присутствующие в сообществе потенциальные ФАО (*Thiotrix*, *Thauera*) играли минорную роль. Вместе с тем, во втором периоде микробное сообщество характеризовалась меньшей эффективностью удаления фосфора по сравнению с ФАО-сообществами, обогащенными *Accumulibacter* и длительное время развивающимися в условиях EBPR.

В настоящих экспериментальных исследованиях удаление 1 мг фосфора сопровождалось потреблением 25-35 мг ХПК, тогда как по имеющимся в литературе данным [213, 214] в сообществах, обогащенных *Accumulibacter*, этот стехиометрический показатель обычно ниже и составляет около 15-20 мг

ХПК/мг $\text{PO}_4\text{-P}$. Отношение количества высвободившегося фосфора к потребленному ацетату в анаэробный период на 22-34 сутки составило 0,28-0,37 P-моль/С-моль, что характерно для сообщества со «средним» (около 0,5) соотношением ФАО/ГАО [215], однако доля *Competibacter* была значительно ниже, чем *Azonexus* и составляла около 6 %. Следует отметить, что невысокие значения P/Ацетат могут быть связаны не только с низким соотношением ФАО/ГАО, но и с биохимическими особенностями представителей ФАО. Состав сообщества в биореакторе в этот период существенно отличался от состава развивающихся в анаэробно/аэробных условиях «типичных» ФАО-сообществ с доминированием *Ca. Accumulibacter*. Возможно, что доминирующий во втором периоде ДФАО *Azonexus* способен к меньшему накоплению в биомассе полифосфатов, чем *Accumulibacter*, что объясняет снижение эффективности удаления фосфора.

На третьем этапе произошло резкое изменение состава доминантов микробного сообщества, и доля *Azonexus* уменьшилась, составив на протяжении этого периода менее 1 %. В то же время увеличилась доля типичного представителя ФАО – *Ca. Accumulibacter* (до 8,3 %), существенно возросла доля представителей *Comamonadaceae*, составивших на 64 сутки до 21,98 % и *Thiotrichaceae* – до 14,8 % на 83 сутки. Ранее было показано, что некоторые представители этих семейств проявляют ФАО-фенотип и способны к удалению фосфора. Так, в работе Spring et al. [216] была выделена и охарактеризована новая бактериальная культура *Malikia granosa* как представитель семейства *Comamonadaceae*, способная накапливать фосфор. В более позднем исследовании Ge et al. [217] было показано, что при низких значениях времени пребывания (SRT) удаление фосфора из сточных вод скотобойни обеспечивалось ФАО, принадлежащим семейству *Comamonadaceae*. Способность представителей *Thiotrix* к удалению фосфора показана в работах Rubio-Rincón et al. и Chen et al. [218, 219].

Несмотря на увеличение в третьем периоде доли *Ca. Accumulibacter* и потенциальных ФАО, увеличения эффективности удаления фосфора не

произошло. Наоборот, эффективность его удаления в этот период снизилась на 30-40 %. Также снизилось содержание фосфора в биомассе и удельная скорость поглощения фосфора в аэробный период (таблица 3.1). Невысокое соотношение Р/Ацетат (0,15-0,25 Р-моль/С-моль) указывает на увеличение доли ГАО в составе сообщества. В этот период доля представителей семейства *Competibacteraceae* возросла до 16,2 %, причем среди *Competibacteraceae* преобладали типичные ГАО – *Ca. Competibacter* и родственные *Ca. Contendobacter* бактерии.

Замещение доминирующего в микробном сообществе *Azonexus* другими представителями ФАО указывает на более низкую конкурентоспособность *Azonexus* в исследованном процессе при создании анаэробно/аэробных условиях. Известно, что *Azonexus* широко распространен в активных илах очистных сооружений, однако после инокуляции активным илом биологических очистных сооружений г. Иннополис в лабораторных установках для глубокого биологического удаления фосфора (EBPR) в «строгом» анаэробно/аэробном режиме происходит, как правило, обогащение микробных сообществ представителями *Ca. Accumulibacter*. Известны лишь немногочисленные сообщения, когда при создании специфических условий, как, например, при росте на пропионате при низкой температуре [220], в «строгом» анаэробно/аэробном режиме представители *Azonexus* доминировали в течение длительного периода (более 3-5 SRT).

Причина столь быстрого уменьшения представителей *Azonexus* в наших экспериментах может быть связана с деятельностью хищных бактерий *Bdellovibrio* и *Bacteriovorax*, участвующих в регулировании численности и разнообразия микробных сообществ. Известно, что *Bdellovibrio* широко распространены в активных илах EBPR-процесса, а некоторые исследователи даже отнесли их к ДФАО [221]. Доля этих организмов достигла максимума в течение первого месяца культивирования, а затем снижалась, как и доля *Azonexus*, из чего можно предположить наличие трофической связи между этими бактериями. В этом случае активность *Bdellovibrio* и *Bacteriovorax* в

активном иле EBPR-процесса можно рассматривать как нежелательную, однако данное утверждение требует дальнейших исследований. В частности, нужно принять во внимание, что потребление *Azonexus* такими хищниками как *Bdellovibrio* – один из вероятных факторов, определяющих снижение доли *Azonexus* в анаэробно/аэробных условиях и повышающих конкурентоспособность других представителей ФАО. Кроме того, следует учитывать, что представители хищных бактерий, таких как *Bdellovibrio*, способны негативно влиять на формирование структуры активного ила [222].

Доминирование представителей *Azonexus* на начальных этапах развития ФАО-сообщества может быть объяснимо не только их способностью к росту в анаэробно/аэробных условиях, но и относительно высоким их содержанием в инокуляте на фоне малого количества других ФАО и ГАО-конкурентов. В данной работе исходный активный ил был отобран из очистных сооружений, работающих по аэробно-аноксидной технологии без глубокого удаления фосфора, и доля *Azonexus* в нем составляла 3,34 %, тогда как *Accumulibacter* – 0,07 %, *Thiothrix* – 0,05 %, *Comamonadaceae* и *Competibacter* – около 1,0 и 0,1 %, соответственно.

Таким образом, использование при запуске процесса глубокого биологического удаления фосфора (EBPR) с внесением активного ила традиционных очистных сооружений, не работающих по технологии EBPR, приводит к развитию в течение 2-3 недель фосфат-аккумулирующего микробного сообщества, эффективно удаляющего фосфор. Однако доминирующими на первом этапе развития ФАО-сообществе могут быть не *Accumulibacter*, а представители ДФАО (*Azonexus*), в значительном количестве присутствующие в исходном активном иле и имеющие конкурентное преимущество в условиях денитрификации.

В дальнейшем при культивировании в анаэробно/аэробном режиме в лабораторных установках, а также в отсутствие или в случае малой продолжительности фазы денитрификации на промышленных биологических очистных сооружениях с глубоким удалением фосфора происходит постепенная смена доминирующих ФАО. Менее специализированные для

анаэробно/аэробного режима или менее конкурентоспособные таксоны (*Azonexus*) вытесняются более конкурентоспособными ФАО (*Accumulibacter*, *Comamonadaceae*, *Thiotrichaceae*) и микроорганизмами группы ГАО. При этом эффективность удаления фосфора может снижаться на отдельных этапах изменения состава сообщества.

В связи с тем, что в условиях EBPR при культивировании в SBR-реакторе эффективность процесса биологической дефосфатации свободноплавающим активным илом достигает невысоких средних значений (до 50 %), актуальным является исследование функционально-устойчивых характеристик бактериальной биопленки, проведение сравнительного анализа удаления соединений фосфора иммобилизованной микробной формой, обладающей структурной стабильностью и метаболической активностью, а также возможностью одновременного развития различных физиологических групп микроорганизмов в составе биоценоза плотной развитой биопленки.

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА

4.1 Оценка биопленкообразующей способности монокультур активного ила

Известно, что более 90 % идентифицированных бактерий обладают способностью к формированию биопленок [118]. Бактериальные биопленки рассматриваются как один из ключевых инструментов экологической биотехнологии в процессах биоремедиации загрязненных экосистем, активного ила. Это связано с тем, что биопленка состоит из множества структурных компонентов, способствующих иммобилизации и солюбилизации ряда соединений из водной среды. Микробная биопленка активного ила, характеризующаяся наличием аэробных и анаэробных микронзон, обеспечивает возможность одновременного протекания процессов нитрификации, денитрификации и фосфатаккумуляции [119].

На первом этапе исследований способности отдельных культур сообщества активного ила к формированию биопленки проводилась видовая идентификация микроорганизмов, выделенных из активного ила очистных сооружений г. Иннополис Республики Татарстан, отличающихся выраженной способностью к биопленкообразованию. По результатам секвенирования нуклеотидной последовательности 16S рРНК было установлено, что бактериальные культуры принадлежат видам *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus yunnanensis* и *Bacillus proteolyticus*.

Следует отметить, что бактериальные культуры активного ила [223-225], а также микроорганизмы, обладающие способностью к биотрансформации широкого спектра органических соединений (полученные из коллекции ПФИЦ УрО РАН), могут участвовать в процессах дефосфатации сточных вод либо быть вовлечёнными в сорбционное связывание фосфат-ионов на поверхности хлопьев активного ила [226-229].

Для оценки биопленкообразующей способности для каждой исследуемой бактериальной культуры определяли биомассу биопленки окрашиванием образцов биопленки кристаллическим фиолетовым и определением оптической плотности раствора отмытого красителя после его поглощения биопленкой (таблица 4.1). Исследование способности идентифицированных микроорганизмов активного ила, а также полученных из коллекции ПФИЦ УрО РАН, к формированию биопленок проводилось на среде LB, а также на питательной среде с минимальным содержанием макро- и микроэлементов (синтетической питательной среде).

Таблица 4.1 – Оптическая плотность растворов красителя кристаллического фиолетового (ОП₅₄₀) в процессе периодического культивирования биопленки в течение 72 часов на питательных средах различного состава

Бактериальные культуры	Среда LB	Синтетическая питательная среда
<i>Bacillus subtilis</i>	0,35±0,01	0,40±0,02
<i>Paenibacillus odorifer</i>	0,27±0,01	0,110±0,005
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0,090±0,004	0,020±0,001
<i>Bacillus proteolyticus</i>	0,080±0,004	0,0100±0,0005
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	0,41±0,02	0,29±0,01
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ИЛБИО	0,150±0,007	0,31±0,01
<i>Acinetobacter guillouiae</i> 11h	0,180±0,009	0,190±0,009
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	0,21±0,01	0,27±0,01

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, формируется устойчивая микробная биопленка вне зависимости от состава среды. Для указанных культур значения оптической плотности красителя, характеризующей биопленкообразующую способность, превышали 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 отмечено при культивировании клеток на среде LB по сравнению с синтетической питательной средой (таблица 4.1). Указанные культуры характеризуются высокой скоростью роста и метаболической активностью, поэтому необходимой является достаточная концентрация углеродного субстрата в составе полноценной питательной среды. В связи с этим следует отметить, что на синтетической питательной среде с минимальным содержанием ацетата натрия активное исчерпание субстрата в процессе культивирования являлось лимитирующим фактором для роста микроорганизмов и формирования биопленок культур *P. odorifer* и *A. 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 [230], 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 *B. subtilis* и *P. odorifer*, а также у бактериальных культур *A. faecalis* 2 и *A. pulmonis* ПНОС. В связи с этим рассматриваемые объекты были выбраны для проведения дальнейших исследований.

Далее оценивали биопленкообразующую способность бактериальных культур на среде LB при увеличении продолжительности культивирования до 144 часов. При этом через 72 часа роста микроорганизмов из опытных планшетов удаляли культуральную жидкость и добавляли свежую

питательную среду LB с целью подпитки и 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 4.1.

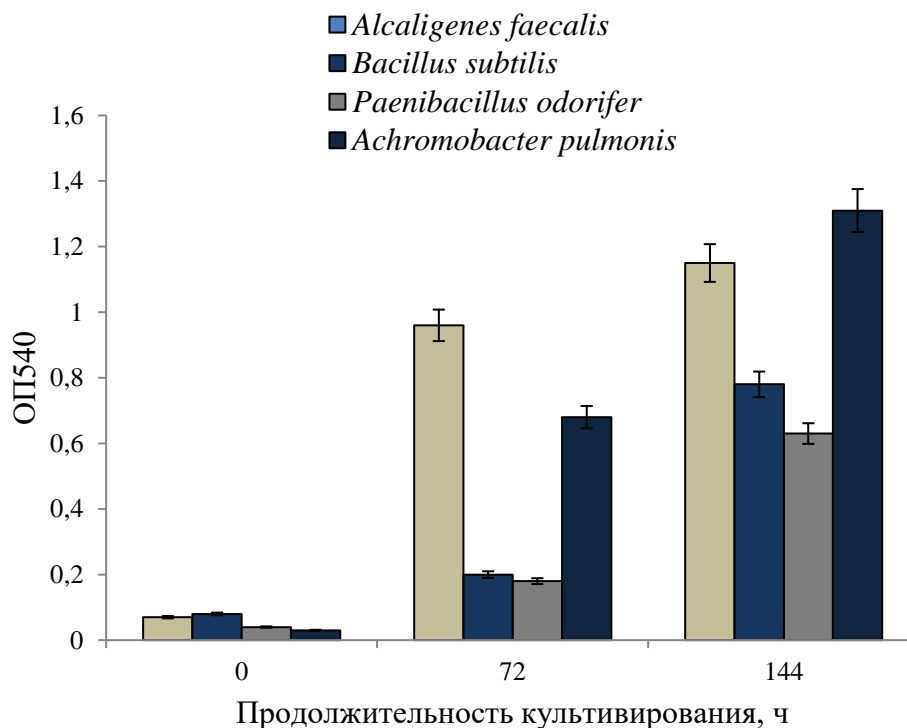


Рисунок 4.1 – Количество биомассы, опт. ед., в культуральной жидкости при периодическом *in vitro* культивировании *Alcaligenes faecalis* 2, *Paenibacillus odorifer*, *Bacillus subtilis* и *Achromobacter pulmonis* ПНОС

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 *B. subtilis*, *P. odorifer*, штаммов *A. faecalis* 2 и *A. pulmonis* ПНОС. Известно [231], что при формировании биопленок важно обеспечить значительное количество

суспендированной биомассы для обеспечения процессов самоиммобилизации клеток и их агрегирования.

Увеличение продолжительности периодического культивирования в опытных планшетах с 72 до 144 часов с подпиткой субстратом способствовало значительному приросту бактерий активного ила *B. subtilis* и *P. 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 (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Показатели формирования биопленок для бактериальных культур *A. faecalis* 2, *A. pulmonis* ПНОС, *B. subtilis* и *P. odorifer* при периодическом культивировании на питательной среде LB

Бактериальные культуры	Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	
	72 ч	144 ч
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	0,41±0,02	0,52±0,02
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	0,20±0,01	0,43±0,02
<i>Bacillus subtilis</i>	0,31±0,01	0,83±0,04
<i>Paenibacillus odorifer</i>	0,18±0,01	0,78±0,04

Таким образом, было подтверждено, что для формирования агрегатов бактериальных клеток активного ила важным является предварительный этап накопления биомассы в культуральной жидкости и его длительность.

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

Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила на 144-й час периодического культивирования варьировало в диапазоне от 0,004 до 0,2 опт.ед.

Результаты оценки метаболической активности микроорганизмов в составе биопленки на 144-й час периодического культивирования приведены в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Метаболическая активность микроорганизмов биопленки, Фл./ОП₅₄₀, оцененная с помощью красителя 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>
628,00±31,40	3609,30±180,40	1227,30±61,30	1120,00±56,00

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

На процесс формирования биопленок бактериями *A. faecalis* 2 оказывают влияние состав питательной среды (таблица 4.1) и в меньшей степени – продолжительность культивирования клеток и подпитка субстратом (рисунок 4.1). Метаболическая активность биопленки к 144 часам эксперимента составила 628 Фл./ОП₅₄₀, что сравнительно ниже значений для других анализируемых культур (таблица 4.3). Это может быть связано с высокой чувствительностью культуры *A. faecalis* 2 к колебанию концентрации кислорода и питательных веществ, приводящему к изменению метаболической активности клеток в глубинных слоях биопленки [232], а также с гибелью большей части популяции за данный промежуток времени в связи с высокими скоростями роста этой культуры.

Для бактериальных культур активного ила *B. subtilis* и *P. odorifer* отмечены высокие значения, отражающие массу биопленок и содержание экзополисахаридов. Показатель жизнеспособности и метаболической активности клеток этих культур составляет 1100-1250 Фл./ОП₅₄₀. Таким образом, в составе биопленки клетки сохраняют жизнеспособность и метаболическую активность.

4.2 Анализ влияния физико-химических факторов среды на устойчивость биопленки монокультур активного ила

В процессах эксплуатации на очистных сооружениях активный ил регулярно подвергается воздействию стрессоров – колебаний гидравлической и органической нагрузки, изменения концентрации кислорода, рН, температуры, токсичных соединений (тяжелые металлы, антимикробные вещества и др.) [233-235]. Несмотря на значительное количество исследований, посвященных роли биопленочных сообществ в процессах биологической очистки сточных вод, ряд аспектов, касающихся функционирования биопленки в условиях изменения внешней среды, остается недостаточно изученным.

Таким образом, особый интерес представляет изучение воздействия параметров среды культивирования в условиях стресса на процесс биопленкообразования. Глубокое понимание механизмов воздействия внешних факторов на формирование биопленок микробных консорциумов обеспечит дальнейшую оптимизацию технологии биоремедиации экосистем от загрязняющих веществ.

На начальном этапе исследований оценивались биомасса и микробная биопленка после 72-часового периодического культивирования в планшете (таблица 4.4).

Установлено, что начальное содержание микроорганизмов в опытных лунках планшета составляло от 0,02 до 0,13 опт.ед. В результате культивирования микроорганизмов в течение 72 ч наибольшие значения оптической плотности бактериальной суспензии наблюдаются для культур бактерий *A. faecalis* 2 и *A. pulmonis* ПНОС. При этом следует отметить, что способность к образованию биопленки и, как следствие, массивность биопленки у культуры *A. pulmonis* ПНОС ниже в среднем на 33-44 %, чем у культур *B. subtilis* и *P. odorifer*.

Таблица 4.4 – Результаты измерения оптической плотности бактериальной суспензии и массивности бактериальных биопленок

Показатель	Исследуемые бактериальные культуры			
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	<i>Paenibacillus odorifer</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,95±0,06	0,67±0,14	0,18±0,06	0,20±0,06
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,47±0,06	0,08±0,05	0,18±0,06	0,12±0,08

Температура оказывает значительное влияние на распространение и развитие микробных биопленок в экосистеме. В частности, изменение температурного режима оказывает воздействие на скорость диффузии растворенного кислорода и метаболическую активность микробных клеток [236]. На следующем этапе проводился анализ воздействия температуры в области низких и высоких значений (10 и 50 °С) на устойчивость бактериальных биопленок (таблица 4.5).

Влияние температурного фактора на устойчивость бактериальных биопленок изучено при стрессировании культур *A. faecalis* 2, *A. pulmonis* ПНОС, *B. subtilis* и *P. odorifer* температурой 10 и 50 °С в течение 24 ч.

В результате термостатирования исследуемых культур микроорганизмов при 10 °С значение оптической плотности бактериальной суспензии варьирует от 0,8 до 1,1 опт.ед. и не имеет существенного отличия от контрольных образцов без температурного стресса (см. таблицу 4.5, температуру 30 °С). В области высоких температурных значений для микроорганизмов *A. faecalis* 2, *B. subtilis* и *P. odorifer* наблюдается уменьшение значения оптической плотности бактериальной суспензии, в среднем, на 38 %, 65 % и 60 % по сравнению с количеством клеток в контроле.

Следует отметить, что периодическое культивирование микроорганизмов при температуре 10 °С оказало влияние на устойчивость исследованных биопленок.

Таблица 4.5 – Результаты измерения оптической плотности массивности биопленки при воздействии температуры среды

Показатель	Температурный режим, °С		
	10	30	50
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,02±0,15	1,14±0,28	0,70±0,22
Массивность биопленки	0,73±0,10	0,52±0,10	0,002±0,051
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	840,00±42,00	286,56±14,32	58,30±2,91
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,10±0,23	1,30±0,08	1,01±0,23
Массивность биопленки	0,71±0,19	0,40±0,32	0,11±0,07
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	920,39±46,01	1193,89±59,69	81,00±4,05
<i>Paenibacillus odorifer</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,87±0,29	1,13±0,09	0,40±0,15
Массивность биопленки	0,72±0,10	0,77±0,09	0,39±0,13
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	642,02±32,10	773,72±38,68	202,50±10,12
<i>Bacillus subtilis</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,90±0,06	1,04±0,21	0,41±0,09
Массивность биопленки	0,75±0,10	0,60±0,03	0,33±0,11
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	768,25±38,41	991,28±49,56	254,41±12,72

При предварительном стрессировании клеток в течение 24 ч массивность биопленки бактериальных культур *A. faecalis 2*, *A. pulmonis* ПНОС, *B. subtilis* увеличивается в среднем на 29 %, 43 % и 20 %, соответственно, по сравнению с контрольными образцами. Одновременно отмечено, что изменения массивности биопленки культуры *P. odorifer* в ответ на снижение температуры до 10 °С не наблюдается. Содержание биопленки в опытной системе и в контрольных образцах изменяется в среднем от 0,70 до 0,77 опт.ед.

Термостатирование микроорганизмов при 50 °С в течение суток привело к дальнейшему снижению массивности биопленки *P. odorifer* и *B. subtilis*, в

среднем, на 49 % и 45 % в сравнении с оптимальным температурным режимом (30 °C). Несмотря на высокие значения оптической плотности бактериальной суспензии *A. faecalis* 2 и *A. pulmonis* ПНОС, стрессирующий фактор оказал ингибирующее воздействие на формирование микробной биопленки.

В условиях предварительного стрессирования *A. faecalis* 2 в составе биопленки при 10 °C наблюдается увеличение метаболической активности, в среднем, на 65 % по сравнению с контрольными образцами микробной биопленки. Несмотря на устойчивость биопленки *A. pulmonis* ПНОС к низкой температуре, наблюдается снижение метаболической активности в среднем на 23 % по сравнению с контрольными образцами. Высокой метаболической активностью обладают штаммы микроорганизмов *P. odorifer* и *B. subtilis* при их периодическом культивировании в отсутствие стрессирующего температурного фактора. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,002 до 0,05 опт.ед.

С учетом фактора повышения температуры для ускорения метаболических процессов в микробных клетках и увеличения скорости роста микроорганизмов ранее были обсуждены результаты исследования процесса формирования бактериальных биопленок в ответ на изменение температурного режима среды (28 и 37 °C) [236]. При этом известно [237], что многие штаммы бактерий рода *Paenibacillus* проявляют устойчивость к низким температурам (в среднем 6 °C). Клетки *B. subtilis* способны использовать различные механизмы для сохранения устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды: подвижность, образование экзополисахаридного матрикса и общую реакцию на стресс [238]. Изменение структуры жирных кислот в липидах мембран является ответной реакцией микроорганизмов, позволяющей адаптироваться к низким температурным значениям среды (с 37 до 15 °C) [239]. С помощью метода двумерного гелевого электрофореза установлено, что одной из главных причин устойчивости микроорганизмов рода *Bacillus* является синтез двух классов специфических белков: белков, индуцируемых при действии низких значений температур, и

белков, образующихся после завершения стадии акклиматизации к температурным условиям среды [240].

Иммобилизованные клетки микроорганизмов обладают различными механизмами, отвечающими на воздействие стрессовых факторов, например, изменение активной реакции среды. На следующем этапе исследований оценивалось влияние рН среды при постоянной температуре 30 °С на устойчивость бактериальных биопленок (таблица 4.6).

Таблица 4.6 – Результаты измерения оптической плотности массивности биопленки при воздействии рН среды

Показатель	рН среды		
	5,0	7,0	10,0
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,85±0,19	0,88±0,12	1,00±0,09
Массивность биопленки	1,09±0,11	0,81±0,11	0,82±0,07
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	343,52±17,17	263,20±13,16	277,43±13,87
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,77±0,42	0,94±0,36	1,15±0,39
Массивность биопленки	0,73±0,14	0,72±0,08	0,68±0,11
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	196,42±9,82	253,98±12,69	347,00±17,35
<i>Paenibacillus odorifer</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,88±0,25	0,99±0,18	1,03±0,31
Массивность биопленки	1,24±0,14	1,26±0,09	1,20±0,09
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	197,01±9,85	187,24±9,36	255,75±12,78
<i>Bacillus subtilis</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,83±0,16	1,01±0,19	1,06±0,27
Массивность биопленки	1,28±0,13	1,34±0,10	1,42±0,12
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	256,62±12,83	357,54±17,87	278,23±13,91

Результаты анализа культивирования микроорганизмов в условиях кислой среды (рН 5,0) в течение 24 ч показали, что значения оптической плотности бактериальной суспензии для штаммов *A. faecalis* 2 и *P. odorifer* не имеют существенных отличий при их выращивании в нейтральной среде (оптическая плотность варьирует в среднем от 0,8 до 0,9 опт.ед.). Максимальное количество клеток *A. pulmonis* ПНОС и *B. subtilis* зарегистрировано при их стрессировании в щелочных условиях среды (рН 10,0) (диапазон изменения оптической плотности бактериальной суспензии составляет в среднем от 1,0 до 1,2 опт.ед.).

Далее отметим, что массивность биопленки микроорганизмов *A. faecalis* 2 увеличивается в условиях кислой среды в среднем на 35 % по сравнению с контрольными образцами (рН 7,0). Количество биопленки оказалось максимальным при стрессировании бактериальной культуры *B. subtilis* в щелочной среде (рН 10,0). Установлено, что микроорганизмы *A. pulmonis* ПНОС и *P. odorifer* проявляют адаптационные свойства и сохраняют способность к образованию биопленки как в щелочных, так и в кислых условиях среды. В обоих случаях масса сформированной микробной биопленки соответствовала массе биопленки для контрольного образца (рН 7,0).

Наибольшая активность микроорганизмов *A. faecalis* 2 наблюдается при культивировании клеток в кислых условиях среды, что коррелирует со значениями массивности биопленки. Повышение рН среды до 10,0 привело к увеличению метаболической активности микроорганизмов *A. pulmonis* ПНОС и *P. odorifer* в среднем на 27 % и 26 % по сравнению с контрольными образцами (рН 7,0). Стрессирование микробных клеток *B. subtilis* оказало ингибирующее воздействие на метаболизм клеток по сравнению с результатами, полученными в процессе инкубирования микроорганизмов в благоприятных условиях среды.

Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,003 до 0,08 опт.ед.

Полученные экспериментальные результаты имеют теоретическое объяснение и практическое подтверждение в опубликованных источниках. Так, кислотность среды влияет на активность протонного насоса и проницаемость клеточной мембраны. Воздействие рН среды как стрессирующего фактора приводит к процессу активации защитного механизма и увеличению образования бактериальной биопленки. Доказано, что изменение рН влияет на соотношение белков и полисахаридов в матриксе биопленки. Описана высокая чувствительность биопленки микроорганизмов *A. faecalis* к щелочным условиям среды – рост бактерий уменьшается при повышении рН среды до 9,0 [241]. Изменение факторов окружающей среды оказывает влияние на способность микробных биопленок к окислению загрязняющих веществ из сточных вод. Биопленкообразующие бактерии рода *Bacillus* проявляют устойчивость к щелочным условиям среды при температуре 30 °С в течение 24 ч. В экстремальных условиях окружающей среды экзополисахаридный матрикс обеспечивает структурную и функциональную стабильность биопленки.

При культивировании микроорганизмов рода *Bacillus* в кислых условиях среды (рН 6,0) синтез ключевых компонентов экзополисахаридов, а также белков и липидов достигает максимальных значений. Подтвердилась аморфная природа экзополисахаридов и изменение функциональных групп ($-\text{CH}_2\text{CHOCH}_3$, $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2$) при воздействии на рН среды. Содержание микробной биопленки составило $5,2 \pm 0,5$ мкм³/мкм² при толщине $9,9 \pm 1,5$ мкм [242, 243]. В исследованиях по изучению бактерий рода *Achromobacter* наибольшая степень образования биопленки наблюдается в диапазоне рН среды от 4,0 до 5,5. Для микроорганизмов рода *Achromobacter* идентифицированы гены *FliF*, *FliM* и *FliN*, влияющие на процесс адгезии клеток. В устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды также вносит вклад использование мембраносвязанных белков, участвующих во внутриклеточном переносе ключевых компонентов и ферментов [244].

Далее, следует отметить влияние стрессирующих факторов, связанных с присутствием токсичных и биорезистентных компонентов в среде культивирования.

Так, например, содержание токсиканта – анионного ПАВ додецилсульфата натрия в хозяйственно-бытовых сточных водах варьирует, в среднем, от 3 до 20 мг/дм³. Несмотря на ингибирующее воздействие высокой концентрации додецилсульфата натрия на микробную активность, достигнута высокая степень биологического окисления поллютанта микроорганизмами в составе биопленки с эффективностью удаления додецилсульфата натрия выше 70 % [245]. Микробная биопленка демонстрирует устойчивость к содержанию ПАВ в среде. Ответной реакцией биопленки на первичное воздействие додецилсульфата натрия является способность к восстановлению дыхательной активности микроорганизмов и количества биомассы [246].

В связи с этим на следующем этапе исследований проводился анализ влияния додецилсульфата натрия на изменение массивности биопленки и метаболической активности микроорганизмов, выделенных из активного ила коммунально-бытовых и промышленных сточных вод (таблица 4.7).

В процессе периодического культивирования штаммов микроорганизмов *A. faecalis* 2, *A. pulmonis* ПНОС, *B. subtilis* и *P. odorifer* на питательной среде, содержащей додецилсульфат натрия в массовой концентрации 5, 10 и 50 мг/дм³, значения оптической плотности бактериальной суспензии изменяются в интервале от 0,95 до 1,20 опт.ед.

Следует отметить, что микроорганизмы *A. faecalis* 2, *B. subtilis* и *P. odorifer* сохраняют способность к образованию биопленки при воздействии концентрации додецилсульфата натрия от 5 до 10 мг/дм³. Однако увеличение содержания додецилсульфата натрия до 50 мг/дм³ оказывает ингибирующее воздействие и приводит к снижению массивности биопленки для рассматриваемых бактериальных культур в среднем на 87 %, 45 % и 46 %, соответственно, по сравнению с опытными образцами с минимальным количеством раствора додецилсульфата натрия (до 5 мг/дм³).

Таблица 4.7 – Результаты измерения оптической плотности массивности биопленки при воздействии раствора додецилсульфата натрия

Показатель	Массовая концентрация додецилсульфата натрия, мг/дм ³		
	5	10	50
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,08±0,05	1,07±0,05	1,11±0,05
Массивность биопленки	0,74±0,11	0,68±0,09	0,09±0,06
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	216,72±10,83	180,37±9,01	36,03±1,80
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,99±0,06	1,01±0,07	1,02±0,05
Массивность биопленки	0,32±0,09	0,52±0,09	0,57±0,08
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	51,57±2,57	78,77±3,93	23,58±1,17
<i>Paenibacillus odorifer</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,99±0,05	0,94±0,05	0,97±0,05
Массивность биопленки	0,73±0,09	0,62±0,11	0,40±0,07
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	307,25±15,36	30,64±1,53	52,38±2,61
<i>Bacillus subtilis</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,98±0,05	0,95±0,05	0,97±0,06
Массивность биопленки	0,73±0,07	0,62±0,10	0,39±0,08
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	306,12±15,30	144,40±7,22	8,82±0,44

Одновременно отмечено, что инкубирование микробных клеток *Achromobacter pulmonis* ПНОС в условиях с повышенным содержанием додецилсульфата натрия оказало стимулирующее воздействие на бактериальную культуру и сопровождалось увеличением массы биопленки в среднем на 38 % для массовой концентрации додецилсульфата натрия 10 и 50 мг/дм³ по сравнению с пробами с минимальной концентрацией додецилсульфата натрия в среде.

Согласно полученным данным, метаболическая активность микроорганизмов *A. faecalis* 2, *B. subtilis* и *P. odorifer* в составе биопленки сохраняется при воздействии додецилсульфата натрия с конечной

концентрацией в среде 5 мг/дм³. Отмечено также, что бактериальная культура *A. pulmonis* ПНОС сохраняет устойчивость и метаболическую активность к содержанию раствора токсиканта в среде до 10 мг/дм³. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,001 до 0,06 опт.ед.

Ряд исследований в предметной литературе посвящен изучению влияния ПАВ на метаболическую активность микроорганизмов. Повышенное содержание додецилсульфата натрия приводит к увеличению денатурирующей способности вещества и к снижению активности таких ферментов, как фосфатаза, бета-глюкозидаза и лейцинаминопептидаза (фермент, способствующий гидролизу лейцина и других N-концевых остатков на концах пептидов и белков) в бактериальной биопленке.

В исследованиях М. Федейлы и др. [247] анализировалась способность к биодegradации анионных ПАВ микробным консорциумом биопленки, состоящим из *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* и *Serratia marcescens*. Эффективность удаления додецилсульфата натрия бактериальным консорциумом в аэробных условиях при температуре 30 °С составила в среднем 94 %. В аналогичных условиях среды степень биотрансформации додецилсульфата натрия монокультурой *Alcaligenes faecalis* составила в среднем 23 %. Также установлено [248], что бактерии родов *Bacillus* и *Paenibacillus* способны использовать додецилсульфат натрия в качестве углеродного субстрата. Анализ проводили в фосфатно-солевом растворе с добавлением додецилсульфата натрия. Изоляты микроорганизмов были получены на твердой питательной среде с концентрацией раствора додецилсульфата натрия 1000 Мм. Эффективность биохимического окисления додецилсульфата натрия бактериями рода *Bacillus* составила, в среднем, 51 %. Экспериментально доказана эффективная способность микроорганизмов рода *Achromobacter*, иммобилизованных на композитном материале на основе ацетата целлюлозы, к биодegradации додецилсульфата натрия при массовой концентрации 100 мг/л [246].

4.3 Оценка биопленкообразующей способности бинарных культур активного ила

Функционированию естественных и инженерных систем очистки сточных вод, в частности, с применением биопленок, способствуют микробные консорциумы, где одним из важных факторов процесса очистки является взаимодействие между ними. Совместное существование видов микроорганизмов может приводить как к усилению биопленкообразования и метаболической активности, так и к подавлению роста отдельных видов сообщества. Изучение взаимодействия микробных культур в консорциумах является затруднительным из-за сложности интерпретации получаемых данных. В связи с этим практическую значимость представляет исследование бинарных бактериальных культур, которые являются репрезентативной моделью микробных консорциумов, характерных для биологических очистных сооружений. Изучение бинарных культур позволит выявить механизмы синергии или антагонизма, определить вклад каждого вида в формирование биопленок и устойчивость к неблагоприятным факторам среды.

На первом этапе исследований оценивалось количество биомассы бинарных бактериальных культур с измерением оптической плотности культуральной жидкости при периодическом культивировании в течение 72 часов. Результаты представлены на рисунке 4.2 [249].

Начальная концентрация биомассы варьировала в интервале от 0,02 до 0,09 опт.ед. При 72-часовом периодическом культивировании концентрация клеток при совместном росте *Bacillus subtilis* и *R. erythropolis* 11-2, а также *A. faecalis* 2 и *B. subtilis* увеличилась до 0,8 и 1,0 опт.ед., соответственно. Низкая плотность клеток отмечена для бинарных культур *B. subtilis* и *A. pulmonis* ПНОС, *P. odorifer* и *A. pulmonis* ПНОС (0,3 до 0,4 опт.ед.).

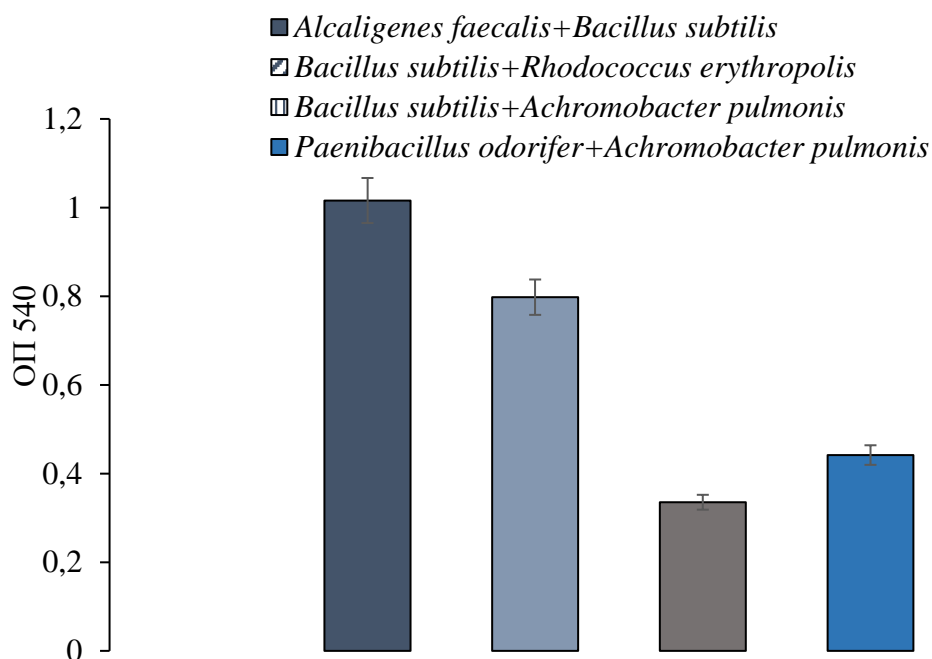


Рисунок 4.2 – Количество биомассы, опт.ед., в культуральной жидкости при периодическом *in vitro* культивировании бинарных культур *A. faecalis* 2, *B. subtilis*, *R. erythropolis* 11-2, *A. pulmonis*, *P. odorifer*

Дополнительно был проведен экспериментальный анализ биопленкообразующей способности бинарных бактериальных культур в опытных планшетах при аэробном периодическом культивировании в течение 72 часов. Результаты представлены в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Биопленкообразующая способность (ОП₅₄₀) бинарных бактериальных культур при периодическом культивировании на питательной среде LB

Бинарные бактериальные культуры			
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2 + <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Rhodococcus erythropolis</i> 11-2	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	<i>Paenibacillus odorifer</i> + <i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС
0,60±0,03	0,29±0,01	0,150±0,007	0,140±0,007

Отмечено, что бинарная культура *A. faecalis* 2 и *B. subtilis* обладает наибольшей биопленкообразующей способностью (ОП₅₄₀ = 0,60). Полученные

результаты согласуются с литературными данными, указывающими на высокую роль представителей рода *Bacillus* в формировании биопленок за счёт синтеза экзополисахаридов, амилоидных белков (TasA) и поверхностно-активных соединений [248, 249]. Стоит отметить, что *A. faecalis* характеризуется выраженной адгезивной активностью и способностью модифицировать среду, что может способствовать стабилизации биоплёнки и усилению межклеточных контактов [250].

Меньшая биопленкообразующая активность отмечена при совместном культивировании *B. subtilis* и *R. erythropolis* 11-2. Известно [251], что представители рода *Rhodococcus* отличаются способностью к образованию клеточных агрегатов и участием в биодegradации трудноокисляемых загрязняющих веществ.

Минимальные значения биоплёнкообразующей способности отмечены для бинарных культур *B. subtilis* и *A. pulmonis* ПНОС, *P. odorifer* и *A. pulmonis* ПНОС ($OP_{540} = 0,15$).

Таким образом, полученные данные подтверждают положения о том, что биоплёнкообразующая способность микробных консорциумов определяется не только индивидуальными свойствами отдельных штаммов, но и характером их межвидовых взаимодействий.

4.4 Анализ влияния физико-химических факторов среды на устойчивость биопленки бинарных бактериальных культур активного ила

В настоящей работе был проведен экспериментальный анализ влияния температурного фактора в области низких (10 °C) и высоких значений (50 °C) на устойчивость биопленок бинарных бактериальных культур. Полученные результаты представлены в таблице 4.9.

Таблица 4.9 – Результаты измерения оптической плотности массивности биопленки бинарных бактериальных культур при воздействии температуры среды

Показатель	Температурный режим, °С		
	10	30	50
	<i>Alcaligenes faecalis 2 + Bacillus subtilis</i>		
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,97±0,05	1,01±0,05	0,57±0,02
Массивность биопленки	0,85±0,04	0,6±0,03	0,070±0,003
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	859,31±42,96	583,18±29,15	49,56±2,47
<i>Bacillus subtilis + Rhodococcus erythropolis 11-2</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,13±0,05	1,36±0,06	0,66±0,03
Массивность биопленки	0,45±0,02	0,50±0,02	0,39±0,01
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	649,81±32,49	1468,31±73,41	493,68±21,98
<i>Bacillus subtilis + Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,26±0,06	0,90±0,04	0,86±0,04
Массивность биопленки	0,77±0,03	0,95±0,04	0,42±0,02
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	672,43±33,62	1322,06±66,10	81,81±4,09
<i>Paenibacillus odorifer + Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,09±0,05	0,96±0,04	0,76±0,03
Массивность биопленки	0,65±0,03	0,80±0,04	0,38±0,01
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	881,43±44,07	1076,56±53,82	794,12±39,70

Показано, что температурный фактор оказывает существенное влияние на формирование, структурную устойчивость и метаболическую активность биоплёнок бинарной бактериальной культуры *A. faecalis 2* и *B. subtilis*. При низких температурных условиях (10 °С) наблюдается интенсивное формирование биоплёнки. Метаболическая активность микроорганизмов в составе биоплёнки сохраняется высокой, что указывает на функциональную устойчивость сообщества.

При оптимальной температуре роста микроорганизмов (30 °С) наблюдаются высокие значения оптической плотности бактериальной суспензии. Однако массивность биопленки уменьшалась в среднем на 30 % по сравнению с результатами термостатирования бинарных бактериальных культур при 10 °С. Результаты метаболической активности согласуются с биопленкообразующей способностью бинарных бактериальных культур.

В области высоких температурных значений (50 °С) отсутствует рост микроорганизмов, не формируется микробная биопленка. Метаболическая активность микроорганизмов отмечается на уровне минимальных значений. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,002 до 0,07 опт.ед.

Высокая плотность клеток бинарной бактериальной суспензии *B. subtilis* и *R. erythropolis* 11-2 (ОП₅₄₀ = 1,36) отмечена при температурном режиме 30 °С, что соответствует оптимальным условиям роста мезофильных микроорганизмов. При понижении температуры до 10 °С наблюдалось снижение планктонной биомассы (ОП₅₄₀ = 1,13), что свидетельствует о замедлении метаболических процессов. При повышении температуры до 50 °С рост микроорганизмов значительно замедлялся (ОП₅₄₀ = 0,66). Аналогичная температурная зависимость выявлена и для биомассы биоплёнки. В результате термостатирования бинарных бактериальных культур биопленка сохраняется в области низких и высоких значений (10 и 50 °С).

В оптимальном диапазоне температуры среды (30 °С) получено максимальное значение метаболической активности (1468,31 Фл./ОП₅₄₀). При пониженной температуре (10 °С) активность снижалась, в среднем, на 50 %. В области высоких температур, несмотря на формирование устойчивой микробной биоплёнки, были зафиксированы низкие показатели ферментативной активности (493,68 Фл./ОП₅₄₀).

Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,01 до 0,06 опт.ед.

Оптическая плотность бактериальной суспензии (ОП₅₄₀) в бинарной культуре *B. subtilis* и *A. pulmonis* ПНОС находится в интервале от 0,8 до 1,3 опт.ед. Существенное влияние температурного режима наблюдается при анализе массивности биоплёнки. Максимальная биопленкообразующая способность наблюдается при 30 °С (ОП₅₄₀ = 0,95), что свидетельствует о наиболее благоприятных условиях для адгезии и накопления биоплёночной биомассы. В области низких и высоких температурных значений массивность биопленки снижается в среднем на 19 % и 55 %, соответственно.

Максимальное значение показателя ферментативной активности зафиксировано при 30 °С (1322,06 Фл./ОП₅₄₀), что свидетельствует о высокой функциональной активности биоплёночного сообщества в оптимальных температурных условиях. При 10 °С активность ферментов снижалась в среднем на 50 %. Минимальная активность ферментов установлена в области высокого температурного воздействия (50 °С).

Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,001 до 0,07 опт.ед.

Количество планктонной биомассы для бинарных культур *P. odorifer* и *A. pulmonis* ПНОС варьировало в диапазоне от 0,7 до 1,1 опт.ед. Максимальное накопление биопленки наблюдается при 30 °С (ОП₅₄₀ = 0,80). При понижении температуры до 10 °С массивность биоплёнки уменьшилась на 18 %, что характеризует сохранение структуры биопленки и способность к адгезии. В области высоких температурных значений количество микробной биопленки уменьшается в среднем на 52 %.

Метаболическая активность микроорганизмов в составе биоплёнки достигала максимальных значений при температуре 30 °С (1076,56 Фл./ОП₅₄₀). При снижении температуры до 10 °С отмечалось уменьшение показателя (881,43 Фл./ОП₅₄₀), однако уровень функциональной активности оставался высоким, что свидетельствует о сохранении метаболического потенциала консорциума в условиях охлаждения. При 50 °С активность снижалась до 794,12 Фл./ОП₅₄₀, однако уменьшение данного показателя не носило

пропорционального характера по отношению к снижению массивности биоплёнки, что указывает на сохранение доли жизнеспособных и метаболически активных клеток в структуре биоплёночного сообщества в условиях теплового стресса. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,009 до 0,05 опт.ед.

Далее оценивалось влияние рН среды при постоянной температуре 30 °С на устойчивость бинарных бактериальных биопленок (таблица 4.10).

Таблица 4.10 – Результаты измерения оптической плотности массивности биопленки бинарных бактериальных культур при воздействии рН среды

Показатель	рН среды		
	5,0	7,0	10,0
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 2 + <i>Bacillus subtilis</i>		
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,82±0,04	0,89±0,04	0,94±0,05
Массивность биопленки	1,28±0,06	1,09±0,05	1,0±0,05
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	186,87±9,34	141,25±7,06	227,31±11,36
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Rhodococcus erythropolis</i> 11-2			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,0±0,05	1,1±0,05	1,34±0,06
Массивность биопленки	1,34±0,06	1,16±0,05	1,12±0,05
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	140,12±7,006	175,75±8,78	221,81±11,09
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,15±0,05	1,25±0,06	1,11±0,05
Массивность биопленки	1,37±0,06	1,09±0,05	1,1±0,05
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	159,00±7,95	186,12±9,30	229,68±11,48
<i>Paenibacillus odorifer</i> + <i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,10±0,05	1,03±0,05	0,67±0,03
Массивность биопленки	1,11±0,05	1,18±0,05	0,86±0,04
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	84,50±4,22	246,12±12,30	566,31±28,31

Значение оптической плотности бактериальной суспензии при совместном периодическом культивировании *A. faecalis* 2 и *B. subtilis* достигало максимальных значений в щелочных условиях среды (0,94 опт. ед.). Следует отметить, что биопленка бинарных культур сохраняет устойчивость в широком диапазоне рН (в кислой и щелочной среде), что подтверждается значениями оптической плотности биомассы биопленки, которая варьируется в интервале от 1,0 до 1,3 опт.ед. Метаболическая активность микроорганизмов в составе биоплёнки демонстрировала нелинейную зависимость от рН. Минимальные значения наблюдаются при нейтральной реакции среды, тогда как как в кислой, так и в щелочной среде активность ферментов возрастала. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,02 до 0,09 опт.ед.

Плотность клеток в культуральной жидкости при совместном культивировании бактериальных культур *B. subtilis* и *R. erythropolis* 11-2 в кислых и щелочных условиях находилась в интервале от 1,0 до 1,3 опт.ед. Биопленка сохраняет устойчивость в кислых условиях среды и достигает максимальных значений. Отмечено, что, несмотря на снижение показателя в нейтральных и щелочных условиях среды, наблюдается сохранение высокого уровня биопленочной структуры. Показатель метаболической активности микроорганизмов увеличивается в щелочных условиях среды и снижается в среднем на 36 % при рН 5,0. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,003 до 0,09 опт.ед.

Планктонный рост бактериальных культур *A. pulmonis* ПНОС и *B. subtilis* сохраняется в широком диапазоне рН среды. Интенсивный процесс биопленкообразования отмечено при низких значениях рН. При переходе рН 7,0 и 10,0 массивность биоплёнки уменьшается, но не имеет существенных отличий. Метаболическая активность микроорганизмов в составе биоплёнки возрастала по мере повышения рН. Максимальная функциональная активность отмечалась при рН 10,0. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,002 до 0,05 опт.ед.

Высокая концентрация клеток при совместном периодическом культивировании микроорганизмов *P. odorifer* и *A. pulmonis* ПНОС установлена в кислых и нейтральных значениях pH. Однако высокие показатели pH (10,0) ингибируют рост микроорганизмов, что сопровождается снижением оптической плотности биомассы. Биопленка также сохраняет свою устойчивость при pH 5,0 и 7,0 и снижается в среднем на 27 % в щелочной среде, по сравнению с контрольным образцом биопленки. Стоит отметить, что показатели ферментативной активности клеток достигают максимальных значений при pH 10,0, но уменьшается в кислых условиях среды (в среднем на 65 %, относительно контроля). Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,004 до 0,06 опт.ед.

На следующем этапе исследований проводился анализ влияния токсиканта – додецилсульфата натрия (SDS) на изменение массивности биопленки и метаболической активности микроорганизмов (таблица 4.11).

Оптическая плотность бинарной бактериальной суспензии *A. faecalis* 2 и *B. subtilis* при увеличении концентрации SDS варьировало в диапазоне от 1,0 до 1,1 опт.ед. При низкой концентрации SDS (5 мг/дм³) устойчивость биоплёнки сохранялось на высоком уровне, однако при увеличении содержания поверхностно-активного вещества (10 и 50 мг/дм³) наблюдалось снижение показателя в среднем на 23 % и 94 %, соответственно.

Метаболическая активность клеток в составе биоплёнки также снижалась с увеличением концентрации SDS. При этом падение метаболической активности по сравнению с изменением планктонного роста указывает на повышенную чувствительность биоплёночных клеток к действию SDS. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,007 до 0,03 опт.ед.

На основании анализа значений оптической плотности культуральной жидкости можно сделать вывод о том, что жизнеспособность клеток в планктонной форме бинарных культуры *B. subtilis* и *R. erythropolis* 11-2 сохраняется.

Таблица 4.11 – Результаты измерения оптической плотности массивности биопленки бинарных бактериальных культур при воздействии раствора додецилсульфата натрия

Показатель	Массовая концентрация додецилсульфат натрия, мг/дм ³		
	5,0	10,0	50,0
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 2 + <i>Bacillus subtilis</i>		
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,03±0,05	1,05±0,05	1,11±0,05
Массивность биопленки	0,91±0,04	0,7±0,03	0,050±0,002
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	240,68±12,03	204,06±10,20	2,18±0,10
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Rhodococcus erythropolis</i> 11-2			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,0±0,05	1,01±0,05	1,01±0,05
Массивность биопленки	0,56±0,02	0,55±0,02	0,55±0,02
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	93,31±4,66	144,68±7,23	27,18±1,35
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	0,99±0,05	0,98±0,04	1,0±0,05
Массивность биопленки	0,67±0,03	0,71±0,04	0,44±0,02
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	97,56±4,87	322,31±16,11	170,81±8,54
<i>Raenibacillus odorifer</i> + <i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии	1,01±0,05	0,99±0,05	1,02±0,05
Массивность биопленки	0,62±0,03	0,77±0,03	0,56±0,02
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП540	226,81±6,80	161,31±8,06	61,93±3,09

Микробная биопленка сохраняет устойчивость, отсутствует выраженная деструкция структуры матрикса, что может свидетельствовать о межклеточных взаимодействиях в бинарных бактериальных культурах в присутствии токсиканта.

При концентрации SDS 5 и 10 мг/дм³ наблюдается сохранение активности ферментов, что может является стресс-ответом на содержание токсиканта в среде. Тем не менее, увеличение концентрации SDS до 50 мг/дм³ способствует снижению метаболической активности, в среднем, на 81 % по

сравнению с максимальным значением (144,68 Фл./ОП540). Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,01 до 0,09 опт.ед.

При культивировании бинарных культур *A. pulmonis* ПНОС и *B. subtilis* установлено, что планктонная популяция сохраняет устойчивость к действию SDS, и плотность клеток остаётся относительно высокой. По мере увеличения концентрации SDS наблюдается уменьшение массивности биопленки, в особенности при максимальном количестве токсиканта в среде (50 мг/дм³). Повышение метаболической активности биоплёнки при воздействии низкой концентрации додецилсульфата натрия (10 мг/дм³) может быть связано со стресс-индуцированной активацией клеточного метаболизма и частичным увеличением проницаемости клеточных оболочек. Кроме того, умеренное разрыхление матрикса может способствовать улучшению диффузии субстратов и кислорода и усилению редокс-процессов [252]. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,01 до 0,03 опт.ед.

Оптическая плотность бактериальной суспензии в ходе культивирования бинарных бактериальных культур *P. odorifer* и *A. pulmonis* ПНОС варьировала в диапазоне 0,9-1,01 опт.ед.

Биомасса биоплёнки снижалась с увеличением концентрации SDS. Отмечено, что повышенное содержание раствора додецилсульфата натрия угнетало ферментативные процессы. Количество экзополисахаридов для указанных бактерий активного ила варьировало в диапазоне от 0,01 до 0,07 опт.ед.

Таким образом, в результате комплекса проведенных исследований показано, что при температурном стрессе активируются универсальные клеточные механизмы адаптации (модификация мембранных липидов, усиление синтеза экзополисахаридов, индукция стресс-регуляторов), которые обеспечивают достаточный уровень защиты в монокультурах без необходимости межвидовой кооперации. Однако, термостабильность наблюдается при совместном культивировании бинарных бактериальных

культур *B. subtilis* и *R. erythropolis* 11-2 с сохранением 78 % исходной массивности биопленки. Следует отметить, что температурный стресс обусловил снижение метаболической активности монокультур, в среднем, на 6-26 % от контрольных значений. В то же время в бинарной системе *P. odorifer* и *A. pulmonis* ПНОС обеспечивалось поддержание исходной метаболической активности, в среднем, на 74 %, что значительно превышало показатели соответствующих монокультур (26 % и 7 %, соответственно).

Монокультуры исследованных штаммов, в целом, демонстрировали достаточно высокую устойчивость в широком диапазоне кислотности среды: массивность биоплёнки у большинства штаммов изменяется незначительно по сравнению с контролем. Это свидетельствует о наличии у отдельных видов эффективных собственных механизмов адаптации к кислотно-щелочному стрессу, обеспечивающих сохранение матрикса и клеточной иммобилизации. В то же время показано, что бинарные культуры способны интенсивнее формировать биоплёнки при экстремальных значениях pH. Наиболее выраженный эффект установлен для систем *Bacillus subtilis* и *A. pulmonis* ПНОС, *B. subtilis* и *R. erythropolis* 11-2, которые характеризуются минимальным изменением показателя массивности биопленки при переходе от нейтральной к щелочной среде, и индукцией биоплёнкообразования при pH 5,0.

По результатам сравнительного анализа по влиянию загрязняющих веществ, на примере додецилсульфата натрия установлено, что для бинарной культуры *B. subtilis* и *A. pulmonis* ПНОС при концентрации SDS 10 мг/дм³ наблюдается увеличение ферментативной активности, превышающее таковую для каждой из отдельных монокультур. При 50 мг/дм³ сохраняется активность при умеренном снижении массивности биоплёнки. Таким образом, данная система демонстрирует не только структурную, но и функциональную устойчивость, что принципиально отличает её от монокультур, у которых при 50 мг/дм³ происходит резкое подавление ферментативной активности.

Бинарная культура *P. odorifer* и *A. pulmonis* ПНОС также демонстрирует преимущество по сравнению с монокультурами в диапазоне 10-50 мг/дм³ SDS.

Для системы *B. subtilis* и *R. erythropolis* 11-2 массивность биоплёнки сохраняется при высоких концентрациях SDS (50 мг/дм³) и превышает показатели монокультуры *B. subtilis*. При умеренных концентрациях SDS (5-10 мг/дм³) бинарная культура *A. faecalis* 2 и *B. subtilis* обладает адаптационным преимуществом перед монокультурами, выражающимся в сочетании повышенной массивности биоплёнки и более высокой ферментативной активности.

Таким образом, в связи с увеличением содержания токсичных ксенобиотических соединений в окружающей среде вследствие сброса неочищенных сточных вод в водные экосистемы, загрязнения почв и т.п. осуществляется поиск альтернативных способов для увеличения эффективности процесса биоремедиации. Технологии очистки сточных вод с использованием биопленок обеспечивают интенсивное удаление загрязняющих веществ, что способствует эффективному восстановлению природных свойств окружающей среды. Высокая плотность клеток и стрессоустойчивость микроорганизмов в составе биопленки обеспечивают биотрансформацию ряда гидрофобных и токсичных соединений. Биопленка обладает многими конструктивными и сорбционными свойствами: компоненты экзополисахаридов являются потенциальными биоэмульгаторами, полисахариды действуют как защитный барьер клеток, рецепторные белки ответственны за определение плотности биопленки, а структурные белки необходимы для агрегации клеток микроорганизмов. Таким образом, биопленка обеспечивает оптимальную среду для межклеточного взаимодействия и обмена генетическим материалом, коммуникационных сигналов, что в дальнейшем способствует минимизации воздействия ксенобиотических соединений в окружающей среде.

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.

ГЛАВА 5. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ БИОМАССЫ АКТИВНОГО ИЛА В БИОФИЛЬТРЕ

5.1 Сравнительный анализ суспендированной и иммобилизованной биомассы в процессе биологической дефосфатации сточных вод

На данном этапе диссертационного исследования анализ эффективности процесса дефосфатации и удаления аммонийного азота из модельного раствора сточных вод осуществляли иммобилизованными культурами в составе биопленки, полученной путем инокуляции биофильтра суспензией активного ила очистных сооружений г. Иннополис Республики Татарстан. Экспериментальные исследования проводили в лабораторной биофильтрационной установке, описанной в главе 2. Культивирование иммобилизованной микрофлоры биопленки проводили в циклическом отъемно-доливном режиме. В качестве объекта сравнения использовали установку с суспендированной биомассой активного ила.

В течение всего периода экспериментальных исследований (22 суток) оценивали накопление биомассы на инертном носителе и в суспензии активного ила. По окончании экспериментальных исследований количество биомассы на носителе достигло 0,25 мг АСБ/г, в системе с взвешенной биомассой активного ила – 1,2 г АСБ/л. Начальное значение ХПК в среде составляло в среднем 300 мг/л. В системах с иммобилизованной и суспендированной биомассой эффективность удаления органического углерода по ХПК достигла в среднем 90-93 %, соответственно.

В процессе трехнедельного циклического отъемно-доливного культивирования суспендированной и иммобилизованной биомассы активного ила был получен сравнительный анализ изменения содержания соединений фосфора, аммонийного азота, нитрит- и нитрат-ионов в среде (рисунок 5.1-5.4).

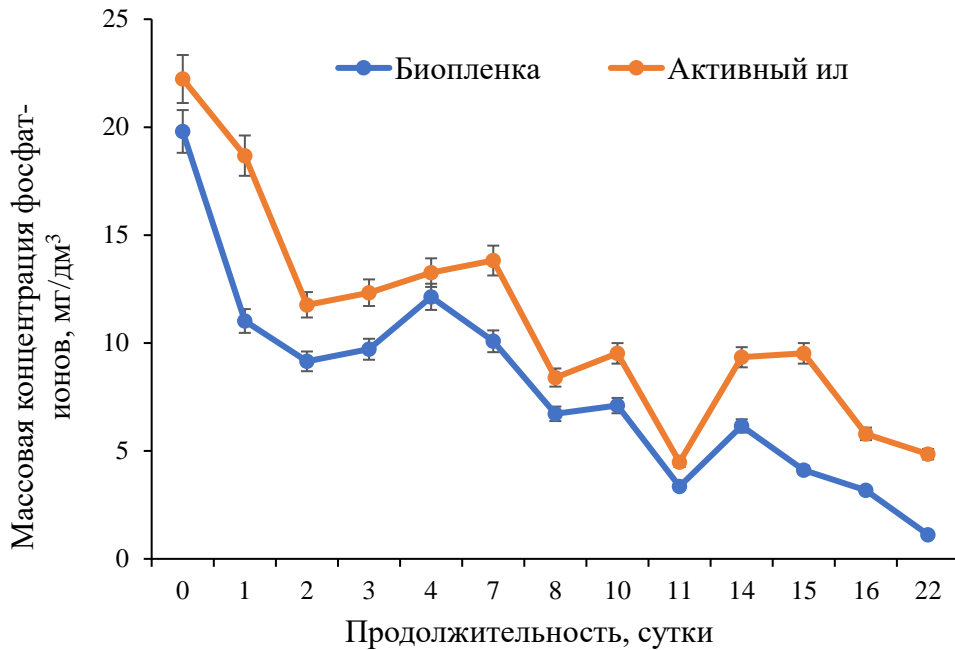


Рисунок 5.1 – Кинетика массовой концентрации фосфат-ионов в среде при отъемно-доливном режиме культивирования

Начальная концентрация фосфат-ионов варьировала в диапазоне от 19,8 до 22,0 мг/дм³.

На первые сутки культивирования биопленки и суспендированной биомассы активного ила наблюдалось снижение концентрации фосфатов в среде в среднем на 9,8 и 3,6 мг/дм³, соответственно, что, вероятно, связано с высокими адаптационными способностями биопленки к условиям культивирования и составу питательной среды. По истечении 4-х суток культивирования прикрепленной и взвешенной биомассы микроорганизмов отмечено высвобождение фосфат-ионов в среду в количестве 2,4 и 1,1 мг/дм³, соответственно, что может быть обусловлено частичной гибелью и лизисом бактериальных клеток. На завершающей стадии в процессе роста иммобилизованных и суспендированных бактерий активного ила массовая концентрация соединений фосфора уменьшилась на 18,6 и 17,5 мг/дм³ по сравнению с начальными значениями фосфатов в модельном растворе сточной воды.

Высокая степень удаления фосфат-ионов из среды биопленкой на инертном носителе может быть связано с тем, что развитый матрикс биопленки обеспечивает градиент концентрации растворенного кислорода и способствует развитию различных групп бактерий: фосфатаккумулирующих, аммонийоокисляющих, нитритоокисляющих и денитрифицирующих микроорганизмов в областях с различным содержанием кислорода [255]. Этот факт подтверждает высокая эффективность процесса биологической дефосфатации сточных вод в биофильтрационной установке для отъемно-доливного культивирования, которая составила более 90 % [256].

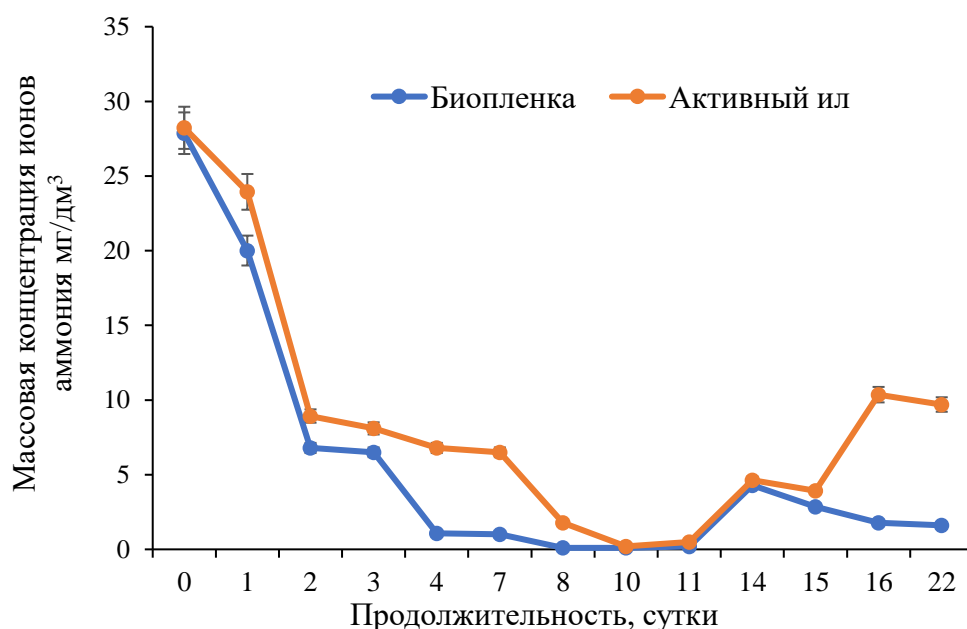


Рисунок 5.2 – Кинетика массовой концентрации ионов аммония в среде при отъемно-доливном режиме культивирования

Согласно экспериментальным данным, представленным на рисунке 5.2, на начальном этапе культивирования иммобилизованной и суспендированной микроорганизмов активного ила (4 суток эксперимента) осуществляется значительное уменьшение ионов аммония на 26,8 и 21,4 мг/дм³ по сравнению с исходным содержанием соединений азота в среде. На 10-е сутки отъемно-доливного культивирования прикрепленного и свободноплавающего

активного ила отмечены низкие значения концентрации ионов аммония в среде: 0,1 и 0,2 мг/дм³. Общая эффективность процесса биологического удаления аммонийного азота иммобилизованной и суспендированной биомассой составила 94 % и 65 %, соответственно.

В зависимости от условий подачи растворенного кислорода и субстрата в матриксе биопленки формируются зоны, обеспечивающие развитие как автотрофных нитрифицирующих бактерий, так и гетеротрофных денитрифицирующих микроорганизмов в составе микробного сообщества. В связи с различием в скорости роста рассматриваемых групп микроорганизмов необходимо увеличение времени пребывания биомассы в биофильтрах, что можно обеспечить путем эксплуатации реактора с большим рабочим объемом и регулированием скорости потока сточной воды. Так, с помощью мембранного аэрируемого биопленочного реактора достигнута высокая степень очистки по общему и аммонийному азоту (84 % и 98 %, соответственно) [257].

При культивировании иммобилизованных микроорганизмов активного ила на 4-е сутки эксперимента наблюдается интенсивное образование нитрит-ионов (рисунок 5.3), что свидетельствует об иницировании процесса нитрификации и развитии нитрифицирующих микроорганизмов первой фазы процесса. При этом в биофильтрационной установке с суспендированными микроорганизмами отмечено незначительное увеличение содержания нитрит-ионов.

Развитие процесса нитрификации в системе с прикрепленной биомассой обусловлено созданием оптимальных условий для развития нитрифицирующих бактерий в составе биопленки, а также условиями процесса биофильтрации: бактериальная биопленка формируется на неподвижном слое носителя с обеспечением достаточного количества растворенного кислорода в среде вследствие принудительной аэрации биофильтра.

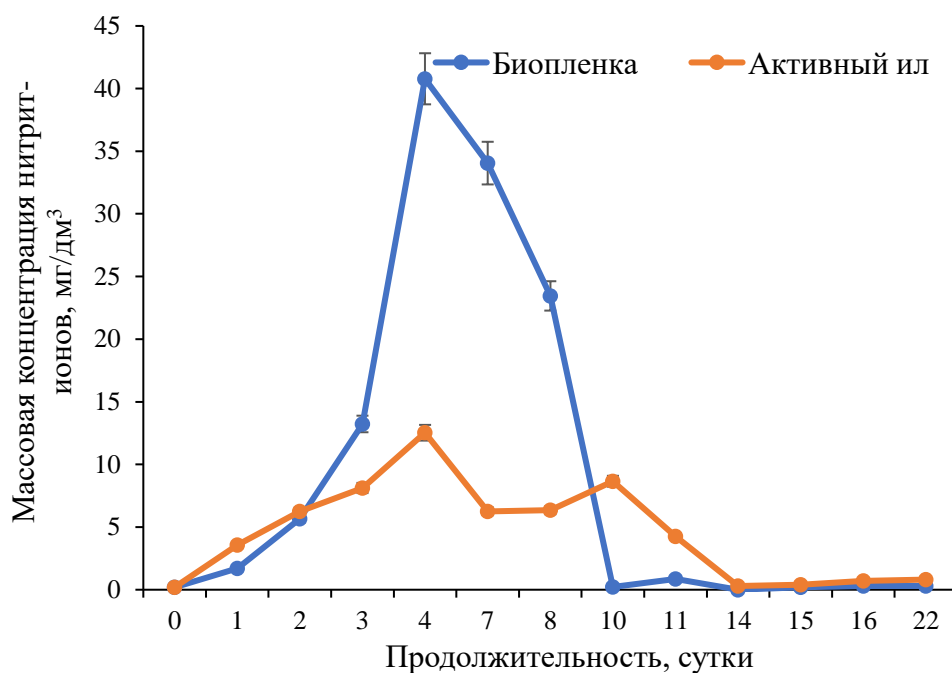


Рисунок 5.3 – Кинетика массовой концентрации нитрит-ионов в среде при отъемно-доливном режиме культивирования

В отличие от биофильтрационной системы культивирование суспендированной биомассы осуществлялось в аналогичных условиях в отъемно-доливном режиме, однако с рециклом суспензии микроорганизмов через емкость-сборник, имеющий низкий уровень растворенного кислорода в среде. В связи с тем, что нитрифицирующие бактерии чувствительны к значениям растворенного кислорода, это могло стать решающим фактором для низкой скорости процесса нитрификации при культивировании суспендированной биомассы активного ила.

Начало процесса нитрификации прикрепленной биомассы активного ила было зарегистрировано на 2-е сутки экспериментального исследования (рисунок 5.4). Начальный период характеризуется низкой активностью нитрифицирующих бактерий, что обусловлено, периодом адаптации микроорганизмов к условиям иммобилизации, прежде всего, нитрификаторов второй фазы процесса.

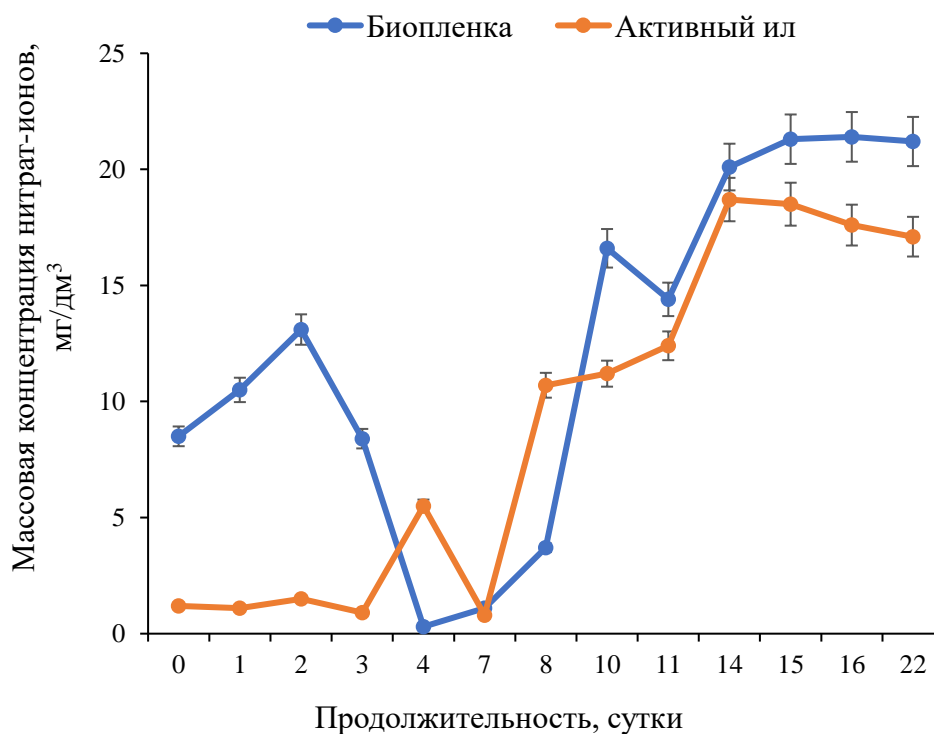


Рисунок 5.4 – Кинетика массовой концентрации нитрат-ионов в среде при отъемно-доливном режиме культивирования

По мере развития биоплёнки и увеличения биомассы нитрифицирующих бактерий наблюдалось повышение скорости и глубины протекания процесса нитрификации с увеличением концентрации нитрат-ионов в культуральной жидкости. К завершению эксперимента средняя концентрация нитрат-ионов в среде достигла 20,0 мг/дм³.

В то же время развитие процесса нитрификации в системе с суспендированной биомассой активного ила наблюдается на 4-е сутки эксперимента. Меньшая общая эффективность процесса биотрансформации аммонийного азота в азот нитратов по сравнению с прикрепленной биомассой может быть обусловлено лимитирующей концентрацией растворенного кислорода для роста и развития нитрифицирующей микрофлоры.

В таблице 5.1 представлена сравнительная оценка скорости удаления фосфат-ионов и окисления азота аммония с участием иммобилизованной и суспендированной биомассы активного ила.

Таблица 5.1 – Основные результаты эффективности работы суспендированной и иммобилизованной биомассы активного ила

Показатель	Иммобилизованная биомасса	Суспендированная биомасса
средняя скорость удаления фосфат-ионов (0–1 сутки), мг/дм ³ ·сут	9,8	3,6
эффективность процесса удаления фосфат-ионов, %	84,5–93,9 %	79,5–88,4 %
средняя скорость удаления аммонийного азота (0–4 сутки), мг/дм ³ ·сут	6,7	5,3
снижение концентрации аммонийного азота в среде на 4-е сутки, мг/дм ³	26,8	21,4
эффективность удаления аммонийного азота, %	94,0	65,0
продолжительность лаг-фазы процесса нитрификации, сутки	4,0	14,0

Сравнительный анализ функционирования систем с иммобилизованной и суспендированной биомассой свидетельствует о выраженном технологическом преимуществе биопленки активного ила в процессах удаления биогенных элементов (фосфора и азота).

Иммобилизованная биомасса характеризуется высокой начальной кинетикой процесса удаления фосфора (9,8 мг/дм³·сут), что указывает на интенсивное вовлечение фосфатов в метаболизм микробного сообщества уже в первые сутки функционирования системы. Несмотря на последующее выравнивание значений средней скорости удаления фосфат-ионов на длительном интервале (0-22 сутки), биопленка демонстрирует высокую эффективность дефосфатации (до 93,9 %).

Аналогичная тенденция наблюдается при анализе удаления аммонийного азота. В системе с иммобилизованной биомассой эффективность удаления азота достигает в среднем 94 %.

Значимым результатом является сокращение продолжительности лаг-фазы процесса нитрификации с 4 до 2 суток. Это свидетельствует об эффективном удержании и функциональной активности нитрифицирующего сообщества в системе с иммобилизованной биомассой активного ила.

5.2 Интродукция фосфатаккумуляирующих микроорганизмов в систему с иммобилизованной биомассой активного ила

В настоящее время одной из перспективных технологий для интенсификации биологических способов очистки сточных вод как от трудноокисляемых загрязняющих веществ, так и биогенных элементов, является процесс интродукции отдельных высокоэффективных штаммов микроорганизмов в сообщества активного ила и биопленки.

Тем не менее, интродуцированные микроорганизмы чувствительны к различным факторам среды: концентрации субстрата в среде, колебаниям температур, рН, конкуренции с автохтонной микрофлорой [258]. Следует отметить, что внешние факторы среды также влияют на эффективность процесса дефосфатации сточных вод. В связи с этим была разработана методика оперативной диагностики микробного сообщества в процессе удаления биогенных элементов из сточных вод (Приложение А).

В литературе предложено использование ферментов для ускорения процесса биodeградации загрязняющих веществ [259], а также применение плазмид бактерий, кодирующих набор ферментов для окисления поллютантов, с последующим внесением в микроорганизмы-реципиенты [260]. Предложено использование наноматериалов (оксид цинка, оксид титана, наночастицы серебра и другие), обладающих адсорбционными свойствами, а также стимулирующих рост внесенных микроорганизмов [261]. Распространение получила технология инкапсуляции микроорганизмов в полупроницаемый гель или закрепление на материале-носителе. Метод был использован для улучшения эффективности очистки сточных вод от азота и фосфора иммобилизованными водорослями р. *Chlorella* [262].

Преимущество технологии интродукции (биоаугментации) при очистке сточных вод заключается в целенаправленном усилении функционального потенциала микробных сообществ активного ила за счёт введения специализированных микроорганизмов-деструкторов. Внесённые

микроорганизмы могут обеспечить разложение специфических субстратов, а также способствовать передачи генов автохтонным бактериям, что приводит к формированию более адаптированного и функционально устойчивого микробного сообщества.

В связи с этим на следующем этапе исследований осуществлялось проведение экспериментальных исследований с интродукцией бактериальной культуры *A. faecalis* 2 в состав биопленки с последующей оценкой удаления биогенных элементов. Микроорганизмы *A. faecalis* 2 обладают способностью к удалению соединений азота и фосфора [226], формируют развитую биопленку и сохраняют устойчивость к отклонениям оптимальных физико-химических факторов среды, что является преимуществом на практике водоочистки.

Экспериментальные исследования состояли из следующих этапов:

1. На первом этапе осуществляли иммобилизацию микробного сообщества активного ила на инертном носителе-керамзите с формированием биопленки в биофильтрационной установке в течение 72-х часов.

2. На втором этапе проводили интродукцию бактерий *A. faecalis* 2 в сообщество биопленки. Начальное содержание инокулята в системе составляло 10^4 КОЕ/1 мл.

3. Дальнейшее культивирование осуществлялось в отъемно-доливном режиме с соблюдением физико-химических параметров, описанных в главе 2 (см. «Объекты и методы исследований»). В контрольной биофильтрационной установке функционировала биопленка активного ила в отсутствии бактериальной культуры *A. faecalis* 2.

На рисунках 5.5-5.7 представлены основные результаты эффективности удаления соединений фосфора и азота из модельного раствора сточных вод интродуцированным и контрольным сообществами биопленки.

В начальный период эксперимента (0-7 сутки) (рисунок 5.5) концентрация фосфатов снижается в среднем на 95 %, что свидетельствует об интенсивном поглощении фосфора микробной биомассой. Рассматриваемый

процесс может быть связан с активностью *A. faecalis* 2 в составе иммобилизованной биомассы.

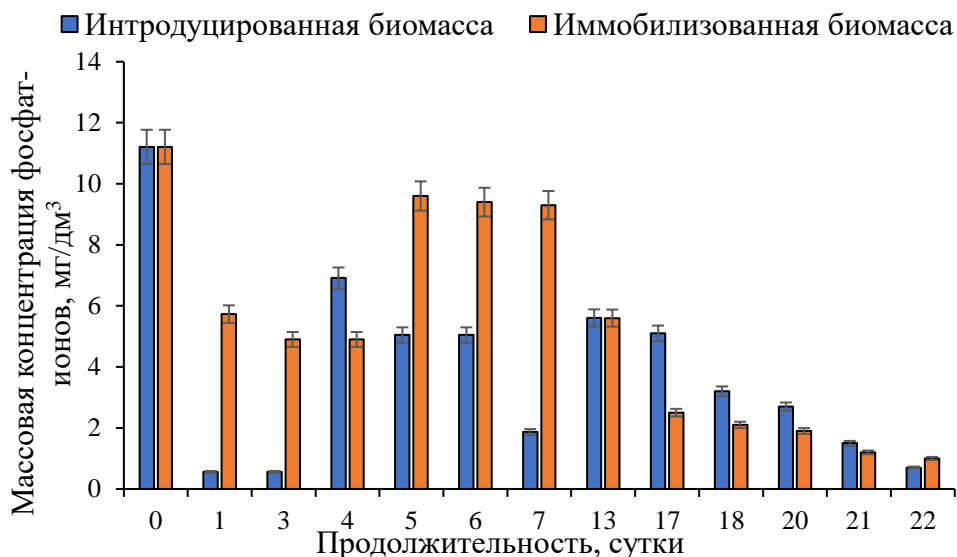


Рисунок 5.5 – Кинетика массовой концентрации фосфат-ионов в среде при эксплуатации интродуцированного и контрольного биофильтра

На втором этапе экспериментальных исследований (12-18 сутки) наблюдается высвобождение фосфат-ионов в среду (в среднем $6,5 \text{ мг/дм}^3$). Увеличение содержания соединений фосфора в среде может быть связано с ростом доли микроорганизмов *A. faecalis* 2 и ФАО в составе биопленки активного ила. В условиях формирования биопленки возникает градиент концентрации растворенного кислорода, который является одним из ключевых факторов, регулирующих процессы гидролиза внутриклеточных полифосфатов. В дальнейшем наблюдается постепенное снижение концентрации фосфат-ионов до $0,7 \text{ мг/дм}^3$, что свидетельствует о стабилизации процесса биоаккумуляции фосфора.

В контрольной системе, содержащей биопленку в отсутствие интродуцированной культуры *A. faecalis* 2, в начальный период эксперимента концентрация фосфатов снижается с $11,2 \text{ мг/дм}^3$ до $5,7 \text{ мг/дм}^3$. Однако на 25-ые сутки периодического культивирования наблюдается постепенное увеличение

концентрации соединений фосфора в среде. На завершающей стадии исследований содержание фосфат-ионов в среде достигает в среднем $1,0 \text{ мг/дм}^3$, что указывает на снижение эффективности процесса дефосфатации сточных вод.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что интродукция культуры *Alcaligenes faecalis* 2 в микробное сообщество биопленки способствовало стабилизации процесса биологической дефосфатации. Представители микроорганизмов рода *Alcaligenes* способны активно участвовать в трансформации органических соединений и процессах денитрификации, что приводит к изменению соотношения биогенных элементов в системе и созданию более благоприятных условий для развития ФАО [263]. Кроме того, бактерии *Alcaligenes* могут способствовать стабилизации структуры микробных консорциумов и улучшению процессов массопереноса внутри биопленки [264]. Это приводит к повышению метаболической активности микроорганизмов и усилению процессов внутриклеточного накопления фосфора. Эффективность биологической дефосфатации биопленкой с интродуцированной *A. faecalis* 2 на 22-е сутки периодического культивирования составила в среднем 95 %.

Что касается процессов нитрификации в аэрируемых биофильтрах, на начальной стадии эксперимента в обеих системах наблюдается высокая концентрация ионов аммония (в среднем 32 мг/дм^3) (рисунок 5.6). В течение 24 часов отмечается снижение аммонийного азота в системе с *Alcaligenes faecalis* 2 и контрольной биопленкой на 19 и 11 мг/дм^3 , соответственно.

В интервале от 5 до 14 суток концентрация аммония в среде с интродуцированной культурой снижается в среднем до $0,3 \text{ мг/дм}^3$, что свидетельствует о высокой эффективности процессов биологической трансформации азота. В контрольной системе остаточная концентрация аммонийного азота находится в интервале от $0,5$ до $1,0 \text{ мг/дм}^3$.

На 20-е сутки периодического культивирования биопленки, интродуцированной *Alcaligenes* концентрация соединений азота снижается до

0,03 мг/дм³, что свидетельствует о практически полном удалении аммонийного азота. В контрольной биофильтрационной установке количество аммонийного азота в среде составляла, в среднем, 1,5 мг/дм³.

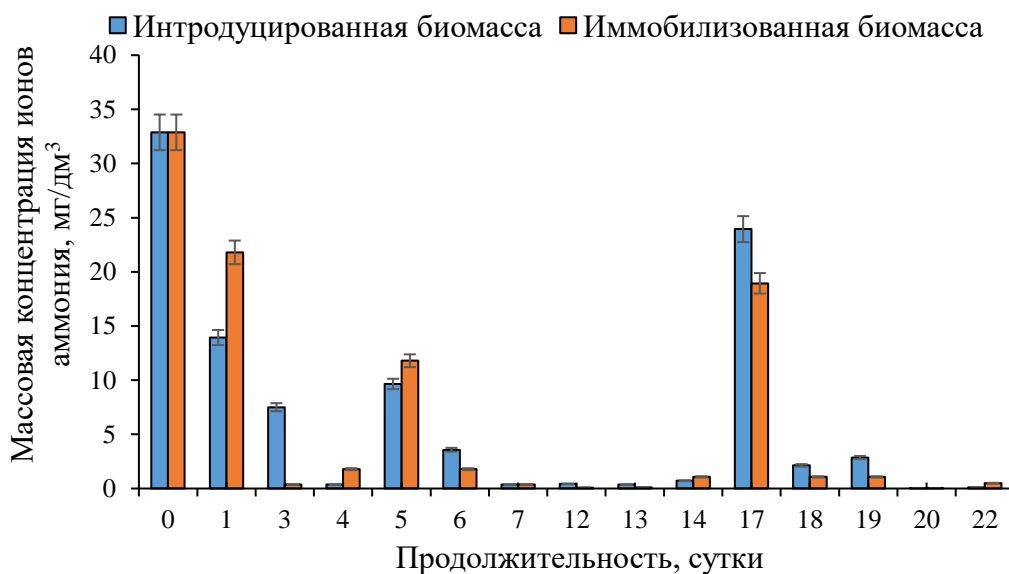


Рисунок 5.6 – Кинетика массовой концентрации аммонийного азота в среде при эксплуатации интродуцированного и контрольного биофильтра

Повышение эффективности удаления аммония в системе с интродукцией *Alcaligenes faecalis* 2 может быть связано с метаболическими особенностями данных микроорганизмов. Известно, что представители рода *Alcaligenes* способны участвовать в процессах гетеротрофной нитрификации и аэробной денитрификации, что обеспечивает более эффективную трансформацию соединений азота [263].

Далее, начиная с 12-х суток, в обеих системах наблюдается увеличение концентрации нитрат-ионов и развитие процесса нитрификации (рисунок 5.7). На заключительной стадии эксперимента (19-22 сутки) в среде с микробным сообществом и *Alcaligenes faecalis* 2, содержание нитратов в среде достигает 21,0 мг/дм³, тогда как в контрольном образце – 27,0 мг/дм³.

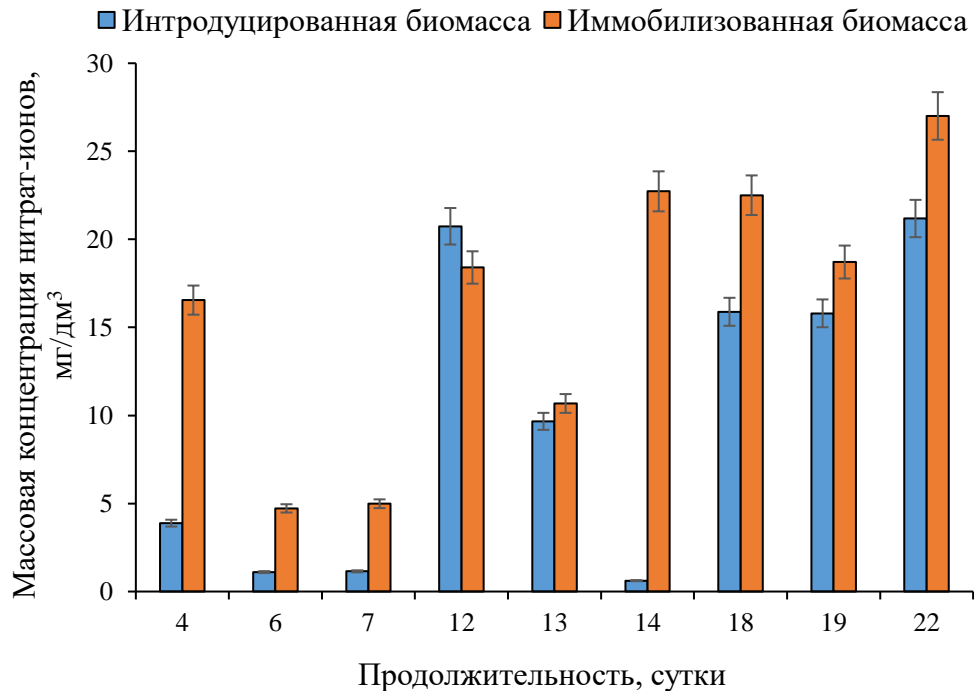


Рисунок 5.7 – Кинетика массовой концентрации нитрат-ионов в среде при эксплуатации интродуцированного и контрольного биофильтра

В биофильтрационной установке в присутствии представителей р. *Alcaligenes* наблюдаются колебания содержания нитрат-ионов, отражающие интенсивное протекание процессов нитрификации и денитрификации, и, напротив, контрольная система характеризуется устойчивостью стадии окисления ионов аммония до нитратного азота.

Проведённые исследования показали, что использование иммобилизованной биомассы активного ила в форме биопленки в биофильтрационной системе обеспечивает более высокую технологическую эффективность удаления биогенных элементов по сравнению с суспендированной формой микроорганизмов. Формирование устойчивой биоплёнки на инертном носителе способствует созданию пространственно-организованной микробной структуры, в пределах которой формируются градиенты растворённого кислорода и субстрата, обеспечивающие одновременное протекание аэробных, аноксидных и анаэробных процессов биотрансформации соединений фосфора и азота.

Установлено, что иммобилизованная биомасса характеризуется большей скоростью и эффективностью биологической дефосфатации. Эффективность удаления фосфат-ионов в системе с биоплёнкой достигала в среднем 95 %, что несколько превышало эффективность дефосфатации суспендированной биомассой.

Аналогичные закономерности выявлены при анализе процессов трансформации соединений азота. В системе с иммобилизованной биомассой эффективность удаления аммонийного азота достигала в среднем 92 %, тогда как для суспендированной биомассы данный показатель не превышал в среднем 65 %. Существенным преимуществом биоплёночной технологии является сокращение лаг-фазы нитрификации с 4 до 2 суток, что свидетельствует о лучшем удержании и функциональной стабильности нитрифицирующих бактерий.

Результаты исследований по интродукции специализированных микроорганизмов в сообщество биопленки подтверждают высокую перспективность технологии биоаугментации для биологической очистки сточных вод. Введение культуры *A. faecalis* 2 способствовало стабилизации процесса биологической дефосфатации сточных вод. К 22-м суткам культивирования система с интродуцированной культурой *A. faecalis* 2 обеспечивала снижение концентрации фосфат-ионов до 0,7 мг/дм³.

К завершению экспериментального периода эффективность удаления аммонийного азота в биоаугментированной системе и контрольной установке составила, в среднем 99 %.

5.3 Технологический расчет биофильтра для очистки сточных вод

На основании полученных экспериментальных данных сформулировано техническое предложение для биологических очистных сооружений малой производительности (400 м³/сут) с реализацией двухсекционной системы

биофильтрации сточных вод с попеременным поступлением сточной воды на последовательно работающие биофильтры.

Далее представлен технологический расчёт биофильтра [265].

Время пребывания сточных вод определяется по формуле 5.1:

$$t = \frac{V}{Q_{\text{ч}}} = \frac{83}{16,7} = 5 \text{ ч}, \quad (5.1)$$

где V – объем биофильтра, м^3 ;

$Q_{\text{ч}}$ – расход сточных вод, $\text{м}^3/\text{ч}$.

Объем сточной воды за 1 цикл рассчитывается по формуле 5.2:

$$V_{\text{ц}} = Q_{\text{ч}} \cdot t = 16,7 \cdot 5 = 83,5 \text{ м}^3. \quad (5.2)$$

Площадь биофильтра рассчитывается по формуле 5.3:

При высоте нагрузки $H = 3,0$ м:

$$F = \frac{V}{H} = \frac{83}{3,0} = 27,7 \text{ м}^2, \quad (5.3)$$

где H – высота биофильтра, м .

Диаметр определяется по формуле 5.4:

$$D = \sqrt{\frac{4F}{\pi}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 27,7}{3,14}} = 5,9 \text{ м}. \quad (5.4)$$

Принимается $D = 6$ м.

Фактическая площадь рассчитывается по формуле 5.5:

$$F_{\text{ф}} = \frac{\pi D^2}{4} = 28,3 \text{ м}^2. \quad (5.5)$$

Фактическая высота рассчитывается по формуле 5.6:

$$H_{\text{ф}} = \frac{V}{F_{\text{ф}}} = \frac{83}{28,3} = 2,9 \text{ м}^2. \quad (5.6)$$

Гидравлическая нагрузка на площадь биофильтра при подаче сточной воды определяется по формуле 5.7:

$$q = \frac{Q_{\text{ч}}}{F_{\text{ф}}} = \frac{16,7}{28,3} = 0,59 \text{ м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{ч}). \quad (5.7)$$

Линейная скорость движения воды через сечение биофильтра составит:

$$v = 0,59 \text{ м/ч} = 0,000164 \text{ м/с}.$$

Скорость движения воды соответствует режиму, при котором перенос загрязняющих веществ к поверхности биоплёнки лимитируется

преимущественно процессами диффузии и локальной турбулизацией, создаваемой системой аэрации. Такой режим обеспечивает устойчивое функционирование иммобилизованной биомассы без её гидродинамического разрушения.

Гидравлическая нагрузка на сечение биофильтра в период откачки составит:

$$q = \frac{83}{28,3} = 2,9 \text{ м}^3 / (\text{м}^2 \cdot \text{ч}).$$

Скорость снижения уровня воды при откачке составляет 2,9 м/ч. При рабочей высоте слоя 2,9 м биофильтр освобождается в среднем за 1 час.

В период откачки очищенной воды из одного биофильтра поступающая сточная вода не должна направляться в этот же аппарат. Объем откачиваемой воды за 1 час определяется по формуле 5.8:

$$V = Q_{\text{ч}} \cdot t = 16,7 \cdot 1 = 16,7 \text{ м}^3. \quad (5.8)$$

С учетом эксплуатационного запаса 20%:

$$V_{\text{буф}} = 16,7 \cdot 1,2 = 20 \text{ м}^3.$$

Таким образом, усреднитель должен иметь дополнительный резервный объем не менее 20 м³, необходимый для обычного выравнивания состава сточных вод.

Расчет кислородной потребности для нитрификации может быть выполнен по удалению аммонийного азота. Начальная концентрация ионов аммония составляла в среднем 27,0 мг/дм³, а конечная – 1,6 мг/дм³.

Масса удаляемого аммония определяется по формуле 5.9:

$$G = \frac{\Delta C \cdot Q}{1000} = \frac{25,4 \cdot 400}{1000} = 10,1 \text{ кг / сут.} \quad (5.9)$$

Масса аммонийного азота составляет:

$$G = 10,1 \cdot \frac{14}{18} = 7,9 \text{ кгN / сут.}$$

Необходимое количество растворенного кислорода определяется по формуле 5.10:

$$O_2 = 4,57 \cdot G = 4,57 \cdot 7,9 = 36,1 \text{ кг O}_2 / \text{сут.} \quad (5.10)$$

При коэффициенте использования кислорода воздуха 8%. Расход воздуха определяется по формуле 5.11:

$$L_{\text{возд}} = \frac{O_2}{0,278 \cdot 0,08} = \frac{36,1}{0,278 \cdot 0,08} = 1623 \text{ м}^3 / \text{сут} = 67,6 \text{ м}^3 / \text{ч}. \quad (5.11)$$

С учетом эксплуатационного запаса 20%:

$$L_{\text{возд}} = 67,6 \cdot 1,2 = 81,1 \text{ м}^3 / \text{ч}.$$

Для очистных сооружений малой производительности ($Q = 400,0 \text{ м}^3/\text{сут}$) с двухсекционной биофильтрацией коммунально-бытовых сточных вод подобраны следующие параметры (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Технические характеристики биофильтра

Параметр	Типовой биофильтр	Проектный биофильтр (один из двух в схеме)
расход, $\text{м}^3/\text{сут}$	400	400
объем биофильтра, м^3	30-500	83,0
высота биофильтра, м	2-6	2,9
диаметр, м	3-20	6,0
гидравлическая нагрузка, $\text{м}^3/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$	5-15	14,2

5.4 Технологическая схема биологической очистки сточных вод с использованием биофильтров

По результатам расчета биофильтра для культивирования биопленки, обеспечивающего глубокое удаление из среды фосфатов, а также от соединений азота и углерода разработана принципиальная технологическая схема и описан процесс очистки сточных вод коммунально-бытового характера.

Сточная вода с расходом $400 \text{ м}^3/\text{сут}$ или $16,7 \text{ м}^3/\text{ч}$, поступает на очистные сооружения и первоначально направляется в усреднитель. В усреднителе происходит выравнивание расхода и состава сточных вод, а также создается

буферный объем, необходимый для согласования непрерывного поступления сточной воды с циклической работой биофильтров (рисунок 5.8).

Из усреднителя сточная вода подается в первичный отстойник. В первичном отстойнике происходит удаление грубодисперсных и взвешенных веществ. Осветленная сточная вода далее направляется на биологическую очистку, а образующийся первичный осадок отводится в емкость сбора осадка с расходом 3,2 м³/сут.

Биологическая очистка осуществляется в двух биофильтрах Б-ф1 и Б-ф2. Каждый биофильтр имеет рабочий объем 83 м³. При расходе 16,7 м³/ч данный объем соответствует 5-часовому времени пребывания сточной воды в аппарате. Работа биофильтров организована попеременно: пока один биофильтр находится в режиме биологической очистки, второй биофильтр может заполняться сточной водой или освобождаться от очищенной воды.

В биофильтрах происходит контакт воды с иммобилизованной биомассой на грузочном материале. Расчет экономической эффективности процесса очистки был проведен для керамзита, используемого в качестве грузочного материала биофильтра. За счет жизнедеятельности микроорганизмов осуществляется удаление органических загрязнений, соединений азота и фосфора. Для поддержания аэробных условий в биофильтры подается воздух от воздуходувок.

После завершения 5-часового цикла очищенная вода из биофильтра откачивается в течение 1 часа. В это время поступающая сточная вода остается в усреднителе и частично может подаваться во второй биофильтр, если он находится на стадии заполнения. За 1 час откачки в усреднителе может дополнительно накапливаться около 16,7 м³ сточной воды. Поэтому усреднитель выполняет не только функцию выравнивания состава, но и роль буферной емкости при переключении биофильтров. Очищенная вода после биофильтров направляется во вторичный отстойник. Во вторичном отстойнике происходит отделение частиц биомассы, фрагментов биопленки и остаточных взвешенных веществ.

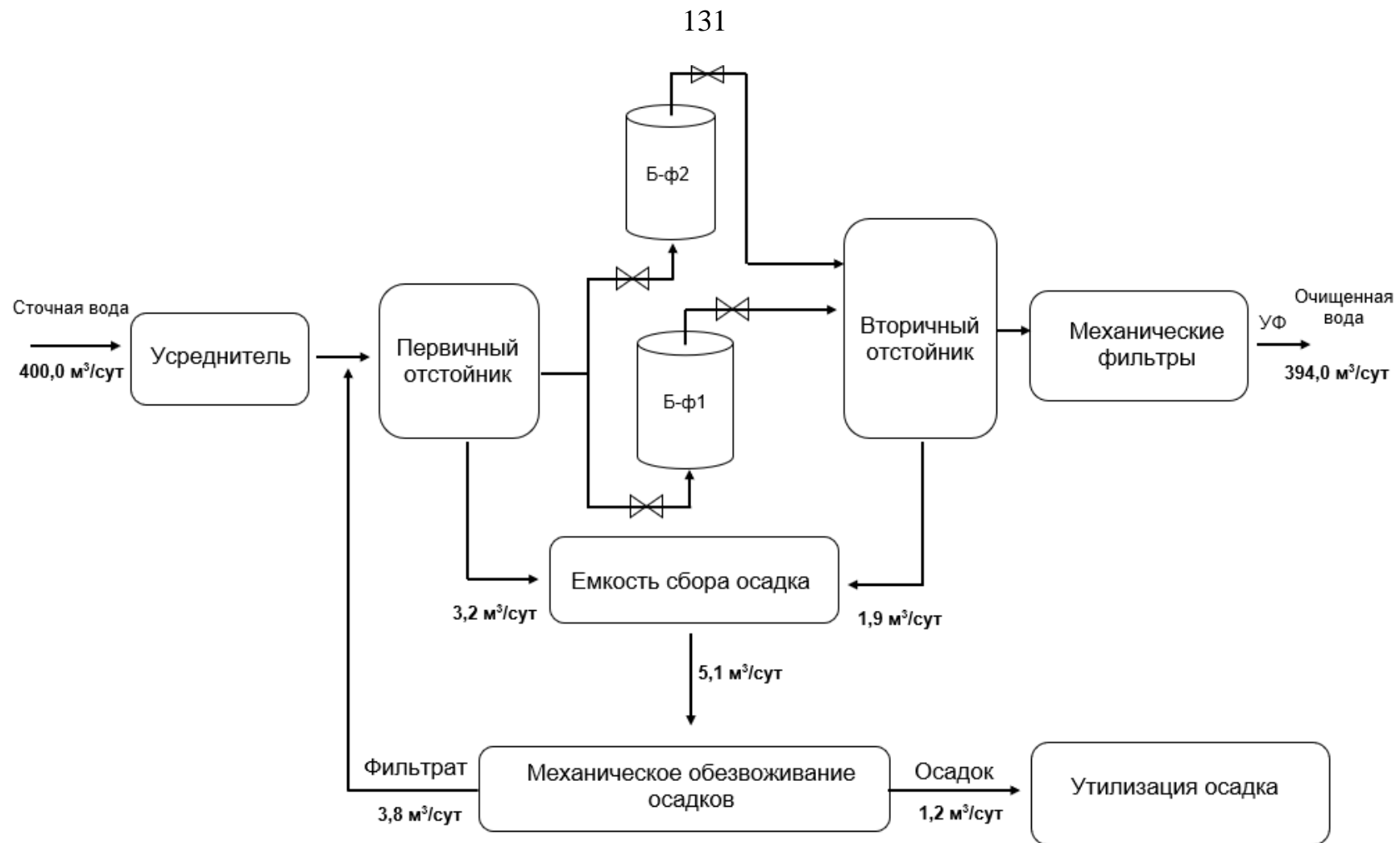


Рисунок 5.8 – Принципиальная схема очистки сточных вод для очистных сооружений с $Q = 400 \text{ м}^3/\text{сут}$

Избыточный активный ил отводится в емкость сбора осадка с расходом 1,9 м³/сут. После вторичного отстаивания очищенная вода направляется на механические фильтры для доочистки от остаточных взвешенных веществ. Далее очищенная вода отводится на сброс или повторное использование.

Первичный осадок с расходом 3,2 м³/сут и избыточный активный ил с расходом 1,9 м³/сут поступают в емкость сбора осадка. Суммарный расход осадка составляет 5,1 м³/сут. Из емкости сбора осадка смесь направляется на механическое обезвоживание. В процессе обезвоживания образуется фильтрат с расходом 3,8 м³/сут, который возвращается в начало технологической схемы, и обезвоженный осадок с расходом 1,2 м³/сут, направляемый на дальнейшую утилизацию.

Сформулированное техническое предложение по интенсификации процесса биологической очистки сточных вод с использованием двух последовательно работающих биофильтров представлено и обсуждено со специалистами профильного предприятия – МУП «Водоканал» г. Казань с оформлением акта о практическом использовании результатов диссертационной работы в эксплуатации системы биофильтрационной очистки сточных вод жилого массива «Крутушка» с глубоким удалением фосфатов (Приложение Б).

ГЛАВА 6. ЭКОЛОГО-ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ БИОФИЛЬТРОВ В ОЧИСТКЕ КОММУНАЛЬНО-БЫТОВЫХ СТОЧНЫХ ВОД

6.1 Расчет экономических показателей процесса биофильтрационной очистки сточных вод

Реализация биофильтров в действующих очистных сооружениях предусматривает подбор параметров оборудования, стоимость оборудования и материалов, расход электроэнергии и заработная плата [266, 267].

Стоимость и расчет основного оборудования и материалов представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Характеристика и стоимость основного оборудования и материалов

Статья затрат	Количество, шт.	Цена за единицу, руб.	Сумма, руб.
биофильтр, рабочий объем 83 м ³	2	2 800 000,0	5 600 000,0
насос для закачивания воды	2	120 000,0	240 000,0
насос для откачивания воды	2	180 000,0	360 000,0
керамзит, 70 % объема двух биофильтров	116,2 м ³	3000,0 руб./м ³	348 600,0
роторная воздуходувка типа ТВ 80-1,6	2	500 000,0	1 000 000,0
доставка и монтаж, 5 % от общей стоимости	-	-	377 430,0
Итого			7 926 030,0
амортизационные отчисления, 10 % от общей суммы			792 603,0 руб./год

Для расчета стоимость электроэнергии на 2026 год составляет 7,36 руб./кВт·ч без НДС. С учетом НДС 22 %: 8,98 руб./кВт·ч (Ц).

Расход электроэнергии рассчитывается по формуле 6.1:

$$\mathcal{E} = N \cdot t \cdot n, \quad (6.1)$$

где \mathcal{E} – расход электроэнергии, кВт·ч/сут;

N – мощность оборудования, кВт;

t – время работы, ч/сут;

n – количество единиц оборудования.

Стоимость электроэнергии рассчитывается по формуле 6.2:

$$C_{\text{Э}} = \text{Э} \cdot \text{Ц}, \quad (6.2)$$

где Э – расход электроэнергии, кВт·ч/сут;

Ц – стоимость электроэнергии на 2026 год, руб./кВт·ч.

Расчет и стоимость электропотребления для основного оборудования представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2 – Основные расходы по расходам на электроэнергию

Оборудование	Мощность, кВт	Время работы, ч	Расход, кВт·ч/год	Расход, кВт·ч/год	Стоимость, руб./год
насос закачивания воды	3	5	15,0	5 475,0	49 166,0
насос откачивания воды	11	1	11,0	4 015,0	36 065,0
роторная воздуходувка типа ТВ 80-1,6	7,5	5	75,0	27 375,0	245 818,0
Итого					331 049,0

6.2 Расчет фонда заработной платы

1. Расчет численности персонала и фонда заработной платы.

Годовой объемом сточных вод для очистных сооружений составляет 146000 м³/год. Для основных рабочих эффективный фонд времени работы составляет 148 дней, для руководителей и специалистов – 209 дней.

Списочная численность основных рабочих рассчитывается по формуле 6.3:

$$P_{\text{СП}} = P_{\text{ЯВ}} \cdot (T_{\text{кал}}/T_{\text{эф}}), \quad (6.3)$$

где $P_{\text{СП}}$ – списочная численность рабочих, чел.;

$P_{\text{ЯВ}}$ – явочная численность в сутки, чел.;

$T_{\text{кал}}$ – календарный фонд времени, дни;

$T_{\text{эф}}$ – эффективный фонд рабочего времени, дни.

$$P_{\text{сп}} = 1 \cdot (365 / 148) = 3 \text{ чел.}$$

Принимается: аппаратчики очистки сточных вод в количестве трех человек, инженер-технолог – 1 человек.

Часовая тарифная ставка аппаратчика ($Z_{\text{ч}}$) составляет 101,75 руб./ч.
Оклад инженера-технолога (О) – 56 715,0 руб./мес.

2. Расчет заработной платы основных рабочих.

Тарифный фонд заработной платы рассчитывается по формуле 6.4:

$$Z_{\text{тар}} = T_{\text{эф}} \cdot Ч_{\text{спис}} \cdot Z_{\text{ч}}, \quad (6.4)$$

где $T_{\text{эф}}$ – эффективный фонд времени, ч;

$Ч_{\text{спис}}$ – списочная численность рабочих, чел.;

$Z_{\text{ч}}$ – часовая тарифная ставка, руб./ч.

$$Z_{\text{тар}} = 1776 \cdot 3 \cdot 101,75 = 542\,140,0 \text{ руб.}$$

Премия составляет 50%:

$$П = 0,5 \cdot 542\,140,0 = 271\,070,0 \text{ руб.}$$

Доплата за вечернее время рассчитывается по формуле 6.5:

$$D_{\text{веч}} = Z_{\text{тар}} \cdot (0,5 / 6) = 542\,140,0 \cdot (0,5 / 6) = 45\,178,0 \text{ руб.} \quad (6.5)$$

Доплата за ночное время рассчитывается по формуле 6.6:

$$Z_{\text{ноч}} = (Z_{\text{тар}} \cdot K_{\text{ноч}}) / 3 = (542\,140,0 \cdot 1,5) / 3 = 271\,070,0 \text{ руб.,} \quad (6.6)$$

где $K_{\text{ноч}} = 1,5$.

Доплата за праздничные дни рассчитывается по формуле 6.7:

$$Z_{\text{праздн}} = 24 \cdot 15 \cdot Z_{\text{ч}} = 24 \cdot 15 \cdot 101,75 = 36\,631,0 \text{ руб.} \quad (6.7)$$

Основная заработная плата определяется по формуле 6.8:

$$\begin{aligned} Z_{\text{осн}} &= Z_{\text{тар}} + П + D_{\text{веч}} + Z_{\text{ноч}} + Z_{\text{праздн}} = 542\,140,0 + 271\,070,0 + \\ &+ 45\,178,0 + 271\,070,0 + 36\,631,0 = 1\,166\,090,0 \text{ руб.} \end{aligned} \quad (6.8)$$

Дополнительная заработная плата принимается 25 %.

$$Z_{\text{доп}} = 1\,166\,090,0 \cdot 0,25 = 291\,522,0 \text{ руб.}$$

Годовой фонд заработной платы основных рабочих рассчитывается по формуле 6.9. При $K = 1$:

$$Z_{\text{год}} = (Z_{\text{осн}} + Z_{\text{доп}}) \cdot K = (1166090,0 + 291522,0) \cdot 1 = 1\,457\,612,0 \text{ руб.} \quad (6.9)$$

Удельная заработная плата основных рабочих определяется по формуле 6.10:

$$Z_{\text{уд}} = Z_{\text{год}} / Q = 1\,457\,612,0 / 146\,000,0 = 9,9 \text{ руб./м}^3. \quad (6.10)$$

Страховые взносы принимаются 30 % и рассчитывается по формуле 6.11:

$$\text{ОбСВ} = Z_{\text{год}} \cdot 0,3 = 1\,457\,612,0 \cdot 0,3 = 437\,284,0 \text{ руб.} \quad (6.11)$$

Удельные страховые взносы определяются по формуле 6.12:

$$Z_{\text{удОбСВ}} = \text{ОбСВ} / Q = 437\,284,0 / 146\,000,0 = 3,0 \text{ руб./м}^3. \quad (6.12)$$

Средняя месячная заработная плата основных рабочих рассчитывается по формуле 6.13:

$$Z_{\text{ср.м}} = Z_{\text{год}} / (P_{\text{сп}} \cdot 12) = 1\,457\,612,0 / (3 \cdot 12) = 40\,489,0 \text{ руб./мес.} \quad (6.13)$$

3. Расчет фонда заработной платы руководителей, специалистов и служащих.

Месячный оклад инженера-технолога на 2026 год (О) составляет 56 715,0 руб./мес.

Годовой фонд по окладу:

$$Z_{\text{окл}} = 56\,715,0 \cdot 12 = 680\,580,0 \text{ руб.}$$

Доплаты 50%.

$$Д = 680\,580,0 \cdot 0,5 = 340\,290,0 \text{ руб.}$$

Годовой фонд заработной платы инженера-технолога определяется по формуле 6.14:

$$Z_{\text{служ}} = Z_{\text{окл}} + Д = 680\,580,0 + 340\,290,0 = 1\,020\,870,0 \text{ руб.} \quad (6.14)$$

Страховые взносы:

$$\text{ОбСВ}_{\text{служ}} = 1\,020\,870,0 \cdot 0,3 = 306\,261,0 \text{ руб.}$$

Годовой фонд заработной платы всех работающих рассчитывается по формуле 6.15:

$$\begin{aligned} Z_{\text{год, раб-щих}} &= Z_{\text{год,рабоч}} + Z_{\text{год,служ}} = 1\,457\,612,0 + 1\,020\,870,0 = \\ &= 2\,478\,482,0 \text{ руб.} \end{aligned} \quad (6.15)$$

Среднегодовая заработная плата одного работающего:

$$З_{\text{ср.раб-их}} = 2\,478\,482,0 / 4 = 619\,621,0 \text{ руб./год.}$$

Среднегодовая заработная плата одного рабочего:

$$З_{\text{ср.рабоч}} = 1\,457\,612,0 / 3 = 485\,871,0 \text{ руб./год.}$$

Производительность труда одного рабочего:

$$ПТ_{\text{рабоч}} = 146\,000,0 / 3 = 48\,667,0 \text{ м}^3/\text{чел.}$$

Производительность труда одного работающего:

$$ПТ_{\text{раб-их}} = 146\,000 / 4 = 36\,500,0 \text{ м}^3/\text{чел.}$$

6.3 Расчет предотвращенного экологического ущерба окружающей природной среде

Укрупненная эколого-экономическая оценка ущерба, предотвращаемого в результате перехода из суспендированной биомассы активного ила на биопленку при дефосфатации сточных вод, рассчитывалась по стандартной методике [268, 269].

Предотвращаемый экологический ущерб рассчитывали для очистных сооружений малой производительности с объемом коммунально-бытовых сточных вод 400,0 м³/сут. Начальные концентрации соединений фосфора и азота в поступающей воде составили:

- PO₄³⁻ варьировало в диапазоне от 20 до 22 мг/дм³,
- NH₄⁺ варьировало в диапазоне от 24 до 25 мг/дм³.

Экспериментально установлено, что на завершающей стадии очистки сточных вод активным илом, остаточная концентрация соединений фосфора и азота составили в среднем 4,8 и 9,8 мг/дм³, биопленкой – 1,1 и 1,6 мг/дм³, соответственно.

Предельно-допустимые концентрации (ПДК) фосфат-ионов и ионов аммония в водах рыбохозяйственного назначения составляют 0,2 и 0,5 мг/дм³, соответственно.

Годовой объем сточных вод рассчитывается по формуле 6.16:

$$Q = 365 \cdot 400 = 146\,000 \text{ м}^3/\text{год}. \quad (6.16)$$

Ниже приведен расчет для фосфат-ионов.

Сверхнормативная концентрация загрязняющего вещества относительно ПДК рассчитывается по формуле 6.17:

$$C_{\text{св}} = C_{\text{факт}} - C_{\text{пдк}}, \quad (6.17)$$

где $C_{\text{факт}}$ – фактическая концентрация загрязняющего вещества, мг/дм³;

$C_{\text{пдк}}$ – предельно-допустимая концентрация загрязняющего вещества, мг/дм³.

Сверхнормативная концентрация фосфат-ионов при использовании биопленки:

$$C_{\text{св}} = 1,12 - 0,2 = 0,92 \text{ мг/дм}^3.$$

Кратность превышения ПДК составляет:

$$\frac{1,12}{0,2} = 5,6.$$

Сверхнормативная концентрация фосфат-ионов при использовании активного ила:

$$C_{\text{св}} = 4,85 - 0,2 = 4,65 \text{ мг/дм}^3.$$

Кратность превышения ПДК составляет:

$$\frac{4,85}{0,2} = 24,2.$$

Сверхнормативный сброс загрязняющего вещества на 1 м³ определяется по формуле 6.18:

$$M_{\text{св}, 1 \text{ м}^3} = (C_{\text{факт}} - C_{\text{пдк}}) \cdot 10^{-6}. \quad (6.18)$$

Сверхнормативный сброс фосфат-ионов на 1 м³ при использовании биопленки:

$$M_{\text{св}, 1 \text{ м}^3} = 0,92 \cdot 10^{-6} \text{ т/м}^3.$$

Сверхнормативный сброс фосфат-ионов на 1 м³ при использовании активного ила:

$$M_{\text{св}, 1 \text{ м}^3} = 4,65 \cdot 10^{-6} \text{ т/м}^3.$$

Сверхнормативный сброс загрязняющего вещества в сутки определяется по формуле 6.19:

$$M_{\text{св, сут}} = (M_{\text{св, 1 м}^3}) \cdot 400,0. \quad (6.19)$$

Сверхнормативный сброс фосфат-ионов в сутки при использовании биопленки:

$$M_{\text{св, сут}} = 0,36 \text{ кг/сут.}$$

Сверхнормативный сброс фосфат-ионов в сутки при использовании активного ила:

$$M_{\text{св, сут}} = 1,86 \text{ кг/сут.}$$

Сверхнормативный сброс загрязняющего вещества в год определяется по формуле 6.20:

$$M_{\text{св, год}} = (M_{\text{св, сут}}) \cdot 365. \quad (6.20)$$

Сверхнормативный сброс фосфат-ионов в год при использовании биопленки:

$$M_{\text{св, год}} = 0,13 \text{ т/год.}$$

Сверхнормативный сброс фосфат-ионов в год при использовании активного ила:

$$M_{\text{св, год}} = 0,67 \text{ т/год.}$$

Предотвращенный сверхнормативный сброс при переходе на биопленку составляет:

$$\Delta M_{\text{св}} = 0,67 - 0,13 = 0,54 \text{ т/год.}$$

Плата за сверхнормативный сброс фосфат-ионов (Π) в 2026 году с учетом ставок за негативное воздействие на окружающую среду (НВОС): $H = 26\,392,7$ руб./т. Коэффициент за сверхнормативный сброс (K) составляет 100, тогда Π рассчитывается по формуле 6.21:

$$\Pi = M_{\text{св, год}} \cdot H \cdot K. \quad (6.21)$$

Плата за сверхнормативный сброс фосфат-ионов при использовании биопленки:

$$\Pi = 0,13 \cdot 26\,392,7 \cdot 100 = 354\,431,15 \text{ руб./год.}$$

Плата за сверхнормативный сброс фосфат-ионов при использовании активного ила:

$$П = 0,67 \cdot 26\,392,7 \cdot 100 = 1\,791\,570,00 \text{ руб./год.}$$

Экспериментально полученные результаты свидетельствуют о не достижении нормативных значений по массовой концентрации фосфат-ионов в очищенной воде как при использовании биопленки, так и активного ила. Однако сверхнормативная концентрация фосфат-ионов в технологии с активным илом превышает в 5 раз, по сравнению с системой с биопленкой. При переходе на биопленку снижение выплат за сверхнормативный сброс ($\Delta П$) составит **1 437 139, 00 руб./год.**

Аналогичные расчеты сделаны для ионов аммония.

Сверхнормативная концентрация ионов аммония при использовании биопленки:

$$C_{св} = 1,6 - 0,5 = 1,1 \text{ мг/дм}^3.$$

Кратность превышения ПДК составляет:

$$\frac{1,6}{0,5} = 3,2.$$

Сверхнормативная концентрация ионов аммония при использовании активного ила:

$$C_{св} = 9,8 - 0,5 = 9,3 \text{ мг/дм}^3.$$

Кратность превышения ПДК составляет:

$$\frac{9,8}{0,2} = 19,7.$$

Сверхнормативный сброс ионов аммония на 1 м^3 при использовании биопленки:

$$M_{св}, 1 \text{ м}^3 = 1,1 \cdot 10^{-6} \text{ т/м}^3.$$

Сверхнормативный сброс ионов аммония на 1 м^3 при использовании активного ила:

$$M_{св}, 1 \text{ м}^3 = 9,3 \cdot 10^{-6} \text{ т/м}^3.$$

Сверхнормативный сброс ионов аммония в сутки при использовании биопленки:

$$M_{\text{св, сут}} = 0,44 \text{ кг/сут.}$$

Сверхнормативный сброс ионов аммония в сутки при использовании активного ила:

$$M_{\text{св, сут}} = 3,74 \text{ кг/сут.}$$

Сверхнормативный сброс ионов аммония в год при использовании биопленки:

$$M_{\text{св, год}} = 0,16 \text{ т/год.}$$

Сверхнормативный сброс ионов аммония в год при использовании активного ила:

$$M_{\text{св, год}} = 1,36 \text{ т/год.}$$

Предотвращенный сверхнормативный сброс при переходе на биопленку составляет:

$$\Delta M_{\text{св}} = 1,36 - 0,16 = 1,20 \text{ т/год.}$$

Плата за сверхнормативный сброс ионов аммония (Π) в 2026 году с учетом ставок за негативное воздействие на окружающую среду (НВОС): $H = 2639,3$ руб./т. Коэффициент за сверхнормативный сброс (K) составляет 100.

Плата за сверхнормативный сброс ионов аммония при использовании биопленки:

$$\Pi = 0,16 \cdot 2639,3 \cdot 100 = 42\,387,16 \text{ руб./год.}$$

Плата за сверхнормативный сброс ионов аммония при использовании активного ила:

$$\Pi = 1,36 \cdot 2639,3 \cdot 100 = 318\,674,36 \text{ руб./год.}$$

Экспериментально полученные результаты свидетельствуют о не достижении нормативных значений по массовой концентрации ионов аммония в очищенной воде как при использовании биопленки, так и активного ила. Однако сверхнормативная концентрация соединений азота в технологии с активным илом превышает в 8,5 раз, по сравнению с системой с биопленкой.

При переходе на технологию с биопленкой снижение выплат за сверхнормативный сброс ($\Delta\Pi$) составит **318 674, 36 руб./год.**

Экспериментально установлено, что массовая концентрация нитрат-ионов в очищенной воде в системе с биопленкой и активным илом составляло в среднем 17,1 и 21,2 мг/дм³, что ниже ПДК для вод рыбохозяйственного назначения, равной 40,0 мг/дм³. В связи с этим сверхнормативный сброс нитратов отсутствует и плата за сверхнормативное воздействие не начисляется. Расчет производится за сброс в пределах допустимых нормативов. Ставка платы за сброс нитрат-ионы в водные объекты на 2026 год – 33,0 руб./т.

Сброс нитратов в год при использовании биопленки:

$$M_{\text{св, год}} = 3,09 \text{ т/год.}$$

Сброс нитратов в год при использовании активного ила:

$$M_{\text{св, год}} = 2,49 \text{ т/год.}$$

Плата за сброс нитратов при использовании биопленки:

$$\Pi = 3,09 \cdot 33,0 = 102,14 \text{ руб./год.}$$

Плата за сброс нитратов при использовании активного ила:

$$\Pi = 2,49 \cdot 33,0 = 82,39 \text{ руб./год.}$$

Таким образом, при эксплуатации очистных сооружений малой производительности ($Q = 400,0 \text{ м}^3/\text{сут}$) на базе 2-х биофильтров для реализации циклического отъемно-доливного процесса очистки коммунально-бытовых сточных вод общее снижение выплат за сверхнормативный сброс соединений азота и фосфора в водные объекты составит **1 755 711,2 руб./год.**

Таким образом, суммарные затраты на строительство и эксплуатацию биофильтров составляет 8 300 000,0 руб. С учетом возврата средств за счет снижения выплат за сверхнормативный сброс соединений азота и фосфора в водные объекты рыбохозяйственного назначения срок окупаемости проекта составит ~ 5 лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выявлено, что сукцессия микробного сообщества активного ила в процессе глубокого удаления фосфора в биореакторе последовательно-периодического действия (SBR – Sequencing Batch Reactor), последовательно реализующего анаэробную и аэробную стадии процесса, проявляется сменой доминирующих групп фосфатаккумулирующих микроорганизмов: р. *Thiotrix*, *Ca. Accumulibacter*, *Ca. Competibacter*. В составе сообщества идентифицирована культура рода *Azonexus*, способная накапливать внутриклеточный фосфор до 12 % от сухой массы клеток и доминирующая в процессе дефосфатации среды с эффективностью до 51 %.

2. Показано, что способностью к образованию биопленки обладают большинство исследованных штаммов бактерий. Установлено, что бинарная культура *Alcaligenes faecalis* 2 и *Bacillus subtilis* обладает наибольшей биоплёнкообразующей способностью ($ОП_{540} = 0,6$), а массивность образцов биопленки, сформированной на основе указанных культур, в 2-3 раза больше по сравнению с другими образцами биопленок.

3. Установлено, что под воздействием физико-химических факторов среды в широком диапазоне значений (рН от 5,0 до 10,0; температуры от 10 до 30°C, присутствия додецилсульфата натрия в диапазоне концентраций от 5 до 10 мг/дм³), микробные биоплёнки исследованных бактериальных культур активно формируют структуру и сохраняют устойчивость, а бактерии в их составе отличаются высокой ферментативной активностью (в диапазоне от 550 до 1400 Фл./ОП540). При этом исследованные бинарные биоплёнки отличаются большей массивностью, в среднем, на 20-40 % по сравнению с монокультурами.

4. Достигнута высокая эффективность удаления фосфат-ионов и ионов аммония в системе с биоплёнкой, которая составила, в среднем, 95 % и 92 %, соответственно, в сравнении с эффективностью дефосфатации и биоокисления аммония микроорганизмами активного ила (78 % и 65 %, соответственно).

5. Интродукция фосфатаккумуляирующей культуры *Alcaligenes faecalis* 2 в микробное сообщество биопленки способствовала стабилизации процесса биологической дефосфатации среды. Эффективность удаления фосфат-ионов и ионов аммония с использованием биопленки с интродуцированной культурой составила, в среднем, 91-93 % и до 99 %, соответственно.

6. Предложено техническое решение процесса очистки коммунально-бытовых сточных вод в сооружениях малой производительности (400,0 м³/сут) на базе двух биофильтров с глубоким удалением фосфора и азота. Разработанное решение отражено в акте об использовании результатов МУП «Водоканал» г. Казани по интенсификации биофильтрационной очистки с глубоким удалением фосфатов из сточных вод жилого массива «Крутушка».

7. Установлено, что срок окупаемости затрат на строительство и эксплуатацию сооружений составит около 5 лет, а общее снижение платы за сверхнормативный сброс соединений азота и фосфора в водные объекты составит более 1 млн. 750 тыс. руб. в год.

Перспективы дальнейшего развития темы исследования связаны с совершенствованием подходов к решению научно-практических задач по разработке новых биотехнологий глубокой очистки сточных вод от комплекса биогенных элементов, основанных на изучении состава, структуры и свойств микробных сообществ активного ила и биопленки и создании условий культивирования отдельных микробных групп.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A2O-BAF – Anaerobic/Anoxic/Oxic-Biological Aerated Filter, анаэробно-аноксидно-аэробная система с биологическим аэрируемым фильтром

ABR-MBR – Anaerobic Baffled Reactor-Membrane Bioreactor, анаэробный реактор с перегородками в сочетании с мембранным биореактором

AGS – Aerobic Granular Sludge, аэробный гранулированный ил

АнохАн – Anoxic Ammonium Oxidation, анаэробно-аноксидный реактор

BSBR – Biofilm Sequencing Batch Reactor, биоплёночный реактор периодического действия

EBPR – Enhanced Biological Phosphorus Removal, биологический способ глубокого удаления фосфора

EFBBR – Extra-Loop Fluidized Bed Bioreactor, биореактор с псевдоожиженным слоем с дополнительным контуром циркуляции

FBBR – Fixed Bed Bioreactor, биореакторы с псевдоожиженным слоем

HRT – Hydraulic Retention Time, гидравлическое время удерживания

IFAS-MBR – Integrated Fixed-Film Activated Sludge-Membrane Bioreactor, интегрированная система с закреплённой биоплёнкой и активным илом в мембранном биореакторе

IFAS-SBR – Integrated Fixed-Film Activated Sludge-Sequencing Batch Reactor, интегрированная система с закреплённой биоплёнкой и активным илом в реакторе периодического действия

MBBR – Moving Bed Biofilm Reactor, биореактор с подвижным слоем биоплёнки

MBfR – Moving Bed Film Reactor, мембранный биопленочный реактор

S2EBPR – Sidestream Enhanced Biological Phosphorus Removal, глубокое удаление фосфора с дополнительным потоком

SBMBfR – Sequencing Batch Membrane Biofilm Reactor, мембранный биоплёночный реактор периодического действия

SBR – Sequencing Batch Reactor, реактор последовательно-периодического действия

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate, додецилсульфат натрия

SNADPR – Simultaneous partial Nitrification, Anammox, Denitrification, and Denitrifying Phosphorus Removal, одновременная частичная нитрификация, анаммокс, денитрификация и денитрифицирующее удаление фосфора

SNDPR – Simultaneous Nitrification Denitrification and Phosphorus Removal, одновременная нитрификация, денитрификация и удаление фосфора

SRT – Solids Retention Time, средний возраст ила

SRT – время удержания биомассы

TTS – Total Suspended Solids, общее количество взвешенных веществ

UCT – University of Cape Town, Кейптаунский университет

АДФ – аденозиндифосфат

АОБ – аммонийокисляющие бактерии

АСБ – абсолютно сухая биомасса

АТФ – аденозинтрифосфат

БПК – биологическое потребление кислорода

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГАО – гликоген-аккумулирующие организмы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДФАО – денитрифицирующие фосфатаккумулирующие бактерии

ЛЖК – летучие жирные кислоты

НОБ – нитритокисляющие бактерии

ОбСВ – обязательные страховые взносы

ОТЕ – Операционная Таксономическая Единица

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПГА – полигидроксиалканоат

ПГБ – полигидроксибутират

ПГВ – полигидроксиивалерат

ПДК – предельно-допустимая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

С-ФАО – сероокисляющие фосфатаккумулялирующие бактерии

ФАО – фосфатаккумулялирующие бактерии

ХПК – химическое потребление кислорода

ЭПС – экзополисахарид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zheng, Y. Recovery of phosphorus from wastewater: A review based on current phosphorous removal technologies / Y. Zheng, Y. Wan, Y. Zhang, J. Huang, Y. Yang, D.C.W. Tsang, H. Wang, H. Chen, B. Gao // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 2022. – Vol. 53, № 4. – P. 447–481. – DOI: 10.1080/10643389.2022.2128194.

2. Ping, Q. A comprehensive investigation to the fate of phosphorus in 8 full-scale municipal wastewater treatment plants / Q. Ping, X. Li, Y. Zhang, et al. // *Science of the Total Environment*. – 2024. – Vol. 907. – Article 169641. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.169641.

3. Gao, S. Molecular insight into the variation of dissolved organic phosphorus in a wastewater treatment plant using ³¹P NMR spectroscopy / S. Gao, X. Zhang, W.-Y. Fan // *Water Research*. – 2021. – Vol. 203. – Article 117529. – DOI: 10.1016/j.watres.2021.117529.

4. Zhang, Y. Composition characterization and transformation mechanism of dissolved organic phosphorus in wastewater treatment using ³¹P NMR spectroscopy / Y. Zhang, W. Shang, S. Khu, et al. // *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. – 2024. – Vol. 18, № 34. – DOI: 10.1007/s11783-024-1794-5.

5. Heinrich, L. Formation of vivianite in digested sludge and its controlling factors in municipal wastewater treatment / L. Heinrich, P. Schmieder, M. Barjenbruch, M. Hupfer // *Science of the Total Environment*. – 2023. – Vol. 854. – Article 158663. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158663.

6. Cui, H. Compatibility of vivianite-crystallization pathway of phosphorus recovery with anaerobic digestion systems of thermally hydrolyzed sludge / H. Cui, et al. // *Environmental Research*. – 2024. – Vol. 248. – Article 119640. – DOI: 10.1016/j.envres.2024.119640.

7. Randall, D.G. Phosphorus recovery as vivianite and amorphous calcium phosphate from high-load industrial wastewater / D.G. Randall, J. Jalava, B.

Vinneras, P. Simha // *Frontiers in Environmental Science*. – 2024. – Vol. 12. – DOI: 10.3389/fenvs.2024.1491220.

8. Moradi, G. Contrasting depth distribution of colloid-associated phosphorus in the active and abandoned sections of an alluvial fan in a hyper-arid region of the Atacama Desert / G. Moradi, F. Rezanezhad, H. Liu, A. Melesse, P. Van Cappellen // *Global and Planetary Change*. – 2020. – Vol. 185. – Article 103090. – DOI: 10.1016/j.gloplacha.2019.103090.

9. Nadagouda, M.N. Recent advances in technologies for phosphate removal and recovery: A review / M.N. Nadagouda, G. Varshney, V. Varshney, C.A. Hejase // *ACS Environmental Au*. – 2024. – Vol. 4, № 6. – P. 271–291. – DOI: 10.1021/acsenvironau.3c00069.

10. Reza, A. Electrocoagulation as a remedial approach for phosphorus removal from onsite wastewater: a review / A. Reza, S. Haller, X. Mao // *Water*. – 2024. – Vol. 16, № 22. – Article 3206. – DOI: 10.3390/w16223206.

11. Genz, A. Advanced phosphorus removal from membrane filtrates by adsorption on activated aluminium oxide and granulated ferric hydroxide / A. Genz, A. Kornmüller, M. Jekel // *Water Research*. – 2004. – Vol. 38, № 16. – P. 3523–3530. – DOI: 10.1016/j.watres.2004.06.006.

12. Huang, Z. Full carbon upcycling of organophosphorus wastewater enabled by interface photolysis / Z. Huang, J. Huang, T. Liu, Y. Wen, H. Wu, S. Yang, H. Li // *Chemical Engineering Journal*. – 2024. – Vol. 485. – Article 149987. – DOI: 10.1016/j.cej.2024.149987.

13. Atmaca, E. Treatment of landfill leachate by using electro-Fenton method / E. Atmaca // *Journal of Hazardous Materials*. – 2009. – Vol. 163. – P. 109–114. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2008.06.073.

14. Xu, B. Photocatalytic removal of perfluoroalkyl substances from water and wastewater: Mechanism, kinetics and controlling factors / B. Xu, M.B. Ahmed, J.L. Zhou, A. Altaee, M. Wu, G. Xu // *Chemosphere*. – 2017. – Vol. 189. – P. 717–729. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.09.110.

15. Martin, H.G. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities / H.G. Martin, N. Ivanova, V. Kunin, et al. // *Nature Biotechnology*. – 2006. – Vol. 24, № 10. – P. 1263–1269. – DOI: 10.1038/nbt1241.

16. Comeau, Y. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal / Y. Comeau, K.J. Hall, R.E.W. Hancock, W.K. Oldham // *Water Research*. – 1986. – Vol. 20, № 12. – P. 1511–1521.

17. Oehmen, A. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale / A. Oehmen, P.C. Lemos, G. Carvalho, Z. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, M.A.M. Reis // *Water Research*. – 2007. – Vol. 41, № 11. – P. 2271–2300.

18. Zeng, W. Denitrifying phosphorus removal and impact of nitrite accumulation on phosphorus removal in a continuous anaerobic-anoxic-aerobic (A2/O) process treating domestic wastewater / W. Zeng, L. Li, Y.Y. Yang, X.D. Wang, Q. Peng, S.Y. Wang // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2011. – Vol. 48, № 2. – P. 134–142.

19. Parnian, I. Design, operation and technology configurations for enhanced biological phosphorus removal (EBPR) process: a review / I. Parnian, A. Eldyasti // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. – 2020. – Vol. 19, № 1. – P. 123–156.

20. Onnis-Hayden, A. Survey of full-scale sidestream enhanced biological phosphorus removal (S2EBPR) systems and comparison with conventional EBPRs in North America: Process stability, kinetics, and microbial populations / A. Onnis-Hayden, V. Srinivasan, K. Lewis, D. Aga, A.Z. Gu // *Water Environment Research*. – 2020. – Vol. 92, № 6. – P. 1021–1033. – DOI: 10.1002/wer.1198.

21. Wang, D. Side-Stream Enhanced Biological Phosphorus Removal (S2EBPR) Enables Effective Phosphorus Removal in a Pilot-scale Shortcut Nitrogen Removal System / D. Wang, I. Han, K. McCullough, S. Klaus, J. Lee, V. Srinivasan, M. Huang, Z.L. Wang, G. Li, Y. Yan, K. Li, L. Qin, C.B. Bott, J.

McQuarrie, B.M. Stinson, C. de Barbadillo, P. Dombrowski, J. Barnard, A.Z. Gu // Preprints.org. – 2023. – DOI: 10.20944/preprints202304.0013.v1.

22. Zhang, Y. A comparative study of microbial dynamics and phosphorus removal for two side-stream wastewater treatment processes / Y. Zhang, M.S. Islam, K.N. McPhedran, S. Dong, E.M. Rashed, M.M. El-Shafei, A.M. Nourel Din, M. Gamal El-Din // RSC Advances. – 2017. – Vol. 7. – P. 45938–45948. – DOI: 10.1039/C7RA07610J.

23. Zheng, C. Denitrifying phosphate accumulating organisms and its mechanism of nitrogen and phosphorus removal / C. Zheng, C. Wang, M. Zhang, et al. // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao (Chinese Journal of Biotechnology). – 2023. – Vol. 39, № 3. – P. 1009–1025. – DOI: 10.13345/j.cjb.220634.

24. Lin, Y. Balancing denitrifying phosphorus-accumulating organisms and denitrifying glycogen-accumulating organisms for advanced nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater / Y. Lin, Y. Sun, L. Zhang, Q. Zhang, X. Li, J. Sui, Y. Peng // Bioresource Technology. – 2023. – Vol. 369. – Article 128444. – DOI: 10.1016/j.biortech.2022.128444.

25. Zhang, C. A review on the integration of mainstream P-recovery strategies with enhanced biological phosphorus removal / C. Zhang, A. Guisasola, J.A. Baeza // Water Research. – 2022. – Vol. 212. – Article 118102. – DOI: 10.1016/j.watres.2022.118102.

26. Mino, T. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process / T. Mino, M.C.M. van Loosdrecht, J.J. Heijnen // Water Research. – 1998. – Vol. 32, № 11. – P. 3193–3207.

27. Fuhs, G.W. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater / G.W. Fuhs, M. Chen // Microbial Ecology. – 1975. – Vol. 2, № 2. – P. 119–138.

28. Barker, P.S. Denitrification behaviour in biological excess phosphorus removal activated sludge systems / P.S. Barker, P.L. Dold // Water Research. – 1996. – Vol. 30, № 4. – P. 769–780.

29. Seviour, R.J. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems / R.J. Seviour, T. Mino, M. Onuki // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2003. – Vol. 27, № 1. – P. 99–127.

30. Wagner, M. Development of a ribosomal-RNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge / M. Wagner, R. Erhart, W. Manz, et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1994. – Vol. 60, № 3. – P. 792–800.

31. Nakamura, K. *Microlunatus phosphovorus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge / K. Nakamura, A. Hiraishi, Y. Yoshimi, et al. // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1995. – Vol. 45, № 1. – P. 17–22.

32. Maszenan, A.M. Three isolates of novel polyphosphate-accumulating gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus, *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. / A.M. Maszenan, R.J. Seviour, B.K. Patel, et al. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2000. – Vol. 50, № 2. – P. 593–603.

33. Hanada, S. *Tetrasphaera elongata* sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge / S. Hanada, W.-T. Liu, T. Shintani, et al. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2002. – Vol. 52, № 3. – P. 883–887.

34. McKenzie, C.M. Isolates of *Candidatus Nostocoida limicola* Blackall et al. 2000 should be described as three novel species of the genus *Tetrasphaera*, as *Tetrasphaera jenkinsii* sp. nov., *Tetrasphaera vanveenii* sp. nov. and *Tetrasphaera veronensis* sp. nov. / C.M. McKenzie, E.M. Seviour, P. Schumann, et al. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2006. – Vol. 56, № 10. – P. 2279–2290.

35. Nguyen, H.T. High diversity and abundance of putative polyphosphate-accumulating *Tetrasphaera*-related bacteria in activated sludge systems / H.T.

Nguyen, V.Q. Le, A.A. Hansen, et al. // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2011. – Vol. 76, № 2. – P. 256–267.

36. Marques, R. Metabolism and ecological niche of *Tetrasphaera* and *Candidatus Accumulibacter* in enhanced biological phosphorus removal / R. Marques, J. Santos, H. Nguyen, et al. // *Water Research*. – 2017. – Vol. 122. – P. 159–171.

37. Bond, P.L. Bacterial community structures of phosphate-removing and nonphosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors / P.L. Bond, P. Hugenholtz, J. Keller, L.L. Blackall // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – Vol. 61, № 5. – P. 1910–1916.

38. Crocetti, G.R. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA directed probes for their detection and quantitation / G.R. Crocetti, P. Hugenholtz, P.L. Bond, et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – Vol. 66, № 3. – P. 1175–1182.

39. Kong, Y.H. Microautoradiographic study of *Rhodocyclus*-related polyphosphate-accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants / Y.H. Kong, J.L. Nielsen, P.H. Nielsen // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – Vol. 70, № 9. – P. 5383–5390.

40. Peterson, S.B. Environmental distribution and population biology of *Candidatus Accumulibacter*, a primary agent of biological phosphorus removal / S.B. Peterson, F. Warnecke, J. Madejska, et al. // *Environmental Microbiology*. – 2008. – Vol. 10, № 10. – P. 2692–2703.

41. Oehmen, A. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale / A. Oehmen, P.C. Lemos, G. Carvalho, et al. // *Water Research*. – 2007. – Vol. 41, № 11. – P. 2271–2300.

42. Flowers, J.J. Denitrification capabilities of two biological phosphorus removal sludges dominated by different ‘*Candidatus Accumulibacter*’ clades / J.J. Flowers, S. He, Y. Yilmaz, S. Noguera, D.R. McMahon // *Environmental Microbiology Reports*. – 2009. – Vol. 1, № 6. – P. 583–588.

43. Wexler, M. Radiolabelled proteomics to determine differential functioning of *Accumulibacter* during the anaerobic and aerobic phases of a

bioreactor operating for enhanced biological phosphorus removal / M. Wexler, D.J. Richardson, P.L. Bond // *Environmental Microbiology*. – 2009. – Vol. 11, № 12. – P. 3029–3044.

44. Acevedo, B. Metabolic shift of polyphosphate-accumulating organisms with different levels of poly-phosphate storage / B. Acevedo, A. Oehmen, G. Carvalho, et al. // *Water Research*. – 2012. – Vol. 46, № 6. – P. 1889–1900.

45. Schreiber, K. The anaerobic regulatory network required for *Pseudomonas aeruginosa* nitrate respiration / K. Schreiber, R. Krieger, B. Benkert, et al. // *Journal of Bacteriology*. – 2007. – Vol. 189, № 11. – P. 4310–4314.

46. Lambert, C. Monitoring of inorganic polyphosphate dynamics in *Corynebacterium glutamicum* using a novel oxygen sparger for real time ^{31}P in vivo NMR / C. Lambert, D. Weuster-Botz, R. Weichenhain, et al. // *Acta Biotechnologica*. – 2002. – Vol. 22, № 3–4. – P. 245–260.

47. Hirota, R. Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses / R. Hirota, A. Kuroda, J. Kato, H. Ohtake // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2010. – Vol. 109, № 5. – P. 423–432.

48. Seufferheld, M. The H(+)-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes / M. Seufferheld, C.R. Lea, M. Vieira, et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 49. – P. 51193–51202.

49. Hu, J.Y. A new method for characterizing denitrifying phosphorus removal bacteria by using three different types of electron acceptors / J.Y. Hu, S.L. Ong, W.J. Ng, F. Lu, X.J. Fan // *Water Research*. – 2003. – Vol. 37, № 14. – P. 3463–3471. – DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00205-7.

50. Martín, H.G. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities / H.G. Martín, N. Ivanova, V. Kunin, F. Warnecke, K.W. Barry, A.C. McHardy, C. Yeates, S.M. He, A.A. Salamov, E. Szeto, E. Dalin, N.H. Putnam, H.J. Shapiro, J.L. Pangilinan, I.

Rigoutsos, N.C. Kyrpides, L.L. Blackall, K.D. McMahon, P. Hugenholtz // *Nature Biotechnology*. – 2006. – Vol. 24, № 10. – P. 1263–1269. – DOI: 10.1038/nbt1247.

51. Carvalho, G. Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure / G. Carvalho, P.C. Lemos, A. Oehmen, M.A.M. Reis // *Water Research*. – 2007. – Vol. 41, № 19. – P. 4383–4396. – DOI: 10.1016/j.watres.2007.06.065.

52. Zhang, Y. Elucidating functional microorganisms and metabolic mechanisms in a novel engineered ecosystem integrating C, N, P and S biotransformation by metagenomics / Y. Zhang, Z.S. Hua, H. Lu, A. Oehmen, J. Guo // *Water Research*. – 2019. – Vol. 148. – P. 219–230. – DOI: 10.1016/j.watres.2018.10.061.

53. Wang, H.G. Investigation on polyphosphate accumulation in the sulfur transformation-centric EBPR (SEBPR) process for treatment of high-temperature saline wastewater / H.G. Wang, H. Huang, R.L. Liu, Y.P. Mao, B.K. Biswal, G.H. Chen, D. Wu // *Water Research*. – 2019. – Vol. 167. – Article 115138. – DOI: 10.1016/j.watres.2019.115138.

54. Chen, Z. Coupled pyrite and sulfur autotrophic denitrification for simultaneous removal of nitrogen and phosphorus from secondary effluent: feasibility, performance and mechanisms / Z. Chen, C. Pang, Q. Wen // *Water Research*. – 2023. – Vol. 235. – Article 120422. – DOI: 10.1016/j.watres.2023.120422.

55. Cuevas-Rodriguez, G. Sedimentation and prefermentation of domestic wastewater in a fixed bed biofilm reactor / G. Cuevas-Rodriguez, I. Tejero-Monzon // *Water Science and Technology*. – 2003. – Vol. 48, № 11–12. – P. 47–55.

56. Thomas, M. Optimisation of Noosa BNR plant to improve performance and reduce operating costs / M. Thomas, P. Wright, L. Blackall, et al. // *Water Science and Technology*. – 2003. – Vol. 47, № 11. – P. 141–148.

57. Ahn, Y.H. Elutriated acid fermentation of municipal primary sludge / Y.H. Ahn, R.E. Speece // *Water Research*. – 2006. – Vol. 40, № 11. – P. 2210–2220.

58. Zeng, R.J. Effects of solids concentration, pH and carbon addition on the production rate and composition of volatile fatty acids in prefermenters using primary sewage sludge / R.J. Zeng, Z. Yuan, J. Keller // *Water Science and Technology*. – 2006. – Vol. 53, № 8. – P. 263–269.

59. Martin, H.G. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities / H.G. Martin, N. Ivanova, V. Kunin, et al. // *Nature Biotechnology*. – 2006. – Vol. 24, № 10. – P. 1263–1269.

60. Tchobanoglous, G. *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery* / G. Tchobanoglous, H.D. Stensel, R. Tsuchihashi, F.L. Burton. – 5th ed. – New York : McGraw-Hill Education, 2013. – 1819 p.

61. Oehmen, A. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale / A. Oehmen, P.C. Lemos, G. Carvalho, et al. // *Water Research*. – 2007. – Vol. 41, № 11. – P. 2271–2300.

62. Tarayre, C. Characterisation of phosphate accumulating organisms and techniques for polyphosphate detection: A review / C. Tarayre, H.-T. Nguyen, A. Brognaux, et al. // *Sensors*. – 2016. – Vol. 16, № 6. – Article 797. – DOI: 10.3390/s16060797.

63. Zhang, H. Recovery of phosphorus from dairy manure: A pilot-scale study / H. Zhang, V.K. Lo, J.R. Thompson // *Environmental Technology*. – 2015. – Vol. 36, № 11. – P. 1398–1404.

64. Docampo, R. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man / R. Docampo, W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3, № 3. – P. 251–261.

65. Zhang, H. Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis / H. Zhang, M.R. Gomez-Garcia, X. Shi, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104, № 42. – P. 16486–16491.

66. Akiyama, M. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein / M. Akiyama,

E. Crooke, A. Kornberg // *Journal of Biological Chemistry*. – 1992. – Vol. 267, № 31. – P. 22556–22561.

67. Kato, J. Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (ppk) of *Klebsiella aerogenes* / J. Kato, T. Yamamoto, K. Yamada, H. Ohtake // *Gene*. – 1993. – Vol. 137, № 2. – P. 237–242.

68. Tinsley, C.R. Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutant / C.R. Tinsley, E.C. Gotschlich // *Infection and Immunity*. – 1995. – Vol. 63, № 5. – P. 1624–1630.

69. Ishige, A. The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa* / A. Ishige, T. Kameda, T. Noguchi, T. Shiba // *DNA Research*. – 1998. – Vol. 5, № 3. – P. 157–162.

70. Ogawa, N. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical and physiologic features / N. Ogawa, C.M. Tzeng, C.D. Fraley, A. Kornberg // *Journal of Bacteriology*. – 2000. – Vol. 182, № 23. – P. 6687–6693.

71. McMahon, K.D. Polyphosphate kinase from activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal / K.D. McMahon, M.A. Dojka, N.R. Pace, D. Jenkins // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68, № 10. – P. 4971–4978.

72. Mensah, J.A. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi is associated with differences in phosphate and nitrogen uptake and fungal phosphate metabolism / J.A. Mensah, A.M. Alexander, P.M. Antunes, et al. // *Mycorrhiza*. – 2015. – Vol. 25, № 7. – P. 533–546.

73. Docampo, R. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man / R. Docampo, W. de Souza, K. Miranda, et al. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3, № 3. – P. 251–261.

74. Rao, N.N. Utilization by *Escherichia coli* of high-molecular-weight linear polyphosphate: roles of phosphatases and pore proteins / N.N. Rao, A. Torriani // *Journal of Bacteriology*. – 1988. – Vol. 170, № 11. – P. 5216–5223.

75. Kuroda, A. Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria / A. Kuroda, H. Ohtake // *Biochemistry (Moscow)*. – 2000. – Vol. 65, № 3. – P. 304–309.

76. Mao, Y. Characterization of *Thauera*-dominated hydrogen-oxidizing autotrophic denitrifying microbial communities by using high-throughput sequencing / Y. Mao, Y. Xia, T. Zhang // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 128. – P. 703–710. – DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.106.

77. Wang, H. Temporal dynamics and performance association of the *Tetrasphaera*-enriched microbiome for enhanced biological phosphorus removal / H. Wang, Y. Wang, G. Zhang, Z. Zhao, F. Ju // *Engineering*. – 2023. – DOI: 10.1016/j.eng.2022.10.016.

78. Zengin, G.E. Effect of aspartate and glutamate on the fate of enhanced biological phosphorus removal process and microbial community structure / G.E. Zengin, N. Artan, D. Orhon, H. Satoh, T. Mino // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102, № 2. – P. 894–903. – DOI: 10.1016/j.biortech.2010.09.023.

79. Ziliani, A. Putative metabolism of *Ca. Accumulibacter* via the utilization of glucose / A. Ziliani, P. Bovio-Winkler, A. Cabezas, C. Etchebehere, H.A. Garcia, C.M. López-Vázquez, D. Brdjanovic, M.C.M. van Loosdrecht, F.J. Rubio-Rincón // *Water Research*. – 2023. – Vol. 229. – Article 119446. – DOI: 10.1016/j.watres.2022.119446.

80. Luo, D. The mechanism of biological phosphorus removal under anoxic–aerobic alternation condition with starch as sole carbon source and its biochemical pathway / D. Luo, L. Yuan, L. Liu, Y. Wang, W. Fan // *Biochemical Engineering Journal*. – 2018. – Vol. 132. – P. 90–99. – DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.007.

81. Luo, D. The mechanism of biological phosphorus removal under anoxic–aerobic alternation condition with starch as sole carbon source and its biochemical pathway / D. Luo, L. Yuan, L. Liu, Y. Wang, W. Fan // *Biochemical Engineering Journal*. – 2018. – Vol. 132. – P. 90–99. – DOI: 10.1016/j.bej.2018.01.007.

82. Liu, W.T. Biological phosphorus removal processes: effect of pH on anaerobic substrate metabolism / W.T. Liu, T. Mino, T. Matsuo, K. Nakamura // *Water Science and Technology*. – 1996. – Vol. 34, № 1–2. – P. 25–32. – DOI: 10.1016/0273-1223(96)00491-X.

83. Liu, Y. Effect of initial pH control on enhanced biological phosphorus removal from wastewater containing acetic and propionic acids / Y. Liu, Y. Chen, Q. Zhou // *Chemosphere*. – 2007. – Vol. 66, № 1. – P. 123–129. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.05.004.

84. Liu, Y. Effect of different ratios of propionic to acetic acid on phosphorus removal by an enriched culture of phosphorus-accumulating organisms / Y. Liu, Y.G. Chen, H. Zheng, Q. Zhou // *Acta Scientiae Circumstantiae*. – 2006. – Vol. 26, № 8. – P. 1278–1283. – DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2006.08.009.

85. Li, N. Influence of pH on microbial community structure and metabolic characteristics of PAOs in biological phosphorus removal at low temperature / N. Li, X.H. Wang, H. Kang, X. Wang // *Environmental Science and Technology*. – 2013. – Vol. 36, № 3. – P. 92–98. – DOI: 10.3969/j.issn.1003-6504.2013.03.003.

86. Jung, S. Effect of purine limitation caused by an amidophosphoribosyl transferase (purF) mutation on polyphosphate kinase 1 (ppk1) gene expression / S. Jung, M.S. Lee, S.K. Kim, B.L. Wanner // *Genes and Genomics*. – 2012. – Vol. 34, № 1. – P. 27–34. – DOI: 10.1007/s13258-011-0128-8.

87. Oehmen, A. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale / A. Oehmen, P.C. Lemos, G. Carvalho, Z. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, M.A.M. Reis // *Water Research*. – 2007. – Vol. 41, № 11. – P. 2271–2300. – DOI: 10.1016/j.watres.2007.02.030.

88. Onnis-Hayden, A. Survey of full-scale sidestream enhanced biological phosphorus removal (S2EBPR) systems and comparison with conventional EBPRs in North America: process stability, kinetics, and microbial populations / A. Onnis-Hayden, V. Srinivasan, N.B. Tooker, G. Li, D. Wang, J.L. Barnard, C. Bott, P. Dombrowski, P. Schauer, A. Menniti, A. Shaw, B. Stinson, G. Stevens, P. Dunlap, I. Takacs, J. McQuarrie, H. Phillips, A. Lambrecht, H. Analla, A. Russell, A.Z. Gu

// Water Environment Research. – 2020. – Vol. 92, № 3. – P. 403–417. – DOI: 10.1002/wer.1198.

89. Zeng, L. The effects and mechanisms of pH and dissolved oxygen conditions on the release of arsenic at the sediment–water interface in Taihu Lake / L. Zeng, C. Yan, F. Yang, Z. Zhen, J. Yang, J. Chen, Y. Huang, Y. Xiao, W. Zhang // Toxics. – 2023. – Vol. 11, № 11. – P. 890.

90. Rayne, S. Evidence for tin inhibition of enhanced biological phosphorus removal at a municipal wastewater treatment plant / S. Rayne, S. Carey, K. Forest // Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering. – 2005. – Vol. 40, № 3. – P. 535–551. – DOI: 10.1081/ESE-200046557.

91. Wang, Y. Effect of copper ion on the anaerobic and aerobic metabolism of phosphorus-accumulating organisms linked to intracellular storage compounds / Y. Wang, Z. Ren, F. Jiang, J. Geng, W. He, J. Yang // Journal of Hazardous Materials. – 2011. – Vol. 186, № 1. – P. 313–319. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.11.007.

92. Tsai, Y.P. Verification of enzymes deterioration due to Cu(II) presence in an enhanced biological phosphorus removal system / Y.P. Tsai, H.F. Tzeng, J.W. Lin, M.S. Lu, J.Y. Lin // Chemosphere. – 2013. – Vol. 91, № 5. – P. 602–607. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.080.

93. Chen, Y. The impacts of silver nanoparticles and silver ions on wastewater biological phosphorus removal and the mechanisms / Y. Chen, H. Chen, X. Zheng, H. Mu // Journal of Hazardous Materials. – 2012. – Vol. 239–240. – P. 88–94. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2012.07.049.

94. Fang, J. Impact of Cr(VI) on P removal performance in enhanced biological phosphorus removal (EBPR) system based on the anaerobic and aerobic metabolism / J. Fang, P. Sun, S. Xu, T. Luo, J. Lou, J. Han, et al. // Bioresource Technology. – 2012. – Vol. 121. – P. 379–385. – DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.001.

95. Hu, Z. Biological nutrient removal in municipal wastewater treatment: new directions in sustainability / Z. Hu, D. Houweling, P. Dold // *Journal of Environmental Engineering*. – 2012. – Vol. 138, № 3. – P. 307–317. – DOI: 10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000462.

96. Zhou, Y. Response of poly-phosphate accumulating organisms to free nitrous acid inhibition under anoxic and aerobic conditions / Y. Zhou, L. Ganda, M. Lim, Z. Yuan, W.J. Ng // *Bioresource Technology*. – 2012. – Vol. 116. – P. 340–347. – DOI: 10.1016/j.biortech.2012.03.111.

97. Wang, Y. Effect of anaerobic reaction time on denitrifying phosphorus removal and N₂O production / Y. Wang, J. Geng, Z. Ren, W. He, M. Xing, M. Wu, et al. // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102, № 10. – P. 5674–5684. – DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.080.

98. Saito, T. Effect of nitrite on phosphate uptake by phosphate-accumulating organisms / T. Saito, D. Brdjanovic, M.C.M. van Loosdrecht // *Water Research*. – 2004. – Vol. 38, № 17. – P. 3760–3768. – DOI: 10.1016/j.watres.2004.05.023.

99. Sin, G. Nitrite effect on the phosphorus uptake activity of phosphate accumulating organisms (PAOs) in pilot-scale SBR and MBR reactors / G. Sin, K. Niville, G. Bachis, T. Jiang, I. Nopens, S. Van Hulle, P.A. Vanrolleghem // *Water SA*. – 2008. – Vol. 34, № 2. – P. 249–260.

100. Zhou, Y. Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms / Y. Zhou, M. Pijuan, Z. Yuan // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2007. – Vol. 98, № 4. – P. 903–912. – DOI: 10.1002/bit.21458.

101. Guerrero, J. The nature of the carbon source rules the competition between PAO and denitrifiers in systems for simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal / J. Guerrero, A. Guisasola, J.A. Baeza // *Water Research*. – 2011. – Vol. 45, № 16. – P. 4793–4802. – DOI: 10.1016/j.watres.2011.06.019.

102. Guerrero, J. Understanding the detrimental effect of nitrate presence on EBPR systems: effect of the plant configuration / J. Guerrero, C. Tayà, A. Guisasola,

J.A. Baeza // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2012. – Vol. 87, № 10. – P. 1508–1511. – DOI: 10.1002/jctb.3812.

103. Woodcock, S. Taxa–area relationships for microbes: the unsampled and the unseen / S. Woodcock, T.P. Curtis, I.M. Head, et al. // *Ecology Letters*. – 2006. – Vol. 9, № 7. – P. 805–812.

104. Xia, Y. Diversity and assembly patterns of activated sludge microbial communities: A review / Y. Xia, X. Wen, B. Zhang, Y. Yang // *Biotechnology Advances*. – 2018. – Vol. 36, № 4. – P. 1038–1047.

105. Pang, J. Characterization of the genes involved in nitrogen cycling in wastewater treatment plants using DNA microarray and most probable number-PCR / J. Pang, M. Matsuda, M. Kuroda, et al. // *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. – 2016. – Vol. 10, № 7. – P. 1–10.

106. Siripong, S. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants / S. Siripong, B.E. Rittmann // *Water Research*. – 2007. – Vol. 41, № 5. – P. 1110–1120.

107. Mielczarek, A.T. Population dynamics of bacteria involved in enhanced biological phosphorus removal in Danish wastewater treatment plants / A.T. Mielczarek, H.T. Nguyen, J.L. Nielsen, et al. // *Water Research*. – 2013. – Vol. 47, № 4. – P. 1529–1544.

108. Qian, Y. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants / Y. Qian, P. Dang-Cong // *AMB Express*. – 2017. – Vol. 7, № 1. – Article 25.

109. Gerda, H. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant / H. Gerda, L. Alice, D.M. Hebe, et al. // *Environmental Science and Technology*. – 2003. – Vol. 37, № 2. – P. 343–351.

110. Thomsen, T.R. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge / T.R. Thomsen, Y. Kong, P.H. Nielsen // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2007. – Vol. 60, № 3. – P. 370–382.

111. Nielsen, P.H. A conceptual ecosystem model of microbial communities in enhanced biological phosphorus removal plants / P.H. Nielsen, A.T. Mielczarek, C. Kragelund, et al. // *Water Research*. – 2010. – Vol. 44, № 17. – P. 5070–5088.

112. Zielińska, M. Community dynamics of denitrifying bacteria in full-scale wastewater treatment plant / M. Zielińska, P. Rusanowska, J. Jarzabek, et al. // *Environmental Technology*. – 2016. – Vol. 37, № 18. – P. 1–10.

113. Kaetzke, A. Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR / A. Kaetzke, D. Jentsch, K. Eschrich // *Letters in Applied Microbiology*. – 2005. – Vol. 40, № 3. – P. 207–211.

114. Marrengane, Z. Rapid quantification and analysis of genetic diversity among *Gordonia* populations in foaming activated sludge plants / Z. Marrengane, S.K. Kumar, L. Pillay, et al. // *Journal of Basic Microbiology*. – 2011. – Vol. 51, № 4. – P. 415–423.

115. Балымова, Е.С. Экспресс-метод контроля для управления процессом биологической очистки сточных вод нефтехимического комплекса: на примере ОАО «Казаньоргсинтез»: дис. ... канд. техн. наук: 03.02.08 / Е.С. Балымова. – Казань, 2015. – 151 с.

116. Su, J. Kinetic Analysis of Heterotrophic Nitrification–Aerobic Denitrification by an Oligotrophic *Acinetobacter* sp. SYF26 / J. Su, M. Ma, F. Ma, et al. // *Environmental Engineering Science*. – 2017. – Vol. 34, № 11. – P. 801–809.

117. Flemming, H.-C. Biofilms: an emergent form of bacterial life / H.-C. Flemming, J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S.A. Rice, S. Kjelleberg // *Nature Reviews Microbiology*. – 2016. – Vol. 14, № 9. – P. 563–575. – DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.

118. Dragos, A. The peculiar functions of the bacterial extracellular matrix / A. Dragos, A.T. Kovacs // *Trends in Microbiology*. – 2017. – Vol. 25, № 4. – P. 257–266. – DOI: 10.1016/j.tim.2016.12.010.

119. Koo, H. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies / H. Koo, R.N. Allan, R.P. Howlin, P. Stoodley, L. Hall-

Stoodley // *Nature Reviews Microbiology*. – 2017. – Vol. 15, № 10. – P. 740–755. – DOI: 10.1038/nrmicro.2017.99.

120. Maurya, A. Recent advances in the application of biofilm in bioremediation of industrial wastewater and organic pollutants / A. Maurya, A. Raj // *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. – Amsterdam: Elsevier, 2020. – P. 81–118.

121. Tang, C.C. Enhanced nitrogen and phosphorus removal from domestic wastewater via algae-assisted sequencing batch biofilm reactor / C.C. Tang, Y. Tian, H. Liang, W. Zuo, Z.W. Wang, J. Zhang, Z.W. He // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 250. – P. 185–190. – DOI: 10.1016/j.biortech.2017.11.028.

122. Quiton, K.G. Removal of chromium (VI) and zinc (II) from aqueous solution using kaolin-supported bacterial biofilms of Gram-negative *E. coli* and Gram-positive *Staphylococcus epidermidis* / K.G. Quiton, B. Doma Jr., C.M. Futralan, M.W. Wan // *Sustainable Environment Research*. – 2018. – Vol. 28, № 5. – P. 206–213. – DOI: 10.1016/j.serj.2018.04.002.

123. Oehmen, A. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale / A. Oehmen, P.C. Lemos, G. Carvalho, Z. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, M.A.M. Reis // *Water Research*. – 2007. – Vol. 41, № 11. – P. 2271–2300. – DOI: 10.1016/j.watres.2007.02.030.

124. Han, W. Bioremediation of aquaculture wastewater with algal-bacterial biofilm combined with the production of selenium rich biofertilizer / W. Han, Y. Mao, Y. Wei, P. Shang, X. Zhou // *Water*. – 2020. – Vol. 12, № 7. – Article 2071. – DOI: 10.3390/w12072071.

125. Peng, Y.Y. Simultaneous removal of nutrient and sulfonamides from marine aquaculture wastewater by concentrated and attached cultivation of *Chlorella vulgaris* in an algal biofilm membrane photobioreactor (BF-MPBR) / Y.Y. Peng, F. Gao, H.L. Yang, C. Li, M.M. Lu, Z.Y. Yang // *Science of the Total Environment*. – 2020. – Vol. 725. – Article 138524. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138524.

126. Akerman-Sanchez, G. Fungi for the bioremediation of pharmaceutical-derived pollutants: a bioengineering approach to water treatment / G. Akerman-

Sanchez, K. Rojas-Jimenez // Environmental Advances. – 2021. – Vol. 4. – Article 100071. – DOI: 10.1016/j.envadv.2021.100071.

127. Balu, S. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in the Sundarbans, the world's largest tidal mangrove forest, and indigenous microbial mixed biofilm-based removal of the contaminants / S. Balu, S. Bhunia, R. Gachhui, J. Mukherjee // Environmental Pollution. – 2020. – Vol. 266. – Article 115270. – DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115270.

128. Yuan, X. Synergistic degradation of crude oil by indigenous bacterial consortium and exogenous fungus *Scedosporium boydii* / X. Yuan, X. Zhang, X. Chen, D. Kong, X. Liu, S. Shen // Bioresource Technology. – 2018. – Vol. 264. – P. 190–197. – DOI: 10.1016/j.biortech.2018.05.072.

129. Al-Mailem, D.M. Bioremediation of hydrocarbons contaminating sewage effluent using man-made biofilms: effects of some variables / D.M. Al-Mailem, M.K. Kansour, S.S. Radwan // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2014. – Vol. 174, № 5. – P. 1736–1751. – DOI: 10.1007/s12010-014-1067-z.

130. Hoque, E. A new mercury accumulating *Mucor hiemalis* strain EH8 from cold sulfidic spring water biofilms / E. Hoque, J. Fritscher // MicrobiologyOpen. – 2016. – Vol. 5, № 5. – P. 763–781. – DOI: 10.1002/mbo3.368.

131. Hussain, S. Simultaneous removal of malachite green and hexavalent chromium by *Cunninghamella elegans* biofilm in a semi-continuous system / S. Hussain, L. Quinn, J. Li, E. Casey, C.D. Murphy // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2017. – Vol. 125. – P. 142–149. – DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.08.016.

132. Wang, W. Enhanced Cd^{2+} adsorption and toxicity for microbial biofilms in the presence of TiO_2 nanoparticles / W. Wang, S. Zhu, N. Li, S. Xie, C. Wen, X. Luo // Environmental Pollution. – 2022. – Vol. 314. – Article 120239. – DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120239.

133. Herath, H.M.L.I. Developed fungal–bacterial biofilms as a novel tool for bioremoval of hexavalent chromium from wastewater / H.M.L.I. Herath, A.U.

Rajapaksha, M. Vithanage, G. Seneviratne // *Chemical Ecology*. – 2014. – Vol. 30, № 5. – P. 418–427. – DOI: 10.1080/02757540.2014.886427.

134. Хасанова, А.А. Изучение способности бактерий активного ила к образованию биопленок *in vitro* / А.А. Хасанова, А.С. Сироткин, Е.В. Перушкина // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. – 2024. – Т. 14, № 2. – С. 207–214. – DOI: 10.21285/2227-2925-2024-14-2-207-214. – EDN: PCUTZF.

135. Шагинурова, Г.И. Получение и культивирование гранул аэробных микроорганизмов в отъемно-доливном процессе очистки сточных вод / Г.И. Шагинурова, А.С. Сироткин, В.М. Емельянов, Т. Эттерер // *Биотехнология*. – 2003. – № 3. – С. 80–89.

136. Xu, S. Microalgae biofilm and bacteria symbiosis in nutrient removal and carbon fixation from wastewater: a review / S. Xu, Y. Xu, Q. Wang, X. Liu, B. Zhao // *Current Pollution Reports*. – 2022. – Vol. 8, № 1. – P. 1–19. – DOI: 10.1007/s40726-022-00214-x.

137. Villard, D. Spatial fractionation of phosphorus accumulating biofilm: stratification of polyphosphate accumulation and dissimilatory nitrogen metabolism / D. Villard, T. Saltnes, G. Sørensen, I.L. Angell, S. Eikås, W. Johansen, K. Rudi // *Biofouling*. – 2022. – Vol. 38, № 2. – P. 162–172. – DOI: 10.1080/08927014.2022.2044475.

138. Sandeep, R. Effect of biofilm thickness on the activity and community composition of phosphorus accumulating bacteria in a moving bed biofilm reactor / R. Sandeep, J.F. Muscolino, W.V. Macêdo, M. Piculell, M. Christensson, J.S. Poulsen, J.L. Nielsen, L. Vergeynst // *Water Research*. – 2023. – Vol. 245. – Article 120599. – DOI: 10.1016/j.watres.2023.120599.

139. Li, Y. Characterization of extracellular phosphorus in enhanced biological phosphorus removal granular sludge systems / Y. Li, M. Pijuan, Z. Yuan // *Bioresource Technology*. – 2021. – Vol. 320. – Article 124366. – DOI: 10.1016/j.biortech.2020.124366.

140. Boonfueng, T. Zn sorption mechanisms onto sheathed *Leptothrix discophora* and the impact of the nanoparticulate biogenic Mn oxide coating / T. Boonfueng, L. Axe, N. Yee, D. Hahn, P.K. Ndiba // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2009. – Vol. 333, № 2. – P. 439–447. – DOI: 10.1016/j.jcis.2009.02.033.

141. Schönborn, C. Stability of enhanced biological phosphorus removal and composition of polyphosphate granules / C. Schönborn, H.D. Bauer, I. Röske // *Water Research*. – 2001. – Vol. 35, № 13. – P. 3190–3196.

142. Zhang, H.L. Phosphorus removal in an enhanced biological phosphorus removal process: roles of extracellular polymeric substances / H.L. Zhang, W. Fang, Y.P. Wan, G.P. Sheng, R.J. Zeng, W.W. Li, H.Q. Yu // *Environmental Science & Technology*. – 2013. – Vol. 47, № 20. – P. 11482–11489. – DOI: 10.1021/es402034m.

143. Zhang, H.L. Species of phosphorus in the extracellular polymeric substances of EBPR sludge / H.L. Zhang, W. Fang, Y.P. Wang, G.P. Sheng, C.W. Xia, R.J. Zeng, H.Q. Yu // *Bioresource Technology*. – 2013. – Vol. 142. – P. 714–718. – DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.068.

144. Patrauchan, M.A. Calcium influences cellular and extracellular product formation during biofilm-associated growth of a marine *Pseudoalteromonas* sp. / M.A. Patrauchan, S. Sarkisova, K. Sauer, M.J. Franklin // *Microbiology*. – 2005. – Vol. 151, № 9. – P. 2885–2897. – DOI: 10.1099/mic.0.27965-0.

145. Lin, Y.M. The contribution of exopolysaccharides induced struvites accumulation to ammonium adsorption in aerobic granular sludge / Y.M. Lin, J.P. Bassin, M.C.M. van Loosdrecht // *Water Research*. – 2012. – Vol. 46, № 4. – P. 986–992. – DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.072.

146. Barat, R. The role of potassium, magnesium and calcium in the enhanced biological phosphorus removal treatment plants / R. Barat, T. Montoya, A. Seco, J. Ferrer // *Environmental Technology*. – 2005. – Vol. 26, № 9. – P. 983–992. – DOI: 10.1080/09593332608618506.

147. Liu, Y. The elemental compositions of P-accumulating microbial granules developed in sequencing batch reactors / Y. Liu, Y.M. Lin, J.H. Tay //

Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40, № 10. – P. 3258–3262. – DOI: 10.1016/j.procbio.2005.02.015.

148. Hesselmann, R.P.X. Anaerobic metabolism of bacteria performing enhanced biological phosphate removal / R.P.X. Hesselmann, R. von Rummell, S.M. Resnick, R. Hany, A.J.B. Zehnder // Water Research. – 2000. – Vol. 34, № 14. – P. 3487–3494.

149. Parker, D.S. New process design procedure for dealing with variable trickling filter effluent suspended solids / D.S. Parker, J.A. Newman // Journal of Environmental Engineering. – 2006. – Vol. 132, № 7. – P. 758–763.

150. Forbis-Stokes, A.A. Nitrifying trickling filters and denitrifying bioreactors for nitrogen management of high-strength anaerobic digestion effluent / A.A. Forbis-Stokes, L. Rocha-Melogno, M.A. Deshusses // Chemosphere. – 2018. – Vol. 204. – P. 119–129. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.137.

151. Hunter, B. Resource recovery from high-strength human waste anaerobic digestate using simple nitrification and denitrification filters / B. Hunter, M.A. Deshusses // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 712. – Article 135509. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135509.

152. Nerenberg, R. The membrane-biofilm reactor (MBfR) as a counter-diffusional biofilm process / R. Nerenberg // Current Opinion in Biotechnology. – 2016. – Vol. 38. – P. 131–136. – DOI: 10.1016/j.copbio.2016.01.015.

153. Zhou, C. Hydrogenotrophic microbial reduction of oxyanions with the membrane biofilm reactor: mechanisms and applications / C. Zhou, A. Ontiveros-Valencia, R. Nerenberg, Y. Tang, D. Friese, R. Krajmalnik-Brown, B.E. Rittmann // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 9. – Article 3268. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.03268.

154. Terada, A. Sequencing batch membrane biofilm reactor for simultaneous nitrogen and phosphorus removal: novel application of membrane-aerated biofilm / A. Terada, T. Yamamoto, S. Tsuneda, A. Hirata // Biotechnology and Bioengineering. – 2006. – Vol. 94, № 4. – P. 730–739. – DOI: 10.1002/bit.20887.

155. Rodríguez-Hernández, L. Evaluation of a hybrid vertical membrane bioreactor (HVMBR) for wastewater treatment / L. Rodríguez-Hernández, A.L. Esteban-García, A. Lobo, et al. // *Water Science and Technology*. – 2012. – Vol. 65, № 6. – P. 1109–1115.

156. Patel, A. Simultaneous carbon, nitrogen and phosphorous removal from municipal wastewater in a circulating fluidized bed bioreactor / A. Patel, J. Zhu, G. Nakhla // *Chemosphere*. – 2006. – Vol. 65, № 7. – P. 1103–1112. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.047.

157. Li, J. Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR) / J. Li, X.-H. Xing, B.-Z. Wang // *Biochemical Engineering Journal*. – 2003. – Vol. 16, № 3. – P. 279–285. – DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00071-8.

158. Lu, Y.-s., Dagot, C., Baudu, M., Laurent, J., Hu, L.-x. Hydrodynamics and oxygen transfer in a novel extra-loop fluidized bed bioreactor / Y.-s. Lu, C. Dagot, M. Baudu, J. Laurent, L.-x. Hu // *Journal of Shanghai University (English Edition)*. – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 266–274. – DOI: 10.1007/s11741-010-0642-1.

159. Ødegaard, H. Innovations in wastewater treatment: the moving bed biofilm process / H. Ødegaard // *Water Science and Technology*. – 2006. – Vol. 53, № 9. – P. 17–33.

160. Delatolla, R. Effects of long exposure to low temperatures on nitrifying biofilm and biomass in wastewater treatment / R. Delatolla, N. Tufenkji, Y. Comeau, A. Gadbois, D. Lamarre, D. Berk // *Water Environment Research*. – 2012. – Vol. 84, № 4. – P. 328–338.

161. Poojashri, R.N. Studies on nutrient removal using polyurethane foam (PUF) in moving bed bioreactor (MBBR) / R.N. Poojashri, M.S. Thanushree, B. Manojkumar // *International Research Journal of Engineering and Technology*. – 2016. – Vol. 3, № 8. – P. 1650–1654.

162. Bengtsson, S. A comparison of aerobic granular sludge with conventional and compact biological treatment technologies / S. Bengtsson, M. de

Blois, B.M. Wilén, D. Gustavsson // *Environmental Technology*. – 2018. – Vol. 39, № 13. – P. 1479–1487. – DOI: 10.1080/09593330.2018.1452985.

163. Iorhemen, O.T. Aerobic granular sludge membrane bioreactor (AGMBR): Extracellular polymeric substances (EPS) analysis / O.T. Iorhemen, R.A. Hamza, M.S. Zaghoul, J.H. Tay // *Water Research*. – 2019. – Vol. 156. – P. 305–314.

164. Sarma, S.J. Carbon, nitrogen and phosphorus removal mechanisms of aerobic granules / S.J. Sarma, J.H. Tay // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2018. – Vol. 38, № 7. – P. 1077–1088.

165. Pronk, M. Effect of influent substrate on aerobic granular sludge formation / M. Pronk, B. Abbas, S.H.K. Al-Zuhairy, R. Kraan, R. Kleerebezem, M.C.M. van Loosdrecht // *Water Research*. – 2015. – Vol. 82. – P. 408–418. – DOI: 10.1016/j.watres.2015.05.032.

166. de Kreuk, M.K. Simultaneous COD, nitrogen, and phosphate removal by aerobic granular sludge / M.K. de Kreuk, J.J. Heijnen, M.C.M. van Loosdrecht // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2005. – Vol. 90, № 6. – P. 761–769. – DOI: 10.1002/bit.20470.

167. Hu, X. Effects of Internal Diameter Size of Carriers on Biofilm Characteristics in Wastewater Treatment / X. Hu, R. Lin, J. Wei, et al. // *Environmental Engineering Science*. – 2020. – Vol. 37, № 10. – P. 679–688. – DOI: 10.1089/ees.2019.0466.

168. Eshamuddin, M. The influence of process operating conditions on the microbial community structure in the moving bed biofilm reactor at phylum and class level: A review / M. Eshamuddin, G. Zuccaro, G. Nourrit, C. Albasi // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2024. – Vol. 12, № 4. – Article 113266. – DOI: 10.1016/j.jece.2024.113266.

169. Madan, S. Advancement in biological wastewater treatment using hybrid moving bed biofilm reactor (MBBR): a review / S. Madan, R. Madan, A. Hussain // *Applied Water Science*. – 2022. – Vol. 12. – Article 141. – DOI: 10.1007/s13201-022-01662-y.

170. Waqas, S. Effect of Operating Parameters on the Performance of Integrated Fixed-Film Activated Sludge for Wastewater Treatment / S. Waqas, N.Y. Harun, N.S. Sambudi, K.J. Abioye, M.H. Zeeshan, A. Ali, A. Abdulrahman, L. Alkhatabi, A.S. Alsaadi // *Membranes*. – 2023. – Vol. 13, № 8. – Article 704. – DOI: 10.3390/membranes13080704.

171. Lariyah, M.S. Application of Moving Bed Biofilm Reactor (MBBR) and Integrated Fixed Activated Sludge (IFAS) for Biological River Water Purification System: A Short Review / M.S. Lariyah, H.A. Mohiyaden, G. Hayder, A. Hussein, H. Basri, A.F. Sabri, M.N. Noh // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2016. – Vol. 32, № 1. – Article 012005. – DOI: 10.1088/1755-1315/32/1/012005.

172. Wang, D. A novel pilot-scale IFAS-MBR system with low aeration for municipal wastewater treatment: Linkages between nutrient removal and core functional microbiota / D. Wang, J. Tao, F. Fan, R. Xu, et al. // *Science of the Total Environment*. – 2021. – Vol. 776. – Article 145858. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.145858.

173. Li, J. Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR) / J. Li, H. Peng, C. Wang, W. Liu // *Biochemical Engineering Journal*. – 2003. – Vol. 16, № 3. – P. 279–285. – DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00071-8.

174. Bi, Z. Influence of dissolved oxygen on phosphorus removal by polyphosphate-accumulating organisms biofilm: performance and metabolic response / Z. Bi, J. Wu, Y. Huang, Y. Pan // *Biochemical Engineering Journal*. – 2023. – Vol. 199. – Article 109048. – DOI: 10.1016/j.bej.2023.109048.

175. Rudi, K. Microbial ecological processes in MBBR biofilms for biological phosphorus removal from wastewater / K. Rudi, I.A. Goa, T. Saltnes, G. Sørensen, I.L. Angell, S. Eikås // *Water Science and Technology*. – 2019. – Vol. 79, № 8. – P. 1467–1473. – DOI: 10.2166/wst.2019.149.

176. Prakash, B. Biofilms: a survival strategy of bacteria / B. Prakash, B.M. Veeregowda, G. Krishnappa // *Current Science*. – 2003. – Vol. 85, № 9. – P. 1299–1307.
177. Simões, M. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms / M. Simões, M.O. Pereira, S. Sillankorva, J. Azeredo, M.J. Vieira // *Biofouling*. – 2007. – Vol. 23, № 4. – P. 249–258. – DOI: 10.1080/08927010701368476.
178. He, Q. Unraveling characteristics of simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal (SNDPR) in an aerobic granular sequencing batch reactor / Q. He, S. Zhang, Z. Zou, L.A. Zheng, H. Wang // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 220. – P. 651–655.
179. Zhang, X. A novel denitrifying phosphorus removal and partial nitrification, anammox (DPR-PNA) process for advanced nutrients removal from high-strength wastewater / X. Zhang, C. Wang, P. Wu, Y. Xia, Y. Chen, W. Liu, L. Xu, F. Faustin // *Chemosphere*. – 2021. – Vol. 265. – Article 129165.
180. Xu, X. Achieving mainstream nitrogen and phosphorus removal through simultaneous partial nitrification, anammox, denitrification, and denitrifying phosphorus removal (SNADPR) process in a single-tank integrative reactor / X. Xu, L. Qiu, C. Wang, F. Yang // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 284. – P. 80–89.
181. Chen, Y. Effect of nitrate recycling ratio on simultaneous biological nutrient removal in a novel anaerobic/anoxic/oxic (A2/O)-biological aerated filter (BAF) system / Y. Chen, C. Peng, J. Wang, L. Ye, L. Zhang, Y. Peng // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102, № 10. – P. 5722–5727.
182. Chen, Y. The combined effects of COD/N ratio and nitrate recycling ratio on nitrogen and phosphorus removal in anaerobic/anoxic/aerobic (A2/O)-biological aerated filter (BAF) systems / Y. Chen, B. Li, L. Ye, Y. Peng // *Biochemical Engineering Journal*. – 2015. – Vol. 93. – P. 235–242.
183. Wang, J. Advanced nitrogen and phosphorus removal in A2O-BAF system treating low carbon-to-nitrogen ratio domestic wastewater / J. Wang, Y.

Peng, Y. Chen // *Frontiers of Environmental Science and Engineering in China*. – 2011. – Vol. 5, № 3. – P. 474–480.

184. Zhang, M. Roles of nitrate recycling ratio in the A2/O-MBBR denitrifying phosphorus removal system for high-efficient wastewater treatment: performance comparison, nutrient mechanism and potential evaluation / M. Zhang, T. Song, C. Zhu, Y. Fan, A. Soares, X. Gu, J. Wu // *Journal of Environmental Management*. – 2020. – Vol. 270. – Article 110887.

185. Демаков, В.А. Бактерии активного ила биологических очистных сооружений, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот / В.А. Демаков, Д.М. Васильев, Ю.Г. Максимова, Ю.А. Павлова, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // *Микробиология*. – 2015. – Т. 84, № 3. – С. 369–378.

186. Максимова, Ю.Г. Влияние немодифицированных многостенных нанотрубок на формирование и разрушение бактериальных биопленок / Ю.Г. Максимова, Я.Е. Быкова, А.С. Зорина, С.М. Никулин, А.Ю. Максимов // *Микробиология*. – 2022. – Т. 91, № 4. – С. 507–516.

187. Максимова, Ю.Г. Деградация пиридина суспензиями и биопленками штаммов *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Burkholderia dolosa* БОС, выделенных из активного ила очистных сооружений / Ю.Г. Максимова, А.А. Сергеева, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов // *Биотехнология*. – 2020. – Т. 36, № 2. – С. 86–98.

188. Pelevina, A.V. Aggregate formation by a microbial community developing in a phosphorus-removing laboratory reactor / A.V. Pelevina, Yu.Yu. Berestovskaya, A.G. Dorofeev, Yu.A. Nikolaev, E.V. Gruzdev, N.V. Pimenov, A.V. Mardanov // *Microbiology*. – 2023. – Vol. 92, № 1. – P. 33–36.

189. Huber, S.G. Einfluß der Prozeßführung auf Menge und Zusammensetzung von Protein und Polysacchariden im Ablauf von Sequencing-Batch Reactoren / S.G. Huber. – München: Technische Universität München, Berichte aus Wassergüte und Abfallwirtschaft, 1999. – Bd. 159. – 129 S.

190. Зорина, А.С. Дисперсия моно- и смешанных биопленок *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus ruber* GT 1 / А.С. Зорина, Ю.Г. Максимова // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2019. – № 2. – С. 153–158.

191. Maksimova, Y. Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes Changes Their Antibiofilm and Probiofilm Effects on Environmental Bacteria / Y. Maksimova, Y. Bykova, A. Maksimov // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10, № 8. – Article 1627. – DOI: 10.3390/microorganisms10081627.

192. Singh, P. Identification of *Candida auris* by PCR and assessment of biofilm formation by crystal violet assay / P. Singh, S. Srivastava, R. Malhotra, P. Mathur // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2023. – Vol. 46. – Article 100421. – DOI: 10.1016/j.ijmmb.2023.100421.

193. Mathur, T. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods / T. Mathur, S. Singhal, S. Khan, D.J. Upadhyay, T. Fatma, A. Rattan // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2006. – Vol. 24, № 1. – P. 25–29. – DOI: 10.1016/S0255-0857(21)02466-X.

194. Luzak, B. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells / B. Luzak, P. Siarkiewicz, M. Boncler // *Toxicology in Vitro*. – 2022. – Vol. 83. – Article 105407. – DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105407.

195. Weisburg, W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane // *Journal of Bacteriology*. – 1991. – Vol. 173, № 2. – P. 697–703.

196. ПНД Ф 14.1:2.112-97. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации фосфат-ионов в природных и сточных водах фотометрическим методом с восстановлением аскорбиновой кислотой. – М.: ГУАК Минприроды РФ, 1997. – 15 с.

197. ПНД Ф 14.1.1-95. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации ионов аммония в

очищенных сточных водах фотометрическим методом с реактивом Несслера. – М.: ГУАК Минприроды РФ, 1995. – 13 с.

198. ПНД Ф 14.1:2.3-95. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нитрит-ионов в природных и сточных водах фотометрическим методом с реактивом Грисса. – М.: ГУАК Минприроды РФ, 1995. – 10 с.

199. ПНД Ф 14.1:2.4-95. Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений массовой концентрации нитрат-ионов в природных и сточных водах фотометрическим методом с салициловой кислотой. – М.: ГУАК Минприроды РФ, 1995. – 10 с.

200. ПНД Ф 14.1:2.3:4.123-97. Методика выполнения измерений биохимической потребности в кислороде после n-дней инкубации в поверхностных, пресных, подземных (грунтовых), питьевых, сточных и очищенных сточных водах. – М.: ГУАК Госкомэкологии России, 1997. – 27 с.

201. Лурье, Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод / Ю.Ю. Лурье. – 4-е изд., перераб. – М.: Химия, 1984. – 448 с.

202. Пелевина, А.В. Микробный консорциум, осуществляющий удаление фосфатов в циклическом аэробно-анаэробном культивировании / А.В. Пелевина, Ю.Ю. Берестовская, А.Г. Дорофеев, Ю.А. Николаев, Н.В. Пименов, А.В. Марданов // Микробиология. – 2021. – Т. 90, № 1. – С. 76–89.

203. Frey, B. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers / B. Frey, T. Rime, M. Phillips, B. Stierli, I. Hajdas, F. Widmer, M. Hartmann // FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – Vol. 92, № 3. – Article fiw018.

204. Khasanova, A. Succession of the activated sludge microbial community and phosphorus removal performance in a sequencing batch reactor during transition from an anoxic/aerobic system to EBPR / A. Khasanova, A. Pelevina, E. Gruzdev, A. Dorofeev, V. Grachev, Y. Nikolaev, A. Beletsky, A. Sirotkin, A. Mardanov, N. Pimenov // Water. – 2026. – Vol. 18, № 8. – P. 951. – DOI: 10.3390/w18080951.

205. Rognes, T. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics / T. Rognes, T. Flouri, B. Nichols, C. Quince, F. Mahé // *PeerJ*. – 2016. – Vol. 4. – Article e2584.
206. Li, D. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph / D. Li, C.M. Liu, R. Luo, K. Sadakane, T.W. Lam // *Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 31, № 10. – P. 1674–1676.
207. Wang, Z. Effective binning of metagenomic contigs using contrastive multi-view representation learning / Z. Wang, R. You, H. Han, W. Liu, F. Sun, S. Zhu // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – Article 585.
208. Pan, S. SemiBin2: self-supervised contrastive learning leads to better MAGs for short- and long-read sequencing / S. Pan, X.M. Zhao, L.P. Coelho // *Bioinformatics*. – 2023. – Vol. 39, Suppl. 1. – P. i21–i29.
209. Wu, Y.W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets / Y.W. Wu, B.A. Simmons, S.W. Singer // *Bioinformatics*. – 2016. – Vol. 32, № 4. – P. 605–607.
210. Kang, D.D. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies / D.D. Kang, F. Li, E. Kirton, A. Thomas, R. Egan, H. An, Z. Wang // *PeerJ*. – 2019. – Vol. 7. – Article e7359.
211. Terashima, M. Culture-dependent and -independent identification of polyphosphate-accumulating *Dechloromonas* spp. in a full-scale oxidation ditch plant / M. Terashima, A. Yama, M. Sato, I. Yumoto, Y. Kamagata, S. Kato // *Microbes and Environments*. – 2016. – Vol. 31, № 4. – P. 449–455. – DOI: 10.1264/jsme2.ME16097.
212. Petriglieri, F. “Candidatus *Dechloromonas phosphoritropha*” and “*Ca. D. phosphorivorans*”, novel polyphosphate-accumulating organisms abundant in wastewater treatment systems / F. Petriglieri, C. Singleton, M. Peces, J.F. Petersen, M. Nierychlo, P.H. Nielsen // *ISME Journal*. – 2021. – Vol. 15. – P. 3605–3614. – DOI: 10.1038/s41396-021-00994-w.

213. Saad, S.A. Denitrification of nitrate and nitrite by “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” clade IC / S.A. Saad, L. Welles, B. Abbas, C.M. Lopez-Vazquez, M.C.M. van Loosdrecht, D. Brdjanovic // *Water Research*. – 2016. – Vol. 105. – P. 97–109. – DOI: 10.1016/j.watres.2016.08.061.

214. Pelevina, A. New insight into granule formation in enhanced biological phosphorus removal reactor / A. Pelevina, E. Gruzdev, Y. Berestovskaya, et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14. – Article 1297694. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1297694.

215. Schuler, A.J. Enhanced biological phosphorus removal from wastewater by biomass with different phosphorus contents. Part 1 / A.J. Schuler, D. Jenkins // *Water Environment Research*. – 2003. – Vol. 75, № 6. – P. 485–498. – DOI: 10.2175/106143003X141286.

216. Spring, S. *Malikia granosa* gen. nov., sp. nov., a polyphosphate-accumulating bacterium / S. Spring, U. Jäckel, M. Wagner, P. Kämpfer // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2005. – Vol. 55, № 2. – P. 621–629. – DOI: 10.1099/ijs.0.63300-0.

217. Ge, H. Biological phosphorus removal from abattoir wastewater at short sludge ages mediated by Comamonadaceae PAO / H. Ge, D.J. Batstone, J. Keller // *Water Research*. – 2015. – Vol. 69. – P. 173–182. – DOI: 10.1016/j.watres.2014.11.004.

218. Rubio-Rincón, F.J. Long-term effects of sulphide on enhanced biological phosphorus removal: Role of *Thiothrix caldifontis* / F.J. Rubio-Rincón, L. Welles, C.M. Lopez-Vazquez, et al. // *Water Research*. – 2017. – Vol. 116. – P. 53–64. – DOI: 10.1016/j.watres.2017.03.017.

219. Chen, L. *Candidatus Thiothrix phosphatis* SCUT-1: A novel PAO abundant in EBPR system / L. Chen, X. Deng, X. Xie, K. Wang, H. Chen, S. Cen, F. Huang, C. Wang, Y. Li, C. Wei, G. Qiu // *Water Research*. – 2024. – Vol. 267. – Article 122479. – DOI: 10.1016/j.watres.2024.122479.

220. Wang, S. Performance and population structure of two carbon-sources granular EBPR systems at low temperature / S. Wang, Z. Li, D. Wang, Y. Li, L. Sun

// *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 291. – Article 122683. – DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122683.

221. Li, M. Insights on nitrogen and phosphorus removal mechanism in a single-stage membrane aeration biofilm reactor (MABR) / M. Li, X. Cao, Z. Wu, J. Li, Y. Cui, J. Liu, B. Li // *Journal of Water Process Engineering*. – 2023. – Vol. 52. – Article 103583. – DOI: 10.1016/j.jwpe.2023.103583.

222. Feng, S. Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* significantly reduces viability and alters the microbial community composition of activated sludge flocs and granules / S. Feng, C.H. Tan, F. Constancias, G.S. Kohli, Y. Cohen, S.A. Rice // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2017. – Vol. 93, № 4. – Article fix020.

223. Zhang, M. Simultaneous aerobic removal of phosphorus and nitrogen by a novel salt-tolerant phosphate-accumulating organism and the application potential in treatment of domestic sewage and aquaculture sewage / M. Zhang, L. Pan, C. Su, L. Liu, L. Dou // *Science of the Total Environment*. – 2021. – Vol. 758. – Article 143580. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143580.

224. Grady, E.N. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review / E.N. Grady, J. MacDonald, L. Liu, A. Richman, Z.-C. Yuan // *Microbial Cell Factories*. – 2016. – Vol. 15. – Article 203. – DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7.

225. Singh, B.K. Microbial degradation of organophosphorus compounds / B.K. Singh, A. Walker // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2006. – Vol. 30, № 3. – P. 428–471. – DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x.

226. Shoda, M. Simultaneous Removal of High-Strength Ammonium and Phosphorus by *Alcaligenes faecalis* No. 4 / M. Shoda, Y. Ishikawa // *International Journal of Water and Wastewater Treatment*. – 2017. – Vol. 3, № 3. – DOI: 10.16966/2381-5299.147.

227. Sirotkina, M.A. Rhodococcus lactonase with organophosphate hydrolase activity and His₆-tagged organophosphate hydrolase with lactonase activity: evolutionary proximity of bacterial enzymes / M.A. Sirotkina, et al. // *FEBS Open Bio*. – 2014. – Vol. 4. – P. 137–142.

228. Zhang, Y. A review of the phosphorus removal of polyphosphate-accumulating organisms under extreme conditions / Y. Zhang, X. Wang, J. Liu, H. Chen, Z. Li // *Science of the Total Environment*. – 2024. – Vol. 912. – Article 169103. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.169103.

229. Liu, S. Genomic insights into metabolic potentials of two simultaneous aerobic denitrification and phosphorus removal bacteria *Achromobacter* sp. GAD3 and *Agrobacterium* sp. LAD9 / S. Liu, Q. Chen, T. Ma, T. Wang, J. Ni // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2018. – Vol. 94, № 3. – Article fiy020. – DOI: 10.1093/femsec/fiy020.

230. Zorina, A.S. Biofilm formation by monocultures and mixed cultures of *Alcaligenes faecalis* 2 and *Rhodococcus ruber* GT1 / A.S. Zorina, Yu.G. Maksimova, V.A. Demakov // *Microbiology*. – 2019. – Vol. 88, № 2. – P. 164–171. – DOI: 10.1134/S0026261719020140.

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

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

233. Alisawi, H.A.O. Performance of wastewater treatment during variable temperature / H.A.O. Alisawi // *Applied Water Science*. – 2020. – Vol. 10. – Article 89. – DOI: 10.1007/s13201-020-1171-x.

234. Maal-Bared, R. Operational impacts of heavy metals on activated sludge systems: the need for improved monitoring / R. Maal-Bared // *Environmental Monitoring and Assessment*. – 2020. – Vol. 192, № 9. – Article 560. – DOI: 10.1007/s10661-020-08529-2.

235. Lu, F. Resistance of anaerobic activated sludge acclimated by different feeding patterns: response to different stress shocks / F. Lu, L. Huang, F. Qian, Q.

Jiang, S. Khan, P. Shen // *Water Science and Technology*. – 2022. – Vol. 85, № 10. – P. 3023–3035. – DOI: 10.2166/wst.2022.164.

236. Velkov, V.V. New insights into the molecular mechanisms of evolution: stress increases genetic diversity / V.V. Velkov // *Molecular Biology*. – 2002. – Vol. 36, № 2. – P. 209–215. – DOI: 10.1023/A:1015365805383.

237. Moreno Switt, A.I. Genomic comparison of spore-forming bacilli isolated from milk / A.I. Moreno Switt, A.D. Andrus, M.L. Ranieri, R.H. Orsi, R. Ivy, H.C. den Bakker, et al. // *BMC Genomics*. – 2014. – Vol. 15. – Article 26. – DOI: 10.1186/1471-2164-15-26.

238. Asadishad, B. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of *Bacillus subtilis* exposed to cold temperature and freeze–thaw / B. Asadishad, A.L.J. Olsson, D.H. Dusane, S. Ghoshal, N. Tufenkji // *Water Research*. – 2014. – Vol. 58. – P. 239–247. – DOI: 10.1016/j.watres.2014.03.048.

239. Klein, W. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures / W. Klein, M.H.W. Weber, M.A. Marahiel // *Journal of Bacteriology*. – 1999. – Vol. 181, № 17. – P. 5341–5349. – DOI: 10.1128/JB.181.17.5341-5349.1999.

240. Beckering, C.L. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis* / C.L. Beckering, L. Steil, M.H.W. Weber, U. Völker, M.A. Marahiel // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – Vol. 184, № 22. – P. 6395–6402. – DOI: 10.1128/JB.184.22.6395-6402.2002.

241. Sriwiriyarat, T. Effects of pH on extracellular polymeric substances compositions of biofilm in Integrated Fixed Film Activated Sludge process / T. Sriwiriyarat, P. Nuchlek // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2022. – Vol. 19. – P. 73–84. – DOI: 10.1007/s13762-021-03316-z.

242. Tahir, U. Assessment of biodecolorization potentials of biofilm forming bacteria from two different genera for Mordant Black 11 dye / U. Tahir, S. Nawaz, U.H. Khan, A. Yasmin // *Bioremediation Journal*. – 2021. – Vol. 25, № 3. – P. 252–270. – DOI: 10.1080/10889868.2021.1911920.

243. Rath, S. Variable pH and subsequent change in pCO₂ modulates the biofilm formation, synthesis of extracellular polymeric substances, and survivability of a marine bacterium *Bacillus stercoris* GST-03 / S. Rath, K. Palit, S. Das // *Environmental Research*. – 2022. – Vol. 214. – Article 114128. – DOI: 10.1016/j.envres.2022.114128.

244. Al-Kahachi, R. Effects of genetic and environmental variables on biofilm development dynamics in *Achromobacter mucicolens* / R. Al-Kahachi, S. Al-Asadi, Z.O. Ali, J. Rampurawala // *Iranian Journal of Microbiology*. – 2023. – Vol. 15, № 3. – P. 414–424. – DOI: 10.18502/ijm.v15i3.12902.

245. Chakraborty, I. Removal of sodium dodecyl sulphate from wastewater and its effect on anodic biofilm and performance of microbial fuel cell / I. Chakraborty, G.D. Bhowmick, D. Nath, C.N. Khuman, B.K. Dubey, M.M. Ghangrekar // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2021. – Vol. 156. – Article 105108. – DOI: 10.1016/j.ibiod.2020.105108.

246. Gill, S.P. Synthetic and biological surfactant effects on freshwater biofilm community composition and metabolic activity / S.P. Gill, W.R. Hunter, L.E. Coulson, I.M. Banat, J. Schelker // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 106. – P. 6847–6859. – DOI: 10.1007/s00253-022-12179-4.

247. Fedeila, M. Biodegradation of anionic surfactants by **Alcaligenes faecalis** 2, **Enterobacter cloacae** and **Serratia marcescens** strains isolated from industrial wastewater / M. Fedeila, Z. Hachaïchi-Sadouk, L.F. Bautista, R. Simarro, F. Nateche // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – Vol. 163. – P. 629–635. – DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.123.

248. Sarioglu, O.F. Evaluation of contact time and fiber morphology on bacterial immobilization for development of novel surfactant degrading nanofibrous webs / O.F. Sarioglu, A. Celebioglu, T. Tekinay, T. Uyar // *RSC Advances*. – 2015. – Vol. 5, № 124. – P. 102750–102758. – DOI: 10.1039/C5RA20739H.

249. Хасанова, А.А. Влияние физико-химических факторов среды на устойчивость бактериальных биопленок на основе микробных сообществ активного ила / А.А. Хасанова, Е.В. Перушкина, А.С. Сироткин // *Известия*

вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2024. – Т. 15, № 4. – С. 535–547. – DOI: 10.21285/achb.1010.

250. Branda, S.S. Biofilms: the matrix revisited / S.S. Branda, Å. Vik, L. Friedman, R. Kolter // *Trends in Microbiology*. – 2005. – Vol. 13, № 1. – P. 20–26. – DOI: 10.1016/j.tim.2004.11.006.

251. Vlamakis, H. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community / H. Vlamakis, C. Aguilar, R. Losick, R. Kolter // *Genes & Development*. – 2008. – Vol. 22, № 7. – P. 945–953. – DOI: 10.1101/gad.1645008.

252. Zhukova, N.V. Biofilm formation by monocultures and mixed cultures of **Alcaligenes faecalis** 2 and **Rhodococcus ruber** GT1 / N.V. Zhukova, A.Y. Mironov, I.N. Mitskevich // *Microbiology*. – 2019. – Vol. 88, № 2. – P. 164–171. – DOI: 10.1134/S0026261719020140.

253. Larkin, M.J. Biodegradation by members of the genus **Rhodococcus**: biochemistry, physiology, and genetic adaptation / M.J. Larkin, L.A. Kulakov, C.C.R. Allen // *Advances in Applied Microbiology*. – 2006. – Vol. 59. – P. 1–29. – DOI: 10.1016/S0065-2164(06)59001-X.

254. Lories, B. Biofilm bacteria use stress responses to detect and respond to competitors / B. Lories, S. Roberfroid, L. Dieltjens, D. De Coster, K.R. Foster, H.P. Steenackers // *Current Biology*. – 2020. – Vol. 30, № 7. – P. 1231–1244.e4. – DOI: 10.1016/j.cub.2020.01.065.

255. Perez, J. Conditions for partial nitrification in biofilm reactors and a kinetic explanation / J. Perez, E. Costa, J.-U. Kreft // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2009. – Vol. 103, № 3. – P. 419–430. – DOI: 10.1002/bit.22249.

256. Jiang, Y. Simultaneous biological nitrogen and phosphorus removal with a sequencing batch reactor–biofilm system / Y. Jiang, P. Zhao, L. Fan, G. Liu, B. Hu // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2015. – Vol. 103. – P. 221–228. – DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.02.019.

257. Adhena, A.W. Application of membrane-aerated biofilm reactor in removing water and wastewater pollutants: Current advances, knowledge gaps and

research needs – A review / A.W. Adhena // *Environmental Challenges*. – 2022. – Vol. 8. – Article 100529. – DOI: 10.1016/j.envc.2022.100529.

258. Thompson, I.P. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection / I.P. Thompson, C.J. van der Gast, L. Ciric, A.C. Singer // *Environmental Microbiology*. – 2005. – Vol. 7, № 7. – P. 909–915. – DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x.

259. Gianfreda, L. Potential of extracellular enzymes in remediation of polluted soils: a review / L. Gianfreda, M.A. Rao // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – Vol. 35, № 4. – P. 339–354. – DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.05.006.

260. Top, E.M. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds / E.M. Top, D. Springael // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2003. – Vol. 14, № 3. – P. 262–269. – DOI: 10.1016/S0958-1669(03)00066-1.

261. Weber, V. Comparing the effect of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on the ability of moderately halophilic bacteria to treat wastewater / V. Weber, I. Kamika, M.N.B. Momba // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – Article 16969. – DOI: 10.1038/s41598-021-96413-5.

262. Shi, J. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study / J. Shi, B. Podola, M. Melkonian // *Journal of Applied Phycology*. – 2007. – Vol. 19, № 4. – P. 417–423. – DOI: 10.1007/s10811-006-9148-1.

263. Rehfuss, M. *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov., a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor / M. Rehfuss, J. Urban // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2005. – Vol. 28, № 5. – P. 421–429. – DOI: 10.1016/j.syapm.2005.02.003.

264. Wang, C. Phosphorus-rich biochar modified with *Alcaligenes faecalis* to promote U(VI) removal from wastewater: interfacial adsorption behavior and mechanism / C. Wang, G. Wang, S. Xie, Z. Dong, L. Zhang, Z. Zhang, J. Song, Y.

Deng // Journal of Hazardous Materials. – 2023. – Vol. 454. – Article 131484. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.131484.

265. СП 32.13330.2018. Канализация. Наружные сети и сооружения. Актуализированная редакция СНиП 2.04.03-85. – М.: Минстрой России, 2018. – 132 с.

266. Лыжина, Н.В. Экономическое обоснование курсовых и дипломных проектов: методические указания / Н.В. Лыжина, Ю.В. Пантелеева; Министерство образования и науки Российской Федерации, Казанский национальный исследовательский технологический университет. – Казань: КНИТУ, 2013. – 89 с.

267. Барышев, Ю.Н. Бизнес-план для обоснования дипломных проектов и работ: методические указания для технико-экономических расчетов / Ю.Н. Барышев, Е.П. Логинова; Казанский государственный технологический университет. – Казань: КГТУ, 2001. – 43 с.

268. Тарасова, Н.П. Оценка воздействия промышленных предприятий на окружающую среду / Н.П. Тарасова, Б.В. Ермоленко, В.А. Зайцев, С.В. Макаров. – Москва: Лаборатория знаний, 2015. – 233 с. – ISBN 978-5-9963-2588-7.

269. СанПиН 2.1.4.1074–01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества: санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. – Введ. 2002-01-01. – М.: Минздрав России, 2002. – 103 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ДОГОВОР (СОГЛАШЕНИЕ) № 17133ГУ/2021

о предоставлении гранта на выполнение научно-исследовательских работ и оценку перспектив коммерческого использования результатов в рамках реализации инновационного проекта

г. Москва

15 декабря 2021 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям), далее именуемое «Фонд», в лице заместителя генерального директора Микитаса Андрея Владимировича, действующего на основании доверенности от 01.03.2021 г. с одной стороны, и граждан Российской Федерации Хасанова Айгуль Айратовна, далее именуемый «Грантополучатель», с другой стороны, совместно именуемые в дальнейшем «Стороны», заключили настоящий Договор (Соглашение), именуемый в дальнейшем «Соглашение», о нижеследующем:

1. Предмет Соглашения

1.1. Фонд выделяет денежные средства (далее – «Грант») на условиях, указанных в настоящем Соглашении, для финансирования выполнения научно-исследовательских работ (НИР) и оценки перспектив коммерческого использования результатов НИР (далее – «Работы») по теме «Разработка уникальной методики диагностики фосфатаккумулялирующей способности активного ила в технологии очистки сточных вод» победителя конкурса «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК»).

1.2. Грантополучатель принимает Грант от Фонда на реализацию Соглашения и выполняет Работы.

1.3. Основанием для заключения Соглашения на выполнение данной работы является: Протокол заседания дирекции Фонда содействия инновациям №7 от 3 декабря 2021 г.

1.4. Исполнение Соглашения осуществляется за счет бюджетных ассигнований в виде субсидий, предоставляемых из средств Федерального бюджета, на основании Федерального закона Российской Федерации о федеральном бюджете на соответствующий финансовый год.

1.5. Итогом сотрудничества Сторон по Соглашению должны стать научно-технические результаты, заявленные Грантополучателем в Заявке при подаче документов на участие в Конкурсе, проводимом Фондом.

1.6. Предусмотренные Соглашением Работы выполняются Грантополучателем в соответствии с техническим заданием (Приложение №1) и календарным планом (Приложение №2), являющимися неотъемлемой частью Соглашения.

2. Сроки исполнения Работ

2.1. Грантополучатель обязуется в течение 25 месяцев со дня подписания Соглашения выполнить Работы и представить в Фонд документы, подтверждающие выполнение вышеуказанных Работ.

2.2. Содержание и сроки выполнения основных этапов Работ определяются календарным планом (Приложение №2), являющимся неотъемлемой частью Соглашения.

Документ подписан УКЭП
Серийный номер:
034D3BF10082ADCDB44125B79F05BC389F
Владелец: ФОНД СОДЕЙСТВИЯ ИННОВАЦИЯМ
Поляков Сергей Геннадьевич
Действие сертификата: с 12.08.2021 по 22.08.2022

Документ подписан УКЭП
Серийный номер:
03384B720000AE5F884BBA5A3F76815B7
Владелец: Хасанова Айгуль Айратовна
Действие сертификата: с 16.12.2021 по 16.12.2022

