

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

На правах рукописи



КОБЕЛЕВ АЛЕКСЕЙ ВИТАЛЬЕВИЧ

**АГРЕГАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА
ПОД ВЛИЯНИЕМ ЛЕКТИНСОДЕРЖАЩИХ СРЕД
В ТЕХНОЛОГИЯХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
д.т.н., профессор Сироткин А.С.

Казань – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 5 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 12 |
| 1.1 Лектины: основные понятия и определения | 12 |
| 1.1.1 Классификация лектинов | 13 |
| 1.2 Свойства лектинов | 16 |
| 1.3 Области использования лектиновой активности | 18 |
| 1.4 Биопленки. Структура и состав | 21 |
| 1.4.1 Формирование биопленок | 22 |
| 1.4.2 Роль лектинов в формировании биопленок | 31 |
| 1.5 Микробные агрегаты в процессах биологической очистки сточных вод | 33 |
| 1.6 Преимущества агрегированных форм микробных сообществ | 38 |
| 1.7 Роль и перспективы использования лектинов в биотехнологиях очистки сточных вод | 41 |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ | 43 |
| 2.1 Объекты исследований | 43 |
| 2.2 Методы исследования | 44 |
| 2.2.1 Определение активности лектинов | 45 |
| 2.2.2 Количественное определение белка | 45 |
| 2.2.3 Культивирование биоплёнок бактериальных культур | 46 |
| 2.2.4 Оценка развития биопленки с использованием красителя генцианвиолета | 46 |
| 2.2.5 Выделение изолятов активного ила | 47 |
| 2.2.6 Молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов | 47 |
| 2.2.7 Исследование характеристик активного ила | 49 |
| 2.2.8 Выделение внеклеточных лектинов из биологически очищенной сточной воды | 50 |
| 2.3 Статистическая обработка результатов | 50 |
| ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР И ЕЁ ВЛИЯНИЕ НА | 51 |

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК

| | |
|---|----|
| 3.1 Исследование внеклеточных бактериальных лектинов в процессах агглютинации клеток | 51 |
| 3.2 Изучение биосинтеза внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования <i>Bacillus subtilis</i> 534 | 53 |
| ГЛАВА 4. ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ МИКРОБНЫХ ПЛЕНОК ПОД ВЛИЯНИЕМ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР | 56 |
| 4.1 Экспериментальная оценка влияния внеклеточных лектинов на образование бактериальных биопленок | 56 |
| ГЛАВА 5. ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К АГРЕГАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АКТИВНОГО ИЛА | 59 |
| 5.1 Культурально-морфологические свойства выделенных изолятов | 59 |
| 5.2 Лектин-углеводное взаимодействие выделенных изолятов | 62 |
| 5.3 Физиолого-биохимические свойства изолятов A2 и BS1 и идентификация микроорганизмов в их составе | 63 |
| 5.4 Биосинтез внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования изолята BS1 | 65 |
| ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНСОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД НА ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТИВНОГО ИЛА | 67 |
| 6.1 Седиментация активного ила под действием культуральной жидкости изолята BS1 | 67 |
| 6.2 Влияние культуральной жидкости изолята BS1 на дегидрогеназную активность ила | 72 |
| 6.3 Влияние биологически очищенной сточной воды на седиментацию активного ила | 73 |
| 6.4 Техническое предложение в процесс биологической очистки коммунально-бытовых сточных вод с изменением объема возвратного активного ила | 76 |

| | |
|---|-----|
| 6.5 Расчет экономических показателей процесса изменения объема возвратного активного ила в технологиях очистки сточных вод | 80 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 83 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 85 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 87 |
| ПРИЛОЖЕНИЯ | 103 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В процессах очистки сточных вод ключевым является метод биологической очистки. В основе данного способа лежат процессы жизнедеятельности микроорганизмов в составе микробных агрегатов в виде взвеси – активный ил, и в виде прикрепленной биомассы – биопленки, использующих загрязняющие компоненты в качестве питательных веществ. Состав активного ила и биопленки напрямую зависит от концентрации и качества стоков, поступаемых в аэротенк или биофильтр.

Первым шагом к образованию микробных агрегатов, в частности, биопленок, является связывание микробных клеток с поверхностью субстрата (подложкой) и/или с поверхностью других клеток в популяции посредством адгезинов. К последним также относятся лектины, представляющие собой особую группу белков или гликопротеинов, которые способны высокоспецифично распознавать и обратимо связывать определенные углеводные структуры, не вызывая у них химических модификаций [1]. Такое свойство лектинов отличает их от ферментов и других белков и делает их уникальными инструментами в решении различных медико-биологических и биотехнологических задач [2].

Агрегирование микроорганизмов и формирование устойчивых микробных сообществ в структуре агрегатов являются важнейшими феноменами, определяющими эффективность технологического процесса очистки воды. В связи с этим исследование факторов агрегирования микроорганизмов остается чрезвычайно актуальным и перспективным для управления и развития технологий биологической очистки сточных вод.

Степень разработанности темы. В настоящий момент значительный интерес представляют исследования, направленные на использование различного биологического сырья в качестве природных коагулянтов. Cheah Y. T., Fakhira Y. C. B. H., Derek C.J.C показали применение порошка из семян *Moringa oleifera* для улучшения качества сточных вод рыболовных хозяйств [3]. В этом процессе важную роль играли лектины, содержащиеся в семенах и выступающие в качестве природных

био-флокулянтов. Подобные работы также проводятся в Индии, где в качестве лектинсодержащего сырья используют семена клещевины *Ricinus communis* [4].

В литературе имеются отдельные сведения по выявлению роли и использованию лектинов бактериального происхождения и лектинсодержащих сред в технологиях биологической очистки для повышения эффективности процесса очистки. В частности, Chul Park и John T. Novak [5] провели анализ экзополимеров, выделенных из активного ила, с оценкой их лектиновой активности и выявлением роли лектинов в составе экзополимеров в процессах агрегации и биофлокуляции активного ила.

Тем не менее, результаты анализа литературы показали, что роль бактериальных лектинов в составе внеклеточных полимеров в процессах биологической очистки сточных вод недостаточно изучена и, в силу большого прикладного значения данной тематики, необходимыми являются целенаправленные исследования, в том числе с формулировкой технических предложений по модернизации систем биологической очистки сточных вод с учетом роли лектинов как природных флокулянтов в составе биологических сред.

Цель работы состоит в исследовании процесса формирования микробных агрегатов – флокул активного ила и/или биопленки под влиянием лектинсодержащих биологических сред (ЛСБС) для разработки технологических предложений по повышению эффективности процесса биологической очистки сточных вод.

Задачи, решаемые в работе:

1. Определить лектиновую активность культуральной жидкости (КЖ) модельных штаммов культур, являющихся представителями сообщества активного ила, на способность к агглютинации клеток различной природы.
2. Проанализировать накопление внеклеточных лектинов в КЖ на различных этапах периодического культивирования культуры *Bacillus subtilis* 534.
3. Оценить влияние лектиновой активности КЖ отдельных бактериальных культур (*Bacillus subtilis* 534, *Escherichia coli* М-17) на формирование микробных биопленок с использованием специфических красителей.

4. Получить изоляты активного ила очистных сооружений, исследовать их культурально-морфологические свойства и провести молекулярно-генетическую идентификацию перспективных изолятов.

5. Экспериментально оценить лектиновую активность КЖ выделенных культур, и накопление внеклеточных лектинов в составе КЖ в процессе периодического культивирования выделенных изолятов.

6. Оценить эффективность использования ЛСБС (КЖ изолята BS1, биологически очищенной сточной воды (БОСВ)) в качестве природных флокулянтов и сформулировать технические предложения по реализации процесса биологической очистки сточных вод в аэротенках, связанные с определением рециркулирующего расхода БОСВ для эффективного осаждения активного ила.

Научная новизна работы

Определены закономерности накопления внеклеточных лектинов в КЖ бактерий *Bacillus sp.* (изолят BS1) в процессе культивирования с получением образцов биопленки. Максимальная лектиновая активность (титр гемагглютинации (НА) = 8 ед.) отмечена во второй половине экспоненциальной – начале стационарной фазы микробного роста.

Получен ряд новых научных результатов по влиянию КЖ изолята BS1 и БОСВ на агрегацию хлопьев активного ила. Показана прямо пропорциональная зависимость между лектиновой активностью вносимых ЛСБС и условным диаметром хлопья (УДХ) активного ила (увеличение до 280 %), а также скоростью седиментации хлопьев активного ила (увеличение до 118 %).

Определены количества ЛСБС – КЖ изолята BS1 (0,25 % от объема активного ила) и БОСВ (5-10 % от объема активного ила) для повышения скорости седиментации активного ила на 118 % и 20 %, соответственно, при культивировании микробных агрегатов (биопленки и хлопьев активного ила) в процессах биологической очистки сточных вод.

Теоретическая значимость работы заключается в анализе отечественной и зарубежной литературы по характеристике и определению свойств лектинов и их роли в процессах агрегации микроорганизмов в сообществах активного ила,

био пленки и хлопьев активного ила, определению основных направлений применения и преимуществ использования ЛСБС в технологиях очистки сточных вод.

Практическая значимость

Разработаны научно-практические основы использования лектинсодержащих биологических сред в качестве природных флокулянтов для интенсификации процесса осаждения активного ила в технологиях биологической очистки сточных вод.

Разработаны технологические рекомендации по повышению эффективности процесса биологической очистки коммунально-бытовых сточных вод г. Зеленодольск от взвешенных веществ, улучшению седиментации активного ила с определением дозировки (570 м³/ч) БОСВ (возвратного ила). Суммарная величина снижения затрат на очистку сточных вод объемом 1300 м³/ч, в среднем, может достигать около 1,181 млн. рублей в год за счет снижения затрат на потребления электроэнергии насосами, а также за счет снижения НДС и предотвращенного экологического ущерба окружающей среде.

Получен акт о намерении внедрения результатов диссертационной работы от АО «Зеленодольск-Водоканалсервис» (г. Зеленодольск) по изменению объема возвратного активного ила, обеспечивающего повышение скорости седиментации во вторичном отстойнике до 20 % (Приложение А).

Методология и методы исследования. В работе использованы классические методы, применяемые в микробиологии (выделение, культивирование и анализ свойств полученных изолятов и бактериальных агрегатов), биохимии (оценка лектиновой и дегидрогеназной активности; выделение и определение концентрации белка), генетике (молекулярно-генетическая идентификация гена 16S рРНК микроорганизмов) а также технические методы для оценки характеристик активного ила (анализ процесса седиментации активного ила; расчет значения илового индекса).

Положения, выносимые на защиту:

1. КЖ всех исследуемых бактериальных культур проявляет лектиновую активность. Для культур *Bacillus sp.* (*Bacillus subtilis* 534, изолят BS1) максимальная

лектиновая активность (титр НА = 4 и 8 ед., соответственно) отмечена во второй половине экспоненциальной – начале стационарной фазы роста культуры.

2. Внесение КЖ *B. subtilis* 534 и *E. coli* М-17 в качестве источника внеклеточных лектинов в среду культивирования изолята фосфатаккумуляирующих микроорганизмов (ФАО) увеличивает способность клеток к образованию биопленок на 15 % и 10 %, соответственно.

3. Внесение лектинсодержащих биологических сред (КЖ изолята BS1, БОСВ) в суспензию активного ила обеспечивает увеличение УДХ активного ила до 280 % и, как следствие, повышение эффективности его седиментации до 118 % по сравнению с контролем.

4. Внесение КЖ изолята BS1 (0,25 % от объема активного ила) повышает, в среднем, значение дегидрогеназной активности микроорганизмов активного ила на 7%.

5. Уменьшение количества возвратного активного ила в аэротенке с 750 м³/ч до 570 м³/ч (или на 24 %), что соответствует среднечасовому расходу возвратного активного ила, равному 5% от объема аэротенка, при прочих неизменных условиях процесса очистки, может обеспечить повышение эффективности осаждения активного ила до 20 %, снижение илового индекса на 10 %, увеличение времени пребывания сточной воды в аэротенке на 10%, а также снижение затрат электроэнергии на перекачку возвратного ила.

Достоверность результатов исследования обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных результатов, использованием комплекса стандартизированных методик их аналитического контроля и анализа, а также современных методов и оборудования для проведения экспериментальных работ.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на конкурсе научных работ «Жить в XXI веке – 2019», посвященному Международному году Периодической таблицы химических элементов (Казань, 2019 г.), на XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии», посвященной 150 – летию Периодической таблицы химических элементов (Казань, 2019 г.), на XIII Всероссийской научной интернет-конференции

«Интеграция науки и высшего образования в области био- и органической химии и биотехнологии» (Уфа, 2019 г.), на Всероссийской научной конференции (с международным участием) преподавателей и студентов вузов «Актуальные проблемы науки о полимерах» (Казань, 2020 г.), на конкурсе научных работ «Жить в XXI веке – 2020» (Казань, 2020 г.), на VII международной конференции молодых ученых OpenBio (Новосибирск, 2020 г.), на Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых ОГУ имени И.С. Тургенева «Горизонты биотехнологии» (Орел, декабрь 2020 г.), на XXXIII зимней международной молодёжной научной школе (Москва, 2021 г.), на XV международной конференции «Кирпичниковские чтения» (Казань, 2021 г.), на XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2022 г.), на VII Пушинской конференции «Биохимия, физиология, и биосферная роль микроорганизмов», на конкурсе научных работ «Жить в XXI веке – 2022» (Казань, 2022 г.), на XVIII Международном форуме - конкурсе студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы недропользования» (Санкт-Петербург, 2022 г.), на XVIII Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием «Пищевые технологии и биотехнологии» (Казань, 2023 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки России для размещения материалов диссертаций, в том числе 1 из них – в журнале, включенном в международную базу данных Web of Science, 2 статьи в российских журналах (РИНЦ), 15 публикаций по материалам докладов на всероссийских и международных конференциях.

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 создание систем биокомпостирования различных отходов, очистки техногенных

отходов (сточных вод, газовых выбросов и др.), создание замкнутых технологических схем микробиологического производства, последние с учетом вопросов по охране окружающей среды.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 107 страницах машинописного текста, включает 25 рисунков, 17 таблиц, 2 приложения. Состоит из введения, 6 глав, заключения и списка использованных источников литературы, включающего 149 наименований отечественных и зарубежных публикаций.

Личный вклад автора заключается в обсуждении целей и задач диссертации, постановки проблемы, выдвижением научных идей, разработкой стратегии исследования, организацией экспериментальной работы и непосредственным участием в ней, анализом и обсуждением полученных результатов, формулировании выводов, написании научных статей и представлении результатов и положений диссертации на конференциях.

Благодарности. Автор выражает благодарность профессору Сироткину Александру Семеновичу за научное руководство, аспиранту Клементьеву Святославу Владимировичу за помощь и сотрудничество в ходе проведения исследовательской работы, главному технологу биологических очистных сооружений г. Зеленодольск Сибиевой Линизе Марсовне за помощь в предоставлении необходимых данных и содействие в проведении экспериментальных исследований по изменению объема возвратного активного ила, за создание комфортных условий работы в процессе проведения опытно-промышленных испытаний, главному научному сотруднику института экологии и природопользования Казанского федерального университета Галицкой Полине Юрьевне за помощь в проведении процедуры идентификации бактериальных изолятов на основе анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, а также коллективу кафедры промышленной биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета за участие и оказание помощи на всех этапах выполнения диссертационной работы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лектины: основные понятия и определения

В настоящее время огромное внимание ученых уделяется исследованию лектинов – углеводсвязывающих белков – агглютининов. Эти гликопротеины, неиммуноглобулинового происхождения, способны к агглютинации клеток, и к избирательной преципитации углеводов. Они обнаружены во всех живых организмах, обладают широким диапазоном действий и выполняемых функций в живых организмах [6].

Впервые сведения о белках, обладающих гемагглютинирующей активностью, появились в 1888 г., благодаря работам немецкого ученого Г. Штильмарка. Его работы были посвящены изучению экстрактов семян клещевины обыкновенной *R. communis*, в которых он обнаружил токсическое вещество, оказывающее влияние на эритроциты в виде их агглютинации и гемолиза. Он назвал его рицином (от латинского названия растения) и описал метод его экстракции. Позднее в лаборатории Kobert, было показано, что экстракты семян четочника *Abrus precatorius* также проявляют гемагглютинирующую способность и содержат токсичный протеин [7].

Первые попытки охарактеризовать по общему свойству белки – гемагглютинины появились в 1954 г. в работах американского иммунолога В. Бойда. По его определению данные вещества называются лектинами и представляют собой белки, обладающие свойством избирательно связывать углеводы, не вызывая их химического превращения [8]. Наиболее точной формулировкой термина «лектин» на данный момент, является определение, данное Коцоуреком и Хорейши в 1983 г., о том, что лектины – это белки неиммуноглобулиновой природы, способные к специфическому распознаванию углеводов (гликозильных групп) и обратимому связыванию с ними без нарушения ковалентной структуры распознаваемых гликозильных лигандов [9].

В современной литературе имеются данные о том, что к лектинам можно отнести как поливалентные белки, способные агглютинировать клетки и преципитировать полисахариды и гликоконъюгаты, так и моновалентные белки растительного и бактериального происхождения, вызывающие токсичный эффект [10,11]. Также к лектинам можно отнести рецепторы транспорта углеводов, некоторые гормоны и ферменты углеводного обмена, обладающие углеводсвязывающими участками, которые не зависят от каталитического центра [12].

Современные методы выделения и очистки лектинов связаны с высаливанием белков с помощью различных солей и органических растворителей с последующим диализом либо обессоливанием и далее с реализацией различных типов хроматографии: аффинной, ионообменной, гель-фильтрационной, гидрофобной.

Наиболее интересным свойством лектинов является их углеводная специфичность – способность специфически связываться с углеводами, не нарушая при этом их химической структуры. Однако не для всех лектинов были определены углеводы, которые специфически связывались бы с ними [13].

В настоящее время препараты на основе растительных лектинов широко применяются в различных областях медицинских и биологических исследований, и это обусловлено широким спектром их углеводной специфичности, а также биологической активностью *in vivo* и *in vitro* [14]. Вследствие того, что лектины играют очень важную роль в современной науке, представляется необходимым поиск новых источников этих гликопротеинов.

1.1.1 Классификация лектинов

В настоящее время существует множество различных классификаций лектинов, согласно которым их характеристика проводится по следующим признакам [15, 16]:

- соотношение белка и углеводов в молекуле лектина;
- биологическая активность;
- источник, из которого они были выделены;
- количество функциональных и структурных доменов;

- специфичность по отношению к моно-, ди- и олигосахаридам;
- число углеводсвязывающих участков в молекуле лектина;
- антигенная специфичность в отношении эритроцитов и Т, Т4, Т8, Тi-лимфоцитов.

Наиболее важной является классификация лектинов по их углеводной специфичности, согласно которой лектины могут быть разделены на пять групп по моносахариду, к которому они обладают наибольшей специфичностью [17]: 1) глюкозе, маннозе; 2) галактозе, N-ацетил-D-галактозамину; 3) N-ацетил-D-глюкозамину; 4) L-фукозе; 5) сиаловым кислотам.

Наиболее полное представление о характеристике лектинов по их углеводной специфичности включает в себя классификация по последовательности аминокислот углеводсвязывающего белкового домена: лектины подразделяются на классы, различающиеся по клеточной локализации и типу углеводных лигандов [18]:

- 1) I-класс (расположены в клеточной мембране (КМ), специфичны к сиаловой кислоте и ее производным);
- 2) С-класс (расположены в КМ, также являются внеклеточными (ВНК), специфичны к разным углеводам);
- 3) Р-класс (расположены в секреторной системе, специфичны к маннозо-6-фосфату);
- 4) R-класс (расположены в аппарате Гольджи (АГ) и КМ, специфичны к разным углеводам);
- 5) Класс калнексинов (расположены в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), специфичны к глюкозе и маннозе);
- 6) L-класс (расположены в АГ, ЭР, промежуточных везикуло-тубулярных структурах, специфичны к разным углеводам);
- 7) М-класс (расположены в ЭР, специфичны к маннозе);
- 8) Класс фиколинов (расположены в КМ, ВНК, специфичны к GlcNAc, GalNAc);
- 9) S-класс (расположены в цитоплазме, ВНК, специфичны к β-галактозидам);

- 10) F-бох класс (расположены в цитоплазме, специфичны к $(\text{GlcNAc})_2$);
- 11) Класс интеллектинов (расположены в КМ, ВНК, специфичны к галактозе, галактофуранозе, пентозе);
- 12) Класс хитиназа-подобных лектинов (расположены ВНК, специфичны к хито-олигосахаридам);
- 13) F-класс (расположены ВНК, специфичны к олигосахаридам с терминальной фукозой).

Следует отметить, что лектины, представленные в разных классах, подразделяются на две функциональные группы, каждая из которых включает в себя лектины, отличающиеся по месту локализации углевод-связывающего домена (УСД) и выполняемых им функций. К первой группе относятся УСД, которые расположены в основном внутриклеточно и выполняют функции отбора, сортировки и доставки к цели гликопротеидов. Ко второй группе относятся УСД локализованные внеклеточно, либо секретируемые и/или расположенные на плазматических мембранах, принимающие участие в процессах межклеточного распознавания и адгезии [19].

Кроме того, согласно большому количеству работ, посвященных изучению лектинов различного происхождения, их можно разделить на 2 большие группы [20]:

- 1) экзолектины, способные связывать определенные моносахариды невосстанавливающихся концов в полисахаридах, ввиду чего агглютинация такими лектинами ингибируется низкими концентрациями свободных углеводов либо их метилгликозидов;
- 2) эндолектины, способные к распознаванию лишь сложных олигосахаридов, и ингибирование агглютинации этих лектинов возможно лишь с помощью специфических углеводных последовательностей.

1.2 Свойства лектинов

В настоящий момент большое количество работ по изучению свойств бактериальных лектинов связано с исследованием молекулярных основ патогенности энтеробактерий. Это связано с тем, что поверхностные гемагглютинины, например, агглютинины *Fusobacterium nucleatum* и *Yersinia pseudotuberculosis* обуславливают специфическую адгезию к клеткам хозяина, которая является началом инфекционного процесса [21-23], а пилийные агглютинины *E. coli* участвуют в маннозо-специфичной адгезии к поверхностям клеток [24]. То же можно сказать и о лектинах, продуцируемых бактериями *Pseudomonas aeruginosa* [25].

В адгезии могут принимать участие и лектины, находящиеся в бактериальных мембранах. Примером может служить мембранный лектиноподобный белок микоплазм, посредством которого последние прикрепляются к клеткам хозяина [26].

Важную роль лектины играют в жизнедеятельности азотофиксирующих микроорганизмов. Отличительной чертой гемагглютининов почвенных бактерий является их участие в прикреплении бактериальных клеток, например, *Bradyrhizobium japonicum* к корням соевых бобов [27, 28]. Удалось выделить агглютинины из *Rhizobium leguminosarum* и показать, что они принимают участие в прикреплении ризобий к корням проростков гороха [29]. Таким же свойством обладают поверхностные лектины *Azospirillum* в процессе адгезии на корнях [30].

Лектины бактерий могут обладать бактерицидными свойствами. Показано [31], что лектины *P. aeruginosa* РА-I и РА-II способны подавлять рост и размножение, как энтеробактерий, таких как *E. coli* O₂₈ и O₁₂, так и дрожжей *Candida albicans*. Для некоторых культур *Serratia* и *E. coli* O₈₆, В₇ отмечено частичное ингибирование жизнедеятельности. Это объясняется тем, что лектины на поверхности мембран клеток *P. aeruginosa* способствуют преодолению стрессовых ситуаций посредством взаимодействий клетка-субстрат и клетка-

клетка. Таким образом, лектины дают бактериям возможность приспособливаться к неблагоприятным условиям среды существования.

Сообщалось также [31], что бактерицидным действием обладают лектин *A. brasiliense* Sp7 и агглютинин *R. leguminosarum* 252. Наряду с этим ярко выраженными бактерицидными свойствами обладали лектины II и III бактерий *Paenibacillus polymyxa* 1460, которые были способны подавлять рост *B. subtilis* 36, *R. leguminosarum* 252 и *A. brasiliense* Sp7 [32].

В последнее время появляются работы, в которых имеются сведения о взаимодействии лектинов с ферментами. Механизмом служит образование белок-углеводных и белок-белковых взаимодействий, в том числе в присутствии ионов двухвалентных металлов. В таких комплексах ферменты повышают свою стабильность, приобретают более широкие рамки функциональности, а также могут, как ингибироваться, так и активироваться лектинами [33]. Полученные комплексы способны сохранять как лектиновую, так и ферментативную активность, что приводит к их ко-функциональности.

Экспериментально показано, что одной из важнейших функций лектинов различных организмов является опосредованная активация основных литических ферментов (протеаз, фосфотаз, гликозидаз и др.). Лектины могут изменять конформацию молекул-рецепторов и, тем самым, делают их доступными для влияния литических ферментов.

Так, агглютинины *R. leguminosarum* 252 способны увеличивать β -глюкозидазную, протеолитическую, сукцинатдегидрогеназную активность ферментов корней проростка гороха; кроме того, эти лектины могут изменять активность гидролитических ферментов в самой бактериальной клетке [34].

В современной литературе имеются данные о способности некоторых лектинов, обладающих токсическим действием, проявлять ферментативные свойства [35, 36]. Так, гемагглютинины *Vibrio cholera* обладают ферментативной активностью. Очищенный энтеротоксин *V. cholera* 01 кроме лектиновой активности проявлял и протеолитическую активность. Проявляемые виды активности тесно связаны друг с другом, так как для проявления лектиновой

активности необходимо наличие протеолитической [36, 37]. Таким же образом, в культуральной жидкости *V. mimicus* обнаружен внеклеточный токсин, обладающий протеазной активностью, идентичный по иммунологическому анализу и субъединичной структуре токсину *V. cholera* 01 [38].

В современной литературе имеются обширные сведения о лектинах и агглютинаинах, которые продуцируются микроорганизмами. В основном, эти работы посвящены обнаружению, выделению и изучению физико-химических свойств очищенных белков. Однако к настоящему времени остаются недостаточно изученными биологические свойства бактериальных лектинов во взаимодействии с окружающей средой, в межклеточном взаимодействии и клеточном транспорте.

1.3 Области использования лектиновой активности

Одной из важнейших областей использования лектинов является современная фармацевтика и поиск новых лекарств и диагностических средств на основе адресного использования животного и растительного сырья, содержащего лектины [39].

В настоящий момент основными направлениями практического применения лектинов в этой области являются [40]:

- разделение и очистка углеводсодержащих биомолекул, основанные на различиях в их углеводном составе, изучении структуры углеводной части биомолекул;
- изучение реакции гемагглютинации лектинами клеток крови человека и животных, микроорганизмов, вирусов, простейших;
- изучение воздействия лектинов на клеточный метаболизм;
- исследование структуры и функций клеточной мембраны в нормальном и патологическом состоянии под воздействием лектинов;
- изучение биологических свойств лектинов в живых организмах.

Перспективными представляются методы применения лектинов для очистки, разделения и обогащения фракций плазматических мембран, вирионов, лизосом, мембран аппарата Гольджи, протопластов ряда клеток. Также лектины используют для получения рецепторных белков путем лизиса или механического

разрушения иммобилизованных протопластов, фракционирования субпопуляций клеток по их антигенным свойствам и их иммобилизации [40-42].

Иммобилизованные лектины применяются для очистки и разделения гликоконъюгатов с близкими физико-химическими свойствами: рецепторов, гормонов, ферментов, иммуноглобулинов, гликопептидов, гликолипидов, протеогликанов, поли- и олигосахаридов, их производных и комплексов [8], используются в качестве носителя клеток дрожжей [43], лимфоцитов [44] или бактерий [45].

Применение вышеперечисленных методов возможно, благодаря сродству лектинов к мембранносвязанным гликоконъюгатам [46]. Лектины патогенных микроорганизмов способны проявлять не только гемагглютинирующую активность, но и являются ответственными антигенами за инфекционный процесс, благодаря чему становится возможным применение препаратов лектинов микроорганизмов в качестве вакцин [47].

Лектины способны активировать большое количество разных биомолекул. В частности, имеются данные, что олигосахариды бактерий стимулируют образование клубеньков в корнях клевера и гороха [40].

Сообщается [48] о том, что меченные лектины с успехом используются при изучении углеводов на поверхности клеточных мембран, а также позволяют отслеживать стадии изменения мембран клетки при злокачественном перерождении.

Лектины успешно применяются в качестве биоэффекторов: митогенов, иммуномодуляторов, фузогенов, трансформантов клеток, адгезинов, стабилизаторов, активаторов и ингибиторов флокулянтов и дефлокулянтов *in vivo* и *in vitro*, а также для получения высокоспецифичных углеводных зондов [7, 48]. Имеются сведения о применении лектинов в генной инженерии для получения супергомогенных биоэффекторов в препаративных количествах с заранее заданными свойствами путем клонирования генов лектинов в кишечной палочке [50].

Вызывает интерес применение лектинов в белковой инженерии. Проведен ряд исследований, описывающих использование лектинов в терапии опухолей, лизосомных и других болезней путем изучения гибридизации субъединиц лектиновых молекул с антителами, факторами роста и другими эффекторами для

получения многофункциональных конъюгатов [51], а также в решении проблемы доставки лекарств в клетки путем использования лектинов в направленном воздействии на лизосомы [52].

Отдельный интерес вызывает изучение применения лектинов в очистке сточных вод. Так, было показано (рисунок 1.1) [4], что внесение 0,5 грамм измельченных семян клещевины в сточные воды в соотношении 1:50 приводило к уменьшению цветности на 80 %, общего количества растворенных веществ на 75 %, химического потребления кислорода (ХПК) сточных вод на 80 %, а также изменению pH с 3,7 до 5,2.

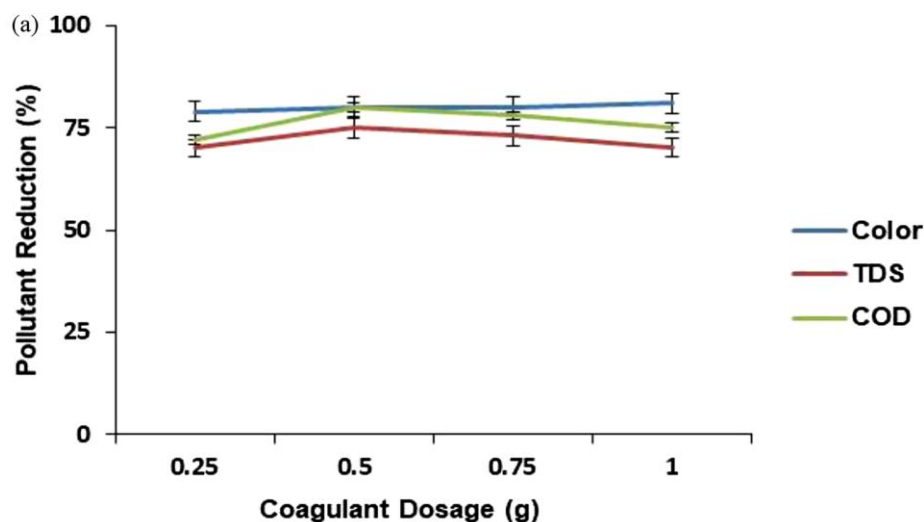


Рисунок 1.1 – (а) Влияние измельченных семян *R. communis* L. вносимых в различных концентрациях на уменьшение цветности (Color), общего количества растворенных веществ (TDS) и ХПК (COD) в сточной воде, полученной после варки кофейной вишни; (б) Наглядное изображение уменьшения цветности у сточных вод кофе при внесении измельченных семян *R. communis* L. [4]

Имеются данные [3] о применении порошка из семян *M. oleifera* в качестве био-флокулянта для очистки сточных вод рыбных ферм. Полученные результаты показали уменьшение на 30 % общих взвешенных частиц, содержание аммиака, общего количества летучих твердых веществ и содержание фосфатов, по сравнению, с контролем.

Таким образом, можно сделать вывод о возможности применения лектинов, в качестве био-флокулянтов, для удаления загрязняющих веществ из сточных вод, а также применения в качестве альтернативного экологически чистого флокулянта и замены синтетических аналогов.

Применение подобных катионных белков – «лектинов» в очистке сточных вод, является важным звеном для понимания процессов био-флокуляции в активном иле, а также формирования биопленок в биофильтрах.

1.4 Биопленки. Структура и состав

В настоящий момент, изучение биопленок уже длительное время вызывает огромный интерес в научном мире. Биопленки – это структурированные сообщества бактериальных клеток, состоящие из одного или нескольких видов, заключенные в ими же синтезированные полимерные матрицы и прикрепленные к различным поверхностям [53, 54-57].

Формирование биопленок является основным механизмом выживания микроорганизмов в окружающей среде, обеспечивая защиту от воздействия окружающей среды, простейших, ультрафиолета и обеспечивая стабильную среду для бактерий, находящихся в структуре полимерного матрикса [58, 59]. В составе биопленок бактериальные клетки обладают высокой толерантностью к антибиотикам и дезинфицирующим химическим веществам и проявляют резистентность к иммунной системе хозяина. Микроорганизмы, в структуре матрикса биопленки, осуществляют генетическую регуляцию, путем направленной экспрессии генов, которая обуславливает персистенцию и патогенез инфекций [60-63].

Бактериальные биопленки распространены повсеместно и присутствуют в различных условиях окружающей среды: от локализованной среды, встречающейся внутри млекопитающих-хозяев, до экстремальных условий, таких как горячие источники и глубоководные впадины (океанические жёлоба). Таким образом, условия, которым подвергается биопленка, варьируются от различных температур, pH, уровней O₂, гидродинамики, осмолярности, а также присутствия питательных веществ и факторов, которые могут быть получены из биотической среды.

1.4.1 Формирование биопленок

В настоящее время показано, что микроорганизмы в условиях окружающей среды в основном, существуют в виде смешанных видовых культур, формируя биопленки, представляющие собой альтернативный образ жизни, при котором микроорганизмы принимают многоклеточное поведение, которое облегчает и/или продлевает выживание в различных экологических нишах. В биопленке бактерии основную часть времени развития и размножения находятся в матриксе, что отличает прикрепленные клетки по физиологическим свойствам от клеток того же вида, находящихся во взвешенном в среде состоянии (англ. *planktonic state*) - планктонном [64, 65].

Формирование биопленок подразделяется на несколько стадий (рисунок 1.2) [66]. На начальной стадии микробные клетки прикрепляются к поверхности подложки или субстрата путем адгезии либо адсорбции из окружающей среды (чаще всего жидкости). Эта стадия является обратимой, так как прикрепленные клетки могут вернуться к планктонной форме существования.

На прикрепление микроорганизмов к различным поверхностям влияет ряд факторов: вид бактерий, структура поверхности, доступность питательных веществ, гидродинамика взаимодействий, межклеточная коммуникация и механизмы клеточного контроля. Например, прикрепление к неорганическим поверхностям обусловлена электростатическими, гидрофобными и ван-дер-

ваальсовыми силами, в то время как адгезия к биологическим объектам опосредована различными адгезинами (например, лектинами).

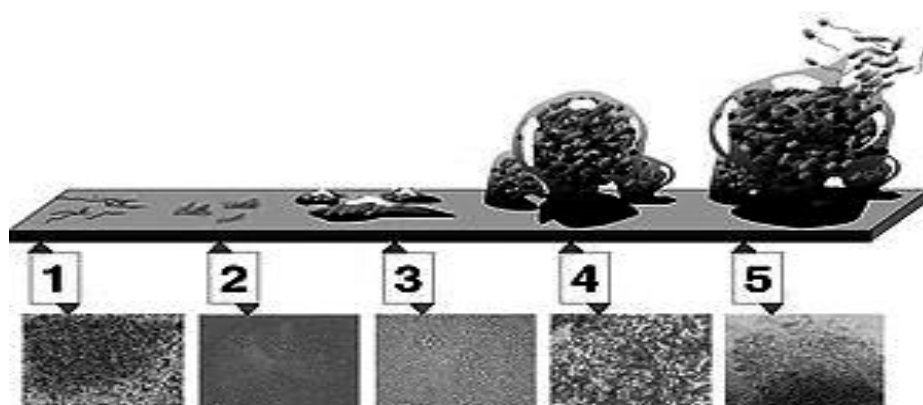


Рисунок 1.2 – Стадии развития биопленки: 1) первичное прикрепление микроорганизмов; 2) окончательное (необратимое) прикрепление микроорганизмов; 3) созревание биопленки; 4) зрелая биопленка; 5) дисперсия (выброс бактерий) [66]

На следующей стадии (второй), прикрепленные клетки выделяют внеклеточные полимеры (полисахариды), которые обеспечивают прочную адгезию с поверхностью, что вызывает окончательное (необратимое) прикрепление.

Синтезированные полисахаридные матриксы обеспечивают фиксацию бактериальных клеток в структуре биопленки, защищают микроорганизмы от неблагоприятных условий окружающей среды и антибиотиков, играют важную роль в получении и сохранении питательных веществ в матриксе биопленки. В зависимости от условий окружающей среды или генетической регуляции, бактериальные клетки способны переходить от планктонной формы существования в прикрепленную (сессильную) и, наоборот [67, 68].

На третьей стадии происходит формирование микроколоний, представляющие собой активно растущие скопления бактериальных клеток в структуре матрикса биопленки. Развитие микроколоний обеспечивается ростом и делением

прикрепленных клеток, либо включением свободноплавающих (планктонных) клеток из окружающей жидкости [66].

Следующая стадия (четвертая) формирования биопленки характеризуется фенотипическими изменениями, которые начинают происходить в микробных клетках. Подобные изменения происходят из-за обмена коммуникативными сигналами между микроорганизмами, запускающие генетическую регуляцию внутри матрикса биопленки, необходимую для формирования зрелой биопленки.

Сформированная зрелая биопленка обладает сложной трехмерной структурой, способной изменять свой размер и форму. Синтезируемый внеклеточный полисахаридный матрикс служит защитой клеток от внешних неблагоприятных факторов [66].

На заключительной стадии развития биопленки происходит дисперсия (выброс бактерий). Периодически, от зрелой биопленки происходит отрыв частиц бактериального матрикса в результате ряда факторов: снижения питательного субстрата и количества экзополимерных веществ, избыточной экспрессии лизирующих ферментов, а также межклеточного взаимодействия и механического влияние, проходящего через биопленку потока жидкости [66].

Существует два механизма, по которым происходит дисперсия клеток. Первый механизм является направленной генетической регуляцией (экспрессией генов), способствующей к точечному разрушению внеклеточного матрикса, с последующим высвобождением некоторой части sessильных клеток и их трансформации в планктонную форму, которая способна покидать биопленку.

Второй механизм, осуществляется путем физического отрыва некоторых фрагментов биопленки (микроколоний), которые отсоединяясь, переносятся потоком жидкости на новое место с целью формирования новой зрелой биопленки [59, 69].

Таким образом, биопленка представляет собой сложную трехмерную гетерогенную структуру, объединенную общим полисахаридным матриксом, способным успешно противостоять различным внешним неблагоприятным факторам.

В настоящий момент хорошо известно, что микробные биопленки в основном состоят из бактериальных клеток и полисахаридного матрикса,

окружающего их. Было показано [56, 61, 70, 71], что жизнеспособная зрелая биопленка представляет собой сложное биологическое образование со специализированной гетерогенной клеточной структурой, образованную микроколониями микроорганизмов в виде грибовидных или столбчатых трехмерных структур (15-20 % объема), заключенных во внешний полимерный матрикс и окруженных заполненными жидкостью каналами (75-85 % объема).

Синтезируемый микроорганизмами полисахаридный матрикс преимущественно состоит из воды (на 97 %). Его компонентами также являются полисахариды (декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза), липиды/фосфолипиды, нуклеиновые кислоты, белки, абсорбированные метаболиты и различные нутриенты [63, 71]. Состав внеклеточного матрикса, продуцируемого различными бактериями различен для каждого вида. [64, 73]. В целом, матрикс биопленки представляет собой пористую структуру, которая позволяет проходить низкомолекулярным соединениям, но задерживаться крупным молекулам, а также белкам и частицам окружающей среды. Экзогенная ДНК участвует в микробной адгезии, и межклеточных взаимодействиях между бактериями в биопленке [64].

Внутренний слой матрикса заполнен мембранными везикулами, содержащие различные ферменты (протеазы, щелочные фосфатазы и др.), способные вызывать лизис части бактериальных клеток, которые затем становятся источником ростовых факторов для других членов микробного сообщества. Все компоненты матрикса разделены каналами, по которым транспортируются питательные вещества, кислород и осуществляется выведение конечных продуктов метаболизма бактериальных клеток. Формирование и поддержание канала в активном состоянии обеспечивается особыми поверхностными структурами – рамнолипидами, состоящие из смеси экзополисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других веществ [63, 64, 74].

Структурная организация биопленки [75] изображена на рисунке 1.3.

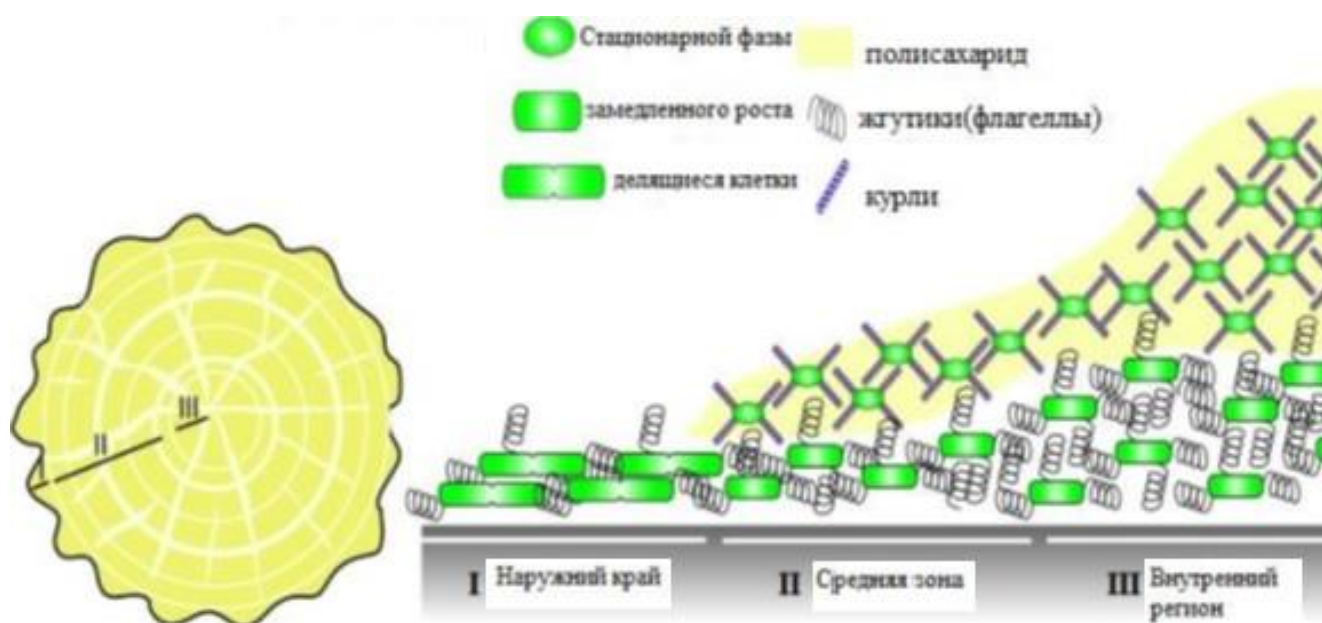


Рисунок 1.3 – Структурная организация биопленки [75]

Наиболее важным условием формирования зрелой биопленки является продукция экзополисахаридов. Они могут различаться по своей структуре и составу, однако, в основном, представлены бета-1,6-N-ацетил-D-глюкозамином и целлюлозой. Экзополисахариды могут составлять до 80 % от всего матрикса биопленки. Наиболее простым методом их изучения является визуализация иммунофлуоресцентным окрашиванием, с помощью специфических красителей, способных связываться с компонентами полисахаридов и целлюлозы [76].

В биопленке до 40 % от общего объема матрикса составляют белки [77]. Показано, что во многих биопленках основная часть белков представлена амилоидоподобными белками: курли (*curli*) волокна (CsgA/CsgB белки) у грамотрицательных бактерий и TasA/TapA-белки у бацилл (рисунок 1.3). Амилоидные группы в составе белка определяют его высокую термостабильность и адгезивную способность. Стоит отметить, что также выделяют ряд специфических белков, к которым относятся *bap*-семейства белков (biofilm-associated protein), лектины, углеводсвязывающие белки и ауто транспортеры. Эти белки играют важную роль в межклеточных контактах, адгезии по типу клетка-клетка и клетка-субстрат, а так же, способствуют связыванию полисахаридов в структуре биопленки [76].

Внеклеточная ДНК (eDNA) способна экскретироваться путем везикулярного транспорта, однако основным способом ее выделения в матрикс является лизис клеток. Она участвует в горизонтальном переносе генов в биопленке и в передаче сигналов между клетками, играет структурную роль и служит мишенью для экзонуклеаз. Суммарное содержание внеклеточной ДНК в матриксе биопленки невелико.

Соотношение количества матрикса и клеток в биопленке может сильно варьироваться. Считается, что в некоторых случаях клетки могут занимать лишь 10 % по объему биопленки. Клетки в биопленках могут находиться на разных стадиях клеточного цикла. Таким образом, отмершие и разрушившиеся клетки также входят в состав биопленки [76].

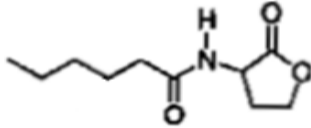
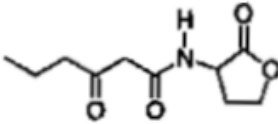
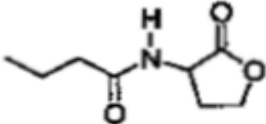
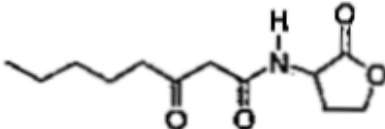
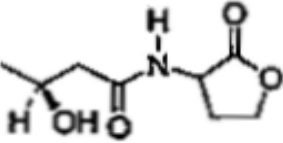
Система регуляции межклеточных сигналов бактериальных клеток в составе биопленки получила название Quorum sensing (QS) (чувство кворума) [76, 78, 79]. Благодаря QS в биопленке происходит контроль плотности популяции, путем совместного реагирования бактериальных клеток (синхронное изменение экспрессии генов) для достижения определенных целей, таких как устойчивость к противомикробным препаратам, синтез фактора вирулентности, колонизация биопленки и т. д. [80-82].

Известны три основные системы QS, отличающиеся друг от друга природой сигнальных молекул – аутоиндукторов. Одна из них используется преимущественно грамотрицательными бактериями, другая – грамположительными, третья является универсальной для всех микроорганизмов [60, 79].

Система QS у грамотрицательных бактерий активирует продукцию аутоиндукторов (ацил-гомосерин-лактона (АГЛ)) (таблица 1.1) с помощью высококонсервативного белка LuxI, который способен свободно диффундировать через внутриклеточную мембрану и накапливаться в окружающей среде. Как только уровень АГЛ достигает определенного порогового уровня, эти молекулы диффундируют в клетку и связываются с активатором транскрипции LuxR. Комплекс LuxR-АГЛ дополнительно связывается с целевым промотором, который контролирует экспрессию гена, с целью активации процесса

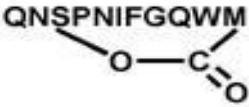
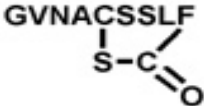
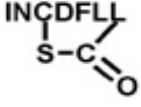
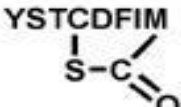
транскрипции. Активация регуляторных белков индуцирует создание микроорганизмами кластеров биоплёнки [61, 83, 84].

Таблица 1.1 – Структурные формулы некоторых АГЛ системы QS грамотрицательных бактерий [61, 83, 84]

| Вид | Ген | АГЛ | Структура АГЛ |
|----------------------------------|--------------|--|---|
| <i>P. chlororaphis</i> | <i>phzI</i> | N-гексаноил-гомосерин-лактон |  |
| <i>V. fischeri</i> | <i>luxI</i> | N-3-оксо-гексаноил-гомосерин-лактон |  |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>rhlI</i> | N-бутаноил-гомосерин-лактон |  |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | <i>traI</i> | N-3-оксо-октаноил-гомосерин-лактон |  |
| <i>V. harveyi</i> | <i>luxLM</i> | N-3-гидрокси-бутаноил-гомосерин-лактон |  |

В системе QS грамположительных бактерий используются олигопептидные аутоиндукторы (табл. 1.2), которые представлены линейными и циклическими пептидами, эфирами фурана, лактонами, хинолонами и их производными, секретируемые во внешнюю среду. [73, 85-87].

Таблица 1.2 – Структурные формулы некоторых аутоиндукторов системы QS грамположительных бактерий [73, 85-87]

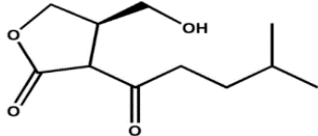
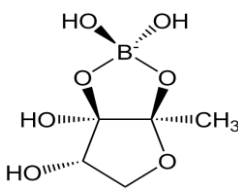
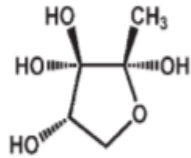
| Вид | QS система (пептиды) | Структура аутоиндукторов (аминокислотная последовательность) |
|--|----------------------|---|
| <i>B. subtilis</i> | ComX | ADPITRQWGD |
| <i>B. subtilis</i> | CSF | ERGMT |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | GBAP | QNSPNIFGQWM  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> Group-II | AIP-II | GVNACSSLF  |
| <i>S. aureus</i> Group-III | AIP-III | INCDFLL  |
| <i>S. aureus</i> Group-IV | AIP-IV | YSTCDFIM  |

Некоторые аутоиндукторы взаимодействуют с мембраносвязанными сенсорными киназами и передают сигналы через мембрану, способную определять пептидный аутоиндуктор, а затем фосфорилировать и активировать регуляторные белки, связывающиеся с ДНК и моделировать транскрипцию [87, 93]. Другие, способны транспортироваться в клетки посредством пермеазных олигопептидов и связываться с внутриклеточными рецепторами, а механизмом передачи сигнала служит процесс фосфорилирования/дефосфорилирования [73, 88]. Сигнальные аутоиндукторы (полипептиды) образуются в цитоплазме грамположительных бактерий, где они разрезаются и модифицируются, а затем экспортируются [89-92]. Биологически активные сигнальные пептиды закодированы в хромосоме, а рецепторные белки – в плазмиде [94]. Благодаря этой связи транслоцируются плазмиды, несущие гены устойчивости к антибиотикам, гены гемолизина, бактериоцинов и гены вирулентности.

Механизм работы QS, основанный на выработке сигнальных молекул аутоиндукторов (ацетил-гомосерин-лактона и пептидных феромонов) действует одинаково у грамположительных и грамотрицательных бактерий – взаимодействие происходит на разных уровнях экспрессии генов: транскрипции, трансляции, посттрансляции. За счет этого, в популяциях биопленки постоянно происходит позитивный отбор клонов клеток с благоприятными характеристиками и негативный отбор (элиминация клонов с «ненужными» фенотипами) [90, 91].

Третья система QS (табл. 1.3) характерна для всех микроорганизмов. В этом случае бактериальная коммуникация осуществляется с помощью веществ, действующих как аутоиндукторы – γ -бутиролактона, хинолонов, гидроксикетонов, люциферазы (LuxS, LuxR), диэфира фуранозилбората. [95, 96].

Таблица 1.3 – Структурные формулы некоторых аутоиндукторов системы QS грамотрицательных и грамположительных бактерий [95, 96]

| Вид | Тип аутоиндуктора | Структура аутоиндуктора |
|-------------------------------|----------------------------------|---|
| <i>Streptomyces griseus</i> | γ -бутиролактон |  |
| <i>V. harveyi</i> | AI-2 (диэфир фуранозилбората) |  |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | AI-2 (диэфир фуранозилбората) |  |

Таким образом, описанное «чувство кворума» является ключевым моментом в формировании бактериальных биоплёнок, координирующим поведение клеток в бактериальных сообществах при достижении их критической плотности.

1.4.2 Роль лектинов в формировании биопленок

Процесс формирования биопленки является сложным многостадийным и строго регулируемым биологическим процессом, в котором одну из ведущих ролей играют лектины. Так, они участвуют в процессе адгезии по типу клетка-клетка и клетка-субстрат, способствуют связыванию полисахаридов в структуре биопленки, а также играют важную роль в межклеточном взаимодействии [6].

В литературе хорошо показана роль лектинов *P. aeruginosa* в адгезии и в образовании биопленок. На поверхности клеток *P. aeruginosa* обнаружено два белка со свойствами лектинов – LecA и LecB [97]. Они специфически связываются с производными D-галактозы (LecA) и L-фукозы (LecB).

Штаммы *P. aeruginosa*, мутантные по генам *lecA* и *lecB*, которые отвечают за синтез лектинов LecA и LecB, формировали менее развитые и прочные биопленки, которые были лишены выраженной архитектуры и хуже прикрепляются к органическим поверхностям, нежели биопленки, сформированные дикими штаммами [98-101].

Так, было показано, что при выращивании биопленок *P. aeruginosa* на стальных пластинках с добавлением изопротил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) или нитрофенилгалактозида, наблюдалось подавление формирования биопленок до уровня *lecA*-мутанта (уменьшение площади поверхности биопленки в 2 раза, по сравнению с биопленками в отсутствие ИПТГ), а добавление галактозидов к уже сформированным биопленкам приводило к их разрушению.

Схожие результаты были продемонстрированы на опытах с мышами. Совместное введение *P. aeruginosa* с углеводными ингибиторами лектинов LecA и LecB (альфа-метил-галактозида и альфа-метил-фукозида) снижало повреждение респираторных клеток мышей *in vitro* и *in vivo* [102]. Эти данные согласуются с

другими подобными работами, которые показали, что LecA [98] и LecB [99] участвуют в образовании биопленочного матрикса, скрепляя между собой молекулы Psl и Pel матриксных полисахаридов.

Однако добавление галактозидов не влияло на формирование и разрушение биопленок штаммом, мутантным по *lecA* [103]. Аналогичным образом биопленки, образованные на предметных стеклах *P. aeruginosa*, мутантным по *lecB*, были значительно тоньше и меньше по площади, чем биопленки дикого типа [98, 101]. Как и галактозиды, лиганд LecB, нитрофенилфукозид, препятствовал образованию биопленок и частично разрушал биопленки дикого типа, но не *lecB*-мутанта.

Описанные выше работы указывают на то, что бактериям необходимы функциональные гены лектинов для образования полноценных биопленок. Также роль лектинов заключается в агрегации бактериальных клеток и формировании микроколоний. Было показано, что *lecA*-мутанты не формировали микроколонии, а лектин LecB необходим для правильной сборки пилей типа IV, которые, в свою очередь, требуются для образования биопленок [98, 99].

Процесс формирования биопленки у *P. aeruginosa* начинается с прикрепления полисахарида Psl к бактериальным клеткам [104]. Интересно то, что в состав внеклеточного полисахарида Psl, необходимого для образования биопленок *P. aeruginosa*, входит манноза и галактоза – лиганды лектинов LecB и LecA, соответственно [104, 105].

Кроме LecA и LecB, на поверхности *P. aeruginosa* расположен еще один лектиновый белок, CdrA. Он получил свое название от того, что его продукция контролируется циклическим димерным гуанозинмонофосфатом (ц-ди-ГМФ). Ген *cdrA* относится к двухгенному оперону, один из компонентов которого отвечает за продукцию белка (CdrB), который обеспечивает секрецию своего партнера, CdrA [106]. CdrA участвует в создании стабильной биопленки, скрепляя нити матриксного Psl полисахарида. Этот процесс может быть ингибирован производными маннозы [107], что говорит о том, что CdrA обладает свойствами лектинов.

Было также показано [108], что лектин *Ralsonia solanacearum* RS-III, кодируемый геном *lecM*, показывает высокую степень сходства с лектином *P.*

aeruginosa PA-III. Мутация у *R. solanacearum* в гене *lecM* приводила к значительному подавлению формирования биопленки. Мутант *lecM* не продуцировал биопленки грибного типа при инкубации в жидкости апопласта из растений томатов. Кроме того, мутант показал значительно меньшую колонизацию межклеточных пространств, чем штамм дикого типа OE1-1, теряя свою вирулентность на растениях томатов.

Таким образом, представляется очевидным, что лектины способствуют взаимодействию полисахаридов внеклеточного матрикса биопленок с бактериальными клетками; они также необходимы для сшивки отдельных цепочек этих полисахаридов между собой. Такая сшивка полисахаридных цепей с помощью мультивалентных лектинов способствует образованию более плотных и устойчивых к физическим воздействиям биопленок и других микробных агрегатов, используемых, в частности, в технологиях очистки сточных вод.

1.5 Микробные агрегаты в процессах биологической очистки сточных вод

В настоящий момент, одной из важнейших экологических проблем человечества является очистка сточных вод [109], решение которой связано с развитием биотехнологий обезвреживания сточных вод в процессах биоокисления и биотрансформации их компонентов.

Наиболее широко распространенным методом очистки сточных вод является метод биологической очистки, представляющий собой удаление органических и некоторых неорганических компонентов сточных вод, путем их использования в качестве питательных субстратов микроорганизмами активного ила (смешанного комплекса бактерий и простейших микроорганизмов) или биопленки. Основным продуктом биоконверсии примесей сточных вод является биологически очищенная сточная вода, а побочным – биомасса активного ила или биопленки [110].

Процессы биологической очистки традиционно протекают в аэробных и анаэробных условиях. В аэробных условиях микроорганизмы используют растворенный в сточных водах кислород, в анаэробных доступа к кислороду

микроорганизмы не имеют [111]. Основными сооружениями для реализации аэробных процессов очистки сточных вод являются аэротенки и биофильтры.

Биологическая обработка сточных вод в аэротенках основана на формировании микробного сообщества активного ила, способного использовать загрязняющие вещества в качестве субстрата. Это осуществляется при продвижении смеси активного ила и сточной жидкости вдоль коридора аэротенка. При контакте микробной суспензии со сточной водой протекает биосорбция загрязняющих веществ на поверхности флюкул активного ила с дальнейшей биодеструкцией и биотрансформацией сорбированных органических и неорганических растворенных и коллоидных веществ микроорганизмами активного ила. Принципиальная схема очистки сточных вод на базе аэротенков представлена на рисунке 1.4 [112].

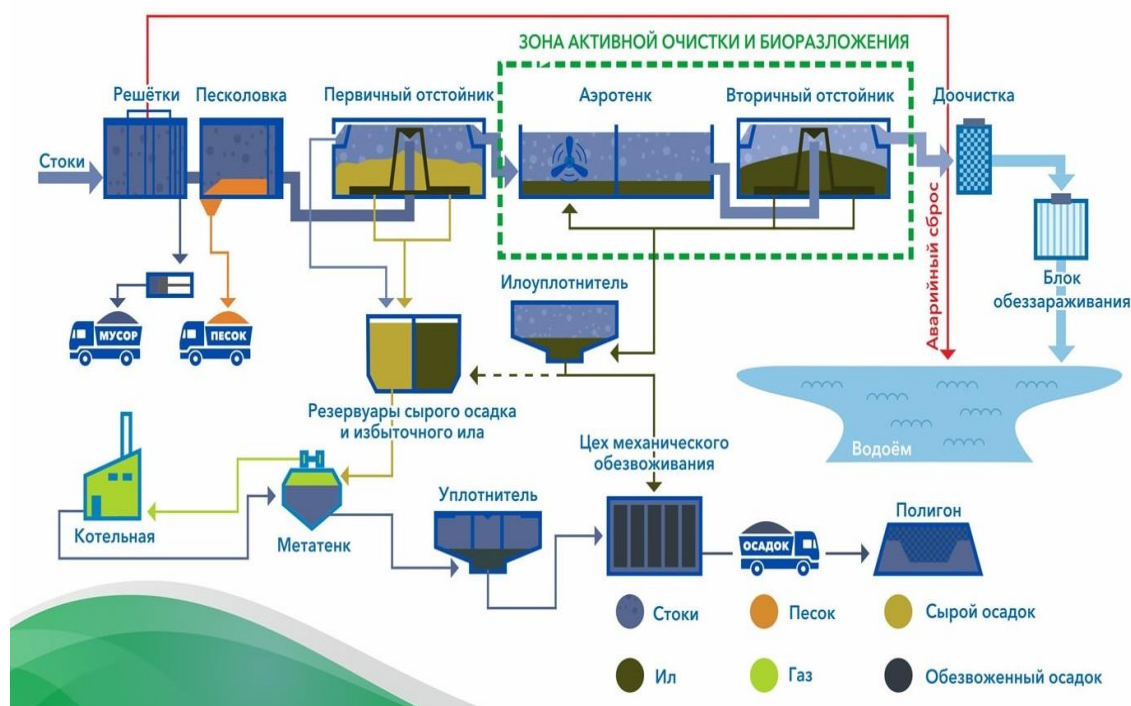


Рисунок 1.4 – Принципиальная схема очистных сооружений [112]

Аэротенк представляет собой открытое железобетонное сооружение с интенсивной аэрацией, через которое проходит сточная вода, содержащая примеси органической и неорганической природы, в смеси с активным илом.

Подача стоков на площадку осуществляется насосными станциями, где стоки подвергаются грубой механической очистке при пропуске через решетки (рисунок 1.4). Затем стоки насосными агрегатами перекачиваются в приемные камеры очистных сооружений, а далее поступают в песколовки, где осаждаются минеральные примеси. Выпавший осадок из песколовок вывозится на песковые площадки.

Далее стоки поступают в первичные отстойники, где в процессе отстаивания из них выделяется наиболее тяжелая и крупная взвесь. Сырой осадок перемещается в метантенк. Осветленная вода из первичных отстойников поступает в аэротенки, где процесс очистки осуществляется активным илом с непрерывной подачей воздуха. Затем вода поступает во вторичный отстойник для осаждения и сгущения активного ила. Сгущенный ил при помощи эрлифта или иловой трубы отводится обратно в аэротенк, либо при его избытке, направляется в метантенк. Из вторичного отстойника отстоянная вода направляется в систему доочистки, с последующим сбросом в окружающую среду.

Активный ил внешне представляет собой хлопья (флокулы) коричнево-бурого цвета, включающие, в основном, в составе микробиоценоза бактериальные культуры, а также разнообразные простейшие организмы. Характерный размер хлопьев активного ила находится в пределах от 1 до 4 мм. Активный ил на 70 % состоит из живых организмов и органических веществ (микробных метаболитов) и на 30 % – из твердых частиц неорганической природы. Организмы вместе с внеклеточными метаболитами матрицы образуют зооглей, представляющий собой симбиоз популяций микроорганизмов, покрытый общей слизистой оболочкой [112]. Благодаря аэрации хлопья активного ила поддерживаются в аэротенке во взвешенном состоянии.

Биоценоз активного ила формируется бактериями, актинобактериями, плесневыми грибами, дрожжами, а также водорослями, простейшими, личинками насекомых, рачков и др., которые попали в аэротенк из внешних источников: вместе со сточной водой, из почвы и воздуха; некоторые заносятся насекомыми. Это сложные по числу и разнообразию различных видов сообщества формируются естественным путем в процессе очистки сточной воды в аэротенке.

При этом удаление из воды органических и неорганических веществ осуществляется бактериями – в 1 м³ активного ила их приблизительно около $2 \cdot 10^{14}$ [113].

Таким образом, источником питания и энергии для жизнедеятельности организмов активного ила служат органические и неорганические загрязняющие вещества, являющиеся примесями сточной воды. Сухое вещество активного ила на 70-90 % состоит из органических веществ и на 10-30 % – из минеральных.

В присутствии кислорода микроорганизмы активного ила с помощью выделяемых ими ферментов окисляют исходные загрязняющие вещества до простых неорганических соединений, в конечном счете, до воды и углекислого газа, нитратов и других продуктов [112].

Часть органических веществ участвует в конструктивном обмене клеток и используется для построения новых клеток микроорганизмов, другая их часть, как и неорганические вещества, используется для поддержания жизнедеятельности.

Выделяют следующие стадии биodeградации примесей сточных вод в аэробных условиях [114]:

1. Сорбция загрязняющих веществ на поверхности хлопьев активного ила. Через несколько минут контакта сточной воды с иловой смесью концентрация загрязнений в воде существенно снижается. Начинается процесс окисления биологически легкодоступных органических веществ.

2. Поступление веществ внутрь клеток по механизмам диффузии, активного транспорта, фагоцитоза. Макромолекулы расщепляются экзоферментами, секретруемыми микробными клетками, либо потребляются простейшими.

3. Окисление загрязняющих веществ с участием эндоферментов внутри клетки, в том числе биоокисление азота аммонийного до нитритов и нитратов в процессе нитрификации.

В зависимости от факторов внешней среды и состава сточных вод доминируют определенные группы, рода и виды микроорганизмов, остальные становятся спутниками основной группы: происходит автоселекция микроорганизмов с преимущественным развитием одних видов, которые находят для себя благоприятные условия, и подавлением других [115].

Основным фактором (но не единственным), влияющим на состав микробного сообщества, выступает качественный состав и количественное соотношение различных примесей, содержащихся в сточной воде. Другими факторами являются аэрация, состав загрязнений, влияние и сезонные колебания температуры, скорость микробного роста и др.

Вся масса активного ила в течение длительного времени циркулирует в системе «аэротенк – отстойник – регенератор – аэротенк», являющейся по существу замкнутым контуром, поскольку прирост активного ила, а, следовательно, и отбор биомассы активного ила из этого контура составляют лишь 1-3 % (кг/час) от массы циркулирующего ила. К этому следует добавить, что циркулирующий ил последовательно проходит через три вышеуказанные стадии технологической схемы, различающиеся по физико-химическим условиям его существования. В таких условиях неизбежно старение и отмирание части микробных клеток. В итоге в биомассе циркулирующего ила устанавливается некое динамическое равновесие между образованием новых клеток, их старением, отмиранием и биодegradацией мертвых клеток. При любых отклонениях в режимных параметрах процесса равновесие сдвигается в сторону старения, снижения активности и отмирания клеток [116].

Бактериальная составляющая активного ила формируется тремя основными группами микроорганизмов [113]:

- 1) углеродооксиляющими флокулообразующими, участвующими в образовании хлопьев с их быстрым осаждением в отстойнике и образованием плотного осадка;
- 2) углеродооксиляющими нитчатыми, обеспечивающими формирование «скелета», вокруг которого образуются флоккулы; нитчатые формы также являются активными окислителями органических веществ;
- 3) нитрификаторами, превращающими аммонийный азот в нитриты и нитраты.

Кроме того, важную роль в создании и функционировании активного ила играют простейшие. Функции простейших достаточно многообразны, сами они не принимают непосредственного участия в потреблении питательного субстрата – примесей сточных вод, но регулируют возрастной и видовой состав

микроорганизмов активного ила, поддерживая его на определенном уровне. Следует отметить, что при изменении состава сточной воды может увеличиться численность одного из видов микроорганизмов, но другие культуры все равно остаются в составе биоценоза [117].

В отличие от аэротенков биофильтры являются сооружениями для биологической очистки сточных вод с прикрепленной микрофлорой, в которых сточные воды проходят через фильтрующий материал, покрытый активной биопленкой.

Традиционная технологическая схема очистки сточных вод методом биофильтрации включает [113]:

- 1) первичный отстойник для удаления взвешенных частиц,
- 2) биофильтр,
- 3) вторичный отстойник.

В качестве фильтрующего материала промышленного биофильтра могут быть использованы щебень, керамзит, керамические элементы, гравий и др. [113]. Сточная вода подается на биофильтр через специальные водораспределительные устройства, которые обеспечивают равномерное орошение всей поверхности загрузочного материала. Изъятие органических и неорганических растворенных веществ из сточной воды осуществляется при контакте поступающей сточной воды с биопленкой [113]. При эксплуатации биофильтра происходит рост биопленки. Часть её отмирает и выносится из устройства и осаждается во вторичном отстойнике.

Следует отметить, что видовой состав биопленки гораздо разнообразнее по сравнению с активным илом, что обеспечивает высокую эффективность и стабильность очистки сточных вод. Кроме того, высокое качество очищенной сточной воды также поддерживается фильтрационной составляющей в общем биофильтрационном процессе очистки.

1.6. Преимущества агрегированных форм микробных сообществ

Как было рассмотрено выше, биопленка является одной из форм микробного сообщества, представляя собой сообщество микроорганизмов, расположенных на

субстрате, клетки которого прикреплены/агрегированы между собой. Такая форма существования значительно повышает устойчивость бактерий к различным неблагоприятным факторам: стрессовым ситуациям (нехватка кислорода и питательных веществ в условиях голодания), к влиянию иммунной системы человеческого организма [75], к действию внешних условий (влияние антибиотиков и дезинфектантов, проведение стерилизации). Микробные клетки, в составе биопленок обладают абсолютной резистентностью к факторам, способных уничтожить бактерий, находящихся в свободном (планктонном) состоянии [118].

Защитная роль биопленок заключается в следующих свойствах [118]:

1. Свойство барьера – биоплёнки предотвращают глубокое проникновение в их матрикс крупных молекул и клеток, вызывающих воспаление, и служат диффузным барьером для маленьких антимикробных агентов;

2. Совокупные защитные свойства – бактерии (как одного, так и разных видов) способны обмениваться факторами защиты (продуктами метаболизма или генами), то есть осуществлять взаимозащиту. Так, бактерии одного вида, резистентные к действию антибиотиков, могут передавать гены, ответственные за резистентность, бактериям другого вида, к данному антибиотику чувствительным, обеспечивая, таким образом, повышение их устойчивости к действию фактора;

3. Свойство обмена, обеспечивающее передачу между микроорганизмами, входящими в состав одной биоплёнки, генов и продуктов жизнедеятельности;

4. Свойство бездействия, то есть образование неподвижных (неактивных, неметаболизирующих, спящих) субпопуляций – ключевое свойство, присущее исключительно биоплёнкам. Для того чтобы антибиотик подействовал на микроорганизм, он должен быть метаболически активным. Поэтому неактивные бактерии в биоплёнках являются наиболее устойчивыми к подобного рода воздействиям.

Природная устойчивость бактерий биопленок к антибиотикам считается общим признаком [119]. Микроорганизмы в составе биопленок могут показывать резистентность выше в 3 раза и более, чем планктонные формы тех же штаммов. Это обусловлено тем, что микроорганизмы, входящие в состав биопленок, становятся в 100-1000 раз менее чувствительными к большинству антибиотикам и другим

биоцидным веществам, чем планктонные клетки. После воздействия антибиотика в биопленке сохраняется небольшая популяция персистирующих (от англ. persist – упорствовать, сохраняться) бактерий, обладающих повышенной устойчивостью к противомикробным препаратам. Однако, если извлечь бактериальные клетки из биопленок, они теряют свою устойчивость к антибиотикам. Также на резистентность микроорганизмов в биопленке влияет диффузионный барьер от химических веществ, связывающихся с гликокаликсом, взаимодействие экзополимереов матрикса с антибиотиками, замедленная скорость роста клеток, гипермутации, многоклеточный состав биопленок и экспрессия генов устойчивости [75].

Предполагают, что такая устойчивость может быть обусловлена разными механизмами: 1) затруднением или неспособностью антибиотиков проникать вглубь матрикса; 2) связыванием и инактивацией антибиотика полимерами или белками матрикса; 3) замедленной скоростью деления бактерий в биопленках; 4) наличием в биопленках метаболически неактивных клеток, нечувствительных к антибиотикам [75].

Матрица биопленки, состоящая из экзополисахаридов, может уменьшить проникновение антибиотиков, физически замедляя диффузию или вступая в химическую реакцию с этими соединениями. Она действует как ионообменник и изолирует гидрофильные и положительно заряженные антибиотики, такие как аминогликозиды и др. [75].

Биопленки способны обеспечивать защиту от неблагоприятных условий окружающей среды и могут включать в себя несколько организмов из различных «царств», например, как в случае смешанных бактериально-грибковых биопленок. Генотипическое и фенотипическое разнообразие микроорганизмов в составе биопленки позволяет адаптироваться к множественным стрессам и выжить, несмотря на различные факторы окружающей среды [66].

1.7 Роль и перспективы использования лектинов в биотехнологиях очистки сточных вод

Благодаря тому, что лектины способны связывать углеводные детерминанты, расположенные на поверхности клеток, не изменяя их химической структуры, происходит процесс агглютинации как между клетками одного вида, так и между клетками разных видов. Это определяет перспективы применения лектинов и их источников для интенсификации процесса биологической очистки сточных вод.

Активный ил и биопленка, используемые в аэротенках и биофильтрах, соответственно, формируются не моментально, а за определенное время. Микрофлора поступающих сточных вод подвергается автоселекции микробных культур, формирующих суспендированные агрегированные формы (активный ил), либо иммобилизованные системы (биопленку) микробиоценозов.

Направленный процесс формирования микробных агрегатов – активного ила, микробных гранул, биопленки под действием определенных лимитирующих факторов является практически реализованным [120], но является достаточно сложным, так как нужно учитывать множество различных факторов – условия окружающей среды, качество и количество органических и минеральных веществ в сточных водах и т.д.

В литературе имеются данные о влиянии очищенных лектинов на агрегацию клеток [5, 121-123] – показано, что при смешивании их с клетками, не склонными к агрегированию, наблюдался процесс адгезии (склеивания и слипания) клеток – это является хорошим примером направленной агрегации клеток под влиянием лектинов.

Также была показана высокая лектиновая активность (титр НА = 256 ед.) у экзополимерных веществ (ЭПВ), выделенных из суспензии активного ила [5]. Экспериментальные исследования показали, что выделенные ЭПВ оказывали влияние на биофлокуляцию хлопьев активного ила – их ингибирование высокими концентрациями углеводов (от 0,5 до 2 мМ углевода на 1 мкл лектина) приводило

к дефлокуляции хлопьев, сопровождающееся высвобождением белков и уменьшением размеров хлопьев.

Описанные выше исследования являются чрезвычайно интересным и перспективным направлением, поскольку направленная селекция агрегированных микробных форм под действием лектинов в процессах очистки сточных вод позволяет определять структуру биопленки и флокул активного ила в номинальных режимах эксплуатации микробиоценозов, а источниками лектинов могут являться как отдельные доминирующие микробные культуры в составе биоценозов, так и все микробные культуры в целом. Основными механизмами агрегирования являются «лектин-белковое» и «лектин-углеводное» взаимодействия, приводящие к межклеточным взаимодействиям.

Однако, в настоящий момент, исследований анализирующих применение лектинов в биотехнологии очистки сточных вод и их роль в формировании и функционировании хлопьев активного ила недостаточно, ввиду этого, актуальным является изучение агрегации микробных клеток в активном иле, их прикрепление к субстрату или между собой (формирование биоплёнок), биофлокуляции активного ила, его седиментации и ферментативной активности – все это имеет фундаментальное значение, в плане понимания и управления процессами протекающими при биологической очистке сточных вод.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследований

Культуры микроорганизмов:

- *E. coli* М-17 (получена из лекарственного препарата «Колибактерин сухой», производитель – АО НПО «Микроген»);
- *B. subtilis* 534 (получена из лекарственного препарата «Споробактерин», производитель – ООО «Бакорен»);
- *P. fluorescens* AP-33 (получена из биопрепарата «Ризоплан Ж», производитель – ООО «Биопестициды»);
- накопительная культура ФАО), выделенная из активного ила биологических очистных сооружений (БОС) г. Чистополь;
- накопительные культуры нитрификаторов I и II фазы, полученные из микробного сообщества активного ила МУП Водоканал, г. Казань;
- активный ил коммунально-бытовых очистных сооружений г. Зеленодольск и выделенные из него сообщества изоляты – накопительные культуры, отнесенные по культурально-морфологическим свойствам к *Acinetobacter sp.*, *Escherichia sp.* (A1, A2, A3, A4) и *Bacillus sp.* (BS1);
- дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, сублимированные пищевые «Люкс Экстра», производитель – ООО «Саф-Нева»;
- *Chlorella sp.* – микроводоросли, полученные из коллекции лаборатории биотестирования кафедры прикладной экологии ФГАОУ ВО Казанского (Приволжского) федерального университета.

КЖ всех указанных бактериальных культур, БОСВ и фитогемагглютинин (ФГА-П), исследовались на проявление лектиновой активности.

КЖ представляет собой биологическую среду после удаления клеток и из суспензии, содержащая биологические активные вещества – метаболиты, таким образом, представляющая собой нативный раствор. БОСВ отбиралась из верхней части активного ила после отстаивания хлопьев. ФГА-П – это

лиофилизированный и стерильный лектин, с чистотой не менее 95 %, полученный из плодов фасоли *Phaseolus vulgaris* [125].

Эритроциты крови человека (ГАУЗ "Республиканский центр крови Министерства здравоохранения РТ" г. Казань), клетки всех бактериальных культур, дрожжей и микроводорослей использовались в качестве объектов для агглютинации.

2.2 Методы исследования

Питательные среды, используемые для периодического культивирования микроорганизмов, были следующего состава [126]:

- мясо-пептонный бульон (г/л): пептон – 20 г, питательный бульон – 20 г;
- мясо-пептонный агар (г/л): пептон – 20 г, питательный бульон – 20 г, агар - 20 г;
- среда Виноградского для нитрификаторов I фазы (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0 г, KH_2PO_4 – 1,0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, NaCl – 2,0 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 г, CaCO_3 – 5 г;
- среда Виноградского для нитрификаторов II фазы (г/л): NaNO_2 – 1,0 г, KH_2PO_4 – 0,5 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, NaCl – 0,5 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4 г, Na_2CO_3 – 1,0 г;
- среда Сабуро (г/л): пептон – 10,0 г, глюкоза - 40 г.

Для культивирования микроводорослей использовали среду Тамия с растворами микроэлементов [127]:

- среда Тамия (г/л): KNO_3 – 5,0 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 г, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,25 г, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,003 г, микроэлементы – 1 мл/литр растворов А и В.

Раствор А (г/л): H_3BO_3 – 2,86 г, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,81 г, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,222 г.

Раствор В (г/л): MoO_3 – 0,01764 г, NH_4VO_3 – 0,02296 г.

Все минеральные среды стерилизовали в автоклаве в течение 30 минут при 1 атм. Органические среды стерилизовали в автоклаве в течение 30 минут при 0,5 атм.

Состав модельного раствора сточных вод (г/л): NH_4Cl – 0,06 г, K_2HPO_4 – 0,025 г, крахмал – 0,05 г, сахара – 0,125 г, глицерин – 0,05 г.

2.2.1 Определение активности лектинов

Для определения активности лектинов использовали реакцию гемагглютинации и агглютинации, с эритроцитами крови человека и клетками микроорганизмов, соответственно [128]. Реакцию проводили специальных планшетах для иммунологических реакций с U-образными лунками. Для этого в лунках планшета готовили серию последовательных двукратных разведений КЖ, БОСВ или ФГА-П (как источника внеклеточных лектинов) (10 разведений) фосфатным буфером (рН 7,2) по 0,05 мл, затем в каждую лунку добавляли 0,05 мл 2 %-ной суспензии эритроцитов крови человека или клеток микроорганизмов и смесь оставляли при комнатной температуре в течение 60-120 минут.

Активность лектинов выражают как максимальное разведение лектина, при которой наблюдается гемагглютинация эритроцитов или агглютинация бактериальных клеток. Расчет полученных результатов проводили по формуле (2.1):

$$HA = 2^{n-1}, \quad (2.1)$$

где: HA – гемагглютинирующая активность (титр, единиц), n – разведение (лунка), при которой наблюдается гемагглютинация эритроцитов.

При проведении реакции агглютинации расчет полученных результатов проводили по формуле (2.2):

$$RA = 2^{n-1}, \quad (2.2)$$

где: RA – это агглютинирующая активность (титр, единиц), n – разведение (лунка), при которой наблюдается агглютинация бактериальных, дрожжевых или клеток микроводорослей.

2.2.2 Количественное определение белка

Содержания белка в исследуемом образце определяли с помощью реактива Бредфорд. Для проведения анализа 50 мкл белкового экстракта смешивали с 1,5 мл реактива Бредфорд. Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 10 минут. После измеряли оптическую

плотность раствора при $\lambda = 590$ нм. Концентрацию белка мкг/мл определяли по калибровочной кривой [129].

2.2.3 Культивирование биоплёнок бактериальных культур

Биопленки культивировали в течение 18 часов в пробирках Эппендорф при $T = 37$ °С, в стационарном режиме. В качестве питательной среды использовали мясо-пептонный бульон (МПБ). Клетки и питательную среду в пробирки Eppendorf вносили в пяти вариациях:

- 1 мл питательной среды + 100 мкл суспензии ФАО;
- 1 мл питательной среды + 100 мкл суспензии ФАО ($22,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) + 100 мкл КЖ *B. subtilis* 534 (в качестве источника внеклеточных лектинов);
- 1 мл питательной среды + 100 мкл суспензии ФАО + 100 мкл КЖ *E. coli* M-17 (в качестве источника внеклеточных лектинов);
- 1 мл питательной среды + 50 мкл суспензии ФАО + 50 мкл суспензии *B. subtilis* 534 ($17,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл);
- 1 мл питательной среды + 50 мкл суспензии ФАО + 50 мкл суспензии *E. coli* M-17 ($15 \cdot 10^9$ КОЕ/мл).

2.2.4 Оценка развития биопленки с использованием красителя генцианвиолета

По окончании культивирования из пробирок Эппендорф удаляли КЖ и суспендированные клетки с помощью пипетирования, двукратно промывали 1 мл 0,9 % раствора NaCl в течение 5 минут. После отмывки, образцы биопленок в пробирках Эппендорф окрашивали с помощью 500 мкл раствора генцианвиолета и инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 минут. Несвязанный краситель отмывали тщательной промывкой дистиллированной водой, связанный экстрагировали 96 % этанолом. Затем измеряли оптическую плотность экстракта на спектрофотометре при $\lambda = 570$ нм [130].

2.2.5 Выделение изолятов из активного ила

Получение накопительных культур изолятов осуществляли высевом на агаризованные питательные среды БОСВ по методу Дригальского [126].

Для выделения изолятов А1, А2, А3, А4 использовали селективную синтетическую питательную среду «Фенилаланин агар» [131], состав которой представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Состав питательной среды «Фенилаланин агар» [131]

| Название компонента | Концентрация, г/л |
|---------------------------------|-------------------|
| L-фенилаланин | 2,0-3,0 |
| NaCl | 5,0 |
| Na ₂ SO ₄ | 2,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 |
| K ₂ HPO ₄ | 2,5 |
| MgSO ₄ | 0,1 |
| Агар микробиологический | 15 |

Получение изолята BS1, содержащего клетки спорообразующей *B. subtilis*, осуществлялось на мясо-пептонном агаре – БОСВ предварительного прогревали при T = 70 °C в течении 45 минут [132] для обеспечения лизиса вегетативных клеток.

Физиолого-биохимические свойства бактерий (ферментативная активность (наличие каталазы, уреазы), рост на 3 % и 7 % NaCl, гидролиз крахмала, желатина и белков (выделение NH₃, H₂S), тест Фогеса-Проскауэра) изучали согласно стандартным методикам. Подвижность клеток определяли приготовлением препарата «висячая капля» [126].

2.2.6 Молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов

Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью определения нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с использованием стандартных праймеров 72s (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') [133-135]. Для получения лизата 0,3 г

биомассу исследуемой культуры ресуспендировали в натриево-фосфатном буфере и МТ-буфере, затем переносили в гомогенизатор (30 сек, 1500 об/мин) и центрифугировали (5 мин, 14000 об/мин) – в осадке остаются крупные внутриклеточные органеллы и остатки клеточной стенки, а ДНК остается в супернатанте. Надосадочную жидкость использовали в качестве матрицы для ПЦР. К отобранному супернатанту, содержащему ДНК добавляли 250 мкл раствора PPS, перемешивали и центрифугируют (5 мин, 14000 об/мин). Осадок отбрасывали, полученный супернатант смешивали с 1 мл Binding Matrix и перемешивали на ротаторе в течение 10 минут. Полученный раствора (600 мкл) переносили Spin колонку и центрифугировали (1 мин, 14000 об/мин) до тех пор, пока весь исследуемый раствор не будет израсходован. Далее, на колонку помещают раствора гуанидин-тиоционата (500 мкл) и центрифугируют (1 мин, 11000 об/мин). Полученную надосадочную жидкость сливали, а на колонку помещали 500 мкл реактива SEWS-M и центрифугировали (1 мин, 14000 об/мин) при комнатной температуре. Оставшуюся жидкость на дне пробирки удаляли и центрифугировали колонку (2 мин, 14000 об/мин) при комнатной температуре.

Полученную колонку (с ДНК/РНК) помещали в чистую пробирку Eppendorf и оставляли сохнуть на воздухе в течение 5 мин. Затем в середину колонки аккуратно добавляли 50 мкл DES и центрифугировали (1 мин, 14000 об/мин) при комнатной температуре для сбора элюата в пробирке.

Постановка сиквенсной реакции проводилась с использованием ген-специфических праймеров и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в объеме 10 мкл. Для подтверждения мутации прочтение осуществлялось с обоих праймеров (прямого и обратного). Реакцию проводили, используя амплификатор Veriti (Applied Biosystems, США) по температурному протоколу: предварительная денатурация при температуре 96 °C (1 мин); 26 циклов при температуре 96 °C (10 сек), 50 °C (5 сек), 60 °C (4 мин). Очистка сиквенсной реакции осуществлялась согласно стандартному протоколу [136]. Полученные результаты сравнивали с базой данных NCBI, с помощью пакета программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

2.2.7 Исследование характеристик активного ила

Постановка эксперимента по определению характеристик активного ила состояла в следующем: в активный ил вносили ЛСБС (КЖ в объеме 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 % от объема активного ила), либо (БОСВ в объеме 1 %, 2 %, 5 %, 10 % от объема активного ила), смешивали с модельным раствором сточной воды (1:1) и аэрировали в течение 4,5 часов. По окончании аэрации измеряли скорость осаждения ила (КЖ, БОСВ) и дегидрогеназную активность (КЖ).

Седиментацию проводили в цилиндре объемом 100 мл и диаметром 60 мм и высотой столба жидкости 135 мм. Седиментация ила описывалась кривыми Кинша [137] с фиксированием границы раздела «вода-ил». Данные измерений заносились в таблицу, а затем отображались графически.

Для каждого временного промежутка рассчитывалась скорость осаждения (скорость седиментации) активного ила по регистрации границы раздела фаз в цилиндре в рассматриваемый момент времени [137].

Скорость осаждения активного ила v , мм/мин, для каждого временного промежутка рассчитывалась по формуле (2.3):

$$v = \frac{H_1 - H_2}{\Delta T}, \quad (2.3)$$

где $H_1 - H_2$ – разница высот границы раздела «ил—вода» на рассматриваемом временном участке, мм; ΔT – продолжительность временного участка между высотами H_1 и H_2 , мин.

Иловый индекс, дозу ила и дегидрогеназную активность определяли стандартными методами [138, 139].

Визуализацию изменения размеров хлопьев активного ила проводили методом микроскопирования препарата «раздавленная капля» в неокрашенных препаратах с использованием микроскопа ZEISS Axio Imager D2 при стократном увеличении ($\times 100$). Обработку полученных фотографий с измерением диаметра хлопьев активного ила проводили в программе AxioVision [140].

2.2.8 Выделение внеклеточных лектинов из биологически очищенной сточной воды

Выделение внеклеточных лектинов из БОСВ (10 мл) проводили путем высаливания белков сульфатом аммония при 80 % насыщении [141]. Полученный раствор центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 мин. Далее, супернатант и белковый осадок, предварительно растворенный в 1 мл физиологического раствора (0,9 % NaCl), диализировали против дистиллированной воды при 4 °С в течение 24 часов. После диализа, растворы оценивались на лектиновую активность и ускорение седиментации активного ила.

2.3 Статистическая обработка результатов

Обработка результатов экспериментов проводилась с помощью пакета программ Microsoft Excel 2007 с оценкой достоверности по критерию Стьюдента-Фишера. Использовали параметрический t-критерий Стьюдента; достоверными считали различия при вероятности ошибки $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 ОЦЕНКА ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР И ЕЁ ВЛИЯНИЕ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК

3.1 Исследование внеклеточных бактериальных лектинов в процессах агглютинации клеток

В ходе экспериментальных работ было выявлено проявление активности внеклеточных лектинов в КЖ всех исследуемых изолятов при использовании различных объектов агглютинации. Лектиновая активность КЖ исследованных бактерий представлена в таблице 3.1. В качестве объектов агглютинации выступали бактерии, дрожжи и клетки микроводорослей.

Таблица 3.1 – Лектиновая активность КЖ бактерий по отношению к клеткам микроорганизмов

| Клетки КЖ | <i>E. coli</i> М-17 | <i>B. subtilis</i> 534 | <i>P. fluorescens</i> АР-33 | Изолят ФАО | <i>S. cerevisiae</i> | <i>Chlorella</i> <i>sp.</i> |
|---|------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------|----------------------|--------------------------------|
| <i>E. coli</i> М-17 | RA 0 ед.* | RA 0 ед. | RA 2 ед. | RA 2 ед. | RA 0 ед. | RA 0 ед. |
| <i>B. subtilis</i> 534 | RA 4 ед. | RA 0 ед. | RA 2 ед. | RA 4 ед. | RA 0 ед. | RA 2 ед. |
| <i>P. fluorescens</i> АР-33 | RA 0 ед. | RA 0 ед. | RA 0 ед. | RA 4 ед. | RA 0 ед. | RA 0 ед. |
| Изолят ФАО | RA 0 ед. | RA 0 ед. | RA 2 ед. | RA 0 ед. | RA 0 ед. | RA 4 ед. |
| Нитрификаторы I фазы роста | -* | - | RA 0 ед. | RA 4 ед. | - | - |
| Нитрификаторы II фазы роста | - | - | RA 0 ед. | RA 2 ед. | - | - |
| RA – активность внеклеточных лектинов, ед. (титр) агглютинации; RA 0 ед.* – реакция агглютинации не наблюдается; -* – реакция агглютинации не проводилась. | | | | | | |

Полученные результаты показали, что самым высоким титром активности лектинов обладала КЖ *B. subtilis* 534 (средний титр RA = 2-4 ед.). Внеклеточные лектины этих бактерий обуславливали бактериальную агглютинацию клеток всех исследуемых микроорганизмов [142].

КЖ *P. fluorescens* AP-33 также проявляла высокую лектиновую активность (титр RA = 4 ед.), однако лишь в случае агглютинации клеток изолята ФАО. Лектины *E. coli* M-17 показали слабую способность склеивать (титр RA = 2 ед.) бактериальные клетки *P. fluorescens* AP-33 и изолята ФАО. Внеклеточные лектины изолята ФАО проявляли свою активность только к клеточной поверхности *P. fluorescens* AP-33 [142].

КЖ нитрифицирующих микроорганизмов I и II фазы роста была исследована на проявление лектиновой активности с использованием бактериальных клеток изолята ФАО и *P. fluorescens* AP-33, показавших наибольшую степень агглютинации. В результате было показано, что экзогенные лектины нитрифицирующих бактерий I и II фазы роста специфичны только к углеводным доменам изолята ФАО (титр RA = 4 и 2 ед., соответственно) [142].

В ходе экспериментальных исследований было показано, что ни одна из рассмотренных КЖ не проявляла способность к агглютинации дрожжевых клеток. Вероятно, это связано с тем, что лектины изучаемых изолятов не обладают способностью специфично связываться с глюкозами и маннаном, которые составляют основную часть углеводов клеточной стенки дрожжей [142, 143].

При этом выявлена способность внеклеточных лектинов *B. subtilis* 534 и изолята ФАО агглютинировать клетки микроводорослей *Chlorella sp.* (титр RA = 2 и 4 ед., соответственно).

Низкая активность лектинов КЖ изолята ФАО и культуры *E. coli* M-17, вероятно, была определена тем, что на 18-й час периодического культивирования изолята ФАО и культуры *E. coli* M-17 соответствует фазе отмирания клеток [144], в то время как для бактерий *B. subtilis* 534 и *P. fluorescens* AP-33 – стационарной фазе роста [145]. Полученные экспериментальные данные указывают о взаимосвязи количества синтезируемых лектинов в КЖ и фазы роста культуры, что подтверждает литературные данные зависимости биосинтеза лектинов от фазы роста бактериальных культур [145, 146].

Проявление лектиновой активности КЖ бактерий по отношению к эритроцитам крови человека представлено в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Лектиновая активность КЖ бактерий по отношению к эритроцитам крови человека

| КЖ | Эритроциты крови человека |
|---|---------------------------|
| <i>E. coli</i> М-17 | НА 4 ед. |
| <i>B. subtilis</i> 534 | НА 4 ед. |
| <i>P. fluorescens</i> АР-33 | НА 4 ед. |
| Изолят ФАО | НА 0 ед.* |
| НА – активность внеклеточных лектинов, ед. (титр) гемагглютинации; НА 0 ед* – реакция гемагглютинации не наблюдается | |

Результаты оценки гемагглютинации эритроцитов выявили проявление активности лектинов в КЖ у 3-х исследуемых культур: *E. coli* М-17, *B. subtilis* 534 и *P. fluorescens* АР-33. КЖ изолята ФАО не проявляла лектиновой активности при влиянии на эритроциты, из-за отсутствия на клеточной поверхности клеток специфических углеводных детерминант.

На основании полученных результатов для дальнейших экспериментальных исследований в качестве источника внеклеточных лектинов была выбрана КЖ *B. subtilis* 534, в качестве объекта для агглютинации – клетки изолята ФАО.

3.2 Изучение биосинтеза внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования *Bacillus subtilis* 534

На рисунке 3.1 показано изменение активности внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования *B. subtilis* 534 [146, 147]. В данном исследовании активность бактериальных лектинов определялась по агглютинации бактериальных клеток изолята ФАО.

Результаты экспериментальных данных свидетельствуют об изменении лектиновой активности *B. subtilis* 534 на разных стадиях роста культуры в течение 36 часов ее периодического культивирования.

На протяжении всей стационарной фазы и последующей фазы отмирания лектиновая активность снижалась и составляла титр RA = 2 ед. в период с 22 по 28-й час культивирования. При этом в лаг-фазе и фазе отмирания клеток лектиновая

активность не была отмечена. Выявленная зависимость выделения лектинов на различных этапах роста культуры коррелирует с литературными данными [146, 147].

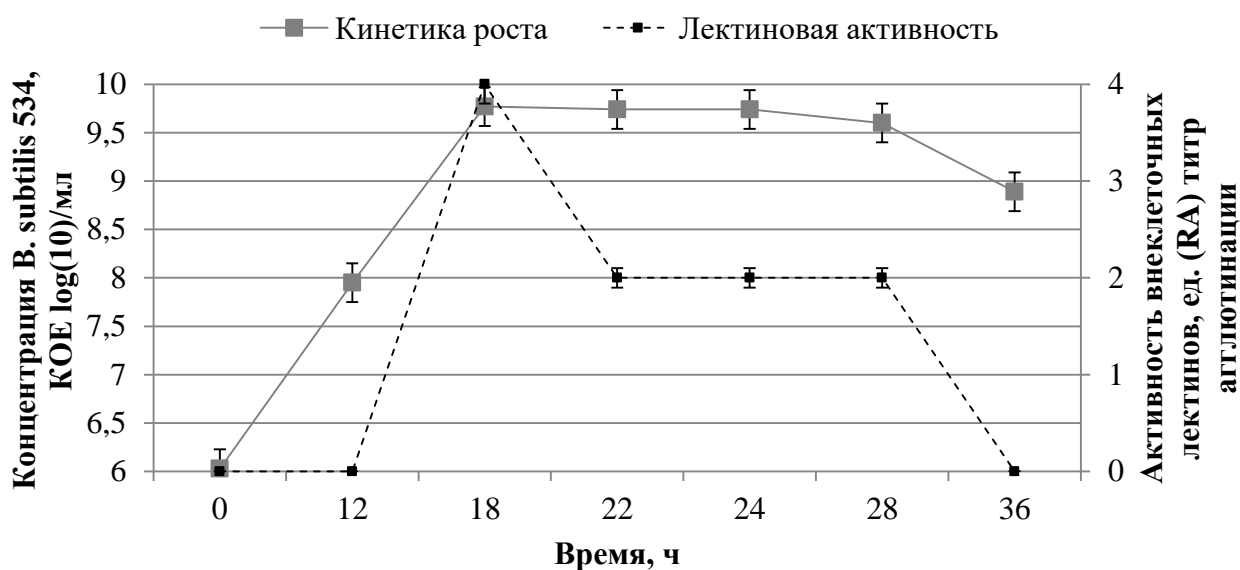


Рисунок 3.1 – Изменение активности внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования *V. subtilis* 534

Таким образом, проведена оценка биосинтеза внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования бактерий *V. subtilis* 534. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях для эффективного направленного биосинтеза лектинов бактерий *V. subtilis* 534.

Результаты микроскопирования реакции агглютинации клеток изолята ФАО, представленные на рисунке 3.2, наглядно подтверждают активность внеклеточных лектинов, содержащихся в КЖ *V. subtilis* 534.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в присутствии КЖ *V. subtilis* 534 наблюдается визуализируемое в процессе микроскопирования склеивание и слипание (агрегация) клеток изолята ФАО, что указывает на роль лектинов в процессе формирования микробных агрегатов.

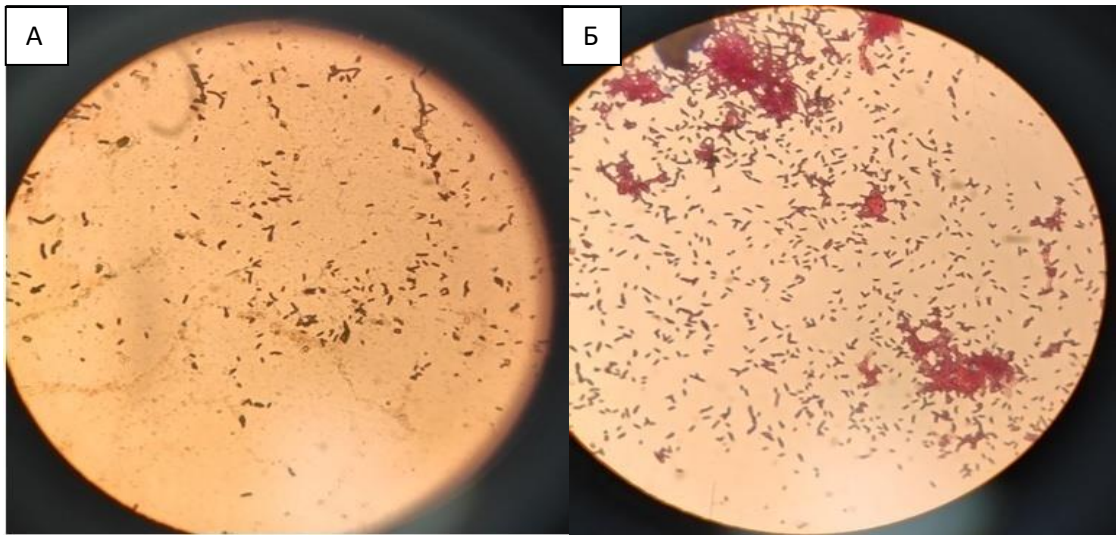


Рисунок 3.2 – Микрофотографии клеток изолята ФАО при увеличении $\times 400$:

А – клетки в собственной КЖ; Б – клетки в КЖ *B. subtilis* 534

ГЛАВА 4 ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ МИКРОБНЫХ ПЛЕНОК ПОД ВЛИЯНИЕМ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

4.1 Экспериментальная оценка влияния внеклеточных лектинов на образование бактериальных биопленок

На рисунке 4.1 показано изменение оптической плотности красителя, отражающее интенсивность формирования биопленок изолятом ФАО под действием внеклеточных лектинов (КЖ) *B. subtilis* 534.

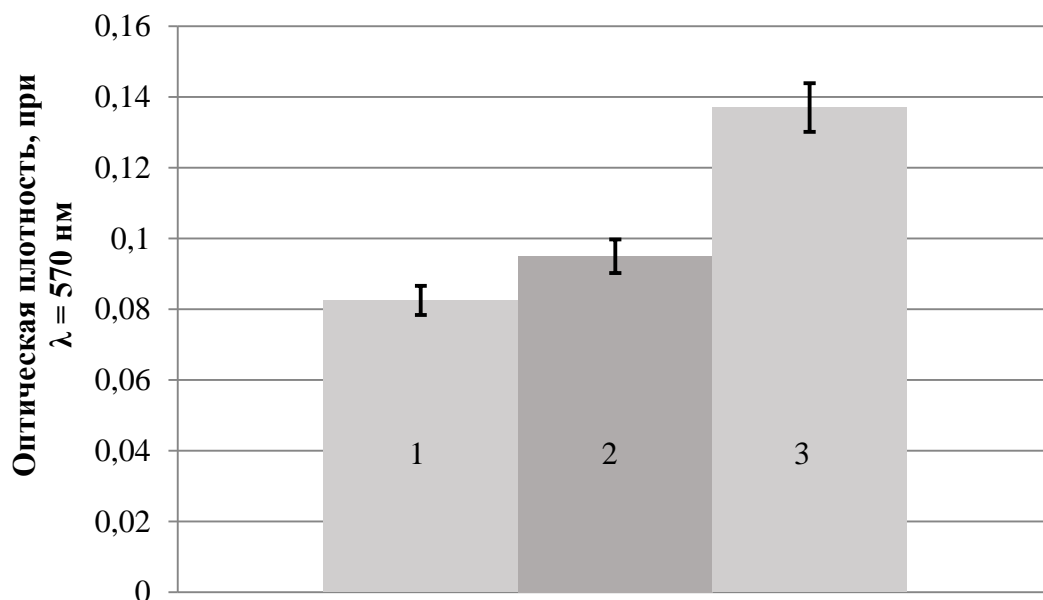


Рисунок 4.1 – Изменение оптической плотности генцианвиолета, отражающее интенсивность формирования биопленок изолятом ФАО под действием внеклеточных лектинов (КЖ) *B. subtilis* 534: 1 – контроль; 2 – суспензия изолята ФАО + КЖ *B. subtilis* 534; 3 – суспензия изолята ФАО + суспензия *B. subtilis* 534

Полученные результаты измерения оптической плотности экстрактов красителя, показали зависимость, отражающую характер формирования биопленок клетками изолята ФАО: в собственной КЖ (контроль), в присутствии КЖ *B. subtilis* 534 (как источника лектинов) и при совместном культивировании с клетками *B. subtilis* 534.

Полученные результаты показали, что добавление к клеткам изолята ФАО КЖ *B. subtilis* 534 обусловила увеличение способности к образованию биопленки, в среднем, на 15 % по сравнению с контролем. Таким образом, можно предположить, что внеклеточные лектины в составе КЖ влияют на образование биопленки. При этом наибольшая выраженная способность к образованию биопленок по сравнению с контролем отмечена при совместном культивировании клеток изолята ФАО и *B. subtilis* 534 – образование биопленки увеличилось на 66 %, по сравнению с контролем.

Для сравнения параллельно был проведен аналогичный эксперимент с использованием в качестве источника лектинов КЖ *E. coli* М-17, охарактеризованную в ходе ранее проведенных испытаний (таблица 3.1), как обладающую низкой активностью. Результаты измерения оптической плотности экстрактов красителя в ходе данного эксперимента представлены на рисунке 4.2.

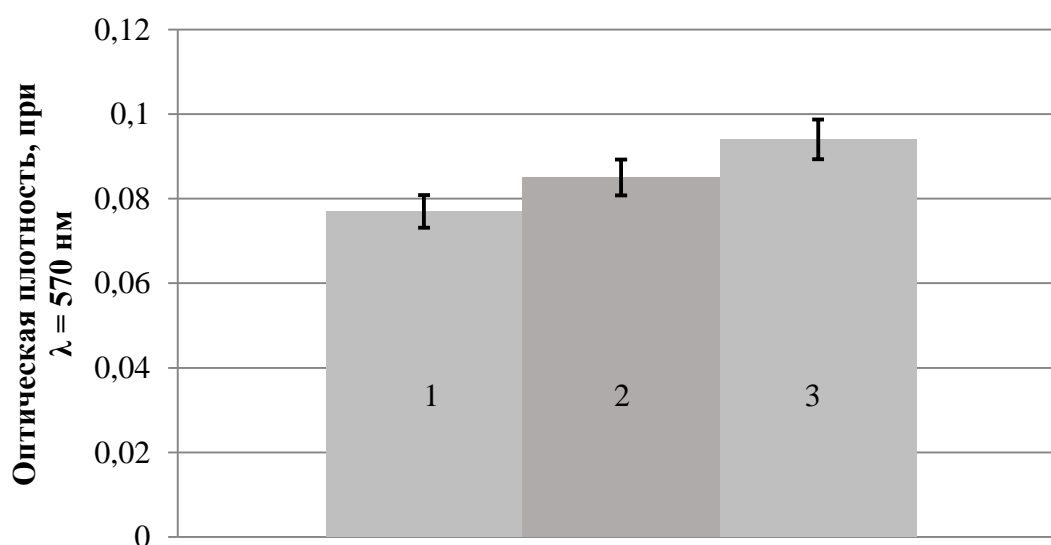


Рисунок 4.2 – Изменение оптической плотности генцианвиолета, отражающее интенсивность формирования биопленок изолятом ФАО под действием внеклеточных лектинов (КЖ) *E. coli* М-17: 1 – контроль; 2 – суспензия изолята ФАО + КЖ *E. coli* М-17 ; 3 – суспензия изолята ФАО + суспензия *E. coli* М-17

Полученные результаты показали, что добавление к клеткам изолята ФАО КЖ *E. coli* М-17 (как источника внеклеточного лектина) обусловила увеличение

способности к образованию биопленки, в среднем, на 10 % по сравнению с контролем. Совместное культивирование клеток изолята ФАО и *E. coli* M-17 также обуславливало увеличение способности к образованию биопленок – на 22 %, в среднем, по сравнению с контролем.

При этом, сравнение результатов двух экспериментальных исследований, представленные на рисунках 4.1 и 4.2, свидетельствует о большей способности к образованию биопленок в случае использования КЖ *B. subtilis* 534, как источника лектинов, и при совместном культивировании клеток изолята ФАО и *B. subtilis* 534 по сравнению с КЖ *E. coli* M-17 и клетками изолята ФАО и *E. coli* M-17, соответственно.

Полученные данные коррелируют с результатами лектиновой активности *B. subtilis* 534 и *E. coli* M-17 с бактериальными клетками изолята ФАО в реакциях агглютинации на планшетах. По-видимому, более сильное формирование биопленок между изолятом ФАО и *B. subtilis* 534 обусловлено наличием большего количества углеводных детерминант, подходящих для взаимодействия с лектинами на поверхности клеток, также возможно, более быстрому и пластичному QS (чувству кворума) между этими представителями.

Исходя из полученных экспериментальных данных с использованием вышеуказанных модельных культур, для дальнейших экспериментальных исследований были выделены изоляты из микробного сообщества активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск и оценена их способность к синтезу внеклеточных лектинов и агрегации микробных клеток.

ГЛАВА 5 ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К АГРЕГАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ АКТИВНОГО ИЛА

5.1 Культурально-морфологические свойства выделенных изолятов

Из активного ила БОС г. Зеленодольск было выделено 5 изолятов: 4 из них по культурально-морфологическим свойствам были отнесены к бактериям *Acinetobacter sp.* и *Escherichia sp.* (A1, A2, A3, A4), а 1 – к бациллам (*Bacillus sp.*), обозначенный BS1.

Клетки изолята A1 представляет собой грамотрицательные кокки (рисунок 5.1). На агаризованных средах образуют круглые колонии диаметром 2 мм. При культивировании на жидкой питательной среде образуют пленку. Спор не образуют.



Рисунок 5.1 – Окраска по Граму изолята A1 (увеличение × 400)

Клетки изолята A2 представляют собой грамотрицательные кокки (рисунок 5.2). На поверхности плотных питательных средах образует круглые белые колонии диаметром 2 мм. При культивировании в жидкой питательной среде на стенках колбы образуют белую пленку. Спор не образует, клетки неподвижны.

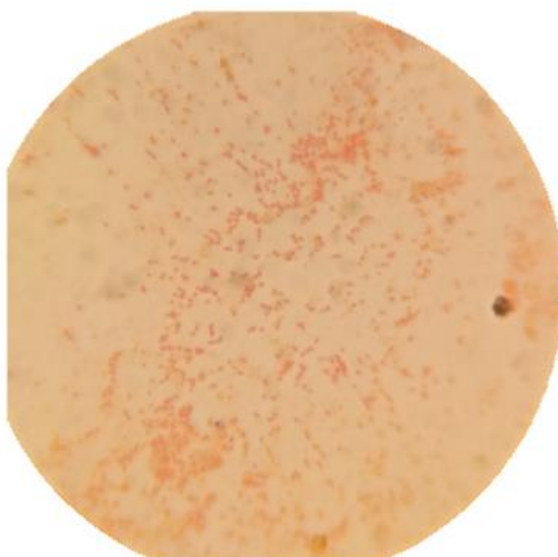


Рисунок 5.2 – Окраска по Граму изолята А2 (увеличение $\times 400$)

Изолят А3 – грамотрицательные палочки. На плотных агаризованных средах образуют колонии желтого цвета диаметром 3-4 мм. При культивировании в жидких средах, пленку не образуют. Спор не образуют (рисунок 5.3).

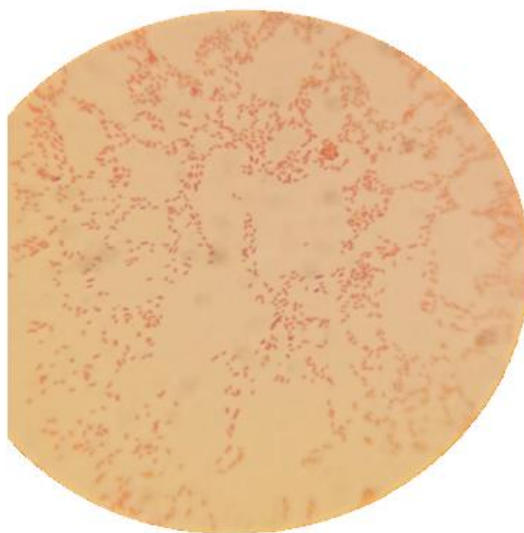


Рисунок 5.3 – Окраска по Граму изолята А3 (увеличение $\times 400$)

Клетки изолята А4 представляют собой грамположительные кокки, расположенные преимущественно гроздьями. На плотных питательных средах образуют круглые колонии с ровными краями диаметром 2-3 мм. При

культивировании на жидких питательных средах, образует едва заметную пленку, на дне присутствует осадок (рисунок 5.4).

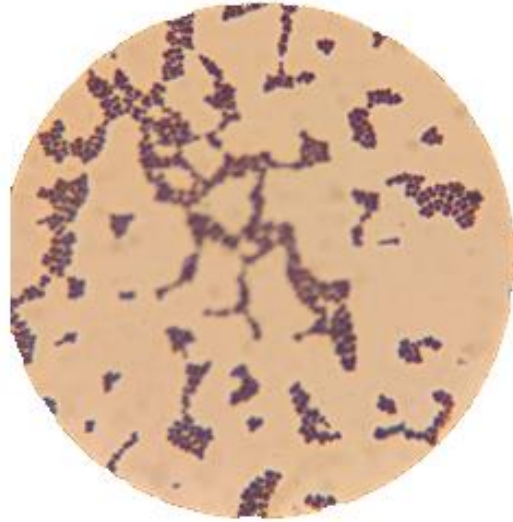


Рисунок 5.4 – Окраска по Граму изолята А4 (увеличение $\times 400$)

Клетки изолята BS1 – грамположительные палочки (рисунок 5.5). Колонии бесцветные, мелкоморщинистые. Образуют споры, клетки подвижны.



Рисунок 5.5 – Окраска по Граму изолята BS1 (увеличение $\times 400$)

5.2 Лектин-углеводное взаимодействие выделенных изолятов

Результаты экспериментальных исследований лектин-углеводного взаимодействия КЖ изолята BS1 с клетками исследуемых изолятов представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Лектин-углеводное взаимодействие КЖ изолята BS1 с клетками исследуемых изолятов

| КЖ Клетки | BS1 |
|---|-----------|
| A1 | RA 1 ед. |
| A2 | RA 2 ед. |
| A3 | RA 0 ед.* |
| A4 | RA 1 ед. |
| RA – активность внеклеточных лектинов, ед. (титр) агглютинации; RA 0 ед.* – реакция агглютинации не наблюдается. | |

Согласно полученным данным КЖ изолята BS1 (источник внеклеточных лектинов) проявляла высокую специфичность к клеточным поверхностям изолята A2 (титр RA = 2 ед.). Отмечена низкая активность лектинов к клеткам изолята A1 и A4 и отсутствие связывания с клетками изолята A3. Отсутствие активности к клеткам изолята A3 можно объяснить отсутствием углеводных детерминантов, специфичных для внеклеточных лектинов BS1 [148].

По результатам экспериментальных данных для дальнейшей идентификации на основе морфологических признаков были выбраны изоляты BS1 и A2, полученные из активного ила: изолят BS1 выбран в качестве продуцента внеклеточных лектинов, клетки изолята A2 – в качестве объекта агглютинации [148].

Результаты микроскопирования реакции агглютинации клеток изолята A2, наглядно подтверждают активность лектинов BS1 (рисунок 5.6). В присутствии КЖ изолята BS1 отмечено визуализируемая в процессе микроскопирования агрегация клеток бактерий изолята A2.

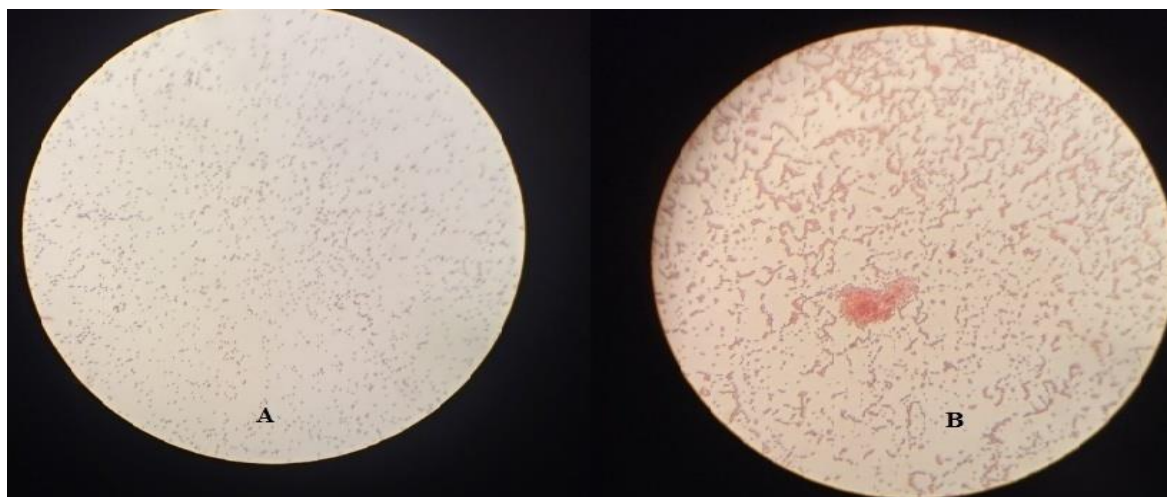


Рисунок 5.6 – Агглютинация бактериальных клеток изолята А2 под действием КЖ изолята BS1 (увеличение $\times 400$); А – микрофотография клеток изолята А2 в собственной КЖ, В – микрофотография клеток А2 под действием КЖ изолята BS1

5.3 Физиолого-биохимические свойства изолятов А2 и BS1 и идентификация микроорганизмов в их составе

Основные физиолого-биохимические свойства культур А2 и BS1 показаны в таблице 5.2. На основании морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств можно отнести культуру изолята А2 к бактериям *Acinetobacter sp.* и *Escherichia sp.*, а BS1 – к *Bacillus sp.*

Таблица 5.2 – Физиолого-биохимические свойства изолятов А2 и BS1

| Физиолого-биохимические свойства | А2 | BS1 |
|--|----|-----|
| Наличие фермента каталазы | + | + |
| Гидролиз желатина | - | + |
| Гидролиз крахмала | - | + |
| Наличие фермента уреазы | + | + |
| Рост при 3 % NaCl | + | + |
| Рост при 7 % NaCl | - | + |
| Тест Фогеса-Проскауэра | - | + |
| Выделение NH ₃ при гидролизе белков | + | + |
| Выделение H ₂ S при гидролизе белков | - | + |
| + – Реакция положительная; - – Реакция отрицательная | | |

Результаты процедуры секвенирования гена 16S рРНК исследуемых образцов показали, что в генах изолятов BS1 и A2 содержатся 1256 и 1214 пар нуклеотидов, соответственно. Результаты представлены в таблицах Б1 и Б2 (Приложение Б).

Согласно нуклеотидной последовательности, приведенной в таблице Б1 установлено 96,27 % соответствие полученного изолята BS1 с бактериями рода *Bacillus* (рисунок 5.7).

| Sequences producing significant alignments | | | | | | | | | |
|--|---|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| Download Select columns Show 10 | | | | | | | | | |
| select all 10 sequences selected | | | | | | | | | |
| GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer | | | | | | | | | |
| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus toyonensis strain LB-As-HNA1-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus toyonensis | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1459 | OP778660.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis strain BT62 chromosome, complete genome | Bacillus thuringiensis | 2039 | 28313 | 100% | 0.0 | 96.27% | 5294964 | CP044978.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus cereus strain M4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus cereus | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1466 | MK326869.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis strain m504 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus thuringiensis | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1374 | MK934458.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus sp. (in: firmicutes) strain TM-S123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus sp. (in: firmicutes) | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1534 | MH698801.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus toyonensis strain HST13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus toyonensis | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1468 | MH197392.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis strain BL14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus thuringiensis | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1474 | OR775780.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus sp. C-2-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus sp. C-2-33 | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1503 | KT583479.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus thuringiensis strain PTO R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus thuringiensis | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1444 | KT895850.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Bacillus sp. IARI-B-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Bacillus sp. IARI-B-8 | 2037 | 2037 | 100% | 0.0 | 96.27% | 1336 | JN411380.1 |

Рисунок 5.7 – Результаты идентификации нуклеотидной последовательности изолята BS1 в программе BLAST

При анализе нуклеотидной последовательности изолята A2 (таблица Б2) в программе BLAST недостаточно высокая степень идентичности (93,95 %) не позволяет достоверно отнести изолят A2 к роду *Escherichia* (рисунок 5.8) (минимальный порог степени идентичности 95 %).

По вышеуказанной причине для дальнейших исследований лектиновой активности КЖ изолята BS1 в качестве объектов агглютинации использовались эритроциты человека, которые, как было показано ранее, агглютинируют под влиянием КЖ *B. subtilis* 534 (раздел 3.1, таблица 3.2).

| Sequences producing significant alignments | | | | | | | | | |
|--|--|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------------------|
| Download Select columns Show 10 | | | | | | | | | |
| select all 10 sequences selected | | | | | | | | | |
| GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer | | | | | | | | | |
| | Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli strain AB038 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Escherichia coli | 1808 | 1808 | 99% | 0.0 | 93.95% | 1452 | OP755835.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli strain DH5alpha 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Escherichia coli | 1808 | 1808 | 99% | 0.0 | 93.95% | 1367 | ON911329.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli strain L6-21 chromosome, complete genome | Escherichia coli | 1807 | 12505 | 99% | 0.0 | 93.95% | 4642880 | CP123963.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli DNA, complete genome, strain: WP2-S18-ESBL-07 | Escherichia coli | 1807 | 12611 | 99% | 0.0 | 93.95% | 4771018 | AP021944.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli isolate SC480 genome assembly, chromosome: omosome1 | Escherichia coli | 1803 | 12374 | 99% | 0.0 | 93.87% | 4741504 | LR778153.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli strain KE46 chromosome, complete genome | Escherichia coli | 1801 | 12505 | 99% | 0.0 | 93.86% | 4736141 | CP141090.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli isolate 79f62194-1f9e-48a9-9f7e-5890de0ea046 genome assembly, chromosome: 1 | Escherichia coli | 1801 | 12539 | 99% | 0.0 | 93.86% | 4728427 | OY762930.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli strain GCEC19 chromosome, complete genome | Escherichia coli | 1801 | 12550 | 99% | 0.0 | 93.86% | 5085237 | CP137765.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli strain TUM1880 chromosome, complete genome | Escherichia coli | 1801 | 12561 | 99% | 0.0 | 93.86% | 5389834 | CP135706.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Escherichia coli strain TW10828 chromosome, complete genome | Escherichia coli | 1801 | 12577 | 99% | 0.0 | 93.86% | 4951773 | CP127262.1 |

Рисунок 5.8 – Результаты идентификации нуклеотидной последовательности изолята A2 в программе BLAST

5.4 Биосинтез внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования изолята BS1

Известно [146, 147], что процесс биосинтеза внеклеточных лектинов изменяется в зависимости от фазы роста культуры, что можно оценить по активности лектинов. В данном исследовании активность бактериальных лектинов определялась по агглютинации эритроцитов крови человека.

Результаты экспериментальных данных свидетельствовали об изменении активности внеклеточных лектинов изолята BS1 на разных стадиях роста в процессе 36-часового культивирования (рисунок 5.9).

Согласно полученным данным максимальная активность лектинов бацилл (титр НА = 8 ед.) наблюдалась в экспоненциальной фазе развития культуры. На протяжении всей стационарной фазы и последующей фазы отмирания лектиновая активность снижалась (титр НА = 2 ед.) в период с 15 по 20-й час. При этом в лаг-фазе и фазе отмирания клеток лектиновая активность не наблюдалась.

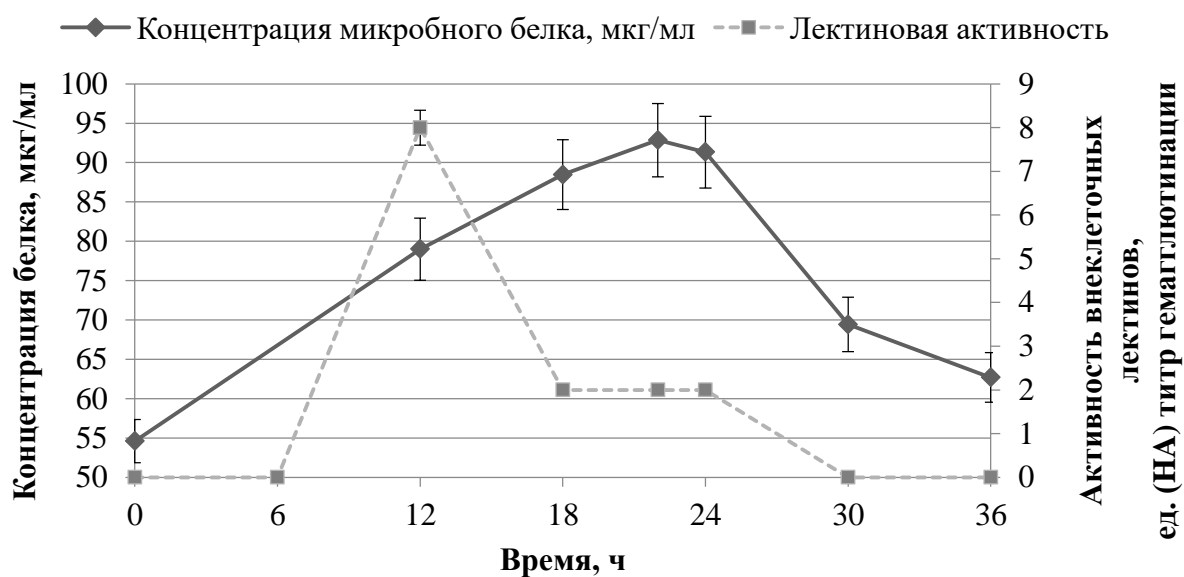


Рисунок 5.9 – Изменение активности внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования изолята BS1

Таким образом, проведена оценка биосинтеза внеклеточных лектинов в процессе периодического культивирования бактерий *Vacillus sp.* Полученные результаты могут быть использованы в дальнейших исследованиях для эффективного направленного биосинтеза лектинов бактериями *Vacillus sp.* [148].

ГЛАВА 6 ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНСОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД НА ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТИВНОГО ИЛА

6.1 Седиментация активного ила под действием культуральной жидкости изолята BS1

Седиментационные свойства активного ила с дозой (концентрацией) ила 2,7 г/л исследовались при внесении в его суспензию КЖ изолята BS1 (в качестве источника внеклеточных лектинов). Результаты скорости осаждения активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск представлены на рисунке 6.1.

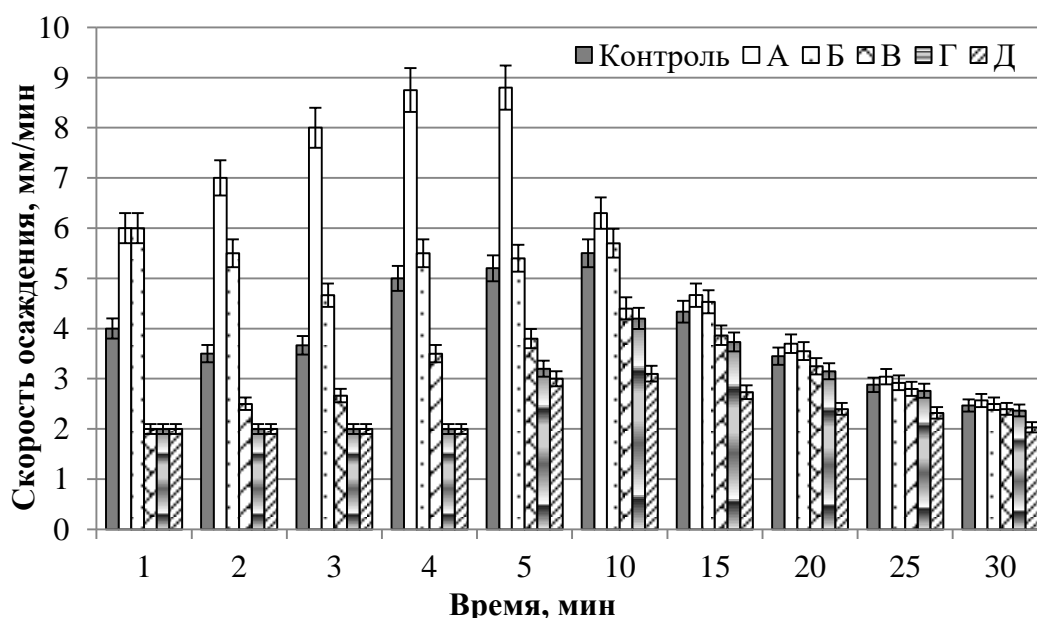


Рисунок 6.1 – Седиментация активного ила под влиянием КЖ изолята BS1, % КЖ от объема активного ила: А – 0,25%; Б – 0,5 %; В – 1 %; Г – 2 %; Д – 5 %; Контроль: активный ил + дистиллированная вода в заданных % от объема активного ила

Наибольшая скорость седиментации активного ила наблюдалась для КЖ вносимой в объеме 0,25 % от объема активного ила (скорость седиментации повышалась от 50 % до 118 %) в период с 1 по 10 мин осаждения, по сравнению с

контрольной пробой. При этом не было отмечено значительного повышения эффективности в процессе дальнейшей седиментации (с 10 по 30 мин).

Внесение в активный ил КЖ в объеме 0,5 % от объема активного ила показало ускорение скорости седиментации на 50 % в начальный момент времени – с 1 по 2 мин.

В случае добавления в активный ил внеклеточных лектинов изолята BS1 в объеме 1 %, 2 %, 5 % от объема активного ила было отмечено снижение скорости седиментации (до 60 %) в период с 1 по 10 мин, по сравнению с контрольным образцом (рис. 6.1).

На рисунке 6.2 показано, что внесение КЖ в объемах 2 % и 5 % от объема активного ила приводило к увеличению значения илового индекса на 13 % и 53 %, в среднем, по сравнению с контролем, соответственно. КЖ в объемах 0,25 %, 0,5 % обеспечивала некоторое снижение илового индекса, объем 1 % КЖ не приводил к значительному увеличению илового индекса.

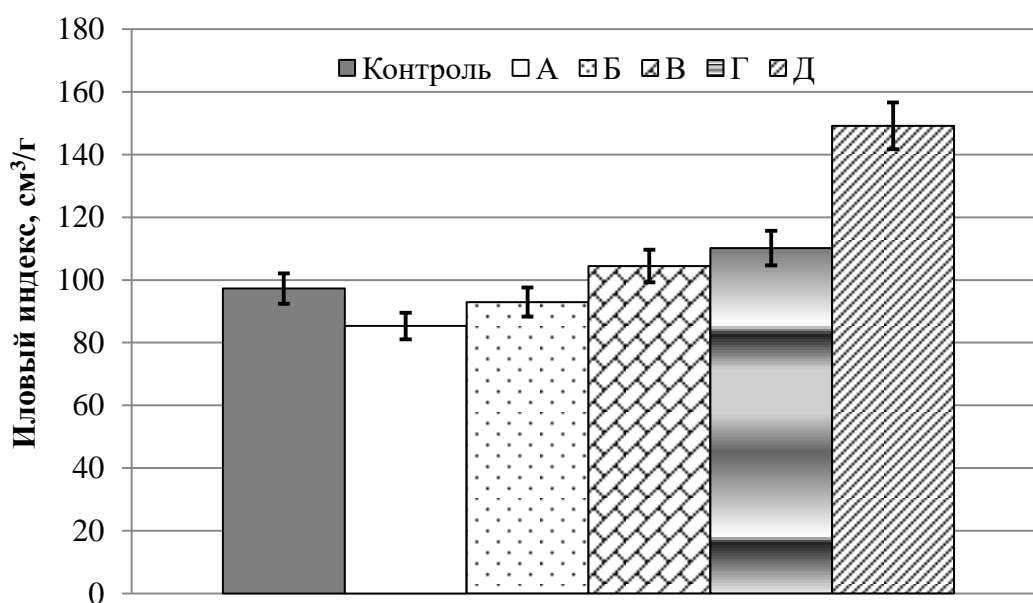


Рисунок 6.2 – Значение илового индекса исследуемых образцов при внесении КЖ, % КЖ от объема активного ила: Контроль – без внесения КЖ; А – 0,25%; Б – 0,5 %; В – 1 %; Г – 2 %; Д – 5 %

Таким образом, следует отметить, что чрезмерное внесение внеклеточных бактериальных лектинов негативно влияет на скорость осаждения активного ила, а также приводит к увеличению илового индекса.

В ходе дальнейших экспериментальных исследований в случаях высоких концентраций лектинов в среде наблюдалось «вспухание» ила после его осаждения (рисунок 6.3).

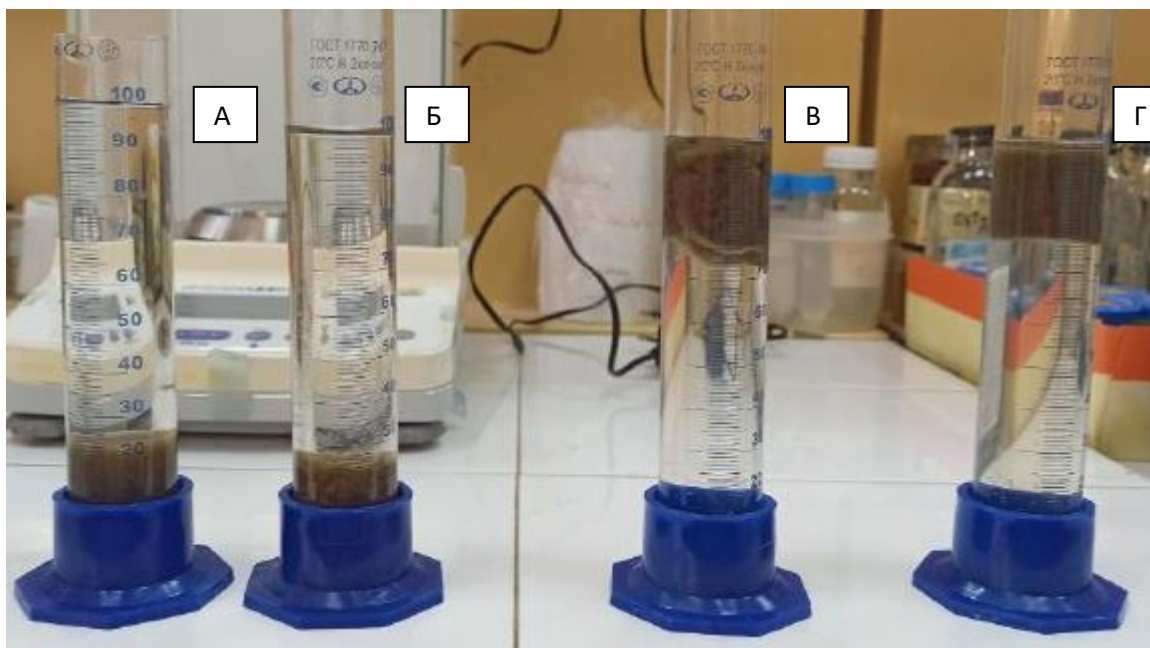


Рисунок 6.3 – «Вспухание» активного ила в стандартном цилиндре после отстаивания в течение 30 мин с различными концентрациями внеклеточных лектинов, % КЖ от объема активного ила: А – 0,25; Б – 0,5; В – 1; Г – 2

В таблице 6.1 представлено время вспухания активного ила (содержащего различные дозировки внеклеточных бактериальных лектинов изолята BS1) после 30-ти минутного отстаивания в цилиндре.

Таблица 6.1 – Результаты регистрации «вспухания» активного ила в зависимости от концентрации внеклеточных лектинов в КЖ

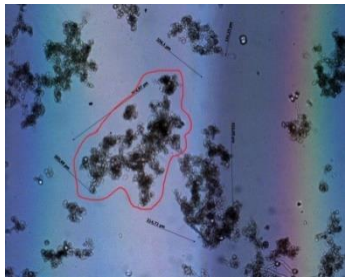
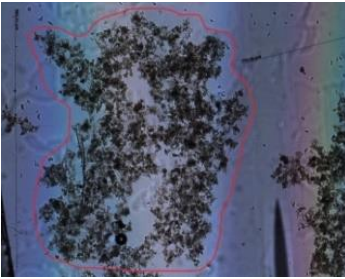
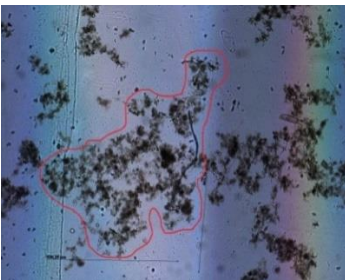
| Объем вносимой КЖ, % от объема активного ила | Время «вспухания» активного ила после осаждения, мин |
|---|---|
| 1 | 2 |
| Контроль | -* |

Продолжение таблицы 6.1

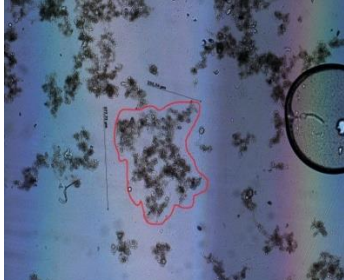
| | |
|-------------------------------|----|
| 1 | 2 |
| 0,25 | - |
| 0,5 | - |
| 1 | 91 |
| 2 | 63 |
| 5 | 49 |
| -- «Вспухание» не наблюдалось | |

Также в работе было исследовано изменение размеров хлопьев активного ила при внесении КЖ. Результаты показали, что внесение КЖ изолята BS1 или ФГА-П (взятого в качестве дополнительного контроля) к суспензии активного ила приводило к изменению размеров хлопьев после 30 минут седиментации (таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Изменение условного диаметра хлопка суспензии активного ила после 30 минут седиментации при внесении КЖ изолята BS1 и ФГА-П

| ЛСБС | Условный диаметр хлопка (УДХ), мкм | Вид хлопков, микрофотография $\times 100$ |
|--|------------------------------------|---|
| 1 | 2 | 3 |
| Контроль (100 мл суспензии активного ила) титр НА = 1 ед. | 325,2 \pm 0,16 |  |
| КЖ изолята BS1 (99,75 мл суспензии активного ила + 0,25 мл КЖ) титр НА = 8 ед. | 937,2 \pm 0,46 |  |
| ФГА-П (1:12) (97,4 мл активного ила + 2,6 мл ФГА-П (1:12)) титр НА = 2 ед. | 356,4 \pm 0,17 |  |

Продолжение таблицы 6.2

| 1 | 2 | 3 |
|---|------------------|---|
| ФГА-П (1:13) (97,4 мл активного ила + 2,6 мл ФГА-П (1:13)) титр НА = 1 ед. | $334,3 \pm 0,16$ |  |

В колбе, куда вносилась КЖ изолята BS1 в объеме 0,25 % от объема активного ила, помимо повышения скорости седиментации активного ила (до 118 %) в начальный период времени (до 10 минуты) (рисунок 6.1), наблюдалось также и увеличение условного диаметра хлопка (УДХ) – в среднем, до 2,8 раза, по сравнению с контролем (таблица 6.2). Полученные результаты показывают, прямую зависимость между скоростью седиментации и условным диаметром хлопка активного ила: чем выше условный диаметр хлопка активного ила, тем выше скорость седиментации. Это также подтверждает внесение ФГА-П (таблица 6.2) в суспензию активного ила – при внесении ФГА-П в разведении 1:13 (титр НА = 1 ед.), УДХ, в среднем, составляет $334,3 \pm 0,16$ мкм, в то время как при внесении ФГА-П в разведении 1:12 (титр НА = 2 ед.), УДХ увеличивается в среднем, до $356,4 \pm 0,17$ мкм (на 6 %).

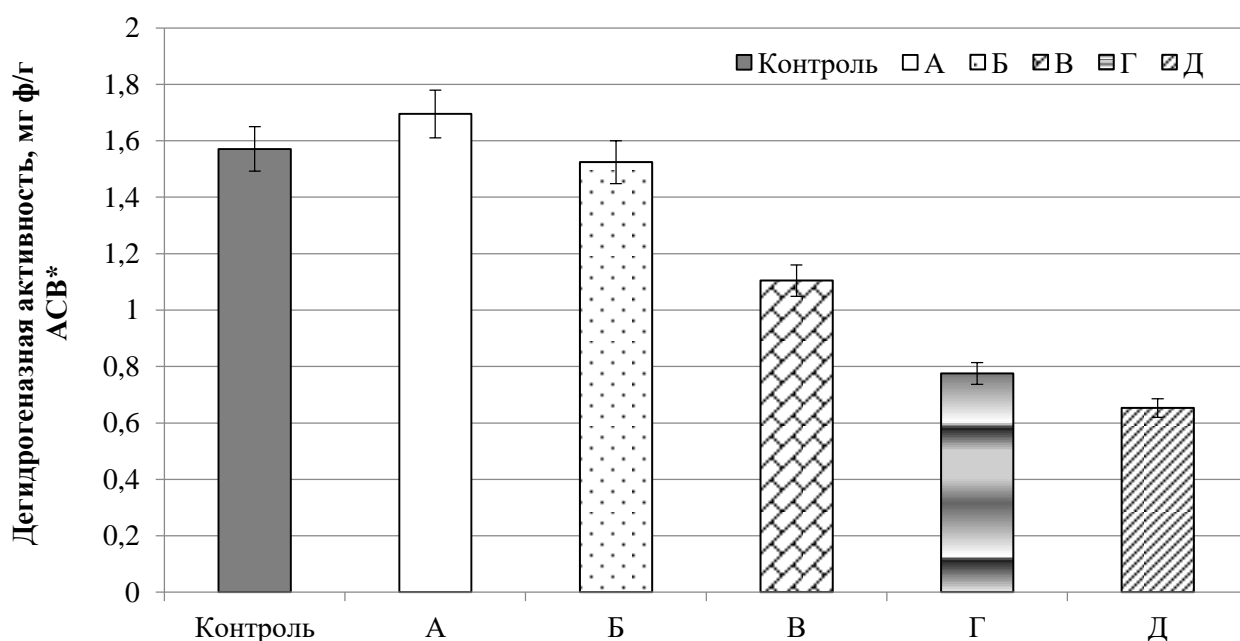
Полученные результаты продемонстрировали очевидную зависимость между лектиновой активностью (НА) в ЛСБС, скоростью седиментации и процессом агрегации хлопьев активного ила: в случае проявления значительной лектиновой активности образцов КЖ принципиально, практически в 3 раза, увеличивается размер хлопьев активного ила и скорость седиментации (до 118 %) вследствие агрегации микробных клеток по сравнению с контрольным образцом, а также с другими образцами биологических сред с низкой лектиновой активностью.

Таким образом, можно заключить, что внеклеточные бактериальные лектины в составе лектинсодержащих биологических сред (КЖ) обладают свойствами природных флокулянтов и требуют определенной дозировки для использования, так как могут

оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на характеристики активного ила в зависимости от объема, вносимого в суспензию активного ила.

6.2 Влияние культуральной жидкости изолята BS1 на дегидрогеназную активность ила

Для оценки влияния внеклеточных лектинов на микроорганизмы активного ила проводилось измерение их дегидрогеназной активности по истечении 4,5 часов культивирования без учета возможности адаптации микроорганизмов к лектинам. Результаты измерения дегидрогеназной активности ила с различными концентрациями КЖ представлены на рисунке 6.4.



* миллиграмм восстановленного формазана (ф) на 1 г абсолютно сухого вещества (АСВ)

Рисунок 6.4 – Дегидрогеназная активность микроорганизмов активного ила в присутствии различных концентраций КЖ, % КЖ от объема активного ила:

Контроль – без внесения КЖ; А – 0,25; Б – 0,5; В – 1; Г – 2; Д – 5

Согласно полученным данным, внесение 0,25 % КЖ от объема активного ила привело к увеличению дегидрогеназной активности ила, в среднем, на 7 % по

сравнению с контрольным образцом. Объем 0,5 % КЖ практически не оказывал влияния на ферментативную активность ила. Внесение КЖ в объемах 1 %, 2 %, 5 % приводило к существенному снижению ферментативной активности микроорганизмов активного ила на 29,7 %, 50 % и 58,5 %, в среднем, соответственно, что коррелирует с результатами, полученными по седиментации активного ила.

6.3 Влияние биологически очищенной сточной воды на седиментацию активного ила

В связи с тем, что КЖ изолята BS1 оказывала значительное влияние на характеристики активного ила, была высказана гипотеза о проявлении агглютинирующих свойств у БОСВ как аналогии КЖ микробного сообщества активного ила.

Для оценки влияния БОСВ (титр НА = 1 ед.) на скорость седиментации активного ила были выбраны следующие объёмы БОСВ (1 %, 2 %, 5 %, 10 % от объема активного ила). Также было исследовано влияние внесения БОСВ (в объемах 5 % и 10 % от объема активного ила) на изменение УДХ активного ила.

Эксперимент проводился без адаптации активного ила к БОСВ. Контролем служила дистиллированная вода в заданных % от объема активного ила. Оценку седиментационных свойств исследовали при дозе ила 2,7 г/л. Результаты скорости осаждения активного ила представлены на рисунке 6.5.

Максимальная скорость седиментации была отмечена при добавлении БОСВ в объеме 5-10 % от объема активного ила к суспензии активного ила. Эффективность осаждения в этом случае составляла от 10 до 20 % в интервале времени с 1 по 10 минуту, а также приводило к увеличению УДХ активного ила – от 3 % до 15 %, соответственно (таблица 6.3). После истечение 10 минут не было зарегистрировано значительного увеличения скорости осаждения ила. Добавление БОСВ в объеме 1 % и 2 % не показало значительного улучшения скорости седиментации ила.

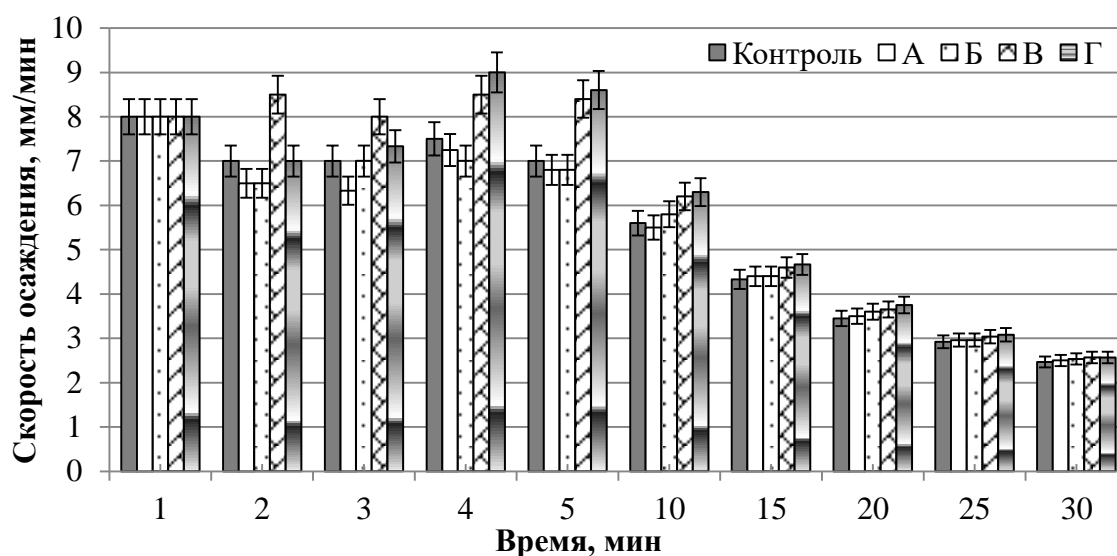
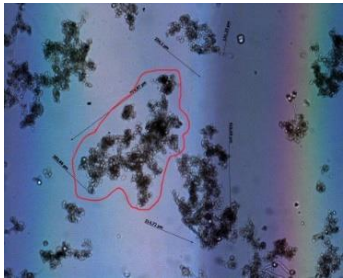


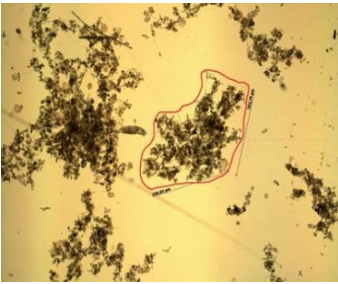

Рисунок 6.5 – Седиментация активного ила под влиянием БОСВ, % БОСВ от объема активного ила: А – 1; Б – 2; В – 5; Г – 10; Контроль: активный ил + дистиллированная вода в заданных % от объема активного ила

Результаты, полученные по влиянию БОСВ на изменение УДХ активного ила (таблица 6.3), коррелируют с ранее полученными данными (таблица 6.2) по влиянию лектиновой активности (НА) в ЛСБС, вносимых в суспензию активного ила, на изменение скорости седиментации и УДХ активного ила.

Таблица 6.3 – Изменение условного диаметра хлопка суспензии активного ила после 30 минут седиментации, при внесении БОСВ

| ЛСБС | Условный диаметр хлопка активного ила, мкм | Скорость осадения, мм/мин | Вид хлопков, микрофотография $\times 100$ |
|---|--|--|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Контроль (100 мл суспензия активного ила) титр НА = 1 ед. | $325,2 \pm 0,16$ | с 1-5 минуту – 7,3 с 5-10 минуту – 2,52 |  |

Продолжение таблицы 6.3

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|------------|---|---|
| БОСВ (95 мл суспензии активного ила + 5 мл БОСВ) титр НА = 1 ед. | 336,1±0,16 | с 1-5 минуту – 8,28 с 5-10 минуту – 2,92 |  |
| БОСВ (90 мл суспензии активного ила + 10 мл БОСВ) титр НА = 1 ед. | 374,8±0,18 | с 1-5 минуту – 7,99 с 5-10 минуту – 2,98 |  |

Для подтверждения наличия внеклеточных лектинов в БОСВ было произведено высаливание белков сульфатом аммония (80 % насыщения), растворении выпавшего осадка в физиологическом растворе, с последующим диализом против дистиллированной воды при 4 °С в течение 24 часов. Полученный белковый раствор после диализа (белковый диализат) (титр НА = 2 ед.) оценивали на ускорение седиментации (рисунок 6.6) – его вносили в объеме 0,1 % от объема активного ила.

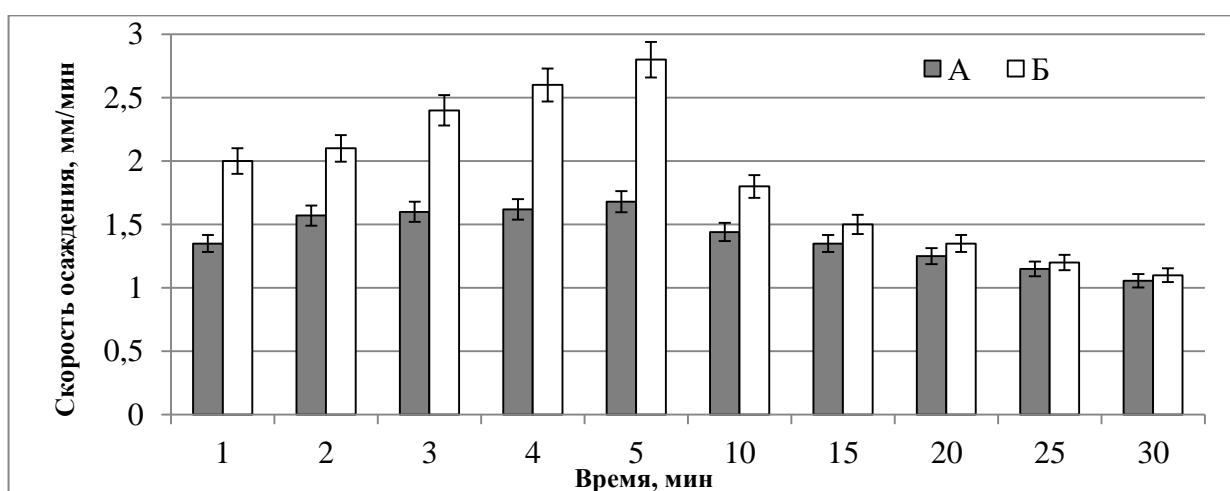


Рисунок 6.6 – Седиментация активного ила под влиянием белкового диализата, % от объема активного ила:

А – 0,1 (контроль – дистиллированная вода); Б – 0,1 (белковый диализат)

Полученные результаты показали (рисунок 6.6), что внесение белкового диализата способствовало повышению скорости седиментации активного ила до 66 % в начальный период времени (до 10 мин), что также свидетельствует о роли внеклеточных лектинов в БОСВ в процессе осаждения активного ила.

Таким образом было показано, что внесение ЛСБС (КЖ и БОСВ) в суспензию активного ила может оказывать как положительный, так и отрицательный эффект на его характеристики, в зависимости от концентрации лектинов в ЛСБС. На основании полученных результатов было сформулировано техническое предложение для БОС г. Зеленодольск с изменением объема возвратного активного ила.

6.4 Техническое предложение в процесс биологической очистки коммунально-бытовых сточных вод с изменением объема возвратного активного ила

В существующей технологии биологической очистки сточной воды процесс очистки осуществляется по технологической схеме, представленной на рисунке 6.7.

Общий объем жидкости, находящейся в аэротенке, равен 11400 м^3 (V_A) – 2 секции (по 5700 м^3) (V_C), каждая имеет по 3 коридора (1900 м^3) (V_K). В аэротенк поступает сточная вода с расходом $1300 \text{ м}^3/\text{ч}$ (Q_{CB}) и возвратный активный ил – $750 \text{ м}^3/\text{ч}$ (Q_1), в среднем; их смешение происходит во втором коридоре каждой секции. После вторичного отстойника основной объем активного ила направляется насосом в регенератор (1 коридор аэротенка), а некоторая часть в качестве избыточного активного ила (Q_3) объемом $25 \text{ м}^3/\text{ч}$ отводится для обезвоживания на центрифуги, нормативное время работы которых составляет 10 ч/сутки (t_1).

Иловой индекс образцов ила имел значения 150 мл/г , в среднем, что является неудовлетворительным показателем седиментационных свойств активного ила (в норме $80\text{-}120 \text{ мл/г}$) [149], поэтому необходимо обеспечить уменьшение илового индекса до удовлетворительного показателя, что приведет также и к увеличению скорости седиментации активного ила во вторичном отстойнике.

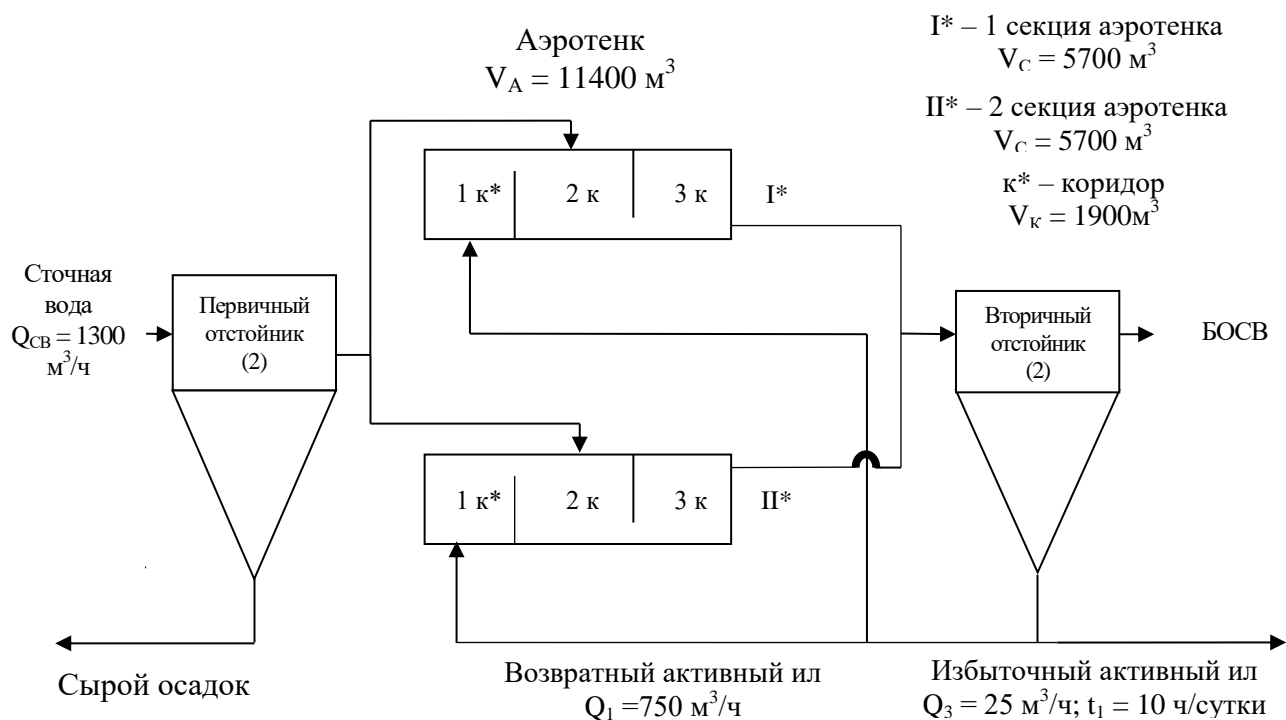


Рисунок 6.7 – Принципиальная схема биологической очистки сточных вод БОС г. Зеленодольск

Для реализации технического предложения на основании проведённых лабораторных исследований по внесению БОСВ в активный ил в объеме 5-10 % от его объема осуществляется внесение возвратного активного ила в аэротенк в объеме 5 % от его объема ($V_A = 11400 \text{ м}^3$), что составит $570 \text{ м}^3/\text{ч}$ (Q_2) согласно формуле 6.1:

$$Q_2 = 5 \% \cdot \left(\frac{V_A}{100 \%} \right) \quad (6.1)$$

где V_A – общий объем аэротенка, м^3 .

Внесение 5% объема возвратного активного ила от объема аэротенка предлагается как аналог внесения БОСВ в активный ил в объеме 5% от его объема.

Подобные изменения (рисунок 6.8) приведут к следующим положительным результатам: ускорение осаждения активного ила до 20 % во вторичном отстойнике и снижение илового индекса на 10 % (на основании проведенных лабораторных исследований по внесению БОСВ в активный ил в объеме 5-10 % от его объема). Также будет увеличиваться время пребывания сточной воды в аэротенке на 10 % (формула 6.2) и снижаться затраты электроэнергии на перекачку возвратного ила.

Время пребывания сточной воды в аэротенке, рассчитывалось по формуле 6.2:

$$T = (N_C \cdot (V_K \cdot N_K)) / (Q_{CB} + Q_2), \quad (6.2)$$

где N_C – количество секций в аэротенке;

V_K – объем одного коридора в секции аэротенка, m^3 ;

N_K – количество коридоров, в которых происходит смешение сточной воды и возвратного активного ила в одной секции аэротенка;

Q_2 – измененный объем возвратного активного ила, поступающего в аэротенк, $m^3/ч$;

Q_{CB} – объем сточной воды поступающей в аэротенк, $m^3/ч$.

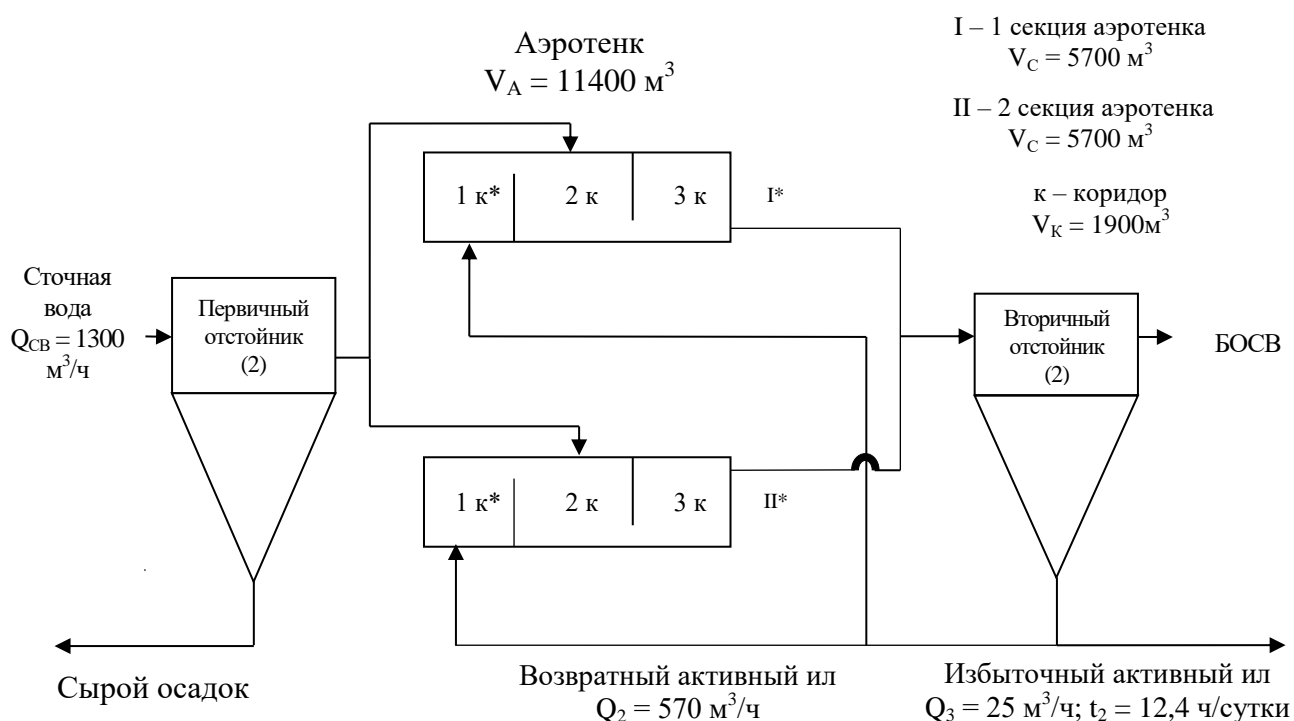


Рисунок 6.8 – Принципиальная схема биологической очистки сточных вод с изменением объема возвратного активного ила БОС г. Зеленодольск

При этом важно учесть вероятное снижение возраста активного ила и, соответственно, повышение его активности (не «вспухает», устойчив к колебаниям температуры и pH, формирует более мелкие хлопья, которые легче оседают), а также необходимость некоторого увеличения количества избыточного активного ила, выводимого из технологического цикла. Ввиду этого повышается

время работы центрифуг (до 12,4 ч/сутки) на обезвоживание избыточного активного ила. Расчет времени работы центрифуг на обезвоживание избыточного активного ила производили по формуле 6.3:

$$t_2 = t_1 \cdot \left(1 + \left(1 - \frac{Q_2}{Q_1}\right)\right), \quad (6.3)$$

где t_1 – нормативное время работы центрифуг, ч/сутки;

Q_1 – нормативный объем возвратного активного ила, поступающего в аэротенк, м³/ч;

Q_2 – измененный объем возвратного активного ила, поступающего в аэротенк, м³/ч.

Изменение объема возвратного ила с его уменьшением до 570 м³/ч осуществляется на полгода, однако, в случае снижения рабочей концентрации активного ила в аэротенке ниже 1,8 г/л количество возвратного ила восстанавливается до 750 м³/ч (независимо от цикличности изменения объема возвратного ила раз в полгода) с целью достижения нормативной рабочей концентрации активного ила в аэротенке (2-2,5 г/л). Далее представляется возможным вновь уменьшить объем возвратного ила до 570 м³/ч на полгода (при нормативной рабочей концентрации активного ила в аэротенке) для обеспечения удовлетворительной седиментации и улучшения других указанных показателей процесса очистки.

Описанное техническое предложение позволит уменьшить риски значительного снижения возраста активного ила и эффективности его отделения от очищенной воды.

Таким образом, на основании проведенных лабораторных исследований по определению активности биофлокулянтов в лектинсодержащих средах бактерий – изолятов активного ила данное техническое предложение рекомендуется в качестве мероприятия по необходимому временному изменению технологического регламента процесса очистки, направленного на улучшение осаждения активного ила и на увеличение времени нахождения сточной воды в аэротенке.

6.5 Расчет экономических показателей процесса изменения объема возвратного активного ила в технологиях очистки сточных вод

К основным затратам на изменение объема возвратного активного ила относятся затраты на перекачку увеличенного объема избыточного активного ила и его утилизацию.

Расчет затрат электроэнергии на перекачку активного ила представлен в таблице 6.4. По результатам расчетов можно сделать вывод что внесение возвратного активного ила в аэротенк в объеме 5 % от его объема (570 м³/ч) приведет к экономии в размере 722 тысяч 700 рублей, без учета увеличения затрат на перекачку и утилизацию избыточного активного ила.

Таблица 6.4 – Расчет затрат электроэнергии на перекачку активного ила

| Аналог/ Проект | Работа центробежных насосов, м ³ /ч | Время работы в сутки (t), ч | Время работы в год, сутки | N, кВт | m _э , руб./кВт·ч | P _э , руб./сутки | Затраты на работу центробежных насосов, руб. |
|--|--|-----------------------------|---------------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| Аналог | Q ₁ = 750 | 24 | 365 | 125 | 5,5 | 16 500 | 6 022 500 |
| Проект | Q ₁ = 750 | 24 | 182,5 | 125 | 5,5 | 16 500 | 3 011 250 |
| | Q ₂ = 570 | 24 | 182,5 | 95 | 5,5 | 12 540 | 2 288 550 |
| Экономия, от работы центробежных насосов, руб. | | | | | | | +722 700 |

Расчет затраченной электроэнергии производили по формуле (6.4):

$$P_э = N \cdot t \cdot m_э, \quad (6.4)$$

где N – суммарная мощность насосов, используемых в процессе перекачки возвратного активного ила, кВт;

t – время эксплуатации оборудования, ч;

m_э – стоимость одного кВт·ч электроэнергии, равная 5,5 рублей.

Расчет затрат электроэнергии на обезвоживание активного ила представлен в таблице 6.5. Из таблицы видно, что изменение объема возвратного активного ила (570 м³/ч) приведет к увеличению затрат на электроэнергию в размере 144 тысяч 540 рублей в год.

Таблица 6.5 – Расчет затрат электроэнергии на обезвоживание избыточного активного ила

| Аналог/ Проект | Работа центрифуг, м ³ /ч | Время работы в сутки (t), ч | Время работы в год, сутки | N, кВт | m _э , руб./кВт·ч | P _э , руб./сутки | Затраты на работу центрифуг, руб. |
|-------------------------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------|-----------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| Аналог | Q ₃ = 25 | t ₁ = 10 | 365 | 60 | 5,5 | 3 300 | 1 204 500 |
| Проект | Q ₃ = 25 | t ₁ = 10 | 182,5 | 60 | 5,5 | 3 300 | 602 250 |
| | Q ₃ = 25 | t ₂ = 12,4 | 182,5 | 60 | 5,5 | 4 092 | 746 790 |
| Экономия, от работы центрифуг, руб. | | | | | | | - 144 540 |

В таблице 6.6 приведен расчет затрат на уплату НДС за взвешенные вещества. Показано, что изменение объема возвратного активного ила приведет к экономии в размере 596 тысяч 503 рублей 50 копеек в год.

Таблица 6.6 – Расчет затрат на уплату НДС за взвешенные вещества в БОСВ

| Аналог/ Проект | Работа центробежн ых насосов, м ³ /ч | Время работы в год, сутки | Доза ила в аэротен ке, г/л | Количество взвешенн ых веществ в БОСВ, мг/л | Объем БОСВ, сбрасывае мый в водоем, м ³ /ч | НДС (плата) БОС г. Зеленодоль ск, руб./тонна | Затраты на уплату НДС, руб. |
|-------------------------------|--|------------------------------------|--|--|--|---|-----------------------------------|
| Аналог | Q ₁ = 750 | 365 | a ₁ = 2,5 | TTS ₁ = 14,55 | 1300 | 30 000 | 4 970 862 |
| Проект | Q ₁ = 750 | 182,5 | a ₁ = 2,5 | TTS ₁ = 14,55 | 1300 | 30 000 | 2 485 431 |
| | Q ₂ = 570 | 182,5 | a ₂ = 1,9 | TTS ₂ = 11,058 | 1300 | 30 000 | 1 888 927,5 |
| Экономия, на уплату НДС, руб. | | | | | | | + 596 503,5 |

Дозу активного ила в аэротенке рассчитывали по формуле 6.5:

$$a_2 = a_1 \cdot \left(\frac{Q_2}{Q_1}\right), \quad (6.5)$$

где a₁ – нормативная доза активного ила в аэротенке, г/л;

Q₁ – нормативный объем возвратного активного ила, поступающего в аэротенк, м³/ч;

Q₂ – измененный объем возвратного активного ила, поступающего в аэротенк, м³/ч.

Количества взвешенных веществ в БОСВ рассчитывали по формуле 6.6:

$$TTS_2 = TTS_1 \cdot \left(\frac{a_2}{a_1}\right), \quad (6.6)$$

где TTS_1 – количество взвешенных веществ в норме, мг/л;

a_1 – нормативная доза активного ила в аэротенке, г/л;

a_2 – измененная доза активного ила в аэротенке, г/л.

Расчет затрат на плату при размещении обезвоженного активного ила представлен в таблице 6.7. Из таблицы видно, что изменение объема возвратного активного ила приводит к экономии затрат на размещение обезвоженного активного ила в размере 6 тысяч 707 рублей 40 копеек в год.

Таблица 6.7 – Расчет затрат на плату при размещении обезвоженного активного ила

| Аналог/ Проект | Работа центри фуг, м ³ /ч | Время работы в сутки (t), ч | Время работы в год, сутки | Доза ила в аэрот енке, г/л | Плата за вывоз обезвоже нного активного ила, руб./тонна | Ставка платы при размещении отходов V класса опасности, руб./тонна | Коэффициент при расчете платы за размещение отходов V класса опасности в 2023 г. | Затраты на размещение обезвоженн ого активного ила, руб. |
|---|---|--------------------------------------|------------------------------------|--|---|--|---|---|
| Аналог | $Q_3 = 25$ | 10 | 365 | 2,5 | 1 000 | 16,6 | 1,26 | 232 896,5 |
| Проект | $Q_3 = 25$ | 10 | 182,5 | 2,5 | 1 000 | 16,6 | 1,26 | 116 448,25 |
| | $Q_3 = 25$ | 12,4 | 182,5 | 1,9 | 1 000 | 16,6 | 1,26 | 109 740,8 |
| Экономия, на размещение обезвоженного активного ила, руб. | | | | | | | | + 6707,4 |

Суммарный годовой экономический эффект от внедрения проектного предложения рассчитывали по формуле 6.7:

$$\mathcal{E}_{\text{год}} = C_1 + C_2 + C_3 + C_4, \quad (6.7)$$

где C_1 – Затраты на работу центробежных насосов, руб.;

C_2 – Затраты на работу центрифуг, руб.;

C_3 – Затраты на уплату НДС, руб.;

C_4 – Затраты на размещение обезвоженного активного ила, руб.

$$\mathcal{E}_{\text{год}} = 722\,700 + (-144\,540) + 596\,503,5 + 6707,4 = 1\,181\,370,9 \text{ руб.}$$

Таким образом, суммарный экономический эффект от внедрения проектного предложения для БОС г. Зеленодольск составит не менее 1 миллиона 181 тысяч рублей в год.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Оценена активность внеклеточных лектинов бактерий накопительных культур. Было отмечено, что КЖ *B. subtilis* 534 способна вызывать агглютинацию клеток всех исследуемых культур микроорганизмов.

2. Проведена оценка биосинтеза внеклеточных лектинов от фазы роста культуры *B. subtilis* 534 в процессе периодического культивирования. Максимальная активность внеклеточных лектинов (титр RA = 4 ед.) наблюдалась в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста культуры. На протяжении всей стационарной фазы и последующей фазы отмирания лектиновая активность снижалась (титр RA = 2 ед.) в период с 22 по 28-й час культивирования. При этом в лаг-фазе и фазе отмирания клеток лектиновая активность не была отмечена.

3. Экспериментально подтверждено, что добавление КЖ *B. subtilis* 534 и *E. coli* М-17 (как источника внеклеточных лектинов) к суспензии клеток изолята ФАО увеличивает способность клеток к образованию биопленок на 15 % и 10 %, соответственно, по сравнению с контролем. Добавление к клеткам ФАО суспензии *B. subtilis* 534 и *E. coli* М-17 обуславливает увеличение образования биопленки на 66 % и 22 %, соответственно, в сравнении с контролем.

4. Получены изоляты (А1, А2, А3, А4, BS1) из микробного сообщества активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск, Республика Татарстан. По фенотипическим и физиолого-биохимическим признакам изоляты А1-А4 описаны как бактериальные культуры, относимые к *Acinetobacter sp.* и *Escherichia sp.* По совокупности физиолого-биохимических признаков, а также по результатам секвенирования гена 16S рРНК изолят BS1 отнесен к бактериям рода *Bacillus*.

5. Оценена активность внеклеточных лектинов изолята BS1 к клеткам изолятов А1, А2, А3, А4. Наибольшую активность изолят BS1 проявлял к углеводным детерминантам изолята А2 (титр RA = 2 ед.); наименьшую активность – изолятов А1 и А4 (титр RA = 1 ед.); не проявлял активности к А3 (титр RA = 0 ед.). Зависимость лектиновой активности изолята BS1 от фазы ее роста в процессе периодического культивирования показала, что пик активности

наблюдался во время экспоненциальной фазы (титр НА = 8 ед.). На протяжении всей стационарной фазы и последующей фазы отмирания лектиновая активность снижалась (титр НА= 2 ед.) в период с 15 по 20-й час. При этом в лаг-фазе и фазе отмирания клеток лектиновая активность не наблюдалась.

6. Показано, что ЛСБС (КЖ, БОСВ) обладают свойствами природных флокулянтов при их внесении в активный ил. При внесении КЖ изолята BS1 объемом 0,25 % от объема активного ила отмечено как увеличение скорости осаждения ила от 50 % до 118 % в начальный период времени, так и изменение условного диаметра хлопка активного ила (в 2,8 раз), по сравнению с контрольным образцом. Также отмечено, что данный объем, вносимый в активный ил, приводил к незначительному увеличению активности дегидрогеназ ила, в среднем, на 7 %. Влияние БОСВ на седиментацию активного ила показало, что при дозе ила 2,7 г/л внесение от 5 % до 10 % БОСВ от объема активного ила как ускоряло осаждение иловых хлопьев в среднем на 10-20 % в начальный период времени, так и увеличивало УДХ ила от 3 % до 15 %, соответственно, по сравнению с контролем. Таким образом, полученные результаты продемонстрировали очевидную зависимость между лектиновой активностью (НА) в ЛСБС, скоростью седиментации и процессом агрегации хлопьев активного ила.

7. Расчеты экономических показателей процесса изменения объема возвратного активного ила для БОС г. Зеленодольск показали экономию денежных средств в размере не менее 1,18 млн. руб./год. Изменение количества возвратного активного ила в аэротенке с 750 м³/ч до 570 м³/ч, при прочих неизменных условиях процесса очистки, может приводить к повышению эффективности осаждения активного ила до 20 %, снижению илового индекса на 10 %, увеличению времени пребывания сточной воды в аэротенке на 10 %, а также к снижению затрат электроэнергии на перекачку возвратного ила.

Перспективы дальнейших исследований связаны с использованием ЛСБС (КЖ и БОСВ) в качестве природных флокулянтов для улучшения седиментационных свойств активного ила в системах биологической очистки сточных вод.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЛСБС – лектинсодержащие биологические среды

КЖ – культуральная жидкость

БОСВ – биологически очищенная сточная вода

ФГА-П – фитогемагглютинин (растительный лектин) из плодов фасоли *Phaseolus vulgaris*

БОС – биологические очистные сооружения

ФАО – фосфатаккумулялирующие организмы

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

LecA – белок, лектин *P. aeruginosa*

lecA – ген, кодирующий синтез белка (лектина) LecA

in vivo – проведение экспериментов на (или внутри) живой ткани при живом организме

in vitro – проведение эксперимента «в пробирке» — в искусственных условиях, вне организма или естественной среды

Psl – экзополисахарид *P. aeruginosa*

КМ – клеточная мембрана

ВНК – внеклеточные

АГ – аппарат Гольджи

ЭР – эндоплазматический ретикулум

УСД – углеводсвязывающий домен

ХПК (COD) – химическое потребление кислорода

Color – цветность

TDS – общее количество растворенных веществ

QS – чувство кворума

eDNA – внеклеточная ДНК

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКазы – эндонуклеаза, расщепляющая одно- и двухцепочечную ДНК

DES – вода, не содержащая ДНКазы, для выделения и очистки ДНК

FastDNA Spin Kit For Soil – набор для выделения геномной ДНК из почв

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit – набор реактивов для секвенирования по методу Сэнгера

MT-буфер – раствор для лизиса, позволяющий извлекать геномную ДНК с минимальным загрязнением РНК.

SEWS-M – промывочный раствор на основе этанола, используемый при экстракции ДНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

16S рРНК – 16S рибосомальная рибонуклеиновая кислота

bar – белки – белки, ассоциированные с биопленкой

АГЛ – ацелированный гомосерин лактон

ц-ди-ГМФ – циклический димер (3' > 5') гуанозинмонофосфата

НА – гемагглютинирующая активность

РА – агглютинирующая активность

МПБ – мясо-пептонный бульон

КОЕ – колониеобразующая единица

АСВ – абсолютно сухое вещество

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singh, R.S. Lectins: sources, activities, and applications / R.S. Singh, A.K. Tiwary, J.F. Kennedy // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 1999. – V. 19., № 2. – P. 145-178.
2. Sharon, N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules / N. Sharon, H. Lis // *Glycobiology*. – 2004. – V. 14., № 11. – P. 53-62.
3. Cheah, Yi Tong. Fishfarm wastewater treatment using *Moringa oleifera* seed powder as natural coagulant / T. Y. Cheah, Y. C. B. H. Fakhira, Derek C.J.C // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2021. – V. 945. – P. 1-7.
4. Ancy, J.A. Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* / J.A. Ancy, M. Vasanthi, C. Thamarai, B. Ravindran, Woo Jin Chung, Soon Woong Chang // *Journal of Water Process Engineering*. – 2021. – V. 39., № 101742. – P. 1-11.
5. Park, C. Characterization of lectins and bacterial adhesins in activated sludge flocs / C. Park, J.T. Novak // *Water environment research*. – 2009. – V. 81., № 8. – P. 755-764.
6. Игнатов, В.В. Углеводузнающие белки – лектины / В.В. Игнатов // *Биология (Соросовский образовательный журнал)*. – 1997. – № 2. – С. 15-20.
7. Liener, I.E. The Lectins: Properties, functions and applications in biology and medicine / I.E. Liener, N. Sharon, I.J. Goldstein // Academic Press, Inc.: Orlando. – 1986. – 600 p.
8. Лахтин, В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов / В.М. Лахтин // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология*. М.: ВИНТИ, 1987. – Т. 2. – С. 4-40.
9. Kocourek, J. A note on the recent discussion on the definition of the term "lectin" / J. Kocourek, V. Horejsi // *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. – 1983. – V. 3. – P. 3-6.
10. Etzler, M. Introduction. In Irwin Goldstein and Marylinn Etzler (Eds.), *Chemical taxonomy, molecular biology and function of plant lectins* / M. Etzler // *Progress in Clinical and Biological Research*. – 1983. – V. 138. – P. 1-5.
11. Trombetta, E.S. Lectins as chaperones in glycoprotein folding / E.S. Trombetta, A. Helenius // *Current Opinion in Structural Biology*. – 1998. – № 8. – P. 587-592.

12. Шакирова, Ф.М. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений / Ф.М. Шакирова, М.В. Безрукова // *Общая биология*. – 2007. – Т. 68., № 2. – С. 98-114.
13. Павловская, Н.Е. Функциональная роль лектинов растений как предпосылка для их применения в биотехнологии / Н.Е. Павловская, И.Н.Гагарина// *Химия растительного сырья*. – 2017. – № 1. – С. 21-35.
14. Michiels, K. Plant – insect interactions: What can we learn from plant lectins? / K. Michiels, E. Van Damme, G. Smagghe // *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* – 2010. – V. 73. – P. 193-212.
15. Неверова, Н.Н. Изучение роли лектинов *Paenibacillus polymyxa* в регуляции метаболизма животных: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Неверова Наталья Николаевна. – Саратов. 2008. – 104 с.
16. Степанова, Л. В. Выделение и характеристика мицелиального лектина базидиомицета *Grifola frondosa* (Fr.) S.F. Gray.: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.00.07 / Л.В. Степанова. – Саратов. – 2008. – 130 с.
17. Slifkin, M. Lectins and their use in clinical microbiology / M. Slifkin, R.J. Doyle // *Clin. Microbiol.* – 1990. – V. 3., № 3. – P. 197-218.
18. Черников, О.В. Лектин красной водоросли *Tichocarpus crinitus*. Биологическая активность лектинов морских гидробионтов: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Черников Олег Викторович. – Владивосток, 2008. – 113 с.
19. Dodd, R.B. Lectin – like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity / R.B. Dodd, K. Drickamer // *Glycobiology*. – 2001. – V. 11., № 5. – P. 71R-79R.
20. Gallagher, J.T. Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification / J.T. Gallagher // *Biosci. Rep.* – 1984. – V. 4. – P. 621-632.
21. Brunins, G. Interaction between *Y. pseudotuberculosis* and the Hela cell surface / G. Brunins, J. Bolin // *J. Med.Microbiol.* – 1983. – V. 16. – P. 245-261.
22. Kanoe, M. Adherence of *Fusobacterium necrophorum* to Vero cells / M. Kanoe, S. Nagai, M. Toda // *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.* – 1985. – V. 260. – P. 100-107.

23. Eshdat, Y. Isolation of a mannose-specific lectin from *E. coli* and its role in the adherence of the bacteria to epithelial cells / Y. Eshdat, I. Ofek, Y. Yashouw-Gan, N. Sharon, D. Mirelman, // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1978. – V. 85. – P. 1551-1559.
24. Мельникова, У.Ю. Лектины *Bacillus polymyxa*: физико-химические и биологические свойства: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.00.07 / У.Ю. Мельникова. – Саратов. – 2000. – 120 с.
25. Eshdat, Y. Dissociation and reassembly of *E. coli* type I pili (fimbriae) / Y. Eshdat, F. Silverblatt, N. Sharon // *J. Bacteriol.* – 1981. – V. 148. – P. 308-314.
26. Razin, S. Adhesion and microorganism pathogenicity / S. Razin, I. Kahane, M. Banai // II CIBA Foundation Symposium, England: Bath. – 1981. – № 80. – P. 98-118.
27. Vesper, J. Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots / J. Vesper, W. Bauer // *Appl. and Environm. Microbiol.* – 1986. – V. 52., № 1. – P. 134-141.
28. Кикалова, Т.В. Биологическая активность лектина *Paenibacillus polymyxa in vitro* и в организме животных: диссертация ... кандидата медицинских наук: 03.00.07 / Т.В. Кикалова. – Саратов – 2009. – 143 с.
29. Никитина, В.Е. Роль агглютининов клеточной поверхности *Rhizobium leguminosarum* в прикреплении к корням гороха / В.Е. Никитина // *Микробиология.* – 1996. – Т. 65., № 4. – С. 512-516.
30. Никитина, В.Е. Изучение роли лектинов клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы / В.Е. Никитина, С.А. Аленькина, Е.Г. Пономарева, Н.Н. Савенкова // *Микробиология.* – 1996. – Т. 2. – С. 165-170.
31. Карпунина, Л.В. Изучение бактерицидных и фунгицидных свойств белков-агглютининов (лектинов) почвенных азотфиксирующих бактерий / Л.В. Карпунина, Е.Г. Пономарева, Е.Ф. Соболева, В.Е. Никитина // *Биотехнология.* – 1997. – Т. 3. – С. 10-13.
32. Карпунина, Л.В. Бактерицидные свойства лектинов азотфиксирующих бацилл / Л.В. Карпунина, У.Ю. Мельникова, Ю.В. Сулова, Е.С. Мухачева, В.В. Игнатов // *Микробиология.* – 2003. – Т. 72., № 3. – С. 343-347.

33. Bowles, D.J. Distribution of lectins in membranes of soybean and peanut plants. I. General distribution in root, shoot and leaf tissue at different stages of growth / D.J. Bowles // *Planta*. – 1997. – V.145., № 2. – P. 193-198.
34. Karpunina, L.V. Effect of agglutinins from *Rhizobium leguminosarum* strain 252 on the activity of hydrolytic enzymes / L.V. Karpunina, E.F. Soboleva, O. A. Pronina // *Current Microbiology*. –2000. – V. 41. – P. 73-75.
35. Sugii, S. Haemagglutinating activity of trypsinized *Clostridium perfringens* enterotoxin / S. Sugii, Y. Horiguchi, T. Uemura // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1986. – V. 34., № 2. – P. 205-209.
36. Sugii, S. Haemagglutinating activity of *Vibrio cholerae* enterotoxin / S. Sugii // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1987. – V. 48., № 1. – P. 73-77.
37. Колякина, А.В. Лектиновые рецепторы холерных вибрионов: диссертация ... кандидата медицинских наук: 03.00.07 / А.В. Колякина. – Ростов-на-Дону. – 2009. – 148 с.
38. Dotevall, H. Characterization of endotoxin and soluble haemagglutinin from *Vibrio mimicus*: identity with *Vibrio cholerae* 01 toxin and haemagglutinin / H. Dotevall, G. Jonson–Stromberg, S. Sanyal, J. Holmgren // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1985. – V. 27., № 1. – P. 17-22.
39. Луцик, М.Д. Лектины / М.Д. Луцик, Е.Н. Панасюк, А.Д. Луцик // Львов: Высшая школа. – 1981. – 156 с.
40. Ямалеева, А. А. Лектины растений и их биологическая роль: диссертация ... доктора биологических наук: 03.00.12 / А. А. Ямалеева. – Уфа: Башкирский университет. 2001. – 349 с.
41. Лахтин, В.М. Очистка ферментов с помощью лектинов / В.М. Лахтин // *Биотехнология*. – 1985. – № 5. – С. 11-25.
42. Мухачева, Е.С. Влияние лектина *Paenibacillus polymyxa* на некоторые метаболические процессы животных: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.00.07 / Е.С. Мухачева. – Саратов. – 2004. – 139 с.
43. Mattiasson, B. Analytical applications of immobilized cells. Immobilized cells and organelles / B. Mattiasson // Florida: CRC Press, Boca Raton. – 1983. – V. 2 – P. 95-123.

44. Mattiasson, B. Reversible immobilization of enzymes with special reference to analytical applications / B. Mattiasson // J. Appl. Biochem. – 1981. – V. 3., № 3. – P. 183-194.
45. Mandenius, C.F. The interaction of protein and cells with affinity ligands covalently coupled to silicon surfaces / C.F. Mandenius, S. Welin, B. Danielsson, I. Lundström, K. Mosbach // Anal. Biochem. – 1984. – V. 137., № 1. – P. 106-114.
46. Diaz–Maurino, T. Different approaches to the elucidation of the atomic features of protein–carbohydrate infractions / T. Diaz–Maurino // European Journal cell biology. – 1997. – V. 1. – P. 74-79.
47. Варбянец, Д.Д. Взаимодействие лектина из картофеля с гликополимерами *Corynebacterium sepedonicum*, *Pseudomonas solanacearum* / Д.Д. Варбянец // Уч. зап. Тартус. ун–та. – 1989. – Т. 2. – С. 73-76.
48. Лахтин, В.М. Лектины в исследовании углеводной части гликопротеинов и других природных гликоконъюгатов / В.М. Лахтин // Биохимия. – 1995. – Т. 60., № 2. – С. 187-217.
49. Лахтин, В.М. Лектины регуляторы метаболизма / В.М. Лахтин // Биотехнология. – 1986. – Т. 2., № 6. – С. 66-79.
50. Fukumori, F. Cloning and expression of a functional fucose–specific lectin from an orange peel mushroom, *Aleuria aurantia* / F. Fukumori, N. Takeuchi, T. Hagiwara, K. Ito, N. Kochibe, A. Kobata, Y. Nagata // FEBS Lett. – 1989. – V. 250. – P. 153-156.
51. Ahmad, A. Strategies for designing antibody–toxin conjugates / A. Ahmad, K. Law // Trends in Biotechnol. – 1988. – V. 6., № 10. – P. 246-251.
52. Ohtoyo, T. Change in membrane fluidity induced by lectin–mediated phase separation of the membrane and agglutination of phospholipid vesicles containing glycopeptides / T. Ohtoyo, M. Shimagaki, K. Otoda, S. Kimura, Y. Imanishi // Biochemistry. – 1988. – V. 27., № 17. – P. 6458-6463.
53. Гостев, В.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журн. инфектологии. – 2010. – Т. 2., № 3. – С. 4-15.
54. Tetz, V.V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies / V.V. Tetz // Med Microbiol. Lett. – 1996. – V. 5. – P.426-436.

55. Голуб, А.В. Бактериальные биоплёнки – новая цель терапии? / А.В. Голуб // *Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия.* – 2012. – Т. 4., № 1. – С. 23-30.
56. Ильина, Т.С. Биоплёнки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // *Генетика.* – 2004. – Т. 40., № 11. – С. 1445-1456.
57. Романова, Ю.М. Биоплёнки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биоплёнками / Ю.М. Романова, Л.В. Диденко, Э.Р. Толордова, А.Л. Гинцбург // *Вестн. РАМН.* – 2011. – № 10. – С. 31-39.
58. Крюков, А.И. Биоплёнки в этиологии и патогенезе хронического тонзиллита / А.И. Крюков, В.Н. Жуховицкий, А.С. Товмасын // *Вестн. оториноларингологии.* – 2008. – № 3. – С. 71-73.
59. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science.* – 1999. – V. 284., № 5418. – P. 1318-1322.
60. Гинцбург, А.Л. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий / А.Л. Гинцбург, Т.С. Ильина, Ю.М. Романова // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* – 2003. – № 5. – С. 86-93.
61. Ильина, Т.С. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // *Мол.генетика, микробиол. и вирусол.* – 2006. – № 3. – С. 22-29.
62. Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R.M. Donlan, J.W. Costerton // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002. – V. 15., № 2. – P. 167-193.
63. Parsek, M. R. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms / M. R. Parsek, E. P. Greenberg // *Trends Microbiol.* – 2005. – V. 13., № 1. – P. 27-33.
64. Pace, J. L. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy / J. L. Pace, E. R. Mark, G. Roger // Boca Raton: Taylor & Francis Group. – 2006. – 495 p.
65. Wolcott, R. D. Biofilms and chronic infections / R. D. Wolcott, G. D. Ehrlich // *JAMA.* – 2008. – V. 299., № 22. – P. 2682-2684.

66. Петрова, Н.В. Биопленки: этапы формирования, свойства и клинические последствия / Н.В. Петрова // Клиническая патофизиология – 2015. – № 3. – С. 9-16.
67. Гостев, В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2., № 3. – С. 4-15.
68. Liao, J. The MerR – like transcriptional regulator BrlR contributes to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance / J. Liao, K. Sauer // J. Bacteriol. – 2012. – V. 194., № 18. – P. 4823-4836.
69. Sun, F. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies / F. Sun, F. Qu, Y. Ling, P. Mao, P. Xia, H. Chen, D. Zhou, // Future Microbiol. – 2013. – V. 8., № 7. – P. 877-886.
70. Gera, C. Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication / C. Gera, S. Srivastava // Current Science. – 2006. – V. 90., № 5. – P. 666-677.
71. Xavier, J.B. Cooperation and conflict in microbial biofilms / J.B. Xavier, K R. Foster // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – V. 104., № 3. – P. 876-881.
72. Mohamed, J.A. Biofilm formation by enterococci / J.A. Mohamed, D.B. Huang // J. Med. Microb. – 2007. – V. 56., № 12. – P. 1581-1588.
73. Xiao, J. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm / J. Xiao, M.I. Klein, M.L. Falsetta, B. Lu, C.M. Delahunty, J.R. Yates, A. Heydorn, H. Koo // PLoS Pathog. – 2012. – № 8. – P.1–16.
74. Darouiche, R.O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence / R.O. Darouiche // Clin. Infect. Dis. – 2001. – V. 33., № 9. – P. 1567-1572.
75. Марданова, А.М. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие / А.М. Марданова, Д.А. Кабанов, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова // Казань: К(П)ФУ, 2016. – 42 с.
76. Mattos-Guaraldi, A.L. Cell surface component and adhesion in *Corynebacterium diphtheria* / A.L. Mattos-Guaraldi, L.C.D. Formiga, G.A. Pereira // Microbes Infect. – 2000. – V. 2., № 12. – P. 1507-1512.

77. Hobley, L. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes / L. Hobley, C. Harkins, C.E. MacPhee, N.R. Stanley–Wall // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2015. – V. 39. – P. 649-669.
78. Camilli, A. Bacterial small–molecule signaling pathways / A. Camilli, B.L. Bassler // *Science.* – 2006. – V. 311. – № 5764. – P. 1113-1116.
79. De Keersmaecker, S.C. Let LuxS speak up in AI–2 signaling / S. C. De Keersmaecker, K. Sonck, J. Vanderleyden // *Trends Microbiol.* – 2006. – V. 14., № 3. – P. 114-119.
80. Хренов, П. А. Обзор методов борьбы с микробными биоплёнками при воспалительных заболеваниях / П. А. Хренов, Т. В. Честнова // *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание.* – 2013. – № 1. – 4 с.
81. Хренов, П.А. Эффект диметилсульфоксида в отношении биоплёнкообразования штаммами *Staphylococcus aureus* / П. А. Хренов, Т. В. Честнова // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* – 2014. – № 5. – С. 140-141.
82. Jorge, P. New trends in peptide–based anti–biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches / P. Jorge, A. Lourenco, M. O. Pereira // *Biofouling.* – 2012. – V. 28., № 10. – P. 1033-1061.
83. Khan, W. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide / W. Khan, S.P. Bernier, S. L. Kuchma, J.H. Hammond, F. Hasan, G.A. O’Toole // *Int. Microbiol.* – 2010. – V. 13., № 4. – P. 207-212.
84. Tateda, K. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N–3–oxododecanoylhomoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils / K. Tateda, I. Yoshikazu, H. Manabu, T. Matsumoto, M. Shinichi, J. C. Pechere, T. J. Standiford, M. Ishiguro, K. Yamaguchi // *Infect. Immun.* – 2003. – V. 71., № 10. – P. 5785-5793.
85. Fuqua, W.C. Regulation of gene expression by cell–to–cell communication: acyl–homoserinelacton quorum sensing / W.C. Fuqua, M.R. Parces, E.P. Greenberg // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – V. 3., № 9. – P. 685-695.

86. Miller, M.B. Quorum sensing in bacteria / M.B. Miller, B.L. Bassler // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2001. – V. 55., № 1. – P. 165-199.
87. Novick, R.P. Autoinduction and signal transduction in the regulation of *Staphylococcus aureus* / R.P. Novick // *Infect. and Immun.* – 2003. – V. 48., № 6. – P. 1429-1449.
88. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M.E. Davey, G.A. O'Toole // *Microbiol Mol. Biol. Rev.* – 2000. – V. 64., № 4. – P. 847-867.
89. Costi, D.S. Quorum sensing: talk sense / D.S. Costi // *Clin. Inf. Dis.* – 2008. – V. 47., № 8.– P. 1070-1076.
90. Mehta, P. Information processing and signal integration in bacterial quorum sensing / P. Mehta // *Mol. Syst. Biol.* – 2009 – V. 5. (325) – P. 1-11.
91. Roy, V. Cross species quorum quenching using a native AI-2 processing enzyme / V. Roy // *ACS Chem. Biol.* – 2010. – V.5., № 2. – P. 223-232.
92. Williams, P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world / P. Williams // *Microbiology.* – 2007. – V. 153., № 12. – P. 3923-3938.
93. Nakao, H. Heterogeneity of diphtheria toxin gene, *tox* and its regulatory element, *dtxR*, in *Corynebacterium diphtheria* strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine / H. Nakao, J.M. Pruckler, I.K. Mazurova // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – V. 34., № 7. – P. 1711-1716.
94. Keren, I. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / I. Keren // *J. Bact.* – 2004. – V. 186., № 24. – P. 8172-8180.
95. Allesen – Holm, M. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms / M. Allesen – Holm, B. Barken, L. Yang // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V. 59., № 4. – P. 1114-1128.
96. Lombardia, E. LuxS-dependent cell-to-cell language regulates social behavior and development in *Bacillus subtilis* / E. Lombardia, J. Adria'n, A. Rovetto, L. Arab-olaza, R.A. Grau // *Am. Soc. Microbiolog.* – 2006. – V. 188., № 12. – P. 4442-4452.

97. Pappas, K. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthase and receptors required for intercellular signaling / K. Pappas, C. Weingart, S. Winans // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 53. – P. 756-769.
98. Diggle, S.P. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* / S.P. Diggle, S. Stacey, C. Dodd, M. Cámara, P. Williams, K. Winzer // *Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 8., № 6. – P. 1095-1104.
99. Tielker, D. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation / D. Tielker, S. Hacker, R. Loris, M. Strathmann, J. Wingender, S. Wilhelm, F. Rosenau, K.–E. Jaeger // *Microbiology.* – 2005.– V. 151.– P. 1313-1323.
100. Sonawane, A. *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins / A. Sonawane, J. Jyot, R. Ramphal // *Infect. Immun.* – 2006. – V. 74., № 12. – P. 7035-7039.
101. Johansson, E.M.V. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB / E.M.V. Johansson, S.A. Crusz, E. Kolomiets, L. Buts, R.U. Kadam, M. Cacciarini, K.–M. Bartels, S.P. Diggle, M. Camara, P. Williams, R. Loris, C. Nativi, F. Rosenau, K.–E. Jaeger, T. Darbre, J.–L. Reymond // *Chem. Biol.* – 2008. – V. 15., № 12. – P. 1249-1257.
102. Chemani, C. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa* induced lung injury and effect of carbohydrate ligands / C. Chemani, I. Anne, B. Sophie, P. Maud, W. Michaela, G. P. Benoît, F. Karine // *Infect. Immun.* – 2009. – V. 77., № 5. – P. 2065-2075.
103. Ma, L. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix / L. Ma, M. Conover, H. Lu, M.R. Parsek, K. Bayles, D.J. Wozniak // *PLoS Pathog.* – 2009. – V. 5., № 3 – P.1-11.
104. Ma, L. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide / L. Ma, H. Lu, A. Sprinkle, M.R. Parsek, D.J. Wozniak // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 189., № 22. – P. 8353-8356.
105. Byrd, M.S. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis

enzymes in Psl and LPS production / M.S. Byrd, I. Sadovskaya, E. Vinogradov, H. Lu, A. B. Sprinkle, S. H. Richardson, L. Ma, B. Ralston, M. R. Parsek, E. M. Anderson, J. S. Lam, D. J. Wozniak // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V. 73., № 4. – P. 622-638.

106. Borlee, B.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix / B.R. Borlee, A.D. Goldman, K. Murakami, R. Samudrala, D.J. Wozniak, M.R. Parsek. // *Mol. Microbiol.* – 2010. – V. 75., № 4. – P. 827-842.

107. Starkey, M. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung / M. Starkey, H. H. Jason, M. Luyan, Z. Niu, D. L. Susan, H. Aaron, P. Sergio, M. Colin, K. J. Mary, S. D. Timothy, W. J. Daniel, H. S. Caroline, P. R. Matthew // *J. Bacteriol.* – 2009. – V. 191., № 11. – P. 3492-3503.

108. Sudakevitz, D. A new *Ralstonia solanacearum* high-affinity mannose-binding lectin RS-III structurally resembling the *Pseudomonas aeruginosa* fucose-specific lectin PA-III / D. Sudakevitz, N. Kostlanova, G. Blatman-Jan, E.P. Mitchell, B. Lerrer, M. Wimmerova, D.J. Katcoff, A. Imberty, N. Gilboa-Garber // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 52. – P. 691-700.

109. Емельянова, Е.Н. Аспекты управления водным хозяйством: эффективный и ценосберегающий способ удаления фосфора из сточных вод / Е.Н. Емельянова // *Известия Челябинского научного центра.* – 2005. – № 1. – С. 72-76.

110. Жмур, Н. С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками / Н. С. Жмур. – М.: АКВАРОС. – 2003. – 512 с.

111. Максимов, С.П. Обзор методов биологической очистки сточных вод / С.П.Максимов, И.А. Алексеев // *Технические науки – от теории к практике.* – 2014. – № 41. – С. 95-101.

112. Сидорова, Л.П. Очистка сточных и промышленных вод: учебное пособие / Л.П.Сидорова, А.Н. Снигирева. – Екатеринбург: Методический совет УрФУ. – 2017 – 125 с.

113. Пучкова, Т.А. Биотехнология очистки промышленных отходов: учебное пособие / Т. А. Пучкова. – Минск: БГУ. – 2018. – 174 с.

114. Ручай, Н. С. Экологическая биотехнология: учебное пособие / Н. С. Ручай, Р. М. Маркевич. – Минск: БГТУ. – 2006. – 312 с.

115. Волкова, Е. М. Эффективность биотехнологических методов очистки сточных вод / Е. М. Волкова, Е.И. Якимчук, Я.А. Соколюк, И. Новик–Пивоварчик // Аграрная наука – сельскому хозяйству: материалы XI Междунар. научно - практической конференции – Барнаул. – 2016. – Т.2. – С. 321-323.

116. Гельфанд, Е.Д. Основы биологической очистки сточных вод: Лекция для студентов, обучающихся по специальностям 240700.62, 240100.62, 280200.62, 240406.01, 200402.01 [Электронный ресурс] // Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова. – Архангельск. – 2012. – Режим доступа: <https://library.narfu.ru/catalog/ELIB?-648728535> – свободный.

117. Великоредчанина, Е. О. Видовое разнообразие организмов активного ила, характеризующих работу сооружений биологической очистки сточных вод ООО «КОММУНАЛЬЩИК» [Электронный ресурс] / Е. О. Великоредчанина, Е. С. Чикишева, А. В. Киреева // Биодиагностика состояния природных и природно–техногенных систем: Материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров. – 2018. – Режим доступа: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=36586079> – свободный.

118. Борисова, М. И. Биопленкообразующая активность и феномен персистенции микроорганизмов / М. И. Борисова, Д. Н. Лазакович, Н. А. Сидорова, А. И. Савушкин // Journal of Biomedical Technologies. – 2015. – № 2. – С. 28-35.

119. Olson, M.E. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics / M.E. Olson, H. Ceri, D.W. Morck, A.G. Buret, R.R. Read // Can. J. Vet. Res. – 2002. – V. 66. – P. 86-92.

120. Сироткин, А.С. Агрегация микроорганизмов: флокулы, биопленки, микробные гранулы / А. С. Сироткин, Г. И. Шагинурова, К. Г. Ипполитов // Казань: Фэн. Акад. наук РТ. – 2007. – 157 с.

121. Yamazaki, Y. Partial purification of a bacterial lectin-like substance from *Eikenella corrodens* / Y. Yamazaki, S. Ebisu, H. Okada // Infect Immun. –1988. – V. 56. – P. 191-196.

122. Nakae, H. Production and characterization of monoclonal antibodies against bacterial lectins of *Eikenella corrodens* / H. Nakae, S. Ebisu, H. Okada // J Dent Res. – 1987. – V.28. – P.404-410.

123. Ebisu, S. Coaggregation of *Eikenella corrodens* with oral bacteria mediated by bacterial lectin-like substance / S. Ebisu, H. Nakae, H. Okada // Adv Dent Res. – 1988. – V.2. – P.323-327.

124. Никитина, В.Е. Лектины азоспирилл - свойства, биологическая активность и перспективы их практического использования: диссертация ... доктора биологических наук:03.00.07 / В.Е. Никитина. – Саратов. – 2001. – 310 с.

125. Фитогемагглютинин-П (ФГА-П), лиофилизированный, стерильный, 5 мг: [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.biolot.ru/catalogue/Reagents_for_cytogenetics/Phytohemagglutinin-P_sterile_lyophilized_cell_culture_grade_5_mg.html. – свободный.

126. Нетрусов, Ф.И. Практикум по микробиологии / Ф.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук. – Москва. – 2005. – 608 с.

127. Митишев, А.В. К вопросу разработки технологии культивирования и переработки *Chlorella vulgaris* для получения резиноида / А.В. Митишев, Е.В. Семенова, Е.В. Преснякова // Вестник Воронежского государственного университета. – 2017. – № 4. – С. 62-65.

128. Фалькович, Т.Н. Определение лектиновой активности с использованием клеток микроводорослей в качестве тест-объекта - метод альгоагглютинации / Т.Н. Фалькович, Н.А. Пронина, В.Е. Семенов // Физиология растений. – 1993. – Т. 40., № 3. – С. 497-499.

129. Невмержицкая, Ю.Ю. Практикум по физиологии и биохимии растений (белки и ферменты): учебно-методическое пособие / Ю.Ю. Невмержицкая, О.А. Тимофеева. – Казань: КГУ. – 2012. – 32 с.

130. Кирилина, Т.В. Оценка способности нитрифицирующих микроорганизмов к образованию биопленок / Т.В. Кирилина, З.Ш. Рахманкулова, А.С. Сироткин // Вестник технологического университета. – 2016. – Т.19., № 16. – С. 152-154.

131. Патент № 2660567 Российская Федерация, МПК С12Q 1/04 (2006.01); С12N 1/20 (2006.01); С12R 1/02 (2006.01). Способ выделения и идентификации бактерий комплекса *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*: / Сиволодский Е.П.; патентообладатель: Сиволодский Е.П. – № 2017130632; заявлено 29.08.2017, опубликовано 06.07.2018. – 8 с.

132. Феоктистова, Н.А. Выделение бактерий вида *Bacillus subtilis* из объектов санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев // Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и биотехнологии. – 2010. – Т.3. – С. 72-75.

133. Ribero, H.B. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information / H.B. Ribero, C.S. Argolo, R.C. Argolo-Filho, L.L. Loguerico // BMC microbiology. – 2019. – V. 74. – P.1-14.

134. Heuer, H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients / H. Heuer, M. Krsek, P. Baker, K. Smalla, E. M. Wellington // Appl Environ Microbiol. – 1997. – V. 63. – P. 33–41.

135. FastDNA™ Spin Kit for Soil [Электронный ресурс] // <https://www.mpbio.com/>: сайт – Режим доступа: https://www.mpbio.com/media/document/file/protocol/dest/f/a/s/t/d/FastDNA_SPIN_Kit_for_Soil_Detailed_Protocol_Insert_2021_WEB.pdf, свободный.

136. BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit [Электронный ресурс] // <https://www.thermofisher.com/>: сайт – Режим доступа: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2F4337035_BDTv31CycSqKt_RUO_UG.pdf, свободный.

137. Кулаков, А.А. Исследование седиментационных свойств иловой смеси городских канализационных очистных / А.А. Кулаков, Н.А. Макиша, А.Ф. Шафигуллина, Р.Хардер // Вестник МГСУ. – 2018. – Т. 13., № 5. – С. 643-650.

138. Жмур, Н.С. Гидрохимические методы контроля. Комплект методик по гидрохимическому контролю активного ила: определение массовой концентрации активного ила, илового индекса, зольности сырого осадка, активного ила, прозрачности надильной воды: федеральный реестр (ФР): ФР 1.31.2008.04397, ФР 1.31.2008.04398, ФР 1.31.2008.04399, ФР 1.31.2008.04400 / Н.С. Жмур. – Москва: АКВАРОС. – 2008. – 37 с.

139. Инструкция по лабораторному контролю очистных сооружений на животноводческих комплексах. Часть III. Определение биогенных веществ. Анализ осадков и ила. – Москва. – 1984. – 34 с.

140. Кобелева Й.В. Биологическая очистка коммунально-бытовых сточных вод с применением реагентных препаратов: дис. ... канд. тех. наук: 03.01.06 / Кобелева Йолдыз Витальевна. – Казань, 2017. – 146 с.

141. Осаждение белков сульфатом аммония [Электронный ресурс] // <http://molbiol.ru/>: сайт – Режим доступа: http://molbiol.ru/protocol/17_15.html, свободный.

142. Кобелев, А.В. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий в формировании агрегированных микробных форм / А.В. Кобелев, С.В. Клементьев, Т.В. Вдовина, А.С. Сироткин // Бутлеровские сообщения. – 2021. – Т. 65., № 1. – С. 105-111.

143. Калебина, Т.С. Молекулярная организация клеточной поверхности дрожжей / Т.С. Калебин, В.В. Рекстин // Молекулярная биология. – 2019. – Т.65., № 6. – С. 105-111.

144. Rodrigo, H. G. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains / H. G. Rodrigo, N. Alejandro, N. Clara B. // Microbiol. Res. –2001. – V.155. – P. 271-277.

145. Бисенова, Г. Н. Изучение динамики роста бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* при периодическом культивировании / Г. Н. Бисенова, А. К. Торина, А. А. Шегебаева // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – 2014. – № 3. – С. 3-9.

146. Подгорский, В.С. Внеклеточные лектины сапрофитных штаммов бактерий рода *Bacillus* (Обзор) / В.С. Подгорский, Э.А. Коваленко, И.С. Карпова,

Е.В. Сащук, Е.И. Гетьман // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50., № 3. – С. 256-263.

147. Подгорский, В.С. Лектины бактерий / В.С. Подгорский, Э.А. Коваленко, И.А. Симоненко. – Киев: Наук. Думка. – 1992. – 204 с.

148. Кобелев, А.В. Процессы агглютинации культур активного ила под действием внеклеточных лектинов / А.В. Кобелев, С.В. Клементьев, А.С. Сироткин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2021. – Т.11., № 4. – С. 617-626.

149. Яковлев, С.В. Очистка производственных сточных вод: учебное пособие для вузов / С.В. Яковлев, Я.А. Карелин, Ю.М. Ласков, Ю.В. Воронов – Москва: Стройиздат. – 1985. – 335 с.

**ТАТАРСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
АКЦИОНЕРЛЫК ЖӘМГҮЯТЕ**

«ЗВКС»

422541, ЗЕЛЕНДОЛ ШӘҖӘРЕ, КҮЛЛЕ УРАМ, 48

ТЕЛ. 8(84371) 4-38-27, ФАКС 4-23-92

Е-mail: aovks@mail.ru

Отделение № 8610 Сбербанка России г. Казань р/с 40702810362480001018 к/с 30101810600000000603 БИК 049205603

ИНН 1648041104 КПП 164801001 Код ОКАТО 92420000000 Код ОКТМО 92628101001

Код ОКОГУ 4210014 Код ОКФС 16 Код ОКОПФ 12267



**РЕСПУБЛИКА ТАТАРСТАН
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО**

«ЗВКС»

422541, г. ЗЕЛЕНДОЛЬСК, ул. ОЗЕРНАЯ, 48

ТЕЛ. 8(84371) 4-38-27, ФАКС 4-23-92

Е-mail: aovks@mail.ru

№ 134 «05» 05 2023 г.



**Акт
о намерении внедрения
результатов диссертационной работы**

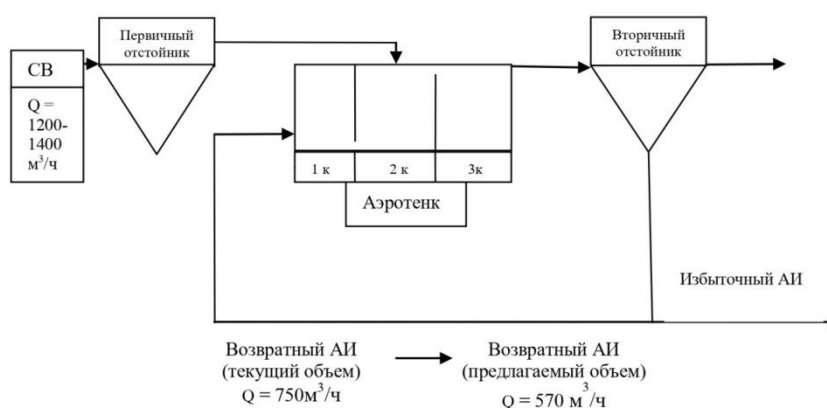
Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования Кобелева Алексея Витальевича по получению, исследованию свойств и применению микробных агрегатов под действием внеклеточных лектинов, являются практически важными, в том числе, для использования в биотехнологиях очистки сточных вод на базе аэротенков.

Экспериментально показано, что внесение культуральной жидкости (КЖ) бактериального изолята BS1, выделенного из активного ила биологических очистных сооружений (БОС) г. Зеленодольск АО «ЗВКС», в количестве 0,25% в суспензию активного ила приводит к повышению эффективности осаждения ила до 118 % в течение первых 10 минут. Выбранная дозировка культуральной жидкости (0,25% от объема активного ила) изолята BS1 также приводила к увеличению дегидрогеназной активности ила, в среднем, на 7%.

Далее, было показано, что внесение биологически очищенной сточной воды (БОСВ) влияет на седиментацию активного ила. Так, при дозе ила 2,7 г/л максимальная скорость седиментации отмечена при внесении БОСВ в объеме от 5 до 10% от объема активного ила. Повышение эффективности осаждения ила составила от 10% до 20% в начальный период.

Таким образом, полученные результаты могут служить основанием для использования лектинсодержащих сред (КЖ и БОСВ), образованных в процессе культивирования бактерий р. *Bacillus*, присутствующих и доминирующих в составе микробного сообщества активного ила, в качестве природного флокулянта для улучшения седиментационных свойств активного ила.

На основании полученных результатов *техническое предложение по интенсификации БОС г. Зеленодольск* состоит в изменении объема возвратного активного ила (АИ), поступающего в аэротенк.



Принципиальная схема БОС г. Зеленодольск с изменением объема возвратного активного ила

Общий объем жидкости, находящейся в аэротенке, равен 11400 м^3 (2 секции (по 5700 м^3), каждая имеет по 3 коридора (1900 м^3)). В каждую секцию трехкоридорного аэротенка (объемом 5700 м^3) поступает сточная вода (в среднем по $650 \text{ м}^3/\text{ч}$) и возвратный активный ил (в среднем по $375 \text{ м}^3/\text{ч}$), их смешение происходит во втором коридоре. Время нахождения сточной жидкости в аэротенке составляет 4 часа ($7600 \text{ м}^3 / (750+1300) \text{ м}^3/\text{ч}$). Таким образом, среднечасовой объем возвратного ила, поступающего в аэротенк, составляет 6,5% от объема аэротенка при иловом индексе 150 мг/г .

Для реализации технического предложения на основании проведенных лабораторных исследований по внесению БОСВ в активный ил в объеме 5-10% от его объема осуществляется уменьшение количества возвратного активного ила до $570 \text{ м}^3/\text{ч}$ (или на 24%), по сравнению с реально существующим. Следует отметить, что это

соответствует среднечасовому расходу возвратного активного ила, равному 5% от объема аэротенка.

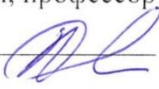
Подобные изменения приведут к следующим положительным результатам: ускорению осаждения во вторичном отстойнике на 10-20%, снижению илового индекса (на 10%), увеличению времени пребывания сточной воды в аэротенке на 10%, а также к снижению затрат электроэнергии на перекачку возвратного ила. При этом важно учесть вероятное снижение возраста активного ила и, соответственно, повышение его активности, а также необходимость некоторого увеличения количества избыточного активного ила, выводимого из технологического цикла.

В случае снижения рабочей концентрации активного ила в аэротенке ниже 1,8 г/л количество возвратного ила восстанавливается до 750 м³/ч с целью достижения нормативной рабочей концентрации активного ила в аэротенке (2-2,5 г/л). Далее представляется возможным вновь уменьшить объем возвратного ила до 570 м³/ч для обеспечения удовлетворительной седиментации и улучшения других указанных показателей процесса очистки.

Описанное техническое предложение позволит уменьшить риски значительного снижения возраста активного ила и эффективности его отделения от очищенной воды.

Таким образом, на основании проведенных лабораторных исследований по определению активности биофлокулянтов в лектинсодержащих средах бактерий – изолятов активного ила данное техническое предложение рекомендуется в качестве мероприятия по необходимому временному изменению технологического регламента процесса очистки, направленного на улучшение осаждения активного ила и на увеличение времени нахождения сточной воды в аэротенке.

Научный руководитель темы,
д.т.н, профессор ФГБОУ ВО «КНИТУ»

 А.С. Сироткин

Ответственный исполнитель

 А.В. Кобелев

Согласовано:

к.т.н., главный технолог АО «ЗВКС»,


 Л.М. Сибиева

Таблица Б1 – Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК изолята BS1

| Изолят | Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК |
|--------|---|
| BS1 | TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACTGC ATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCG TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGC CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTA GGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATTAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAA CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCCGCGCAGGTGGTTTC TTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACT GGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTTCCATGTGTAGCGGTGA AATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCT GTAACCTGACACTGAGGCGCGCAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACC CTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGTTTCCGCCC CTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCC GCCTGGAGGAGTACGGCT CGCAGGCTGAACCTCCAAAGGAATTTGACCGCGGGCCCGCCACAGCCGGTT GGTAGCATGATGGATTTAGTCGACGTCCACCGCCGTAACGAACCTTTACCCA GTCCTTGACATCCCTCTGAAACTCCTAGAGAATTAGGGCCTTCCCTTCGGGA GCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGT TGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA CGTCAAATCATCATGTCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA CGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGCTAGAGCTAATCTCATAAAACCGT TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTA GTAATCGCGGATCAGCATG |

Таблица Б2 – Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК изолята А2

| Изолят | Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК |
|--------|---|
| А2 | AAACGGTAGCTAATAACCGCATAACCTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTC GGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGGGGTA ACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA CACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAA GGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAA TACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGC GTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCATGATAGTAAAATCCCCGGGCT CAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGG GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG GGTGGCGAAGGCGGTCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCG TGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGTTAGTCCACGCCGTAACGATGTC GACTTGCAGGTTGTGCTCTTGAGGCGTGGCTTCCAGAGCTAATGCGTTAAGT CGACCGCCTGGCGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAATGAATTGACGG CGGCCCGCACCAAGCTGTGGAGCATGTAGTTCAATCGAATGCTAGCGCGAAG CAGCTTAACTGGTCTGGACAATCCAACGAAAGTTCCAGAGCATGGATATTGT GCCTATCGGTAATCGGTGAGAACAGGTGACCTGCATGGCTGTCCTCAAGCTT CTGGTATGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTT GCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTCTCCAGGGCAACAC ACGTTCTTCAATGGGGCATACAAAGAGAAGCGCCCTCGCGAGATCAAGCCG ACCTCATAAAGAGCGCAGTAGTCCCGATGGTCTCTCTCAACTCTCCTCCATG AAGTCGGGGTCGCTAGTAATGTTTCCTCTAG |