



Влияние физико-химических факторов среды на устойчивость бактериальных биопленок на основе микробных сообществ активного ила

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

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
Казань, Российская Федерация

Аннотация. Целью исследования являлось проведение оценки устойчивости бактериальных биопленок культур *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis*, *Paenibacillus odorifer* и *Bacillus subtilis* при стрессирующем воздействии физико-химических факторов среды в процессе периодического культивирования. В качестве основных параметров были выбраны температура (10 и 50 °C) и pH среды (5,0 и 10,0), содержание поверхностно-активных веществ (додецилсульфат натрия) в концентрациях 5, 10 и 50 мг/дм³. Установлено, что в области низких температурных значений (10 °C) увеличивается массивность биопленки микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Bacillus subtilis*. Отмечено, что бактериальная биопленка *Alcaligenes faecalis* 2 проявляет устойчивость и метаболическую активность в кислых условиях среды. При повышении значений pH среды до 10,0 происходит увеличение количества биопленки микроорганизмов *Bacillus subtilis*. При воздействии раствора додецилсульфата натрия в интервале от 5 до 10 мг/дм³ наблюдается процесс формирования бактериальной биопленки *Alcaligenes faecalis* 2, *Bacillus subtilis*, *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Paenibacillus odorifer*. Ответной реакцией на воздействие додецилсульфата натрия в области высоких концентраций (10 и 50 мг/дм³) является сохранение количества биомассы и массивности биопленки для штамма микроорганизмов *Achromobacter pulmonis* ПНОС. Таким образом, показана стрессоустойчивость рассмотренных культур под воздействием отрицательных внешних факторов среды, что может способствовать устойчивости микробных культур к различным видам поллютантов в технологиях очистки загрязненных сред.

Ключевые слова: бактериальная биопленка, массивность биопленки, метаболическая активность, экзополисахариды, биопленкообразующая способность

Для цитирования: Хасанова А.А., Сироткин А.С., Перушкина Е.В. Влияние физико-химических факторов среды на устойчивость бактериальных биопленок на основе микробных сообществ активного ила // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. № 4. С. 535–547. DOI: 10.21285/achb.1010. EDN: AFVEBZ.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Resistance of bacterial biofilms comprising activated sludge microbial communities to physicochemical external factors

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

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russian Federation

Abstract. The study was aimed at evaluating the resistance of *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis*, *Paenibacillus odorifer*, and *Bacillus subtilis* biofilms to negative physicochemical external factors during batch culture. The

main analyzed parameters included temperature (10 and 50 °C) and pH level (5.0 and 10.0), as well as surfactant (sodium dodecyl sulfate) concentrations of 5, 10, and 50 mg/dm³. At low temperatures (10 °C), the size of *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* PNOS, and *Bacillus subtilis* biofilms was found to increase. The *Alcaligenes faecalis* 2 biofilm was noted to exhibit resistance and metabolic activity under acidic conditions. A pH rise to 10.0 resulted in a higher amount of *Bacillus subtilis* biofilm. When exposed to sodium dodecyl sulfate solution (5 to 10 mg/dm³), *Alcaligenes faecalis* 2, *Bacillus subtilis*, *Achromobacter pulmonis* PNOS, and *Paenibacillus odorifer* biofilms were observed to form. In response to the exposure to high sodium dodecyl sulfate concentrations (10 and 50 mg/dm³), the biomass and size of *Achromobacter pulmonis* PNOS biofilm remained unchanged. Thus, the considered cultures were shown to be stress-resistant to negative external factors, which may contribute to the resistance of microbial cultures to various types of pollutants in treatment technologies.

Keywords: bacterial biofilm, biofilm size, metabolic activity, exopolysaccharides, biofilm-forming ability

For citation: Khasanova A.A., Sirotnik A.S., Perushkina E.V. Resistance of bacterial biofilms comprising activated sludge microbial communities to physicochemical external factors. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2025;15(4):535-547. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.1010. EDN: AFVEBZ.

ВВЕДЕНИЕ

В естественной среде обитания биопленка представляет собой динамически изменяющееся микробное сообщество, формирующееся в результате симбиотических взаимоотношений отдельных групп микроорганизмов. Популяция микробных клеток в биопленке варьирует от 10⁸ до 10¹¹ на 1 г сырой биомассы [1]. Процесс формирования биопленок включает в себя несколько этапов: адгезия клеток к поверхности, образование микроколоний, синтез экзополисахаридного матрикса, дисперсия биопленки и последующее высвобождение планктонных клеток для возобновления цикла биопленкообразования. Явление «чувство кворума» (QS-система), описанное в ряде исследований, обуславливает развитие и дисперсию биопленок. С другой стороны, отмечена значительная роль в процессе формирования биопленок TCS-системы, представляющей собой клеточную сигнализацию, которая обеспечивает адаптивную реакцию микроорганизмов как к изменениям внутри клеток, так и к абиотическим факторам среды [2]. Согласно недавним исследованиям, также обнаружена функциональная связь между процессами пост-трансляционной модификации белков (фосфорилирование по ключевым аминокислотам Ser-Thr-Tyr) и Lys-ацетилированием в образовании биопленок [3]. Формирование и развитие бактериальной биопленки во многом связано с защитной реакцией микробного сообщества на стрессовые факторы окружающей среды (изменения температуры, активной реакции среды, состава и доступности субстрата, содержания антимикробных веществ, межвидового взаимодействия в микробном сообществе, типа поверхности и др.).

Так, было проанализировано влияние pH среды (в диапазоне от 5,5 до 8,5) на образование биопленок у микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Vibrio cholerae* [4, 5]. При повышении pH среды наблюдается увеличение биопленкообразующей способности у всех протестированных видов и штаммов бактерий. Усиленное образование биопленки наблюдается для бактерий *Escherichia coli* при pH 2,5, что связано с активацией белка *ycfR*, ответственного за устойчивость ко многим стрессовым воздействиям [6].

В других исследованиях оценивалось влияние температурного режима на степень образования биопленки у штамма бактерий *Stenotrophomonas maltophilia* [7]. Активное формирование биопленок у исследуемых бактериальных культур осуществляется при темпе-

ратуре 32 °C. Изучено температурное воздействие на бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (при 23 и 37 °C соответственно). В интервале низких температурных значений наблюдается увеличение биопленкообразующей активности и отмечаются различия в экспрессии генов у микроорганизмов [8].

Условия культивирования и физиологическое состояние клеточных популяций также оказывают влияние на биоокисление загрязняющих веществ. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) относятся к числу соединений, отрицательно воздействующих на бактериальную биопленку [9]. Однако существуют исследования, доказывающие противоположный эффект влияния ПАВ на микроорганизмы. Доказано, что при воздействии низких концентраций анионного ПАВ (додецилсульфата натрия) на бактерии рода *Pseudomonas* наблюдается увеличение процесса биопленкообразования исследуемым микробным сообществом. Увеличивается степень микробной колонизации и формирование биопленок на гидрофобном носителе при воздействии синтетических ПАВ (Novanik 0633A) на бактерии *Rhodococcus erythropolis* [10].

Развитие бактериальной биопленки зависит от доступности растворенного кислорода. Доступность растворенного кислорода повлияла на структуру биопленки факультативно анаэробной культуры *Escherichia coli*: в аэробных условиях в биопленке преобладали грибовидные микроколонии, в бескислородной среде биопленка имела тонкую неоднородную структуру [11]. Стоить отметить, что в аэробных условиях бактерии *Pseudomonas aeruginosa* формируют более массивные и трехмерные биопленки, но за счет быстрого потребления кислорода образуются анаэробные зоны, в которых бактерии утрачивают свою активность [12].

Во многих исследованиях представлены результаты влияния количества и доступности органического субстрата на биопленкообразующую способность микроорганизмов. Отмечено, что при культивировании бактерий рода *Escherichia* на питательной среде с добавлением глюкозы увеличивается скорость образования биопленок. Однако содержание в среде глюкозы оказывает ингибирующее воздействие на формирование биопленки микроорганизмами *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* и *Salmonella enterica* [13, 14].

Бактериальные биопленки рассматриваются как один из ключевых инструментов экологической биотехнологии в процессах биоремедиации загрязненных экосистем,

в частности в очистке сточных вод микроорганизмами активного ила. Это связано с тем, что биопленка состоит из множества структурных компонентов, способствующих иммобилизации и солюбилизации ряда соединений из водной среды. Микробная биопленка активного ила, характеризующаяся наличием аэробных и анаэробных микрозон, обеспечивает возможность одновременного протекания процессов нитрификации, денитрификации и фосфатаккумуляции [15]. Биопленочные или гибридные конфигурации (MBBR, IFAS, гранулы активного ила) способствуют уменьшению генерации избыточного ила, снижению гидравлического времени удерживания осадка и повышению стабильности процессов при переменных нагрузках [16–18].

В процессах эксплуатации на очистных сооружениях активный ил регулярно подвергается воздействию стрессоров – колебаний гидравлической и органической нагрузки, изменения концентрации кислорода, pH, температуры, токсичных соединений (тяжелые металлы, антимикробные вещества и др.) [19–21]. Несмотря на значительное количество исследований, посвященных роли биопленочных сообществ в процессах биологической очистки сточных вод, ряд аспектов, касающихся функционирования биопленки в условиях изменения внешней среды, остается недостаточно изученным. Для реализации технологии очистки сточных вод от азота в мембранным аэрируемом биореакторе в условиях холодного климата было изучено влияние температуры (8 и 30 °C соответственно) на процесс нитрификации. При температуре 8 °C достигнута высокая скорость нитрификации ($3,08 \text{ г N} \times \text{м}^{-2} \times \text{сут}^{-1}$) [22]. Проводятся исследования по влиянию pH среды на развитие фосфатаккумулирующих микроорганизмов в составе биопленок и эффективности дефосфатации в секвенционном реакторе с биопленкой. Установлено, что доля представителей фосфатаккумулирующих микроорганизмов *Candidatus Accumulibacter* в биопленке составляет 33–60%, тогда как в супензированном активном иле – 8–33%. При значениях pH среды от 7,5 до 8,0 эффективность фосфатаккумуляции достигает в среднем 90% [23].

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

В связи с вышесказанным целью проведенного исследования являлась оценка биопленкообразования активного ила бактериальными культурами и культурами, обладающими нитрилгидролизующей активностью, в ответ на воздействие стрессирующих факторов среды в процессе периодического культивирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования и условия культивирования. В ранее описанной работе [24] были проанализированы и выбраны перспективные бактериальные монокультуры, обладающие высокой активностью к формированию микробных биопленок. В связи с этим в качестве объектов исследований выступили бактерии микробных сообществ, участвующих в очистке коммунально-бытовых

и промышленных сточных вод: *Alcaligenes faecalis* 2 [25], *Achromobacter pulmonis* ПНОС [26], *Paenibacillus odorifer* и *Bacillus subtilis*, выделенные из биоценоза активного ила. Для рассматриваемых бактериальных культур оптимальные значения температуры для роста находятся в диапазоне от 30 до 37 °C, pH – в интервале от 6,5 до 7,5 [27–30]. Экспериментальные исследования проводили с супензией суточной бактериальной культуры, выращенной на среде LB при периодическом культивировании при температуре 30 °C со скоростью перемешивания 120 об/мин [31].

Анализ устойчивости бактериальных биопленок к внешним факторам окружающей среды. Для оценки устойчивости бактериальных биопленок под влиянием внешних факторов среды были выбраны следующие параметры: температура (10 и 50 °C), pH среды (5,0 и 10,0) и содержание ПАВ (додецилсульфата натрия) в концентрациях 5, 10 и 50 мг/дм³.

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

1. В 96-луночные полистирольные планшеты («Медполимер», Россия), вносили 150 мкл питательной среды LB и инокулят микроорганизмов в количестве 10 мкл. Культивирование проводили в термостате в течение 72 ч при 30 °C.

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

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

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

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

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

1. Первоначально проводили планшетное культивирование трехсуточной микробной биопленки в подкисленной (pH 5,0±0,2) и щелочной (pH 10,0±0,2) среде LB в течение 24 ч при 30 °C.

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

3. Проводили периодическое культивирование микробной биопленки с добавлением свежей питательной среды LB объемом 150 мкл с нейтральным значением pH среды 7,0±0,2 при 30 °C в течение 48 ч. В контрольных лунках планшета осуществляли культи-

вирование микроорганизмов в аналогичных условиях на питательной среде LB с pH среды $7,0 \pm 0,2$.

С целью оценки воздействия еще одного фактора внешней среды – ПАВ – на устойчивость микробной биопленки осуществляли добавление раствора додецилсульфата натрия в питательную среду с конечной концентрацией додецилсульфата натрия 5, 10 и 50 мг/дм³ по следующему алгоритму:

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

3. Далее удаляли культуральную жидкость и обрабатывали лунки планшета стерильным калий-fosфатным буфером.

3. Целью анализа ответной реакции бактериальной биопленки на стрессовый фактор – содержание ПАВ – проводили периодическое культивирование микроорганизмов в стерильной питательной среде LB при отсутствии раствора додецилсульфата натрия в течение 48 ч при 30 °C.

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

Материалы и методы исследования. В процессе периодического культивирования анализировали рост микроорганизмов путем измерения оптической плотности культуральной жидкости на микропланшетном ридере Tecan Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария) при длине волны 540 нм. Массивность биопленки как количественный показатель массы биопленки определяли окрашиванием образцов биопленки 0,1%-м раствором кристаллического фиолетового, дальнейшим экстрагированием красителя 96%-м этанолом и измерением оптической плотности экстрактов на микропланшетном ридере при длине волны 540 нм [32]. Для определения экзополисахаридов в составе биопленки осуществляли окрашивание образцов биопленки с помощью специфического красителя конго красного (конечная концентрация красителя – 40 мкг/мл). Далее экстрагировали краситель 96%-м этанолом и измеряли оптическую плотность экстрактов на микропланшетном ридере при длине волны 490 нм [33]. Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленок оценивали путем

окрашивания клеток с помощью красителя PrestoBlue HS Viability Reagent. Флуоресценцию клеток определяли на планшетном ридере при длине волны возбуждения/эмиссии 560/590 нм [34].

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

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На начальном этапе исследований оценивались биомасса и микробная биопленка после 72-часового периодического культивирования в планшете (табл. 1).

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

Температура оказывает значительное влияние на распространение и развитие микробных биопленок в экосистеме. Изменение температурного режима воздействует на скорость диффузии растворенного кислорода и метаболическую активность микробных клеток [35]. На следующем этапе проводился анализ воздействия температуры в области низких и высоких значений (10 и 50 °C) на устойчивость бактериальных биопленок (табл. 2).

Влияние температурного фактора на устойчивость бактериальных биопленок изучено при предварительном стрессировании культур *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* температурой 10 и 50 °C в течение 24 ч.

В результате термостатирования исследуемых культур микроорганизмов при 10 °C значение оптической плотности бактериальной супензии варьирует от 0,8 до 1,1 опт.ед. и не имеет существенного отличия от контрольных образцов без температурного стресса

Таблица 1. Результаты измерения оптической плотности бактериальной супензии и массивности бактериальных биопленок

Table 1. Optical density of the bacterial suspension and the massiveness of bacterial biofilms

Показатель	Исследуемые бактериальные культуры			
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 2	<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС	<i>Paenibacillus odorifer</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Начальная оптическая плотность бактериальной супензии при $\lambda = 540$ нм	0,03 \pm 0,0015	0,05 \pm 0,0025	0,13 \pm 0,0065	0,02 \pm 0,0010
Оптическая плотность бактериальной супензии при $\lambda = 540$ нм (через 72 ч)	0,95 \pm 0,0600	0,67 \pm 0,1400	0,18 \pm 0,0600	0,20 \pm 0,0600
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,47 \pm 0,0600	0,08 \pm 0,0500	0,18 \pm 0,0600	0,12 \pm 0,0800

Таблица 2. Анализ влияния температуры среды на массивность биопленок, метаболическую активность, биомассу и количество экзополисахаридов микроорганизмов

Table 2. Environmental temperature effect on the massiveness of biofilms, metabolic activity, biomass, and the amount of exopolysaccharides of microorganisms

Показатель	Температурный режим, °C		
	10	30	50
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	1,02±0,15	1,14±0,28	0,70±0,22
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,73±0,10	0,52±0,10	0,002±0,051
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,022±0,0010	0,0072±0,00003	-
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	840,00±42,00	286,56±14,32	58,30±2,91
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	1,10±0,23	1,30±0,08	1,01±0,23
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,71±0,19	0,40±0,32	0,11±0,07
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,004±0,0002	0,0019±0,00009	-
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	920,39±46,01	1193,89±59,69	81,00±4,05
<i>Paenibacillus odorifer</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,87±0,29	1,13±0,09	0,40±0,15
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,72±0,10	0,77±0,09	0,39±0,13
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,022±0,0011	0,023±0,0011	0,0018±0,00009
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	642,02±32,10	773,72±38,68	202,50±10,12
<i>Bacillus subtilis</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,90±0,06	1,04±0,21	0,41±0,09
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,75±0,10	0,60±0,03	0,33±0,11
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,028±0,0014	0,025±0,0012	0,0017±0,00008
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	768,25±38,41	991,28±49,56	254,41±12,72

(см. табл. 2, температуру 30 °C). В области высоких температурных значений для микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* 2, *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* наблюдается уменьшение значения оптической плотности бактериальной суспензии в среднем на 38, 65 и 60% по сравнению с количеством клеток в контрольных лунках планшета.

Далее следует отметить, что периодическое культивирование микроорганизмов при температуре 10 °C оказало влияние на устойчивость исследованных биопленок. В результате предварительного стрессирования клеток в течение 24 ч массивность биопленки бактериальных культур *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Bacillus subtilis* увеличивается в среднем на 29, 43 и 20% соответственно по сравнению с контрольными образцами. Одновременно отмечено, что изменения массивности биопленки культуры *Paenibacillus odorifer* в ответ на снижение температуры до 10 °C не наблюдается. Содержание биопленки в опытной системе и в контрольных образцах изменяется в среднем от 0,70 до 0,77 опт.ед.

Термостатирование микроорганизмов при 50 °C в течение суток привело к дальнейшему снижению массивности биопленки *Paenibacillus odorifer* и *Bacillus subtilis* в среднем на 49 и 45% в сравнении с оптимальным температурным режимом (30 °C). Несмотря на высокие значения оптической плотности бактериальной суспензии *Alcaligenes faecalis* 2 и *Achromobacter pulmonis* ПНОС, стрессирующий фактор оказал ингибирующее воздействие на формирование микробной биопленки.

Данные, полученные при количественной оценке содержания экзополисахаридов, коррелируют с результатами измерения массивности биопленки бактериальных культур.

В условиях предварительного стрессирования микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* 2 в составе биопленки при 10 °C наблюдается увеличение метаболической активности в среднем на 65,8% по сравнению с контрольными образцами микробной биопленки. Несмотря на устойчивость биопленки бактериальной культуры *Achromobacter pulmonis* ПНОС к низкой температуре, наблюдается снижение метаболической активности

в среднем на 23% по сравнению с контрольными образцами. Высокой метаболической активностью обладают штаммы микроорганизмов *Paenibacillus odorifer* и *Bacillus subtilis* при их периодическом культивировании в отсутствии стрессирующего температурного фактора.

Известно, что при повышении температуры ускоряются метаболические процессы в микробных клетках, что в дальнейшем приводит к увеличению скорости роста микроорганизмов [35]. Исследован процесс формирования бактериальных биопленок в ответ на изменение температурного режима среды (28 и 37 °C), а также показано, что многие штаммы бактерий рода *Paenibacillus* проявляют устойчивость к низким температурам (в среднем 6 °C) [36]. Клетки *Bacillus subtilis* способны использовать различные механизмы для сохранения устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды: подвижность, образование экзополисахаридного матрикса и общую реакцию на стресс [37]. Изменение структуры жирных кислот в

липидах мембран является ответной реакцией микроорганизмов, позволяющей адаптироваться к низким температурным значениям среды (с 37 до 15 °C) [38]. С помощью метода двумерного гель-электрофореза установлено, что одной из главных причин устойчивости микроорганизмов рода *Bacillus* является синтез двух классов специфических белков: белков, индуцируемых при действии низких значений температур (CIPs – termed cold-induced proteins), и белков, образующихся после завершения стадии акклиматизации к температурным условиям среды (CAPs – cold acclimatization proteins) [39].

Иммобилизованные клетки микроорганизмов обладают различными механизмами, отвечающими на воздействие стрессовых факторов, например, изменение активной реакции среды. На следующем этапе исследований оценивалось влияние pH среды при постоянной температуре 30 °C на устойчивость бактериальных биопленок (табл. 3).

Результаты анализа культивирования микроорганизмов в условиях кислой среды (pH 5,0) в течение 24 ч

Таблица 3. Оценка воздействия pH среды на массивность биопленки, метаболическую активность, биомассу и количество экзополисахаридов микроорганизмов

Table 3. Evaluation of medium pH effect on the massiveness of the biofilm, metabolic activity, biomass, and the number of exopolysaccharides of microorganisms

Показатель	pH среды		
	5,0	7,0	10,0
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,85±0,19	0,88±0,12	1,00±0,09
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	1,09±0,11	0,81±0,11	0,82±0,07
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,06±0,003	0,01±0,0008	0,02±0,001
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	343,52±17,17	263,20±13,16	277,43±13,87
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,77±0,42	0,94±0,36	1,15±0,39
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,73±0,14	0,72±0,08	0,68±0,11
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,023±0,001	0,022±0,001	0,013±0,0006
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	196,42±9,82	253,98±12,69	347,00±17,35
<i>Paenibacillus odorifer</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,88±0,25	0,99±0,18	1,03±0,31
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	1,24±0,14	1,26±0,09	1,20±0,09
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,13±0,006	0,17±0,008	0,10±0,005
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	197,01±9,85	187,24±9,36	255,75±12,78
<i>Bacillus subtilis</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,83±0,16	1,01±0,19	1,06±0,27
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	1,28±0,13	1,34±0,10	1,42±0,12
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,14±0,007	0,20±0,01	0,21±0,01
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	256,62±12,83	357,54±17,87	278,23±13,91

показали, что значения оптической плотности бактериальной суспензии для штаммов *Alcaligenes faecalis* 2 и *Paenibacillus odorifer* не имеют существенных отличий при их выращивании в нейтральной среде (оптическая плотность варьирует в среднем от 0,8 до 0,9 опт.ед.). Максимальное количество клеток *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Bacillus subtilis* образуется при их стрессировании в щелочных условиях среды (рН 10,0) (диапазон изменения оптической плотности бактериальной суспензии составляет в среднем от 1,0 до 1,2 опт.ед.).

Далее отметим, что массивность биопленки микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* 2 увеличивается в условиях кислой среды в среднем на 35% по сравнению с контрольными образцами (рН 7,0). Количество биопленки оказалось максимальным при стрессировании бактериальной культуры *Bacillus subtilis* в щелочной среде (рН 10,0). Установлено, что микроорганизмы *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Paenibacillus odorifer* проявляют адаптационные свойства и сохраняют способность к образованию биопленки как в щелочных, так и в кислых условиях среды. В обоих случаях масса сформированной микробной биопленки соответствовала массе биопленки для контрольного образца (рН 7,0). Данные, полученные при количественной оценке содержания экзополисахаридов, коррелируют с результатами измерения массивности биопленки бактериальных культур.

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

Кислотность среды влияет на механизмы протонного насоса и проницаемость клеточной мембраны. Воздействие рН среды как стрессирующего фактора приводит к процессу активации защитного механизма и увеличению образования бактериальной биопленки. Доказано, что изменение рН влияет на соотношение белков и полисахаридов в матриксе биопленки. Описана высокая чувствительность биопленки микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* к щелочным условиям среды – рост бактерий уменьшается при повышении рН среды до 9,0 [40]. Изменение факторов окружающей среды воздействует на способность микробных биопленок к окислению загрязняющих веществ из сточных вод. Биопленкообразующие бактерии рода *Bacillus* проявляют устойчивость к щелочным условиям среды при температуре 30 °С в течение 24 ч. В экстремальных условиях окружающей среды экзополисахаридный матрикс обеспечивает структурную и функциональную стабильность биопленки.

При культивировании микроорганизмов рода *Bacillus* в кислых условиях среды (рН 6,0) синтез ключевых компонентов экзополисахаридов, а также белков и липидов достигает максимальных значений. Подтверждалась аморфная природа экзополисахаридов и изме-

нение функциональных групп ($-\text{CH}_2\text{CH(OCH}_3\text{)}_2$, $-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2-$) при воздействии на рН среды. Содержание микробной биопленки составило $5,28582 \pm 0,5372 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$ при толщине $9,982 \pm 1,5288 \text{ мкм}$ [41, 42]. В исследованиях по изучению бактерий рода *Achromobacter* наибольшая степень образования биопленки наблюдается в диапазоне рН среды от 4,0 до 5,5. Для микроорганизмов рода *Achromobacter* идентифицированы гены *FliF*, *FliM* и *FliN*, влияющие на процесс адгезии клеток. В устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды также вносит вклад использование мембранных белков, участвующих во внутриклеточном переносе ключевых компонентов и ферментов [43].

Содержание анионного ПАВ додецилсульфата натрия в хозяйственно-бытовых сточных водах варьирует от 3 до 20 мг/л. Несмотря на ингибирующее воздействие высокой концентрации додецилсульфата натрия на микробную активность, достигнута высокая степень биологического окисления поллютанта микроорганизмами в составе биопленки (эффективность удаления додецилсульфата натрия в среднем выше 70%) [44]. Микробная биопленка демонстрирует устойчивость к содержанию ПАВ в среде. Ответной реакцией биопленки на первичное воздействие додецилсульфата натрия является способность к восстановлению дыхательной активности микроорганизмов и количества биомассы через 12 и 5 ч соответственно [45].

В связи с этим на следующем этапе исследований проводился анализ влияния додецилсульфата натрия на изменение массивности биопленки и метаболической активности микроорганизмов, выделенных из коммунально-бытовых и промышленных сточных вод (табл. 4).

В процессе периодического культивирования штаммов микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* ПНОС, *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* на питательной среде, содержащей додецилсульфат натрия (с массовой концентрацией 5, 10 и 50 мг/дм³), значения оптической плотности бактериальной суспензии изменяются в интервале от 0,95 до 1,20 опт.ед.

Микроорганизмы *Alcaligenes faecalis* 2, *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus odorifer* сохраняют способность к образованию биопленки при воздействии концентрации додецилсульфата натрия от 5 до 10 мг/дм³. Однако увеличение содержания додецилсульфата натрия до 50 мг/дм³ оказывает ингибирующее воздействие и приводит к снижению массивности биопленки для рассматриваемых бактериальных культур в среднем на 87, 45 и 46% соответственно по сравнению с опытными образцами с минимальным количеством раствора додецилсульфата натрия (до 5 мг/дм³). Одновременно отмечено, что инкубирование микробных клеток *Achromobacter pulmonis* ПНОС в условиях с повышенным содержанием додецилсульфата натрия оказалось стимулирующее воздействие на бактериальную культуру и сопровождалось увеличением массы биопленки в среднем на 38% для массовой концентрации додецилсульфата натрия 10 и 50 мг/дм³ по сравнению с пробами с минимальной концентрацией додецилсульфата натрия в среде. Данные, полученные при количественной оценке содержания экзополисахаридов, коррелируют с результатами измерения массивности биопленки бактериальных культур.

Согласно полученным данным, метаболическая активность микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* 2,

Таблица 4. Экспериментальный анализ воздействия раствора додецилсульфата натрия на массивность биопленки, метаболическую активность, биомассу и количество экзополисахаридов микроорганизмов

Table 4. Effect of sodium dodecyl sulfate solution on the massiveness of the biofilm, metabolic activity, biomass, and the number of exopolysaccharides of microorganisms

Показатель	Массовая концентрация додецилсульфата натрия, мг/дм ³		
	5	10	50
<i>Alcaligenes faecalis</i> 2			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	1,08±0,05	1,07±0,05	1,11±0,05
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,74±0,11	0,68±0,09	0,09±0,06
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,01582±0,0007	0,01065±0,0005	0,00079±0,00003
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	216,72±10,83	180,37±9,01	36,03±1,80
<i>Achromobacter pulmonis</i> ПНОС			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,99±0,06	1,01±0,07	1,02±0,05
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,32±0,09	0,52±0,09	0,57±0,08
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,0030±0,0001	0,0067±0,0003	0,0079±0,0003
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	51,57±2,57	78,77±3,93	23,58±1,17
<i>Paenibacillus odorifer</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,99±0,05	0,94±0,05	0,97±0,05
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,73±0,09	0,62±0,11	0,40±0,07
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,0133±0,0006	0,0084±0,0004	0,0037±0,0001
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	307,25±15,36	30,64±1,53	52,38±2,61
<i>Bacillus subtilis</i>			
Оптическая плотность бактериальной суспензии при $\lambda = 540$ нм	0,98±0,05	0,95±0,05	0,97±0,06
Массивность биопленки при $\lambda = 540$ нм	0,73±0,07	0,62±0,10	0,39±0,08
Количество экзополисахаридов в составе биопленки при $\lambda = 490$ нм	0,0132±0,0006	0,0089±0,0004	0,0042±0,0002
Метаболическая активность микроорганизмов в составе биопленки, Фл./ОП ₅₄₀	306,12±15,30	144,4±7,22	8,82±0,44

Bacillus subtilis и *Paenibacillus odorifer* в составе биопленки сохраняется при воздействии додецилсульфата натрия с конечной концентрацией в среде 5 мг/дм³. Отмечено, что бактериальная культура *Achromobacter pulmonis* ПНОС сохраняет устойчивость и метаболическую активность к содержанию раствора токсиканта в системе до 10 мг/дм³.

Что касается исследования влияния ПАВ на микробные биопленки, необходимо отметить следующие данные из предметной литературы. Так, в исследованиях М. Федейлы и др. [46] анализировалась способность к биодеградации анионных ПАВ микробным консорциумом биопленки, состоящим из *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* и *Serratia marcescens*. Эффективность удаления додецилсульфата натрия бактериальным консорциумом в аэробных условиях при температуре 30 °C составила в среднем 94%. В аналогичных условиях среды степень биотрансформации додецилсульфата натрия монокультурой *Alcaligenes faecalis* составила в среднем 23%. Также установлено [47], что бактерии родов *Bacillus* и *Paenibacillus* способны использовать додецилсульфат

натрия в качестве углеродного субстрата. Анализ проводили в фосфатно-солевом растворе с добавлением додецилсульфата натрия. Изолятами микроорганизмов были получены на твердой питательной среде с концентрацией раствора додецилсульфата натрия 1000 Мм. Эффективность биохимического окисления додецилсульфата натрия бактериями рода *Bacillus* составило в среднем 51%. Экспериментально доказана эффективная биодеградирующая способность додецилсульфата натрия при массовой концентрации 100 мг/л с помощью микроорганизмов рода *Achromobacter*, иммобилизованных на композитном материале на основе ацетата целлюлозы [45]. Ряд исследований посвящен изучению влияния ПАВ на метаболическую активность микроорганизмов. Повышенное содержание додецилсульфата натрия приводит к увеличению денатурирующей способности вещества, но к снижению активности таких ферментов, как фосфатаза, бета-глюказидаза и лейцинаминопептидаза (фермент, способствующий гидролизу лейцина и других N-концевых остатков на концах пептидов и белков) в бактериальной биопленке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения экспериментальных исследований доказано, что при понижении температуры среды до 10 °С осуществляется увеличение массивности биопленки микроорганизмов *Alcaligenes faecalis* 2, *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Bacillus subtilis*. Анализ бактериальной культуры *Paenibacillus odorifer* показал высокую способность к образованию биопленки при их периодическом культивировании при 30 °С в нейтральных условиях среды. Установлено, что бактериальная биопленка *Alcaligenes faecalis* 2 проявляет устойчивость и метаболическую активность в кислых условиях среды. Повышение значений pH среды до 10,0 сопровождается увеличением количества биопленки микроорганизмов *Bacillus subtilis*. При воздействии раствора додецилсульфата натрия в интервале от 5 до 10 мг/дм³ сохраняется способность к биопленкообразованию для культур *Alcaligenes faecalis* 2, *Bacillus subtilis*, *Achromobacter pulmonis* ПНОС и *Paenibacillus odorifer*. Ответной реакцией на воздействие додецилсульфата натрия в области высоких концентраций (10 и 50 мг/дм³) является сохранение биомассы и массивности биопленки для штамма микроорганизмов *Achromobacter pulmonis* ПНОС.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life // *Nature Reviews Microbiology*. 2016. Vol. 14. P. 563–575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
2. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities // *Annual Review of Microbiology*. 2002. Vol. 56. P. 187–209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
3. Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives // *RSC Advances*. 2017. Vol. 7, no. 58. P. 36670–36683. DOI: 10.1039/C7RA02497E.
4. Ouidir T., Gabriel B., Chabane Y.N. Overview of multi-species biofilms in different ecosystems: wastewater treatment, soil and oral cavity // *Journal of Biotechnology*. 2022. Vol. 350. P. 67–74. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2022.03.014.
5. Çam S., Brinkmeyer R. The effects of temperature, pH, and iron on biofilm formation by clinical versus environmental strains of *Vibrio vulnificus* // *Folia Microbiologica*. 2020. Vol. 65. P. 557–566. DOI: 10.1007/s12223-019-00761-9.
6. Zhang X.-S., García-Contreras R., Wood T.K. YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity // *Journal of Bacteriology*. 2007. Vol. 189, no. 8. P. 3051–3062. DOI: 10.1128/jb.01832-06.
7. Di Bonaventura G., Stepanović S., Picciani C., Pompilio A., Piccolomini R. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates // *Folia Microbiologica*. 2007. Vol. 52, no. 1. P. 86–90. DOI: 10.1007/BF02932144.
8. Bisht K., Moore J.L., Caprioli R.M., Skaar E.P., Wakeman C.A. Impact of temperature-dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation // *NPJ Biofilms and Microbiomes*. 2021. Vol. 7. P. 22. DOI: 10.1038/s41522-021-00194-8.
9. Aonofriesei F. Surfactants' interplay with biofilm development in *Staphylococcus* and *Candida* // *Pharmaceutics*. 2024. Vol. 16, no. 5. P. 657. DOI: 10.3390/pharmaceutics16050657.
10. Schreiberová O., Hedbávná P., Čejková A., Jirků V., Masák J. Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants // *New Biotechnology*. 2012. Vol. 30, no. 1. P. 62–68. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.04.005.
11. Bjergbæk L.A., Haagensen J.A.J., Reisner A., Molin S., Roslev P. Effect of oxygen and growth medium on in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* // *Biofilms*. 2006. Vol. 3, no. 1. P. 1–10. DOI: 10.1017/S1479050507002074.
12. Werner E., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Heydorn A., Molin S., et al. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. Vol. 70, no. 10. P. 6188–6196. DOI: 10.1128/AEM.70.10.6188-6196.2004.
13. Bühler T., Ballester S., Desai M., Brown M.R. Generation of a reproducible nutrient-depleted biofilm of *Escherichia coli* and *Burkholderia cepacia* // *Journal of Applied Microbiology*. 1998. Vol. 85, no. 3. P. 457–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.853501.x.
14. Alotaibi G.F., Bukhari M.A. Characterization and evaluation of biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* MBB9 isolated from epilithic biofilms of the Porter Brook River, Sheffield // *Edelweiss Journal of Biomedical Research and Review*. 2021. Vol. 3, no. 1. P. 14–24. DOI: 10.33805/2690-2613.120.
15. Wang C., Lin Q., Yao Y., Xu R., Wu X., Meng F. Achieving simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in pilot-scale flow-through biofilm reactor with low dissolved oxygen concentrations: performance and mechanisms // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 358. P. 127373. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127373.
16. Khudhair D.N., Hosseinzadeh M., Zwain H.M., Sia-datmousavi S.M., Majdi A., Mojiri A. Upgrading the MBBR process to reduce excess sludge production in activated sludge system treating sewage // *Water*. 2023. Vol. 15, no. 3. P. 408. DOI: 10.3390/w15030408.

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

- 17.** Silva T.P., Alves L., Paixão S.M. Effect of dibenzothiophene and its alkylated derivatives on coupled desulfurization and carotenoid production by *Gordonia alkanivorans* strain 1B // Journal of Environmental Management. 2020. Vol. 270. P. 110825. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110825.
- 18.** Zhou X., Liu H., Fan X., Wang X., Bi X., Cheng L., Huang S., et al. Comparative analysis of bacterial information of biofilms and activated sludge in full-scale MBBR-IFAS systems // Microorganisms. 2024. Vol. 12, no. 6. P. 1121. DOI: 10.3390/microorganisms12061121.
- 19.** Alisawi H.A.O. Performance of wastewater treatment during variable temperature // Applied Water Science. 2020. Vol. 10. P. 89. DOI: 10.1007/s13201-020-1171-x.
- 20.** Maal-Bared R. Operational impacts of heavy metals on activated sludge systems: the need for improved monitoring // Environmental Monitoring and Assessment. 2020. Vol. 192, no. 9. P. 560. DOI: 10.1007/s10661-020-08529-2.
- 21.** Lu F., Huang L., Qian F., Jiang Q., Khan S., Shen P. Resistance of anaerobic activated sludge acclimated by different feeding patterns: response to different stress shocks // Water Science and Technology. 2022. Vol. 85, no. 10. P. 3023–3035. DOI: 10.2166/wst.2022.164.
- 22.** Németh A., Ainsworth J., Ravishankar H., Lens P.N.L., Heffernan B. Temperature dependence of nitrification in a membrane-aerated biofilm reactor // Frontiers in Microbiology. 2023. Vol. 14. P. 1114647. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1114647.
- 23.** Li J., Xing X.-H., Wang B.-Z. Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR) // Biochemical Engineering Journal. 2003. Vol. 16. P. 279–285.
- 24.** Демаков В.А., Васильев Д.М., Максимова Ю.Г., Павлова Ю.А., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю. Бактерии активного ила из сооружений биологической очистки, трансформирующие цианопиридины и амиды пиридинкарбоновых кислот // Микробиология. 2015. Т. 84. Н 3. С. 369–378. DOI: 10.7868/S0026365615030039. EDN: TQQVBB.
- 25.** Хасанова А.А., Сироткин А.С., Перушкина Е.В. Изучение способности бактерий активного ила к образованию биопленок *in vitro* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. Н 2. С. 207–214. DOI: 10.21285/achb.912. EDN: PCUTZF.
- 26.** Максимова Ю. Г., Сергеева А. А., Овечкина Г. В., Максимов А. Ю. Деградация пиридина супензиями и биопленками штаммов *Achromobacter pulmonis* PNOS и *Burkholderia dolosa* BOS, выделенных из активного ила очистных сооружений // Биотехнология. 2020. Т. 36. Н 2. С. 86–98. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-86-98. EDN: IYFZFI.
- 27.** Kumar A., Bhunia B., Dasgupta D., Mandal T., Dey A., Datta S., et al. Optimization of culture condition for growth and phenol degradation by *Alcaligenes faecalis* JF339228 using Taguchi methodology // Desalination and Water Treatment. 2013. Vol. 51, no. 16–18. P. 3153–3163. DOI: 10.1080/19443994.2012.749021.
- 28.** Vandamme P., Moore E.R.B., Cnockaert M., De Brandt E., Svensson-Stadler L., Houf K., et al. *Achromobacter animicus* sp. nov., *Achromobacter mucicola* sp. nov., *Achromobacter pulmonis* sp. nov. and *Achromobacter spiritinus* sp. nov., from human clinical samples // Systematic and Applied Microbiology. 2013. Vol. 36, no. 1. P. 1–10. DOI: 10.1016/j.syapm.2012.10.003.
- 29.** Deng Z., Chen H., Chen S. Medium optimization for nitrogen fixer *Paenibacillus* sp. 1-49 // Acta Microbiologica Sinica. 2016. Vol. 56, no. 9. P. 1415–1425.
- 30.** Suwanmanon K., Hsieh P.-C. Isolating *Bacillus subtilis* and optimizing its fermentative medium for GABA and natto kinase production // CyTA – Journal of Food. 2013. Vol. 12, no. 3. P. 282–290. DOI: 10.1080/19476337.2013.848472.
- 31.** Maksimova Yu., Bykova Ya., Maksimov A. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes changes their antibiofilm and probiofilm effects on environmental bacteria // Microorganisms. 2022. Vol. 10, no. 8. P. 1627. DOI: 10.3390/microorganisms10081627.
- 32.** Singh P., Srivastava S., Malhotra R., Mathur P. Identification of *Candida auris* by PCR and assessment of biofilm formation by crystal violet assay // Indian Journal of Medical Microbiology. 2023. Vol. 46. P. 100421. DOI: 10.1016/j.ijmm.2023.100421.
- 33.** Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods // Indian Journal of Medical Microbiology. 2006. Vol. 24, no. 1. P. 25–29. DOI: 10.1016/S0255-0857(21)02466-X.
- 34.** Luzak B., Siarkiewicz P., Boncler M. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells // Toxicology in Vitro. 2022. Vol. 83. P. 105407. DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105407.
- 35.** Velkov V.V. New insights into the molecular mechanisms of evolution: stress increases genetic diversity // Molecular Biology. 2022. Vol. 36. P. 209–215. DOI: 10.1023/A:1015365805383.
- 36.** Moreno Switt A.I., Andrus A.D., Ranieri M.L., Orsi R.H., Ivy R., den Bakker H.C., et al. Genomic comparison of sporeforming bacilli isolated from milk // BMC Genomics. 2014. Vol. 15. P. 26. DOI: 10.1186/1471-2164-15-26.
- 37.** Asadishad B., Olsson A.L.J., Dusane D.H., Ghoshal S., Tufenkji N. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of *Bacillus subtilis* exposed to cold temperature and freeze-thaw // Water Research. 2014. Vol. 58. P. 239–247. DOI: 10.1016/j.watres.2014.03.048.
- 38.** Klein W., Weber M.H.W., Marahiel M.A. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures // Journal of Bacteriology. 1999. Vol. 181, no. 17. P. 5341–5349. DOI: 10.1128/jb.181.17.5341-5349.1999.
- 39.** Beckering C.L., Steil L., Weber M.H.W., Völker U., Marahiel M.A. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis* // Journal of Bacteriology. 2002. Vol. 184, no. 22. P. 6395–6402. DOI: 10.1128/jb.184.22.6395-6402.2002.
- 40.** Sriwiriyarat T., Nuchlek P. Effects of pH on extracellular polymeric substances compositions of biofilm in Integrated Fixed Film Activated Sludge process // International Journal of Environmental Science and Technology. 2022. Vol. 19. P. 73–84. DOI: 10.1007/s13762-021-03316-z.
- 41.** Tahir U., Nawaz S., Khan U.H., Yasmin A. Assessment of biodecolorization potentials of biofilm forming bacteria from two different genera for Mordant Black 11 dye // Bioremediation Journal. 2021. Vol. 25, no. 3. P. 252–270. DOI: 10.1080/10889868.2021.1911920.
- 42.** Rath S., Palit K., Das S. Variable pH and subsequent change in pCO_2 modulates the biofilm formation, synthesis of extracellular polymeric substances, and survivability of a marine bacterium *Bacillus stercoris* GST-03 // Environmental

Research. 2022. Vol. 214. P. 114128. DOI: 10.1016/j.envres.2022.114128.

43. Al-Kahachi R., Al-Asadi S., Ali Z.O., Rampurawala J. Effects of genetic and environmental variables on biofilm development dynamics in *Achromobacter mucicola* // Iranian Journal of Microbiology. 2023. Vol. 15, no. 3. P. 414–424. DOI: 10.18502/ijm.v15i3.12902.

44. Chakraborty I., Bhowmick G.D., Nath D., Khuman C.N., Dubey B.K., Ghangrekar M.M. Removal of sodium dodecyl sulphate from wastewater and its effect on anodic biofilm and performance of microbial fuel cell // International Biodeterioration & Biodegradation. 2021. Vol. 156. P. 105108. DOI: 10.1016/j.ibiod.2020.105108.

45. Gill S.P., Hunter W.R., Coulson L.E., Banat I.M., Schelker J. Synthetic and biological surfactant effects on

freshwater biofilm community composition and metabolic activity // Applied Microbiology and Biotechnology. 2022. Vol. 106. P. 6847–6859. DOI: 10.1007/s00253-022-12179-4.

46. Fedeila M., Hachaïchi-Sadouk Z., Bautista L.F., Simarro R., Nateche F. Biodegradation of anionic surfactants by *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* strains isolated from industrial wastewater // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2018. Vol. 163. P. 629–635. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.123.

47. Sarioglu O.F., Celebioglu A., Tekinay T., Uyar T. Evaluation of contact time and fiber morphology on bacterial immobilization for development of novel surfactant degrading nanofibrous webs // RSC Advances. 2015. Vol. 5, no. 124. P. 102750–102758. DOI: 10.1039/c5ra20739h.

REFERENCES

1. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14:563–575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94.
2. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*. 2002;56:187–209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
3. Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*. 2017;7(58):36670–36683. DOI: 10.1039/C7RA02497E.
4. Ouidir T., Gabriel B., Chabane Y.N. Overview of multi-species biofilms in different ecosystems: wastewater treatment, soil and oral cavity. *Journal of Biotechnology*. 2022;350:67–74. DOI: 10.1016/j.biote.2022.03.014.
5. Çam S., Brinkmeyer R. The effects of temperature, pH, and iron on biofilm formation by clinical versus environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Folia Microbiologica*. 2020;65:557–566. DOI: 10.1007/s12223-019-00761-9.
6. Zhang X.-S., García-Contreras R., Wood T.K. YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. *Journal of Bacteriology*. 2007;189(8):3051–3062. DOI: 10.1128/jb.01832-06.
7. Di Bonaventura G., Stepanović S., Picciani C., Pompilio A., Piccolomini R. Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Folia Microbiologica*. 2007;52(1):86–90. DOI: 10.1007/BF02932144.
8. Bisht K., Moore J.L., Caprioli R.M., Skaar E.P., Wakeman C.A. Impact of temperature-dependent phage expression on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *NPJ Biofilms and Microbiomes*. 2021;7:22. DOI: 10.1038/s41522-021-00194-8.
9. Aonofriesei F. Surfactants' interplay with biofilm development in *Staphylococcus* and *Candida*. *Pharmaceutics*. 2024;16(5):657. DOI: 10.3390/pharmaceutics16050657.
10. Schreiberová O., Hedbávná P., Čejková A., Jirků V., Masák J. Effect of surfactants on the biofilm of *Rhodococcus erythropolis*, a potent degrader of aromatic pollutants. *New Biotechnology*. 2012;30(1):62–68. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.04.005.
11. Bjergbæk L.A., Haagensen J.A.J., Reisner A., Molin S., Roslev P. Effect of oxygen and growth medium on in vitro biofilm formation by *Escherichia coli*. *Biofilms*. 2006;3(1):1–10. DOI: 10.1017/S1479050507002074.
12. Werner E., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Heydorn A., Molin S., et al. Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(10):6188–6196. DOI: 10.1128/AEM.70.10.6188-6196.2004.
13. Bühler T., Ballester S., Desai M., Brown M.R. Generation of a reproducible nutrient-depleted biofilm of *Escherichia coli* and *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*. 1998;85(3):457–462. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.853501.x.
14. Alotaibi G.F., Bukhari M.A. Characterization and evaluation of biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* MBB9 isolated from epilithic biofilms of the Porter Brook River, Sheffield. *Edelweiss Journal of Biomedical Research and Review*. 2021;3(1):14–24. DOI: 10.33805/2690-2613.120.
15. Wang C., Lin Q., Yao Y., Xu R., Wu X., Meng F. Achieving simultaneous nitrification, denitrification, and phosphorus removal in pilot-scale flow-through biofilm reactor with low dissolved oxygen concentrations: performance and mechanisms. *Bioresource Technology*. 2022;358:127373. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127373.
16. Khudhair D.N., Hosseinzadeh M., Zwain H.M., Siadatmousavi S.M., Majdi A., Mojiri A. Upgrading the MBBR process to reduce excess sludge production in activated sludge system treating sewage. *Water*. 2023;15(3):408. DOI: 10.3390/w15030408.
17. Silva T.P., Alves L., Paixão S.M. Effect of dibenzothiophene and its alkylated derivatives on coupled desulfurization and carotenoid production by *Gordonia alkanivorans* strain 1B. *Journal of Environmental Management*. 2020;270:110825. DOI: 10.1016/j.jenvman.2020.110825.
18. Zhou X., Liu H., Fan X., Wang X., Bi X., Cheng L., Huang S., et al. Comparative analysis of bacterial information of biofilms and activated sludge in full-scale MBBR-IFAS systems. *Microorganisms*. 2024;12(6):1121. DOI: 10.3390/microorganisms12061121.
19. Alisawi H.A.O. Performance of wastewater treatment during variable temperature. *Applied Water Science*. 2020;10:89. DOI: 10.1007/s13201-020-1171-x.
20. Maal-Bared R. Operational impacts of heavy metals on activated sludge systems: the need for improved monitoring. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2020;192(9):560. DOI: 10.1007/s10661-020-08529-2.
21. Lu F., Huang L., Qian F., Jiang Q., Khan S., Shen P. Resistance of anaerobic activated sludge acclimated by different feeding patterns: response to different stress

- shocks. *Water Science and Technology*. 2022;85(10):3023-3035. DOI: 10.2166/wst.2022.164.
- 22.** Németh A., Ainsworth J., Ravishankar H., Lens P.N.L., Heffernan B. Temperature dependence of nitrification in a membrane-aerated biofilm reactor. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14:1114647. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1114647.
- 23.** Li J., Xing X.-H., Wang B.-Z. Characteristics of phosphorus removal from wastewater by biofilm sequencing batch reactor (SBR). *Biochemical Engineering Journal*. 2003;16:279-285.
- 24.** Demakov V.A., Vasil'ev D.M., Maksimova Y.G., Pavlova Y.A., Ovechkina G.V., Maksimov A.Y. Activated sludge bacteria transforming cyanopyridines and amides of pyridinecarboxylic acids. *Mikrobiologiya*. 2015;84(3):369-378. (In Russian). DOI: 10.7868/S0026365615030039. EDN: TQQVBB.
- 25.** Khasanova A.A., Sirotkin A.S., Perushkina E.V. Study on the ability of activated sludge bacteria to form biofilms in vitro. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(2):207-214. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.912. EDN: PCUTZF.
- 26.** Maksimova Yu.G., Sergeeva A.A., Ovechkina G.V., Maksimov A.Yu. Pyridine degradation by suspensions and biofilms of *Achromobacter pulmonis* PNOS and *Burkholderia dolosa* BOS strains isolated from activated sludge of sewage treatment plants. *Biotehnologiya*. 2020;36(2):86-98. (In Russian). DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-2-86-98. EDN: IYFZFI.
- 27.** Kumar A., Bhunia B., Dasgupta D., Mandal T., Dey A., Datta S., et al. Optimization of culture condition for growth and phenol degradation by *Alcaligenes faecalis* JF339228 using Taguchi methodology. *Desalination and Water Treatment*. 2013;51(16-18):3153-3163. DOI: 10.1080/19443994.2012.749021.
- 28.** Vandamme P., Moore E.R.B., Cnockaert M., De Brandt E., Svensson-Stadler L., Houf K., et al. *Achromobacter animicus* sp. nov., *Achromobacter mucicola* sp. nov., *Achromobacter pulmonis* sp. nov. and *Achromobacter spiritinus* sp. nov., from human clinical samples. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013;36(1):1-10. DOI: 10.1016/j.syapm.2012.10.003.
- 29.** Deng Z., Chen H., Chen S. Medium optimization for nitrogen fixer *Paenibacillus* sp. 1-49. *Acta Microbiologica Sinica*. 2016;56(9):1415-1425.
- 30.** Suwanmanon K., Hsieh P.-C. Isolating *Bacillus subtilis* and optimizing its fermentative medium for GABA and nattokinase production. *CyTA – Journal of Food*. 2013;12(3):282-290. DOI: 10.1080/19476337.2013.848472.
- 31.** Maksimova Yu., Bykova Ya., Maksimov A. Functionalization of multi-walled carbon nanotubes changes their antibiofilm and probiofilm effects on environmental bacteria. *Microorganisms*. 2022;10(8):1627. DOI: 10.3390/microorganisms10081627.
- 32.** Singh P., Srivastava S., Malhotra R., Mathur P. Identification of *Candida auris* by PCR and assessment of biofilm formation by crystal violet assay. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2023;46:100421. DOI: 10.1016/j.ijmm.2023.100421.
- 33.** Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T., Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2006;24(1):25-29. DOI: 10.1016/S0255-0857(21)02466-X.
- 34.** Luzak B., Siarkiewicz P., Boncler M. An evaluation of a new high-sensitivity PrestoBlue assay for measuring cell viability and drug cytotoxicity using EA.hy926 endothelial cells. *Toxicology in Vitro*. 2022;83:105407. DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105407.
- 35.** Velkov V.V. New insights into the molecular mechanisms of evolution: stress increases genetic diversity. *Molecular Biology*. 2022;36:209-215. DOI: 10.1023/A:1015365805383.
- 36.** Moreno Switt A.I., Andrus A.D., Ranieri M.L., Orsi R.H., Ivy R., den Bakker H.C., et al. Genomic comparison of sporeforming bacilli isolated from milk. *BMC Genomics*. 2014;15:26. DOI: 10.1186/1471-2164-15-26.
- 37.** Asadishad B., Olsson A.L.J., Dusane D.H., Ghoshal S., Tufenkji N. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of *Bacillus subtilis* exposed to cold temperature and freeze-thaw. *Water Research*. 2014;58:239-247. DOI: 10.1016/j.watres.2014.03.048.
- 38.** Klein W., Weber M.H.W., Marahiel M.A. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(17):5341-5349. DOI: 10.1128/jb.181.17.5341-5349.1999.
- 39.** Beckering C.L., Steil L., Weber M.H.W., Völker U., Marahiel M.A. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 2002;184(22):6395-6402. DOI: 10.1128/jb.184.22.6395-6402.2002.
- 40.** Sriwiriyarat T., Nuchlek P. Effects of pH on extracellular polymeric substances compositions of biofilm in Integrated Fixed Film Activated Sludge process. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2022;19:73-84. DOI: 10.1007/s13762-021-03316-z.
- 41.** Tahir U., Nawaz S., Khan U.H., Yasmin A. Assessment of biodecolorization potentials of biofilm forming bacteria from two different genera for Mordant Black 11 dye. *Bioremediation Journal*. 2021;25(3):252-270. DOI: 10.1080/10889868.2021.1911920.
- 42.** Rath S., Palit K., Das S. Variable pH and subsequent change in pCO₂ modulates the biofilm formation, synthesis of extracellular polymeric substances, and survivability of a marine bacterium *Bacillus stercoris* GST-03. *Environmental Research*. 2022;214:114128. DOI: 10.1016/j.envres.2022.114128.
- 43.** Al-Kahachi R., Al-Asadi S., Ali Z.O., Rampurawala J. Effects of genetic and environmental variables on biofilm development dynamics in *Achromobacter mucicola*. *Iranian Journal of Microbiology*. 2023;15(3):414-424. DOI: 10.18502/ijm.v15i3.12902.
- 44.** Chakraborty I., Bhowmick G.D., Nath D., Khuman C.N., Dubey B.K., Ghangrekar M.M. Removal of sodium dodecyl sulphate from wastewater and its effect on anodic biofilm and performance of microbial fuel cell. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2021;156:105108. DOI: 10.1016/j.ibiod.2020.105108.
- 45.** Gill S.P., Hunter W.R., Coulson L.E., Banat I.M., Schelker J. Synthetic and biological surfactant effects on freshwater biofilm community composition and metabolic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022;106:6847-6859. DOI: 10.1007/s00253-022-12179-4.

46. Fedeila M., Hachaïchi-Sadouk Z., Bautista L.F., Simarro R., Nateche F. Biodegradation of anionic surfactants by *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* strains isolated from industrial wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018;163:629-635. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.123.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

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

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

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

Вклад авторов

А.А. Хасанова – проведение исследования, формальный анализ, валидация результатов, написание черновика рукописи.
А.С. Сироткин – разработка концепции, разработка методологии, валидация результатов, редактирование рукописи.
Е.В. Перушкина – разработка концепции, разработка методологии, валидация результатов, редактирование рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Информация о статье

Поступила в редакцию 14.03.2025.
Одобрена после рецензирования 20.05.2025.
Принята к публикации 21.11.2025.

47. Sarioglu O.F., Celebioglu A., Tekinay T., Uyar T. Evaluation of contact time and fiber morphology on bacterial immobilization for development of novel surfactant degrading nanofibrous webs. *RSC Advances*. 2015;5(124):102750-102758. DOI: 10.1039/c5ra20739h.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

Contribution of the authors

Aigul A. Khasanova – investigation, formal analysis, validation, writing – original draft.
Aleksandr S. Sirotkin – conceptualization, methodology, validation, editing.
Elena V. Perushkina – conceptualization, methodology, validation, editing.

Conflict of interest

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

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

Information about the article

The article was submitted 14.03.2025.
Approved after reviewing 20.05.2025.
Accepted for publication 21.11.2025.