

УДК 579.695

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОМА АКТИВНОГО ИЛА И ОПТИМИЗАЦИЯ ЕГО МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Брындина Л. В., Корчагина А. Ю.

***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет
им. Г. Ф. Морозова», Воронеж, Россия
E-mail: bryndinv@mail.ru***

Показана возможность оптимизации микробиома активного ила сточных вод, которая достигается корректировкой аборигенного бактериального сообщества микроорганизмами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных (свиньи). Внесение 5 % ЖКТ подавляло рост нитчатых бактерий. Увеличилась доля гетеротрофных бактерий ответственных за процессы денитрификации в активном иле. Доля *Lactococcus* увеличилась в 2,7 раза, *Acinetobacter* – в 3,1 раза, *Pseudomonas* – в 4,1 раза, *Lactobacillus* – в 4,4 раза, *Streptococcus* – в 5,2 раза, *Escherichia/Shigella* – в 20 раз. Установлена положительная динамика между процессами флокулообразования и денитрификации. Наибольшая денитрификация соответствовала максимальному размеру флокул. Флокулы размером 240 нм через 1,5 ч снижали содержание нитратов в стоке на 85,4 %. В то же время, не установлено корреляционной зависимости между значением ζ -потенциала и эффективностью денитрификации в сточной воде. Полученные экспериментальные данные могут быть использованы при отслеживании процессов нитрификации/денитрификации в сточных водах и снижении нитчатого вспухания активного ила.

Ключевые слова: микробиом; активный ил; сточные воды; аэробная денитрификация; анаэробные зоны; вспухание активного ила.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время появилось много исследований по повышению качества и эффективности очистки сточных вод. Основной проблемой при очистке хозяйственно-бытовых сточных вод является снижение концентрации биогенных элементов в очищенных стоках. В противном случае нарушается экологическое равновесие водоемов и, как следствие, в результате антропогенной эвтрофикации возможно полное разрушение экосистемы водного объекта. Наиболее сложным во всех биологических способах очистки считается удаление биогенного азота. Процесс удаления биологического азота включает в себя несколько стадий:

- аэробная нитрификация аммонийного азота до нитритов и нитратов;
- анаэробная денитрификация нитратов до свободного азота.

Высокая концентрация аммонийного азота (более 50 мг/л) требует большого количества кислорода (4,6 мг O_2 на 1 мг окисленного азота) на окисление органических примесей сточной воды [1]. Это может увеличивать стрессовые нагрузки на микроорганизмы из-за нехватки кислорода, приводить к сукцессии биоценоза ила и развитию процесса его вспухания. В таких условиях преимущественное развитие получают микроорганизмы с большой поверхностью

для поглощения кислорода – нитчатые [2, 3]. Вспухание активного ила – это ответ его биоценоза на неблагоприятные факторы. Поэтому активизация ферментативной активности микрофлоры активного ила позволит создать условия, при которых улучшится качество очистки стоков.

Денитрификация осуществляется в анаэробных условиях гетеротрофными денитрифицирующими микроорганизмами. Эффективность и скорость этого процесса зависят от присутствия в сточных водах легкоокисляемых форм органического углерода. В большинстве случаев дополнительные источники его не вводятся в сточные воды по причине экономической нецелесообразности. При этом отмечается, что потребность в легкоокисляемом источнике углерода для обеспечения эффективной денитрификации в данном процессе снижается в силу того, что некоторые денитрифицирующие микроорганизмы, участвующих в одновременной нитрификации и денитрификации, являются автотрофными [4].

Большинство исследований в области очистки сточных вод биологическими методами направлено на совершенствование анаэробных и аэробных стадий процесса. Перспективным направлением в этой области считается процесс «аэробной денитрификации» [4]. Внутри биофлокул активного ила в результате распределения градиентов концентрации растворенного кислорода одновременно протекают процессы нитрификации и денитрификации. В центре флокул находятся анаэробные зоны, в которых гетеротрофные денитрифицирующие бактерии восстанавливают нитраты. Эксперименты в этой области ведутся активно и в нашей стране, и за рубежом, но в основном опытные разработки направлены на совершенствование конструктивных особенностей оборудования и технологических режимов [5–8].

Исследование популяций микроорганизмов активного ила, участвующих в процессах «аэробной денитрификации», изучено недостаточно. Следует отметить, что сведения о микробиологической составляющей осадков сточных вод основаны в большинстве случаев на классических микробиологических способах их идентификации. Они не позволяют дать полное представление о микроорганизмах, населяющих активный ил.

Представители каждого рода бактерий в биоценозе активного ила выполняют определенные функции и задачи. Чем больше их разнообразие, тем больше возможностей взаимодополнять, обмениваться необходимыми веществами, и тем устойчивее система в целом.

В последнее время широко изучаются микробиомы животных [9–17]. Проводятся полноценные исследования по определению их видового разнообразия. Многие процессы в кишечном симбиозе протекают при объединении микроорганизмов в консорциумы. Представители одних видов микроорганизмов ферментируют сложные органические субстраты для других. Это позволило нам предположить, что микробиом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных может являться дополнительным поставщиком источников питания в легкоусвояемой форме для микроорганизмов активного ила.

Качество биологической очистки обуславливается не только видовым разнообразием активного ила. Процессы денитрификации при очистке сточных вод

можно оценивать по интенсивности флокулообразования и величине ζ -потенциала [18, 19].

Гульшин И. А. подчеркивает, что более крупные флоккулы способствуют созданию стабильных аноксидных зон. Максимальная эффективность одновременной нитрификации и денитрификации была достигнута при размерах флоккул активного ила в диапазоне от 200 до 250 мкм [18].

Так же сотрудники ЗАО «Проектно-конструкторское предприятие Адсорбер» и Пермского национального исследовательского политехнического университета отмечают, что процесс денитрификации можно отслеживать по ζ -потенциалу [19]. Наиболее эффективно процесс протекает в диапазоне от +50 до -50 мВ и продолжительности 1ч.

Большинство исследователей действительно отмечают, что высокие положительные или отрицательные значения ζ -потенциала (более 30 мВ) приводят к стабилизации системы и утверждают – чем выше его значение, тем устойчивее биосуспензия [20]. Однако Роланд с соавторами [21], напротив, не наблюдали корреляции между высокими значениями ζ -потенциала (от -43,1 до -50,2 мВ) и общей стабильностью. Стабильные эмульсии в этом случае демонстрировали самый низкий ζ -потенциал.

В связи с этим, целью работы было исследовать взаимодействие микроорганизмов активного ила и ЖКТ животных и оценить последствия этого влияния на эффективность процесса денитрификации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- обосновать целесообразность создания модифицированного консорциума микроорганизмов, способного подавить развитие нитчатых бактерий;
- определить условия, влияющие на процесс денитрификации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись активный ил и сточные воды левобережных городских очистных сооружений г. Воронежа, кишечник свиней, предоставленный ООО «Бутурлиновский мясокомбинат».

Определение α -разнообразия проводили по индексу Шеннона [22, 23].

Выделение ДНК и полученных образцов производили с помощью коммерческого набора ZymoBIOMICS DNA Microprep Kit (Zymo research, USA) в соответствии с протоколом.

В качестве таргетного сегмента бактериальной ДНК для исследования микробиома с помощью секвенирования на платформе Ion Torrent PGM использовали гипервариабельный участок V3 гена 16S rRNA. Данный ген присутствует у всех представителей бактерий, содержит достаточную филогенетическую информацию и характеризуется выраженной генетической изменчивостью у прокариотических организмов. Для изоляции бактериальной ДНК проводили ПЦР с универсальными праймерами 337F (5'-GACTCCTACGGGAGGCGWGCAG-3') и 518R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3'), ограничивающими гипервариабельный участок V3 гена 16S rRNA. ПЦР проводили

в следующем амплификационном режиме: денатурация при 94 °C – 4 мин, затем 37 циклов: 94 °C – 30 с, 59 °C – 30 с, 72 °C – 30 с, с финальной элонгацией при 72 °C – 5 мин.

После амплификации проводили очистку ДНК из реакционной ПЦР-смеси с помощью коммерческого набора CleanMag DNA (Evrogen, Россия).

Для приготовления библиотек секвенирования на платформе Ion Torrent PGM использовали набор реактивов NEBNext Fast DNA Library Prep (New England Biolabs, США).

Секвенирование проводили на платформе IonTorrent PGM с использованием реактивов и систем Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit, Ion OneTouch 2 System, and Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Результаты секвенирования получены в формате BAM и преобразованы в формат FASTQ с помощью программного обеспечения SAMtools v.1.2.

Демультимплексирование выполнялось с помощью приложения fastq-multx пакета программ ea-utils v.1.3. Чтения отфильтрованы на основе ожидаемого количества ошибок с использованием максимального ожидаемого отсека ошибок 1.0. Поиск OTU производился с использованием алгоритма UNOISE2. Фильтрация считываний, идентификация уникальных последовательностей и кластеризация для поиска OTU выполнялись с использованием программного обеспечения USEARCH v.10.0.240. Таксоны микроорганизмов в образцах были идентифицированы с использованием базы данных SILVA v.123

Величину ζ -потенциала рассчитывали по формуле:

$$\zeta = (U \cdot \mu \cdot L) / (\epsilon_o \cdot \epsilon \cdot E),$$

где U – электрофоретическая скорость, м·с⁻¹;

μ – вязкость воды при температуре опыта, м²·с⁻¹;

$\epsilon_o = 8,85 \cdot 10^{-12}$ – электрическая постоянная, Кл/(В·м);

ϵ – диэлектрическая проницаемость среды;

E – разность потенциалов внешнего электрического поля, В;

L – расстояние между электродами, м.

Определение ζ -потенциала основано на способности бактериальных клеток перемещаться в электрическом поле к одному из полюсов. Подсчет количества бактериальных клеток проводили в камере Горяева под микроскопом. Средой служил физиологический раствор, который активировали в электроактиваторе «Эсперо-1». Использовали свежеприготовленные католит и анолит, а также растворы, в которых требуемые величины pH, окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) получали, добавляя фосфатный буфер.

Определение массовой концентрации нитрат-иона проводили по ГОСТ 33045-2014. Вода. Методы определения азотсодержащих веществ. Сущность метода заключается во взаимодействии нитратов с салициловокислым натрием в сернокислой среде с образованием соли нитросалициловой кислоты, окрашенной в желтый цвет, и последующим фотометрическим определением и расчетом массовой концентрации нитратов в пробе исследуемой воды. Содержание нитрат-ионов, X , мг/дм³ рассчитывали по формуле:

$$X = C \times K / V,$$

где C – содержание нитрат-ионов, найденное по графику, мг/дм³;

K – коэффициент градуировочной характеристики, рассчитанный по формуле $K = C_i/A_i$ (где C_i – массовая концентрация ионов аммония в i -м градуировочном растворе, мг/дм³; A_i – среднеарифметическое значение оптической плотности i -го градуировочного раствора за вычетом среднеарифметического значения оптической плотности холостой пробы, ед.опт.пл.)

V – объем исследуемой пробы, взятой на анализ, дм³.

Определение размера флуккул проводили методом светорассеяния.

Очистку сточных вод проводили микробиомом кишечника свиней в концентрации 5 % к массе активного ила. Пробы культивировали в шейкере-инкубаторе фирмы Biosan при температуре 25 °С, начальном рН = 7,0 в течение 72 ч. при скорости вращения 200 об/мин.

Все опыты, описанные в работе, проводили 3-х кратной повторности. В таблицах и рисунках показаны данные, где каждое значение есть среднее из трех определений. Обсуждаются только те результаты, которые были воспроизводимы в каждом опыте. При математической обработке результатов использовали критерий Стьюдента. Достоверными считали различия с уровнем значимости $q=5\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ бактерий активного ила и ЖКТ на основе данных секвенирования показал, что наибольшая доля микроорганизмов приходится на тип Firmicutes (табл. 1). Вероятно, бактерии данного филума ответственны за большую часть трансформационных процессов в активном иле и ЖКТ. В процессе ферментации они производят ряд важных метаболитов, таких как витамины и жирные кислоты с короткой цепью, обладают амила- и целлюлозолитической активностью. Большинство Firmicutes спорообразующие, что дает им преимущество при выживании в неблагоприятных условиях.

Доля бактерий филума Bacteroidetes, после внесения в активный ил 5 % микробиома кишечника свиньи, увеличилась в 1,7 раза (табл. 1). Bacteroidetes благодаря наличию амила- и протеолитических ферментов способны расщеплять не только простые и сложные сахара, но и белки. Возможно, увеличение Bacteroidetes связано со спецификой веществ, ферментируемых микробиомом ЖКТ свиньи. Высокое содержание в кишечнике белков активизирует рост Bacteroidetes. Многие представители филума Bacteroidetes выполняют сложные метаболические превращения.

Представители типа Actinobacteria в активном иле встречались чаще, чем в ЖКТ. После внесения 5 % ЖКТ в активный ил, их доля снизилась в 5,5 раза (табл. 1). Следует отметить, что 42,5 % из них в активном иле была представлена аэробными нитчатными бактериями родов Gaiella, Intraspangium, Dietzia. Присутствие этих микроорганизмов свидетельствует о предрасположенности исследуемого активного ила к вспуханию. Резкое снижение Actinobacteria после добавления ЖКТ в активный ил, скорее всего, связано с тем, что микробиоценоз кишечника свиньи антагонистически вытесняет представителей данного филума.

Тип *Proteobacteria* включает в себя широкий спектр грамотрицательных микроорганизмов. В то время как основную массу бактерий ЖКТ составляют облигатные анаэробы, представители типа *Proteobacteria* являются факультативными анаэробами. *Proteobacteria* способны продуцировать нитраты, адаптироваться к экстремальным условиям окружающей среды. Их содержание практически оставалось на одном уровне.

Тип *Verrucomicrobiota* сбраживает различные сахара. Некоторые представители окисляют метан. По типу дыхания могут быть аэробами и факультативными анаэробами, по отношению к температуре: мезофилы [16]. В нашем исследовании содержание бактерий типа *Verrucomicrobiota* после добавления в активный ил ЖКТ возросло в 18,5 раз (табл. 1).

Появление в активном иле представителей типов *Fusobacteriota*, *Campilobacterota* свидетельствовало о низком содержании кислорода в стоке. Они требовательны к газовому составу среды и не растут при содержании кислорода более 5 % [24].

Таблица 1

Соотношение основных филумов микробиоты

Тип (филум)бактерий Указать классиф. единицы	Активный ил	Кишечник свиньи	Активный ил+ 5 % кишечник свиньи
Firmicutes	61,0	53,1	54,3
Bacteroidetes	13,2	21,9	22,6
Actinobacteria	9,3	6,3	1,7
Proteobacteria	15,5	15,6	17,7
Verrucomicrobiota	0,2	3,1	3,7
Fusobacteriota	0,2	-	-
Campilobacterota	0,6	-	-

Fusobacteriota и *Campilobacterota* – анаэробные бактерии, обладают низкой ферментативной активностью. Следует отметить, что представители данных типов могут иметь нитевидную форму [24], а значит усиливать эффект вспухания активного ила. Вероятно, микробиом ЖКТ свиньи, внесенный в аборигенную микрофлору активного ила, подавляет рост представителей *Fusobacteriota* и *Campilobacterota*, корректируя тем самым присутствие нитевидных форм бактерий в активном иле (табл. 1).

Анализ состава микробиомов на уровне класса (рис. 1) показал, что самыми распространенными желудочно-кишечными микроорганизмами типа *Firmicutes* являются представители класса *Clostridia*. Эти же представители преобладали и в активном иле. Но микроорганизмов класса *Clostridia* на 11,9 % в ЖКТ было больше, чем в активном иле (рис. 1). Полученные экспериментальные данные совпадают с исследованиями [25].

Интересен тот факт, что доля бактерий класса Bacilli (тип Firmicutes), обнаруженных в активном иле, увеличилась на 2 % после добавления микробиома ЖКТ.

Среди представителей типа Bacteroidetes преобладали бактерии класса Bacteroidia. Можно отметить, что микробиом ЖКТ активизировал развитие представителей данного класса в активном иле на 2,9 %.

Тип Proteobacteria был представлен, в основном, бактериями класса Gammaproteobacteria. Эти микроорганизмы преобладали в активном иле, многие из них способны были к расщеплению белков, липидов и углеводов. Внесение микробиома ЖКТ спровоцировало их рост в активном иле на 3,7 %.

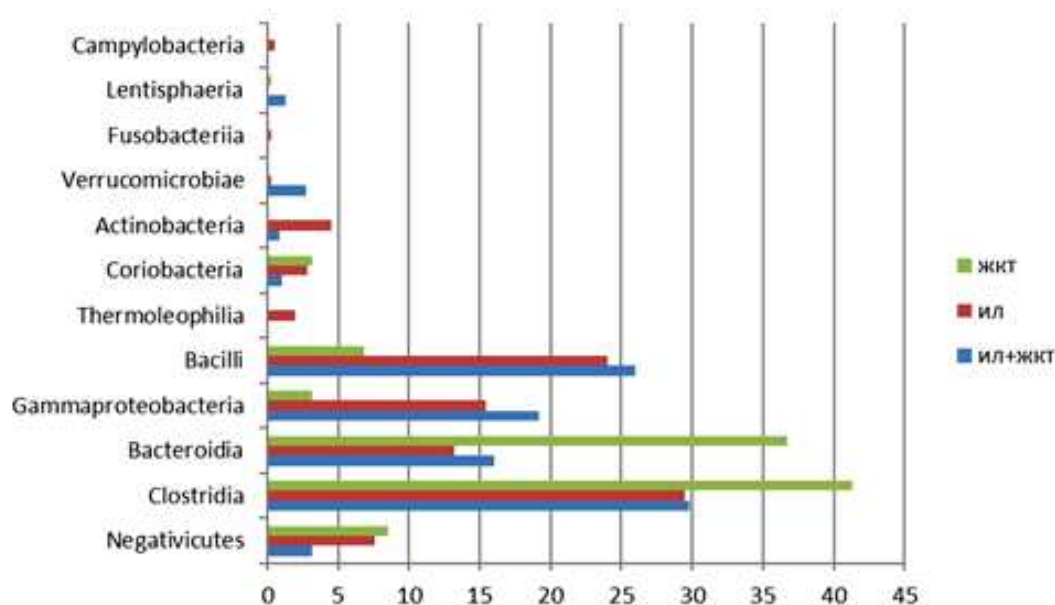


Рис. 1. Таксономический профиль микробиома ила, ЖКТ, ила + ЖКТ, определенный до уровня класса, %.

Полученные результаты позволяют предположить, что микроорганизмы ЖКТ, внесенные в микробиоту активного ила, несмотря на высокую долю анаэробных бактерий, способствовали снижению нитчатых форм бактерий. Полностью исчезли представители классов Thermoleophilia, Fusobacteriia, Lentisphaeria. Отмечена положительная динамика взаимодействия микробиоты ЖКТ и активного ила.

Внутри класса Clostridia преобладали представители семейства Ruminococcaceae и Lachnospiraceae (рис. 2). Внесение микробиома в активный ил привело к уменьшению бактерий Ruminococcaceae на 5,2 % , Lachnospiraceae – на 1,6 % и к активному росту семейства Oscillospiraceae, численность которых увеличилась в 2 раза.

Из представителей класса Bacilli больше всего в активном иле было микроорганизмов семейств Staphylococcaceae и Carnobacteriaceae, количество которых, после взаимодействия с микробиомом ЖКТ, сократилось в 2,4 и 39 раз соответственно. Одновременно наблюдалось повышение Lactobacillaceae в 4,3 раза и Streptococcaceae – в 3,6 раза. Интересно отметить, что возросло число тех бактерий, которые способны к ферментации не только углеводов, но и белков, а снизилось присутствие в активном иле представителей микробного сообщества, отдающих предпочтение углеводам. Видимо, микробиом ЖКТ, внесенный в аборигенную микрофлору активного ила, активизировал рост микроорганизмов с протеолитическими ферментами.

Из класса Campilobacterota более чем в 3 раза повысилась доля представителей семейства Enterobacteriaceae, которые также проявляют высокую активность в отношении белковых загрязнений. Общая численность бактерий семейства Pseudomonadaceae и Moraxellaceae почти не изменилась после внесения микробиома ЖКТ. Одновременно с этим в 7 раз сократилось количество Sutterellaceae (рис. 2) и полностью исчезли микроорганизмы семейства Arcobacteraceae.

Большая часть типа Bacteroidetes (класс Bacteroida) была представлена семейством Prevotellaceae (рис. 2). Их доля в активном иле после внесения микроорганизмов ЖКТ возросла на 1,6 %. Бактерии семейств Bacteroidaceae увеличились в 7,8 раза, Rikenellaceae – в 4,6, Muribaculaceae – в 11 раз. Рост их численности можно объяснить наличием универсального набора ферментов [26]. Bacteroides способны переключать экспрессию генов с одного метаболического пути на другой, так как обладают высокой гибкостью к использованию различных субстратов [27].

Общая численность семейства Tannerellaceae сократилась почти в 2 раза. Это связано с тем, что представители рода Macellibacteroides данного семейства отрицательно коррелируют с концентрацией кислорода [28], которая существенно выше в активном иле, чем в ЖКТ.

Взаимодействие микробиоты активного ила и ЖКТ привело к появлению семейств Barnesiellaceae и Marinifilaceae в активном иле. Это повлияло на снижение бактерий семейства Clostridiaceae в 4,8 раза в активном иле (рис. 2). Полученные результаты исследования совпадают с данными экспериментов группы экологов во главе с I. Lagkouravdos, которые также отметили влияние Marinifilaceae на подавление размножения Clostridiaceae [26].

Сравнительный анализ активного ила на уровне родов (рис. 3) показал следующее. После внесения микробиома ЖКТ в активный ил полностью исчезли представители нитчатых форм бактерий (Gaiella, Intrasporgium, Dietzia).

Увеличилась численность некоторых родов анаэробных бактерий. Так, представители рода UCG-002 заняли лидирующую позицию. Их количество удвоилось. Prevotella по распространенности заняли 2-е место. Однако, если внесение микробиома ЖКТ в активный ил достоверно повышало UCG-002, то Prevotella изначально было больше в ЖКТ, чем в активном иле. Накопление доли этих микроорганизмов в микробиоте «активный ил + ЖКТ» составило 1,43 % (табл. 2). Возрастание анаэробных бактерий в активном иле, связанное с

преобладанием их в ЖКТ, возможно активизировало конкуренцию между отдельными представителями за источники питания. Это позволило создать анаэробные условия в активном иле для активизации процессов денитрификации [29].

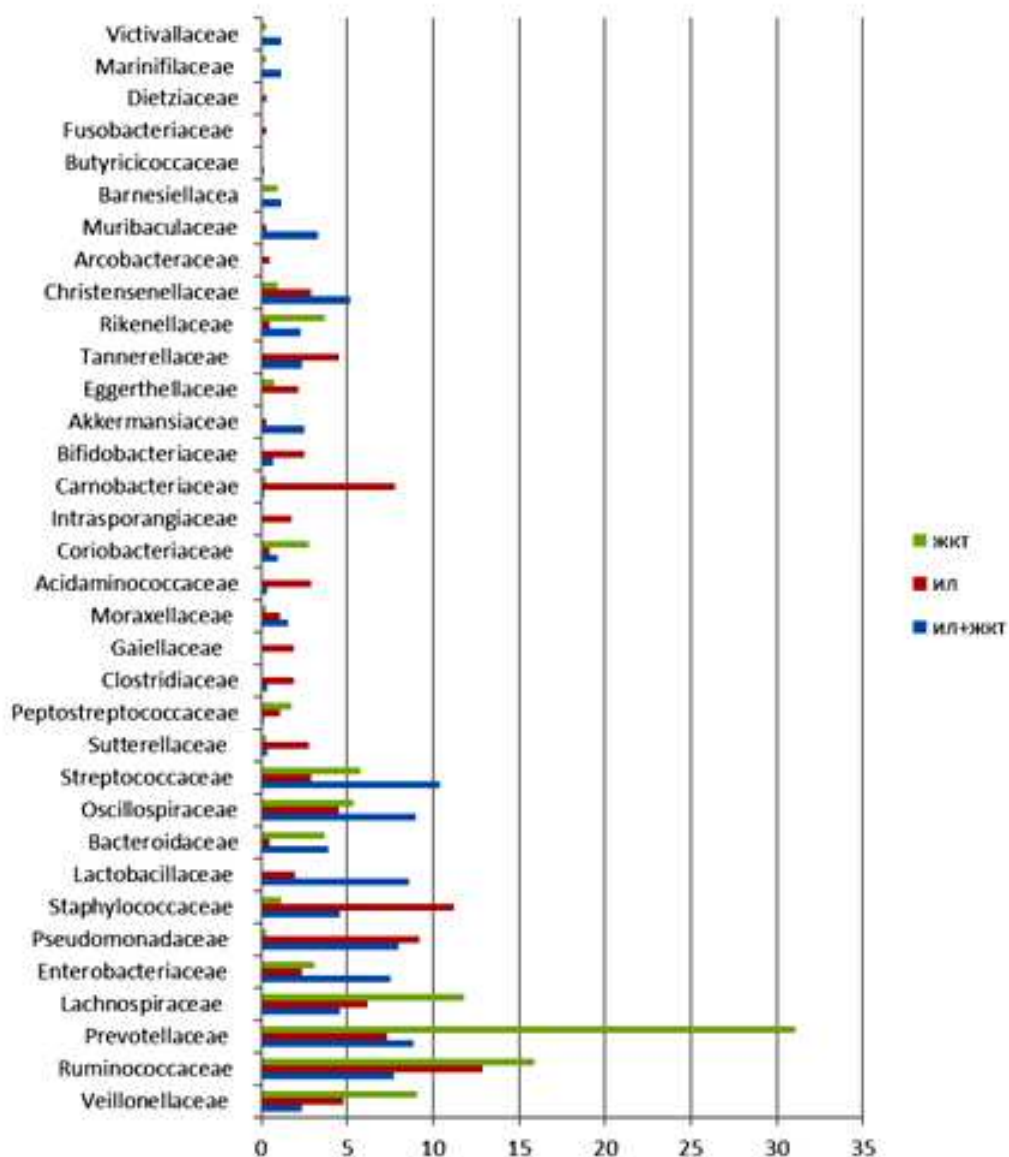


Рис. 2. Таксономический профиль микробиома ила, ЖКТ, ила + ЖКТ, определенный до уровня семейства, %.

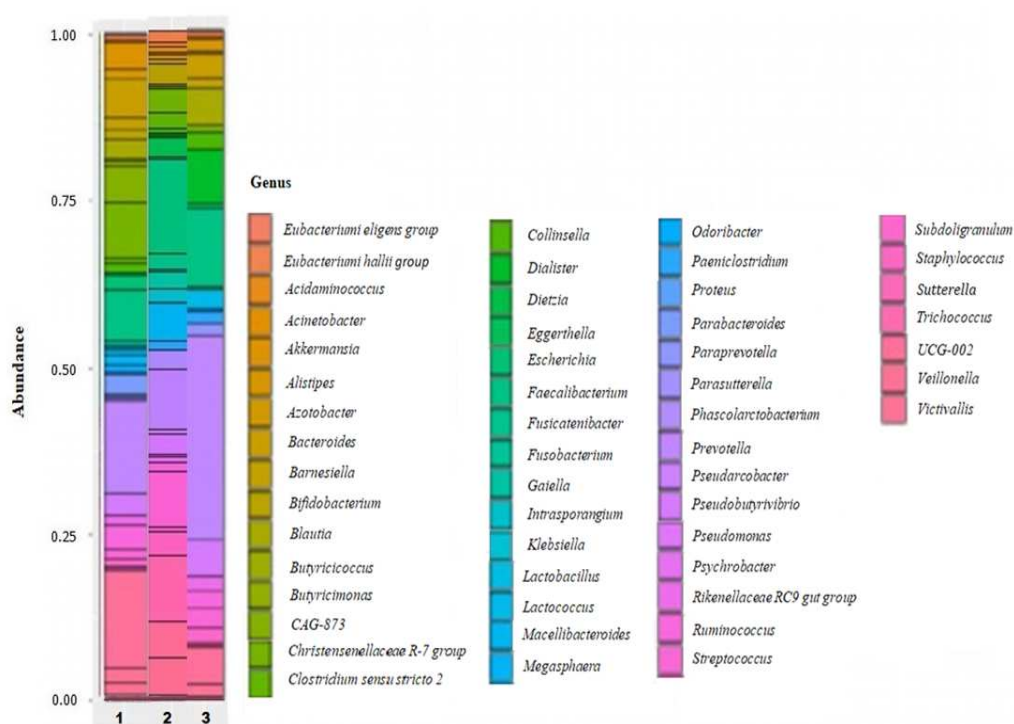


Рис. 3. Родовое разнообразие исследуемых образцов микробиома: 1 – ил+ЖКТ, 2 – ил, 3 – ЖКТ.

После обогащения активного ила микробиомом ЖКТ отмечен прирост гетеротрофных бактерий (табл.2). Микроорганизмы рода *Lactococcus* увеличились в 2,7 раза, *Acinetobacter* – в 3,1 раза, *Pseudomonas* – в 4,1 раза, *Lactobacillus* – в 4,4 раза, *Streptococcus* – в 5,2 раза, *Escherichia/Shigella* – в 20 раз. Бактерии перечисленных родов активно участвуют в процессах денитрификации [30–33].

Также было оценено α -разнообразие каждого из исследуемых образцов с применением индекса Шеннона. Индекс Шеннона для микробиома ЖКТ свиньи составил 2,8, для активного ила – 3,1, для активного ила с 5 % ЖКТ – 3,3. На основании полученных данных можно отметить, что сообщество микроорганизмов активного ила разнообразнее ЖКТ. Увеличение его значения после активизации микробиомом ЖКТ свидетельствует о более благоприятных условиях для их развития.

Таблица 2

Таксономический профиль ила, ЖКТ, ила + ЖКТ, определенный до уровня
рода, %

Род	Ил+ЖКТ	Ил	ЖКТ
1	2	3	4
Veillonella	1.35	4.47	1.69
Faecalibacterium	4.64	11.22	11.49
Prevotella	8.71	7.28	29.41
Blautia	1.74	0.28	5.41
Escherichia-Shigella	5.63	0.28	2.46
Proteus	1.70	2.15	0.64
Azotobacter	6.89	8.81	0.34
Staphylococcus	4.64	11.22	1.23
Lactobacillus	8.67	1.97	0
Bacteroides	3.87	0.56	3.72
Fusicatenibacter	0.39	1.97	0.34
Ruminococcus	2.32	1.12	2.36
Pseudobutyrvibrio	1.93	2.53	5.07
UCG-002	9.09	4.47	5.41
Subdoligranulum	0.77	0.56	2.03
Lactococcus	5.22	1.97	2.71
Sutterella	0.19	2.81	0.34
Paeniclostridium	0.19	1.12	1.69
[Eubacterium] hallii group	0.39	1.4	0.68
Clostridium sensu stricto 2	0.39	1.97	0
Gaiella	0	1.97	0
Acinetobacter	1.74	0.56	0.34
Phascolarctobacterium	0.19	2.25	0
Collinsella	0.97	0.56	2.71
Dialister	0.19	0.28	7.44
Intrasporangium	0	1.69	0
Streptococcus	5.20	1.00	3.04
Trichococcus	0.19	7.85	0.34
Bifidobacterium	0.77	2.52	0
Akkermansia	2.52	0.28	0
Eggerthella	0	2.25	0.68
[Eubacterium] eligens group	0.19	0	0.34
Macellibacteroides	0.58	4.47	0
Alistipes	0.77	0.56	1.69

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
Paraprevotella	0.19	0	1.69
Klebsiella	0.19	0	0
Christensenellaceae R-7 group	5.22	2.8	1.0
Parabacteroides	1.93	0	0
Pseudarcobacter	0	0.56	0
CAG-873	3.29	0.28	0
Barnesiella	1.16	0	1.0
Parasutterella	0.19	0	0
Butyricicoccus	0.19	0	0
Rikenellaceae RC9 gut group	0.97	0	2.03
Fusobacterium	0	0.28	0
Pseudomonas	1.16	0.28	0
Megasphaera	0.97	0	0
Dietzia	0	0.28	0
Psychrobacter	0	0.56	0
Odoribacter	0.58	0	0.34
Butyricimonas	0.58	0	0
Acidaminococcus	0.19	0.56	0
Victivallis	1.16	0	0.34

Результаты исследования влияния процесса флокулообразования и ζ -потенциала на денитрификацию представлены в таблице 3. В первые 5 минут размер частиц увеличивался незначительно, величина ζ -потенциала также была невысокой. Это объясняется тем, что рост объема флокул происходит за счет аккумуляции примесей в результате флокуляционного потока, который связан с адгезионными силами. Затем наблюдается резкое укрупнение агрегатов конвективным путем, т. е. путем захвата встречного потока примесей. Через 1ч процесса флокуляции параметры глобул достигают своего наибольшего значения и далее происходит процесс дестабилизации. Коллоидные частицы начинают частично терять свою агрегативную устойчивость, но процесс денитрификации продолжается. К этому времени содержание нитратов в стоке уменьшилось в 4,4 раза и через 2 ч. составило 3,6 % от первоначально уровня. Полученные данные подтверждают утверждение других исследователей [4, 18] о влиянии размера флокул на активизацию процессов денитрификации.

Установить корреляцию между значением ζ -потенциала и процессом денитрификации не удалось. В нашем случае при максимальном значении ζ -потенциала процесс денитрификации продолжался и далее, содержание нитратов снижалось и при уменьшении величины ζ -потенциала.

Таблица 3

**Влияние размеров флокул и величины ζ -потенциала на процесс
денитрификации**

Показатели	Время флокуляции, мин						
	0	5	10	30	60	90	120
Размер флокул, мкм	5-10	60	115	150	240	240	234
ζ -потенциал клеток, мВ	-2,3	-13	-27	-51	-32	-25	-23
Нитраты, мг/дм ³	47,2	40,3	34,6	25,4	10,7	6,9	1,7

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного нами исследования установлено, что качественное изменение микробиоты активного ила за счет активизации его микробиомом ЖКТ животных влияет на эффективность денитрификации. Оптимизация микробного сообщества активного ила микробиомом ЖКТ животных позволила снизить содержание нитратов в сточной воде на 85,4 %.

Анализ данных секвенирования 16S рРНК бактерий показал количественные и качественные отличия в составе микробиомов ЖКТ свиньи, активного ила, «активного ила+ ЖКТ свиньи» на уровне типа бактерий. Количество Bacteroidetes увеличилось по сравнению с исходным активным илом в 1,7 раза, Verrucomicrobiota возросло в 18,5 раз, Firmicutes снизилось в 1,1 раза, Actinobacteria уменьшилось в 5,5 раза, подавлен рост Fusobacteriota и Campilobacterota.

Были выявлены различия в содержании бактерий на уровне класса-семейства-рода в пределах каждого типа в исходном активном иле и его модификации с микробиомом ЖКТ свиньи. Внесение микробиома ЖКТ позволило сформировать популяции микроорганизмов, способных конкурентно подавлять развитие нитчатых бактерий. Смена ценоза активного ила привела к формированию у его представителей ферментных систем, адаптированных к специфичным загрязнениям сточных вод.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках реализации проекта «Оптимизация биоценоза активного ила городских очистных сооружений», № договора 20-34-90126\20.

Список литературы

1. Гришин Б. М. Удаление аммонийного азота из городских сточных вод с применением физико-химического и биологического методов / Б. М. Гришин, М. В. Бikuнова, А. Н. Кошев, Ю. П. Перельгин // Региональная архитектура и строительство. – 2020. – 2(43). – С. 134–141.
2. Смирнов В. Б. Гидробиологические аспекты процесса биологической очистки с нитрификацией и симультанной денитрификацией (БНЧСД) / В. Б. Смирнов, Н. П. Шевченко // СОК. – 2020. – №2. – С. 32–36.

3. Alaya S. B. Aeration management in an oxidation ditch / S. B. Alaya, L. Haouech, H. Cherif, H. Shayeb // *Desalination*. – 2010. – Vol. 252. – P. 172–178.
4. Pochana K. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND) / K. Pochana, J. Keller // *Water Science and Technology*. – 1999. – Vol. 39, No 6. – P. 61–68.
5. Chai H. Enhanced simultaneous nitrification and denitrification in treating low carbon-to-nitrogen ratio wastewater: Treatment performance and nitrogen removal pathway / H. Chai, Y. Xiang, R. Chen, Z. Shao, L. Gu, L. Li, Q. He // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 280. – P. 51–58.
6. Ito T. Diversity and abundance of denitrifying bacteria in a simultaneously nitrifying and denitrifying rotating biological contactor treating real wastewater at low temperatures / T. Ito, T. Aoi, N. Miyazato, M. Hatamoto, S. Fuchigami, T. Yamaguchi, H. Watanabe // *Open Journal*. – 2019. – Vol.2(1). – P. 58–70.
7. She Z. Salinity effect on simultaneous nitrification and denitrification, microbial characteristics in a hybrid sequencing batch biofilm reactor / Z. She, L. Wu, Q. Wang, M. Gao, C. Jin, Y. Zhao, L. Zhao, L. Guo // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. – 2018. – Vol. 41(1). – P. 65–75.
8. Yan L. Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen-limited SBR by alternating the DO / L. Yan, S. Liu, Q. Liu, M. Zhang, Y. Liu, Y. Wen, Z. Chen, Y. Zhang, Q. Yang // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 275. – P. 153–162.
9. Basson B. Mucosal Interactions between Genetics, Diet, and Microbiome in Inflammatory Bowel Disease / A. Basson, A. Trotter, A. Rodriguez-Palacios, [et al.] // *Front Immunol*. – 2016. – Vol. 7 – P. 290.
10. Mahowald M. A. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla / M. A. Mahowald, F. E. Rey, H. Seedorf // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2009. – Vol. 106, No14. – P. 5859–5864.
11. Darrell W. Molecular details of a starch utilization pathway in the human gut symbiont *Eubacterium rectale* / W. Darrell, Cockburn, N. I. Orlovsky et al. // *Mol Microbiol*. – 2015. – Vol. 95, No 2. – P. 209–230.
12. Gibson M. K. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome / M. K. Gibson, B. Wang, S. Ahmadi et al. // *Nat Microbiol*. – 2016. – No 1. – P. 1–10.
13. Бухарин О. В. Ассоциативный симбиоз / О. В. Бухарин и др. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.
14. Бухарин О. В. Микросимбиоз / О. В. Бухарин, Н. Б. Перунова // Екатеринбург: УрО РАН. – 2014. – 260 с.
15. Wu G. D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. / Wu G. D. et al. // *Science*. – 2011. – Vol. 334. – P. 105–108.
16. Pol A. Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species / A. Pol, K. Heijmans, H. R. Harhangi, D. Tedesco, M. S. Jetten, J. M. Op Den Camp Huub. // *Nature*. – 2007. – Vol. 450. – P. 874–878.
17. Dunfield P. F. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. / P. F. Dunfield, A. Yuryev, P. Senin, A. V. Smirnova, M. B. Stott, S. Hou, B. Ly, J. H. Saw, Z. Zhou, Y. Ren, J. Wang, B. W. Mountain, M. A. Crowe, T. M. Weatherby, P. L. Bodelier, W. Liesack, L. Feng, L. Wang, M. Alam // *Nature*. – 2007. – Vol. 450, No7171. – P. 879–882.
18. Гульшин И. А. Одноиловая система низкокислородной технологии глубокой очистки сточных вод от соединений азота / И. А. Гульшин, Е. С. Гогина // *Водопользование*. – 2019. – № 4 (80). – С. 9–19.
19. Кольчурина Н. А. Денитрификация сточной воды / Н. А. Кольчурина, В. В. Солнцев, В. И. Шувалов, Е. А. Фарберова // *Вестник ПНИПУ*. – 2015. – №3. – С. 80–88.
20. G. W. Lu, P. Gao, Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems: chapter 3 – Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery/Editor(s): V. S. Kulkarni. – William Andrew Publishing, 2010. – P. 59–94.
21. Roland L. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design / I. Roland, G. Piel, L. Delattre, B. Evrard // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2003. – Vol.263, No(1-2). – P. 85–94.
22. Shannon C. E. The mathematical theory of communication / C. E. Shannon, W. Warren. – Urbana: the University of Illinois Press, 1949. – 117 p.
23. Шитиков В. К. Оценка биоразнообразия: попытка формального обобщения / В. К. Шитиков, Г. С. Розенберг // *Количественные методы экологии и гидробиологии: сборник научных трудов, посвященный памяти А. И. Баканова*. – Тольятти: СамНЦ РАН, 2005. – С. 91–129.

24. Литусов Н. В. Кампилобактерии. Иллюстрированное учебное пособие / Н. В. Литусов. – Екатеринбург: Изд-во ГБОУ ВПО УГМА, 2012. – 18 с.
25. Tap J. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core / J. Tap, S. Mondot, F. Levenez et al. // *Environ Microbiol* – 2009. – Vol. 11. – P. 2574–2584.
26. Lagkouravdos I. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family / I. Lagkouravdos, T. R. Lesker, T. C. A. Hitch, E. J. C. Gálvez, N. Smit, K. Neuhaus, J. Wang, J. F. Baines, B. Abt, B. Stecher, J. Overmann, T. Strowig, T. Clavel // *Lagkouravdos et al. Microbiome*. – 2019. – Vol. 7 – P. 1–28.
27. Mahowald M. A. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla / M. A. Mahowald, F. E. Rey, H. Seedorf, P. J. Turnbaugh, R. S. Fulton, A. Wollam, N. Shah, C. Wang, V. Magrini, R. K. Wilson // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – No 106. – P. 5859–5864.
28. Jabari L. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters / L. Jabari, H. Gannoun, J.-L. Cayol, A. Hedi, M. Sakamoto, E. Falsen, M. Ohkuma, M. Hamdi, G. Fauque, B. Ollivier, M.-L. Fardeau // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – Vol. 62 (10). – P. 2522–2527.
29. Sun S-P. Effective Biological Nitrogen Removal Treatment Processes for Domestic Wastewaters with Low C/N Ratios: A Review / S-P Sun, C. P. Nacher, B. Merkey, Qi Zhou, S.-Q. Xia, D.-H. Yang, J.-H. Sun, B. F. Smets // *Environmental Engineering Science*. – 2010. – Vol. 27, No 2. – P. 111–126.
30. Hong K. H. Novel phased isolation ditch system for enhanced nutrient removal and its optimal operating strategy / K. H. Hong, D. Chang, J. M. Hur, S. B. Han // *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. – 2003. – Vol. 38, No 10. – P. 2179–2189.
31. Insel G. Effect of aeration on nutrient removal performance of oxidation ditch systems / G. Insel, N. Artan, D. Orhon // *Environmental engineering science*. – 2005. – Vol. 22 (6). – P. 802–815.
32. Jayasvasti M. Appropriate Lab Scale Oxidation Ditch Tank for Cafeteria Building Wastewater Treatment / M. Jayasvasti, C. Ratanatamskul // *International Journal of Advances in Agricultural and Environmental Engineering*. – 2014. – Vol. 1. – P. 127–130.
33. Stamou A. I. Modeling Oxidation Ditches Using the IAWPRC Activated Sludge Model with Hydrodynamic Effects / A. I. Stamou // *Water Science Technology*. – 1994. – Vol. 30, No 2. – P. 195–192.

INVESTIGATION OF THE MICROBIOME OF ACTIVATED SLUDGE AND OPTIMIZATION OF ITS METABOLIC ACTIVITY

Bryndina L. V., Korchagina A. Yu.

*Voronezh State Forestry University named after G. F. Morozov, Voronezh, Russia
E-mail: bryndinv@mail.ru*

The issue of reducing biogenic elements in wastewater remains relevant for all biological treatment methods. In addition, there is an environmental problem – pollution of natural reservoirs. Most of the research in the field of wastewater treatment by biological methods is aimed at improving the anaerobic and aerobic stages of the process. The process of "aerobic denitrification" is considered a promising direction in this area. The study of populations of activated sludge microorganisms involved in the processes of "aerobic denitrification" has not been sufficiently studied yet. Information about the microbiological component of sewage sludge is based in most cases on classical

microbiological methods of their identification and does not allow us to give a complete picture of the microorganisms inhabiting active sludge. To activate the work of microorganisms of active sludge is proposed by the microbiome of the gastrointestinal tract (gastrointestinal tract) of animals (pigs). This will create favorable conditions for the vital activity of the microflora of activated sludge, increase its enzymatic activity by reducing the concentration of pollutants entering the treatment, and allow antagonistically to displace filamentous bacteria. The objects of the study were activated sludge and wastewater from the left-bank municipal sewage treatment plants of Voronezh, pig intestines provided by Buturlinovskiy Meat Processing Plant. The α -diversity was determined by the Shannon index. Sequencing was performed on the IonTorrent PGM platform using reagents and systems Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit, Ion OneTouch 2 System, and Ion PGM Hi-Q View OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The ζ -potential was determined by the ability of bacterial cells to move in an electric field to one of the poles. The count of the number of bacterial cells was carried out in the Goryaev chamber under a microscope. Determination of the mass concentration of nitrate ion was carried out according to GOST 33045-2014. The size of the flocs was estimated by light scattering. The increase in biodiversity when 5 % of the gastrointestinal tract was added to the active sludge was 3.4 %. The largest proportion of microorganisms is represented by *Firmicutes*. The share of *Actinobacteria* decreased by 5.5 times. 42.5 % of them in the active sludge were represented by aerobic filamentous bacteria: *Gaiella*, *Intrasporangium*, *Dietzia*. The presence of these bacteria indicates the predisposition of the studied activated sludge to swelling. A sharp decrease in *Actinobacteria* after the addition of the gastrointestinal tract to the active sludge is most likely due to the fact that the microbiocenosis of the pig intestine antagonistically displaces representatives of this phylum. The microbiome of the pig's gastrointestinal tract, introduced into the native microflora of activated sludge, suppresses the growth of representatives of *Fusobacteriota* and *Campilobacterota*, thereby correcting the presence of filamentous forms of bacteria in the active sludge. The number of bacteria that are capable of fermenting not only carbohydrates, but also proteins has increased. The proportion of heterotrophic bacteria responsible for denitrification processes in activated sludge has increased. The proportion of *Lactococcus* increased 2.7 times, *Acinetobacter* – 3.1 times, *Pseudomonas* – 4.1 times, *Lactobacillus* – 4.4 times, *Streptococcus* – 5.2 times, *Escherichia/Shigella* – 20 times. Positive dynamics between the processes of flocculation and denitrification has been established. The greatest denitrification corresponded to the maximum size of the flocs. Flocs of 240nm in size reduced the nitrate content in the drain by 85.4 % after 1.5 hours. At the same time, no correlation has been established between the value of the ζ -potential and the efficiency of denitrification in wastewater. The experimental data obtained can be used to monitor nitrification/denitrification processes in wastewater and reduce the filamentous swelling of activated sludge.

Keywords: microbiome; activated sludge; wastewater; aerobic denitrification; anoxic zones; swelling of activated sludge.

References

1. Grishin B. M., Bikunova M. V., Koshev A. N., Perelygin Y. P. Udalenie ammonijnogo azota iz gorodskih stochnyh vod s primeneniem fiziko-himicheskogo i biologicheskogo metodov, *Regionalnaya arhitektura i stroitelstvo*, **2(43)**, 134 (2020).
2. Smirnov V. B., Shevchenko V. B. Hidrobiologicheskie aspekty processa biologicheskoy ochistki s nitrifikaciej i simul'tannoj denitrifikaciej (BNCHSD), *SOK*, **2**, 32(2020).
3. Alaya S. B., Haouech L., Cherif H., Shayeb H. Aeration management in an oxidation ditch, *Desalination*, **252**, 172(2010).
4. Pochana K., Keller J. Study of factors affecting simultaneous nitrification and denitrification (SND), *Water Science and Technology*, **39(6)**, 61(1999).
5. Chai H., Xiang Y., Chen R., Shao Z., Gu L., Li L., He Q. Enhanced simultaneous nitrification and denitrification in treating low carbon-to-nitrogen ratio wastewater: Treatment performance and nitrogen removal pathway, *Bioresource Technology*, **280**, 51(2019).
6. Ito T., Aoi T., Miyazato N., Hatamoto M., Fuchigami S., Yamaguchi T., Watanabe H. Diversity and abundance of denitrifying bacteria in a simultaneously nitrifying and denitrifying rotating biological contactor treating real wastewater at low temperatures, *Open Journal*, **2**, 1, 55 (2019).
7. She Z., Wu L., Wang Q., Gao M., Jin C., Zhao Y., Zhao L., Guo L. Salinity effect on simultaneous nitrification and denitrification, microbial characteristics in a hybrid sequencing batch biofilm reactor, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **41**, 1, 65(2018).
8. Yan L., Liu S., Liu Q., Zhang M., Liu Y., Wen Y., Chen Z., Zhang Y., Yang Q. Improved performance of simultaneous nitrification and denitrification via nitrite in an oxygen-limited SBR by alternating the DO, *Bioresource Technology*, **275**, 153 (2019).
9. Basson B., Trotter A., Rodriguez-Palacios A. et al. Mucosal Interactions between Genetics, Diet, and Microbiome in Inflammatory Bowel Disease, *Front Immunol*, **7**, 290 (2016).
10. Mahowald M. A., Rey F. E., Seedorf H. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 14, 5859 (2009).
11. Darrell W., Cockburn, Orlovsky N.I. et al. Molecular details of a starch utilization pathway in the human gut symbiont *Eubacterium rectale*, *Mol Microbiol*, **95**, 2, 209 (2015).
12. Gibson M. K., Wang B., Ahmadi S. et al. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome, *Nat Microbiol*, **1**, 1 (2016).
13. Buharin O. V. *Associativnyj simbioz*, p. 264 (Ekaterinburg: UrO RAN, 2007).
14. Buharin O. V., Perunova N. B. *Mikrosimbioz*, p. 260 (Ekaterinburg: UrO RAN, 2014).
15. Wu G. D. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes, *Science*, **334**, 105 (2011).
16. Pol A., Heijmans K., Harhangi H. R., Tedesco D., Jetten M. S., Op Den Camp Huub J.M. Methanotrophy below pH 1 by a new Verrucomicrobia species, *Nature*, **450**, 874 (2007).
17. Dunfield P. F., Yuryev A., Senin P., Smirnova A. V., Stott M. B., Hou S., Ly B., Saw J. H., Zhou Z., Ren Y., Wang J., Mountain B. W., Crowe M. A., Weatherby T. M., Bodelier P. L., Liesack W., Feng L., Wang L., Alam M. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia, *Nature*, **450**, 7171, 879 (2007).
18. Gulshin I. A., Gogina E. S. Odnoilovaya sistema nizkokislorodnoj tekhnologii glubokoj ochistki stochnyh vod ot soedinenij azota, *Vodopolzovanie*, **4** (80), 9 (2019).
19. Kolchurina N. A., Solncev V. V., Shuvalov V. I., Farberova E. A. Denitrifikaciya stochnoj vody, *Vestnik PNIPU*, **3**, 80 (2015).
20. Lu G. W., Gao P. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems: chapter 3 - Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery*, p. 59 (William Andrew Publishing, 2010).
21. Roland L., Piel G., Delattre L., Evrard B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, *International Journal of Pharmaceutics*, **263**(1-2), 85 (2003).
22. Shannon C. E., Warren W. *The mathematical theory of communication*, p. 117 (Urbana: the University of Illinois Press, 1949).
23. SHitikov V. K., Rozenberg G. S. Ocenka bioraznoobraziya: popytka formalnogo obobshcheniya, *Kolichestvennye metody ekologii i gidrobiologii: sbornik nauchnyh trudov, posvyashchennyj pamyati A. I. Bakanova* (Tolyatti: SamNC RAN, 2005), p. 91.

24. Litusov N. V. *Kampilobakterii. Illyustrirovannoe uchebnoe posobie*, p. 18 (Ekaterinburg: Izd-vo GBOU VPO UGMA, 2012).
25. Tap J., Mondot S., Levenez F. et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core, *Environ Microbiol*, **11**, 2574 (2009).
26. Lagkouvardos I. I., Lesker T. R., Hitch T. C. A., Gálvez E. J. C., Smit N., Neuhaus K., Wang J., Baines J. F., Abt B., Stecher B., Overmann J., Strowig T., Clavel T. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family, *Microbiome*, **7**, 1 (2019).
27. Mahowald M. A., Rey F. E., Seedorf H., Turnbaugh P. J., Fulton R. S., Wollam A., Shah N., Wang C., Magrini V., Wilson R. K. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of two dominant bacterial phyla, *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 5859 (2009).
28. Jabari L., Gannoun H., Cayol J.-L., Hedi A., Sakamoto M., Falsen E., Ohkuma M., Hamdi M., Fauque G., Ollivier B., Fardeau M.-L. *Macellibacteroides fermentans* gen. nov., sp. nov., a member of the family Porphyromonadaceae isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62** (10), 2522 (2012).
29. Sun S.-P., Nacher C. P., Merkey B., Zhou Q., Xia S.-Q., Yang D.-H., Sun J.-H., Smets B. F. Effective Biological Nitrogen Removal Treatment Processes for Domestic Wastewaters with Low C/N Ratios: A Review, *Environmental Engineering Science*, **27**(2), 111 (2010).
30. Hong K. H., Chang D., Hur J. M., Han S. B. Novel phased isolation ditch system for enhanced nutrient removal and its optimal operating strategy, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **38**(10), 2179 (2003).
31. Insel G., Artan N., Orhon D. Effect of aeration on nutrient removal performance of oxidation ditch systems, *Environmental engineering science*, **22** (6), 802 (2005).
32. Jayasvasti M., Ratanatamskul C. Appropriate Lab Scale Oxidation Ditch Tank for Cafeteria Building Wastewater Treatment, *International Journal of Advances in Agricultural and Environmental Engineering*, **1**, 127 (2014).
33. Stamou A. I. Modeling Oxidation Ditches Using the IAWPRC Activated Sludge Model with Hydrodynamic Effects, *Water Science Technology*, **30**(2), 195 (1994).