

Оригинальная статья / Original article

УДК 577.2

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-116-125>



Молекулярно-генетическая идентификация штаммов микроорганизмов, выделенных из активного ила, на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16s rRNA гена

© Е.А. Иванчиков, А.Т. Бубеев, В.Ж. Цыренов,
А.В. Арбатская

Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления,
г. Улан-Удэ, Российская Федерация

Резюме: Проведена молекулярно-генетическая идентификация четырех штаммов бактерий, выделенных из активного ила городских очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК» (пгт. Селенгинск). Идентификация штаммов бактерий проводилась на капиллярном секвенаторе марки ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) с использованием 16S праймеров 27F и 1492R в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск. Результаты получены с помощью метода определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК с последующим сравнением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GenBank. Определены штаммы бактерий, выделенных из активного ила: штамм В 1.1 по базе данных GenBank соответствует штамму *Paenibacillus dendritiformis* strain P411 (идентичность – 99,93%), штаммы В 1.2 и В 1.3 соответствуют штамму *Bacillus licheniformis* strain PB399 (идентичность – 86 и 100% соответственно), штамм Р 1.1 соответствует штамму *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-85 (идентичность – 99,86%). Определены биохимические свойства идентифицированных штаммов: амилитическая, протеолитическая и липолитическая активность; способность к ферментации углеводов на средах Гисса; способность к образованию аммиака, мочевины и восстановлению нитратов. Данные штаммы микроорганизмов, выделенных из активного ила, могут оказаться перспективными для деструкции загрязнителей сточной воды. На их основе предполагается создание консорциума микроорганизмов для деструкции белковых и жировых загрязнителей сточной воды.

Ключевые слова: активный ил, микроорганизмы, молекулярно-генетическая идентификация, сточная вода, очистные сооружения

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-48-030019).

Для цитирования: Иванчиков Е.А., Бубеев А.Т., Цыренов В.Ж., Арбатская А.В. Молекулярно-генетическая идентификация штаммов микроорганизмов, выделенных из активного ила, на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16s rRNA гена. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11. N 1. С. 116–125. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-116-125>

Molecular-genetic identification of microorganism strains isolated from activated sludge based on an analysis of nucleotide sequences of the 16s rRNA gene

Egor A. Ivanchikov, Alexey T. Bubeev, Vladimir Zh. Tsyrenov,
Aleksandra V. Arbatsksaya

East Siberia State University of Technology and Management,
Ulan-Ude, Russian Federation

Abstract: A molecular-genetic identification of four bacterial strains isolated from activated sludge of urban wastewater treatment plants (Ulan-Ude) and the industrial enterprise OJSC “Selenginsky Pulp and Paper Mill” (Selenginsk) was carried out. Bacterial strains were identified by a capillary sequencer ABI 3130XL Ge-

netic Analyzer (Applied Biosystems) using 16S primers 27F and 1492R at the Genomics Collective Use Center of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk. The results were obtained using the method of determination of the direct nucleotide sequence of a 16S rRNA fragment followed by comparison of the nucleotide identity with the sequences deposited in the international database GenBank. Bacterial strains isolated from activated sludge were identified according to the GenBank database: strain B 1.1 corresponds to *Paenibacillus dendritiformis* strain P411 (similarity 99.93%), strains B 1.2 and B 1.3 correspond to *Bacillus licheniformis* strain PB399 (similarity 86 and 100%, respectively), strain P 1.1 corresponds to the *Paenibacillus polymyxa* strain ISSDS-85 (similarity 99.86%). The biochemical properties of the identified strains were determined: amylolytic, proteolytic and lipolytic activity; the ability to ferment carbohydrates in Hiss' nutrient medium; the ability to form ammonia, urea and nitrate reduction. The bacterial strains isolated from activated sludge may be promising for the destruction of wastewater pollutants. On their basis, it is planned to create a consortium of microorganisms for the destruction of protein and fatty pollutants in wastewater.

Keywords: activated sludge, microorganisms, molecular genetic identification, waste water, treatment facilities

Acknowledgments: The study was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research within the framework of the research project No. 18-48-030019.

For citation: Ivanchikov EA, Bubeev AT, Tsyrenov VZh, Arbatskaya AV. Molecular-genetic identification of microorganism strains isolated from activated sludge based on an analysis of nucleotide sequences of the 16s rRNA gene. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(1):116–125. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-1-116-125>

ВВЕДЕНИЕ

Одним из приоритетных направлений борьбы с загрязнением окружающей среды является применение биотехнологических методов. Известно, что для очистки сточных вод широко используется природный активный ил, представляющий собой сложно структурированную систему, состоящую преимущественно из микроорганизмов, связанных между собой симбиотическими отношениями и разнообразными метаболическими процессами [1–8]. Показано, что одни микроорганизмы способны потреблять продукты реакций других микроорганизмов. В результате поэтапного действия микроорганизмов создается замкнутый цикл с образованием простых соединений. Рассмотрев основные группы загрязнителей сточных вод, условия роста и пути метаболизма выбранных культур микроорганизмов и возможность их совместного культивирования, можно создать искусственные биологические консорциумы в целях более эффективной утилизации загрязнителей [9].

Для определения процессов, происходящих внутри активного ила, необходимо изучать его видовой состав. В настоящее время при изучении видовой состава микроорганизмов активного ила используются стандартные методы идентификации, которые не всегда позволяют установить родовую принадлежность микроорганизмов ввиду их близкого родства и общности свойств. В то же время эти методы являются достаточно трудоемкими и длительными по времени¹ [10–14]. Для того чтобы избежать ошибки в

определении видовой и родовой принадлежности исследуемых культур активного ила стандартными методами, необходимо проводить молекулярно-генетическую идентификацию, на основании результатов которой возможно выделение культур микроорганизмов, обладающих активностью по отношению к определенным группам загрязнителей, что поможет в разработке конкретных технологий очистки сточных вод [15–18].

Целью работы являлась молекулярно-генетическая идентификация микроорганизмов, выделенных из активного ила городских очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК» (пгт. Селенгинск), способных биотрансформировать компоненты модельной сточной воды с использованием анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования – чистые штаммы бактерий рода *Bacillus*, выделенные из активного ила городских очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК» (пгт. Селенгинск). Культуры выращивали на мясо-пептонном агаре (Государственный научный центр прикладной биологии и биотехнологии, пгт. Оболенск, Московская обл.) в течение двух суток при температуре 37 °С.

Стандартными микробиологическими способами проводили исследование следующих биохимических свойств выделенных штаммов: фер-

¹Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С., Булава Г.В., Вертиев Ю.В., Винокуров А.Е. [и др.]. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учеб. пособие; 4-е изд., стер. СПб.: Лань, 2020. 588 с.

ментативная активность (амилолитическая, протеолитическая, липолитическая), способность к ферментации углеводов на средах Гисса, способность к образованию аммиака, мочевины и восстановлению нитратов¹.

Идентификация штаммов бактерий проводилась с помощью BLAST-анализа гена 16S рРНК. Секвенирование по Сэнгеру проводилось в центре коллективного пользования «Геномика» Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г. Новосибирск) на капиллярном секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) с использованием 16S праймеров 27F [19] и 1492R [20].

Секвенограммы всех исследуемых образцов ДНК проанализированы на предмет гомологии/идентичности с помощью программы BLAST базы данных GenBank и классификатора базы 16S рибосомальных последовательностей – RDB.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основными компонентами бытовых и промышленных сточных вод г. Улан-Удэ и ОАО «Селенгинский ЦКК» являются белковые и жировые соединения. Задача исследования – подтвердить или опровергнуть предположение, что штаммы, выделенные из активного ила, могут быть использованы в качестве деструкторов данных веществ.

Биохимические свойства четырех выделенных штаммов определяли по продуктам реакции гидролиза и ферментативной активности. Полученные результаты позволили три штамма отнести к роду *Bacillus*, им присвоили обозначения В 1.1, В 1.2 и В 1.3. Родовую принадлежность четвертой культуры идентифицировать не удалось, ей было присвоено обозначение Р 1.1. Результаты представлены в табл. 1.

По результатам исследования амилолитической, протеолитической и липолитической активности штаммы В 1.1, В 1.2 и В 1.3 показали положительную реакцию, штамм Р 1.1 – отрицательную. Можно предположить, что штаммы В 1.1, В 1.2 и В 1.3 способны к деструкции белковых и жировых соединений, штамм Р 1.1 – нет.

Результаты исследований способности к ферментации углеводов на средах Гисса показали, что штаммы В 1.1, В 1.2 и В 1.3 не способны сбраживать лактозу и сорбит в отличие от штамма Р 1.1, который сбраживает лактозу и частично сорбит. В целом использование данных штаммов для деструкции загрязнителей в сточных водах позволит охватить широкий спектр углеводов.

Результаты эксперимента по исследованию способности к образованию аммиака, мочевины и восстановлению нитратов показали, что штамм В 1.1 образует аммиак и способен восстанавливать нитраты, штаммы В 1.2 и В 1.3 образуют аммиак и мочевину, штамм Р 1.1 образует мочевину и восстанавливает нитраты.

Таким образом, по полученным результатам можно предположить, что выделенные штаммы обладают способностью к деструкции белковых и жировых соединений, а также углеводов и азотистых соединений (см. табл. 1). Для дальнейшего изучения выделенных штаммов необходимо было провести их молекулярно-генетическую идентификацию.

Генетическая идентификация полученных штаммов осуществлялась методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК с последующим сравнением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных GenBank, с помощью программы BLAST и классификатором базы 16S рибосомальных последовательностей – RDB.

Таблица 1. Результаты исследования биохимических свойств выделенных штаммов
Table 1. Biochemical properties of isolated strains

Биохимические свойства	Штамм			
	В 1.1	В 1.2	В 1.3	Р 1.1
Амилолитическая активность	+	+	+	-
Протеолитическая активность	+	+	+	-
Липолитическая активность	+	±	±	-
Сбраживание:				
лактозы	-	-	-	+
маннита	+	±	±	-
глюкозы	+	+	+	+
сахарозы	+	+	+	±
сорбита	-	-	-	±
мальтозы	+	+	+	+
Образование:				
аммиака	+	+	+	-
мочевины	-	+	+	+
Восстановление нитратов	+	-	-	+

Примечание. «-» – 95 и более процентов отрицательная реакция; «+» – 95 и более процентов положительная реакция, «±» – 50% положительная реакция.

Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) амплифицированы фрагменты гена 16S рРНК, размером около 1500 п.н. Продукты ПЦР амплификации использованы для определения нуклеотидной последовательности.

Фрагмент гена 16S рРНК для каждого образца секвенирован с двух сторон по методу Сэнгера и проанализирован на автоматическом геномном анализаторе ABI3130XL. Полученные после геномного анализатора считанные из секвеннограмм последовательности образцов представлены на рис. 1, 3, 4 и 7.

На рис. 1 представлена секвеннограмма штамма В 1.1.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLAST

показал, что структура штамма В 1.1 совпадает со структурой *Paenibacillus dendritiformis* strain P411 16S ribosomal RNA gene и *Paenibacillus dendritiformis* partial 16S rRNA gene, strain Marseille-P568.

Классификатор RDP показал следующую «оригинальную» структуру фрагмента 16S рРНК (рис. 2).

Как видно из рис. 2, штамм В 1.1 по классификатору RDP и GenBank определен как штамм *Paenibacillus dendritiformis* partial P411, который характеризуется более высоким уровнем вариабельности генов 16S рРНК.

На рис. 3 и 4 представлены секвеннограммы штаммов В 1.2 и В 1.3 соответственно.

```

CCTCCGCGGCTGGCTCCTTGCAGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTGTAACCTCTCGTGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGCCGGGAA
CGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCAATCCGACTTCATGACGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGAAGTGGCTTT
TTAGGATTCGCTCCGCTCGCGCTTCGCTCCCGTTGTACAGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGTCAAGGGGCATGATGATTTGA
CGTCAATCCCACTTCTCCGTTTGTACCCGCGAGTCACTAGAGTGCCCACTCAATGTGGCACTAAAGTTAAGGGTTGCGCTCGTTG
CGGGACTTAACCCCACTTCAACGACACGAGCTGACGCAACCATGACCACTCTGCGCCGAAAGGGAAGCCATCTCTAGGAC
GGTCAGAGGATGCAAGACCTGTAAGGTTCTTCGCGTTCGTAATTAACACATATCCCACTGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCT
TTGAGTTTCACTTTCGCGAGTACTCCCAAGCGGAATGCTTAATGTGTTAACTTCGGCACAAGGGTATCGAAACCCCTAACACCTAGCAT
TCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAAGGTATCTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTCGCGCCTCAGCGTCAATACAGCCAGAAAGTCCGC
TTCCCACTGTTGCTCCACATCTCTACGCAATTCACCGCTACAGTGGAAATCCACTTCTCTCTGCACTCAAGTACACAGTTTCCGAT
GCGACCCGGAGTTGAGCCCGGGTTTAAACACCAAGTACTCATGACCGCTCGCGCTTTACGCCAATAATTCGGGCAAGCGCTTCCG
CTACGTTTACCGCGGTCTGGCAGTATGAGCCGGGCTTTCTCTCAGGTACCGTCACTATGGAACAGTTACTCTCCATAGCGTTCTT
CCCTGGCAACAGAGTTTACGATCCGAAACCTTCATCACTCACGCGCGTGTCTCCGTCAGACTTGCCTCCATTGCGGAAAGATTCCCTACTG
CTGCTCCCGTAGAGTCTGGCCGTGTCTCAGTCCCAAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTGCTACGCACTGCTCGCTTGTGAGCCGTT
ACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGTAAGTCCATCCATAAGCGCAGATTGCTCCGCTTCCCGATTCCTCATCGGAGGAATCGCTATC
CGGTATTAGCCACGTTTCCGTGAGTTATCCCGGTCTAAAGGCGAGGTTACTACGATTAACCTACCCGCTCCCGCTAAGCATCAGGAGTGC
AAGCACTCCATCAACTCCGCTCGACTTGA
    
```

Рис. 1. Секвеннограмма штамма В 1.1

Fig. 1. Sequenogram of strain B 1.1

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16
 Query File: classifier_seq_upload7263391969301308076.FASTA
 Query Submit Date: Thu Feb 28 03:14:00 EST 2019

Display depth: Confidence threshold: CopyNumber Adjusted:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

- rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]
- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum Firmicutes (1)
- » » » » class Bacilli (1)
- » » » » » order Bacillales (1)
- » » » » » » family Paenibacillaceae 1 (1)
- » » » » » » » genus Paenibacillus (1)

Рис. 2. Идентификация по 16S рРНК штамма *Paenibacillus dendritiformis* strain P411

Fig. 2. 16S rRNA strain identification of *Paenibacillus dendritiformis* strain P411

```

CTTCGCGCGTGGCTCCAAAAGGTTACCTCACGACTTCGGGTGTTCAAACTCTCGTGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGCCGGGAAACGATTC
ACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCATTCCAGCTTCACGCGAGTTCGAGTTGACAGACTGCGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTTGGGATGGCT
TAGCCTCGCGGCTTCGCTCCGCTTGTCTGCCCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCAGGTCAAGGGGCATGATGATTTGAGCTATCCCACTTCTCCTC
CGGTTGTACCCGCGAGTCACTTAGAGTGCCCACTGAATGCTGGCACTAAGGTTGCGCTGTTGCGGGACTTAACCCAACTCATCAG
ACACGAGCTGACGCAACCATGCAACCACTGCTCCAGCTTCCGCGGAAAGGGAAGCCCTATCTTAGGTTGTGACAGGATGCAAGACCTGTAAGGT
TCTTCGCGTGTGTTTCAAGTAAACCACTGCTCCAGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCCTTTGAGTTTCACTGCTTCCGACCTACTCCCAAGCGGA
GTGCTTAATGCGTGTGCTGACGACTAAAGGGCGGAAACCTCTAACACTAGCACTATCGTTTACGCGGTGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCAAGCTTTCGCGCTCAGCGTCACTGATCAGACCAAGAGTTCGCTTCCGCACTGTTTCTCCACATCTCACTGCTATTCACCGTACAGCTG
GAATTCACCTCTCTCTGCACTCAAGTTCCCGAGTTTCCAAATGACCTCCCGGTTGAGCGGGGGCTTTCATCAGACTTAAGAAACCGCTGCG
CGCGCTTACGCCAATAATTCGGGACAACGCTTCCCACTAGTATTAACCGCGTGTGGCAGGATGTTAGCCGTGCTTCTGTTAGGTTACCGT
AAGGTACCGCCCTATTCGAACCGTACTTGTCTCCCTAACCAACAGAGTTTACGATCCGAAACCTCATCACTACGCGGGGTTGCTCCGTCAGACTT
TCGTCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCTCCGCTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCAGTGTGCGCGATCACCTCTCAGGTCCGCTACGCA
TCGTCGCTTGTGAGCCGTTACTCAACCACTAGCTAATGCGCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTGAAGTAAAGCCACCTTTTATGATTGAACCATGC
GGTTCAAATCAAGCATCGGTATTAAGCCCGGTTTCCCGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAAGTTACCAACGTTACTACCCGCTCCCGCGCTGCACTA
AGGGAGCAAGCTCCGCTCGGCTCCGACTTGA
    
```

Рис. 3. Секвеннограмма штамма В 1.2

Fig. 3. Sequenogram of strain B 1.2

```
CCTTCGGCGGCTGGCTCAAAGGTTACCTCACCAGCTCGGGTGTACAACTCTCGTGGTGTACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATT
CACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTACGCACTCGAGTTGCAGACTCGGATCCGAAGTGAAGACAGATTGTGGATTGGC
TTAGCCTCGCGCTCGCTGCCCTTTGTTCTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCAAAAGGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTCTCT
CCGGTTTGTACCGGCGAGTACCTTAGAGTGCCCACTGAATGCTGGCACTAAGATCAAGGTTGCGCTGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCAG
ACACGAGCTGACGACAACATGACCACCTGTCACTCTGCCCGAAGGGGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAAGGATGTCAAGACCTGTAAGT
TCTTCGCGTGTCTCGAATTAACAACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAAGTCTTGCAGCCGCTACTCCCCAGGGGA
GTGCTTAATGCGTTTGTGCGAGCACTAAAGGGCGAAACCTCTAACACTTAGCACTCATGTTTACGGCGTGGACTACAGGGTATCTAATCTGTTT
GCTCCCCACGCTTTCGCGCTCAGCGTACGATACAGACAGAGAGTCCGCTTCCGCACTGTGTTCTCCACATCTCTACGCAATTCACCGCTACAGCTG
GAATTCACCTCTCTCTCTGCACTCAAGTTCACAGTTTCCAATGACCTCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCCGCTGCG
CGGCTTACGCCAATAATCCGGAACAACGCTTCCACCTACTGATTACCGCGGTGTGGCACGTAGTACCGGTGCTTCTGTTAGTACCGCTC
AAGGTACCGCCATTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTTACGATCCGAAACCTTCATCACTCACGGCGGTTGCTCCGTCAGACTT
TCGTCATTGCGGAAAGATTCCCTACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCA
TCGTCGCTGTGTAGCCGTTACTCACCACCTAGTAAATGCGCCGCGGTTCCATCTGTAAGTGTAGTCAAAAAGCCACCTTTATGATTGAACCATCG
GGTTCAATCAAGCATCCGTTATGACCCGCTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGAGGTTACCCAGTGTACTCACCGCTCCGCGCTGACCTA
AGGGAGCAAGCTCCGCTCGGCTCGACTGCA
```

Рис. 4. Секвенограмма штамма В 1.3

Fig. 4. Sequenogram of strain В 1.3

Секвенограммы штаммов В 1.2 и В 1.3 при сравнении структур нуклеотидных последовательностей с помощью программы BLAST совпадают между собой и имеют сходство со структурами *Bacillus licheniformis strain PB3* chromosome, complete genome и *Bacillus licheniformis strain UN1* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

В соответствии с классификатором RDP получены результаты по «оригинальной» структуре фрагмента 16S рРНК, показанного на рис. 5 и 6.

На рис. 5 и 6 представлены результаты идентификации штаммов В 1.2 и В 1.3 по клас-

сификатору RDP и GenBank. Штаммы определили как *Bacillus licheniformis strain PB3*, который характеризуется более высоким уровнем варибельности генов 16S рРНК в обоих случаях.

На рис. 7 показана структура нуклеотидной последовательности штамма Р 1.1, полученная с помощью программы BLAST, которая при сравнении совпадает со структурой штаммов *Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-851* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence и *Paenibacillus sp. strain R363* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16
 Query File: classifier_seq_upload6269460942246028130.FASTA
 Query Submit Date: Thu Feb 28 03:21:43 EST 2019

Display depth: Confidence threshold: CopyNumber Adjusted:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root — only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum Firmicutes (1)
- » » » » class Bacilli (1)
- » » » » » order Bacillales (1)
- » » » » » » family Bacillaceae 1 (1)
- » » » » » » » genus Bacillus (1)

Рис. 5. Идентификация по 16S рРНК штамма *Bacillus licheniformis strain PB3*

Fig. 5. 16S rRNA strain identification of *Bacillus licheniformis strain PB3*

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16
 Query File: classifier_seq_upload7378860646406092108.FASTA
 Query Submit Date: Thu Feb 28 03:47:43 EST 2019

Display depth: Confidence threshold: CopyNumber Adjusted:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root — only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]

- » » domain Bacteria (1)
- » » » phylum Firmicutes (1)
- » » » » class Bacilli (1)
- » » » » » order Bacillales (1)
- » » » » » » family Bacillaceae 1 (1)
- » » » » » » » genus Bacillus (1)

Рис. 6. Идентификация по 16S рРНК штамма *Bacillus licheniformis strain PB3*

Fig. 6. 16S rRNA strain identification of *Bacillus licheniformis strain PB3*

TCGAAGTCGAGCGGGTTGTTTGAAGCTTGCTTATATAACCTAGCGCGGACGGGTGAGTAAACAGTGGCAACCTGCCCAAGACAG
 GGATAACTACCGGAACCGGTAGCTAATACCCGATACATCCTTTTCTGTCATGGAGAAGGAGGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTTGTGGAT
 GGGCCTGCGCGCATTAGCTAGTGTGGGTAAGGCTACCAAGGCGAGTGCCTGACCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACTGCGG
 ACTGAGACACGCGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTGGAAATCTTCCGCAATGGCGGAAAGCCTGACGGAGCAACCGCGTGTAGTGA
 TGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTGGCCAGGGAAGAACGTTCTGTAGATAACTGCTACAAGAAGTACGGTACCTGAGAAGAAAGCCC
 CGGCTAACTACGTGCGAGCGCGGTAATACGTAGGGGCAAGCGTTCGCGGAATATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGCTCTTTA
 AGTCTGTGTTTAAATCCCGAGGCTCACTTCGGGTCGCACTGAAACTGGGAGCTTGTAGTGCAGAAAGGAGTGGAAATCCACCTGTAG
 CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAG
 CAAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCTTGGTCCGCAAGTAAACACAT
 TAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGTCAAACTCAAGGAATTGACGGGGACCGCACAAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATTC
 GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCCTGACCGGTCTAGAGATAGNCCTTTCTCGGACAGAGGAGACAGGTGGTGC
 ATGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGACGCAACCTTATGCTTAGTTGCGCAGGTTCAAGCTGGGCA
 CTCTAAGCAGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGTACACACGTAACA
 TGCCCGGTACAACGGAAGCGAAATCGCGAGGTGGAGCAAATCCTAGAAAGCCGCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACAT
 GAAGTCGGAATTGCTAGTAACTCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACCCGCCGTCACACCCAGAGAGTTTA
 CAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCCGCAAGGGAGCCGCGCGAAGG

Рис. 7. Секвенограмма штамма P 1.1

Fig. 7. Sequenogram of strain P 1.1

Классификатор RDP показал следующий результат по «оригинальной» структуре фрагмента 16S рРНК (рис. 8).

Как видно из рис. 8, идентифицированная нуклеотидная последовательность штамма P 1.1 по GenBank и классификатору RDP соответствует *Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-851* 16S ribosomal RNA gene, который характеризуется более высоким уровнем варибельности генов 16S рРНК.

Для исключения методической погрешности анализа гена 16S рРНК образцы проанализи-

рованы с помощью программы BLAST, предназначенной для сравнения изучаемой нуклеотидной последовательности с базой данных секвенированного генома (табл. 2).

Процент идентичности фрагментов нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК составляет, %: между штаммом В 1.2. и *Bacillus licheniformis strain PB3* – 99,86; между штаммом В 1.3. и *Bacillus licheniformis strain PB3* – 100%. Как видно из табл. 2, полученные штаммы можно отнести к одному референтному штамму.

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.11, September 2015
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 16
 Query File: classifier_seq_upload3629237541678539669.FASTA
 Query Submit Date: Fri Mar 01 03:00:40 EST 2019

Display depth: Confidence threshold: CopyNumber Adjusted:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root — only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

```

rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] [download entire hierarchy as text file]
» » domain Bacteria (1)
» » » phylum Firmicutes (1)
» » » » class Bacilli (1)
» » » » » order Bacillales (1)
» » » » » » family Paenibacillaceae 1 (1)
» » » » » » » genus Paenibacillus (1)
    
```

Рис. 8. Идентификация по 16S рРНК штамма *Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-851*

Fig. 8. 16S rRNA strain identification of *Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-8513*

Таблица 2. Результаты идентификации нуклеотидной последовательности в международной базе данных GenBank

Table 2. Results of the nucleotide sequence identification in the international GenBank database

Обозначение штамма	Наименование штамма по GenBank	% совпадения
В 1.1	<i>Paenibacillus dendritiformis strain P411</i> 16S ribosomal RNA gene	99,93
	<i>Paenibacillus dendritiformis partial</i> 16S rRNA gene, strain Marseille-P568	99,79
В 1.2 В 1.3	<i>Bacillus licheniformis strain PB3</i> chromosome, complete genome	99,86
	<i>Bacillus licheniformis strain PB3</i> chromosome, complete genome	100,00
P 1.1	<i>Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-851</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99,86
	<i>Paenibacillus sp. strain R363</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99,79

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования биохимических свойств штаммов В 1.1, В 1.2, В 1.3 и Р 1.1 показали, что использование данных штаммов в создании биологического консорциума позволит применять его для деструкции белковых и жировых соединений, а также углеводных и азотистых соединений сточных вод.

В результате молекулярно-генетической идентификации четырех исследуемых штаммов, впервые выделенных из активного ила городских

очистных сооружений г. Улан-Удэ и промышленного предприятия ОАО «Селенгинский ЦКК», на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК определены штаммы бактерий: для штамм В 1.1 идентичность с *Paenibacillus dendritiformis strain P411* составила 99,93%; штаммы В 1.2 и В 1.3 идентифицированы как *Bacillus licheniformis strain PB3* – 99,86% и 100% соответственно; штамм Р 1.1 соотнесен с *Paenibacillus polymyxa strain ISSDS-851* (процент идентификации – 99,86).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дегтярева И.А., Хидиятуллина А.Я. Рекультивация нефтезагрязненной почвы при использовании микроорганизмов-деструкторов и бентонита // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. N 5. С. 134–136.
2. Akpor O.B., Momba M.N.B.. Relationship of protozoan biomass to phosphate and nitrate removal from activated sludge mixed liquor // *Biotechnology Journal*. 2010. Vol. 5. Issue 3. P. 304–313. <https://doi.org/10.1002/biot.200900135>
3. Albertsen M., Hansen L.B.S., Saunders A.M., Nielsen P.H., Nielsen K.L. A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal // *ISME Journal*. 2012. Vol. 6. Issue 6. P. 1094–1106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.176>
4. Park H.-D., Noguera D.R. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge // *Water Research*. 2004. Vol. 38. Issue 14-15. P. 3275–3286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.047>
5. Залевская Ю.М., Белик Е.С. Адаптация естественного биоценоза микроорганизмов активного ила целлюлозно-бумажной промышленности к трудноокисляемым органическим соединениям // Вестник Казанского технологического университета. 2017. Т. 20. N 5. С. 135–139.
6. Кобызева Н.В., Гатауллин А.Г., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Разработка технологии очистки сточной воды с использованием иммобилизованной микрофлоры // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. Т. 1 (95). С. 104–107.
7. Abusam A. Calibration of ASM1 for Carbon & Nitrogen Removals of Riqqa Activated Sludge System, Kuwait // *International Journal of Modeling and Optimization*. 2014. Vol. 4. Issue 6. P. 461–464.
8. Wagner M., Loy A., Nogueira R., Purkhold U., Lee N., Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 81. Issue 1-4. P. 665–680. <https://doi.org/10.1023/A:1020586312170>
9. Бубеев А.Т., Балдаев Н.С., Цыренов В.Ж., Иванчиков Е.А. Метаболические основы создания искусственных консорциумов микроорганизмов для утилизации загрязнителей различной при-
- роды // Вестник ВСГУТУ. 2018. Т. 4(71). С. 97–106.
10. Шалимов Ю.Н., Руссу А.В., Епифанов А.В., Епифанов В.Д., Лутовац М., Бабкин В.Ф. [и др.]. Микробиология сточных вод очистных сооружений // Современные технологии обеспечения гражданской обороны и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций. 2016. N 1-1 (7). С. 366–374.
11. Джобулаева А.К., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Байкара Б.Т., Джакибаева Г.Т., Кебекбаева К.М. Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S rRNA гена // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014. N 8–1. С. 63–67.
12. Гогонин А.В., Щемелинина Т.Н., Володин В.В. Сравнительная оценка эффективности очистки сточных вод при внесении монокультур и консорциумов микроводорослей // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: материалы XVI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (Киров, 03–05 декабря 2018 г.). Киров: Изд-во Вятского государственного университета, 2018. С. 200–203.
13. Тимакова Д.Н., Ксенофонтов Б.С. Использование активного ила в качестве биофлокулянта // *Universum: химия и биология*. 2016. N 10 (28). С. 14–18.
14. McIlroy S.J., Starnawska A., Starnawski P.M., Saunders A.M., Nierychlo M., Nielsen P.H., et al. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems // *Environmental Microbiology*. 2016. Vol. 18. Issue 1. P. 50–64. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12614>
15. Lee H.-W., Lee S.-Y., Lee J.-W., Park J.-B., Choi E.-S., Park Y.K. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge // *FEMS Microbiology Ecology*. 2002. Vol. 41. Issue 2. P. 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00969.x>
16. Ekama G.A., Wetzel M.C. Modelling inorganic material in activated sludge systems // *Water SA*. 2004. Vol. 30. Issue 2. P. 153–174. <https://doi.org/10.4314/wsa.v30i2.5060>
17. Stricker A.E., Racault Y. Application of

activated sludge model no. 1 to biological treatment of pure winery effluents: case studies // *Water Science & Technology*. 2005. Vol. 51. Issue 1. P. 121–127. <https://doi.org/10.2166/WST.2005.0015>

18. Song Y.J., Xie Y.B. Extended ASM1 for simulating biodegradation process using bacterial technology // *Water Science and Engineering*. 2012. Vol. 5. Issue 3. P. 278–290.

19. Lane D.J. 16S/23S rRNA Sequencing. In:

Sta-ckebrandt E, Goodfellow M. (Edited by). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons; 1991. Chapter 4. P. 115–175.

20. Turner S., Pryer K.M., Miao V.P., Palmer J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis // *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999. Vol. 46. Issue 4. P. 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

REFERENCES

1. Degtyareva IA, Khidiyatullina AY. Reclamation of oil-contaminated soil using microorganisms-destructors and bentonite. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2012;15(5):134–136. (In Russian)

2. Akpor OB, Momba MNB. Relationship of protozoan biomass to phosphate and nitrate removal from activated sludge mixed liquor. *Biotechnology Journal*. 2010;5(3):304–313. <https://doi.org/10.1002/biot.200900135>

3. Albertsen M, Hansen LBS, Saunders AM, Nielsen PH, Nielsen KL. A metagenome of a full-scale microbial community carrying out enhanced biological phosphorus removal. *ISME Journal*. 2012;6(6):1094–1106. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.176>

4. Park H-D, Noguera DR. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Research*. 2004;38(14-15):3275–3286. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.04.047>

5. Zalevskaya JM, Belik ES. Adaptation of the natural biocenosis of activated sludge microorganisms of the pulp and paper industry to difficult-to-oxidize organic compounds. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta = Bulletin of Kazan Technological University*. 2017;20(5):135–139. (In Russian)

6. Kobyzeva NV, Gataullin AG, Silishchev HH, Loginov ON. Development of waste water treatment technology using immobilized microflora. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University*. 2009;1:104–107. (In Russian)

7. Abusam A. Calibration of ASM1 for Carbon & Nitrogen Removals of Riqqa Activated Sludge System, Kuwait. *International Journal of Modeling and Optimization*. 2014;4(6):461–464.

8. Wagner M, Loy A, Nogueira R, Purkhold U, Lee N, Daims H. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002;81(1-4):665–680. <https://doi.org/10.1023/A:1020586312170>

9. Bubeev AT, Baldaev NS, Tsyrenov VZh, Ivanchikov EA. The metabolic basis for the creation of artificial consortia of microorganisms for the disposal of pollutants of different nature. *Vestnik Vostochno-Sibirskogo universiteta tekhnologii i*

upravleniya = ESSUTM Bulletin. 2018;4:97–106. (In Russian)

10. Shalimov YuN, Russu AV, Epifanov AV, Epifanov VD, Lutovac M, Babkin VF, et al. Microbiology of wastewater treatment plants. *Sovremennye tekhnologii obespecheniya grazhdanskoi oborony i likvidatsii posledstviy chrezvychaynykh situatsii*. 2016;1-1:366–374. (In Russian)

11. Dzhobulaeva AK, Sadanov AK, Aytgeldieva SA, Baykara BT, Dzhakibaeva GT, Kebekbaeva KM. Molecular genetic identification of two strains of lactic acid bacteria based on nucleotide sequence analysis of 16s rRNA gene. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2014;8-1:63–67. (In Russian)

12. Gogonin AV, Shchemelinin TN, Vladimir VV. Comparative assessment of the efficiency of wastewater treatment in the introduction of monocultures and micro-algae consortium. In: *Biodiagnostika sostoyaniya prirodnykh i prirodno-tekhnogennykh sistem: Materialy XVI Vserossiiskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem = Biodiagnosis of the state of natural and natural-anthropogenic systems: Proceedings of the XVI All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation*. 03–05 December 2018, Kirov. Kirov: Izdatel'stvo Vyatskogo gosudarstvennogo universiteta, 2018, p. 200–203. (In Russian)

13. Timakova DN, Ksenofontov BS. The using of activated sludge as a bioflocculant. *Universum: khimiya i biologiya*. 2016;10:14–18. (In Russian)

14. McIlroy SJ, Starnawska A, Starnawski PM, Saunders AM, Nierychlo M, Nielsen PH, et al. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environmental Microbiology*. 2016;18(1):50–64. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12614>

15. Lee H-W, Lee S-Y, Lee J-W, Park J-B, Choi E-S, Park YK. Molecular characterization of microbial community in nitrate-removing activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology*. 2002;41(2):85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00969.x>

16. Ekama GA, Wetzel MC. Modelling inorganic material in activated sludge systems. *Water SA*. 2004;30(2):153–174. <https://doi.org/10.4314/wsa.v30i2.5060>

17. Stricker AE, Racault Y. Application of activated sludge model no. 1 to biological treatment

of pure winery effluents: case studies. *Water Science & Technology*. 2005;51(1):121–127. <https://doi.org/10.2166/WST.2005.0015>

18. Song YJ, Xie YB. Extended ASM1 for simulating biodegradation process using bacterial technology. *Water Science and Engineering*. 2012;5(3):278–290.

19. Lane DJ. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. (eds.) *Nucleic acid*

techniques in bacterial systematics. New York: John Wiley & Sons; 1991. Chapter 4. p.115–175.

20. Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 1999;46(4):327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванчиков Егор Андреевич,

аспирант,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
✉ e-mail: ivanchikov92@mail.ru

Бубеев Алексей Трофимович,

к.б.н., доцент,
директор Института пищевой инженерии
и биотехнологии,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
e-mail: bubeev.aleksej@mail.ru

Цыренов Владимир Жигжитович,

д.б.н., профессор кафедры биотехнологии,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
e-mail: vtsyrenov@gmail.com

Арбатская Александра Валерьевна,

студентка,
Восточно-Сибирский государственный
университет технологий и управления,
670013, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в/1,
Российская Федерация,
e-mail: aleksandra-arbatskaya@mail.ru

Заявленный вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили оконча-
тельный вариант рукописи.*

*Поступила в редакцию 03.11.2020.
Одобрена после рецензирования 15.01.2021.
Принята к публикации 28.02.2021.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Egor A. Ivanchikov,

Postgraduate Student,
East Siberia State University
of Technology and Management,
40в/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
✉ e-mail: ivanchikov92@mail.ru

Alexey T. Bubeev,

Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Director of the Institute of Food Engineering
and Biotechnology,
East Siberia State University of Technology
and Management,
40в/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
e-mail: bubeev.aleksej@mail.ru

Vladimir Zh. Tsyrenov,

Dr. Sci. (Biol.), Professor,
Department of Biotechnology,
East Siberia State University
of Technology and Management,
40в/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
e-mail: vtsyrenov@gmail.com

Aleksandra V. Arbatskaya,

Student,
East Siberia State University
of Technology and Management,
40в/1, Klyuchevskaya St., Ulan-Ude, 670013,
Russian Federation,
e-mail: aleksandra-arbatskaya@mail.ru

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests re-
garding the publication of this article.

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

*The article was submitted 03.11.2020.
Approved after reviewing 15.01.2021.
Accepted for publication 28.02.2021.*