

Научная статья

УДК 579.22

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-617-626>



Процессы агглютинации культур активного ила под действием внеклеточных лектинов

Алексей Витальевич Кобелев, Святослав Владимирович Клементьев,
Александр Семенович Сироткин

*Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку: Кобелев Алексей Витальевич, alexei-ksu@mail.ru

Аннотация. Цель исследования – изучить агглютинирующую способность пяти изолятов – A1, A2, A3, A4, BS1, выделенных из активного ила на селективных средах, характерных для ряда микробных культур, доминирующих в активном иле и участвующих в процессах формирования микробных агрегатов. Изучены морфологические свойства выделенных изолятов и их лектиновая активность, физиолого-биохимические свойства отдельных изолятов, осуществлена идентификация микроорганизмов в их составе. Оценена способность к синтезу экзополисахаридного матрикса у выбранных изолятов, а также седиментация активного ила под действием компонентов нативного раствора и культуральной жидкости изолята BS1. По результатам оценки способности к агглютинации для дальнейшей работы были выбраны изоляты BS1 и A2 в качестве продуцентов внеклеточных лектинов и объектов агглютинации соответственно. Физиолого-биохимические свойства и молекулярно-генетическая идентификация изолята BS1 позволила установить степень идентичности 96,19% с известными культурами р. *Bacillus*; для изолята A2 была зарегистрирована степень идентичности 92,93% с известными культурами р. *Shigella* и р. *Escherichia*. Для оценки способности к синтезу матрикса биопленки изоляты BS1 и A2 выращивались на агаризованной питательной среде с добавлением красителя конго красного. Полученные результаты показали, что изоляты способны синтезировать экзополисахаридный матрикс, который является основным компонентом бактериальных биопленок. Результаты изучения процессов седиментации активного ила под влиянием нативного раствора и культуральной жидкости изолята BS1 показали, что скорость седиментации активного ила значительно увеличивалась при внесении суспензии клеток изолята BS1 в начальный период седиментации, а при внесении нативного раствора изолята BS1 – по истечении 5 мин контакта. Полученные экспериментальные данные позволяют предложить использование сред – источников внеклеточных лектинов бактерий, в качестве коагулянта (флокулянта) для седиментации активного ила.

Ключевые слова: лектины, микробные изоляты, активный ил, матрикс биопленки, агглютинация, седиментация

Для цитирования: Кобелев А. В., Клементьев С. В., Сироткин А. С. Процессы агглютинации культур активного ила под действием внеклеточных лектинов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2021. Т. 11. N 4. С. 617–626. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-617-626>.

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Agglutination processes of activated sludge cultures induced by extracellular lectins

Alexei V. Kobelev, Svyatoslav V. Klement'ev,
Alexander S. Sirotkin

Kazan National Research Technological University,
Kazan, Russian Federation

Corresponding author: Alexei V. Kobelev, alexei-ksu@mail.ru

Abstract. We examine the agglutinating ability of five compounds, namely, A1, A2, A3, A4 and BS1, isolated from activated sludge on selective media typical of a number of dominant microbial cultures that contribute to

the formation of microbial aggregates. The morphological properties of the isolates and their lectin activity, as well as the physiological and biochemical properties of individual isolates were studied; microorganisms in their composition were identified. We assessed the capacity of the isolates under study to synthesize an exopolysaccharide matrix, as well as the sedimentation of activated sludge under the action of the native solution and culture liquid of the BS1 isolate. Based on their capacity to agglutinate, the BS1 and A2 isolates were selected for further research as producers of extracellular lectins and objects of agglutination, respectively. The biophysicochemical properties and molecular-genetic identification of the BS1 isolate allowed the degree of identity with *r. Bacillus* to be defined (96.19%); for the A2 isolate, 92.93% identity with *p. Shigella* and *p. Escherichia* was determined. To assess the capacity to synthesize a biofilm matrix, the BS1 and A2 isolates were cultivated on an agar nutrient solution using Congo Red dye. According to the obtained results, the isolates are capable of synthesizing an exopolysaccharide matrix, the main component of bacterial biofilms. The research results on the sedimentation of activated sludge induced by the native solution and culture liquid of BS1 showed the following. The sedimentation rate of activated sludge increased significantly at the beginning of the process upon adding a BS1 cell suspension, while the introduction of the native solution of BS1 intensified the process following 5 minutes of contact. The obtained experimental data suggest that the media containing extracellular bacterial lectins can be effectively used as a coagulant (flocculant) for the sedimentation of activated sludge.

Keywords: lectins, microbial isolates, activated sludge, biofilm matrix, agglutination, sedimentation

For citation: Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Sirotkin A. S. Agglutination processes of activated sludge cultures induced by extracellular lectins. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2021;11(4):617-626. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-617-626>.

ВВЕДЕНИЕ

Биологическая трансформация загрязняющих веществ играет важную роль в процессах биологической очистки сточных вод сообществом агрегированных микроорганизмов в виде суспензии активного ила, а также иммобилизованной биомассы в виде биопленки. В формировании биопленки в свою очередь очень важны лектины, необходимые для правильной архитектуры и прочности биопленки, они отвечают за связывание микробных клеток между собой и/или с поверхностью для иммобилизации, [1].

Лектины – это гликопротеины, способные связывать углеводные остатки на поверхности клетки, вызывая их агглютинацию [2, 3]. Было обнаружено, что эти белки присутствуют в любой живой системе от вирусов до человека и играют фундаментальную роль в процессах углевод-белкового узнавания в организме хозяина и микробных сообществ в целом [4, 5]. В настоящее время особый интерес вызывают лектины, синтезируемые бактериями, в связи с перспективой использования их в различных медико-биологических, биотехнологических и исследовательских задачах.

В литературе имеются данные об использовании растительных материалов в качестве природных коагулянтов [6], примером которых являются семена, богатые лектинами. Однако затраты на получение очищенных растительных лектинов довольно существенны. Ввиду этого очевидный интерес представляет изучение микробных лектинов.

Цель данной работы состояла в изучении агглютинирующей способности микробных культур, выделенных из активного ила. В процессе ис-

следования решались следующие задачи:

1. Получение изолятов сообщества активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск, Республика Татарстан.

2. Анализ культурально-морфологических признаков полученных изолятов и оценка активности внеклеточных лектинов культур в их составе.

3. Идентификация микроорганизмов в составе изолятов, проявивших наибольшую способность к агглютинации клеток, и исследование их физиолого-биохимических свойств.

4. Визуализация реакции бактериальной агглютинации с выбранными образцами.

5. Оценка способности идентифицированных изолятов к синтезу экзополисахаридного матрикса биопленки.

6. Анализ эффективности бактериальных лектинов отдельных культур в качестве коагулянта (флокулянта) для седиментации активного ила.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования были рассмотрены:

– активный ил биологических очистных сооружений г. Зеленодольск по очистке коммунально-бытовых сточных вод и выделенные из его сообщества изоляты A1, A2, A3, A4, а также изолят культуры *Bacillus subtilis* (BS1);

– культура *Bacillus subtilis*, выделенная из лекарственного препарата Споробактерин (ООО «Бакорен», Россия).

Выделенные изоляты и препаративные культуры представляли интерес для исследования агглютинации на основании их распространенности в микробном сообществе активного ила, а также их участия в процессах агглютинации клеток на осно-

вании ранее полученных данных [7, 8].

Изолят BS1 и культура *Bacillus subtilis* рассматривались в качестве продуцентов внеклеточных лектинов.

Клетки бактерий изолятов А1, А2, А3, А4 рассматривались в качестве объектов агглютинации.

Методы исследования. Получение чистых культур изолятов осуществляли высевом на плотные питательные среды суспензии активно ила методом Дригальского¹.

Для выделения изолятов А1, А2, А3, А4 использовали селективную синтетическую питательную среду Фенилаланин агар [9], характерную для накопления культур р. *Acinetobacter*, состав которой представлен в табл. 1.

Таблица 1. Состав питательной среды «Фенилаланин агар» для накопления культур рода *Acinetobacter*

Table 1. "Phenylalanine agar" medium composition for genus *Acinetobacter* accumulation

Компонент	Концентрация, г/л
L-Фенилаланин	2,0–3,0
NaCl	5,0
Na ₂ SO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄	0,1
Агар микробиологический	15,0

Основной селективный фактор данной питательной среды – L-фенилаланин, являющийся единственным источником азота и углерода.

Получение изолята BS1, содержащего клетки спорообразующей *Bacillus subtilis*, осуществляли на мясопептонном агаре. Суспензию активного ила предварительно прогревали при температуре 70 °С в течении 45 мин для обеспечения лизиса вегетативных клеток [10, 11].

Физиолого-биохимические свойства бактерий изучали согласно стандартным методикам, также представленным в «Практикуме по микробиологии»¹. Подвижность клеток определяли приготовлением препарата «висячая капля»¹.

Молекулярно-генетическую идентификацию микроорганизмов осуществляли путем определения нуклеотидной последовательности 16S рРНК с использованием стандартных праймеров 72s (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACSTTGTACGACTT-3') [12, 13]. Процедура идентификации проводилась на базе Института экологии и природопользования, а также на базе Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского (Приволжского) федерального университета.

Данная процедура проводилась в два этапа:

1. Выделение бактериальной геномной ДНК.

2. Секвенирование по методу Сэнгера.

Выделение бактериальной геномной ДНК проводили с помощью набора реагентов FastDNA Spin Kit For Soil². Клетки и органеллы подвергали механическому разрушению, для чего 0,3 г биомассы бактерий суспендировали в натриево-фосфатном буфере и МТ-буфере, после переносили в гомогенизатор (30 с, 1500 об./мин) и центрифугировали (5 мин, 14000 об./мин). В осадке оставались крупные внутриклеточные органеллы, обломки клеток и полуразрушенные бактерии, ДНК оставалась в супернатанте. Для осаждения белков к отобранному супернатанту, содержащему ДНК, добавляли 250 мкл раствора PPS (PPS Silent Surfactant), перемешивали и центрифугировали (5 мин, 14000 об./мин).

Закрепление ДНК на матриксе проводили следующим образом: осадок отбрасывали, полученный супернатант смешивали с 1 мл Binding Matrix и перемешивали на ротаторе в течение 10 мин. Далее проводили закрепление ДНК на колонке Spin. Для этого 600 мкл полученного раствора переносили на колонку Spin и центрифугировали (1 мин, 14000 об./мин) до тех пор, пока весь исследуемый раствор не будет израсходован.

ДНК очищали от реактивов и клеточных остатков путем использования 500 мкл раствора гуанидин-тиоционата, который помещали на колонку и центрифугировали (1 мин, 11000 об./мин). Полученную надосадочную жидкость отбрасывали. На колонку помещали 500 мкл SEWS-M и центрифугировали (1 мин, 14000 об./мин) при комнатной температуре. Для удаления SEWS-M и других реактивов жидкость со дна пробирки удаляли и центрифугировали колонку (2 мин, 14000 об./мин) при комнатной температуре. Полученную колонку с очищенными ДНК/рНК помещали в чистую пробирку Eppendorf и оставляли сохнуть на воздухе в течение 5 мин. Затем в середину колонки аккуратно добавляли 50 мкл DES (апиригенная вода без ДНКазы) и центрифугировали (1 мин, 14000 об./мин) при комнатной температуре для сбора элюата в пробирке.

Определение первичных нуклеотидных последовательностей ДНК проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера³. Постановка сиквенсной реакции проводилась с использованием ген-специфических праймеров и набора реактивов Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) в объеме 10 мкл. Для подтверждения мутации прочтение осуществлялось с обоих праймеров – прямого и обратного. Реакцию проводили, используя амплификатор Veriti (Applied Biosystems, США) по

¹Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. Практикум по микробиологии. М.: ИЦ «Академия»: 2005. 608 с.

²FastDNA SPIN Kit for Soil. URL: http://dmoserv3.who.edu/data_docs/IODP_347/FastDNA_Spin_Kit_for_Soil (29.07.2021).

³BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_081527.pdf (29.07.2021).

следующему температурному протоколу: предварительная денатурация – при температуре 96 °С (1 мин); 26 циклов при температуре: 96 °С (10 с), 50 °С (5 с), 60 °С (4 мин).

Очистка сиквенсной реакции осуществлялась в следующей последовательности:

1) в пробирку с ПЦР-продуктом добавляли по 40 мкл смеси ацетата аммония с этанолом на каждые 10 мкл ПЦР-смеси;

2) пробирки вортексировали и инкубировали смесь при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин;

3) после пробы центрифугировали 30 мин при 2500 об./мин;

4) полученный супернатант аккуратно удаляли, осадок промывали 150 мкл охлажденного 80%-го этанола с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 2500 об./мин;

5) этанол удаляли, осадок высушивали при температуре 55 °С в амплификаторе и растворяли в 10 мкл Hi-Di-формамида;

6) перед секвенированием пробы денатурировали в течение 2 мин при 95 °С;

7) детекция продуктов секвенирования проводилась в автоматическом режиме методом капиллярного электрофореза на приборе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystems, США).

Полученные результаты сравнивали с базой данных NCBI с помощью пакета программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Определения лектиновой активности проводили путем периодического культивирования микроорганизмов в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 18 ч. В качестве питательной среды использовали мясопептонный бульон. После активации микробные суспензии центрифугировали при 8000 об./мин в течение 10 мин.

Нативный раствор (н.р.) изолята BS1 и *Bacillus subtilis* для реакции агглютинации получали путем центрифугирования культуральной жидкости при 10000 об./мин в течение 30 мин.

Бактериальные клетки, оставшиеся после первого центрифугирования, трижды отмывали в физиологическом растворе при 8000 об./мин, в течение 10 мин, а затем доводили до 2%-й суспензии клеток и использовали в дальнейшем эксперименте.

Реакцию агглютинации проводили в специальных планшетах для иммунологических реакций с U-образными лунками: в лунках планшета готовили серию последовательных разведений нативного раствора по 0,05 мл, затем в каждую лунку добавляли 0,05 мл 2%-й суспензии бактериальных клеток, реакцию проводили при 24 °С в течение 2 ч.

Активность лектинов выражали как максимальное разведение лектинов, при котором

наблюдается агглютинация бактериальных клеток. Расчет полученных результатов проводили по формуле $AG = 2^{n-1}$, где AG – агглютинирующая активность (титр, единиц), n – разведение (лунка), при котором наблюдается агглютинация бактериальных клеток [14].

Оценка способности бактерий к синтезу экзополисахаридного матрикса. Способность культур к выделению экзополисахаридного матрикса оценивали с помощью методики, предложенной D. J. Freeman [15]. Для этого анализируемые штаммы выращивали на поверхности плотной питательной среды, помимо основных питательных компонентов содержащей специфический краситель конго красный. Образование матрикса оценивали по цвету выросших колоний. Согласно данному методу, отсутствие матрикса определяется по белому цвету колоний, умеренная способность к синтезу матрикса – по красным колониям, выраженная способность – по черному цвету колоний [16].

Седиментация активного ила. Исследования проводились в цилиндре объемом 100 мл, диаметром 60 мм и высотой столба жидкости 135 мм. Седиментация ила описывалась кривыми Кинша [17] с фиксированием границы раздела вода–ил. Данные измерений заносились в таблицу, а затем отображались графически.

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

Скорость осаждения активного ила, u , мм/мин, для каждого временного промежутка рассчитывалась по формуле:

$$u = \frac{H_1 - H_2}{\Delta T},$$

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

Седиментационные свойства ила исследовались для дозы (концентрации) ила 2,9 г/л.

Дозу ила определяли по методике ФР 1.31.2008.04398⁴.

Для исследования процесса седиментации под действием внеклеточных лектинов использовались следующие образцы:

– активный ил биологических очистных сооружений г. Зеленодольск (100 мл) в качестве контроля;

– контроль (98 мл) + нативный раствор BS1 (2 мл);

– контроль (98 мл) + нативный раствор *Bacillus subtilis* (2 л);

⁴ФР 1.31.2008.04398. Методика выполнения измерений дозы ила по объему и расчету илового индекса [Электронный ресурс]. URL: <https://meganorm.ru/Index2/1/4293790/4293790509.htm> (29.07.2021).

– контроль (98 мл) + суспензия BS1 (2 мл);
– контроль (98 мл) + суспензия *Bacillus subtilis* (2 мл).

Объем вносимых в активный ил нативного раствора и суспензии – 2 мл, был выбран согласно предварительным исследованиям.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культурально-морфологические свойства выделенных изолятов и оценка их лектиновой активности. Клетки изолята А1 представляют собой грамотрицательные кокки, которые на агаризованных средах образуют круглые колонии диаметром 2 мм, при культивировании на жидкой питательной среде образуют пленку. Спор не образуют.

Клетки изолята А2 представляют собой грамотрицательные кокки. На поверхности плотных агаризованных сред образуют круглые белые колонии диаметром 2 мм. При культивировании в жидкой питательной среде на стенках колбы образуют белую пленку. Спор не образует, клетки неподвижны.

Изолят А3 содержит грамотрицательные палочки. На плотных агаризованных средах образуют колонии желтого цвета диаметром 3–4 мм. При культивировании в жидких средах пленку не образуют. Спор не образуют.

Клетки изолята А4 представляют собой грамположительные кокки, расположенные преимущественно гроздьями. На плотных питательных средах образуют круглые колонии с ровными краями диаметром 2–3 мм. При культивировании на жидких питательных средах образуют едва заметную пленку, на дне присутствует осадок.

Клетки изолята BS1 – грамположительные палочки. Колонии бесцветные, мелкоморщинистые. Образуют споры, подвижны.

Согласно результатам экспериментальных исследований активности лектинов культуры BS1 к клеткам исследуемых изолятов было показано, что нативный раствор изолята BS1 (как источник внеклеточных лектинов) проявлял наибольшую активность к клеткам изолятов А2 (AG=2 ед.) и А4 (AG=2 ед.). Выявлена низкая лектиновая активность к клеткам изолята А1 (AG=1 ед.) и отсутствие активности к клеткам изолята А3 (AG=0 ед.). Невыраженную активность к клеткам изолята А3 можно объяснить отсутствием углеводных детерминантов, специфичных для внеклеточных лектинов BS1.

Нативный раствор модельной культуры *Bacillus subtilis* показал слабую активность внеклеточных лектинов к клеткам изолята А4 (AG=1 ед.). Отсутствие активности к остальным культурам связана, вероятно, с неспецифиче-

скими для лектинов углеводными остатками на поверхности клеток.

На основе морфологических признаков для дальнейшей идентификации были выбраны изоляты А2 и BS1, полученные из активного ила: клетки изолята А2 выбраны в качестве объекта агглютинации, изолят BS1 – в качестве продуцента внеклеточных лектинов.

Физиолого-биохимические свойства изолятов А2 и BS1 и идентификация микроорганизмов в их составе. Основные физиолого-биохимические свойства культур А2 и BS1 показаны в табл. 2.

Таблица 2. Физиолого-биохимические свойства изолятов А2 и BS1

Table 2. Physiological and biochemical properties of isolates А2 and BS1

Свойства	Изоляты	
	А2	BS1
Наличие фермента каталазы	+	+
Гидролиз желатина	-	+
Гидролиз крахмала	-	+
Наличие фермента уреазы	+	+
Рост при 3% NaCl	+	+
Рост при 7% NaCl	-	+
Тест Фогеса-Проскауэра	-	+
Выделение NH ₃ при гидролизе белков	+	+
Выделение H ₂ S при гидролизе белков	-	+

Примечание. «+» – реакция положительная, «-» – реакция отрицательная.

На основании морфологических признаков и физиолого-биохимических свойств культуру изолята А2 можно отнести к бактериям рода *Acinetobacter*, а BS1 – к роду *Bacillus*⁵.

Результаты процедуры секвенирования исследуемых образцов показали, что 16S рРНК изолятов А2 и BS1 содержит 1214 и 1256 пар нуклеотидов соответственно (табл. 3).

Идентификация нуклеотидной последовательности фрагментов изолята А2 в международной базе позволила установить степень идентичности 92,93% с известными культурами р. *Shigella* и р. *Escherichia*; по отношению к изоляту BS1 была зарегистрирована степень идентичности 96,19% с известными культурами р. *Bacillus* (табл. 4).

Согласно молекулярно-генетической экспертизе, изолят А2 можно отнести к различным видам рода *Shigella* или рода *Escherichia* либо к их смеси, а изолят BS1 можно отнести к различным видам рода *Bacillus* либо к их смеси.

⁵Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи: в 2 т.; 9-е изд.; пер. с англ. под ред. Г. А. Заварзина. М.: Мир. 1997. 800 с.

Таблица 3. Нуклеотидная последовательность 16S рРНК изолятов А2 и BS1

Table 3. Nucleotide sequence of 16S rRNA isolates A2 and BS1

A2	AAACGGTAGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTGCCATCGGATGT GCCCAGATGGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA TGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGCACAAT GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCCAGCGGG AGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCGAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTG TTAAGTCATGATAGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTA GAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGGTGGCGAAGGCG GTCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGTAGTGC CACGCCGTAACGATGTCGACTTGACAGTTGTGCTCTTGAGGCGTGGCTTCCAGAGCTAATGCGTTAAGTCGA CCGCTGGCGAGTACGGCCGAAGGCTAAACTTCAATGAATGACGGCGGCCCGCACAGCTTGGAGCAT GTAGTTCAATCGAATGCTAGCGCGAAGCAGCTTAAGTGGTCTGGACAATCCAACGAAAGTTCCAGAGCATGGA TATTGTGCCTATCGGTAATCGGTGAGAACAGGTGACCTGCATGGCTGTCTCAAGCTTCTGGTATGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTG CCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTCTCCAGGGCAACACACGT TCTTCAATGGGGCATACAAGAGAAGCGCCCTCGCGAGATCAAGCCGACCTCATAAAGAGCGCAGTAGTCCC GATGGTCTCTCAACTCTCCTCCATGAAGTCGGGGTGCCTAGTAATGTTTCTCTAG
BS1	TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTTGAAAGGCGG CTTCCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAAC GATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCACGGGAGG CAGCAGTAAGGAATCTCCGCAATGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAAGGCTTTCCG GGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATTAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAAC AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG GGCGTAAAGGGCGCCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT ATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCACTTTCTGGTCTGTAAGTGCATGACACTGAGGCGCGCAAGCGTGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGTTTCCGCCCTT TAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCCGCTGGAGGAGTACGGCTCGCAGGCTGAACCTCCAAAGGAAT TTGACCGCGGGCCCGCCACAGCCGGTTGGTAGCATGATGGATTTAGTCGACGTCCACCGCGTAACGAACCT TTACCCAGTCTTACATCCCTCTGAAACTCCTAGAGAATTAGGGCCTTCCCTTCGGGAGCAGAGTGCAGGT GGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTATCTT AGTTGCCATCATTAAGTTGGCACTTAAGTGTACTGCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGGATGACGTC AAATCATCATGTCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCGCG AGCTAGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGATAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATC GCTAGTAATCGCGGATCAGCATG

Таблица 4. Сравнение секвенированных нуклеотидных последовательностей фрагментов 16S РНК с известными данными в базе международного банка

Table 4. Comparison of sequenced nucleotide sequences of 16S RNA fragments with known data in the international bank database

Идентифицируемый штамм	Штамм в базе данных	Процент идентичности
A2	<i>Shigella boydii</i> strain P288	92,93
	<i>Shigella flexneri</i> strain ATCC 29903	92,93
	<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	92,93
BS1	<i>Bacillus proteolyticus</i> strain MCCC 1A00365	96,19
	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	96,19
	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain FSL W8-0169	96,19
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792	96,19

Визуализация реакции агглютинации. Результаты микроскопирования реакции агглютинации клеток изолята А2 наглядно подтверждают активность лектинов BS1 (рис. 1).

В присутствии внеклеточных лектинов BS1 наблюдается визуализируемое в процессе микроскопирования «склеивание» клеток бактерий изолята А2.

Способность к синтезу матрикса биопленки. На рис. 2 представлены колонии исследуемых культур на питательной среде с добавлением красителя конго красный.

В процессе культивирования колонии культуры А2 окрасились в темно-красный цвет, колонии изолята BS1 стали светло-красными. По цвету данных колоний можно утверждать, что изоляты способны синтезировать экзополисахаридный матрикс (основной компонент бактериальных биопленок)⁶. Полученные результаты представляют интерес для дальнейшего исследования биопленок культур в составе полученных изолятов.

Седиментация активного ила. Результаты седиментации активного ила представлены на рис. 3.

⁶Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учеб.-метод. пособие. Казань: Изд-во К(П)ФУ. 2016. 42 с.

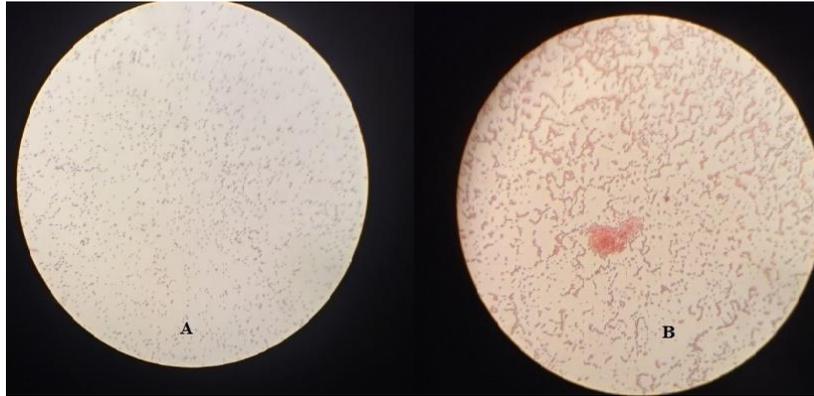


Рис. 1. Агглютинация бактериальных клеток А2 под действием внеклеточных лектинов BS1 (увеличение ×400);
 А – микрофотография клеток изолята А2 в собственной культуральной жидкости;
 В – микрофотография клеток А2 под действием внеклеточных лектинов BS1

Fig. 1. Agglutination of A2 bacterial cells under the action of BS1 extracellular lectins (magnification ×400);
 А – photomicrograph of A2 cells in their own culture fluid;
 В – photomicrograph of A2 cells exposed to BS1 extracellular lectins



Рис. 2. Фотографии колоний: А – изолят А2; В – изолят BS1

Fig. 2. Colony photos: А – isolate А2; В – isolate BS1

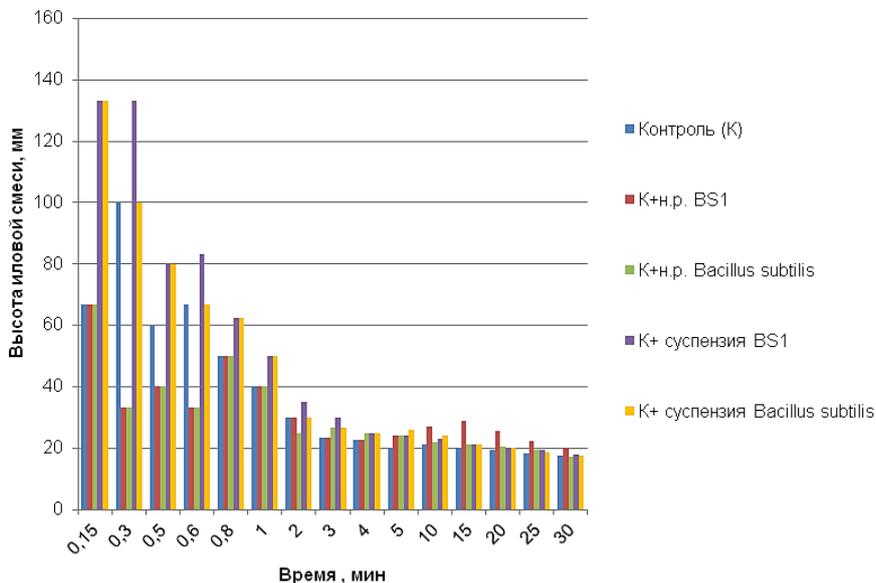


Рис. 3. Кривые кинетики снижения границы раздела ил–вода

Fig. 3. Kinetic curves of a decrease in the sludge–water interface

Наибольшая эффективность седиментации активного ила при добавлении нативного раствора выделенных изолятов была зарегистрирована для изолята BS1 – от 17 до 43% и выше по сравнению с контролем в различных интервалах 30-минутного времени седиментации. При этом не было отмечено повышения эффективности процесса седимен-

тации в первые 5 мин осаждения активного ила с нативными растворами изолятов. Добавление в активный ил нативного раствора культуры *Bacillus subtilis* показало ускорение седиментации активного ила не более чем на 20% в начальный момент времени осаждения.

В случае внесения в активный ил клеточной

суспензии изолята BS1 было показано значительное улучшение седиментации в первый момент времени: на 100, 33, 33, 25, 25, 25, 16 и 28%, в период с 10 с до 3 мин соответственно по сравнению с контролем. Добавление в активный ил суспензии *Bacillus subtilis* показало увеличение скорости осаждения активного ила на 100% на 10 с, 33% на 30 с и по 25% на 50 с и 1 мин соответственно.

Полученные выше данные позволяют предположить, что изменение характера процесса седиментации при внесении нативного раствора (источника лектинов) либо клеточной суспензии (продуцентов лектинов) связано с наличием/отсутствием микробных клеток в культуральной жидкости, внесимой в активный ил. При этом следует отметить, что при внесении суспензии клеток в начальный период осаждения происходит быстрая агглютинация между поверхностными лектинами клеток продуцента и комплементарными компонентами активного ила, что приводит к повышению эффективности осаждения активного ила. Внесение нативного раствора как источника внеклеточных лектинов обеспечивает ускорение процесса седиментации активного ила лишь по истечении первых 5 мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены изоляты A1, A2, A3, A4 и BS1 из микробного сообщества активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск (Республика Татарстан).

2. Оценена активность внеклеточных лектинов в нативном растворе изолята BS1 к клеткам изоля-

тов A1, A2, A3, A4. Наибольшую лектиновую активность нативный раствор BS1 проявил к клеткам изолята A2 (AG=2 ед.) и A4 (AG=2 ед.), наименьшую активность – к клеткам изолята A1 (AG=1 ед.), не проявлял активности – к клеткам изолята A3 (AG=0 ед.).

3. По культурально-морфологическим признакам и физиолого-биохимическим свойствам изолят A2 отнесен к роду *Acinetobacter*, изолят BS1 – к роду *Bacillus*. С помощью молекулярно-генетического анализа показано, что изолят BS1 относится к бактериям р. *Bacillus*, а изолят A2 – к бактериям р. *Shigella* или р. *Escherichia*.

4. Визуализацией реакции бактериальной агглютинации при микроскопировании препаратов подтверждена активность внеклеточных лектинов BS1 к бактериальным клеткам A2.

5. Оценена способность культур изолятов A2 и BS1 синтезировать экзополисахаридный матрикс высевом на плотную питательную среду с добавлением красителя конго красный. По цвету колоний сделан вывод о том, что культуры A2 и BS1 способны синтезировать матрикс внеклеточных полимеров и участвовать в образовании биопленки.

6. Показано, что скорость седиментации активного ила увеличивалась при внесении суспензии клеток изолята BS1 в начальный период процесса осаждения, а при внесении нативного раствора изолята BS1 – по истечении 5 мин контакта.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Grishin A. V., Krivozubov M. S., Karyagina A. S., Gintsburg A. L. *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials // Actanaturae. 2015. Vol. 7, no. 2. P. 29–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-29-41>.

2. Луцик А. Д., Детько Е. С., Луцик М. Д. Лектины в гистохимии. Львов: Вища шк., 1989. 142 с.

3. Кобелев А. В., Сироткин А. С. Лектины: обзор свойств и перспектив использования в биотехнологии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова. 2018. Т. 14. N 2. С. 60–67.

4. Muhammadiev R. S., Bagaeva T. V. Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani* // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. Vol. 6, no. 6. P. 1756–1763.

5. Алешин В.Н., Лобанов В.Г., Минакова А.Д. Лектины: свойства, сферы применения и перспективы исследования // Известия вузов. Пищевая технология. 2005. N 1 (284). С. 5–7.

6. Ancy J. A., Vasanthi M., Thamarai selvi C., Ravindran B., Woo J. C., Soon W. C. Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* L. seed. // Journal of Water Process Engineering. 2020. Vol. 39, no. 3. Article number 101742. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101742>.

7. Кобелев А. В., Клементьев С. В., Вдовина Т. В.,

Хабибуллина А. Р., Сироткин А. С. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий активного ила // Пищевые технологии и биотехнологии: материалы XVI Всероссийской конференции молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием, посвященной 150-летию Периодической таблицы химических элементов (Казань, 16–19 апреля 2019 г.), в 3 ч. Казань: Изд-во КНИТУ, 2019. Ч. 2. С. 102–105.

8. Кобелев А.В., Клементьев С.В., Вдовина Т.В., Сироткин А.С. Оценка активности внеклеточных лектинов бактерий в формировании агрегированных микробных форм // Бутлеровские сообщения. 2021. Т. 65, N 1. С.105–113. <https://doi.org/10.37952/ROI-jbc-01/21-65-1-105>.

9. Пат. № 2660567, Российская Федерация. Способ выделения и идентификации бактерий комплекса *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* / Е. П. Сиволодский; патентообладатель Е.П. Сиволодский; заявл. 29.08.2017; опубл. 06.07.2018. Бюл. № 19.

10. Феоктистова Н. А., Мустафин А. Х., Калдыркаев А. И., Васильев Д. А. Выделение бактерий вида *Bacillus subtilis* из объектов санитарного надзора // Молодежь и наука XXI века: материалы III Международной науч.-практ. конф. молодых ученых (Ульяновск, 23–26 ноября 2010 г.). Ульяновск: Изд-во УГСХА, 2010. Т. 3: Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпи-

зоотологии и биотехнологии. С. 72–75.

11. Феоктистова Н. А., Калдыркаев А. И., Муштафин А. Х. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. N 4 (32). С. 288–290.

12. Martins dos Santos H. R., Argolo C. S., Argôlo-Filho R. C., Loguerico L. L. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information // BMC Microbiology. 2019. Vol. 19, no. 1. Article number 74. 14 p. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>.

13. Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denatur-

ing gradients // Applied and Environmental Microbiology. 1997. Vol. 63, no. 8. P. 3233–3241. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3233-3241.1997>.

14. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. Львов: Вища шк.1981. 156 с.

15. Freeman D. J., Falkiner F. R., Keane C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci // Journal of Clinical Pathology. 1989. Vol. 42, no. 8. P. 872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.

16. Ярец Ю. И., Шевченко Н. И. Новый метод анализа бактериальной биопленки // Наука и инновации. 2016. N 10 (164). С. 64–68.

17. Кулаков А. А., Макиша Н. А., Шафигуллина А. Ф., Хардер Р. Исследование седиментационных свойств иловой смеси городских канализационных очистных сооружений // Вестник МГСУ. 2018. Т. 13. N 5 (116). С. 643–650. <https://doi.org/10.22227/1997-0935.2018.5.643-650>.

REFERENCE

1. Grishin A. V., Krivozubov M. S., Karyagina A. S., Gintsburg A. L. *Pseudomonas aeruginosa* lectins as targets for novel antibacterials. *Acta naturae*. 2015;7(2):29–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-29-41>.

2. Lutsik A. D., Detyuk E. S., Lutsik M. D. *Lectins in histochemistry*. Lvov: Vischa shkola; 1989.142 p. (In Russian).

3. Kobelev A. V., Sirotkin A. S. Lectins: A review of properties and prospects for use in biotechnology. *Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoi biologii imeni Yu. A. Ovchinnikova = Yu. A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2018; 14(2):60–67. (In Russian).

4. Muhammadiev R. S., Bagaeva T. V. Isolation and structural characterization of lectin micromycetes *Rhizoctonia solani*. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2015;6(6):1756–1763.

5. Aleshin V. N., Lobanov V. G., Minakova A. D. Lectins: properties, applications and research prospects. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Pishhevaya tehnologiya = News of Institutes of Higher Education. Food Technology*. 2005;1:5–7. (In Russian).

6. Ancy J. A., Vasanthy M., Thamarai selvi C., Ravindran B., Woo J. C., Soon W. C. Treatment of coffee cherry pulping wastewater by using lectin protein isolated from *Ricinus communis* L. seed. *Journal of Water Process Engineering*. 2020;39(3). Article number 101742. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101742>.

7. Kobelev A. V., Klementyev S. V., Vdovina T. V., Khabibullina A. R., Sirotkin A. S. Assessment of extracellular lectins activity of activated sludge bacteria. In: *Pishchevye tekhnologii i biotekhnologii: materialy XVI Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh, aspirantov i studentov s mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 150-letiyu Periodicheskoi tablitsy khimicheskikh elementov = Food*

technologies and diotecnologies: Proceedings of XVI All-Russian Conference of Young Scientists, Postgraduates and Students with International Participation, dedicated to the 150th anniversary of the Periodic Table of Chemical Elements, 16–19 April 2019, Kazan. Kazan: Izdatel'stvo KNITU; 2019, part 2, p. 102–105. (In Russian).

8. Kobelev A. V., Klement'ev S. V., Vdovina T. V., Sirotkin A. S. Evaluation of the activity of bacterial extracellular lectins in the formation of aggregated microbial forms. *Butlerovskie soobshcheniya = Butlerov Communications*. 2021;65(1):105–113. (In Russian).

9. Sivolodsky E. P. Method for isolation and identification of bacteria of *Acinetobacter calcoaceticus – Acinetobacter baumannii* complex. Patent RF, no. 2660567; 2017. (In Russian).

10. Feoktistova N. A., Mustafin A. H., Kaldyrkaev A. I., Vasiliev D. A. Allocation of bacteria of type bacillus subtilis from objects of sanitary inspection. In: *Molodezh' i nauka XXI veka: materialy III Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii molodykh uchenykh = Youth and Science of the XXI Century: Proceedings of the III International Scientific and Practical Conference of Young Scientists*. 23–26 November 2010, Ul'yanovsk. Ul'yanovsk, 2010. Vol. 3: *Aktual'nye voprosy mikrobiologii, virusologii, epizootologii i biotekhnologii = Actual problems of microbiology, virology, epizootology and biotechnology*, p. 72–75. (In Russian).

11. Feoktistova N. A., Kaldyrkaev A. I., Mustafin A. Kh. Working out of an outline of the patterns study aimed at isolating and rapid identification of bacillus subtilis, and bacillus cereus bacteria species. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta = Bulletin of the Orenburg State Agrarian University*. 2011;4:288–290. (In Russian).

12. Martins dos Santos H. R., Argolo C. S., Argôlo-Filho R. C., Loguerico L. L. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe los-

ses of diversity information. *BMC Microbiology*. 2019;19(1). Article number 74. 14 p. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1446-2>.

13. Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K., Wellington E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(8):3233–3241. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3233-3241.1997>.

14. Lutsik A. D., Panasyuk E. N., Lutsik M. D. *Lectins*. Lvov: Vischa shkola; 1981.156 p. (In Russian).

15. Freeman D. J., Falkiner F. R., Keane C. T. New method for detecting slime production by co-

agulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 1989;42(8):872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>.

16. Yarets Yu. I., Shevchenko N. I. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. *Nauka i innovatsii = Science and Innovations*. 2016;10:64–68. (In Russian).

17. Kulakov A. A., Makisha N. A., Shafigullina A. F., Harder R. Investigation of sedimentation properties of sludge liquor at wastewater treatment plants. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo stroitel'no-go universiteta = Vestnik MGSU*. 2018;13(5):643–650. (In Russian). <https://doi.org/10.22227/1997-0935.2018.5.643-650>.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

А. В. Кобелев,

ведущий инженер,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

С.В. Клементьев,

магистрант, техник 1 категории,
Казанский национальный исследовательский
технологический университет,
420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68,
Российская Федерация,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

А. С. Сироткин,

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

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.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 16.10.2021.
Одобрена после рецензирования 15.11.2021.
Принята к публикации 30.11.2021.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Alexei V. Kobelev,

Lead Engineer,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
alexei-ksu@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9070-739X>

Svyatoslav V. Klement'ev,

Master's Student,
Technician of the 1st category,
Kazan National Research Technological
University,
68, K. Marx St., Kazan, 420015,
Russian Federation,
slava_klementev3715@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-5459-974X>

Alexander S. Sirotkin,

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

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.*

Information about the article

The article was submitted 16.10.2021.
Approved after reviewing 15.11.2021.
Accepted for publication 30.11.2021.