

Количественный анализ бактерий родов *Bacillus*, *Agrobacterium* и *Microbacterium* в гранулах аэробного активного ила методом ПЦР в режиме реального времени

© Соколова^{1*+} Людмила Сергеевна, Груздев² Денис Сергеевич,
Хохлачев³ Николай Сергеевич, Сакаян¹ Даниил Игоревич,
Калёнов^{1*} Сергей Владимирович

¹ Кафедра биотехнологии. Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. Миусская пл., 9. г. Москва, 125047. Россия.
Тел.: +7 (967) 054-63-35. E-mail: sokolova.lyudmila.s@gmail.com

² Школа морских и атмосферных наук. Университет Стони-Брук (Stony Brook University).
Stony Brook. NY. 11794-5000. США. E-mail: denis.grouzdev@stonybrook.edu

³ ООО «Газпром ВНИИГАЗ». Развилка, Ленинский городской округ, Московская область, 142717.
Россия.

*Ведущий направление; +Поддерживающий переписку

Ключевые слова: аэробный гранулированный активный ил, гранулы активного ила, микробное сообщество, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, ген 16S рПНК, ПЦР в реальном времени.

Аннотация

В работе представлен молекулярно-генетический подход к количественному анализу бактерий родов *Bacillus*, *Agrobacterium* и *Microbacterium* в гранулах аэробного активного ила методом ПЦР в режиме реального времени (qPCR). Целью исследования являлись разработка и апробация родоспецифичных праймерно-зондовых систем для определения числа копий гена 16S рПНК в образцах гранулированного активного ила, отобранных на различных стадиях функционирования модельных систем. Для анализа использовали морфологически устойчивые гранулы, сохранявшие структурную целостность при воздействии стрессовых факторов; всего проанализировано 45 образцов, отобранных в шести временных точках. На основе нуклеотидных последовательностей базы данных GenBank были сконструированы родоспецифичные праймеры и TaqMan-зонды для целевых таксонов, а также универсальная праймерно-зондовая система для гена 16S рПНК. Специфичность разработанных систем подтверждена методом end-point ПЦР с использованием ДНК чистых культур и последующим электрофоретическим анализом продуктов амплификации. В реакциях qPCR достигнута высокая эффективность амплификации и линейность стандартных кривых ($R^2 \geq 0.99$), что подтверждает корректность количественного определения. Установлено, что общее содержание бактерий в исследуемых образцах варьирует в диапазоне 10^8 - 10^{10} копий гена 16S рПНК/мл. Показана значительная вариабельность структуры микробного сообщества на различных этапах функционирования системы: в отдельных образцах доминировали представители родов *Microbacterium* и *Agrobacterium*, тогда как бактерии рода *Bacillus* характеризовались низкой относительной численностью. Полученные результаты подтверждают применимость разработанных праймерно-зондовых систем для оперативного количественного мониторинга целевых таксономических групп микроорганизмов и оценки стабильности процессов биологической очистки сточных вод.

Выходные данные для цитирования русскоязычной печатной версии статьи:

Соколова Л.С., Груздев Д.С., Хохлачев Н.С., Сакаян Д.И., Калёнов С.В. Количественный анализ бактерий родов *Bacillus*, *Agrobacterium* и *Microbacterium* в гранулах аэробного активного ила методом ПЦР в режиме реального времени. *Бутлеровские сообщения*. 2026. Т.86. №4. С.107-114. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-86-4-107

Выходные данные для цитирования русскоязычной электронной версии статьи:

Соколова Л.С., Груздев Д.С., Хохлачев Н.С., Сакаян Д.И., Калёнов С.В. Количественный анализ бактерий родов *Bacillus*, *Agrobacterium* и *Microbacterium* в гранулах аэробного активного ила методом ПЦР в режиме реального времени. *Бутлеровские сообщения* С. 2026. Т.13. №2. Id.4. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-86-4-107/ROI-jbc-RC/26-13-2-4

The output for citing the English online version of the article:

Liudmila S. Sokolova, Denis S. Grouzdev, Nikolay S. Khokhlachev, Daniil I. Sakayan, Sergey V. Kalenov. Quantitative analysis of *Bacillus*, *Agrobacterium* and *Microbacterium* bacteria in aerobic granular sludge by real-time polymerase chain reaction. *Butlerov Communications C.* **2026**. Vol.13. No.2. Id.4. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-86-4-107/ROI-jbc-C/26-13-2-4

Литература

- [1] M. Pronk, M.K. de Kreuk, B. de Bruin, P. Kamminga, R. Kleerebezem, M.C.M. van Loosdrecht. Full scale performance of the aerobic granular sludge process for sewage treatment. *Water Research.* **2015**. Vol.84. P.207-217. DOI: 10.1016/j.watres.2015.07.011.
- [2] L. Zhang, B. Long, J. Wu, Y. Cheng, B. Zhang, Y. Zeng, M. Zeng. Evolution of microbial community during dry storage and recovery of aerobic granular sludge. *Heliyon.* **2019**. Vol.5. No.12. Article e02987. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e03023.
- [3] S.P. Wei, B.N. Quoc, M. Shapiro, P.H. Chang, J. Calhoun, M.K. Winkler. Application of aerobic kenaf granules for biological nutrient removal in a full-scale continuous flow activated sludge system. *Chemosphere.* **2021**. Vol.271. Article 129522. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129522.
- [4] S.P. Wei, H.D. Stensel, R.M. Ziels, S. Herrera, P.H. Lee, M.K. Winkler. Partitioning of nutrient removal contribution between granules and flocs in a hybrid granular activated sludge system. *Water Research.* **2021**. Vol.203. Article 117514. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117514.
- [5] Q. Tran, D.T. Pham, V. Phan. Using 16S rRNA gene as marker to detect unknown bacteria in microbial communities. *BMC Bioinformatics.* **2017**. Vol.18. Suppl.14. Article 499. DOI: 10.1186/s12859-017-1901-8
- [6] A. Kallastu, E. Malv, V. Aro, A. Meikas, M. Vendelin, A. Kattel, J. Kazantseva. Absolute quantification of viable bacteria abundances in food by next-generation sequencing: quantitative NGS of viable microbes. *Current Research in Food Science.* **2023**. Vol.6. Article 100443. DOI: 10.1016/j.crfs.2023.100443.
- [7] D.D. Kim, D. Park, H. Yoon, T. Yun, M.J. Song, S. Yoon. Quantification of nosZ genes and transcripts in activated sludge microbiomes with novel group-specific qPCR methods validated with metagenomic analyses. *Water Research.* **2020**. Vol.185. Article 116261. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116261.
- [8] C.L. Amorim, M. Alves, P.M. Castro, I. Henriques. Bacterial community dynamics within an aerobic granular sludge reactor treating wastewater loaded with pharmaceuticals. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **2018**. Vol.147. P.905-912. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.047.
- [9] A.J. Li, S.F. Yang, X.Y. Li, J.D. Gu. Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. *Water Research.* **2008**. Vol.42. No.13. P.3552-3560. DOI: 10.1016/j.watres.2008.05.026.
- [10] Булыгина Е.С., Колганова Т.В., Сухачева М.В., Пантелеева А.Н., Патутина Е.О., Кузнецов Б.Б. Выделение ДНК из различных пищевых продуктов с помощью модифицированного щелочного метода. *Биотехнология.* **2009**. №2. С.83-90. <https://www.elibrary.ru/ocqkfh> [E.S. Bulygina, T.V. Kolganova, M.V. Sukhacheva, A.N. Panteleeva, E.O. Patutina, B.B. Kuznetsov. Isolation of DNA from various food products using a modified alkaline method. *Biotechnology.* **2009**. No.2. P.83-90. <https://www.elibrary.ru/ocqkfh> (Russian)]
- [11] Соколова Л.С., Кузнецов А.Е., Калёнов С.В. Активность азотфиксирующего сообщества гранулированного аэробного активного ила и отдельных его компонентов. *Успехи в химии и химической технологии.* **2016**. Т.30. №9(178). С.28-29. <https://www.elibrary.ru/xebmdb> [L.S. Sokolova, A.E. Kuznetsov, S.V. Kalenov. Activity of the nitrogen-fixing community of aerobic granular sludge and its individual components. *Advances in Chemistry and Chemical Technology.* **2016**. Vol.30. No.9. P.28-29. <https://www.elibrary.ru/xebmdb> (Russian)]
- [12] Хохлачев Н.С., Калёнов С.В., Занина О.С., Кузнецов А.Е. Исследование грануляции активного ила при воздействии агентов стресса в объемно-доливном процессе аэробной биологической очистки. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* **2012**. Т.14. №5-3. С.852-855. <https://www.elibrary.ru/qaqvub> [N.S. Khokhlachev, S.V. Kalenov, O.S. Zanina, A.E. Kuznetsov. Study of activated sludge granulation under the influence of stress agents in sequencing batch aerobic biological treatment. *Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.* **2012**. Vol.14. No.5-3. P.852-855. <https://www.elibrary.ru/qaqvub> (Russian)]
- [13] Алексеева Л.С., Тюпа Д.В., Калёнов С.В., Панфилов В.И. Выделение и идентификация компонентов азотфиксирующего сообщества гранулированного аэробного активного ила, адаптированного к стрессу. *Успехи в химии и химической технологии.* **2014**. Т.28. №4(153). С.121-124. <https://www.elibrary.ru/stfvvz> [L.S. Alekseeva, D.V. Tyupa, S.V. Kalenov, V.I. Panfilov. Isolation and identification of components of the nitrogen-fixing community of aerobic granular sludge adapted to stress. *Advances in Chemistry and Chemical Technology.* **2014**. Vol.28. No.4. P.121-124. <https://www.elibrary.ru/stfvvz> (Russian)]
- [14] J. Kim, J. Lim, C. Lee. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnology Advances.* **2013**. Vol.31. No.8. P.1358-1373. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.010
- [15] Сакаян Д.И., Русякова М.А., Калёнов С.В., Хохлачев Н.С. Изучение очистки сточных вод процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов гранулированным аэробным илом. *Бутлеровские*

- КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИЙ РОДОВ *BACILLUS*, *AGROBACTERIUM* И ... _____ 107-114
сообщения С. 2024. Т.7. №1. Id.13. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/24-77-3-99/ROI-jbc-RC/24-7-1-13 [Daniil I. Sakayan, Marina A. Ruslyakova, Sergey V. Kalenov, Nikolay S. Khokhlachev. Study of wastewater treatment from the process of cultivating methane-oxidizing microorganisms using granular aerobic sludge. *Butlerov Communications C*. 2024. Vol.7. No.1. Id.13. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/24-77-3-99/ROI-jbc-C/24-7-1-13]
- [16] Liudmila S. Sokolova, Denis S. Grouzdev, Nikolay S. Khokhlachev, Daniil I. Sakayan, Sergey V. Kalenov. Quantitative analysis of *Bacillus*, *Agrobacterium* and *Microbacterium* bacteria in aerobic granular sludge by real-time polymerase chain reaction. *Butlerov Communications C*. 2026. Vol.13. No.2. Id.4. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-86-4-107/ROI-jbc-C/26-13-2-4
- [17] Соколова Л.С., Груздев Д.С., Хохлачев Н.С., Сакаян Д.И., Калёнов С.В. Количественный анализ бактерий родов *Bacillus*, *Agrobacterium* и *Microbacterium* в гранулах аэробного активного ила методом ПЦР в режиме реального времени. *Бутлеровские сообщения С*. 2026. Т.13. №2. Id.4. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-86-4-107/ROI-jbc-RC/26-13-2-4

The English version of the article has been published in the international edition of the journal

Butlerov Communications C
Advances in Biochemistry & Technologies

The Reference Object Identifier – ROI: jbc-C/26-13-2-4

The Digital Object Identifier – DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/26-86-4-107/ROI-jbc-C/26-12-2-4

**Quantitative analysis of *Bacillus*, *Agrobacterium*
and *Microbacterium* bacteria in aerobic granular
sludge by real-time polymerase chain reaction**

**Liudmila S. Sokolova,^{1*+} Denis S. Grouzdev,² Nikolay S. Khokhlachev,³
Daniil I. Sakayan,¹ Sergey V. Kalenov^{1*}**

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Industrial Ecology. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia. Miusskaya Sq., 9. Moscow, 125047. Russia.

Phone: +7 (967) 054-63-35. E-mail: sokolova.lyudmila.s@gmail.com

² School of Marine and Atmospheric Sciences. Stony Brook University.

Stony Brook, NY, 11794-5000. USA. E-mail: denis.grouzdev@stonybrook.edu

³ Gazprom VNIIGAZ LLC. Razvilka, Leninsky Urban District, Moscow Region, 142717. Russia.

*Supervising author; +Corresponding author

Keywords: aerobic granular sludge, activated sludge granules, microbial community, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Microbacterium*, 16S rRNA gene, real-time PCR.

Abstract

This study presents a molecular genetic approach for the quantitative analysis of bacteria belonging to the genera *Bacillus*, *Agrobacterium*, and *Microbacterium* in aerobic granular sludge using real-time PCR (qPCR). The aim of the study was to develop and validate genus-specific primer-probe systems for determining the copy number of the 16S rRNA gene in aerobic granular sludge samples collected at different stages of model system operation. Morphologically stable granules that retained structural integrity under stress conditions were selected for analysis; a total of 45 samples collected at six time points were examined. Based on nucleotide sequences from the GenBank database, genus-specific primers and TaqMan probes for the target taxa, as well as a universal primer-probe system for the 16S rRNA gene, were designed. The specificity of the developed systems was confirmed by end-point PCR using DNA from pure cultures followed by electrophoretic analysis of amplification products. In qPCR assays, high amplification efficiency and high linearity of standard curves ($R^2 \geq 0.99$) were achieved, which confirms the reliability of quantitative measurements. The total bacterial abundance ranged from 10^8 to 10^{10} copies of the 16S rRNA gene per mL. A significant variability in the microbial community structure was observed at different operational stages: in some samples, representatives of the genera *Microbacterium* and *Agrobacterium* predominated, whereas *Bacillus* was detected at relatively low abundance. The results confirm the applicability of the developed qPCR systems for rapid quantitative monitoring of target taxonomic groups and for assessing the stability of biological wastewater treatment processes.