

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Селективное культивирование бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью из донных осадков реки Оби в Западной Сибири

А.Л. Герасимчук¹✉, Д.А. Ивасенко^{1, 2}, А.А. Касимова¹, Ю.А. Франк^{1, 2}

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

² ООО «Дарвин», Томск, Россия

✉ gerasimchuk_ann@mail.ru

Аннотация. Бактерии играют ключевую роль в биогеохимических циклах природных и антропогенных экосистем. В речных экосистемах бактерии, как правило, интенсивно заселяют илистые отложения. Микроорганизмы имеют важное значение в преобразовании энергии и биотрансформации органических веществ. В связи с этим донные отложения, богатые органикой, могут являться источником выделения метаболически разнообразных микроорганизмов, в том числе перспективных для промышленных биотехнологий. Целью данного исследования было выделение и изучение чистых культур микроорганизмов – продуцентов промышленно значимых ферментов и деструкторов органических веществ из донных осадков р. Оби. В качестве субстратов для выделения накопительных и чистых культур использовали свиной жир и дизельное топливо для селективного культивирования бактерий с липолитической и углеводородокисляющей активностью. Всего получена 21 чистая культура. Филогенетическое положение бактериальных изолятов определено на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК. Выделенные на селективных средах штаммы оказались представителями родов *Pseudomonas* и *Aeromonas* класса *Gammaproteobacteria* и рода *Microvirgula* класса *Betaproteobacteria*. Изучена способность штаммов к росту на плотных питательных средах со свиным жиром, оливковым маслом и дизельным топливом. Липолитическая активность штаммов подтверждена культивированием на диагностической среде с трибутирином. Обнаруженное в ходе исследований филогенетическое и метаболическое разнообразие культивируемых непатогенных бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью указывает на биотехнологический потенциал выделенных нами изолятов. Наиболее перспективными оказались штаммы *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5K3, которые не только проявили липолитическую активность на диагностической среде с трибутирином в широком диапазоне температур, но и утилизировали такие сложные органические субстраты, как дизельное топливо, свиной жир и оливковое масло. Ключевые слова: микроорганизмы-деструкторы; филогенетическое разнообразие; продуценты; липолитическая активность; органические субстраты; биотехнологический потенциал.

Для цитирования: Герасимчук А.Л., Ивасенко Д.А., Касимова А.А., Франк Ю.А. Селективное культивирование бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью из донных осадков реки Оби в Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):449-457. DOI 10.18699/VJGB-22-55

Selective cultivation of bacterial strains with lipolytic and hydrocarbon-oxidizing activity from bottom sediments of the Ob River, Western Siberia

A.L. Gerasimchuk¹✉, D.A. Ivashenko^{1, 2}, A.A. Kasymova¹, Yu.A. Frank^{1, 2}

¹ Tomsk State University, Tomsk, Russia

² Darwin LLC, Tomsk, Russia

✉ gerasimchuk_ann@mail.ru

Abstract. Bacteria play a key role in biogeochemical cycles in natural and anthropogenic ecosystems. In river ecosystems, bacteria intensively colonize silt sediments. Microorganisms are essential for energy conversion, biogeochemical nutrient cycling, pollutant degradation, and biotransformation of organic matter; therefore, bottom sediments can be a source of metabolically diverse microorganisms, including those with promise for industrial biotechnologies. The aim of this work was to isolate and study pure cultures of microorganisms – producers of industrially important enzymes and decomposers of organic matter – from bottom sediments of the Ob River. Pork fat and diesel fuel were used as substrates to obtain enrichment and pure cultures for selective cultivation of bacteria with lipolytic and hydrocarbon-oxidizing activity. A total of 21 pure cultures were isolated. The phylogenetic position of the obtained bacterial isolates was determined based on the analysis of 16S rRNA gene sequences. The strains isolated on selective media belonged to representatives of the genera *Pseudomonas* and *Aeromonas* (*Gammaproteobacteria*), and the ge-

nus *Microvirgula* (*Betaproteobacteria*). The ability of strains to grow on culture media containing pork fat, olive oil and diesel fuel was analyzed. The lipolytic activity of the isolates was evidenced by cultivation on a diagnostic medium containing 1 % tributyrin. The phylogenetic and metabolic diversity of the cultivated non-pathogenic bacterial strains with lipolytic and oil-oxidizing activity revealed in the study indicates the biotechnological potential of the isolates. The most promising strains were *M. aerodenitrificans* sp. LM1 and *P. lini* sp. KG55K3, which not only exhibited lipolytic activity on the diagnostic medium with tributyrin in a wide temperature range, but also utilized diesel fuel, pork fat and olive oil.

Key words: microorganisms-decomposers; phylogenetic diversity; producers; lipolytic activity; organic substrates; biotechnological potential.

For citation: Gerasimchuk A.L., Ivashenko D.A., Kasymova A.A., Frank Yu.A. Selective cultivation of bacterial strains with lipolytic and hydrocarbon-oxidizing activity from bottom sediments of the Ob River, Western Siberia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(5):449-457. DOI 10.18699/VJGB-22-55

Введение

Бактерии играют важную роль в биогеохимических циклах природных и антропогенных экосистем. В речных экосистемах бактерии, как правило, интенсивно заселяют илистые отложения (Araña et al., 2003). Речная микробная сеть представляет собой направленную линейно-разветвленную структуру, сформированную речным потоком. Из толщи воды микроорганизмы переносятся в нижележащие отложения и обогащают их (Brown et al., 2011; De Oliveira, Margis, 2015; Mansour et al., 2018; Wang L. et al., 2018). Разветвленная структура речной экосистемы собирает бактерий с окружающих земель, включая городские и промышленные районы, очистные сооружения сточных вод и сельскохозяйственные угодья, которые тоже поставляют растворимые компоненты (Mansour et al., 2018), такие как органические вещества, питательные вещества или токсичные соединения, в том числе металлы, которые в совокупности определяют активность и численность гетеротрофных бактерий в донных отложениях (Fischer et al., 2002).

Поскольку микроорганизмы имеют большое значение в преобразовании энергии, биогеохимических цикла питательных веществ, деградации загрязнителей и биотрансформации органических веществ, бактерии могут использоваться в качестве биоиндикаторов водных экосистем (Wei et al., 2008; Chen et al., 2018). Например, для представителей *Nitrospirae*, *Betaproteobacteriales*, *Chloroflexi* и *Sphingobacteriales* отмечено увеличение численности пропорционально увеличению количества азота в воде, высокие концентрации которого являются следствием антропогенной нагрузки. Рост доли *Nitrospirae*, *Sphingobacteriales* (*Bacteroidetes*) и *Spirochaetes* и общее снижение численности *Actinobacteria* отмечены в сообществах отложений речных экосистем вблизи очистных сооружений и указывают на влияние сточных вод (Sagova-Mareckova et al., 2021).

Таким образом, характеристика состава бактериальных сообществ в речных отложениях и толще воды, а также соответствующая реакция микробных сообществ на изменение окружающей среды предоставляют ценную информацию, которая помогает исследовать микробные взаимосвязи и оценить экологический риск (Psenner et al., 2008; Wang J. et al., 2016). Кроме того, донные отложения могут быть источником метаболически разнообразных микроорганизмов, в том числе перспективных для промышленных биотехнологий.

Работы, посвященные изучению видового состава и функций микробных сообществ речных экосистем, немногочисленны по сравнению, например, с аналогичными публикациями по экосистемам соленых озер или морей. Микробиологические исследования рек, протекающих по территории России, в большинстве касаются лишь их санитарно-эпидемиологического состояния (Шорникова, 2008). Так, в статье А.И. Копылова и Д.Б. Косолапова (2011) рассмотрено распространение бактериопланктона в нижнем течении р. Оби. Приведены измерения удельной скорости роста, количества и распределения биомассы на разных участках реки (Копылов, Косолапов, 2011). В других работах, связанных с микробиологическим мониторингом Оби, исследованы численность и распространение некоторых метаболических групп микроорганизмов (Savichev et al., 2015), включая устойчивые к антибиотикам и фенолу (Shornikova, Arslanova, 2020). Однако видовое разнообразие и физиологические особенности аборигенной микрофлоры не изучались.

Река Обь, протекающая по территории Западной Сибири, занимает одно из первых мест по протяженности, водоносности и площади водосборного бассейна среди рек Евразии. Из водных бассейнов Сибирского региона для Оби характерны наибольшая антропогенная нагрузка, включая демографическое, сельскохозяйственное и производственное воздействие, и критические показатели качества воды по содержанию некоторых металлов и нефтепродуктов (Koronkevich et al., 2019). В связи с вышеописанным интерес представляет изучение микробных сообществ водной толщи и донных осадков, в том числе с целью поиска биотехнологически перспективных микроорганизмов-деструкторов органического вещества.

Целью данного исследования было выделение чистых культур микроорганизмов-деструкторов из донных осадков реки Оби и изучение их способности утилизировать разные органические субстраты, а также определение липолитической активности при различных условиях культивирования.

Материалы и методы

Пробы донных осадков для исследования были взяты в июле 2020 г. в среднем течении Оби в районе следующих населенных пунктов: Молчаново (57.601429° с. ш., 83.7824851° в. д.), Колпашево (58.30456° с. ш., 82.90774° в. д.), Кargasок (59.06722° с. ш., 80.84963° в. д.). Осадки, представляющие собой песчаные отложения,

отобраны с глубины 1.5 м в стерильные пластиковые пробирки и хранились при +4 °С. Значения рН воды в местах отбора проб были смещены в слабощелочную сторону (от 7.5 до 8.6) (Frank et al., 2021).

Для выделения штаммов-деструкторов органического вещества и продуцентов биотехнологически значимых ферментов применяли подход селективного культивирования с использованием питательных сред для липолитических и нефтеоокисляющих микроорганизмов. Первоначальные накопительные культуры из каждого сайта отбора проб получали на селективной минеральной питательной среде со свиным жиром (1 % от объема среды) в качестве единственного источника углерода (Gerasimchuk et al., 2020) и на среде для нефтеоокисляющих бактерий с добавлением 1 % дизельного топлива, как описано ранее (Франк и др., 2020). Образцы пробы из каждого сайта высевали в количестве 0.5 мл в 50 мл жидкой питательной среды (рН 7.5) со свиным жиром в 120-мл стеклянных флаконах и культивировали при +28 °С в присутствии кислорода. Первый посев для выделения нефтеоокисляющих микроорганизмов проведен методом предельных разведений в 7 мл жидкой среды в стеклянных 15-мл пенициллиновых флаконах. Затем полученные накопительные культуры были посеяны на агаризованные среды с тем же составом для выделения отдельных колоний. Выросшие на чашках с накопительными культурами отдельные колонии пересевались на агаризованный ГРМ-бульон (панкреатический гидролизат рыбной муки – 8 г/л, пептон ферментативный – 8 г/л, хлорид натрия – 4 г/л, рН 7.0–7.4). Дальнейшее культивирование выделенных аэробных штаммов проводили на чашках Петри с агаризованным ГРМ-бульоном при температуре +28 °С.

Морфологию накопительных и чистых культур определяли методом фазово-контрастного микроскопирования (Биомед 6, Россия) с помощью иммерсионного объектива $\times 100$.

Для определения способности штаммов к окислению нефтепродуктов использовали жидкую питательную среду (г/л: KH_2PO_4 – 1.5, K_2HPO_4 – 0.75, NH_4Cl – 1.0, NaCl – 2.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, дрожжевой экстракт – 0.5) с добавлением 1 % дизельного топлива в качестве органического субстрата. Посевы проводили в 15-мл пенициллиновых флаконах, заполненных средой на одну треть (5 мл). Инкубирование происходило при +28 °С. Рост оценивали по помутнению питательной среды и с помощью микроскопирования. Дополнительно для подтверждения углеводородоокисляющей активности отдельных штаммов были сделаны посевы на плотную минеральную среду без дрожжевого экстракта (Gerasimchuk et al., 2020) в чашках Петри с добавлением 0.1 мл дизельного топлива и распределением вместе с инокулятом по поверхности питательной среды.

Способность утилизировать животный и растительный жир изучали с использованием минеральной питательной среды (Gerasimchuk et al., 2020) с добавлением 1 % свиного жира или 1 % оливкового масла. Культивирование проводили следующим образом: в чашки Петри с 25 мл агаризованной минеральной среды добавляли 0.25 мл расплавленного стерильного свиного жира или оливкового масла, в каплю с жиром помещали инокулят и распреде-

ляли по поверхности агаризованной среды с помощью шпателя или бактериальной петли.

Для определения липолитической активности использовали диагностическую среду (трибутириновый агар), содержащую 0.5 % (w/v) пептона, 0.3 % (w/v) дрожжевого экстракта и 1.5 % бактериологического агара (рН 7.0) с добавлением 1 % трибутирина (Ramnath et al., 2017). Трибутирин – это сложный эфир, состоящий из масляной кислоты и глицерина. Трибутириновый агар классически применяется для демонстрации липолитической активности у бактерий (Mourey, Kilbertus, 1976). Культуры инкубировали при +28, +25 и +4 °С. После 24 или 48 ч инкубации наблюдали зоны гидролиза (прозрачные ореолы) вокруг колоний.

Филогенетическое положение полученных бактериальных штаммов устанавливали с помощью секвенирования и анализа последовательностей генов 16S рРНК. Геномную ДНК из культур выделяли с набором Biolabmix (DU-50) в соответствии с инструкцией производителя (<http://biolabmix.ru/>). Для амплификации бактериальных генов 16S рРНК, которые являются универсальными филогенетическими маркерами, использовали праймеры 27F (DeLong, 1992) и 1492R (Weisburg et al., 1991). ПЦР-смесь объемом 50 мкл содержала 1х ПЦР-буфер (Biolabmix), 2.5 mM MgCl_2 (Biolabmix), 0.2 mM смеси dNTP (Biolabmix), по 10 пМ каждого праймера (ООО «Синтол»), 0.7 ед. а. термостабильной HS-Taq-полимеразы (Biolabmix), 3 мкл матрицы ДНК (в концентрации, превышающей 50 нг), до конечного объема доводили стерильной деионизованной водой.

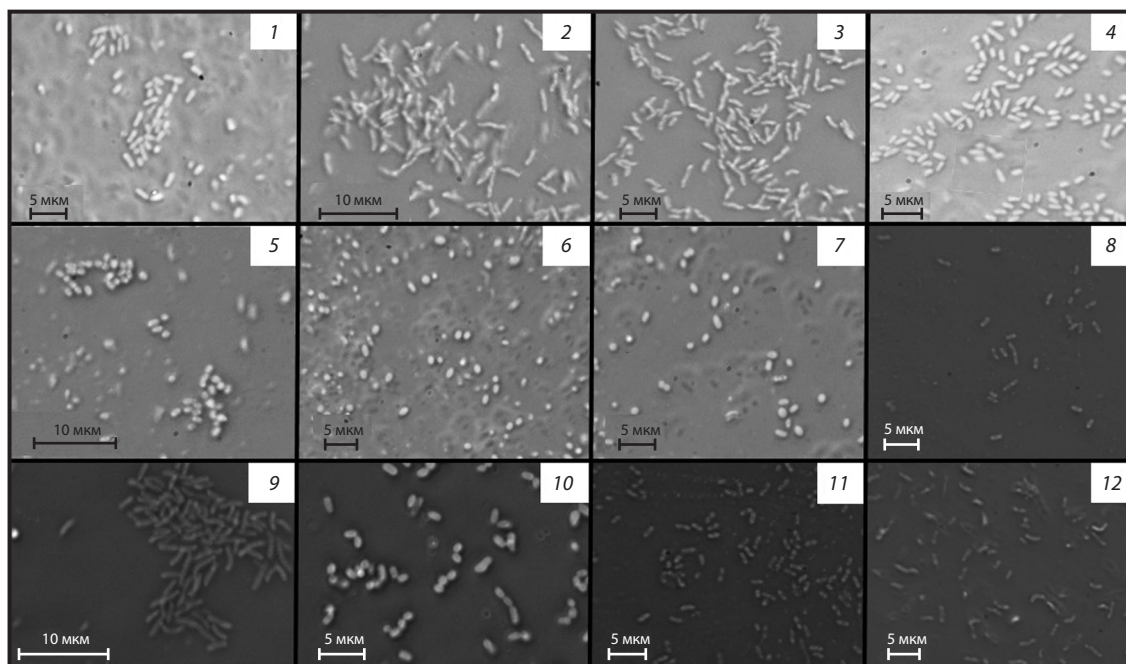
Амплификацию генов 16S рРНК проводили по программе, описанной нами ранее (Герасимчук и др., 2010). Секвенирование выделенных последовательностей ДНК осуществляли с помощью генетического анализатора «НАНОФОР-05» на базе НПФ «Синтол» (Москва). Для получения близкой к полной последовательности гена 16S рРНК выполняли секвенирование с использованием прямого праймера 27F (DeLong, 1992), обратного праймера 1492R (Weisburg et al., 1991) и праймера на середину гена VacV3F (Muyzer et al., 1993).

При анализе нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК применяли редактор последовательностей BIOEDIT (<http://www.jwbrown.mbio.ncsu.edu>), программу BLAST в базе данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и классификатор баз данных SILVA (<http://www.arb-silva/aligner/de>). Для исключения химер последовательности проверяли с использованием веб-инструмента DECIPHER (<http://www2.decipher.codes/FindChimeras.html>). Секвенированные нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК депонированы в базу данных GenBank под номерами OM212652, OM212653, OM212656–OM212659, OM212664–OM212671.

Результаты и обсуждение

Получение накопительных и чистых культур

С целью выделения бактериальных штаммов-продуцентов и деструкторов органических веществ использовали образцы донных осадков среднего течения р. Оби и селективные питательные среды для липофильных и нефте-



Микрофотографии чистых культур: 1 – штамм LM7; 2 – штамм LM6; 3 – штамм LM8; 4 – штамм KGS3Ps1; 5 – штамм LK01; 6 – штамм LM3; 7 – штамм LM4; 8 – штамм KGS5k2; 9 – штамм KGS3Ps2; 10 – штамм KGS5k3; 11 – KGS5k1; 12 – штамм LK03.

Фазово-контрастная микроскопия, увеличение $\times 1000$.

окисляющих микроорганизмов. Из накопительных культур, которые характеризовались высокой численностью и морфологическим разнообразием клеточных форм, были выделены морфологически однородные чистые культуры (см. рисунок). Для дальнейших исследований отобраны штаммы, показавшие стабильный рост на ГРМ-агаре. Всего получено 9 чистых культур из отдельно лежащих колоний, выделенных на среде для нефтеокисляющих бактерий, и 12 чистых культур – на среде для липолитиков.

Филогенетический анализ

Анализ фрагментов генов 16S рРНК показал принадлежность чистых культур к Proteobacteria (классы *Gamma-proteobacteria* и *Betaproteobacteria*) (см. таблицу). Протеобактерии часто являются основными компонентами бактериальных сообществ воды и донных отложений, и доля этого типа в отложениях, как правило, выше, чем в воде (Dai et al., 2016; Zhang et al., 2019).

Большинство проанализированных штаммов оказались представителями *Pseudomonas* и *Aeromonas*, относящихся к классу *Gamma-proteobacteria*. Все полученные и проанализированные фрагменты последовательностей ДНК длиной 677–1445 п. о. демонстрировали высокое сходство (99.48–100 %) с последовательностями типовых штаммов микроорганизмов из базы данных GenBank NCBI.

Некоторые штаммы были родственны условно патогенным микроорганизмам, относящимся к группе риска II в соответствии с классификацией ВОЗ (<https://bacdiv.dsmz.de/>). К обнаруженным патогенам относились все штаммы аэромонад, родственные *A. veronii* (штаммы LKar2 и LKar3), *A. hydrophila* (штаммы LM7 и KLP3), а также *E. coli* (штамм LK01) и *P. putida* (штаммы LM3 и LM4).

Основная часть патогенных штаммов получена из липофильных накопительных культур. Подобный результат, а именно выделение условно патогенных микроорганизмов (энтеробактерий, родственных *Serratia marcescens*, *Leclercia adecarboxylata*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. huaxiensis*, *Enterobacter cloacae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Morganella morganii*) на минеральной среде со свиным жиром, был получен нами ранее при выделении чистых культур липофильных микроорганизмов из очистных сооружений и сточных вод пищевой промышленности (Gerasimchuk et al., 2020). Большое количество патогенов среди липофильных микроорганизмов можно объяснить тем, что, помимо участия в таких метаболических процессах, как гидролиз и модификация липидов, бактериальные липазы могут служить факторами вирулентности у некоторых филогенетических групп (Bender, Flieger, 2010; Kovacic et al., 2019).

Остальные бактерии были родственны микроорганизмам, не являющимся патогенами человека. Большинство штаммов отнесены к роду *Pseudomonas*. Род *Pseudomonas* включает в себя крупную группу грамотрицательных бактерий, которые демонстрируют значительное метаболическое разнообразие, что позволяет им использовать широкий спектр органических соединений и занимать важное экологическое положение в цикле углерода. Псевдомонады распространены повсеместно, встречаются в самых разных экосистемах, среди них много патогенных видов человека, животных и растений (Peix et al., 2009), а также видов-мутуалистов, наиболее яркими примерами которых являются штаммы биоконтроля, защищающие растения от патогенов (Ramette et al., 2011; De Vrieze et al., 2015). Установлено, что виды *Pseudomonas* могут разлагать различные липиды и липид-содержащие соедине-

Филогенетическое положение бактерий, выделенных из донных осадков

Штамм	Номер доступа GenBank	Длина последовательности	Сходство, %	Ближайший валидный родственный организм (GenBank)	Источник выделения	Филогенетическая принадлежность
Чистые культуры, выделенные из липофильных накопительных культур на минеральной среде со свиным жиром						
LM1	OM212667	1364	100	<i>Microvirgula aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Nies
LM2	–	613	100			
LM3	–	681	100	<i>Pseudomonas putida</i> (KX083533)	Нет информации	Gam, Pseu
LM4	–	679	100			
LM6	–	617	100	<i>M. aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Neis
LM7	OM212659	680	100	<i>Aeromonas hydrophila</i> (MG428802)	Слизистая оболочка кишечника рыб	Gam, Aero
LM8	OM212666	1407	100	<i>M. aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Neis
LKar2	OM212656	686	100	<i>A. veronii</i> (NR_118947)	Мокрота человека	Gam, Aero
LKar3	OM212658	679	100			
LKol1	–	470	100	<i>Escherichia coli</i> (AP022215)	Сточные воды очистных сооружений	Gam, Enter
LKol2	OM212669	1364	100	<i>M. aerodenitrificans</i> (MT367755)	Кишечник диких животных	Beta, Neis
LKol3	–	621	100			
Чистые культуры, выделенные из накопительных культур на среде с нефтепродуктами						
KGS5k1	OM212664	1413	99.86	<i>P. brassicacearum</i> (KT695825)	Почва США	Gam, Pseu
KGS5k2	–	631	100	<i>P. lini</i> (NR_029042)	Ризосферная почва	
KGS5k3	OM212670	1345	100			
KGS5k8	OM212671	1379	100			
KGS3Ps1	OM212652	1445	100	<i>P. baetica</i> (KU921565)	Осадки озера в Индии	
KGS3Ps2	OM212653	1413	99.83	<i>P. protegens</i> (LS999205)	Почва	
KLP3	OM212657	677	100	<i>A. hydrophila</i> (MT572504)	Загрязненная почва	
Mol4A	OM212665	1108	100	<i>P. veronii</i> (MH669341)	Сосна	
Mol4K12	OM212668	1260	99.92	<i>P. fildesensis</i> (MK859934)/ <i>P. extremaustralis</i> (KX186942)	Антарктическая почва/ пересыхающий водоем	

Примечание. Beta, Nies – *Betaproteobacteria*, *Neisseriales*; Gam, Pseu – *Gammaproteobacteria*, *Pseudomonadales*; Gam, Enter – *Gammaproteobacteria*, *Enterobacteriales*; Gam, Aero – *Gammaproteobacteria*, *Aeromonadales*.

ния (Pabai et al., 1996; Lee, Rhee, 2008; Yang J. et al., 2009; Fendri et al., 2010), а также углеводороды нефти (Barathi, Vasudevan, 2001). Представители рода *Pseudomonas* часто присутствуют в речных экосистемах, что подтверждается как молекулярными исследованиями (Cyriaque et al., 2020), так и культуральными методами (Pellett et al., 1983; Pirnay et al., 2005), включая выделение новых псевдомонад из нефтезагрязненных речных осадков в Китае (Li et al., 2020), загрязненных диоксинами донных отложений в Техасе (Iyer et al., 2017), донных отложений р. Ганг в Индии (Sudan et al., 2018) и т. д.

На основе анализа гена 16S рПНК штамм Mol4a показал 100 % сходство с последовательностями из разнообразных местообитаний (активный ил, загрязненные углеводородами подземные воды, загрязненные осадки и др.), обозначенных как *P. veronii*, и 99.82 % – с типовым штаммом

P. veronii, выделенным из минеральных вод (Elomari et al., 1996). Штамм KGS3Ps2 оказался близкородственен выделенному из почвы и стимулирующему рост растений *P. protegens* (LS999205), который вместе с представителями *P. veronii* попадает в группу флуоресцирующих псевдомонад (*Pseudomonas fluorescens* group). К данной таксономической группе относится и *P. baetica*, ген 16S рПНК которого на 100 % совпадает с последовательностью штамма KGS3Ps1. Это недавно описанная бактерия, типовой штамм которой является патогеном для камбалы (López et al., 2012).

Штамм KGS5k1 показал наибольшее сходство, 99.86 %, с неописанным штаммом из почвы, обозначенным как *P. brassicacearum* (KT695825), и 99.5 % – с валидным штаммом *P. chlororaphis* (CP027720), выделенным из речной глины и принадлежащим таксономической группе

Pseudomonas chlororaphis group. Штамм Mol4k12 на основе сравнения близкой к полной последовательности гена 16S рРНК продемонстрировал сходство 99.92 % с типовыми штаммами разных видов, а именно *P. fildesensis* (MK859934) и *P. extremaustralis* (KX186942), близкородственных представителям группы флуоресцирующих псевдомонад. Штаммы KGS5k2, KGS5k3 и KGS5k8 имели 100 % гомологию с геном 16S рРНК *P. lini* (NR_029042), выделенной из ризосферной почвы (Delorme et al., 2002).

Род *Pseudomonas* – один из самых сложных в таксономическом отношении (Parte, 2014). Хотя ген 16S рРНК является универсальным филогенетическим маркером в существующей системе классификации бактерий, для дифференцирования близкородственных видов бактерий недостаточно анализа только этого гена. Согласно (Mulet et al., 2012), мультилокусный анализ последовательностей (MLSA), основанный на анализе четырех генов домашнего хозяйства (16S рРНК, *gyrB*, *rpoB* и *rpoD*), позволяет прояснить определение видов и облегчает идентификацию штаммов у *Pseudomonas*. Таким образом, для более точного определения филогенетического положения выделенных штаммов *Pseudomonas* необходимо провести анализ дополнительных филогенетических маркеров (например, генов *gyrB* и *rpoD*).

По результатам анализа последовательностей генов 16S рРНК, штаммы LM1, LM2, LM6, LM8, LK0l2 и LK0l3 оказались идентичны и отнесены к роду *Microvirgula*, представителю класса *Betaproteobacteria*. Надо отметить, что идентичная последовательность длиной 768 п. о. (номер доступа GenBank MT476921), принадлежащая *Microvirgula*, выделена нами ранее из отходов пищевой промышленности (Gerasimchuk et al., 2020). Представители *Microvirgula* хорошо растут в аэробных и анаэробных условиях и имеют нетипичный дыхательный тип метаболизма, используют кислород и оксиды азота в качестве конечных акцепторов электрона (Patureau et al., 1998). Род *Microvirgula* впервые описан в работе (Patureau et al., 1998) и охарактеризован как новая денитрифицирующая бактерия *M. aerodenitrificans*, выделенная из активного ила. В настоящее время в род *Microvirgula* входят два вида. Второй представитель, *M. curvata*, был выделен из загрязненных углеводородами почв (Subhash et al., 2016) и включает один штамм. Сравнение секвенированных фрагментов генов 16S рРНК штаммов LM1, LM2, LM6, LM8, LK0l2 и LK0l3 показало, что их последовательности идентичны и имеют 100 % гомологию со штаммом *M. aerodenitrificans* (MT367755) из кишечника диких животных и сходство 99.79 и 99.86 % с типовыми штаммами *M. aerodenitrificans* Sgly2 из активного ила (Patureau et al., 1998) и *M. aerodenitrificans* NBRC 15328 (AB680837) из пресной воды (Cleenwerck et al., 2003) соответственно.

Для многих представителей *Pseudomonas* хорошо изучена липолитическая активность на разных субстратах, а также исследованы и клонированы гены липолитических ферментов (Reetz, Jaeger, 1998; Bofill et al., 2010; Yang W. et al., 2015; Cai et al., 2016) и установлена нефтеокисляющая активность (Muriel-Millán et al., 2019). В то же время для видов *Microvirgula* показана липолитическая активность только на диагностических средах, подробное изучение липолитических свойств не проводилось. Однако анализ

доступных в базе данных NCBI геномов *Microvirgula* позволил обнаружить гены липолитических ферментов. К настоящему моменту опубликованы геномы двух штаммов *M. aerodenitrificans* (JHVK01000000 и CP028519), выделенных из разных биореакторов, и одного штамма *Microvirgula* (NZ_QLTJ01000000) с неустановленным филогенетическим положением, который является бактериальным эндофитом риса. Поиск в перечисленных геномах генов липолитических ферментов выявил присутствие липаз и эстераз. Кроме того, информация о последовательностях *Microvirgula* в базе данных GenBank (номера доступа KM357844, LT631813), выделенных из нефтезагрязненных местообитаний, косвенно свидетельствует о способности к окислению нефти.

Определение липолитической активности штаммов с помощью диагностической среды

Для изучения липолитической активности были отобраны непатогенные штаммы разной филогенетической принадлежности, имеющие отличия в росте или морфологии, для которых получены близкие к полным последовательности 16S рРНК (см. таблицу). Все штаммы росли и образовывали зоны гидролиза на трибутириновом агаре через 24–48 ч культивирования при +28 °С, кроме штамма *P. veronii* sp. Mol4A, который рос без образования зон гидролиза, что связано, скорее всего, с отсутствием липолитической активности и использованием в качестве ростового субстрата пептона, входящего в состав питательной среды. Штаммы *P. protegens* sp. KGS3Ps2, *P. brassicacearum* sp. KGS5k1 и *M. aerodenitrificans* sp. LM1 показали более выраженную липолитическую активность в виде полного гидролиза по сравнению с остальными штаммами, у которых зоны гидролиза составляли около 3 мм. Также штаммы *P. protegens* sp. KGS3Ps2 и *P. brassicacearum* sp. KGS5k1 демонстрировали рост и липолитическую активность при +4 °С.

Способность штаммов утилизировать органические субстраты

При росте на ГРМ-агаре штаммы, относящиеся к *Pseudomonas*, в отличие от штаммов *Microvirgula*, проявляли психротолерантные свойства и демонстрировали рост при +4 °С. Среди отобранных для исследования штаммов не обнаружено термотолерантных представителей, которые показали бы стабильный рост при температуре +50 °С. На ГРМ и трибутириновом агаре не было найдено значимых отличий в росте биомассы при +25 и +28 °С.

На плотных средах с 1 % свиным жиром и 1 % оливковым маслом выявлен рост штаммов *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5k3 при температурах +25 и +28 °С. В посевах на средах со свиным жиром и оливковым маслом при +4 °С деструкции животного и растительного жира не происходило или она была затруднена при пониженных температурах. У *P. protegens* sp. KGS3Ps2 и *P. brassicacearum* sp. KGS5k1 рост на данных средах отсутствовал даже при +28 °С, несмотря на их более выраженную липолитическую активность на диагностической среде.

Скрининг штаммов, проведенный на селективной среде с добавлением дизельного топлива в концентрации 1 %,

показал способность к росту в присутствии углеводородсодержащего субстрата пяти штаммов из десяти, а именно: штаммов *P. protegens* sp. KGS3Ps2, *M. aerodenitrificans* sp. LM1, *P. fildesensis/extremaustralis* sp. Mol4K12, *P. lini* spp. KGS5k3 и KGS5k8. Для подтверждения способности к окислению нефтепродуктов для штаммов *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5k3 как наиболее перспективных штаммов-деструкторов проведены дополнительные посеы на плотной минеральной среде с добавлением дизельного топлива в качестве единственного источника углерода. Рост штаммов наблюдался менее чем через 2 суток. Следует отметить, что штамм *P. lini* sp. KGS5k3 образовывал большее количество биомассы.

Заключение

Обнаруженное в ходе исследований филогенетическое и метаболическое разнообразие культивируемых непатогенных бактериальных штаммов с липолитической и нефтеокисляющей активностью указывает на биотехнологический потенциал полученных нами изолятов. Наиболее перспективными являются штаммы *M. aerodenitrificans* sp. LM1 и *P. lini* sp. KGS5k3, которые не только проявили липолитическую активность на диагностической среде в широком диапазоне температур, но и утилизировали такие сложные органические субстраты, как дизельное топливо, свиной жир и оливковое масло. Для представителей *M. aerodenitrificans* впервые показана способность к окислению нефтепродуктов и росту на конкретных жиродержащих субстратах. Ранее сообщалось лишь о наличии у них липолитической активности на диагностических средах (Patureau et al., 1998). Описанный в литературе биотехнологический потенциал представителей *M. aerodenitrificans* заключается в использовании их способности к аэробной и анаэробной денитрификации в технологиях очистки отходов с помощью биореакторов (Patureau et al., 2001; Bouchez et al., 2009; Anderson et al., 2020). Однако выделение флотипов 16S рНК и чистых культур, родственных *Microvirgula*, из нефтезагрязненных природных образцов (Subhash et al., 2016; Sarkar et al., 2017) и сточных вод (Cea et al., 2015; Gerasimchuk et al., 2020), а также полученные нами результаты по росту на средах с добавлением жиров и нефтепродуктов свидетельствуют о более широком биотехнологическом потенциале данной группы микроорганизмов.

Литературные сведения об изучении липолитической активности у *P. lini* не обнаружены. Таким образом, нами впервые показана для представителей данного вида липолитическая активность на диагностической среде, а также способность утилизировать нефтепродукты и животный жир.

Список литературы / References

Герасимчук А.Л., Шаталов А.А., Новиков А.Д., Буторова О.П., Пименов Н.В., Леин А.Ю., Яненко А.С., Карначук О.В. Поиск сульфатредуцирующих бактерий в пробах мата из гидротермального поля Лост Сити методом молекулярного клонирования. *Микробиология*. 2010;79(1):103-113.
[Gerasimchuk A.L., Shatalov A.A., Novikov A.L., Butorova O.P., Pimenov N.V., Lein A.Y., Yanenko A.S., Karnachuk O.V. The search

for sulfate-reducing bacteria in mat samples from the lost city hydrothermal field by molecular cloning. *Microbiology*. 2010;79(1):96-105. DOI 10.1134/S0026261710010133.]

Копылов А.И., Косолапов Д.Б. Структура планктонного микробного сообщества нижней Оби (район г. Салехарда). *Сиб. экол. журн.* 2011;18(1):3-11.

[Kopylov A.I., Kosolapov D.B. The structure of the planktic microbial community in the lower reaches of the Ob river near Salekhard. *Contemp. Probl. Ecol.* 2011;4(1):1-7. DOI 10.1134/S1995425511010012.]

Франк Ю.А., Никитчук К.Л., Сапега А.А., Лукьянова Е.А., Ивасенко Д.А., Косов А.В., Герасимчук А.Л., Евсеева Н.С. Повышение эффективности ремедиации нефтезагрязненных почв в природно-климатических условиях севера Томской области и сопредельных регионов с применением аборигенных микроорганизмов. *Изв. Том. политехн. ун-та. Инжиниринг георесурсов*. 2020;331(9):130-139. DOI 10.18799/24131830/2020/9/2815.

[Frank Y.A., Nikitchuk K.L., Sapega A.A., Lukjanova E.A., Ivasko D.A., Kosov A.V., Gerasimchuk A.L., Evseeva N.S. Improvement of the efficiency of oil-contaminated soils remediation in the natural conditions of the north Tomsk region and the nearby regions by indigenous microorganisms application. *Izvestiya Tomskogo Polytechnicheskogo Universita. Inzhiniring Georesursov = Bulletin of the Tomsk Polytechnic University. Geo Assets Engineering*. 2020; 331(9):130-139. DOI 10.18799/24131830/2020/9/2815. (in Russian)]

Шорникова Е.А. Микробиологическая индикация состояния экосистем водотоков на нефтяных месторождениях Среднего Приобья. *Сиб. экол. журн.* 2008;15(3):417-425.

[Shornikova E.A. Microbiological indication of river ecosystem conditions at the oil fields in the Middle Ob' area. *Contemp. Probl. Ecol.* 2008;1(3):328-334. DOI 10.1134/S1995425508030077.]

Anderson E.L., Jang J., Venterea R.T., Feyereisen G.W., Ishii S. Isolation and characterization of denitrifiers from woodchip bioreactors for bioaugmentation application. *J. Appl. Microbiol.* 2020;129(3): 590-600. DOI 10.1111/jam.14655.

Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N., Nasu M. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2003;43(1):111-119. DOI 10.1111/j.15746941.2003.tb01050.x.

Barathi S., Vasudevan N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from petroleum contaminated soil. *Environ. Int.* 2001;26:413-416. DOI 10.1016/S0160-4120(01)00021-6.

Bender J., Fliieger A. Lipases as pathogenicity factors of bacterial pathogens of humans. In: Timmis K.N. (Ed.) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2010:3241-3258. DOI 10.1007/978-3-540-77587-4_246.

Bofill C., Prim N., Mormeneo M., Manresa A., Pastor F.I.J., Diaz P. Differential behaviour of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA. *Biochimie*. 2010;92(3):307-316. DOI 10.1016/j.biochi.2009.11.005.

Bouchez T., Patureau D., Delgenès J.P., Moletta R. Successful bacterial incorporation into activated sludge flocs using alginate. *Bioresour. Technol.* 2009;100(2):1031-1032. DOI 10.1016/j.biortech.2008.07.028.

Brown B.L., Swan C.M., Auerbach D., Campbell Grant E.H., Hitt N.P., Maloney K.O., Patrick C. Metacommunity theory as a multispecies, multiscale framework for studying the influence of river network structure on riverine communities and ecosystems. *J. North Am. Benthol. Soc.* 2011;30(1):310-327. DOI 10.1899/10-129.1.

Cai X., Chen S., Yang H., Wang W., Lin L., Shen Y., Wei D. Biodegradation of waste greases and biochemical properties of a novel lipase from *Pseudomonas synxantha* PS1. *Can. J. Microbiol.* 2016; 62(7):588-599. DOI 10.1139/cjm-2015-0641.

Cea M., Sangaletti-Gerhard N., Acuña P., Fuentes I., Jorquera M., Godoy K., Osses F., Navia R. Screening transesterifiable lipid ac-

- cumulating bacteria from sewage sludge for biodiesel production. *Biotechnol. Rep.* 2015;8:116-123. DOI 10.1016/j.btre.2015.10.008.
- Chen J., Wang P.F., Wang C., Wang X., Miao L.Z., Liu S., Yuan Q.S. Bacterial communities in riparian sediments: a large-scale longitudinal distribution pattern and response to dam construction. *Front. Microbiol.* 2018;9:999. DOI 10.3389/fmicb.2018.00999.
- Cleenwerck I., De Wachter M., Hoste B., Janssens D., Swings J. *Aquaspirillum dispar* Hylemon et al. 1973 and *Microvirgula aerodenitrificans* Patureau et al. 1998 are subjective synonyms. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003;53(5):1457-1459. DOI 10.1099/ijs.0.02675-0.
- Cyriaque V., Géron A., Billon G., Nesme J., Werner J., Gillan D.C., Wattiez R. Metal-induced bacterial interactions promote diversity in river-sediment microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020;96(6): 5826176. DOI 10.1093/femsec/fiaa076.
- Dai Y., Yang Y.Y., Wu Z., Feng Q.Y., Xie S.G., Liu Y. Spatiotemporal variation of planktonic and sediment bacterial assemblages in two plateau freshwater lakes at different trophic status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016;100(9):4161-4175. DOI 10.1007/s00253-015-7253-2.
- DeLong E.F. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:5685-5689. DOI 10.1073/pnas.89.12.5685.
- Delorme S., Lemanceau P., Christen R., Corberand T., Meyer J.M., Gardan L. *Pseudomonas lini* sp. nov., a novel species from bulk and rhizospheric soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002;52(2):513-523. DOI 10.1099/00207713-52-2-513.
- de Oliveira L.F.V., Margis R. The source of the river as a nursery for microbial diversity. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120608. DOI 10.1371/journal.pone.0120608.
- De Vrieze M., Pandey P., Bucheli T.D., Varadarajan A.R., Ahrens C.H., Weisskopf L., Bailly A. Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential anti-oomycete agents. *Front. Microbiol.* 2015;6:1295. DOI 10.3389/fmicb.2015.01295.
- Elomari M., Coroler L., Hoste B., Gillis M., Izard D., Leclerc H. DNA relatedness among *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996;46(4):1138-1144. DOI 10.1099/00207713-46-4-1138.
- Fendri I., Chaari A., Dhouib A., Jlassi B., Abousalham A., Carrière F., Sayadi S., Abdelkafi S. Isolation, identification and characterization of a new lipolytic *Pseudomonas* sp., from Tunisian soil. *Environ. Technol.* 2010;31(1):87-95. DOI 10.1080/09593330903369994.
- Fischer H., Wanner S.C., Pusch M. Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM). *Biogeochemistry.* 2002;61:37-55. DOI 10.1023/A:1020298907014.
- Frank Y.A., Vorobiev E.D., Vorobiev D.S., Trifonov A.A., Antsiferov D.V., Soliman Hunter T., Wilson S.P., Strezov V. Preliminary screening for microplastic concentrations in the surface water of the Ob and Tom rivers in Siberia, Russia. *Sustainability.* 2021;13(1):80. DOI 10.3390/su13010080.
- Gerasimchuk A.L., Ivashenko D.A., Bukhtiyarova P.A., Antsiferov D.V., Frank Y.A. Search for new cultured lipophilic bacteria in industrial fat-containing wastes. *BIO Web Conf. II Int. Sci. Conf. "Plants and Microbes: The Future of Biotechnology"* (PLAMIC2020). 2020;23: 02012. DOI 10.1051/bioconf/20202302012.
- Iyer R., Iken B., Damania A. Genome of *Pseudomonas nitroreducens* DF05 from dioxin contaminated sediment downstream of the San Jacinto River waste pits reveals a broad array of aromatic degradation gene determinants. *Genom. Data.* 2017;17(14):40-43. DOI 10.1016/j.gdata.2017.07.011.
- Koronkevich N.I., Barabanova E.A., Georgiadi A.G., Zaitseva I.S., Shaporenko S.I. Anthropogenic impacts on the water resources of the Russian Arctic basin rivers. *Geogr. Nat. Resour.* 2019;40(1):22-29. DOI 10.1134/S1875372819010049.
- Kovacic F., Babić N., Krauss U., Jaeger K.-E. Classification of lipolytic enzymes from bacteria. In: Rojo F. (Ed.) *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids. Handbook of Hydrocarbon and Lipid microbiology.* Cham: Springer, 2019;255-289. DOI 10.1007/978-3-319-50418-6_39.
- Lee S.Y., Rhee J.S. Hydrolysis of triglyceride by the whole cell of *Pseudomonas putida* 3SK in two-phase batch and continuous reactors systems. *Biotechnol. Bioeng.* 2008;44:437-443. DOI 10.1002/bit.260440406.
- Li J., Wang L.-H., Xiang F.-G., Ding W.-L., Xi L.-J., Wang M.-Q., Xiao Z.-J., Liu J.-G. *Pseudomonas phragmitis* sp. nov., isolated from petroleum polluted river sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020;70(1):364-372. DOI 10.1099/ijs.0.003763.
- López J.R., Diéguez A.L., Doce A., De la Roca E., De la Herran R., Navas J.I., Toranzo A.E., Romalde J.L. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012;62(4):874-882. DOI 10.1099/ijs.0.030601-0.
- Mansour I., Heppell C.M., Ryo M., Rillig M.C. Application of the microbial community coalescence concept to riverine networks. *Biol. Rev.* 2018;93(4):1832-1845. DOI 10.1111/brv.12422.
- Mourey A., Kilbertus G. Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J. Appl. Bacteriol.* 1976;40:47-51. DOI 10.1111/j.1365-2672.1976.tb00589.x.
- Mulet M., Gomila M., Lemaitre B., Lalucat J., García-Valdés E. Taxonomic characterization of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 2012;35:145-149. DOI 10.1016/j.syapm.2011.12.003.
- Muriel-Millán L.F., Rodríguez-Mejía J.L., Godoy-Lozano E.E., Rivera-Gómez N., Gutierrez-Rios R.-M., Morales-Guzmán D., Trejo-Hernández M.R., Estradas-Romero A., Pardo-López L. Functional and genomic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from the southwestern gulf of Mexico reveals an enhanced adaptation for long-chain alkane degradation. *Front. Mar. Sci.* 2019;6:572. DOI 10.3389/fmars.2019.00572.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden U.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993;59(3):695-700. DOI 10.1128/aem.59.3.695-700.1993.
- Pabai F., Kermasha S., Morin A. Use of continuous culture to screen for lipase-producing microorganisms and interesterification of butterfat by lipase isolates. *Can. J. Microbiol.* 1996;42:446-452. DOI 10.1139/m96-061.
- Parte A. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D613-D616. DOI 10.1093/nar/gkt1111.
- Patureau D., Godon J.J., Dabert P., Bouchez T., Bernet N., Delgenes J.P., Moletta R. *Microvirgula aerodenitrificans* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative bacterium exhibiting co-respiration of oxygen and nitrogen oxides up to oxygen-saturated conditions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998;48:775-782. DOI 10.1099/00207713-48-3-775.
- Patureau D., Helloin E., Rustrian E., Bouchez T., Delgenes J., Moletta R. Combined phosphate and nitrogen removal in a sequencing batch reactor using the aerobic denitrifier, *Microvirgula aerodenitrificans*. *Water Res.* 2001;35(1):189-197. DOI 10.1016/s0043-1354(00)00244.
- Peix A., Ramírez-Bahena M.-H., Velázquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.* 2009;9(6):1132-1147. DOI 10.1016/j.meegid.2009.08.001.
- Pellett S., Bigley V.D., Grimes D.J. Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45(1):328-332. DOI 10.1128/aem.45.1.328-332.1983.
- Pirnay J.-P., Matthijs S., Colak H., Chablain P., Bilocq F., Van Eldere J., De Vos D., Zizi M., Triest L., Cornelis P. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ. Microbiol.* 2005;7(7):969-980. DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00776.x.
- Psenner R., Alfreider A., Schwarz A. Aquatic microbial ecology: water desert, microcosm, ecosystem. What's text? *Int. Rev. Hydrobiol.* 2008;93(4-5):606-623. DOI 10.1002/IROH.200711044.

- Ramette A., Frapolli M., Saux M.F.-L., Gruffaz C., Meyer J.-M., Défago G., Sutra L., Moënne-Loccoz Y. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011;34(3):180-188. DOI 10.1016/j.syapm.2010.10.005.
- Ramnath L., Sithole B., Govinden R. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. *Biotechnol. Rep.* 2017;15:114-124. DOI 10.1016/j.btre.2017.07.004.
- Reetz M.T., Jaeger K.E. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chem. Phys. Lipids.* 1998;93(1-2):3-14. DOI 10.1016/S0009-3084(98)00033-4.
- Sagova-Mareckova M., Boenigk J., Bouchez A., Cermakova K., Chonova T., Cordier T., Eisendle U., Elsersek T., Fazi S., Fleituch T., Frühe L., Gajdosova M., Graupner N., Haegerbaeumer A., Kelly A.-M., Kopecky J., Leese F., Nöges P., Orlic S., Panksep K., Pawlowski J., Petrusek A., Piggott J.J., Rusch J.C., Salis R., Schenk J., Simek K., Stovicek A., Strand D.A., Vasquez M.I., Vrålstad T., Zlatkovic S., Zupancic M., Stoek T. Expanding ecological assessment by integrating microorganisms into routine freshwater biomonitoring. *Water Res.* 2021;191:116767. DOI 10.1016/j.watres.2020.116767.
- Sarkar P., Roy A., Pal S., Mohapatra B., Kazy S.K., Maiti M.K., Sar P. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for *in situ* bioremediation. *Bioresour. Technol.* 2017;242:15-27. DOI 10.1016/j.biortech.2017.05.010.
- Savichev O.G., Tokarenko O.G., Pasechnik E.Yu., Nalivaiko N.G., Ivanova E.A., Nadeina L.V. Microbiological composition of river waters in the Ob' basin (West Siberia) and its associations with hydrochemical indices. *IOP Conf. Series: Earth Environ. Sci.* 2015;27:012035. DOI 10.1088/1755-1315/27/1/012035.
- Shomikova E., Arslanova M. The experience of application of microbiological indicators in monitoring procedures of aquatic ecosystems in the Middle Ob basin. *E3S Web Conf.* 2020;210:07013. DOI 10.1051/e3sconf/202021007013.
- Subhash Y., Park M.J., Lee S.S. *Microvirgula curvata* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil, and emended description of the genus *Microvirgula*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016;66:5309-5313. DOI 10.1099/ijsem.0.001512.
- Sudan S.K., Pal D., Bisht B., Kumar N., Chaudhry V., Patil P., Sahni G., Mayilraj S., Krishnamurthi S. *Pseudomonas fluvialis* sp. nov., a novel member of the genus *Pseudomonas* isolated from the river Ganges, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018;68(1):402-408. DOI 10.1099/ijsem.0.002520.
- Wang J., Li Y., Wang P., Niu L., Zhang W., Wang C. Response of bacterial community compositions to different sources of pollutants in sediments of a tributary of Taihu Lake, China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2016;23(14):13886-13894. DOI 10.1007/s11356-016-6573-9.
- Wang L., Zhang J., Li H., Yang H., Peng C., Peng Z., Lu L. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Sci. Total. Environ.* 2018;627:600-612. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.01.203.
- Wei C.L., Bao S., Zhu X.Y., Huang X.X. Spatio-temporal variations of the bacterioplankton community composition in Chaohu Lake, China. *Prog. Nat. Sci.* 2008;18(9):1115-1122. DOI 10.1016/j.pnsc.2008.04.005.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991;173:697-703. DOI 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Yang J., Zhang B., Yan Y. Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009;159:355-365. DOI 10.1007/s12010-008-8419-5.
- Yang W., Cao H., Xu L., Zhang H., Yan Y. A novel eurythermic and thermostable lipase LipM from *Pseudomonas moraviensis* M9 and its application in the partial hydrolysis of algal oil. *BMC Biotechnol.* 2015;15:94. DOI 10.1186/s12896-015-0214-0.
- Zhang L., Zhao T., Wang Q., Li L., Shen T., Gao G. Bacterial community composition in aquatic and sediment samples with spatiotemporal dynamics in large, shallow, eutrophic Lake Chaohu, China. *J. Freshw. Ecol.* 2019;34(1):575-589. DOI 10.1080/02705060.2019.1635536.

ORCID ID

A.L. Gerasimchuk orcid.org/0000-0002-2945-2364

D.A. Ivashenko orcid.org/0000-0001-7132-182X

Yu.A. Frank orcid.org/0000-0001-6347-4009

Благодарности. Исследование выполнено при поддержке Программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 30.03.2022. После доработки 20.05.2022. Принята к публикации 24.05.2022.