

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ БАКТЕРИИ ИЗ ГОРОДСКОГО ОЗЕРА: ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

© 2020 г. Т. Р. Кравцова^{a, *}, В. В. Ильинский^a, И. В. Лазебная^b, О. Е. Лазебный^c,
А. Ю. Акулова^a, И. В. Мошарова^{a, d}, О. А. Кокшарова^e

^aМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

^bИнститут общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, Россия

^dИнститут океанологии им. П.П. Ширшова Российской академии наук, Москва, Россия

^eИнститут физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ, Москва, Россия

*e-mail: skypou-92@mail.ru

Поступила в редакцию 27.05.2019 г.

После доработки 30.08.2019 г.

Принята к публикации 23.09.2019 г.

Впервые из бактериопланктона оз. Белое (г. Москва) выделены культивируемые углеводородокисляющие бактерии — штаммы 2012В и 2012С. Жирно-кислотный профиль штаммов 2012В и 2012С представлен в диапазоне C_{14:0}–C_{19:0}. Спектр наиболее представленных жирных кислот штамма 2012В включает в себя C_{15:0} (54%), C_{16:0} (17%), C_{17:0} (10%) и 10-метил C_{18:0} (3.5%), липидный спектр штамма 2012С представлен жирными кислотами C_{15:0} (45%), C_{16:0} (32%) и C_{17:0} (9%). По биохимическим и морфологическим характеристикам штамм 2012В наиболее сходен с представителями рода *Rhodococcus* spp. (Actinobacteria, Nocardiaceae). Проведенный филогенетический анализ с использованием нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК (KP779654.1) и *alkB* (KR422620.1) показал, что штамм 2012В принадлежит к виду *Rhodococcus qingshengii*. Нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК штамма 2012С (MG966152) имеет наибольшее сходство (99.57%) с последовательностями *Pseudomonas psychrotolerans* и *P. oryzihabitans*.

Ключевые слова: углеводородокисляющие бактерии, филогенетический анализ, 16S рРНК, *alkB*, озеро Белое

DOI: 10.31857/S0320965220030092

ВВЕДЕНИЕ

Городские озера — “экологические барометры здоровья города” (Ravikumar et al., 2013), а бактериопланктонные сообщества — их неотъемлемые компоненты. Загрязняющие вещества, среди которых полициклические ароматические углеводороды, поступающие из выхлопных газов автомобилей, гидрофобные хлорорганические соединения, как хлордан, дильдрин, полихлорированные бифенилы (Long et al., 2003), легко попадают в городские озера по водным стокам и накапливаются в виде донных отложений.

Наиболее дешевый способ биоремедиации — использование УОБ, активно участвующих в естественной биодеградации нефтяных и других углеводородных загрязнений (Grooijmans et al., 2009). В водной среде УОБ утилизируют 0.003–100% углеводородов (Das, Chandran, 2011), что приводит к

ускорению очистки водных систем и позволяет обеспечить сбалансированность биотопа. Показано, что в лабораторных условиях микробному сообществу, состоящему из двух изолятов *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872; Migula, 1900) и *Rhodococcus* sp. (EU259892), удалось разложить до 90% углеводородов за 6 нед. в жидкой культуре (Cameotra, Singh, 2008).

Таксономический состав УОБ, обитающих в городских озерах России, в литературе фактически не описан, а видовой таксономический состав культивируемых УОБ, выделенных из московских озер, ранее не исследовали. Более полувека назад сообщалось лишь о том, что в водах оз. Белое обнаружены бактерии, способные окислять метан, гексан и нафталин (Кузнецов, 1952).

Известно, что на долю культивируемых УОБ приходится <1% общего числа бактерий в естественном бактериоценозе. В связи с этим идентификация новых культивируемых природных штаммов УОБ, безусловно, влияющих на состоя-

Сокращения: ПЦР — полимеразная цепная реакция; УОБ — углеводородокисляющие бактерии.

ние всей биоты городского оз. Белое, представляет особый интерес.

Цель работы – охарактеризовать выделенные впервые из городского оз. Белое культивируемые штаммы УОБ, провести филогенетический анализ и определить их таксономическое положение.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика вод оз. Белое. Озеро природно-происхождения – наиболее глубокое из трех озер природно-исторического парка. Его глубина 4.2–13.5 м, площадь 0.2 км² (Россолимо, 1925). В 1930-х гг. озеро уже имело статус эвтрофного, а в его донных осадках отмечены процессы анаэробной деструкции органического вещества (Кузнецов, 1970). В 1986 г. оз. Белое вошло в черту г. Москвы.

За период наблюдений температура поверхностного слоя воды в озере варьировала от 0.1–0.5 до 27–30°C. Значения рН колебались от нейтральных 7.22 до слабощелочных 7.99, пики подщелачивания воды – от 9.11 до 8.62. Концентрация ионов аммония изменялась в пределах 0.05–1.73 мг/л, нитратов – 0.22–4.73 мг/л, концентрация нитритов – 0.003–0.12 мг/л, фосфатов – 0.02–0.33 мг/л. Содержание легкоразлагаемого органического вещества, оцененное по параметрам величин перманганатной окисляемости, достигало 4.41–7.13 мг О₂/л.

Таким образом, по содержанию биогенных элементов степень сапробности оз. Белое в разные сезоны года варьировала от ксеносапробной до полисапробной. Постоянное присутствие в воде биогенных элементов выводит их из числа факторов, лимитирующих развитие гетеротрофных бактерий (Акулова и др., 2014).

Отбор проб. Пробы воды из оз. Белое для микробиологического анализа отбирали с глубины ~0.5 м в 5 м от берега, где глубина была ≥1.5 м.

Выделение чистых культур УОБ. Чистые культуры выращивали на 2%-ной агаризованной синтетической среде ММС (Mills et al., 1978) с добавлением летнего дизельного топлива, в состав которого входят 20–30% нефтяных, 20–30% ароматических и до ≤40% парафиновых углеводородов. Культуры бактерий хранили на среде ММС в холодильнике при температуре 4–6°C.

Морфологические признаки. Морфологию клеток бактериальных штаммов изучали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse E 200F 200 и сканирующего электронного микроскопа Samsan S-2 Cambridge (Великобритания). Образцы для микроскопии отбирали через 1, 3, 7, 16 и 30 сут роста культур на минеральной среде ММС и среде Мюллера (Hansen, Møller, 1975).

Ферментативную активность определяли по методике Сэмбрука (Sambrook et al., 1989). Биодес-

градацию аминокислот и сахаров оценивали по росту штаммов на среде М9 с углеводородами (Sambrook et al., 1989). Жирные кислоты анализировали по методике MIDI (Microbial Identification System) (Sasser, 2001).

Штаммы УОБ идентифицировали по определителю Берги (Bergey et al., 1989), а также с применением молекулярных методов.

Экстракция геномной ДНК. Выделение геномной ДНК из бактерий проводили по методике Кокшаровой и др. (Koksharova et al., 1998), амплификацию нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК – с помощью ПЦР. Для штамма 2012В использовали праймеры RodF (5'-CAGCAGCTCAACTGCTGGCT-3') и RodR (5'-CATGCTCCGC-CGCTTGTG-3') (Fredriksson et al., 2013), для штамма 2012С – праймеры Ps-F (5'-GGTCTGAGAGGATGATCAGT-3') и Ps-R (5'-TTAGCTC-CACCTCGCGGC-3') (Widmer et al., 1998). Температурно-временной режим для ПЦР: 94°C – 10 мин; 25 циклов (94°C – 45 с, 54°C – 45 с, 68°C – 2 мин); хранение при 4°C. Продукты ПЦР визуализировали в 1.5%-ном агарозном геле. Амплификацию последовательности гена *alkB* проводили с использованием праймеров *alk-FI* (5'-CATAATAAAGG-GCATCACCG-3') и *alk-RI* (5'-GATTTTCATTCT-CGAAACTCC-3') (Kohno et al., 2002).

Клонирование и секвенирование ПЦР продуктов. Фрагменты ДНК клонировали с помощью набора CloneJet PCR™ Cloning Kit # K1231 (Fermentas, ЕС). Секвенирование полученных продуктов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer с использованием реагентов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 в Центре коллективного пользования “Геном” (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Филогенетическую реконструкцию последовательностей проводили методом ближайшего соседа (Neighbor-Joining) (Saitou, Nei, 1987) с помощью программы Blast Tree View (Fast minimum evolution – tree method). Для первичного сравнительного анализа полученных последовательностей использовали GenBank (NCBI) и BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul et al., 1997). Последовательности проверяли на наличие химер с помощью сервиса Bellerophon (Huber et al., 2004). Индексы бутстрепа (1000 итераций) показаны рядом с ветвями (Felsenstein, 1985). Длины ветвей эквивалентны эволюционным расстояниям, используемым для построения филогенетического дерева. Для построения филогенетических деревьев применяли программу MEGA X (Kumar et al., 2018).

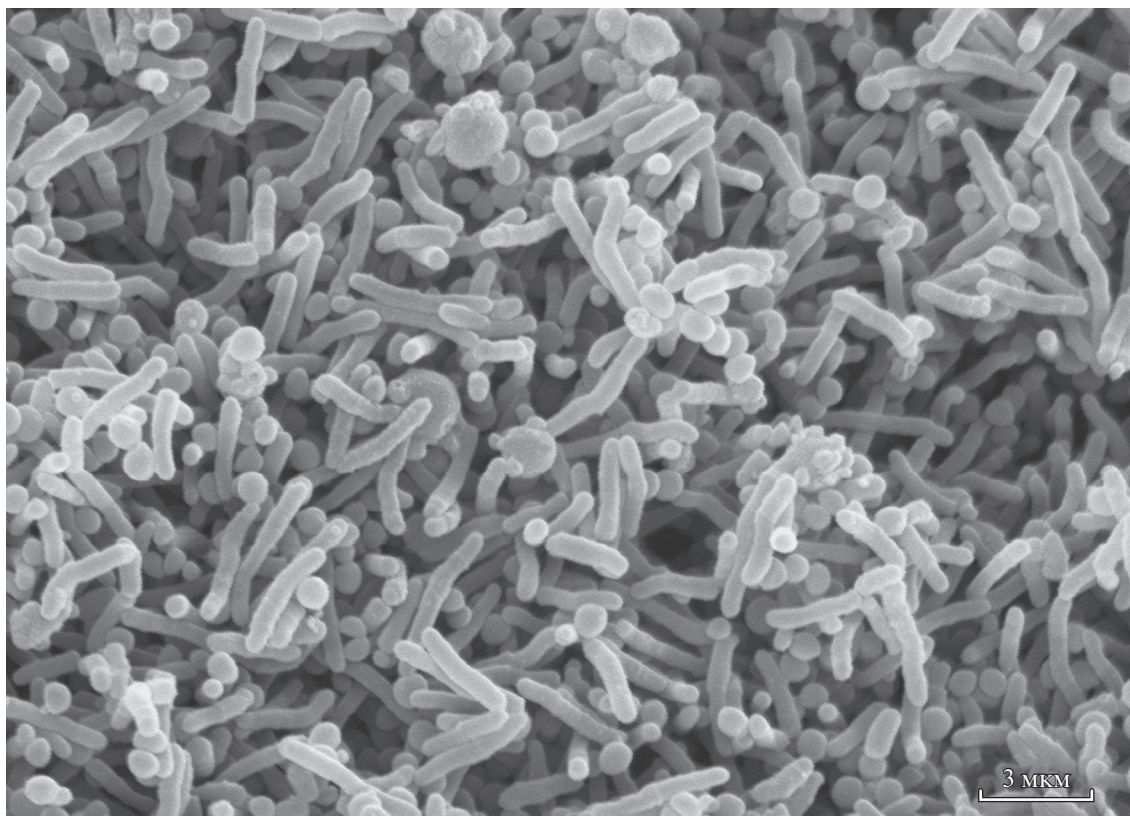


Рис. 1. Морфология клеток штамма 2012В (СЭМ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из выделенных культивируемых штаммов для определения таксономического положения выбрано два штамма УОБ, способных к использованию жидких углеводов в качестве единственного источника углерода и энергии.

Характеристика штамма 2012В. Колонии клеток розового цвета, выпуклые, матовые, с ровным краем, сухие. Клетки грамположительные, аэробные, неподвижные, неспорообразующие (рис. 1).

На среде ММС с дизельным топливом размер клетки 1–2 мкм, на среде Мюллера – 3–5 мкм. Клетки каталазоположительны и кислотоустойчивы. Жирно-кислотный профиль штамма представлен жирными кислотами с длиной углеродной цепи $C_{14:0}$ – $C_{19:0}$. Спектр наиболее представленных жирных кислот включал в себя $C_{15:0}$ (54%), $C_{16:0}$ (17%), $C_{17:0}$ (10%) и 10-метил $C_{18:0}$ (3.5%).

Штамм 2012В способен утилизировать сахара и ряд аминокислот: L-инозин, L-арабинозу, L-аспарагин, D-фруктозу, мальтозу, D-маннитол и D-сорбитол. Он не утилизирует лактозу, D-ксилозу, а из фунгицидов – беномил и карбендазим (табл. 1).

Недавно продемонстрировано уникальное свойство штамма 2012В, способного к биодеструкции наноматериалов (Сафронова, Кокшарова, 2018). Попадание наноматериалов в почву и воду приводит к негативным последствиям. В этой связи данный штамм может рассматриваться как потенциальный деструктор и этих углеродсодержащих материалов.

ПЦР и филогенетический анализ штамма 2012В. В результате ПЦР получен ДНК фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность (1479 пн) гена 16S рРНК малой субъединицы бактериальной рибосомы.

Филогенетический анализ позволил установить, что последовательность гена 16S рРНК попадает в отдельный кластер, сформированный бактериями *Rhodococcus* spp. и поддерживается тремя референтными штаммами – *R. qingshengii* sp. dj1-6^T (NR_043535.1), *R. jialingiae* sp. dj1-6-2^T (NR_115708.1) и *R. erythropolis* sp. DSM 43066^T (X79289) с гомологией >99.9% и со штаммом *R. qingshengii* BLH-Y4 (KF704113) со степенью сходства (99.93%) (рис. 2). Все последовательности гена 16S рРНК, входящие в кластер с последовательностью штамма *Rhodococcus* sp. 2012В, принадлежат к представителям одной монофилетической группы.

Таблица 1. Сравнительная фенотипическая характеристика штамма *Rhodococcus* sp. 2012В с референтными штаммами рода *Rhodococcus*

Показатели	<i>R. sp.</i> 2012В	<i>R. qingshengii</i> sp. djl-6 ^T (Xu et al., 2007)	<i>R. jialingiae</i> sp. djl-6-2 ^T (Wang et al., 2010)	<i>R. erythropolis</i> sp. DSM 43066 ^T (Xu et al., 2007)
Источник изоляции образца	Оз. Белое (г. Москва)	Почва овощного поля, загрязненного карбеназимом (провинция Цзянсу, Китай)	Осадки сточных вод очистительных сооружений, производства карбеназима (Цзянсу, Китай)	нд
Цвет колонии	Розовый	Оранжевый	Бледно-розовый	Бледно-розовый
Max NaCl, %	5	5	7	5
pH	6–9.2	5–8	4–9	5–8
Углерод и азот как единственный источник питания				
L-аспарагин	+	–	–	+
Беномил	–	+	+	–
Карбендозим	–	+	+	–
L-инозин	+	нд	нд	нд
L-арабиноза	+	нд	нд	нд
D-фруктоза	+	–	+	+
L-молочная кислота	–	–	–	+
Мальтоза	+	–	–	+
D-маннитол	+	–	+	+
D-сорбитол	+	–	–	+
Сахароза	+	+	–	+
D-ксилоза	–	–	–	+

Примечание. “+” – положительный ответ, “–” – отрицательный, нд – нет данных.

Также видовую идентификацию проводили с помощью сравнения морфологических и физиолого-биохимических признаков с референтными штаммами – *R. qingshengii* djl-6^T, *R. jialingiae* djl-6-2^T и *R. erythropolis* DSM 43066^T (Wang et al., 2010; Xu et al., 2007) (табл. 1).

Для уточнения результатов филогенетического анализа, проведенного с использованием рибосомального гена, в качестве дополнительного гена-маркера использовали белок-кодирующую последовательность *alkB* гена. Продукт этого гена – алканмонооксигеназа, обеспечивающая окисление *n*-алканов с длиной углеводородной цепи C₆–C₁₇ и катализирующая реакцию деградации углеводов (Чернявская и др., 2012; van Beilen, Funhoff, 2007).

С помощью ПЦР для штамма 2012В получена нуклеотидная последовательность длиной 333 пн, соответствующая фрагменту гена *alkB*, которая позволила построить филогенетическое дерево (рис. 3). Видно, что ближайший родственник

штамма *Rhodococcus* sp. 2012В – штамм *R. qingshengii* BLH-Y4 (KF696707) (идентичность 97.3%), выделенный из почвы Цинхай-Тибетского плато (Xu et al., 2007). Таким образом, уровень сходства последовательностей гена 16SpPHK и *alkB* показал, что по молекулярным таксономическим критериям (Stackebrandt, 2011) штамм 2012В можно отнести к виду *Rhodococcus qingshengii* sp. nov. (Xu et al., 2007).

Характеристика штамма 2012С. Клетки грамотрицательные, аэробные, одиночные палочки (рис. 4). На среде ММС с дизельным топливом образуют выпуклые блестящие колонии бежевого цвета с ровным краем, размер клеток 2–3 мкм. На среде Мюллера клетки крупнее (3–5 мкм). Клетки флюоресцируют в проходящем свете. Бактерии давали положительный ответ на каталазу и отрицательный – на кислотоустойчивость.

Состав жирных кислот характеризуется преобладанием длинноцепочечных насыщенных и полиненасыщенных жирных кислот с длиной угле-

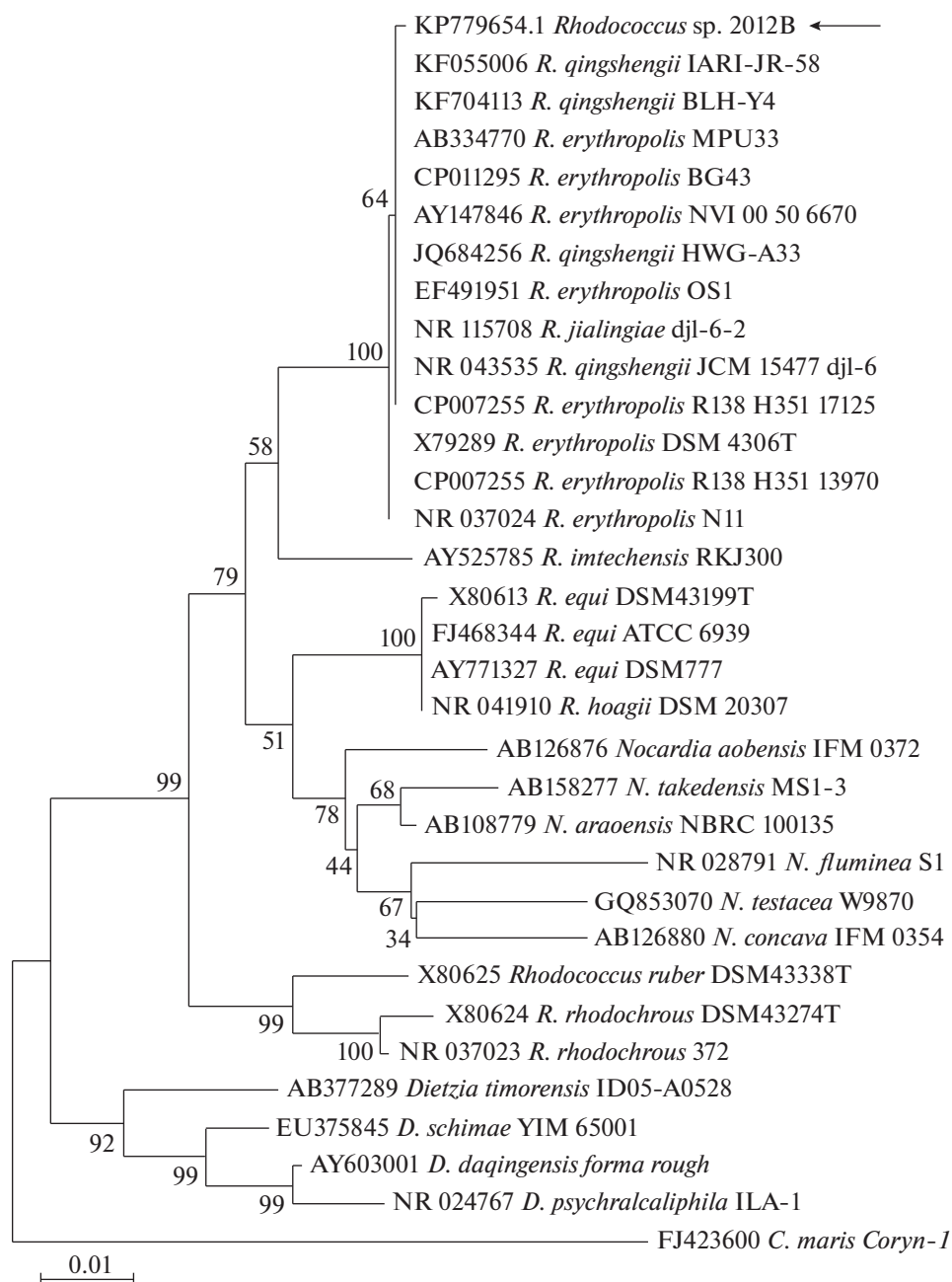


Рис. 2. Эволюционные отношения штамма *Rhodococcus* sp. 2012B (KP779654.1) с представителями рода *Rhodococcus* по фрагменту гена 16S рРНК (1286 пн). Эволюционные расстояния рассчитаны методом, описанным в работе Wang et al. (2010), и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Изменение скорости замены оснований в исследованной последовательности моделировали с помощью гамма-распределения (параметр формы = 0.44). В качестве аутгруппы использовали вид *Corynebacterium maris*.

родной цепи $C_{14:0}$ – $C_{19:0}$, где наиболее представлено жирными кислотами $C_{15:0}$ (45%), $C_{16:0}$ (32%) и $C_{17:0}$ (9%).

Штамм 2012C способен утилизировать сахара и аминокислоты (L-аспарагин, L-инозин, D-мальтоза, D-сорбитол, L-арабиноза и D-арабитол); не утилизирует лактозу и фунгициды беномил и карбендозим.

ПЦР и филогенетический анализ штамма 2012C. В результате ПЦР получен фрагмент ДНК, содержащий нуклеотидную последовательность (936 пн) гена малой субъединицы бактериальной рибосомы 16S рРНК.

Установлено, что нуклеотидная последовательность гена 16SpРНК наиболее сходна с таковыми различных представителей сем. Pseudomonadaceae

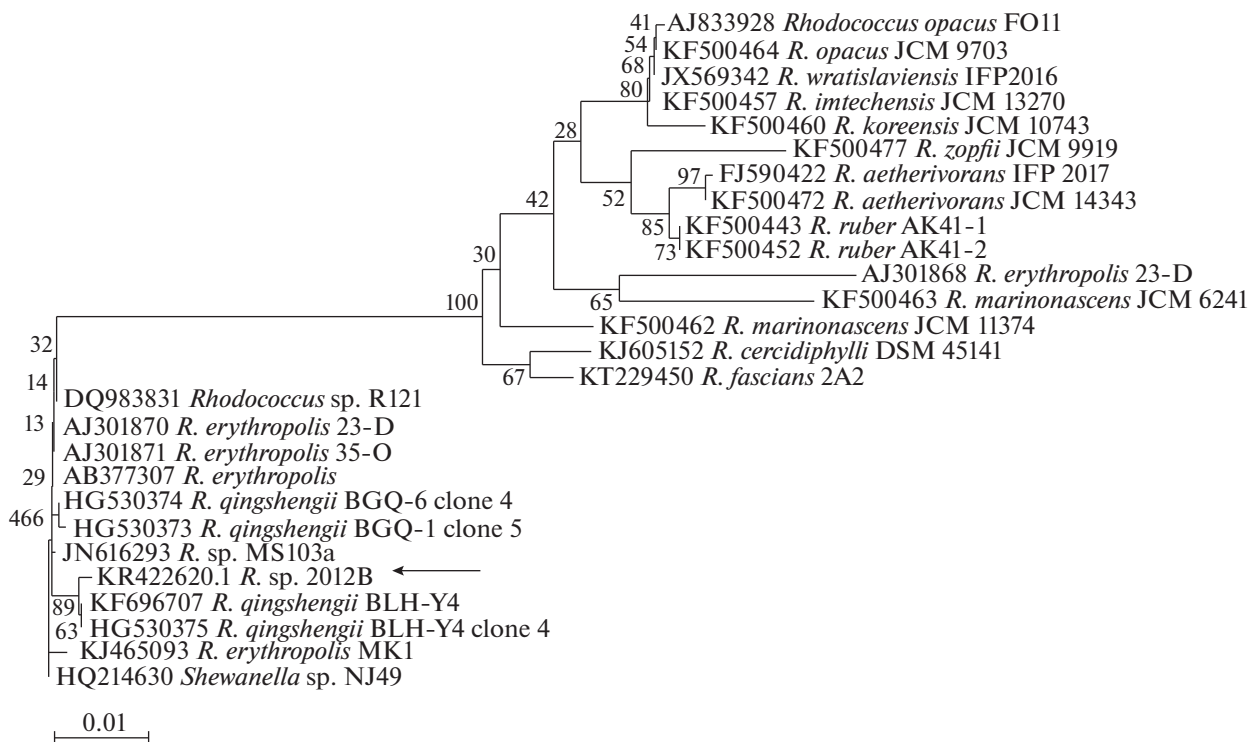


Рис. 3. Эволюционные отношения штамма *Rhodococcus* sp. 2012B (KR422620.1) с представителями рода *Rhodococcus* по фрагменту гена *alkB* (272 пн). Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием трехпараметрического метода (van Beilen, Funhoff, 2007) и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Изменение скорости замены оснований в исследованной последовательности моделировали с помощью гамма-распределения (параметр формы = 0.41). В качестве аутгруппы использовали штамм NJ49 рода *Shewanella*.

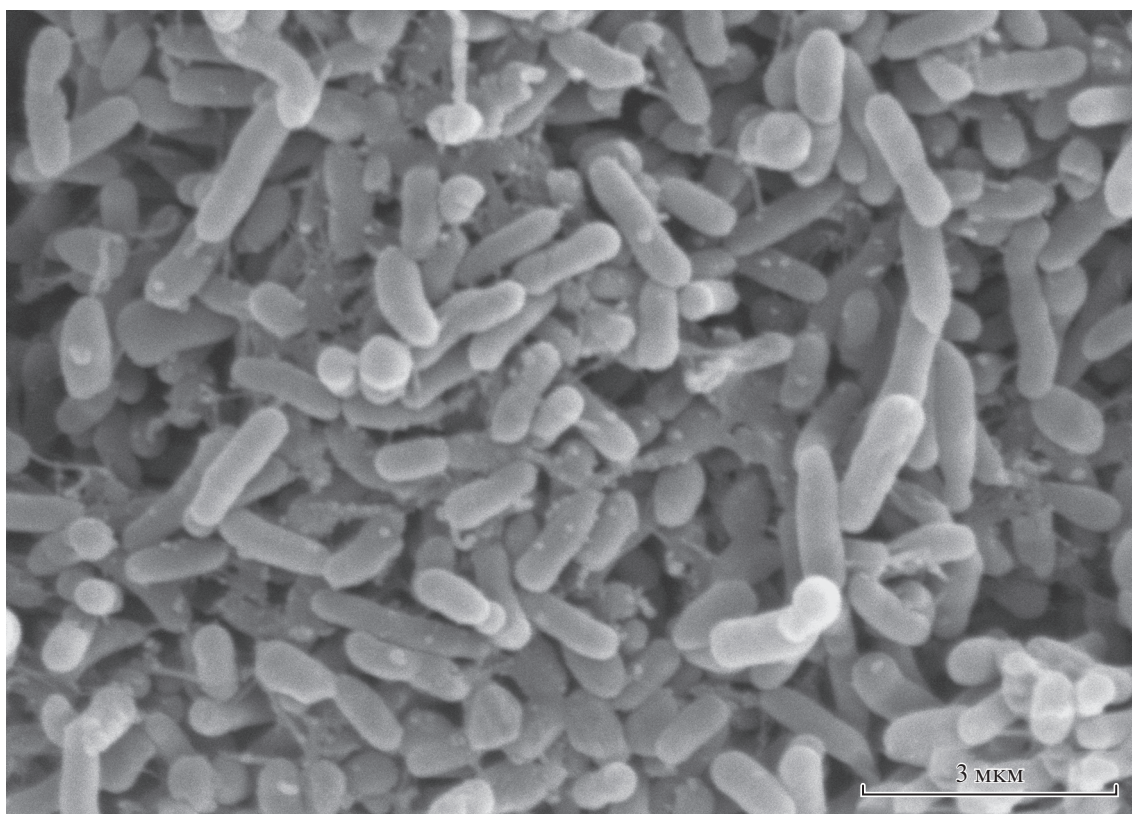


Рис. 4. Морфология клеток штамма 2012С (СЭМ).

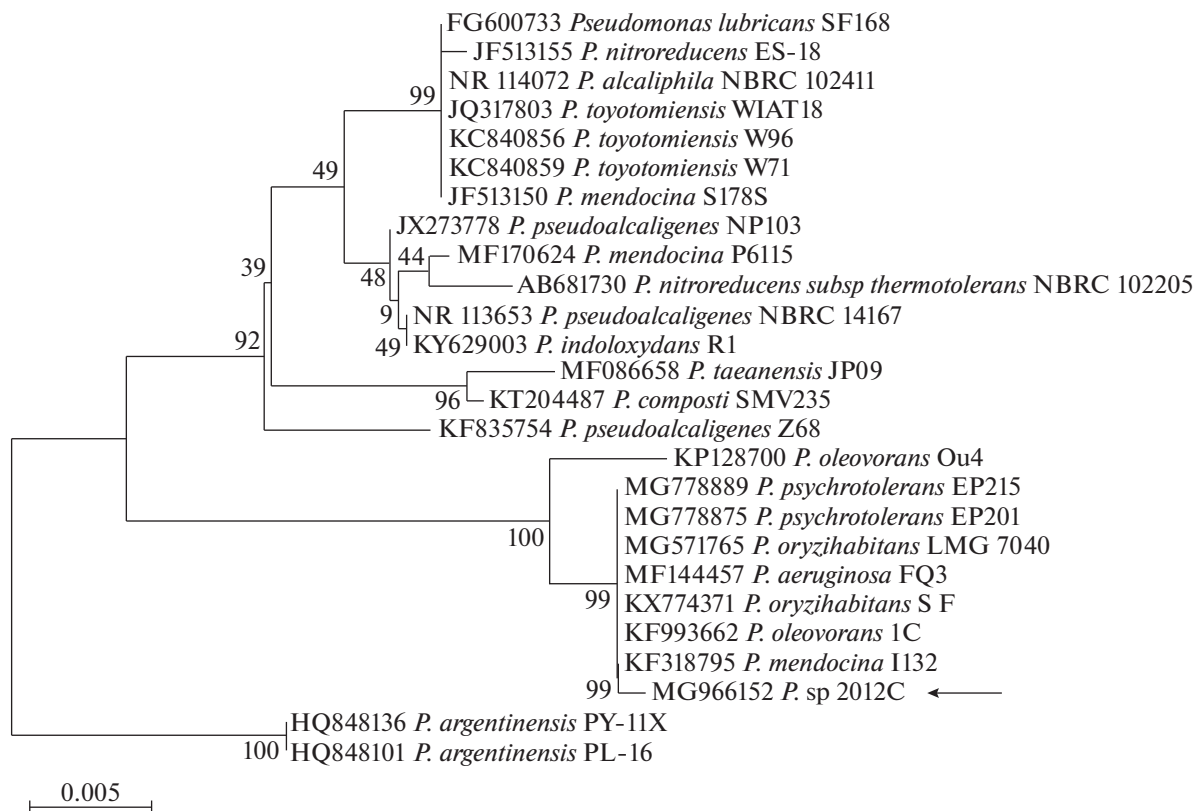


Рис. 5. Эволюционные отношения штамма *Pseudomonas* sp. 2012C (MG966152) с представителями рода *Pseudomonas* по фрагменту гена 16S рРНК (917 пн). Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием двух параметрического метода Кимуры (Long et al., 2003) и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Изменение скорости замены оснований в исследованной последовательности моделировали с помощью гамма-распределения (параметр формы = 0.44).

и позволяет отнести штамм 2012C к роду *Pseudomonas* (Proteobacteria, Pseudomonadaceae) (рис. 5). Филогенетический анализ показал, что штамм 2012C сформировал таксономически однородный кластер, в котором представлены штаммы рода *Pseudomonas* с гомологией 99.57%, при этом в кластере объединились бактерии из разных экосистем и разных географических зон. Так, *P. mendocina* (KF318795) выделен из ризосферной почвы в Индии, *P. psychrotolerans* (MG778875) — из бразильского цветка пассифлоры. *P. oryzihabitans* (MG571765.1) из загрязненной почвы в Саудовской Аравии обладает способностью деградировать углеводороды.

Культивирование штамма 2012C проводили на твердой синтетической среде ММС, содержащей в качестве единственного источника углерода летнее дизельное топливо, что свидетельствует о способности штамма 2012C деградировать алифатические углеводороды. С помощью ПЦР при использовании специфических праймеров (Kohn et al., 2002) получена нуклеотидная последовательность длиной ~220 пн, соответствующая

фрагменту гена *alkB*. Полученные результаты дают возможность предположить, что в геноме *Pseudomonas* sp. 2012C присутствуют гены, кодирующие ферменты, отвечающие за окисление алканов с “короткой” углеродной цепью. Таким образом, филогенетический анализ позволил определить штамм *Pseudomonas* sp. 2012C как наиболее близкий к видам *P. psychrotolerans* и *P. oryzihabitans*.

Выводы. Из пресного водоема, находящегося в черте г. Москвы, выделены и охарактеризованы культивируемые углеводородокисляющие штаммы. Видовое таксономическое положение штамма *Rhodococcus* 2012B определено как *Rh. qingshengii*, штамм и *Pseudomonas* sp. 2012C наиболее сходны с видами *P. psychrotolerans* и *P. oryzihabitans*. Новые штаммы могут стать основой для создания биопрепаратов, стимулирующих процессы естественного очищения среды от нефтяных углеводородов, в том числе, от наиболее устойчивых полициклических ароматических соединений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотруднику Института физиологии растений РАН Р.А. Сидорову за помощь при определении состава жирных кислот.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнялась в рамках темы “Физиологическая экология микроорганизмов водных экосистем”, номер госзадания АААА-А16-116021660041-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Акулова А.Ю., Ильинский В.В., Мошарова И.В. и др. 2014. Состояние гетеротрофного бактериопланктона прибрежья озер Святое и Белое природно-исторического парка “Косинский” (город Москва) в 2011 году // Известия Самарского научного центра РАН. Т. 16. № 1. С. 1185.
- Кузнецов С.И. 1952. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в озерах. Москва: Наука.
- Кузнецов С.И. 1970. Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность. Ленинград: Наука.
- Россолимо Л.Л. 1925. Морфометрия Косинских озер // Труды лимнологической станции в Косине. № 2. С. 3.
- Сафронова Н.А., Кокшарова О.А. 2018. Бактерия *Rhodococcus* sp. – потенциальный деструктор детонационных наноалмазов // Российские нанотехнологии. № 7–8. С. 88.
- Чернявская М.И., Эльгамуди А.А., Туток М.А. 2012. Первичная характеристика бактерий – деструкторов нефти // Вестник Белорусского государственного университета. Т. 2. № 3. С. 44.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucleic Acids Res. V. 25. № 17. P. 3389.
- Bergey D.H., Krieg N.R. Holt J.G. 1989. Bergey’s manual of systematic bacteriology. Baltimore, MD: Williams & Wilkins. V. 4. P. 2648.
- Brooijmans R.J.W., Pastink M.I., Siezen R.J. 2009. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew // Microb. Biotechnol. V. 2. № 6. P. 587.
- Cameotra S.S., Singh P. 2008. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants // Int. Biodeterior. Biodegrad. V. 62. P. 274.
- Das N., Chandran P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview // Biotechnol. Res. Internat. V. 2011. P. 1. 13.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. V. 39. P. 783.
- Fredriksson N.J., Hermansson M., Wilén Britt-Marie. 2013. The choice of PCR primers has great impact on assessments of bacterial community diversity and dynamics in a wastewater treatment plant // PLoS One. V. 8. № 10.
- Hansen J., Møller I. 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone // Anal. Biochem. V. 68. P. 87.
- Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments // Bioinformatics. V. 20. P. 2317.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. V. 16. P. 111.
- Kohno T., Sugimoto Y., Sei K., Mori K. 2002. Design of PCR primers and gene probes for general detection alkane-degrading bacteria // Microbiol. Environ. V. 17. № 3. P. 114.
- Koksharova O., Shubert M., Shestakov S., Cerff R. 1998. Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent gapdh genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. // Plant Mol. Biol. V. 36. P. 183.
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. V. 35. P. 1547.
- Long G.R., Ayers M.A., Callender E., Van Metre P.C. 2003. Trends in chemical concentration in sediment cores from three lakes in New Jersey and one lake on Long Island, New York. U.S. // Geological Survey. Water-Res. Inv. Rep. V. 02-4272. P. 32.
- Mills A.L., Breule C., Colwell R.R. 1978. Enumeration of petroleum – degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method // Can. J. Microbiol. V. 24. P. 552.
- Ravikumar P., Mehmood M.A., Somashekar R.K. 2013. Water quality index to determine the surface water quality of Sankey tank and Mallathahalli lake, Bangalore urban district, Karnataka, India // Appl. Water Sci. V. 3. № 1. P. 247.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. V. 4. P. 406.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a Laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasser M. 2001. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids // MIDI Technical Note 101.
- Stackebrandt E. 2011. Molecular taxonomic parameters // Microbiol. V. 32. P. 59.
- van Beilen J.B., Funhoff E.G. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. V. 74. P. 13.
- Wang Z., Xu J., Li Y. et al. 2010. *Rhodococcus jialingiae* sp. nov., an actinobacterium isolated from sludge of a carbendazim wastewater treatment facility // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 60. P. 378.
- Widmer F., Seidler R.J., Gillevet P.M. et al. 1998. A Highly Selective PCR Protocol for Detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* (Sensu stricto) in Environmental Samples // Appl. Env. Microbiol. V. 64. № 7. P. 2545.
- Xu J.L., He J., Wang Z.C. et al. 2007. *Rhodococcus qingshengii* sp. nov., a carbendazim-degrading bacterium // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. V. 57. P. 2754.

Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria from the Urban Lake Beloe (Moscow): Identification and Phylogenetic Analysis

T. R. Kravzova^{1,*}, V. V. Ilinsky¹, I. V. Lazebnaya², O. E. Lazebny³,
A. U. Akulova¹, I. V. Mosharova^{1,4}, and O. A. Koksharova⁵

¹Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: skypoy-92@mail.ru

Cultured hydrocarbon-oxidizing bacteria were for the first time isolated from bacterioplankton in the urban Lake Beloe (Moscow). The taxonomic position of two bacterial strains (2012B and 2012C) isolated from this lake has been determined. Lipids of the strain 2012B are comprised of C_{14:0}–C_{19:0} fatty acids, where the most abundant are C_{15:0} (54%), C_{16:0} (17%), C_{17:0} (10%) and 10-methyl C_{18:0} (3.5%). Lipids of the strain 2012C are comprised of C_{14:0}–C_{19:0} fatty acids, where the most abundant are C_{15:0} (45%), C_{16:0} (32%) and C_{17:0} (9%). A phylogenetic analysis of the strain 2012B is performed using the nucleotide sequences of genes 16S rRNA (KP779654.1) and *alkB* (KR422620.1) and is identified as typical member of the genus *Rhodococcus* spp. (Actinobacteria, Nocardiaceae). The combination of molecular identification, biochemical and physiological properties analysis permits to identify the strain 2012B as *Rhodococcus qingshengii* 2012B. A phylogenetic analysis of the strain 2012C is performed using the nucleotide sequences of 16S rRNA (MG966152) and reveals the strain 2012C highest identity (99.57%) with *Pseudomonas psychrotolerans* и *Pseudomonas oryzihabitans*.

Keywords: hydrocarbon oxidizing bacteria, phylogenetic analysis, 16S rRNA, *alkB*, White Lake