ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2504
https://elibrary.ru/YMIEWZ

Оригинальная статья
https://fptt.ru

Исследование нативной микробиоты рапсового жмыха – потенциального источника промышленных продуцентов

О. П. Свердлова[1], Е. В. Подшивалова[2], Н. Ю. Шарова[1,2], Д. Д. Белова[1,*]

[1] *Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, Санкт-Петербург, Россия*

[2] *Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия*

Поступила в редакцию: 05.12.2023
Принята после рецензирования: 25.01.2024
Принята к публикации: 06.02.2024

**Д. Д. Белова: antonina-daria@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0630-7658*
О. П. Свердлова: https://orcid.org/0000-0002-1786-0061
Е. В. Подшивалова: https://orcid.org/0009-0007-9006-5201
Н. Ю. Шарова: https://orcid.org/0000-0002-4208-9299

© О. П. Свердлова, Е. В. Подшивалова, Н. Ю. Шарова, Д. Д. Белова, 2024

Аннотация.
В России активно развивается производство рапсового масла, основным побочным продуктом которого является жмых. Богатый химический состав и доступность делают рапсовый жмых перспективным источником питательных веществ, его можно использовать для культивирования микроорганизмов и получения с помощью них ценных биологически активных соединений и продуктов с улучшенной питательной ценностью. Целью работы являлось исследование нативной микробиоты рапсового жмыха в условиях повышенной влажности, морфологическая характеристика выделенных микроорганизмов и определение их таксономической принадлежности до рода при помощи NGS-секвенирования.
Объектами исследования являлись рапсовый жмых и колонии микроорганизмов, выделенные в процессе его ферментации. Для выделения представителей нативной микробиоты рапсового жмыха провели 2, 5, 7 и 9-суточную ферментацию глубинным способом. Для получения микробных изолятов применили метод поверхностного и глубинного культивирования на плотной и жидких питательных средах соответственно. Метагеномный анализ таксономического состава микробиоты проводили с помощью секвенирования на платформе Illumina.
Выявили 16 типов колоний по их морфологии. Колонии с морфологией 1, 3, 8, 12 и 13 являлись преобладающими для всех суток ферментации, что позволяет сделать вывод о их росте при жидкофазной ферментации на рапсовом жмыхе в качестве изолятов. При помощи метагеномного анализа суспензии рапсового жмыха обнаружили присутствие более 28 родов бактерий. Наибольшее процентное содержание пришлось на бактерии родов *Weisella* (до 45,8 % на 2-е сутки), *Acinetobacter* (до 40,6 % на 7-е сутки), *Lactobacillus* (до 15,7 % на 5-е сутки), *Leuconostoc* (до 15,1 % на 7-е сутки), *Enterococcus* (до 14,6 % на 5-е сутки) и *Paenibacillus* (до 16,3 % на 9-е сутки).
Полученные изоляты представляют интерес в качестве промышленных продуцентов полезных метаболитов (ферментов, пигментов, органических кислот и др.). Дальнейшая работа будет направлена на идентификацию микроорганизмов для определения их видовой принадлежности. Это позволит выявить их полезные характеристики и подобрать оптимальные условия культивирования.

Ключевые слова. Рапс, жмых, отходы пищевых производств, нативная микробиота, ферментация, микроорганизмы-продуценты

Финансирование. Исследования проведены по теме FGUS-2022-0003 в рамках государственного задания № 075-01190-22-00 Всероссийского научно-исследовательского института пищевых добавок (ВНИИПД).

Для цитирования: Исследование нативной микробиоты рапсового жмыха – потенциального источника промышленных продуцентов / О. П. Свердлова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2024. Т. 54. № 2. С. 245–260. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2504

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2504
https://elibrary.ru/YMIEWZ

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

Native Microbiota of Rapeseed Cake as Potential Source of Industrial Producers

Olga P. Sverdlova[1], Elizaveta V. Podshivalova[2], Natalya Yu. Sharova[1,2], Daria D. Belova[1,*]

[1] *All-Russian Research Institute for Food Additives, St. Petersburg, Russia*

[2] *ITMO University, St. Petersburg, Russia*

Received: 05.12.2024
Revised: 25.01.2024
Accepted: 06.02.2024

**Daria D. Belova: antonina-daria@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-0630-7658*
Olga P. Sverdlova: https://orcid.org/0000-0002-1786-0061
Elizaveta V. Podshivalova: https://orcid.org/0009-0007-9006-5201
Natalya Yu. Sharova: https://orcid.org/0000-0002-4208-9299

© O.P. Sverdlova, E.V. Podshivalova, N.Yu. Sharova, D.D. Belova, 2024

Abstract.
Rapeseed oil production is very active in Russia. Its main by-product is cake: its chemical composition and availability make it an excellent source of nutrients in microbial cultivation to be used as biologically active compounds or as part of functional products. The research objective was to study the native microbiota of rapeseed cake under conditions of high humidity, as well as to describe the morphology of isolated microorganisms and determine their genera by NGS sequencing.
The study featured rapeseed cake and microbial colonies isolated after 2, 5, 7, and 9 days of fermentation. The microbial isolates were obtained by the method of surface and deep cultivation on solid and liquid nutrient media, respectively. The metagenomic analysis of the microbial taxonomy involved sequencing on the Illumina platform.
The experiment revealed 16 types of colonies with different morphology. Colonies with morphology 1, 3, 8, 12, and 13 were predominant for all fermentation periods, which means that they grew as isolates during the liquid-phase fermentation. The metagenomic analysis revealed at least 28 genera of bacteria in the rapeseed cake suspensions. The highest percentage belonged to *Weisella* (≤ 45.8% on day 2), *Acinetobacter* (≤ 40.6% on day 7), *Lactobacillus* (≤ 15.7% on day 5), *Leuconostoc* (≤ 15.1% on day 7), *Enterococcus* (≤ 14.6% on day 5), and *Paenibacillus* (≤ 16.3% on day 9).
The obtained isolates could be of interest as industrial producers of useful metabolites, e.g., enzymes, pigments, organic acids, etc. Further research will identify the microbial species, their useful properties, and optimal cultivation conditions.

Keywords. Rapeseed, cake, food production waste, native microbiota, fermentation, microorganisms-producers

Funding. The research was part of FGUS-2022-0003 research topic, State Assignment No. 075-01190-22-00 to the All-Russian Research Institute for Food Additives (VNIIPD).

For citation: Sverdlova OP, Podshivalova EV, Sharova NYu, Belova DD. Native Microbiota of Rapeseed Cake as Potential Source of Industrial Producers. Food Processing: Techniques and Technology. 2024;54(2):245–260. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2024-2-2504

Введение

Производство и переработка семян рапса в России в последние десятилетия активно развиваются. Данная культура адаптируется к почвенно-климатическим условиям регионов рискованного земледелия, быстро созревает и дает стабильный урожай. Основным продуктом, получаемым из семян рапса, является пищевое масло с ценным жирнокислотным составом, которое используют в пищу и в качестве сырьевого компонента для производства пищевых продуктов [1]. Поскольку семена рапса содержат примерно 40–45 % масла, то более половины оставшегося сырья превращается в прессованный рапсовый жмых – основной побочный продукт производства рапсового масла [2]. Жмых характеризуется высоким содержанием белка, липидов, клетчатки и является природным источником минералов, витаминов и фенольных соединений [3].

Рапсовый жмых применяют в кормлении различных сельскохозяйственных животных отдельно и в составе комбикормов, а также в качестве удобрений для растений или получения белковых концентратов [4, 5]. Включение рапсового жмыха в состав полиуретановой матрицы позволило получить композитный материал с улучшенными физико-химическими свойствами,

что делает его перспективным объектом исследования в области материаловедения [6]. Применение порошка рапсового жмыха в качестве стабилизатора эмульсий может повысить его ценность для пищевой промышленности [7, 8]. Из рапсового жмыха выделяют соединения с высокой добавленной стоимостью (белок и полифенолы) путем ферментации молочнокислыми бактериями и ферментативной обработки [9].

Быстрое развитие производства рапса в России и его широкое распространение в мире ведет к увеличению производства рапсового жмыха. Биотехнологическая переработка жмыха считается экономически эффективным способом переработки побочных продуктов для получения и восстановления ценных биологически активных соединений (белков, пептидов, ферментов, пигментов и фенольных соединений), которые представляют экономический и промышленный интерес при одновременном получении продуктов с улучшенной питательной ценностью [10].

Изучение микробного сообщества рапсового жмыха позволит выделить основные группы микроорганизмов, которые могут быть культивированы с использованием данного типа сырья, и определить их полезные биохимические свойства.

Целью работы являлось получение данных о морфологических характеристиках нативной микробиоты рапсового жмыха при помощи его жидкофазной ферментации в присутствии собственной микробиоты и определение преобладающих микроорганизмов на различных этапах ферментации и таксономической принадлежности выделенных микроорганизмов до рода при помощи секвенирования нового поколения (Next generation sequencing, NGS-секвенирование).

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись рапсовый жмых (производитель «Рецепты Дедушки Никиты», г. Екатеринбург) и колонии микроорганизмов, выделенные в результате ферментации рапсового жмыха.

Определение влажности. Влажность рапсового жмыха определяли по ГОСТ Р 54705. Метод основан на высушивании пробы при температуре 130 ± 2 °С. Предварительно высушенные в сухожаровом шкафу (DaihanLabtech LDO-E, Южная Корея) при температуре 130 °С в течение 30 мин и охлажденные в эксикаторе в течение 40 мин алюминиевые бюксы взвешивали с закрытыми крышками на аналитических весах (AND GR-200, Япония). В бюксы отбирали по 5 г рапсового жмыха и распределяли тонким слоем по дну бюксы. Затем пробы с открытыми крышками помещали в сухожаровой шкаф при 130 °С и выдерживали в течение 40 мин. Далее бюксы с закрытыми крышками охлаждали в эксикаторе в течение 40 мин и взвешивали на аналитических весах.

Ферментация. Для проведения ферментации рапсовый жмых смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1:9 (30 ± 1 г рапсового жмыха и 270 см^3 стерильной дистиллированной воды) в качалочных колбах Эрленмейера. Полученную суспензию выдерживали в шейкере-инкубаторе (INFORS HT multitron standard, Швейцария) при температуре 28 ± 1 °С и частотой вращения платформы 180 об/мин в течение 9 суток [11]. Надосадочную жидкость отбирали в стерильных условиях на 2, 5, 7 и 9 сутки ферментации.

Динамика изменения количества биомассы. Оптическую плотность полученных в результате ферментации проб на 2, 5, 7 и 9 сутки измеряли на спектрофотометре (Shimadzu UF-1800, Япония) при длине волны 600 нм и толщине проходящего слоя 1 см.

Выделение консорциумов. Колонии микроорганизмов получали методом поверхностного культивирования на плотной питательной среде – мясопептонном агаре (МПА; НИЦФ, Россия). Все манипуляции с микроорганизмами проводили в ламинарном боксе II класса биологической безопасности (ESCO Streamline®, Сингапур). Суспензию микроорганизмов, полученную в результате ферментации рапсового жмыха, разводили в 100, 1000 и 10 000 раз в стерильной дистиллированной воде. Далее 100 мкл разбавленной суспензии микроорганизмов вносили в чашку Петри со средой МПА и распределяли стерильным шпателем Дригальского в трех направлениях и двукратной повторности. Затем чашки Петри выдерживали в термостате (Memmert UF75, Германия) при температуре 28 ± 1 °С в течение 3 суток. В результате этого получали консорциумы нативной микробиоты рапсового жмыха на чашках Петри. Воздух в ламинарном боксе и качество стерилизации ультрафиолетовым излучением проверяли с использованием контрольных чашек без инокулята.

Морфологию колоний оценивали по следующим характеристикам: размер (диаметр) колонии, цвет, прозрачность, однородность, край, поверхность, форма и профиль [12].

Выделение изолятов. Из полученных консорциумов микроорганизмов случайным образом отбирали отдельные оформленные колонии и высевали на плотную питательную среду МПА методом истощающего штриха. Затем чашки Петри выдерживали в термостате при температуре 28 ± 1 °С в течение 3 суток. Пересев вели до тех пор, пока культура визуально не становилась однородной. Биомассу микроорганизмов собирали с чашек в конические микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф с 1 мл стерильной дистиллированной воды и отправляли на хранение в морозильную камеру (POZIS ХЛ-250, Россия) при –20 ± 1 °С. Микроорганизмы, которые показали плохой рост на МПА, пересевали сначала на жидкую питательную среду Луриа-Бертани (LB: триптон 20 г/л, дрожжевой экстракт 10 г/л, натрия хлорид 20 г/л), а затем, если не наблюдался прирост биомассы, на жидкую среду Сабуро (пептон 10 г/л, глюкоза 20 г/л). Для этого в стерильные центрифужные пробирки типа Фалькон на 15 мл вносили 10 мл среды и 2 мл смыва с поверхности чашки Петри и выдерживали в термостате при

температуре 28 ± 1 °С в течение 3 суток. Если не наблюдался прирост биомассы, то выдерживали еще 3 суток при 37 ± 1 °С. Если при данных условиях рост усиливался, то биомассу отбирали путем центрифугирования в конические микроцентрифужные пробирки и хранили как описано ранее.

Метагеномный анализ. Полученные во время ферментации суспензии микроорганизмов на 2, 5, 7 и 9 сутки культивирования использовали для метагеномного анализа. Из них выделили образцы ДНК, из которых готовили индексированные библиотеки фрагментов генов 16S рРНК на вариабельный участок гена v4 с праймерами Ferier_F515 (5'-3') GTGCCAGCMGCCGCGGTAA/ Ferier_R806 (5'-3') GGACTACVSGGGTATCTAAT (Т отжига = 55 °С), полученные методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Очистку и анализ ампликонных библиотек для каждого образца провели методом высокопроизводительного секвенирования амплифицированнных фрагментов ДНК с обоих концов на секвенаторе Illumina MiSeq (Illumina.inc, США). Провели первичную биоинформационную обработку полученных данных с предоставлением результатов в виде таксономических диаграмм распределения микроорганизмов. Секвенирование и первичную обработку данных провели в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии.

Результаты и их обсуждения

Влажность рапсового жмыха. В связи с рассыпчатой структурой рапсового жмыха, способной абсорбировать влагу из окружающей среды, важным показателем, который влияет на численность микроорганизмов нативной микробиоты, является влажность. По результатам измерений массовая доля влаги и летучих веществ составила 6,8 ± 0,3 %, что соответствует требованиям ГОСТ 11048, где массовая доля влаги должна находиться в пределах 6–9 %. Полученные данные свидетельствуют о том, что для исследуемого рапсового жмыха соблюдались правильные условия хранения по влажности, что влияет на его качество. В частности, позволяет снизить концентрацию микроорганизмов порчи, таких как плесневые грибы.

Динамика изменения количества биомассы в процессе ферментации представлена на рисунке 1.

Из графика видно, что оптическая плотность возрастает с течением времени ферментации, что свидетельствует об увеличении количества биомассы нативной микробиоты рапсового жмыха.

Выделение консорциумов. Группы микроорганизмов, выделенные в результате первичного анализа на основе морфологии колоний, представлены в таблице 1.

Выделенные колонии по морфологическим характеристикам были разделены на 16 групп. Большинство представленных групп обладает небольшими размерами

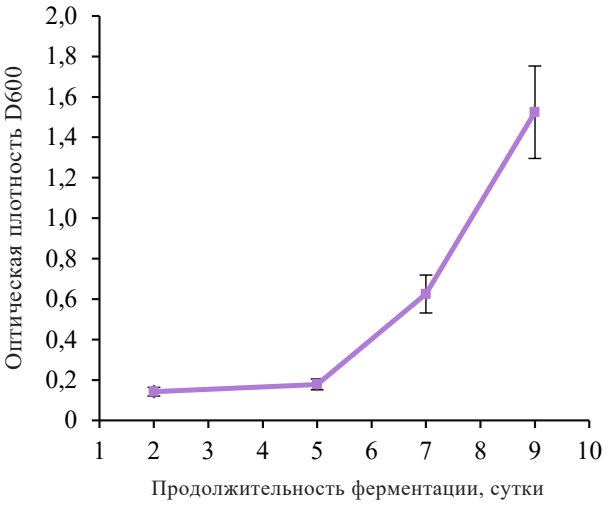


Рисунок 1. Динамика изменения количества биомассы в процессе ферментации рапсового жмыха

Figure 1. Biomass amount during rapeseed cake fermentation

(до 5 мм в диаметре), но встречаются колонии больших размеров (до 3 см в диаметре). Для большинства групп преобладает белый цвет колонии, но для некоторых колоний характерно наличие окрашивающих пигментов (розовый, оранжевый и желтый). Среди групп встречаются как полупрозрачные, так и непрозрачные колонии. Выделенные колонии отличались большим разнообразием краев: гладкие, реснитчатые, волнистые или лопастные. Глянцевая поверхность присуща большинству групп колоний, но также наблюдалась и матовая. Профили колоний выделенных групп отличались большим разнообразием: встречались как врастающие в агар, так и выпуклые каплевидные.

Преобладающими являлись 5 типов колоний, которые менялись с течением времени ферментации. Наибольшее количество наблюдается у колоний 1-ой группы – это белые полупрозрачные колонии с непрозрачным центром. Они встречаются во всех исследованных образцах, а их количество увеличивается с течением времени ферментации. Второй преобладающей по концентрации группой является 3 группа (белые непрозрачные выпуклые колонии), которая наблюдалась на протяжении всего периода ферментации в высоких концентрациях. Третьей по распространенности стала 8 группа колоний – это белые полупрозрачные колонии до 2 см в диаметре с каплевидным профилем. Также часто встречались бактерии 12 и 13 групп. Желтые и розовые колонии, а также белые полупрозрачные колонии с конусовидным профилем и диаметром до 10 мм встречались реже.

Выделение изолятов. Пример выделенного изолята из консорциума микроорганизмов методом истощающего штриха представлен на рисунке 2.

В процессе работы выделили 127 изолятов, 10 из которых показали недостаточный прирост биомассы на всех

Таблица 1. Характеристика морфологии колоний выделенных групп микроорганизмов из рапсового жмыха

Table 1. Morphology of microorganisms isolated from rapeseed cake

Группа	1	2	3	4	5	6	7	8
Размер колонии, мм	1–3	3–5	1–2	5–7	1–2	8–10	2–3	1–2
Цвет	Белый	Розовый	Белый	Белый	Желтый	Бежевый	Оранжевый	Белый
Прозрачность	Полупрозрачная	Непрозрачная	Непрозрачная	Полупрозрачная	Непрозрачная	Непрозрачная	Непрозрачная	Полупрозрачная
Однородность	Неоднородная (плотнее в центре)	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная	Однородная
Край	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Реснитчатый
Поверхность	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая	Матовая
Форма	Круглая	Круглая	Круглая	Круглая	Круглая	Концентрическая	Круглая	Круглая
Профиль	Конусовидный или выпуклый	Выпуклый	Выпуклый	Изогнутый, плоский	Выпуклый	Конусовидный	Выпуклый	Каплевидный, врастающий в агар

Группа	9	10	11	12	13	14	15	16
Размер колонии, мм	10–20	5–7	10–30	3–4	3–10	3–4	5–7	4–6
Цвет	Кремовый	Белый	Белый	Белый	Белый	Молочно-белый	Белый	Желто-лимонный
Прозрачность	Полупрозрачная	Непрозрачная	Полупрозрачная	Полупрозрачная	Непрозрачная	Полупрозрачная	Полупрозрачная	Непрозрачная
Однородность	Неоднородная (с плотным центром)	Неоднородная (морщинистая по краям)	Неоднородная (более плотная в центре)	Неоднородная (более плотная в центре)	Однородная	Неоднородная (более прозрачная в центре)	Однородная	Однородная
Край	Волнистый	Лопастной	Лопастной	Лопастной	Гладкий	Гладкий	Гладкий	Гладкий
Поверхность	Глянцевая	Матовая	Матовая	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая	Глянцевая
Форма	Круглая с фестончатым краем	Ризоидная, складчатая	Ризоидная, складчатая	Круглая с фестончатым краем	Круглая	Круглая	Овальная или круглая	Круглая
Профиль	Выпуклый	Изогнутый	Изогнутый	Конусовидный	Выпуклый	Кратерообразный	Выпуклый	Плоский

используемых средах, в отличие от консорциумов, где данная группа колоний была преобладающей (белые полупрозрачные у края колонии до 5 мм в диаметре).

Метагеномный анализ. Данные о типах бактерий, которые обнаружили при ферментации рапсового жмыха под влиянием нативной микробиоты, полученные в результате метагеномного анализа с помощью NGS-секвенирования, представлены на рисунке 3.

Из рисунка 3 видно, что преобладающим типом бактерий в течение времени ферментации были *Firmicutes*. Содержание данных бактерий в большинстве рассматриваемых образцов оказалось более 70 %. Тип *Firmicutes* состоит из 26 семейств и 223 родов. Для данного типа характерна жесткая клеточная стенка, которая содержит мурамовую кислоту, хотя встречаются бактерии с тейховой кислотой. Большинство представителей является грамположительными бактериями, но есть и грамотрицательные (*Veillonellaceae* и *Syntrophomonadaceae*). По фенотипу выделяют клетки сферической, прямой или изогнутой формы, со спиралевидными стержнями или нитями, жгутиками или без них, термостойкими эндоспорами или без них. По отношению к кислороду встречаются как аэробы, так и строгие анаэробы. Встречаются термофилы и галофилы. Большинство из них – хемоорганотрофы, некоторые – аноксигенные фотогетеротрофы. Они растут при нейтральном pH, а некоторые являются ацидофилами или алкалофилами. Отличительной генетической характеристикой данного типа является содержание гуанинцитозиновых пар (ГЦ-пар) в ДНК менее 50 мол.% [13, 14]. При исследовании почвенной микробиоты сои (маслосодержащее растение) было обнаружено присутствие фирмикутных бактерий в небольших количествах [15]. При метагеномном анализе семян 50 видов растений данный тип встречался в меньших количествах для рапса, чем для других исследуемых видов растений [16].

Рисунок 2. Выделенный изолят микроорганизмов методом истощающего штриха

Figure 2. Microorganisms isolated by depletion streaking

Вторым преобладающим типом был *Proteobateria*. Около 30 % бактерий из обнаруженных на 2, 5 и 9 сутки относились к этому типу. На 7-е сутки количество данного типа бактерий составил 43,1 %. В домене *Bacteria* тип *Proteobacteria* составляет крупную и фенотипически разнообразную филогенетическую линию. Всего выделяют 5 основных классов: альфапротеобактерии, бетапротеобактерии, гаммапротеобактерии, дельтапротеобактерии и эпсилонпротеобактерии. К данному типу относится большинство грамотрицательных микроорганизмов, которые отличаются широким разнообразием метаболических путей. Некоторые роды внутри данного типа имеют экологическое значение, поскольку играют ключевые роли в круговороте углерода, серы и азота на планете. *Proteobacteria* характеризуются разнообразием морфологических и физиологических типов [17]. Встречаются палочки, кокки, изогнутые, спиральные, кольцевидные, придаточные, нитевидные и оболочечные формы. Большинство *Proteobacteria* относится к мезофилам, но описаны некото-

	Таксономия	2-е сутки	5-е сутки	7-е сутки	9-е сутки
	Bacteria;Actinobacteriota	0.1%	0.0%	0.0%	0.8%
	Bacteria;Bacteroidota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Campilobacterota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Deinococcota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Firmicutes	70.5%	70.6%	56.9%	71.2%
	Bacteria;Fusobacteriota	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Patescibacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria	29.4%	29.0%	43.1%	28.0%
	Bacteria;unclassified_Bacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Unclassified;Other	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%

Рисунок 3. Распределение бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха по типам

Figure 3. Types of native microbiota in rapeseed cake

рые термофильные (*Thiomonas thermosulfata* и *Tepidomonas*) и психрофильные (*Polaromonas*) представители. Бактерии данного типа имеют подвижность из-за различных механизмов: от жгутиков до скользящего движения. Встречаются как свободноживущие, так и симбиотические организмы, такие как клубеньковые азотфиксаторы или внутриклеточные эндосимбионты простейших, а также облигатные внутриклеточные паразиты человека и млекопитающих. По типу питания они бывают хемоорганотрофами (*Escherichia coli*), хемолитотрофами (бактерии, окисляющие серу (*Thiobacillus*), и бактерии, окисляющие аммиак (*Nitrosomonas*)) или фототрофами (пурпурный *Chromatium* и *Rhodospirillum*). По отношению к кислороду данный тип включает строго аэробные и анаэробные виды, а также факультативные аэробы и микроаэрофилы [18]. *Proteobacteria* был обнаружен в больших количествах (25 %) при исследовании ризосферного сообщества рапса (*Brassica napus*) [19]. Данный тип являлся преобладающим при изучении почвенной микробиоты сои [15]. В исследовании нативной микробиоты семян различных растений было обнаружено преобладающее содержание *Proteobacteria* для большинства растений, включая рапс (более 70 %) [16].

На 2-е и 9-е сутки в малых количествах обнаружены ДНК бактерий типа *Actinobacteriota* (менее 1 %). Актинобактерии представляют собой грамположительные организмы, которые характеризуются высоким соотношением ГЦ-пар и большими геномами (более 8 Мб). Отличительной чертой данного типа является нитевидная форма клеток. Тип *Actinobacteriota* включает 6 классов, 6 порядков, 14 подотрядов и 56 семейств. Актинобактерии являются автохтонными обитателями почвы и моря, часто входят в состав доминирующей популяции их экосистем, а также могут встречаться в экстремальных условиях. Представители данного типа получили свою известность благодаря продуцированию различных антибиотиков, таких как стрептомицин. Однако некоторые известны как патогены человека и животных, которые вызывают такие болезни, как туберкулез. Многие из актинобактерий являются свободноживущими почвенными бактериями. Также к этой группе относятся патогенные или сапрофитные организмы, встречаются симбиотические виды. Характерной чертой большого числа представителей актинобактерий является образование спороносных органов (конидии, спорангии и одиночные споры на спорофорах). Некоторые актинобактерии относятся к экстремофилам. Они встречаются в пустынях, полярных районах, кислых и щелочных почвах, глубоко под водой и в других экстремальных зонах [20]. Актинобактерии являются богатым источником вторичных метаболитов. Кроме того, многие представители различных подотрядов, относясь к сапрофитам, способны разлагать различные углеводородные соединения, включая полимеры (целлюлоза, гемицеллюлозы, хитин и лигнин) [21]. Полученные значения отличаются от данных, полученных при исследовании ризосферы рапсового жмыха, где тип *Actinobacteriota* являлся преобладающим среди других обнаруженных бактерий (21–24 %) [19]. Большой процент содержания актинобактерий обнаружили при исследовании микробиома ризосферы сои [15]. Микробиота семян рапса также содержала в своем составе некоторое количество актинобактерий [16].

Распределение бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха по классам представлено на рисунке 4.

Таксономия	2-е сутки	5-е сутки	7-е сутки	9-е сутки
Bacteria;Actinobacteriota;Acidimicrobiia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria	0.1%	0.0%	0.0%	0.8%
Bacteria;Bacteroidota;Bacteroidia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Campilobacterota;Campylobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Deinococcota;Deinococci	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli	70.5%	70.6%	45.7%	51.4%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia	0.0%	0.0%	11.2%	19.7%
Bacteria;Firmicutes;Negativicutes	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Fusobacteriota;Fusobacteriia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Patescibacteria;Saccharimonadia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria	29.4%	29.0%	43.1%	27.9%
Bacteria;unclassified_Bacteria;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Unclassified;Other;Other	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%

Рисунок 4. Распределение бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха по классам

Figure 4. Classes of native microbiota in rapeseed cake

Среди классов прокариот наиболее встречающимся являлся класс *Bacilli*. Он характерен для всех суток ферментации в больших количествах (до 70,6 % на 5-е сутки). Классы *Bacilli* и *Clostridia* являются сестринскими классами и имеют ряд филогенетических свойств, их лучше рассматривать вместе. Эти классы характеризуются грамположительными видами бактерий, которые имеют низкий коэффициент ГЦ-пар. Это признак, отличающий эту группу от класса *Actinobacteria*, представители которого являются грамположительными с высоким коэффициентом ГЦ-пар [20]. Бактерии классов *Clostridia* и *Bacilli* обладают склонностью к синтезу биологически активных химических веществ, которые входят в состав сильнодействующих токсинов (ботулинический токсин и тетаноспазмин). Члены классов *Bacilli* и *Clostridia* представлены короткими палочками (бациллы) или круглыми (кокки), анаэробными и способными образовывать эндоспоры. Образование эндоспор, хоть и не присутствует у всех представителей классов *Bacilli* и *Clostridia*, никогда не наблюдается за пределами этих классов. Бактериальные эндоспоры представляют собой защитный механизм клетки в ответ на неблагоприятные условия среды. Упрощенные формы бактерий состоят из генома ДНК, небольшого количества цитоплазмы и специального покрытия, придающего устойчивость к теплу, радиации и другим неблагоприятным внешним условиям. Из-за их высокой устойчивости и способности расти в анаэробных условиях в течение длительного времени виды, относящиеся к патогенам, являются одними из наиболее опасных бактерий для здоровья человека и животных [22]. Данный факт осложняется тем, что многие виды класса *Bacilli* обладают антибиотикорезистентностью [23]. Некоторые термофильные и мезофильные виды класса *Bacilli*, такие как *Anoxybacillus flavithermus* и *Geobacillus* spp., выступают организмами порчи молочной продукции [24]. Виды *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* и *Bacillus subtilis* могут выступать в качестве биофунгицидов и биопестицидов, а также помогать в борьбе с бактериальными фитопатогенами [25]. Среди видов класса *Clostridia* наблюдается несколько азотфиксаторов: *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum* и *Clostridium pasteurianum* [26]. *Clostridia* могут образовывать кислоты, такие как уксусная, пропионовая и масляная, а в качестве продуктов – формиат, лактат, сукцинат и капроат. *Clostridia*, ферментирующие аминокислоты, продуцируют валерат, изовалерат, изобутират и другие промышленно важные кислоты. Регулируя параметры микробиологического синтеза, можно добиться высоких выходов кислот, снижая выход растворителей, таких как этанол, ацетон и бутанол, которые образуются параллельно с кислотами [27]. Представители данных классов не наблюдались при исследовании почвенной микробиоты сои [15].

Среди *Proteobateria* выделяется класс *Gammaproteobacteria*, который составляет около 30 % от всех выявленных классов на 2, 5 и 9-е сутки, тогда как на 7-е сутки его значение достигает 43,1 %. Члены класса *Gammaproteobacteria* имеют сходство в своей рибосомальной РНК и являются грамотрицательными, как и все подклассы класса *Proteobacteria*. *Gammaproteobacteria* обладают различными свойствами: одни являются аэробными, другие анаэробными; могут встречаться палочки, кокки и спиралевидные формы, а также разные по размеру колонии [28, 29]. Класс *Gammaproteobacteria* был обнаружен в большом количестве в почве сои [15].

Около 1 % в сумме составляют классы *Actinobacteria* и *Alphaproteobacteria*. Особенности *Actinobacteria* в рамках типа обсуждались выше. *Alphaproteobacteria* являются грамотрицательными бактериями, характеризуются небольшим размером и тесной связью с эукариотическими клетками. *Alphaproteobacteria* живут как симбионты, эндосимбионты или как внутриклеточные паразиты. Основываясь на сходстве последовательностей между *Alphaproteobacteria* и эукариотическими митохондриями, было высказано предположение о том, что эукариотические митохондрии произошли от эндосимбиотического члена класса *Alphaproteobacteria*. Существует два основных подкласса *Alphaproteobacteria*: *Rhizobiales* и *Rickettsiales*. Класс *Rhizobiales* содержит азотфиксирующие бактерии, которые живут в симбиотических отношениях с корнями растений. Класс *Rhizobiales* включает два патогенных для человека рода: *Bartonella* и *Brucella* [30]. Почвенная микробиота сои, напротив, содержит преобладающее количество *Alphaproteobacteria* в составе микробиоты, что связано с симбиотическими отношениями между соей и бактериями данного класса [15].

Порядки обнаруженных бактерий представлены на рисунке 5.

В результате исследования в рапсовом жмыхе выявили 21 порядок бактерий. Среди преобладающего класса *Bacilli* обнаружили следующие порядки: *Lactobacillales* (максимальное значение на 2-е сутки культивирования – 70,5 %), *Bacillales* (наибольшее количество на 2-е сутки культивирования – 4,2 %, затем значение колеблется в пределах 1 %), *Paenibacillales* (процент содержания данного порядка возрастает в процессе культивирования до 17,6 % на 9-е сутки), *Brevibacillales* (в сумме менее 1 % в течение всего периода ферментации) и *Staphylococcales* (значение снижается в процессе культивирования, максимально – 0,2 % на 2-е сутки).

Из определенных в результате метагеномного анализа порядков пять относятся к типу *Proteobateria*. Из них только *Rhizobiales* (в процессе ферментации возрастает до 0,1 %) относится к *Alphaproteobacteria*. Остальные порядки – это *Burkholderiales* (количество снижается с течением времени культивирования, максимальное значение на первые 2-е сутки ферментации – 26,7 %), *Pseudomonadales* (максимальное значение на 7-е сутки – 40,6 %), *Enterobacterales* (максимальное значение на 2-е сутки – 0,2 %) и *Xanthomonadale*s (определены в количестве менее 1 % на 2-е сутки). К

Таксономия	2-е сутки	5-е сутки	7-е сутки	9-е сутки
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Actinomycetales	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Bifidobacteriales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Corynebacteriales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Micrococcales	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Propionibacteriales	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%
Bacteria;Bacteroidota;Bacteroidia;Sphingobacteriales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales	4.2%	0.1%	0.2%	1.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Brevibacillales	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales	66.0%	70.5%	41.3%	32.5%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Paenibacillales	0.0%	0.0%	4.2%	17.6%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Staphylococcales	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;unclassified_Bacilli	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales	0.0%	0.0%	11.1%	19.1%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Lachnospirales	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%
Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Burkholderiales	26.7%	5.5%	2.4%	1.4%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacterales	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales	2.4%	23.4%	40.6%	26.4%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;unclassified_Bacteria;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Unclassified;Other;Other;Other	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%

Рисунок 5. Распределение бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха по порядкам

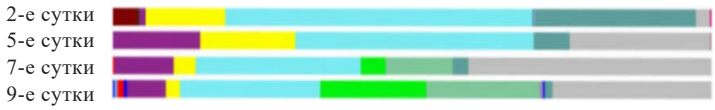
Figure 5. Orders of native microbiota in rapeseed cake

классу *Clostridia* относятся два обнаруженных порядка: *Clostridiales* с высоким содержанием (до 19,1 % на 9-е сутки ферментации) и *Lachnospirales* (до 0,6 % на 9-е сутки). *Actinobacteria* представляют малочисленную группу, среди которой определено 5 порядков (*Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Corynebacteriales*, *Micrococcales* и *Propionibacteriales*) с содержанием менее 1 % в течение всего периода ферментации. Порядок *Sphingobacteriales* принадлежит к классу *Bacteroidia*, его содержание незначительно – менее 1 % на 2-е сутки культивирования.

Распределение бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха по семействам в результате метагеномного анализа представлено на рисунке 6.

Из рисунка 6 видно, что класс *Gammaproteobacteria* представлен 7 семействами. Порядок *Burkholderiales* представлен 2 семействами – *Comamonadaceae* и *Oxalobacteraceae*, содержание которых максимально на 2-е сутки ферментации (26,7 и менее 1 % соответственно) и снижается с течением времени. Менее 1 % по содержанию представлены бактерии порядка *Enterobacterales* с семейством *Enterobacteriaceae*. К порядку *Pseudomonadales* относятся два обнаруженных семейства: *Moraxellaceae* с относительно высоким процентным содержанием (до 40,6 % на 7-е сутки) и *Pseudomonadaceae* (0,1 % на 2-е сутки ферментации). *Xanthomonadaceae* – это семейство, относящееся к порядку *Xanthomonadales*, его относительное содержание менее 1 %. К классу *Alphaproteobacteria* принадлежит только одно обнаруженное семейство. *Rhizobiaceae* содержится в количестве менее 1 % для всех исследованных суток. К классу *Clostridia* относятся два обнаруженных семейства: *Lachnospiraceae* из порядка *Lachnospirales* (содержание 0,6 % на 9-е сутки) и *Clostridiaceae* из порядка *Clostridiales* (значение возрастает до 19,1 % на 9-е сутки). Десять из выявленных семейств относятся к отряду *Bacilli*. Из них к порядку *Bacillales* относятся два семейства – *Bacillaceae* (количество снижается во время ферментации, максимально – 4,2 % на 2-е сутки) и *Planococcaceae* (содержание менее 1 %), а также до 1 % составили неклассифицированные бактерии этого порядка. К порядку *Brevibacillales* относится одно выделенное семейство – *Brevibacillaceae* (максимальное содержание 0,4 % на 9-е сутки).

Большинство выделенных семейств из отряда *Bacilli* принадлежит к порядку *Lactobacillales*. Они также представляют многочисленную группу из всех обнаруженных микроорганизмов. Из них наибольшее содержание составляет семейство *Leuconostocaceae* (51,4 % на 2-е сутки ферметации). Вторым по встречаемости семейством является *Lactobacillaceae* (максимальное процентное содержание 15,7 % на 5-е сутки ферментации). Процентное содержание семейства *Enterococcaceae* максимально на 5-е сутки – 14,6 %. В небольших количествах на ранних периодах ферментации



Таксономия	2-е сутки	5-е сутки	7-е сутки	9-е сутки
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Actinomycetales;Actinomycetaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Bifidobacteriales;Bifidobacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Corynebacteriales;Corynebacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Micrococcales;Microbacteriaceae	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Micrococcales;Micrococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Propionibacteriales;Propionibacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%
Bacteria;Bacteroidota;Bacteroidia;Sphingobacteriales;Sphingobacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae	4.2%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Planococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;unclassified_Bacillales	0.0%	0.0%	0.2%	1.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Brevibacillales;Brevibacillaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Enterococcaceae	1.1%	14.6%	10.1%	6.7%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae	13.2%	15.7%	3.5%	2.2%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Leuconostocaceae	51.4%	39.9%	27.7%	23.6%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Listeriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae	0.3%	0.2%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Paenibacillales;Paenibacillaceae	0.0%	0.0%	4.2%	17.6%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Staphylococcales;Staphylococcaceae	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;unclassified_Bacilli;Other	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae	0.0%	0.0%	11.1%	19.1%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%
Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae	26.7%	5.5%	2.4%	1.4%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Burkholderiales;Oxalobacteraceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacterales;Enterobacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacterales;unclassified_Enterobacterales	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Moraxellaceae	2.3%	23.4%	40.6%	26.4%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;unclassified_Bacteria;Other;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Unclassified;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%

Рисунок 6. Распределение бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха по семействам

Figure 6. Families of native microbiota in rapeseed cake

обнаружены семейства *Listeriaceae* и *Streptococcaceae* (до 0,3 %). *Paenibacillaceae* из порядка *Paenibacillales* повышает свое процентное содержание во время ферментации до 17,6 % на 9-е сутки ферментации. Порядок *Staphylococcales* представлен одним семейством – *Staphylococcaceae* (максимально 0,2 % на 2-е сутки, затем содержание снижается в процессе ферментации). Семейство *Sphingobacteriaceae* из порядка *Sphingobacteriales* обнаружено только на 2-е сутки ферментации в содержании менее 1 %. В относительно низких концентрациях выявлены семейства из класса *Actinobacteria*: *Actinomycetaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Corynebacteriaceae* и *Propionibacteriaceae* из порядков *Actinomycetales*, *Bifidobacteriales*, *Corynebacteriales* и *Propionibacteriales* соответственно. Порядок *Micrococcales* включает два обнаруженных семейства – *Microbacteriaceae* и *Micrococcaceae*.

Всего в результате метагеномного анализа бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха выявлено 28 родов, а также 8 неклассифицированных родов. Таксономия обнаруженных родов представлена на рисунке 7.

В результате анализа выявлено, что род *Bacillus* в наибольшем количестве представлен на 2-е сутки ферментации (4,2 %). Данный род – это аэробные палочки, способные к образованию эндоспор при неблагоприятных условиях. Представители рода *Bacillus* применяются в сельском хозяйстве, экологии, промышленности и медицине. Способность к спорообразованию дает роду *Bacillus* преимущество перед другими биотехнологически важными родами, поскольку препараты на основе спор хранятся в течение длительного периода времени и хорошо переносят неблагоприятные условия хранения. Многие виды *Bacillus* коммерчески используются в качестве фитостимуляторов и биоудобрений. Бактерии *Bacillus*, стимулирующие рост растений, позволяют им подавлять патогены (биоконтроль) [31]. Виды *Bacillus* повсеместно распростра-

Таксономия	2-е сутки	5-е сутки	7-е сутки	9-е сутки
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Actinomycetales;Actinomycetaceae;Actinomyces	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Bifidobacteriales;Bifidobacteriaceae;Neoscardovia	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Corynebacteriales;Corynebacteriaceae;Corynebacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Micrococcales;Microbacteriaceae;unclassified_Microbacteriaceae	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Micrococcales;Micrococcaceae;Kocuria	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Propionibacteriales;Propionibacteriaceae;Tessaracoccus	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%
Bacteria;Actinobacteriota;Actinobacteria;Propionibacteriales;Propionibacteriaceae;unclassified_Propionibacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
Bacteria;Bacteroidota;Bacteroidia;Sphingobacteriales;Sphingobacteriaceae;Sphingobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae;Bacillus	4.2%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Planococcaceae;unclassified_Planococcaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;unclassified_Bacillales;Other	0.0%	0.0%	0.2%	1.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Brevibacillales;Brevibacillaceae;Brevibacillus	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Enterococcaceae;Enterococcus	1.1%	14.6%	10.1%	6.7%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus	13.0%	15.7%	3.5%	2.2%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Pediococcus	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;unclassified_Lactobacillaceae	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Leuconostocaceae;Leuconostoc	5.3%	10.7%	15.1%	12.8%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Leuconostocaceae;Weissella	45.8%	29.0%	12.4%	10.4%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Leuconostocaceae;unclassified_Leuconostocaceae	0.3%	0.2%	0.2%	0.4%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Listeriaceae;Brochothrix	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Streptococcaceae;Lactococcus	0.3%	0.2%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Paenibacillales;Paenibacillaceae;Paenibacillus	0.0%	0.0%	4.1%	16.3%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Paenibacillales;Paenibacillaceae;unclassified_Paenibacillaceae	0.0%	0.0%	0.1%	1.3%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Staphylococcales;Staphylococcaceae;Staphylococcus	0.2%	0.1%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Bacilli;unclassified_Bacilli;Other;Other	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae;Clostridium sensu stricto 1	0.0%	0.0%	5.3%	4.6%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae;Clostridium sensu stricto 13	0.0%	0.0%	0.9%	0.2%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae;Clostridium sensu stricto 3	0.0%	0.0%	0.8%	2.0%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae;unclassified_Clostridiaceae	0.0%	0.0%	4.1%	12.4%
Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;Lachnoclostridium	0.0%	0.0%	0.0%	0.6%
Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae;Ensifer	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhizobiales;Rhizobiaceae;Ochrobactrum	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Burkholderiales;Comamonadaceae;Paucibacter	26.7%	5.5%	2.4%	1.4%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Burkholderiales;Oxalobacteraceae;Janthinobacterium	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacterales;Enterobacteriaceae;unclassified_Enterobacteriaceae	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacterales;unclassified_Enterobacterales;Other	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Moraxellaceae;Acinetobacter	2.3%	23.4%	40.6%	26.4%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae;Pseudomonas	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae;Stenotrophomonas	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Bacteria;unclassified_Bacteria;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Unclassified;Other;Other;Other;Other;Other	0.0%	0.3%	0.0%	0.0%

Рисунок 7. Распределение бактерий нативной микробиоты рапсового жмыха по родам

Figure 7. Genera of native microbiota in rapeseed cake

нены в природе, но в более высоких концентрациях обнаруживаются в почве, воде и пищевых продуктах растительного происхождения. Штаммы *Bacillus* являются потенциальными кандидатами для использования в качестве пробиотиков [32]. Метаболически виды *Bacillus* очень активны. Предыдущие исследования выявили ряд полезных ферментов и антибиотиков, которые они производят [33]. Известно о синтезе большого количества липолитических ферментов представителями данного рода [34].

Значительную по процентному содержанию группу обнаруженных бактерий представляют *Enterococcus* (максимальное значение 14,6 % на 5-е сутки ферментации) – грамположительные факультативно анаэробные кокки с короткими и средними цепочками. *Enterococcus* встречаются в почве, воде, пищевых продуктах, сточных водах, растениях, коже человека, полости рта и толстом кишечнике. *Enterococcus* обладают высокой устойчивостью и могут выживать в сложных условиях среды, что делает их опасными организмами для человека. Некоторые штаммы обладают антибиотикорезистентностью. Например, к ванкомицину [35]. *Enterococcus* известны за свою способность к синтезу молочной кислоты [36, 37].

До 15,7 % на 5-е сутки культивирования принадлежит роду *Lactobacillus*. Представители этого рода не образуют спор, имеют палочковидную форму, часто организованны в цепочки, хотя могут наблюдаться

коккобациллы. Оптимум температуры составляет от 30 до 40 °C. Показатель кислотности среды варьируется от 3 до 8. По отношению к кислороду бактерии являются анаэробами или микроаэрофилами. В качестве основного продукта брожения производят молочную кислоту [38]. *Lactobacillus* известны как пробиотики, которые положительно влияют на здоровье человека из-за их способности продуцировать экзополисахариды. Экзополисахаридпродуцирующие виды *Lactobacillus* используются в качестве заквасочных культур для производства ферментированных пищевых продуктов [39]. Виды *Lactobacillus* обладают большей липазной активностью по сравнению с *Bacillus* sp. и *Pseudomonas* sp. [40].

Род *Leuconostoc* был обнаружен для всех исследованных образцов с максимальным содержанием на 7-е сутки ферментации – 15,1 %. Представители рода – это грамположительные факультативно-анаэробные неспорообразующие неподвижные молочнокислые гетероферментативные бактерии. Большинство штаммов *Leuconostoc* имеет сферическую морфологию, которая варьируется в зависимости от условий культивирования и представляет собой одиночные клетки или цепочки [41]. *Leuconostoc* является основным родом бактерий в ферментированных пищевых продуктах. *Leuconostoc* продуцируют молочную и уксусную кислоты, углекислый газ, этиловый спирт, декстран, эфиры, ароматические вещества ацетоин и диацетил, т. к. являются гетероферментативными бактериями. Низкомолекулярные органические соединения, производимые *Leuconostoc*, придают ферментированным продуктам вкус и аромат [42]. Представители данного рода способны продуцировать липазы [43].

Наибольшее процентное содержание в течение всего периода ферментации принадлежит роду *Weissella*. Бактерии данного рода являются факультативными анаэробами, клетки имеют яйцевидную форму или форму коротких палочек, встречаются парами или короткими цепочками. Штаммы *Weissella* были выделены из различных природных источников, в том числе из ферментированных пищевых продуктов. Для данного рода характерен гексозомонофосфатный и фосфокетолазный путь, конечными продуктами которых являются молочная и уксусная кислоты, углекислый газ и этанол. Оптимум температур приходится на интервал от 15 до 37 °C, но некоторые штаммы *Weissella cibaria* и *Weissella confusa* способны расти при 45 °C [44, 45].

Процентное содержание рода *Paenibacillus* увеличивалось в течение ферментации и на 9-е сутки составило 16,3 %. *Paenibacillus* имеют палочковидную форму. Грамположительные факультативно анаэробные или строго аэробные бактерии подвижны за счет перитрехиальных жгутиков. Большинство видов каталазоположительно. Колонии обычно гладкие и полупрозрачные светло-коричневого, белого или розового цвета. Оптимум температуры находится в интервале от 28 до 40 °C, pH – 7, но некоторые виды являются как алкалофильными, так и ацидофильными. Представители этого рода известны как азотфиксаторы, солюбилизаторы фосфатов, продуценты антимикробных соединений и различных экзополисахаридов. Также сообщается об их способности к деградации некоторых ксенобиотиков. Некоторые виды рода способны к биоконтролю и биоремедиации, а также могут выступать как стимуляторы роста растений. Кроме того, виды *Paenibacillus* продуцируют различные ферменты, такие как протеазы, липазы, амилазы, целлюлазы и гемицеллюазы, которые могут применяться в промышленных процессах [46–48].

Роды *Clostridium sensu stricto*, относящиеся к истинным клостридиям, в небольших количествах присутствовали на 7-е и 9-е сутки ферментации. Для представителей рода *C. sensu stricto* характерно присутствие мезодиаминопимелиновой кислоты в составе пептидогликана. По типу питания большинство видов *Clostridium* гетеротрофы, но встречаются хемолитоавтотрофы (осуществляют гомоацетатное брожение с образованием спиртов и органических кислот в качестве конечных продуктов) [49]. Для большинства видов рода *Clostridium*, способных к маслянокислому брожению, бутанол является основным продуктом. Получение таких продуктов делает род *Clostridium* ценным с биотехнологической точки зрения [50]. Представители данного рода являются также продуцентами протеолитических ферментов. *Clostridium histolyticum* является известным продуцентом коллагенолитических протеаз. Известно о продукции липолитических ферментов представителями данного рода. Например, *Clostridium tetanomorphum* продуцирует внеклеточную липазу [26, 51].

До 12,4 % на 9-е сутки ферментации приходится на бактерии семейства *Clostridiaceae*, которые не были идентифицированы до рода.

Процентное содержание бактерии рода *Paucibacter* составило до 26,7 % на 2-е сутки ферментации. Сообщалось об использовании штамма *Paucibacter aquatile* DH15 для борьбы с цветением вредных цианобактерий. Данный штамм проявляет цианобактерицидную активность против *Microcystis aeruginosa* за счет сочетания физического прикрепления и секреции цианобактерицидного соединения [52]. Вид *Paucibacter toxinivorans* способен к деградации микроцистинов и нодуларина (цианобактериальные гепатотоксины). Это делает его перспективным объектом исследования в области борьбы с вредными цианобактериями и очистки воды от их токсинов [53].

Род *Acinetobacter*, наравне с *Weissella*, составляет наибольший процент от всех присутствующих микроорганизмов при ферментации рапсового жмыха. *Acinetobacter* представляет из себя род грамотрицательных неподвижных строго аэробных коккобацилл. *Acinetobacter* spp. считаются непатогенными для здоровых людей, но известны случаи возникновения инфекционных поражений данным родом, что осложняется их

антибиотикорезистентностью. Виды *Acinetobacter* широко распространены в окружающей среде. Сообщалось о способности некоторых видов *Acinetobacter* продуцировать липолитические ферменты [54]. Известно о продукции *Acinetobacter parvus* в экзохитиназы для преобразования хитина в N-ацетил-β-D-глюкозамин (GlcNAc), который широко используется в качестве биоагента и функциональной пищевой добавки [55]. Глубинная ферментации *Acinetobacter nosocomialis* RR20 позволяет получить полигидроксибутират, который применяется в пищевой промышленности и медицине [56].

Остальные выявленные по родам бактерии были представлены в небольших количествах (менее 1 %) в процессе всего периода ферментации. Это бактерии рода *Actinomyces*, *Neoscardovia*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Tessaracoccus*, *Sphingobacterium*, *Brevibacillus*, *Pediococcus*, *Brochothrix*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Lachnoclostridium*, *Ensifer*, *Ochrobactrum*, *Janthinobacterium*, *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas*.

Полученные результаты отличаются от данных, представленных при исследовании микробиоты цельных семян рапса, где среди всех выявленных родов микроорганизмов 15 составили основную массу. Это такие роды, как *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, unclassified *Enterobacteriaceae*, *Sphingobium*, *Escherichia-Shigella*, *Blastomonas*, unclassified *Microbacteriaceae*, *Streptococcus* и др. [16]. Данное различие может быть связано с обработкой семян, которой они подвергаются при маслопроизводстве (высокие температуры), а также с отличием в химических составах поверхностей цельных семян и рапсового жмыха. Кроме того, в водной среде при ферментации состав изменяется с течением времени, поскольку микроорганизмы в больших количествах продуцируют различные вещества, в том числе изменяя кислотность. Это ведет к изменению микробного сообщества в системе рапсовый жмых – вода за счет межвидовой конкуренции.

Выводы

Биотехнологическая промышленность, как и любая другая отрасль, постоянно нуждается в разработке новых подходов и использовании новых видов сырья, которое будет отвечать требованиям безопасности, эффективности и экономичности. В этом плане рапсовый жмых является перспективным вариантом для отрасли. Благодаря своему компонентному составу рапсовый жмых может использоваться в качестве субстрата для бактерий при промышленном получение таких ферментов, как липазы и протеазы. Исследование нативной микробиоты рапсового жмыха при его жидкофазной ферментации позволит выделить микроорганизмы, которые представляют интерес в качестве промышленных штаммов и способны расти на данном типе сырья.

В процессе работы описана морфология 16 основных групп микроорганизмов, которые присутствуют в отобранных образцах суспензии. Колонии с морфологией 1, 3, 8, 12 и 13 являлись преобладающими для всех суток ферментации, что позволяет предположить их рост при жидкофазной ферментации на рапсовом жмыхе в качестве изолятов. Однако следует учитывать влияние межвидовых взаимодействий при ферментации консорциума, поскольку существует вероятность, что для некоторых видов выделенных бактерий при культивировании необходимо присутствие других бактерий.

Полученные изоляты обладают широким морфологическим разнообразием по цвету, размерам, профилю и формам колоний. Выделенные цветные колонии представляют интерес в качестве потенциальных источников пигментов.

В результате метагеномного анализа суспензии рапсового жмыха было обнаружено присутствие более 28 родов бактерий. Наибольшее процентное содержание пришлось на бактерии родов *Weisella* (до 45,8 % на 2-е сутки), *Acinetobacter* (до 40,6 % на 7-е сутки), *Lactobacillus* (до 15,7 % на 5-е сутки), *Leuconostoc* (до 15,1 % на 7-е сутки), *Enterococcus* (до 14,6 % на 5-е сутки) и *Paenibacillus* (до 16,3 % на 9-е сутки). Представители всех выделенных родов распространены в природе, занимают различные экологические ниши и имеют разнообразную морфологию и условия культивирования. Они способны синтезировать широкий спектр биохимических веществ и находят разнообразное применение в различных областях промышленности. Многие из них являются продуцентами ферментов, в том числе липаз.

Дальнейшая работа направлена на идентификацию микроорганизмов для определения их видовой принадлежности. Это позволит выявить их полезные характеристики и подобрать оптимальные условия культивирования. Биомасса 127 изолятов собрана для последующего выделения ДНК и идентификации при помощи секвенирования. На следующем этапе планируется произвести количественную оценку липазной активности выбранных микроорганизмов аналитическими методами. Следует отметить, что на протяжении выбранного периода ферментации (9 суток) наблюдалось увеличение количества биомассы нативной микробиоты рапсового жмыха. Такая закономерность может быть следствием симбиотического взаимодействия микроорганизмов. В связи с этим в дальнейшей работе планируется увеличение продолжительности ферментации для более полного исследования представителей нативной микробиоты рапсового жмыха.

Критерии авторства

Е. В. Подшивалова и О. П. Свердлова: проведение исследований. Н. Ю. Шарова: руководитель исследования, концептуализация, методология и редактирование статьи. Д. Д. Белова: анализ литературных источников и подготовка статьи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

E.V. Podshivalova and O.P. Sverdlova conducted the research. N.Yu. Sharova supervised the research, developed the research concept and methodology, and proofread the manuscript. D.D. Belova reviewed scientific publications and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

References/Список литературы

1. Renzyaeva TV, Renzyaev AO, Kravtchenko SN, Reznichenko IYu. Capabilities of rapeseed oilcake as food raw materials. Storage and Processing of Farm Products. 2020;(2):143–160. (In Russ.). https://doi.org/10.36107/spfp.2020.213; https://www.elibrary.ru/SJPZJK

2. Bagnani M, Ehrengruber S, Soon WL, Peydayesh M, Miserez A, Mezzenga R. Rapeseed Cake valorization into bioplastics based on protein amyloid fibrils. Advanced Materials Technologies. 2022;8(3):2200932. https://doi.org/10.1002/admt.202200932

3. Sousa D, Salgado JM, Cambra-López M, Dias A, Belo I. Biotechnological valorization of oilseed cakes: Substrate optimization by simplex centroid mixture design and scale-up to tray bioreactor. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 2022; 17(1):121–134. https://doi.org/10.1002/bbb.2428

4. Zhou T, Chen L, Wang W, Xu Y, Zhang W, Zhang H, *et al.* Effects of application of rapeseed cake as organic fertilizer on rice quality at high yield level. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2022;102(5):1832–1841. https://doi.org/10.1002/jsfa.11518

5. Fu H, Li H, Yin P, Mei H, Li J, Zhou P, *et al.* Integrated application of rapeseed cake and green manure enhances soil nutrients and microbial communities in tea garden soil. Sustainability. 2021;13(5):2967. https://doi.org/10.3390/su13052967

6. Paciorek-Sadowska J, Borowicz M, Isbrandt M, Czupryński B, Apiecionek Ł. The use of waste from the production of rapeseed oil for obtaining of new polyurethane composites. Polymers. 2019;11(9):1431. https://doi.org/10.3390/polym11091431

7. Joseph C, Savoire R, Harscoat-Schiavo C, Pintori D, Monteil J, Faure C, *et al.* Redispersible dry emulsions stabilized by plant material: Rapeseed press-cake or cocoa powder. LWT. 2019;113;108311. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108311

8. Joseph C, Savoire R, Harscoat-Schiavo C, Pintori D, Monteil J, Faure C, *et al.* Pickering emulsions stabilized by various plant materials: Cocoa, rapeseed press cake and lupin hulls. LWT. 2020;130:109621. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109621

9. Tian Y, Zhou Y, Kriisa M, Anderson M, Laaksonen O, Kütt M-L, *et al.* Effects of fermentation and enzymatic treatment on phenolic compounds and soluble proteins in oil press cakes of canola (*Brassica napus*). Food Chemistry. 2023; 409:135339. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135339

10. Sousa D, Simões L, Oliveira R, Salgado JM, Cambra-López M, Belo I, *et al.* Evaluation of biotechnological processing through solid-state fermentation of oilseed cakes on extracts bioactive potential. Biotechnology Letters. 2023;45:1293–1307. https://doi.org/10.1007/s10529-023-03417-4

11. Wagner C, Bonte A, Brühl L, Niehaus K, Bednarz H, Matthäus B. Microorganisms growing on rapeseed during storage affect the profile of volatile compounds of virgin rapeseed oil. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2017; 98(6):2147–2155. https://doi.org/10.1002/jsfa.8699

12. Lysak VV, Zheldakova RA, Fomina OV. Workshop in microbiology. Minsk: Belarusian State University; 2015. 115 p. (In Russ.). [Лысак В. В., Желдакова Р. А., Фомина О. В. Микробиология. Практикум. Минск: БГУ, 2015. 115 с.].

13. Galperin MY. Genome diversity of spore-forming *Firmicutes.* Microbiology Spectrum. 2013;1(2). https://doi.org/10.1128/microbiolspectrum.tbs-0015-2012

14. Seong CN, Kang JW, Lee JH, Seo SY, Woo JJ, Park C, *et al.* Taxonomic hierarchy of the phylum *Firmicutes* and novel *Firmicutes* species originated from various environments in Korea. Journal of Microbiology. 2018;56:1–10. https://doi.org/10.1007/s12275-018-7318-x

15. Popescu SC, Tomaso-Peterson M, Wilkerson T, Bronzato-Badial A, Wesser U, Popescu GV. Metagenomic analyses of the soybean root mycobiome and microbiome reveal signatures of the healthy and diseased plants affected by taproot decline. Microorganisms. 2022;10(5):856. https://doi.org/10.3390/microorganisms10050856

16. Simonin M, Briand M, Chesneau G, Rochefort A, Marais C, Sarniguet A, *et al.* Seed microbiota revealed by a large-scale meta-analysis including 50 plant species. New Phytologist. 2022;234(4):1448–1463. https://doi.org/10.1111/nph.18037

17. Klūga A, Dubova L, Alsiņa I, Rostoks N. Alpha-, gamma- and beta-proteobacteria detected in legume nodules in Latvia, using full-length 16S rRNA gene sequencing. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil ans Plant Science. 2023;73(1):127–141. https://doi.org/10.1080/09064710.2023.2232681

18. Kersters K, de Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P, Stackebrandt E. Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. The Prokaryotes. Vol. 5: Proteobacteria: Alpha and beta subclasses. New York: Springer; 2006. pp. 3–37. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1

19. Floc'h, J-B, Hamel C, Newton Lupwayi, Neil Harker K, Hijri M, St-Arnaud M. Bacterial communities of the canola rhizosphere: Network analysis reveals a core bacterium shaping microbial interactions. Frontiers in Microbiology. 2020; 11:1587. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01587

20. Wink J, Mohammadipanah F, Hamedi J. Biology and biotechnology of actinobacteria. Cham: Springer; 2017. 395 p. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60339-1

21. Javed Z, Tripathi GD, Mishra M, Dashora K. Actinomycetes – The microbial machinery for the organic-cycling, plant growth, and sustainable soil health. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2021;31;101893. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101893

22. Berman JJ. Class Bacilli plus class Clostridia. In: Berman JJ, editor. Taxonomic guide to infectious diseases. Academic Press; 2012. pp. 65–71. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415895-5.00012-X

23. Muntean D, Horhat F-G, Bădițoiu L, Dumitrașcu V, Bagiu I-C, Horhat D-I, *et al.* Multidrug-resistant gram-negative Bacilli: A retrospective study of trends in a tertiary healthcare unit. Medicina. 2018;54(6):92. https://doi.org/10.3390/medicina54060092

24. Hebishy E, Yerlikaya O, Mahony J, Akpinar A, Saygili D. Microbiological aspects and challenges of whey powders – I thermoduric, thermophilic and spore-forming bacteria. International Journal of Dairy Technology. 2023;76(4):779–800. https://doi.org/10.1111/1471-0307.13006

25. Dame ZT, Rahman M, Islam T. Bacilli as sources of agrobiotechnology: recent advances and future directions. Green Chemistry Letters and Reviews. 2021;14(2):246–271. https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1905080

26. Du Y, Zou W, Zhang Ka, Ye G, Yang J. Advances and applications of *Clostridium* co-culture systems in biotechnology. Frontiers in Microbiology. 2020;11:560223. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560223

27. Diallo M, Kengen SWM, López-Contreras AM. Sporulation in solventogenic and acetogenic clostridia. Applied Microbiology and Biotechnology. 2021;105:3533–3557. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11289-9

28. Zhang Q, Zhang Z, Lu T, Yu Y, Penuelas J, Zhu Y-G, *et al.* Gammaproteobacteria, a core taxon in the guts of soil fauna, are potential responders to environmental concentrations of soil pollutants. Microbiome. 2021;9:196. https://doi.org/10.1186/s40168-021-01150-6

29. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A common factor in human diseases. BioMed Research International. 2017;2017:9351507. https://doi.org/10.1155/2017/9351507

30. Muñoz-Gómez SA, Hess S, Burger G, Franz Lang B, Susko E, Slamovits CH, *et al.* An updated phylogeny of the *Alphaproteobacteria* reveals that the parasitic *Rickettsiales* and *Holosporales* have independent origins. eLife. 2019;8:e42535. https://doi.org/10.7554/eLife.42535

31. Ahirwar NK, Singh R, Chaurasia S, Chandra R, Prajapati S, Ramana S. Effective role of beneficial microbes in achieving the sustainable agriculture and eco-friendly environment development goals: A review. Frontiers in Environmental Microbiology. 2020;5(6):111–123. https://doi.org/10.11648/j.fem.20190506.12

32. Lee N-K, Kim W-S, Paik H-D. *Bacillus* strains as human probiotics: Characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier. Food Science and Biotechnology. 2019;28:1297–1305. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00691-9

33. Koilybayeva M, Shynykul Z, Ustenova G, Abzaliyeva S, Alimzhanova M, Amirkhanova A, *et al.* Molecular characterization of some *Bacillus* species from vegetables and evaluation of their antimicrobial and antibiotic potency. Molecules. 2023;28(7):3210. https://doi.org/10.3390/molecules28073210

34. Kumar R, Goomber S, Kaur J. Engineering lipases for temperature adaptation: Structure function correlation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics. 2019;1867(11):140261. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.08.001

35. Contreras GA, Munita JM, Arias CA. Novel strategies for the management of vancomycin-resistant Enterococcal infections. Current Infectious Disease Reports. 2019;21:22. https://doi.org/10.1007/s11908-019-0680-y

36. Hassan SE-D, Abdel-Rahman MA, Roushdy MM, Azab MS, Gaber MA. Effective biorefinery approach for lactic acid production based on co-fermentation of mixed organic wastes by *Enterococcus durans* BP130. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019;20:101203. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101203

37. Wang Y, Chan K-L, Abdel-Rahman MA, Sonomoto K, Leu S-Y. Dynamic simulation of continuous mixed sugar fermentation with increasing cell retention time for lactic acid production using *Enterococcus mundtii* QU 25. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. 2020;13:112. https://doi.org/10.1186/s13068-020-01752-6

38. Divyashree S, Anjali PG, Somashekaraiah R, Sreenivasa MY. Probiotic properties of *Lactobacillus casei* – MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. Biotechnology Reports. 2021;32:e00672. https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00672

39. Riaz Rajoka MS, Wu Y, Mehwish HM, Bansal M, Zhao L. *Lactobacillus* exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. Trends in Food Science and Technology. 2020;103:36–48. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.003

40. Guan C, Tao Z, Wang L, Zhao R, Chen X, Huang X, *et al.* Isolation of novel *Lactobacillus* with lipolytic activity from the vinasse and their preliminary potential using as probiotics. AMB Express. 2020;10:91. https://doi.org/10.1186/s13568-020-01026-2

41. Zikmanis P, Brants K, Kolesovs S, Semjonovs P. Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the *Leuconostoc* genus. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2020;36:161. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02937-9

42. Leeuwendaal NK, Stanton C, O'Toole PW, Beresford TP. Fermented foods, health and the gut microbiome. Nutrients. 2022;14(7):1527. https://doi.org/10.3390/nu14071527

43. Sukohidayat NHE, Zarei M, Baharin BS, Manap MY. Purification and characterization of lipase produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 using an aqueous two-phase system (ATPS) composed of Triton X-100 and maltitol. Molecules. 2018;23(7):1800. https://doi.org/10.3390/molecules23071800

44. Teixeira CG, da Silva RR, Fusieger A, Martins E, de Freitas R, de Carvalho AF. The Weissella genus in the food industry: A review. Research, Society and Development. 2021;10(5):e8310514557. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14557

45. Kavitake D, Devi PB, Shetty PH. Overview of exopolysaccharides produced by Weissella genus – A review. International Journal of Biological Macromolecules. 2020;164:2964–2973. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.185

46. Xue H, Tu Y, Ma T, Jiang N, Piao C, Li Y. Taxonomic study of three novel *Paenibacillus* species with cold-adapted plant growth-promoting capacities isolated from root of *Larix gmelinii*. Microorganisms. 2023;11(1):130. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010130

47. do Couto MTT, da Silva AV, Sobral RVS, Rodrigues CH, da Cunha MNC, Leite ACL, *et al.* Production, extraction and characterization of a serine protease with fibrinolytic, fibrinogenolytic and thrombolytic activity obtained by *Paenibacillus graminis*. Process Biochemistry. 2022;118:335–345. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.005

48. Nguyen DL, Hwang J, Kim EJ, Lee JH, Han SJ. Production and characterization of a recombinant cold-active acetyl Xylan esterase from psychrophilic *Paenibacillus* sp. R4 strain. Applied Biochemistry and Microbiology. 2022;58:428–434. https://doi.org/10.1134/S0003683822040123

49. Li C-J, Zhang Z, Zhan P-C, Lv A-P, Li P-P, Liu L, *et al.* Comparative genomic analysis and proposal of *Clostridium yunnanense* sp. nov., *Clostridium rhizosphaerae* sp. nov., and *Clostridium paridis* sp. nov., three novel *Clostridium sensu stricto* endophytes with diverse capabilities of acetic acid and ethanol production. Anaerobe. 2023;79:102686. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102686

50. de Brito Bezerra PKS, de Azevedo JCS, dos Santos ES. Biobutanol production by batch and fed-batch fermentations from the green coconut husk hydrolysate using *C. beijerinckii* ATCC 10132. Biomass Conversion and Biorefinery. 2023. https://doi.org/10.1007/s13399-023-04537-7

51. Mills SA, Gelbard MK. Sixty years in the making: Collagenase *Clostridium histolyticum*, from benchtop to FDA approval and beyond. World Journal of Urology. 2020;38:269–277. https://doi.org/10.1007/s00345-019-02818-3

52. Le VV, Ko S-R, Kang M, Park C-Y, Lee S-A, Oh H-M, *et al.* The cyanobactericidal bacterium *Paucibacter aquatile* DH15 caused the decline of *Microcystis* and aquatic microbial community succession: A mesocosm study. Environmental Pollution. 2022;311:119849. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119849

53. Santos AA, Soldatou S, de Magalhães VF, Azevedo SMFO, Camacho-Muñoz D, Lawton LA. Degradation of multiple peptides by microcystin-degrader *Paucibacter toxinivorans* (2C20). Toxins. 2021;13(4):265. https://doi.org/10.3390/toxins13040265

54. Bunmadee S, Teeka J, Lomthong T, Kaewpa D, Areesirisuk P, Areesirisuk A. Isolation and identification of a newly isolated lipase-producing bacteria (*Acinetobacter baumannii* RMUTT3S8-2) from oily wastewater treatment pond in a poultry processing factory and its optimum lipase production. Bioresource Technology Reports. 2022;20:101267. https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101267

55. Kim TI, Ki KS, Lim DH, Vijayakumar M, Park SM, Choi SH, *et al.* Novel *Acinetobacter parvus* HANDI 309 microbial biomass for the production of *N*-acetyl-β-d-glucosamine (GlcNAc) using swollen chitin substrate in submerged fermentation. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts. 2017;10:59. https://doi.org/10.1186/s13068-017-0740-1

56. Reddy AR, Peele KA, Krupanidhi S, Prabhakar KV, Venkateswarulu TC. Production of polyhydroxybutyrate from *Acinetobacter nosocomialis* RR20 strain using modified mineral salt medium: a statistical approach. International Journal of Environmental Science and Technology. 2019;16:6447–6452. https://doi.org/10.1007/s13762-018-2102-3