ПОЧВОВЕДЕНИЕ, 2021, № 1, с. 80–89

БИОЛОГИЯ ПОЧВ

УДК 631.46

ПРОКАРИОТНЫЙ КОМПОНЕНТ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ТОРФЯНОЙ ОЛИГОТРОФНОЙ ПОЧВЫ ПРИ РАЗНОМ УРОВНЕ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

© 2021 г. Н. А. Манучарова[a], *, Н. А. Ксенофонтова[a], А. А. Белов[a], Н. Н. Каменский[a], А. В. Арзамазова[a], Г. М. Зенова[a], Р. Р. Кинжаев[a], С. Я. Трофимов[a], А. Л. Степанов[a]

[a] *МГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: manucharova@mail.ru*

Поступила в редакцию 15.04.2020 г.
После доработки 16.05.2020 г.
Принята к публикации 12.07.2020 г.

Молекулярно-биологическими методами исследованы разнообразие и биомасса метаболически активных прокариотных клеток в олиготрофной торфяной почве, загрязненной нефтью при разных уровнях минерального питания. Установлено, что доля метаболически активных компонентов в образцах исследованного торфа составляет 0.1 часть (10%) от прокариотного сообщества. Внесение в загрязненную почву полного минерального удобрения ($N_{40}P_{50}K_{50}$) на фоне известкования (1/2 гидролитической кислотности) приводит к возрастанию более чем в 2 раза биомассы клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bss* и *nifH*) и значимому уменьшению содержания нефтепродуктов. Внесение полного минерального удобрения на фоне известкования в загрязненной нефтью почве сопровождается изменением филогенетической структуры и частичным восстановлением метаболически активного прокариотного комплекса.

Ключевые слова: нефть, метаболически активный почвенный прокариотный комплекс, функциональные гены, гибридизация клеток *in situ* (FISH), метагеномный анализ

DOI: 10.31857/S0032180X2101010X

ВВЕДЕНИЕ

Обширные территории Российской Федерации, на которых происходят разливы нефти, приурочены к зонам торфяных почв средней и северной тайги. Основными характеристиками таких почв являются: высокая кислотность, низкие величины окислительно-восстановительного потенциала, малое содержание основных элементов питания, низкая скорость минерализации органического вещества, что негативно влияет на их способность к самовосстановлению после антропогенных нарушений [8]. Нефтяное загрязнение способно значительно влиять на свойства этих почв. Так, при разливах нефти на болотах значение окислительно-восстановительного потенциала торфяных почв уменьшается [8]. Все это приводит к изменению структуры микробного сообщества, увеличению количества микроорганизмов с анаэробным дыханием, что сопряжено и с разложением нефтепродуктов [8]. Установлено, что в средах без молекулярного кислорода или его лимитированием, микроорганизмы используют альтернативные акцепторы электронов для анаэробного дыхания [18]. Для выявления роли микроорганизмов в биодеградации поллютантов в окружающей среде следует оценивать структуру и активность их сообщества *in situ* прямыми методами.

Целью настоящего исследования являлась оценка разнообразия и активности прокариотного сообщества загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почвы в условиях разного минерального питания.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования явился верхний слой (0–20 см) торфяной олиготрофной почвы Fluvic Histosol, отобранной в периферийной части нефтезагрязненной крупной мочажины Среднеобской низменности (территория Приобского нефтяного месторождения вблизи села Селиярово, Ханты-Мансийский р-н ХМАО; GPS координаты: 61°31′24.71″ с. ш., 70°26′76.10″ в. д.). Продолжительность нефтяного загрязнения почвы при отборе ее образцов составляла более трех лет. Контролем служили образцы верхнего горизонта (0–20 см) торфяной олиготрофной почвы (Fluvic Histosol) болотного грядово-мочажинного комплекса (**ГМК**), не загрязненной нефтью (фон).

Определение агрохимических свойств торфяной почвы выполнено следующими методами: pH_{KCl} (ГОСТ 26483); влажность (термостатно-весовой метод) (ГОСТ 11305-2013); гидролитическая кислотность (ГОСТ 26212); подвижные формы фосфора и обменного калия (ГОСТ 26207). Содержание нефтепродуктов в почве определяли методом ИК-спектрометрии (ПНД Ф 16.1:2.2.22-98).

pH_{KCl} составил 3.85; гидролитическая кислотность (Нг) 127.2 ммоль/100 г, подвижные соединения фосфора (P_2O_5)12.2 ± 1.5 мг/кг и калия (K_2O) 14.6 ± 2.6 мг/кг, содержание нефтепродуктов (**НП**) 129400 ± 2225 мг/кг и их исходная влажность (*W*) – 326%.

В почвенные образцы вносили следующие минеральные соли: NH_4NO_3; $Ca(H_2PO_4)_2$; K_2SO_4, которые служили элементами питания (NPK). Дозы этих солей составляли (мг/100 г почвы) $N_{20}P_{30}K_{30}$ (средний уровень обеспеченности, далее 0.5 NPK) и $N_{40}P_{50}K_{50}$ (повышенный уровень, далее 1 NPK). Уровни обеспеченности элементами минерального питания создавались в соответствии с группировками по наличию и доступности минерального азота, подвижного фосфора и обменного калия, разработанными Белорусским НИИ почвоведения и агрохимии для торфяных почв [7]. Гидролитическую кислотность (Нг) нейтрализовали $Ca(OH)_2$ на 50% в вариантах половины гидролитической кислотности (0.5 Нг) и 100% в вариантах полной гидролитической кислотности (1 Нг). Исследуемые варианты эксперимента представлены в табл. 1.

Таблица 1. Варианты эксперимента

№	Вариант
1	Контроль (фон)
2	Контроль нефтезагрязненный (КН)
3	КН + 0.5 Нг (1/2 гидролитическая кислотность)
4	КН + 0.5 Нг + 0.5NPK ($N_{20}P_{30}K_{30}$)
5	КН + 0.5 Нг + 1NPK($N_{40}P_{50}K_{50}$)
6	КН + 0.5 Нг + б. (бактериальная суспензия)
7	КН + 0.5 Нг + 0.5NPK + б.
8	КН + 0.5 Нг + 1NPK + б.
9	КН + 1Нг (полная гидролитическая кислотность)
10	КН + 1Нг + 0.5NPK
11	КН + 1Нг + 1NPK
12	КН + 1Нг + б.
13	КН + 1Нг + 0.5NPK + б.
14	КН + 1Нг + 1NPK + б.

В ряд вариантов опыта (6–8 и 12–14 см) была внесена культура бактерий рода *Pseudomonas*, способных к росту на среде Эванса с нефтью в качестве единственного источника углерода [10] и на среде Эшби без источников азота [5]. Суспензию стационарных клеток бактерий вносили в концентрации 10^7 кл/мл.

Для проведения опыта использованы сосуды объемом 1.5 л. Почву инкубировали при комнатной температуре (20–22°С) в течение восьми недель с поддержанием первоначальной влажности (326%, весовой метод).

Численность прокариот определяли люминесцентно-микроскопическим методом с использованием различных флуорохромов: (акридиновый оранжевый, Cy3). Общую численность прокариот в почве определяли с помощью красителя акридина оранжевого, который растворяли в воде в соотношении 1 : 10000. Почвенную суспензию (разведение 1 : 100) обрабатывали ультразвуком, а затем ее аликвоту (10 мкл) наносили на предметное стекло и фиксировали пламенем горелки. Подготовленные таким образом стекла окрашивали (3 мин), а затем помещали в воду (5 мин, 2 раза). Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Подсчет клеток бактерий проводили с использованием люминесцентного микроскопа ZEISS Microscope Axioskop 2 plus (Германия) со светофильтром Filterset 09 (λ = 450 – 490 нм). Количество микробных клеток в 1 г почвы вычисляли по формуле: $N = 4an \times 10^{10}/S$; где N – количество клеток в 1 г почвы, a – среднее число клеток в поле зрения, 4×10^8 – площадь фиксированного препарата (мкм^2), n – показатель разведения [5]. Удельную массу микроорганизмов принимали равной 1 г/см^3, а содержание воды в клетках – 80%. Сухая биомасса одноклеточных бактерий и актиномицетов вычисляли умножением их численности на средние значения массы клетки или участка мицелия. Масса бактериальной клетки принималась равной 2×10^{-14} г, актиномицетного мицелия длиной 1 м при диаметре 0.5 мкм – 3.9×10^{-8} г [3].

Метаболически активные прокариоты определяли методом *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH), меченным Cy3 красителем. Были применены зонды, специфичные для доменов *Archaea* и *Bacteria*.

Экстракция тотальной ДНК из почвы выполнена из образцов массой 0.2 г с помощью набора Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, США) согласно протоколу производителя.

Оценку численности рибосомальных генов бактерий и архей осуществляли методом полимеразной цепной реакции (**ПЦР**) в реальном времени [14]. Реакцию проводили в амплификаторе DTLite4 ДНК-Технология. Реакционную смесь готовили из препарата Super Mix Eva Green (“Bio-Rad”). В качестве стандартов концентрации генов 16S рРНК для бактерий использовали растворы

клонированных фрагментов рибосомального оперона штамма K12 *Escherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*. Использовали следующие ДНК-специфичные праймеры:

arc915f 5'-AGGAATTGGCGGGGGAGCAC-3';

arc1059r5'-GCCATGCACCWCCTCT-3';

Eub338f5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3';

Eub518r5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'.

Протокол реакции (температурный профиль) был следующим: 95°C – 3 мин → (95°C – 10 с → → 50°C – 10 с → 72°C – 20 с + детекция флуоресценции)×49 циклов [14]. Для каждого варианта эксперимента (образца) реакцию проводили в трех повторностях. Обработка результатов измерения выполнена с использованием пакета программы Real time_PCR.

Для выявления функциональных генов, указывающих на процессы анаэробной деградации углеводородов нефти использовали следующую систему праймеров:

BssADegF15'-CTGRTYTWYGAMGARAAG-AAG-3';

BssADegR1 5'-AGYACBGCVGTYGGBCCATT-3';

BssADegF2 5'-AATGGVCCRACBGCVGTRCT-3';

BssADegR2 5'-ACSMMGTTRAACTGSACRTG-3'.

Амплификацию проводили по программе: денатурация ДНК (98°C, мин) и последующие 40 циклов реакции, в которые входит денатурация ДНК (98°C, 10 с), отжиг праймеров (58°C, 10 с) и элонгация (65°C, 1 мин) [20]. В результате работы фермента бензилсукцинатсинтазы (*bss* – ген), толуол используется бактериями через промежуточный продукт – бензилсукцинат, что является начальным этапом деградации циклических углеводородов в анаэробных условиях [20].

Для определения наличия гена, отвечающего за способность обеспечения системы азотом (*nifH*) использовали следующие праймеры и условия:

Forward5'-GGTTGTGACCCGAAAGCTGA-3';

Reverse 5'-GCGTACATGGCCATCATCTC-3'.

Амплификация: 94°C –1 мин, (94°C 30 с, 50°C 1 мин, 72°C 30 с) (40 циклов), 72°C 10 мин [15].

Высокопроизводительное секвенирование. С целью выявления биоразнообразия прокариотного комплекса исследуемых почв применяли метод высокопроизводительного секвенирования консервативного участка гена 16S рРНК [22]. Для экстракции тотальной ДНК прокариот использовали набор Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, США согласно инструкции производителя). Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с помощью праймеров, комплементарных последовательностям бактерий и архей:

PRK341F 5'-CCTACGGGRBGCASCAG-3';

PRK806R 5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3'.

Полученные ПЦР-фрагменты очищали на колонках QIAquick согласно протоколу производителя. Каждый ПЦР-фрагмент растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера. Нуклеотидные последовательности вариабельных фрагментов генов 16S рибосомальных РНК из образцов метагеномной ДНК определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования [22]. Секвенирование проводили на секвенаторе Illumina Miseq, время прочтения 39 ч, количество pair-endreads (парных прочтений) – 8 млн. Затем с обоих концов ДНК формировали файл с прямыми и обратными прочтениями, которые представляли собой текстовое описание первичной структуры линейных макромолекул в виде последовательности мономеров. Обработку данных секвенирования проводили с использованием автоматизированного алгоритма Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) [13]. При помощи инструментов программы осуществлялись:

– проверка качества секвенирования и создание библиотеки сиквенсов;

– формирование ОТЕ (OTU picking) denovo на основе 97%; удаление синглтонов (“singletons” – ОТЕ, содержащих только один сиквенс) и последовательностей, относящихся к растительным хлоропластам;

– определение филогенетического состава сообществ на разных таксономических уровнях при помощи базы данных разнообразия гена RDP classifier [21].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биомасса прокариот. Выявлено, что в незагрязненной нефтью торфяной олиготрофной почве сухая биомасса прокариот достигала в среднем 65 мкг/г почвы (рис. 1, А), абиомасса метаболически активных клеток прокариот не превышала 6.5 мкг/г почвы (рис. 1, Б), что составило около 10%. В загрязненной нефтью почве наблюдали уменьшение биомассы прокариот и доли метаболически активных клеток по сравнению с контролем. Значения общей биомассы находились в диапазоне от 57 до 60 мкг/г почвы (рис. 1, А), а биомасса метаболически активных клеток в загрязненных образцах не превышала 3.5 мкг/г, что составляет только 5% от всех выявляемых прокариот (рис. 1, Б).

Внесение минеральных солей (источники питания NPK и известь) в загрязненную нефтью почву способствовало увеличению биомассы прокариот (табл. 2). Для вариантов с внесением повышенного минерального питания ($N_{40}P_{50}K_{50}$) и низкой (0.5 Нг) гидролитической кислотностью выявлена наибольшая биомасса прокариот, дости-

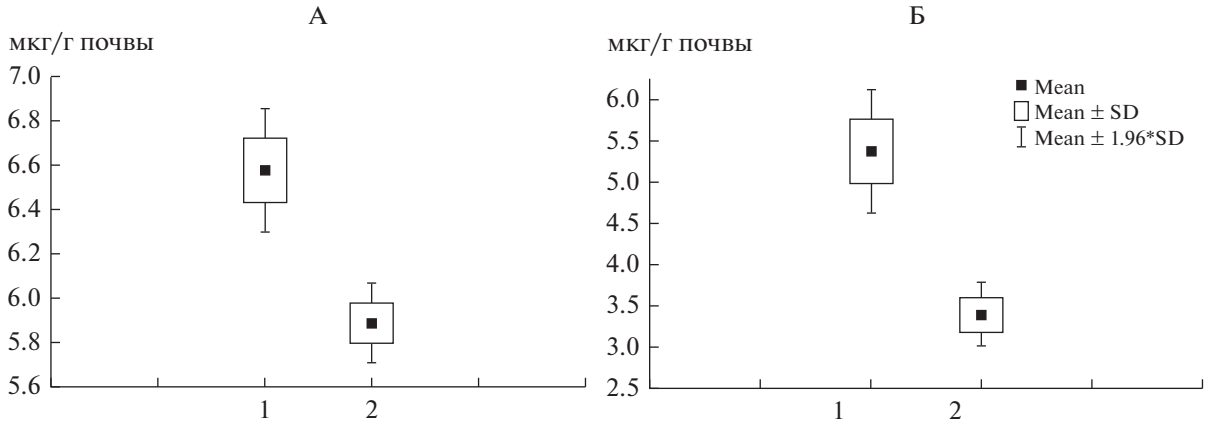


Рис. 1. Биомасса прокариот (А) и их метаболически активных клеток (Б) в торфяной олиготрофной почве: 1 – контроль (без нефти), 2 –загрязненной нефтью.

гающая 130 мкг/г почвы, что в 2 раза больше по сравнению с загрязненной почвой без внесения солей (нефтезагрязненный вариант, КН). Внесение в почву бактериальных культур, способных к деструкции углеводородов нефти, на фоне минеральных солей не приводило к статистически значимому изменению прокариотной биомассы в исследуемых вариантах эксперимента.

Молекулярно-биологическими методами (ПЦР в реальном времени и FISH) получены схожие результаты. Численность архейных и бактериальных компонентов сообщества по числу копий гена 16S рРНК была максимальной в вариантах с повышенным уровнем минерального питания и нейтрализованной на половину гидролитической кислотностью и достигала 1×10^{11} копий гена/мл для бактерий и 2×10^{8} копий гена/мл – для архей (табл. 3). Биомасса метаболически активных клеток представителей доменов *Bacteria* и *Archaea* также увеличивалась в вариантах с повышенным уровнем минерального питания и 1/2 гидролитической кислотностью (0.5 Нг), более чем в 2 раза по сравнению с загрязненной почвой без применения ремедиации (нефтезагрязненная почва, КН) (рис. 2, А, Б).

Филогенетическая структура прокариотных сообществ исследуемых почв. Молекулярно-биологическими методами (FISH и высокопроизводительным секвенированием) в исследуемых образ-

Таблица 2. Убыль нефтепродуктов и суммарная биомасса прокариот в загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почве в фоновом варианте и с внесением удобрений и извести в соответствии со схемой опыта

Вариант	Убыль НП, %	Количество клеток в 1 г	Биомасса прокариот, мкг/г почвы
КН	2.2	2.91E+09	58.2 ± 2.2*
КН + 0.5Нг	4.2	2.94E+09	58.7 ± 2.03
КН + 0.5Нг + 0.5NPK	6.3	4.28E+09	85.7 ± 2.8
КН + 0.5Нг + 1NPK	11.7	6.53E+09	130.5 ± 2.1
КН + 0.5Нг + б.	7.3	3.14E+09	62.8 ± 2.1
КН + 0.5Нг + 0.5NPK + б.	7.1	4.28E+09	85.6 ± 2.4
КН + 0.5Нг + 1NPK + б.	11	4.67E+09	93.4 ± 2.0
КН + 1Нг	2.8	3.34E+09	66.9 ± 2.9
КН + 1Нг + 0.5NPK	3.8	4.39E+09	87.8 ± 2.3
КН + 1Нг + 1NPK	4.5	3.08E+09	61.6 ± 2.6
КН + 1Нг + б.	7.2	2.75E+09	55.0 ± 2.5
КН + 1Нг + 0.5NPK + б.	7.8	3.12E+09	62.5 ± 2.1
КН + 1Нг + 1NPK + б.	3.1	3.61E+09	72.2 ± 2.3

* Биомасса прокариот приведена в формате: среднее значение ± доверительный интервал.

Таблица 3. Число копий гена 16S рРНК представителей домена *Bacteria* и *Archaea* в загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почве в фоновом варианте и с внесением удобрений и извести в соответствии со схемой опыта*

Вариант	Число копий гена *Bacteria*/мл	Число копий гена *Archaea*/мл
КН	2.44E+10	4.54E+07
КН + 0.5 Нг	5.07E+10	4.24E+07
КН + 0.5Нг + 0.5NPK	6.35E+10	9.61E+07
КН + 0.5Нг + 1NPK*	1.09E+11	1.34E+08
КН + 0.5Нг + б.	4.18E+10	4.64E+07
КН + 0.5Нг + 0.5NPK + б.	8.27E+10	1.16E+08
КН + 0.5Нг + 1NPK + б.	9.06E+10	3.64E+07
КН + 1Нг	2.38E+10	5.39E+07
КН + 1Нг + 0.5NPK	5.39E+10	2.16E+07
КН + 1Нг + 1NPK	3.05E+10	3.51E+07
КН + 1Нг + б.	2.78E+10	1.12E+08
КН + 1Нг + 0.5NPK + б.	6.18E+10	1.90E+08
КН + 1Нг + 1NPK + б.	6.14E+10	2.05E+07

* Число бактериальных копий гена 16S рРНК в сообществе максимально в вариантах с повышенным уровнем минерального питания и нейтрализованной на половину гидролитической кислотностью (1×10^{11} копий гена/мл).

цах была выявлена структура метаболически активного прокариотного сообщества.

В незагрязненных нефтью образцах торфа среди домена *Bacteria* доминировали представители филумов *Proteobacteria* и *Acidobacteria*, занимая по 25% от всего выявляемого бактериального комплекса (рис. 3, А). Среди протеобактерий выявляли представителей альфа-, гамма- и дельта-протеобактерий. Представители филогенетических групп *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* были обнаружены в сообществе в меньших количествах. Представители *Firmicutes* входили в спектр минорных компонентов. Известны работы отечественных исследователей, рассматривавших структуру метаболически активного прокариотного сообщества торфов, в которых выявлены схожие закономерности [2, 6].

Структура бактериального комплекса в загрязненном нефтью торфе изменялась по сравнению с контрольной почвой. Доля филума *Proteobacteria* возрастала до 50% от всех выявляемых бактерий (рис. 3, Б). Среди протеобактерий обнаружи-

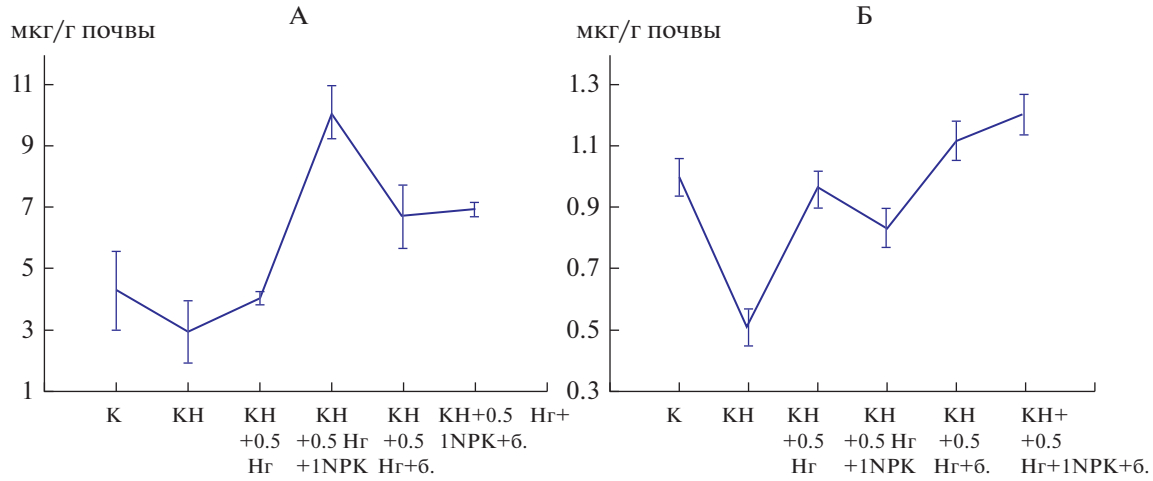
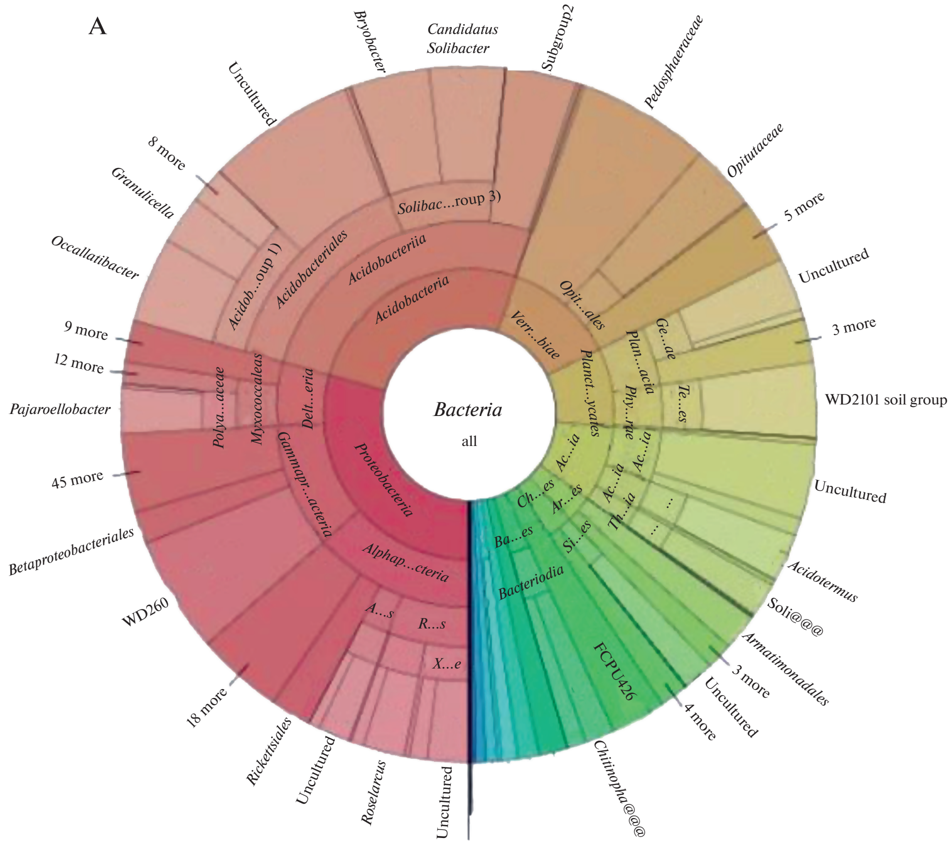


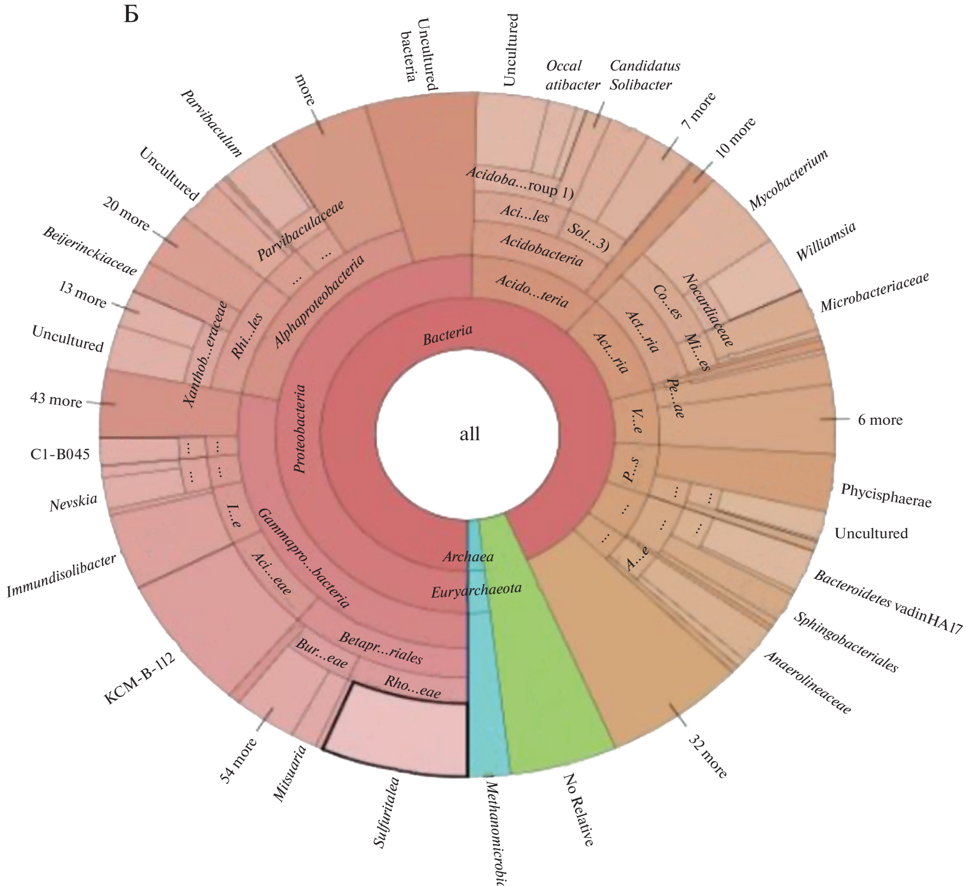
Рис. 2. Биомасса (мкг/г почвы) метаболически активных клеток представителей домена *Bacteria* (А) и домена *Archaea* (Б) в фоновой почве и с внесением удобрений и извести в соответствии со схемой опыта.

Рис. 3. Филогенетическая карта структуры бактериального компонента (%) болотной торфяной верховой ненарушенной почвы (контроль) (А) и почвы с сильным загрязнением нефтью (Б).

А


Bacteria
all
Acidobacteria
Acidobacteriia
Acidobacteriales
Solibac...roup 3)
Acidob...oup 1)
Bryobacter
Candidatus Solibacter
Subgroup2
Uncultured
8 more
Granulicella
Occallatibacter
Pedosphaeraceae
Opitutaceae
5 more
Uncultured
3 more
WD2101 soil group
Uncultured
Acidotermus
Soli@@@
Armatimonadales
3 more
Uncultured
4 more
Chitinopha@@@
FCPU426
Bacteriodia
Verr...biae
Opit...ales
Planct...ycetes
Plan...acia
Phy...rae
Ge...ae
Te...es
Ac...ia
Ch...es
Ar...es
Ba...es
Si...es
Th...ia
Proteobacteria
Gammapr...acteria
Delt...eria
Myxococcales
Polya...aceae
Alphap...cteria
A...s
R...s
X...e
9 more
12 more
Pajaroellobacter
45 more
Betaproteobacteriales
WD260
18 more
Rickettsiales
Uncultured
Roselarcus
Uncultured

Б


all
Bacteria
Archaea
Euryarchaeota
Proteobacteria
Alphaproteobacteria
Parvibaculaceae
Rhi...les
Xanthob...eraceae
Gammapro...bacteria
Aci...eae
L...e
Betapr...riales
Bur...eae
Rho...eae
Acido...teria
Acidobacteria
Aci...les
Sol...3)
Acidoba...roup 1)
Act...ria
Co...es
Nocardiaceae
Mi...es
Pe...ae
V...e
P...s
A...e
Uncultured bacteria
Uncultured
Occal atibacter
Candidatus Solibacter
7 more
10 more
Mycobacterium
Williamsia
Microbacteriaceae
6 more
Phycisphaerae
Uncultured
Bacteroidetes vadinHA17
Sphingobacteriales
Anaerolineaceae
32 more
No Relative
Methanomicrobia
Sulfuritalea
Mitsuaria
54 more
KCM-B-112
Immundisolibacter
Nevskia
C1-B045
43 more
Uncultured
13 more
Beijerinckiaceae
20 more
Uncultured
Parvibaculum
more

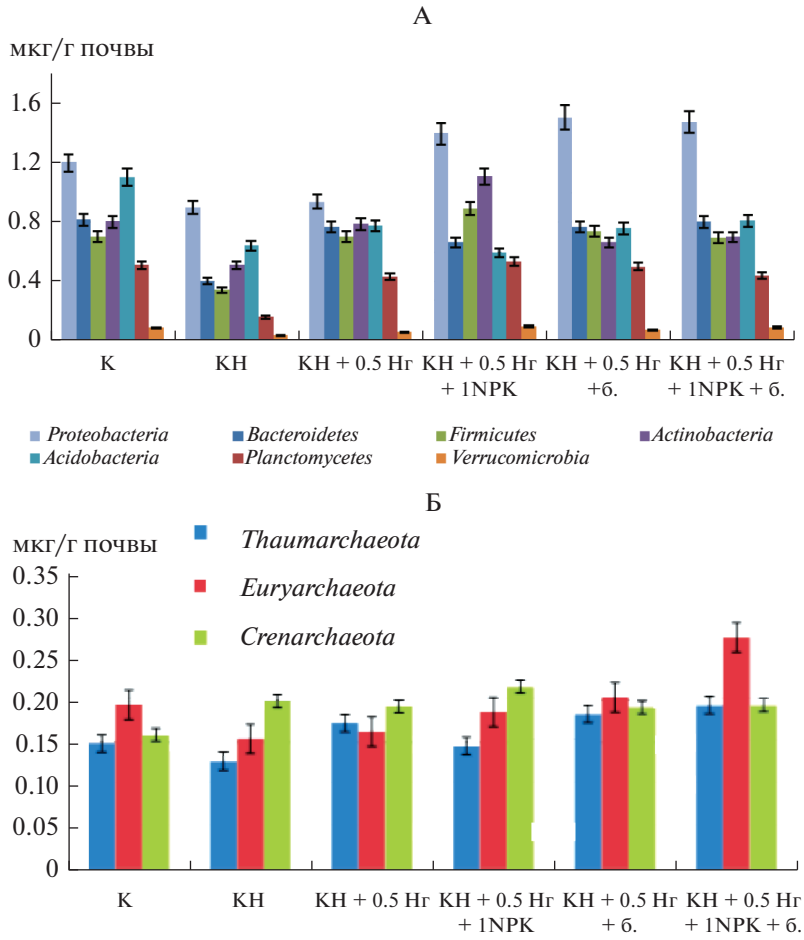


Рис. 4. Значения биомассы (мкг/г почвы) метаболически активных представителей различных филогенетических групп домена *Bacteria* (А) и *Archaea* (Б) в загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почве в фоновом варианте и с внесением удобрений и извести в соответствии со схемой опыта.

вались альфа-, гамма- и бета- протебактерии. Стоит отметить, что увеличение протеобактерий происходит за счет появления видов, которые не встречались в незагрязненной почве, например *Sulfuritalea*, принадлежащим к *Betaproteobacteria* семейству *Sterolibacteriaceae*. Данный организм является хемолитоавтотрофом, окисляющим тиосульфаты, серу и водород [12]. Согласно литературным источникам, его используют для деградации ароматических соединений, в частности, для анаэробного разложения бензоатов и фенилацетатов [12]. В бактериальном комплексе загрязненного торфа возрастает доля актинобактерий, причем, если в контрольной почве среди актинобактерий доминировали представители порядка *Frankiales* (род *Acidotermus*), то в опытном варианте начинают доминировать представители порядков *Micrococcales* и *Corinebacteriales* (представители родов *Micobacterim* и *Williamsia*). В литературе имеются сведения о росте некоторых видов рода *Williamsia* на бензоле [17].

В загрязненной нефтью торфяной почве, подверженной ремедиации, стоит обратить внимание на вариант с большей дозой минеральных удобрений на фоне неполного известкования, где по результатам метода FISH доминирующей группой в прокариотном комплексе остаются протеобактерии и значимо возрастает доля метаболически активных представителей филума *Actinobacteria* (рис. 4, А). Биомасса представителей этой группы увеличивается в 2 раза – от 0.5 мкг/г почвы (для варианта с нефтью) до 1.1 мкг/ г образца (для почвенного образца с нефтью и удобрением).

В структуре метаболически активных представителей домена *Archaea* в загрязненных образцах также происходит перестройка комплекса по сравнению с контрольной почвой. Если в контроле доминирует группа *Euryarchaeota*, то в загрязненной почве – *Crenarchaeota*. Применение агрохимических средств приводит к восстановлению исходной, схожей с фоновым вариантом структуры (рис. 4, Б).

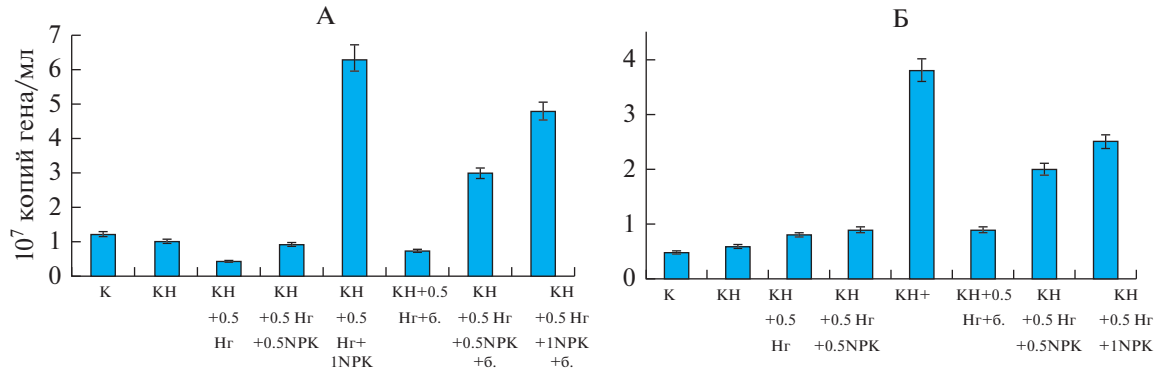


Рис. 5. Число копий гена (копий/мл) гена *nifH* (А) и гена *bssA* (Б) в исследуемых вариантах опыта.

Детекция функциональных генов *BssA* и *nifH*. В дополнении к характеристике филогенетической структуры прокариотного сообщества был проведен анализ функциональных генов, отвечающих за возможность самовосстановления микробного сообщества исследуемых почв. Рассматривали наличие и число копий генов бактерий анаэробов деструкторов углеводородов. Процесс окисления алканов в анаэробных условиях начинается с карбоксилирования, что приводит к образованию альдегида или жирной кислоты [11]. Так, анаэробное разложение бензола может быть инициировано метилированием в толуол. Толуол включается в метаболизм бактерий через промежуточный продукт – бензилсукцинат, образующийся в результате работы фермента бензилсукцинатсинтазы (*bss*), что представляет собой начальный этап деградации циклических углеводородов в анаэробных условиях. С другой стороны, рассматривали наличие копий гена бактерий азотфиксаторов (*nifH*), способных обеспечить систему азотом, что является одним из этапов ремедиации почв.

Ген *nifH* был обнаружен во всех вариантах опыта. Обращают на себя внимание 2 варианта опыта: с повышенным уровнем удобрений и неполной дозой мелиоранта без бактериального комплекса и с его наличием, где число копий гена составляло 6×10^7 и 4.8×10^7 копий гена/мл среды соответственно (рис. 5, А).

Бактериальный ген, отвечающий за катаболизм толуола, обнаружен также во всех исследуемых образцах (в том числе контрольных). Наименьшие значения, около 5×10^8 копий гена/мл принадлежали контрольным образцам. В вариантах с нефтью, несмотря на пониженную численность и биомассу прокариотного комплекса, установлено увеличение числа копий гена *bssA* по сравнению с контролем (до 8×10^8). Таким образом, обнаружение повышенного числа копий гена *bssA* может выступать в качестве показателя индикатора загрязнения (рис. 5, Б). Наибольшие значения числа копий гена *bssA* обнаружены в варианте с повышенной дозой удобрений и неполной дозой извести, что можно объяснить наибольшей численностью метаболически активных клеток в сообществе данного варианта опыта.

Наибольшие значения для числа копий гена *bssA* коррелирует с убылью содержания нефтепродуктов в исследуемых вариантах опыта. Наименьшее содержание нефтепродуктов после завершения опыта зафиксирована для варианта с большей дозой минеральных удобрений и неполной дозой мелиоранта (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В олиготрофной торфяной почве биомасса метаболически активных (имеющих в своей структуре РНК, а, следовательно, делящихся и растущих) прокариотных клеток достигает в среднем 5 мкг/г, что составляет 0.1 часть (10%) от всего сообщества. Следует отметить, что по полученным нами ранее данным, для верхних горизонтов чернозема, серой лесной, каштановой почв доля метаболически активных представителей прокариот составляла от 30 до 45% от суммарной биомассы прокариотного комплекса, что в несколько раз превышает значения для торфяной олиготрофной почвы [4]. Из отечественной литературы известны сведения о пониженной микробной активности торфов: доля активных (участвующих в биогеоценотических циклах) бактерий для верхового торфяника составляла в среднем от 10 до 25% [1].

Загрязнение олиготрофной торфяной почвы нефтью приводит к уменьшению метаболически активной прокариотной биомассы (в 2 раза), доля которой составляет 5% от всех выявляемых прокариот. Применение ремедиации к загрязненным нефтью образцам торфа, а именно внесение полного минерального питания на фоне известкования (0.5 Нг), приводит к возрастанию (более чем в 2 раза) биомассы метаболически активных клеток бактерий и архей. Установлено изменение филоге-

нетической структуры метаболически активного прокариотного комплекса как на уровне домена *Archaea*, так и *Bacteria* в загрязненных нефтью торфах по сравнению с фоном. Внесение полного минерального питания на фоне неполного (0.5 Нг) известкования приводит к частичному восстановлению структуры прокариотного комплекса. Наибольшие значения числа копий функциональных генов (*bss* и *nifH*) для варианта с большей дозой минеральных удобрений на фоне известкования по 0.5 Нг совпадают со значимым уменьшением содержания нефтепродуктов в исследуемых вариантах опыта. Полученные результаты могут быть полезны при биоиндикации и оценке процесса восстановления загрязненных почвенных систем.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке проектов РФФИ “Фундаментальные проблемы исследования почв и управления почвенными ресурсами России” (грант № 19-29-05197-мк) и частично в рамках НИР “Продуктивность агроэкосистем и ее связь с динамикой плодородия почв” (номер госрегистрации 116020350086-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Богданова О.Ю., Головченко А.В., Лысак Л.В., Глухова Т.В., Звягинцев Д.Г.* Жизнеспособность бактерий в торфяниках // Почвоведение. 2014. № 4. С. 466–472. https://doi.org/10.7868/S0032180X14020038
2. *Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Якушев А.В., Юрченко Е.Н., Манучарова Н.А., Чернов И.Ю.* Бактериальные комплексы верхового торфяника в условиях различного микрорельефа // Почвоведение. 2017. № 4. С. 483–489. https://doi.org/10.7868/S0032180X17040025
3. *Кожевин П.А.* Микробные популяции в природе. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. 175 с.
4. *Манучарова Н.А., Ксенофонтова Н.А., Каримов Т.Д., Власова А.П., Зенова Г.М., Степанов А.Л.* Изменение филогенетической структуры метаболически активного прокариотного комплекса почв под влиянием нефтяного загрязнения // Микробиология. 2020. Т. 89. № 2. С. 222–234. https://doi.org/10.31857/S0026365620020093
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 303 с.
6. *Панкратов Т.А., Белова С.Э., Дедыш С.Н.* Оценка филогенетического разнообразия прокариотных микроорганизмов сфагновых болотах с использованием метода FISH // Микробиология. 2005. Т. 74. № 6. С. 831–837. https://doi.org/10.1007/s11021-005-0130-8
7. Практикум по агрохимии / Под ред. Минеева В.Г. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2001. 688 с.
8. *Толпешта И.И., Трофимов С.Я., Эркенова М.И., Соколова Т.А., Степанов А.Л., Лысак Л.В., Лобаненков А.М.* Лабораторное моделирование последовательного аэробного и анаэробного разложения нефтепродуктов в загрязненном нефтью верховом торфе // Почвоведение. 2015. № 3. С. 360–372.
9. *Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H.* Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation // Microbiol. 1995. Rev. 59(1). P. 143–169. https://doi.org/10.1128/mmbr.59.1.143-169.1995
10. *Anokhina T.O., Volkova O.V., Puntus I.F., Filonov A.E., Kochetkov V.V., and Boronin A.M.* Plant growth-promoting Pseudomonas bearing catabolic plasmids: Naphthalene degradation and effect on plants // Process Biochem. 2006. № 41. P. 2417–2423. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.06.026
11. *Biegert T., Fuchs G., Heider F.* Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate // Eur. J. Biochem. 1996. V. 238. P. 661–668. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0661w.x
12. *Boden R., Hutt L.P., Rae A.W.* Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the *Hydrogenophilales* to the *Nitrosomonadales*, proposal of *Hydrogenophilalia* class. nov. within the '*Proteobacteria*', and four new families within the orders *Nitrosomonadales* and *Rhodocyclales* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1191–1205. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001927
13. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. № 5. P. 335–340.
14. *Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B.* Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Rev. 71(7). P. 4117–4120. https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005
15. *Helmut B.F., Widmer W., Sigler V., Zeyer J.* New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. P. 240–247. https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.240-247.2004
16. IUSS Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2014: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps / World Soil Resources Reports No. 106. FAO. Rome, 2014. 181 p.
17. *Jones A.L., Paynet G.D., Goodfellow M. Williamsia faeni* sp. nov, an actinomycete isolated from a hay meadow //

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2548–2551. https://doi.org/10.1099/ijs.0.015826-0

18. *Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing // Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic / Eds.: Stackebrandt E., Goodfellow M. John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken. NJ. USA, 1991. P. 115–175.
19. *Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P.* Brock biology of microorganisms. Prentice-Hall. Englewood Cliffs. 2008. 1061 p.
20. *Perry Verlin.* Metabolic Activities and Diversity of Microbial Communities Associated with Anaerobic Degradation. Dissertation. Georgia State University, 2014. 250 p.
21. *Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R.* Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 16. P. 5261–5267.
22. *Will C., Thürmer A., Wollherr A., Nacke H., Herold N., Schrumpf M., Gutknecht J., Wubet T., Buscot F., Daniel R.* Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 20. P. 6751.

Prokaryotic Component of Oil-Polluted Peat Oligotrophic Soil at Different Levels of Mineral Nutrition: Biomass, Diversity, Activity

N. A. Manucharova[1], *, N. A. Ksenofontova[1], A. A. Belov[1], N. N. Kamenskiy[1], A. V. Arzamazova[1], G. M. Zenova[1], R. R. Kinzhaev[1], S. Ya. Trofimov[1], and A. L. Stepanov[1]

[1]Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

**e-mail: manucharova@mail.ru*

Molecular biological methods were used to study the diversity and biomass of metabolically active prokaryotic cells in oil-contaminated oligotrophic peat soil on various agrochemical backgrounds. It was found that the proportion of the metabolically active component in the samples of the studied peat is 0.1 part of the entire prokaryotic community. The use of agrochemical remedies for oil-contaminated peat, namely the introduction of full mineral fertilizer against the background of half-dose liming, leads to an increase (more than 2 times) in the biomass of bacterial and archaeal cells, an increase in the number of functional genes (*bss* and *nifH*) copies, as well as a significant reduction in the content of oil products in the studied variants of the experiment. The introduction of full mineral fertilizer against the background of half-dose liming to contaminated soil induces changes in the phylogenetic structure and partial restoration of the metabolically active prokaryotic complex.

Keywords: oil, metabolically active soil prokaryotic community, functional genes, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), high throughput sequencing