

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ ПРОКАРИОТНОЙ
КОМПОНЕНТЫ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ
И ВОССТАНОВЛЕННЫХ ВНЕСЕНИЕМ ХИТИНА

© 2017 г. Н. А. Манучарова^а, *, Ю. В. Кутейникова^а, П. В. Иванов^б, С. К. Николаева^б,
В. Т. Трофимов^б, П. Ю. Степанов^б, Е. В. Тяпкина^а, Д. Н. Липатов^а, А. Л. Степанов^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет почвоведения, Россия

^бМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, геологический факультет, Россия

*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2016 г.

Молекулярно-биологическими методами (FISH, метагеномным анализом) исследованы почвенные прокариотные комплексы микрочесов нативных почв (серой лесной почвы и урбостратозема типичного), загрязненных нефтепродуктами (бензином или дизельным топливом) и подвергнутых ремедиации путем добавления азотсодержащего биополимера полисахарида хитина. Выявлена доля метаболически активных клеток прокариот в гидролитическом комплексе почвенных микрочесов, определены их биомасса и биологическое разнообразие. В микрочесвах, загрязненных поллютантами, по сравнению с контрольными, установлено уменьшение доли метаболически активных клеток прокариот, изменение структуры гидролитического комплекса: увеличение доли филума *Actinobacteria*, а именно рода *Galiella* в образцах, загрязненных бензином и рода *Nocardioidea* (в образцах, загрязненных дизельным топливом). Внесение в загрязненную углеводородами систему биополимера хитина приводило к переработке смешаннослойных минералов с увеличением количества слоев смектитового типа, как следствие, формированию агрегатов, оструктуриванию почвы и улучшению аэрации. Также отмечено возрастание численности метаболически активных клеток прокариот и снижение разнообразия прокариотного комплекса почв, что может быть связано с развитием селективной группы гидролитического комплекса микроорганизмов-хитинолитиков.

Ключевые слова: метаболически активный прокариотный комплекс, поллютанты, нефтепродукты, хитин, метагеномный анализ, гибридизация клеток *in situ* (FISH)

DOI: 10.7868/S0026365617030119

Нефть и продукты ее переработки являются одними из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды (Микроорганизмы и охрана почв, 1989). В результате выбросов промышленных предприятий, а также предприятий по переработке и синтезу углеводородов огромное количество нефтепродуктов попадает в окружающую среду (Пиковский и соавт., 2003). По данным работы Гриценко и соавт. (1997) только в результате разового прорыва нефтепровода выбрасывается до 2 т нефти, что выводит из строя 1000 м³ земли, а в результате аварии на землю попадает не менее 2 млн тонн нефтепродуктов в год. При добыче, переработке и использовании нефтепродуктов в мире теряется до 45 × 10⁶ тонн углеводородов (Рябчиков, 1994). По праву названные приоритетными загрязнителями биосферы, эти поллютанты являются не только стойкими загрязнителями окружающей среды, но и виновниками деградации почвенного покрова: под их

влиянием происходит ингибирование дыхательной активности почвы, процессов азотфиксации, нитрификации, накопление в почве трудноокисляемых метаболитов (Atlas, 1981). Процесс самовосстановления биоценозов в регионах, подвергшихся нефтяному загрязнению, занимает от 10 до 25 лет (Тимергазина, Переходова, 2012). Наиболее эффективным и доступным методом снижения концентрации нефтепродуктов в почвах является их сорбция. К природным сорбентам в настоящее время относят хитин и его производное, хитозан. Утилизация хитинсодержащих отходов, в частности, от микробиологических производств, может способствовать охране окружающей среды, снижая стоимость сорбента.

Целью исследования являлось изучить особенности и закономерности структуры прокариотной гидролитической компоненты серой лесной почвы и урбостратозема типичного, загрязненных нефтепродуктами (бензином, дизельным

топливом), и восстановленных путем внесения биополимера хитина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования явились образцы: 1) серой лесной маломощной среднесуглинистой почвы на покровных суглинках (классификация 1977 г.) или текстурно-дифференцированной серой типичной бескарбонатной мелкой неглубокоосветленной среднесуглинистой на покровных суглинках (по классификации WRB – Naplic Abruptic Luvisols, 2004 г.), отобранные в 2014 г. в Щекинском районе Тульской области (вторая терраса водораздела р. Упы) (глубина отбора 35 см, содержание $C_{орг}$ 5.6%; рН водной вытяжки 6.9) и 2) урбостратозема типичного (светло-коричневый пылеватый песок), отобранный в 2014 г. на территории Новодевичьего монастыря в г. Москве (культурный слой, глубина отбора 35 см, содержание $C_{орг}$ 0.6%; рН водной вытяжки 7.6).

Исследование динамики микробных сообществ проводили методом инициированной микробной сукцессии. Почвенный микрочосм инициировали увлажнением (до 60% от массы абсолютно сухой почвы), добавляли дизельное топливо или бензин (10% от массы почвы, соответственно). На сегодняшний день нет данных по ПДК нефти и нефтепродуктов в окружающей среде. В зависимости от экологических факторов, количества, концентрации и фракционного состава загрязнителя различается способность почв к самоочищению. По ГОСТ 17.4.3.06-86 объект с концентрацией топлива 10% от массы почвы относится к сильно загрязненному (Хомяков, Узких, 2009). В экспериментах ремедиации на фоне загрязнения вносили природный сорбент – биополимер хитин, в количестве 0.6% от массы почвы или 30 мг/5 г почвы (использовали очищенный хитин фирмы “Sigma-Aldrich”). Контролем служила почва, увлажненная водой.

Определение общей численности и численности метаболически активных клеток в исследуемых образцах проводили люминесцентно-микроскопическим методом с использованием различных флуорохромов: акридина оранжевого, Су3 (Манучарова, 2014; Manucharova et al., 2014). Общую численность прокариот определяли с помощью красителя акридина оранжевого, вступающего в реакцию с ДНК клеток. Численность метаболически активных клеток устанавливали при окрашивании рРНК клеток специфическими флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами, что позволило сделать выводы не только о жизнеспособности микроорганизмов, но и исследовать микробное разнообразие *in situ*. К исследуемым образцам был применен спектр зондов,

специфичных для доменов *Archaea* и *Bacteria*. Для прямого учета микроорганизмов использовали микроскоп Axioskop 2 plus (“ZEISS”, Германия). Количество микробных клеток, содержащихся в 1 г образца, вычисляли по формуле: $N = S_1 a n/v S_2 c$, где: N – число клеток (или длина мицелия, мкм) в 1 г почвы; S_1 – площадь препарата (мкм²); a – количество клеток (или длина мицелия, мкм) в одном поле зрения (усреднение производили по всем препаратам); n – показатель разведения почвенной суспензии (мл); v – объем капли, наносимой на стекло (мл); S_2 – площадь полей зрения микроскопа (мкм²); c – навеска почвы (г). Удельную массу микроорганизмов принимали равной 1 г/см³, содержание воды в клетках – 80%. Биомассу микробных клеток вычисляли, учитывая показатели сухой биомассы для: одной бактериальной клетки объемом 0.1 мкм³ – 2×10^{-14} г; 1 м мицелия актиномицетов диаметром 0.5 мкм – 3.9×10^{-8} г (Полянская и соавт., 1995).

Биоразнообразие прокариотного комплекса было оценено методом высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК. Для экстракции тотальной ДНК применяли стандартные методы PowerSoil DNA Isolation Kit (“MO BIO”, США), руководствуясь инструкциями производителя. Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с помощью вырожденных праймеров, комплементарных последовательностям как бактерий, так и архей: PRK341F (CCTACGGGRBGCASCAG) и PRK806R (GGACTACYVGGGTATCTAAT). Полученные ПЦР-фрагменты очищали на колонках QIAquick согласно протоколу производителя. Каждый ПЦР-фрагмент растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера, полученного материала было достаточно для дальнейшего анализа. Нуклеотидные последовательности переменных фрагментов генов 16S рибосомальных РНК из образцов метагеномной ДНК определяли с помощью высокопроизводительного секвенирования.

Пиросеквенирование проводили на приборе GS FLX (“Roche”, США) согласно протоколу Titanium с использованием набора GS FLX Titanium Sequencing Kit XL и пикотитровой пластины GS Titanium PicoTiterPlate Kit 70 × 75.

Таксономическую классификацию полученных последовательностей проводили с помощью программы RDP Classifier. Этот метод позволяет определить структуру сообщества при наличии близкородственных организмов в базе данных.

Минеральный состав контрольных образцов дисперсных грунтов, опытных образцов, загрязненных нефтепродуктами, а также подвергнутых ремедиации полисахаридом хитином, исследовали с помощью рентгеновской дифрактометрии на приборе Rigaku Ultima IV. Были проведены как

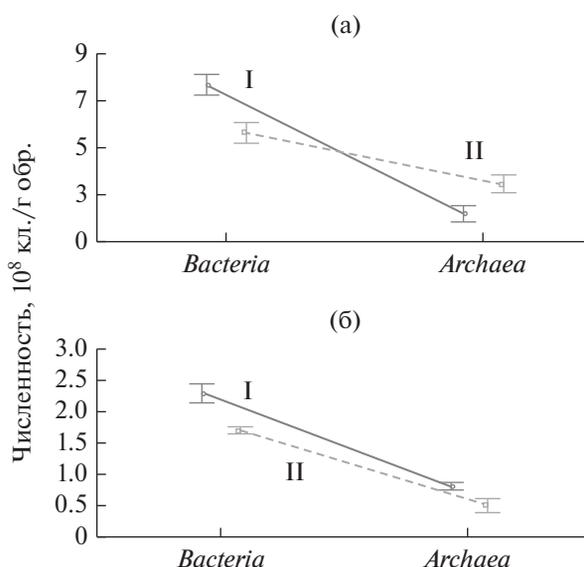


Рис. 1. Численность метаболически активных клеток прокариот (*Bacteria* и *Archaea*) в контрольных (I) и опытных (II) образцах серой лесной почвы (а) и урбостратозема типичного (б) при добавлении дизельного топлива.

общие анализы, так и анализы минерального состава глинистых фракций. Образцы глинистой фракции были получены методом седиментации с растиранием с пирофосфатом натрия и отбором проб через интервал времени, рассчитанный по закону Стокса. Исследовали препараты, размер частиц в которых не превышал 5 мкм. Проводили съемку исходного препарата и после насыщения его этиленгликолем. После индицирования рентгенограмм по базе данных проводили уточнение параметров элементарной решетки. Содержание минералов оценивали методом полуколичественного анализа Бискае, вычисляя площади наиболее характерных пиков на дифрактограмме насыщенных этиленгликолем образцов (Шлыков, 1991).

Количественные измерения массовой доли нефтепродуктов в исследуемых образцах проводили методом ИК-спектрометрии (по ПНД Ф 16.1:2.2.22-98). С помощью четыреххлористого углерода осуществляли экстракцию углеводородов из почвы и по интенсивности их поглощения в ИК-области спектра определяли их количество. Навески почвы или песка массой от 0.05 до 0.2 г помещали в колбу емкостью 100 см³. Проводили две экстракции. К пробе добавляли 15 см³ четыреххлористого углерода, встряхивали и фильтровали с помощью фильтра “белая лента”. Суммарный объем полученного экстракта составлял 25 см³. Затем каждый из исследуемых экстрактов (из образцов, содержащих и не содержащих нефтепродукты) заливали в кювету в приборе (концен-

трамер КН-2м). Фиксировали показания прибора ($S_{изм}$). Пересчет проводили по формуле: $C = S_{изм} \times 0.025/M$, где C [мг/кг] – сумма углеводородов нефти; $S_{изм}$ [мг/л] – показания прибора; 0.025 [л] – суммарный объем экстракта; M [кг] – масса навески (ПНД Ф 16.1:2.2.22-98, 1998).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA 6.0. Все пробы почв анализировали в 5-кратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью молекулярно-биологического метода гибридизации клеток *in situ* (FISH) была определена численность метаболически активных форм прокариот в исследуемых образцах микрососмов. В контрольных образцах серой лесной почвы численность метаболически активных клеток прокариот, принадлежащих домену *Bacteria*, достигала 8×10^8 кл./г образца (рис. 1а). Статистически достоверно, с вероятностью большей 95%, было установлено, что в почвенных образцах исследуемых микрососмов в прокариотном комплексе при добавлении нефтепродуктов численность метаболически активных клеток снижалась в 2–4 раза (рис. 1а, 1б). Так, для образцов серой лесной почвы в опытных вариантах к 20 сут сукцессии численность представителей домена *Bacteria* снижалась в четыре раза по сравнению с контрольными, достигая 2×10^8 кл./г образца. Доля метаболически активных клеток прокариот от всех выявляемых клеток бактерий при

внесении нефтепродуктов сокращалась до 30% по сравнению с контрольными вариантами, где доля метаболически активных клеток достигала 50%. Для образцов урбостратозема типичного прослеживались схожие закономерности (рис. 1б).

Таксономическое разнообразие прокариотных сообществ серой лесной почвы и урбостратозема типичного было изучено с помощью метагеномного анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей тотальной ДНК, выделенной из исследуемых микрокосмов. Было получено около 50 тыс. частичных последовательностей генов 16S рРНК со средней длиной более 400 п.н. Из них 1 тыс. последовательностей относились к домену *Archaea* и 49 тыс. принадлежали бактериям.

Во всех образцах были выявлены представители таких филогенетических групп домена *Bacteria* как *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria* (рис. 2). В контрольных образцах серой лесной почвы в домене *Bacteria* преобладали филогенетические группы *Firmicutes* (68% от всех выявляемых прокариот) и *Proteobacteria* (22%) (рис. 2а), в то время как в контрольных образцах урбостратозема типичного доминировали филогенетические группы *Proteobacteria* (до 83%), *Actinobacteria* (10%) (рис. 2б).

Установлено изменение структуры прокариотного метаболически активного комплекса в образцах с нефтепродуктами по сравнению с образцами ненарушенных систем. В микрокосмах, загрязненных поллютантами, отмечалось увеличение доли филума *Actinobacteria* по сравнению с ненарушенными системами, а именно рода *Galiella* в образцах, загрязненных бензином, и субпорядков *Propionibacterineae* (рода *Nocardioideae*) и *Streptomycineae* в образцах, загрязненных дизельным топливом (рис. 2в, 2г). Из литературы известно, что постоянными и доминирующими компонентами естественных биоценозов нефтяных загрязнений являются родококки (представители филума *Actinobacteria*), их основная экологическая функция — аккумуляция газообразных *n*-алканов, жидких углеводородов нефти и утилизация их в биомассу (Коронелли и соавт., 1986; Нестеренко, 1985).

Предварительное исследование библиотеки клонов архей на основе амплификационной ДНК с помощью специфических праймеров на фрагмент *v1-v5* бактериального гена 16S рРНК показало присутствие фрагментов, наиболее близких к представителям филумов *Euryarchaeota* (семейства *Halobacteriaceae*), *Crenarchaeota* и *Thaumarchaeota* (представители рода *Nitrososphaera* семейства *Nitrososphaeraceae*). В современной литературе указывается на присутствие в загрязненных углеводородами субстратах археобактерий, представителей

филума *Euryarchaeota*, метаногенов, родов *Methanobolus* и *Methanoplanus*, растущих на нефти с образованием метана (Назина и соавт., 2013).

Следует отметить, что при добавлении хитина в качестве ремедианта к загрязненным образцам как серой лесной почвы, так и урбостратозема типичного, численность метаболически активных клеток возрастала в 2–3 раза и достигала в случае с серой лесной почвой 5×10^8 кл./г образца. По данным метагеномного анализа прокариотный комплекс восстановленных почв становился менее разнообразным, что может быть связано с развитием и преобладанием групп микроорганизмов-хитинолитиков (рис. 3а, 3б). Для обобщения полученных данных высокоточного секвенирования консервативного участка гена 16S рРНК был применен кластерный анализ, позволяющий классифицировать объекты в относительно однородные группы. Удалось выявить сходство и различия в структуре прокариотного комплекса, а также общие закономерности как для контрольных образцов, так и для опытных, загрязненных углеводородами, вариантов серой лесной почвы и песчаного урбостратозема (рис. 4). На ближайшем расстоянии на дендрограмме находятся и, следовательно, имеют наибольшее сходство образцы, подверженные загрязнению нефтепродуктами. Они объединены в отдельные кластеры. В то же время контрольные объекты серой лесной почвы и песчаного урбостратозема находятся вблизи друг от друга, а также от образцов, загрязненных дизельным топливом и бензином с внесением ремедианта хитина на фоне загрязнения. Такое объединение может быть связано со способностью хитина сорбировать и, таким образом, консервировать молекулы нефтепродуктов, не давая им разрушаться в почве.

Определение количества остаточных нефтепродуктов проводили в микрокосмах на 14 сут сукцессии (рис. 5). Статистически достоверно (с вероятностью большей 95%) было показано, что при добавлении ремедианта хитина в загрязненные поллютантами микрокосмы наблюдается снижение количества остаточных нефтепродуктов в 1.5–2 раза, что, вероятно, можно объяснить сорбционными свойствами хитина, а кроме того, явлением кометаболизма (соокисления), когда хитин можно рассматривать как дополнительный вносимый субстрат для микробной деятельности. Из литературы известно, что в процессе инкубации загрязненного нефтью торфа с известью и минеральными удобрениями содержание нефтепродуктов в загрязненных образцах уменьшалось на 21–26% по сравнению с исходным (Толпешта и соавт., 2015).

Методом рентгеновской дифрактометрии совместно с сотрудниками геологического факультета

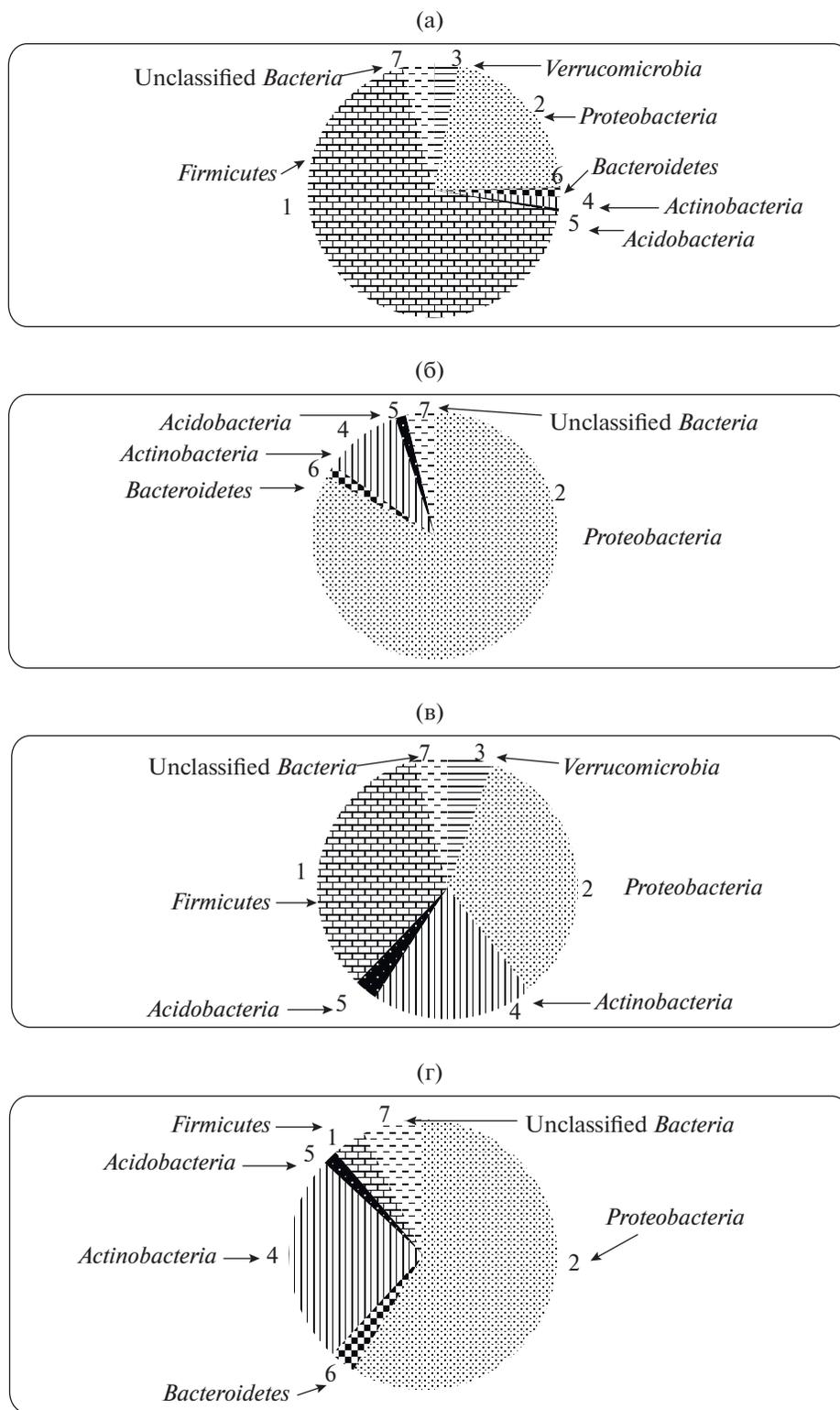


Рис. 2. Доля отдельных филогенетических групп домена *Bacteria* в контрольных образцах серой лесной почвы (а) и урбостратозема типичного (б), а также в образцах серой лесной почвы (в) и урбостратозема типичного (г), подверженных воздействию нефтепродуктов, полученных методом секвенирования тотальной ДНК (1 – *Firmicutes*; 2 – *Proteobacteria*; 3 – *Verrucomicrobia*; 4 – *Actinobacteria*; 5 – *Acidobacteria*; 6 – *Bacteroidetes*; 7 – unclassified *Bacteria*).

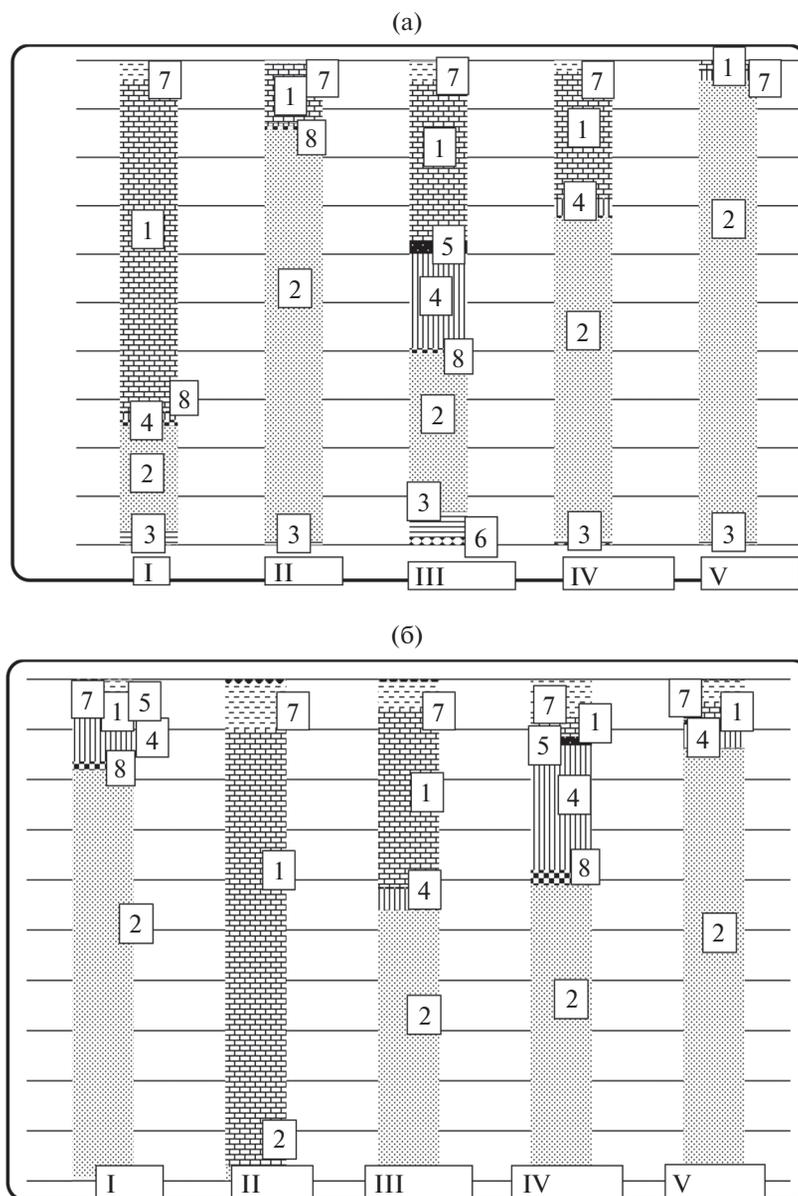


Рис. 3. Процентное содержание отдельных филогенетических групп домена *Bacteria* в серой лесной почве (а) и урбостратоземе типичном (б) при добавлении хитина и без него (I – контроль, II – с хитином, III – с бензином, IV – с дизелем, V – с бензином и хитином); 1 – *Firmicutes*; 2 – *Proteobacteria*; 3 – *Verrucomicrobia*; 4 – *Actinobacteria*; 5 – *Acidobacteria*; 6 – *Bacteroidetes*; 7 – unclassified *Bacteria*; 8 – *Tenericutes*.

МГУ имени М.В. Ломоносова была проведена оценка минерального состава исследуемых образцов среднесуглинистой почвы и песчаного урбано-зема. При загрязнении образцов нефтепродуктами (особенно бензином) крупные органические молекулы топлива встраиваются в межслоевое пространство смектитовых пакетов, максимально раздвигая слои, снижая, тем самым агрегированность почвы (сдвиг первых пиков при насыщении

этиленгликолем практически не наблюдается). Пирофосфат не расходуется на разрушение агрегатов и остается в системе, давая высокий пик на дифрактограмме. При внесении полисахарида хитина в образцы почв, загрязненных нефтепродуктами, отмечена переработка смешаннослойных минералов – перераспределение пакетов с увеличением количества слоев смектитового типа, иллитовые пакеты уничтожаются практически полностью.

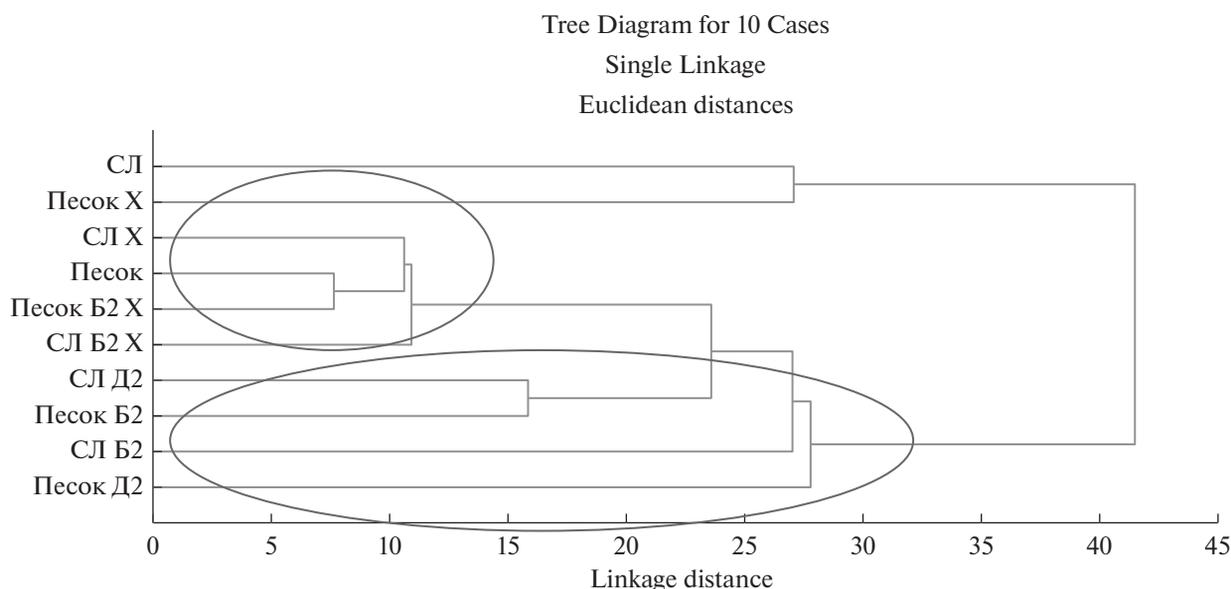


Рис. 4. Кластерный анализ данных, полученных для серой лесной почвы и урбостратозема типичного на основе данных секвенирования. Исследуемые варианты: СЛ – образцы серой лесной почвы без загрязнителей; Песок Х – песчаная почва урбостратозема с внесенным биополимером хитином; СЛ Х – серая лесная почва с внесенным хитином; Песок – образцы урбостратозема; Песок Б2Х – образцы урбостратозема, загрязненные бензином с внесением хитина; СЛ Б2Х – образцы серой лесной почвы, загрязненные бензином с внесенным хитином; СЛ Д2 – образцы серой лесной почвы, загрязненные дизельным топливом; Песок Б2 – образцы урбостратозема, загрязненные бензином, СЛ Б2 – образцы серой лесной почвы, загрязненные бензином; Песок Д2 – образцы урбостратозема, загрязненные дизельным топливом.

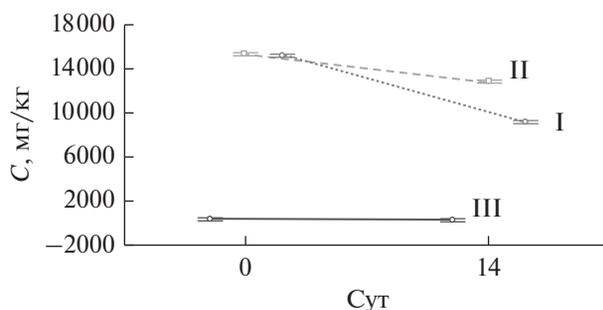


Рис. 5. Концентрация нефтепродуктов (мг/кг почвы) в опытных образцах урбостратозема типичного при добавлении хитина в образцы с нефтепродуктами (I), без хитина (вариант только с нефтепродуктами) (II) и в контроле (III) на 0 и 14 сутки эксперимента.

Эти результаты позволяют сделать вывод, что хитин вносит изменения в структуру решетки минералов, и рекомендовать использовать этот биополимер для восстановления загрязненных углеводородными почв (рис. 6).

Таким образом, в процессе выполнения работы впервые на основе анализа данных высокопроизводительных молекулярно-биологических методов установлено изменение структуры прокариотного метаболически активного комплекса в микросомах, загрязненных нефтепродуктами,

по сравнению с ненарушенными системами. Показано возрастание биоразнообразия в загрязненных образцах, увеличение доли филума *Actinobacteria* (родов *Gaiella* и *Nocardioidea*). Внесение полисахарида хитина в микросома на фоне загрязнителей на порядок увеличивает численность метаболически активного микробного сообщества, способствует оструктурированию почвы и формированию агрономически ценной структуры, а также приводит к снижению количества остаточных нефтепродуктов. Перечисленные па-

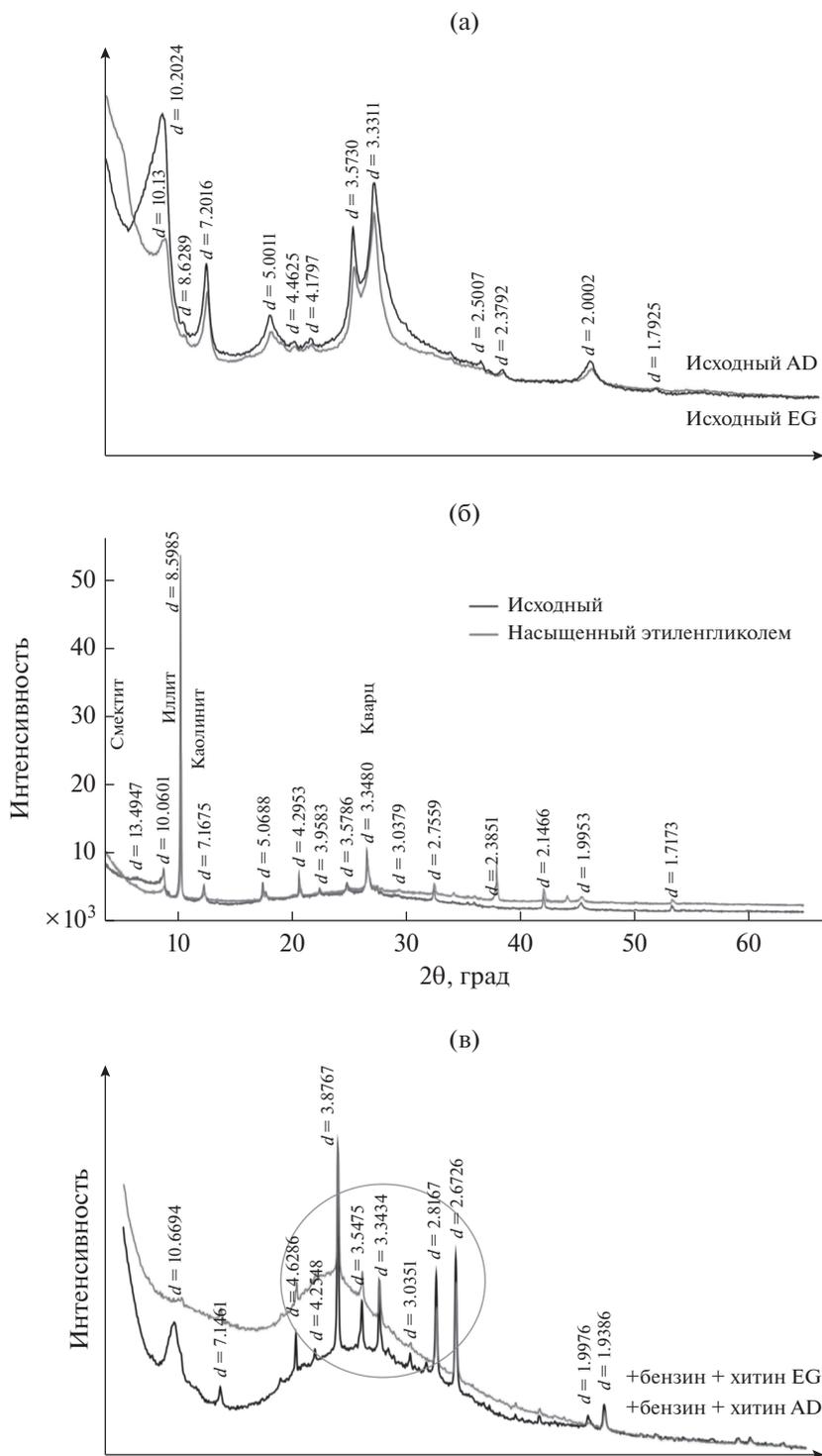


Рис. 6. Рентгеновская дифрактограмма почвенного образца на 30 сут эксперимента: а – контрольный образец; б – образец, загрязненный бензином (EG-насыщен этиленгликолем); в – образец, загрязненный бензином с добавлением хитина (EG-насыщен этиленгликолем).

раметры могут служить показателями частичной ремедиации загрязненных систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-29-02499-офи_м (50% работы) и РНФ № 14-50-00029 (50% работы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гриценко А.И. Экология. Нефть и газ / Под ред. Гриценко А.И., Акопов Г.С., Максимов В.М. М.: Наука, 1997. 598 с.

Коронелли Т.В., Дермичева С.Г., Семенов М.Н. Родоккокки как природный сорбент углеводородов // Микробиология. 1986. Т. 55. № 4. С. 683–686.

Манучарова Н.А. Гидролитические прокариотные комплексы наземных экосистем. М.: Университетская книга, 2014. 272 с.

Микроорганизмы и охрана почв // Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. 239 с.

Назина Т.Н., Павлова Н.К., Татаркин Ю.В., Шестакова Н.М., Бабич Т.Л., Соколова Д.Ш., Ивойлов В.С., Хисаметдинов М.Р., Ибатуллин Р.Р., Турова Т.П., Беляев С.С., Иванов М.В. Микроорганизмы карбонатной нефтяной залежи 302 Ромашкинского месторождения и их биотехнологический потенциал // Микробиология. 2013. Т. 82. № 2. С. 191–202.

Nazina T.N., Pavlova N.K., Tatarikin Yu.V., Shestakova N.M., Babich T.L., Sokolova D.Sh., Ivoilov V.S., Khisameidinov M.R., Ibatullin R.R., Tourova T.P., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Microorganisms of the carbonate petroleum reservoir 302 of the Romashkinskoe oilfield and their biotechnological potential // Microbiology. 2013. V. 82. № 2. P. 190–200.

Нестеренко О.А., Квасников Е.И., Ногина Т.М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. Киев: Наукова Думка, 1985. 334 с.

Пиковский Ю.И., Геннадиев А.Н., Чернянский С.С., Сахаров Г.Н. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. 2003. № 9. С. 1132–1140.

ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных,

органогенных, органо-минеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектрометрии. М., 1998. 18 с.

Полянская Л.М., Гейдебрект В.В., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г. Распределение численности и биомассы микроорганизмов по профилям зональных типов почв // Почвоведение. 1995. № 3. С. 322–328.

Рябчиков А.М. О загрязнении природной среды нефтью // Вестник МГУ. 1974. Вып. 2. С. 11–19.

Тимергазина И.Ф., Переходова Л.С. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородоокисляющими микроорганизмами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. 2012. Т. 7. № 1. С. 35–39.

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.

Tolpeshta I.I., Trofimov S.Y., Erkenova M.I., Sokolova T.A., Stepanov A.L., Lysak L.V., Lobanenkov A.M. Laboratory simulation of the successive aerobic and anaerobic degradation of oil products in oil-contaminated high-moor peat // Eurasian Soil Sci. 2015. V. 48. P. 314–324.

Хомяков Д.М., Узких О.С. Диагностика нефтезагрязненных почв // Экологические нормы. Правила. Информатика. 2009. № 3. С. 34–39.

Шлыков В.Г. Рентгеновские исследования грунтов. М.: Изд-во МГУ, 1991. 184 с.

Atlas R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective // Microbiol. Rev. 1981. V. 45. P. 180–209.

Manucharova N.A., Kol'tsova E.M., Stepanov A.L., Demkina E.V., Demkin V.A., El'Registan G.I. Comparative analysis of the functional activity and composition of hydrolytic microbial complexes from the Lower Volga barrow and modern chestnut soils // Microbiology. 2014. V. 83. № 5. P. 674–683.

Molecular Analysis of the Hydrolytic Component of Petroleum-Contaminated Soils and of Soils Remediated with Chitin

N. A. Manucharova¹, * Yu. V. Kuteinikova¹, P. V. Ivanov², S. K. Nikolaeva¹, V. T. Trofimov², P. Yu. Stepanov², E. V. Tyapkina¹, D. N. Lipatov¹, and A. L. Stepanov¹

¹Faculty of Soil Science, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

²Faculty of Geology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*e-mail: manucharova@mail.ru

Received July 27, 2016

Abstract—Molecular genetic techniques (FISH and metagenomic analysis) were used to investigate prokaryotic complexes in native soils (gray forest soil and urbostratozema typical), soils contaminated by petroleum products (gasoline or diesel fuel), and soils subject to remediation by addition of a nitrogen-containing polysaccharide biopolymer chitin. The share of metabolically active prokaryotic cells in the hydrolytic complex of soil microcosms was determined, as well as their biomass and biodiversity. Compared to the control,

in the pollutant-containing experimental microcosms, a decrease in the share of metabolically active prokaryotic cells was observed, as well as changes of the hydrolytic complex structure, such as an increase in the share of the phylum *Actinobacteria* (specifically of the genera *Galiella* and *Nocardioides* in the samples contaminated with gasoline and diesel fuel, respectively). Supplementing the hydrocarbon-contaminated system the biopolymer chitin resulted in processing of mixed-minerals with an increase in the number of layers of the smectite type and, as a result, in formation of aggregates and improved aeration. An increase in the number of metabolically active prokaryotic cells and decreased diversity of the soil prokaryotic complex were observed, which were probably associated with the development of a selective group of the hydrolytic complex of chitin-degrading microorganisms.

Keywords: metabolically active prokaryotic complex, petroleum products, metagenomic analysis, fluorescence in situ hybridization (FISH)