

ИЗМЕНЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРОКАРИОТНОГО КОМПЛЕКСА ПОЧВ ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

© 2020 г. Н. А. Манучарова^а, *, Н. А. Ксенофонтова^а, Т. Д. Каримов^а,
А. П. Власова^а, Г. М. Зенова^а, А. Л. Степанов^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119192 Россия

*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2018 г.

После доработки 14.09.2019 г.

Принята к публикации 22.11.2019 г.

С применением молекулярно-биологических методов (FISH, метабаркодинг) исследовано сравнительное биоразнообразие прокариотного комплекса почвенных микрокосмов серой лесной, каштановой почв и чернозема до и после их загрязнения нефтью. По высокому таксономическому ранжированию три прокариотных сообщества, принадлежащие почвам разных типов, имеют сходную структуру. Установлены снижение микробного разнообразия и смена метаболически активных доминантов – представителей доменов *Bacteria* и *Archaea*, в микрокосмах, загрязненных нефтью, по сравнению с контрольными образцами в процессе микробной сукцессии. В опытных образцах почв всех исследуемых типов выявлено формирование специфического комплекса бактерий, в котором преобладали представители *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria*, а также архей, среди которых доминировали представители *Thaumarchaeota* и *Crenarchaeota*. Определены метаболически активные и неактивные в отношении нефтяного загрязнения представители почвенного прокариотного комплекса. Полученные данные свидетельствуют о сходстве сукцессионных реакций микробных сообществ почв разного типа на их загрязнение нефтью.

Ключевые слова: нефтезагрязненные почвы, метаболически активный прокариотный комплекс, гибридизация клеток *in situ* (FISH), высокопроизводительное секвенирование

DOI: 10.31857/S0026365620020093

По современным оценкам санитарно-экологического мониторинга только на территории России масштабы загрязнения почв нефтью в результате деятельности добывающих предприятий и транспортировки достигают нескольких сотен тысяч гектар. Следствием нефтяных разливов являются глубокие изменения физических, химических и биологических свойств почв (Трофимов, 2002; Геннадиев и соавт., 2015), в том числе изменения численности и состава почвенных микроорганизмов (Sorkhov et al., 1990; Назина и соавт., 2017). Присутствие нефти в почве может как стимулировать, так и угнетать размножение и развитие микроорганизмов. Наблюдаются уменьшение численности нитрифицирующих бактерий, увеличение численности аммонификаторов, денитрифицирующих бактерий и микромицетов (Шаркова и соавт., 2011). Изменения в микробном населении почвы в ответ на возрастающие антропогенные нагрузки отражаются на последовательной смене адаптивных зон. Происходят адаптация и кардинальная перестройка структуры функционального сообщества, выражающиеся в развитии популяций микроорганизмов, перерабатывающих нефть и потребляющих значительное количество азота

(Звягинцев и соавт., 2002; Хомяков и соавт., 2009). Эти изменения почвенной микрофлоры используются в биомониторинге и биоиндикации нефтяных загрязнений.

Наиболее эффективным способом снижения негативных последствий нефтяных разливов на сегодняшний день считается биологический, в связи с чем поиск высокоэффективных штаммов микроорганизмов-деструкторов углеводородов (УГВ) и выяснение условий для их эффективного применения является одним из приоритетных направлений (Иванова и соавт., 2015). Аэробные органотрофные бактерии являются важным звеном микробной трофической цепи, в которой в качестве источника углерода и энергии используются н-алканы нефти или сложные алифатические и ароматические фракции нефти (Nazina et al., 2001). Их основной экологической функцией является аккумуляция, деградация и утилизация газообразных и жидких углеводородов нефти, трансформация их в биомассу (Ившина и соавт., 2014, 2018). Считается, что интродукция микроорганизмов-деструкторов углеводородов нефти, как потенциальных доноров генетических детерминант биодegradации ароматических углеводо-

Таблица 1. Основные характеристики почв исследуемых типов

Название почвы/место отбора образцов	Глубина отбора образцов, см	Содержание гумуса, %	pH водн.
Чернозем типичный/Воронежская область	10	8	7.5
Серая лесная/Тульская обл., Щекинский р-н, Ярцевское лесничество	15	5.6	6.9
Каштановая почва/Воронежская область	12	4.18	7.5

родов, способствует интенсификации процессов очистки почв от загрязнений и повышению биодegradативного потенциала микробных популяций в местах, загрязненных нефтью, путем передачи детерминант биодegradации в эндогенные микроорганизмы (Ветрова и соавт., 2007; Филонов и соавт., 2010). До настоящего времени проблема биоремедиации загрязненных экосистем остается открытой, что обуславливает актуальность дальнейших исследований микробных сообществ.

Целью настоящей работы было проведение сравнительного анализа изменений филогенетического состава метаболически активного прокариотного комплекса чернозема, серой лесной и каштановой почв в процессе их загрязнения нефтью в модельных экспериментах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были отобранные в июне 2017 года образцы гумусовых горизонтов (А) следующих типов почв (табл. 1): 1) чернозем типичный среднесуглинистый среднесуглинистый на лессовидных суглинках (N 51°1'41", E 40°43'31") (Классификация и диагностика почв СССР, 1977) или чернозем миграционно-мицелярный среднесуглинистый среднесуглинистый на лессовидных суглинках (по классификации Шишова и соавт., 2004) или Voronic Chernozems (Классификация WRB IUSS Working ..., 2014). Лесополоса, растительность – дуб черешчатый (*Quercus robur*), клен остролистный (*Acer platanoides*). 2) Серая лесная (обычная) маломощная среднесуглинистая на покровных суглинках (N 53°58'23", E 37°10'34") (Классификация и диагностика почв СССР, 1977) или текстурно-дифференцированная серая типичная бескарбонатная мелкая неглубоко осветленная среднесуглинистая на покровных суглинках (по классификации 2004 г.) или Naplic Luvisols (Abruptic) (Классификация WRB IUSS Working ..., 2014). Растительный покров – липняк-лещино-пролесниковый. 3) Каштановая среднесуглинистая на лессовидных суглинках (N 49.39936°, E 46.81083°) (Классификация и диагностика почв СССР, 1977) или аккумулятивно карбонатная малогумусовая каштановая маломощная среднесуглинистая на лессовидных суглинках (Классификация и диагностика почв России, 2004) или Naplic Arenic Kashtanozem (Классификация WRBIUSS Working ..., 2014).

Почвенные образцы увлажняли водой до 60% от массы почвы. При проведении модельных экспериментов в опытные образцы нефть добавляли в количестве, превышающем показатели сильнозагрязненных почв (20% от массы почвы). Эксперимент проводили в течение 1 мес.

Использовали нефть Азово-Кубанского нефтегазоносного бассейна (НГБ, месторождение “Кубанская площадь”, скважина С-1, глубина отбора 2800–2832 м, возраст N₁², плотность нефти 0.835 г/см³ при 15°C, цетановое число 51, йодное число 0.4, вязкость условная 1.5 и кинематическая 4.9 при 20°C, мм²/с).

Анализ биоразнообразия прокариотного комплекса исследуемых образцов почв проводили методом высокопроизводительного секвенирования консервативного участка гена 16S рРНК. Для экстракции тотальной ДНК применяли стандартные методы Power Soil 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 (CCTACG-GGRBGCASCAG) и PRK806R (GGACTACYVG-GGTATCTAAT). 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. Секвенирование проводили на полигеномном секвенаторе Illumina Miseq, время прочтения 39 ч, количество pair-end reads (парных прочтений) – 8 млн. После проведенных прочтений 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 QIIME 1.9.1, включающего объединение прямых и обратных прочтений. Удаление технических последовательностей, фильтрацию последовательностей с низкими показателями достоверности про-

Таблица 2. рРНК-специфичные олигонуклеотидные зонды. Y = C или T, W = A или T, R = A или G

Зонд	Целевая группа организмов	Нуклеотидная последовательность зонда (5'-3')	Ссылка
EUB338 I	<i>Bacteria</i>	Cy3 GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Amann et al., 1990
EUB338 II	<i>Bacteria (Planctomycetales)</i>	Cy3 GCA GCC ACC CGT AGG TGT	
EUB338 III 338-355	<i>Bacteria (Verrucomicrobiales)</i>	Cy3 GCT GCC ACC CGT AGG TGT	
ARCH915-934	<i>Archaea</i>	Cy3 GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT TCG	Stahl et al., 1991
EURY806	<i>Euryarchaeota</i>	Cy3 CAC AGC GTT TAC ACC TAG	
CREN537	<i>Cren + Thaumarchaeota</i>	Cy3 TGA CCA CTT GAG GTG CTG	Teira et al., 2004
THAUM-494	<i>Thaumarchaeota</i>	Cy3 GAA TAA GGG GTG GGC AAGT	Timonen, 2009
ALF1b ALF968	<i>Alphaproteobacteria</i>	Cy3 CGT TCG YTC TGA GCC AGT GGT AAG GTT CTG CGC GTT	Teira et al., 2004
BET	<i>Betaproteobacteria</i>	Cy3 GCC TTC CCA CTT CGT TT	Manz et al., 1992
GAM42a	<i>Gammaproteobacteria</i>	Cy3 GCC TTC CCA CAT CGT TT	Manz et al., 1992
SRB385Db	<i>Deltaproteobacteria</i>	Cy3 CGG CGT TGC TGC GTC AGG	Rabus et al., 1999
CF319a CFB560	<i>Bacteroidetes</i>	Cy3 TGG TCC GTG TCT CAG TAC WCC CTT TAA ACC CART	Manz et al., 1996
HGC69	<i>Actinobacteria</i>	Cy3 TAT AGT TAC CAC CGC CGT	Roller et al., 1994
LGC354A, LGC354B, LGC354Ce	<i>Firmicutes</i>	Cy3 TGG GAA GAT TCC CTA CTG C, Cy3 CGG GAA GAT TCC CTA CTG C, Cy3 CCG GAA GAT TCC CTA CTG C	
HoAc1402	<i>Acidobacteria</i>	Cy3 CTT TCG TGA TGT GAC GGG	Juretschko et al., 2002
Ver138	<i>Verrucomicrobia</i>	Cy3 CGA GCT ATT CCC CTC TTG	Wagner et al., 2006
Ver 1455		Cy3 CCA TCC ATA CCT TCG GCA	
PLA46	<i>Planctomycetes</i>	Cy3 GAC TTG CAT GCC TAA TCC	Neef et al., 1998
PLA886		Cy3 GCC TTG CGA CCA TAC TCC C	

чтения отдельных нуклеотидов (качество менее Q20), фильтрацию химерных последовательностей, выравнивание прочтений на референсную последовательность 16S рРНК, распределение последовательностей по таксономическим единицам проводили с использованием базы данных Silva версии 132. Использовали алгоритм классификации операционных таксономических единиц (ОТЕ) с открытым референсом (Open-reference OTU), порог классификации 97%.

Определение общей численности и численности метаболически активных клеток в исследуемых образцах проводили люминесцентно-микроскопическим методом FISH (метод гибридизации клеток *in situ*) с использованием различных флуорохромов (акридина оранжевого, Cy3) (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 олигонук-

леотидными зондами, что позволяет 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*. Олигонуклеотидные последовательности зондов приведены в табл. 2.

Для прямого учета микроорганизмов использовали микроскоп Axioskop 2 plus ("ZEISS", Германия). Численность 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 вы-

Таблица 3. Праймеры, используемые при амплификации (PCR in real time) нуклеотидных последовательностей рода *Micromonospora*

Целевая группа организмов	Праймеры (1 – forward; 2 – reverse)	Нуклеотидная последовательность зонда (5'–3')	Ссылка
<i>Micromonospora</i> (MMS)	M2F 492-508 A3R 1059r	WAGAAGAAGAGCCCGGCC* CCAGCCCCACCTTCGAC	Monciardini et al., 2002

* W = A или T.

числяли, учитывая показатели сухой биомассы для одной бактериальной клетки объемом 0.1 мкм^3 – $2 \times 10^{-14} \text{ г}$; для 1 м мицелия актиномицетов диаметром 0.5 мкм – $3.9 \times 10^{-8} \text{ г}$ (Полянская и соавт., 1995).

Для количественного анализа числа копий ДНК представителей бактерий, принадлежащих филогенетической группе *Actinobacteria* в исследуемых вариантах микрокосмов на определенные сутки сукцессии (14 и 30 сут) применяли метод ПЦР в реальном времени на детектирующем амплификаторе DTLite4 ДНК-Технология. Обработка полученных результатов измерений была сделана с использованием пакета программы Realtime_PCR. Детектирующий амплификатор DTLite4 совмещает в себе функции программируемого термоциклера и оптической системы, позволяющей регистрировать флуоресценцию реакционной смеси в пробирках в ходе полимеразной цепной реакции. Использовали интеркалирующий краситель SYBR® Green и красители, связанные с праймерами (Lightcyaler – два зонда, связывающие ДНК-мишень на небольшом расстоянии друг от друга). 5'-Конец одного зонда и 3'-конец второго содержат флуорофор-донор и флуорофор-акцептор. При их близком расположении флуорофор-донор поглощает свет определенной длины волны и переносит энергию на флуорофор-акцептор, по флуоресценции которого детектируют продукты амплификации. Реакционную смесь готовили из препарата Super MixEva Green Biorad (концентрированный буфер с дезоксирибонуклеотидами, полимеразой Sso7d-fusion, MgCl_2 , красителем EvaGreen и стабилизаторами). Калибровку прибора проводили по зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК стандартных растворов. Последовательности праймеров, используемых для выявления представителей рода *Micromonospora*, представлены в табл. 3 (Monciardini et al., 2002). Применяли следующий протокол для амплификации: 1 цикл: 94.0°C – 5 мин; 29 циклов: 94.0°C – 0.75 мин; 68.0°C – 2 мин; 1 цикл: 68.0°C – 7 мин. Количество исследуемой ДНК выражали в абсолютных или относительных единицах. Каждое количественное определение матрицы ДНК требует трех стандартов и отрицательного контроля (образца без матрицы ДНК).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сукцессия микробных сообществ при загрязнении почв нефтью. Из литературы известно, что сообщество почвенных микроорганизмов может по-разному реагировать на загрязнение почвы нефтепродуктами, например, после кратковременного ингибирования – повышением общей численности и возрастанием активности. Прежде всего, это относится к углеводородокисляющим бактериям, количество которых резко возрастает по сравнению с численностью в незагрязненных почвах (Гузев и соавт., 1980; Лысак, Добровольская, 1982; Звягинцев, Зенова, 2001; Толпешта и соавт., 2015). Анализ общей численности прокариот и пересчет на их биомассу для всех трех типов исследуемых почв (чернозема, серой лесной и каштановой) показал, что в опытных вариантах с внесением нефти оба показателя были ниже, чем в контрольных образцах. Так для чернозема к 21 сут сукцессии суммарная биомасса прокариот в загрязненных образцах составляла около 600 мкг/г почвы, что в два раза меньше биомассы в контрольных вариантах, при этом биомасса метаболически активных представителей прокариот составляла от 30 до 45% от суммарной биомассы прокариотного комплекса (рис. 1). Аналогичные закономерности были отмечены для образцов серой лесной и каштановой почв (данные не приводятся).

В процессе сукцессии почвенного микробного сообщества происходит перестройка структуры его микробной компоненты, развиваются специализированные группы, участвующие в утилизации УГВ на разных ее этапах, что приводит к формированию устойчивого сообщества, состоящего из представителей, способных использовать различные УГВ в процессе жизнедеятельности (Звягинцев и соавт., 2002).

С целью расширения выявляемого спектра прокариот-деструкторов УГВ, в том числе за счет некультивируемых форм, были использованы молекулярно-биологические анализы (FISH) и подходы с применением метабаркодинга. Характеристика метаболически активного прокариотного комплекса также включала оценку соотно-

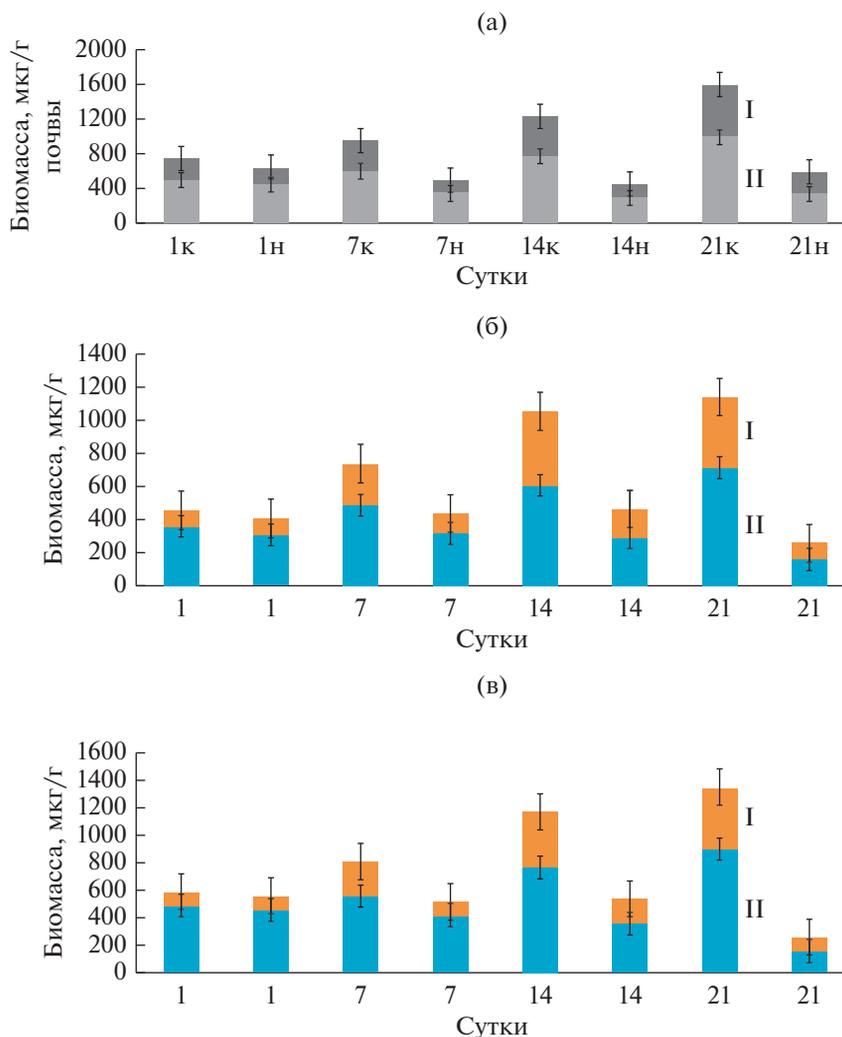


Рис. 1. Динамика биомассы прокариот (метод FISH) в черноземе (а), серой лесной (б), каштановой (в) в процессе сукцессии, инициированной увлажнением с внесением нефти (н) и в контроле (к): I – биомасса метаболически активных клеток прокариот; II – биомасса клеток, не идентифицируемых используемыми зондами (в том числе споры, цисты).

шения представителей доменов *Bacteria* и *Archaea*. Во всех исследуемых почвенных образцах по результатам FISH преобладали метаболически активные представители домена *Bacteria* (90%), а доля архей составляла около 10% как в опытных, так и в контрольных образцах (рис. 2). В образцах с внесением нефти наблюдалась перестройка метаболически активной компоненты прокариотного комплекса, происходило снижение биоразнообразия по сравнению с контролем: наряду с присутствием в сообществе прокариот организмов, устойчивых к нефтяному загрязнению, там имеются и чувствительные, полностью исчезающие из активного комплекса организмы.

При оценке структуры метаболически активного прокариотного комплекса по показателям численности и биомассы представителей различных филогенетических групп домена *Bacteria* в образцах с внесением нефти выявлено преобладание пред-

ставителей *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Значения биомассы представителей этих групп в загрязненном нефтью черноземе, по оценке методом FISH, достигали 200 и 280 $\mu\text{g/g}$ почвы соответственно (рис. 3).

В работах, посвященных анализу прокариотной компоненты серой лесной почвы и урбостратозема типичного, загрязненных нефтепродуктами, опубликованных нами ранее, также было показано, что в этих почвах происходит изменение структуры прокариотного метаболически активного комплекса, по сравнению с образцами ненарушенных почвенных систем. В микрокосмах, загрязненных УГВ, по сравнению с ненарушенными системами, отмечалось увеличение доли филума *Actinobacteria*, особенно рода *Galiella* (в образцах, загрязненных бензином) и рода *Nocardioides* (в образцах, загрязненных дизельным топливом) (Манучарова и соавт., 2017).

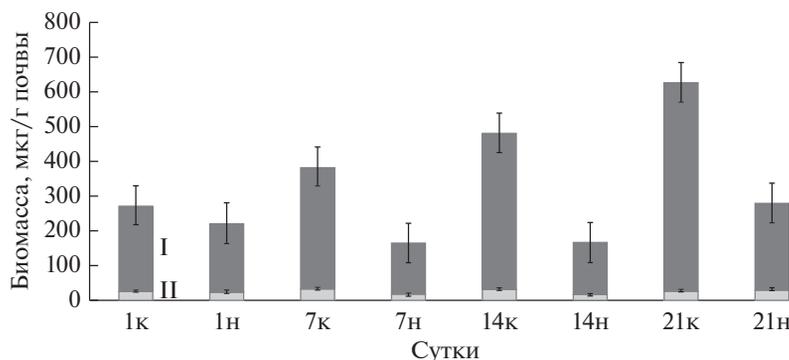


Рис. 2. Соотношение метаболически активной биомассы (метод FISH) представителей доменов *Bacteria* и *Archaea* в черноземе в процессе сукцессии, инициированной внесением нефти (н) и в контроле (к): I – биомасса метаболически активных клеток домена *Bacteria*; II – биомасса метаболически активных клеток домена *Archaea*.

Молекулярно-биологическими методами (FISH и высокопроизводительным секвенированием) в загрязненных нефтью образцах чернозема на 20 сут сукцессии обнаружено значительное, относительно контрольных образцов, возрастание биомассы метаболически активных представителей *Actinobacteria*. Если доля актинобактерий в контрольных образцах чернозема составляла 28% (метод FISH, рис. 4а; секвенирование, рис. 5а), то в образцах с нефтью она возросла до 48% от биомассы всей метаболически активной прокариотной компоненты (метод FISH, рис. 4б; высокопроизводительное секвенирование, рис. 5б).

Среди актинобактерий доминировали в опытных вариантах представители следующих групп: Subclass *Rubrobacteridae* (роды *Gaiella*, *Solirubrobacter*); Subclass *Actinobacteridae* (suborder *Propionobacterineae* (*Nocardiodes*, *Kribella*); *Micromonosporineae* (*Catelliglobospora*, *Micromonospora*); *Corynebacterineae* (*Rhodococcus*); *Pseudonocardineae* (*Pseudonocardia*); *Micrococccineae* (*Cellulomonas*, *Agromy-*

ces); *Streptomycineae* (*Streptomyces*); *Streptosporangineae* (*Thermomonosporaceae*, *Streptosporangium*) (рис. 6). Отметим, что многие представители родов *Ilumotobacter*, *Aciditerrimonas*, принадлежащих группе актинобактерий, также обнаруженных нами в исследуемых образцах с нефтью, способны расти в анаэробных условиях и обладают термо- и ацидофилией (Itoh et al., 2011).

Для образцов серой лесной почвы, как и для чернозема, наблюдалась схожая картина: доля актинобактерий в опытных вариантах возросла, по сравнению с контрольными (рис. 7а, 7б). Если в контрольных образцах, по результатам секвенирования, представители актинобактерий занимали минорные позиции, то при внесении УГВ их доля возросла до 30% от всего бактериального сообщества.

По результатам метабаркодинга в филуме *Actinobacteria* в опытных образцах обнаруживаются представители как устойчивых, так и чувствительных к нефтезагрязнению родов. Численность некоторых родов резко сокращается до полного исчезновения при внесении в почву нефти, что приводит к сокращению биоразнообразия сообщества. Примером чувствительных организмов в филуме *Actinobacteria* служат представители семейства *Micromonosporineae* (*Dactylosporangium*, *Actinoplanes*, *Virgisporangium*). Таким образом, в микробном сообществе формируется достаточно специфичная группа метаболически активных представителей, обладающих набором функциональных генов, отвечающих за деструкцию таких труднодоступных соединений, к которым относится нефть.

Заслуживающим внимания результатом, с точки зрения авторов, явилось сокращение в вариантах с нефтью представителей семейства *Micromonosporineae*, принадлежащих к филогенетической группе *Actinobacteria* и характеризующихся широким ареалом обитания, в том числе в загрязненных поллютантами антропогенных городских экосистемах (Звягинцев, Зенова, 2001). В связи с этим была проведена серия экспериментов по определению числа копий генов ДНК, ха-

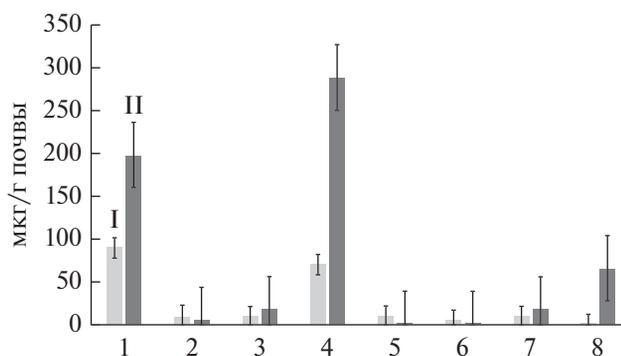


Рис. 3. Биомасса метаболически активных представителей (метод FISH) различных филогенетических групп домена *Bacteria* (мкг/г почвы) в черноземе на 20 сут сукцессии, инициированной внесением нефти (II) и в контроле (I): 1 – *Proteobacteria*; 2 – *Verrucomicrobia*; 3 – *Acidobacteria*; 4 – *Actinobacteria*; 5 – *Firmicutes*; 6 – *Planctomycetes*; 7 – *Bacteroidetes*; 8 – Unclassified.

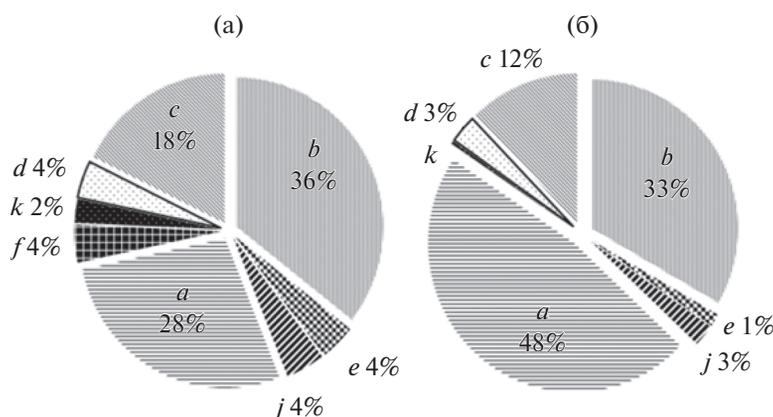


Рис. 4. Филогенетическая структура метаболически активного прокариотного комплекса домена *Bacteria* (метод FISH) на 20 сут сукцессии, инициированной увлажнением (контроль) (а) и увлажнением и внесением нефти (б) в образцах чернозема: *a* – *Actinobacteria*; *b* – *Proteobacteria*; *c* – *Unclassified*; *d* – *Bacteroidetes*; *e* – *Acidobacteria*; *f* – *Firmicutes*; *j* – *Verrucomicrobia*; *k* – *Planctomycetes*.

рактерных для представителей рода *Micromonospora*, что определяли в образцах исследуемых микроскозов, загрязненных углеводородами и контрольных, с помощью количественной ПЦР (qPCR). Представители этого рода обнаруживались во всех пробах в ходе сукцессии (табл. 4), при этом во всех опытных загрязненных нефтью образцах число копий было ниже, по сравнению с контролем. В микроскомах образцов серой лесной и каштановой почв, загрязненных нефтью, по сравнению с контролем численность микромоноспор снижалась на порядок и к завершающим срокам сукцессии (30 сут) составила 1.1×10^4 и 7.5×10^4 соответственно. Для чернозема это снижение было менее значимым. Таким образом, представители рода *Micromonospora*, определенные в образцах исследуемых микроскозов, были отнесены к организмам, проявляющим чувствительность к нефтяному загрязнению.

Чувствительность к нефтяному загрязнению проявили некоторые представители и других филогенетических групп бактерий: *Firmicutes* (семейство *Streptococcaceae*, представители рода *Lactovum*), *Alphaproteobacteria* (представители *Mesorhisobuim*, *Nitrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobuim*, *Pedomicrobium*), *Bacteroidetes* (семейство *Chitinophagaceae*, представители *Terrimonas*, *Flavisolibacter*, *Niastella*).

Анализ филогенетической структуры *Proteobacteria* показал преобладание в образцах с нефтью представителей альфа- и гамма-протеобактерий. Среди гамма-протеобактерий – представители родов *Pseudomonocardis* (в черноземе и каштановой почвах) и *Rhodopseudomonas* (в серой лесной). Среди альфа-протеобактерий – до 30% *Bradyrhizobium* (в черноземе) и *Sphingobium* (в серой лесной почве).

Следует отметить, что комплекс бактерий, устойчивых к загрязнению углеводородами, может быть интересен также с точки зрения скрининга штаммов-продуцентов новых антибиотиков, действующих на резистентные формы патогенных микроорганизмов (Ефименко и соавт., 2016). Так, среди представителей филума *Bacteroidetes* был обнаружен продуцент нового антибиотика фальцитидина – ацилтетрапептида, обладающего активностью в отношении возбудителя малярии, доминирующей в образцах, загрязненных нефтью (Somanadhan et al., 2013).

Анализ метаболически активных представителей филогенетических групп домена *Archaea* (метод FISH) исследуемых образцов почв на 20 сут сукцессии выявил изменения как численности, так и структуры комплекса архей при добавлении в образцы УГВ нефти, по сравнению с контролем (рис. 8). В то время как численность метаболически активных представителей *Thaumarchaeota* и

Таблица 4. Число копий генов ДНК детерминирующих представителей родов *Micromonospora*, выявляемых в микроскомах разных типов почв (число копий/г почвы) в процессе сукцессии, инициированной увлажнением (контроль) и увлажнением с внесением нефти (метод qPCR)

Почва	14 сут сукцессии		30 сут сукцессии	
	контроль	нефть	контроль	нефть
Серая лесная	1.6×10^5	5.1×10^4	2.8×10^5	1.1×10^4
Каштановая	1.8×10^5	3.8×10^4	3.7×10^5	7.5×10^4
Чернозем	7.3×10^5	6.8×10^5	5.8×10^5	1.6×10^5

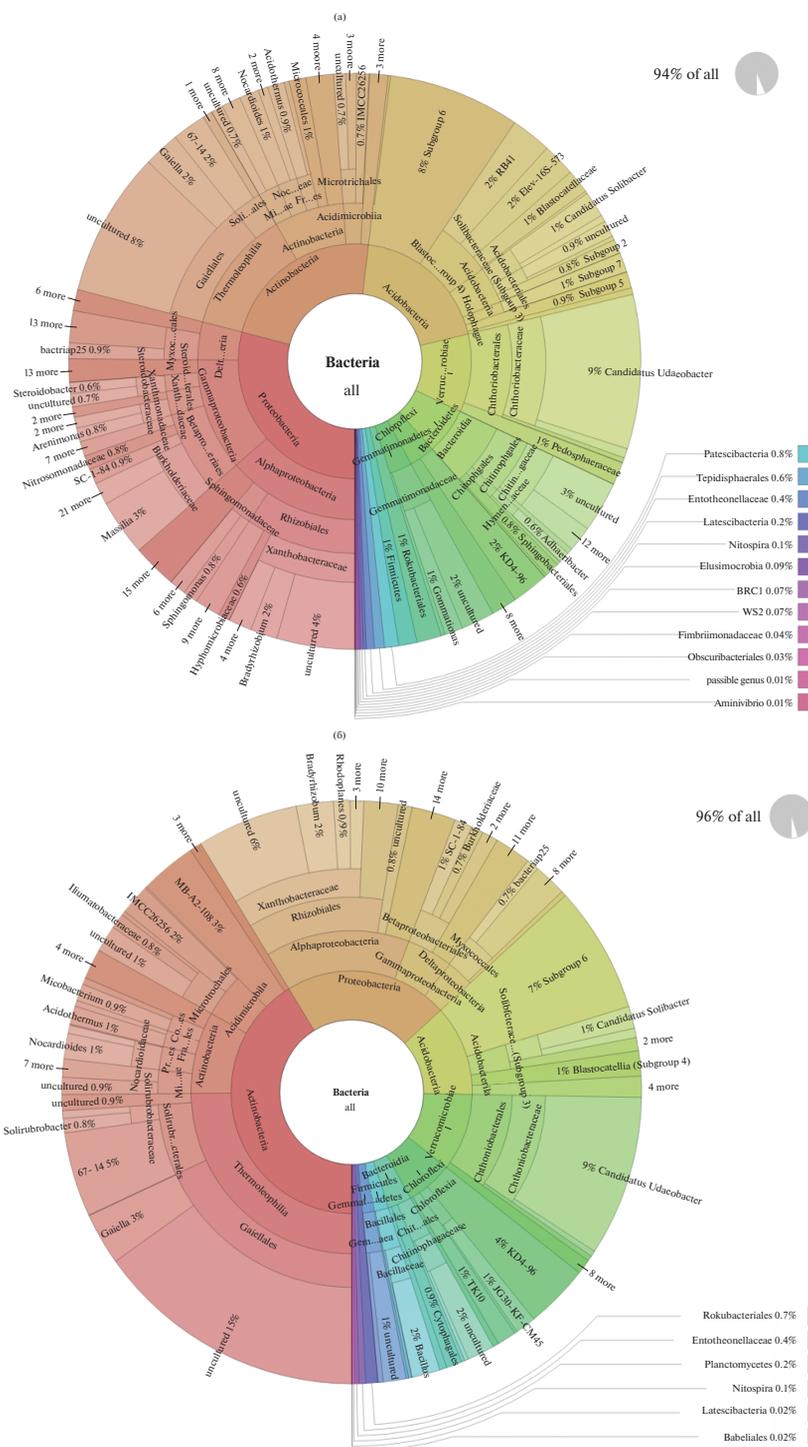


Рис. 5. Филогенетическая карта структуры бактериальной компоненты чернозема на 20 сут сукцессии в контрольных (а) и опытных (с внесением нефти) (б) образцах.

Euryarchaeota во всех опытных образцах снижалась к 20 сут сукцессии, численность представителей филогенетической группы *Crenarchaeota* немного возрастала или оставалась неизменной в

черноземе и доминировала (по биомассе) в образцах каштановой и серой лесной почв.

По результатам секвенирования в загрязненных нефтью образцах среди *Crenarchaeota* домини-

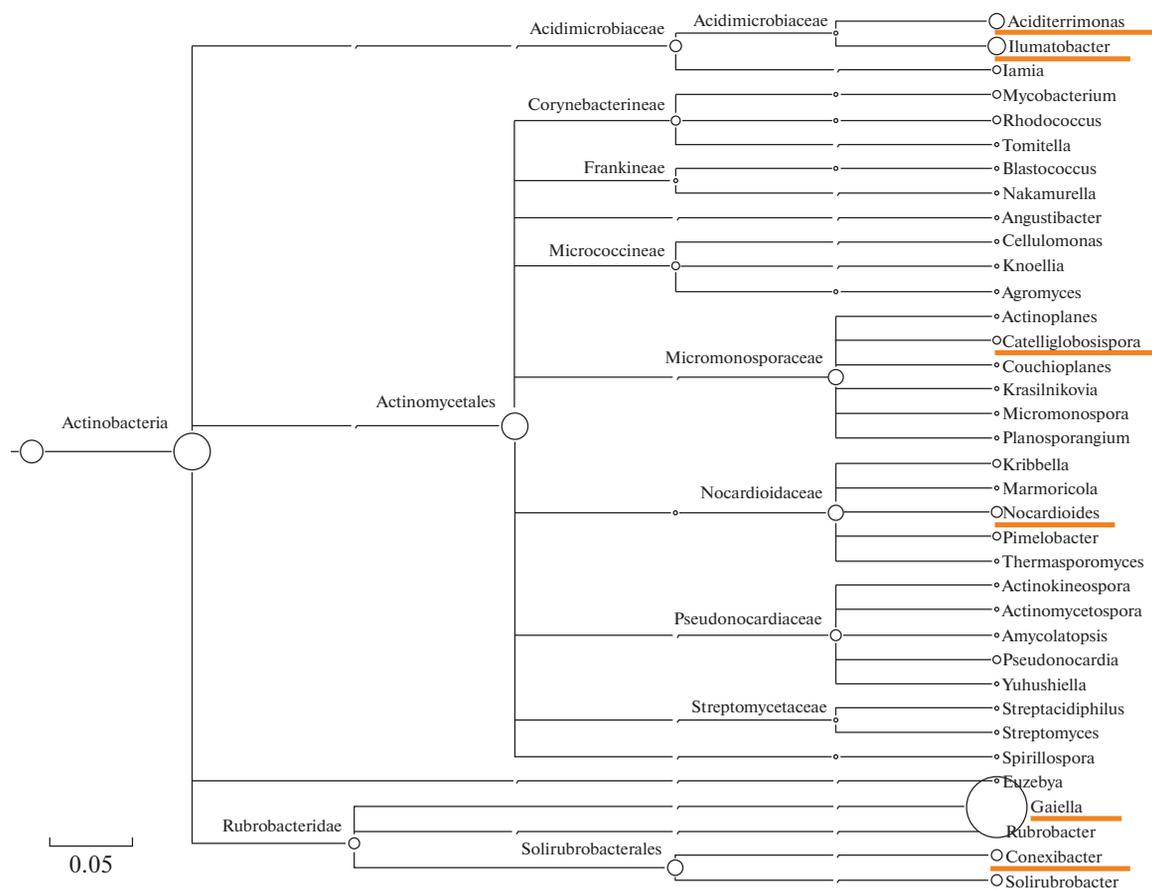


Рис. 6. Филогенетическая дендрограмма доминирующих представителей филума *Actinobacteria* в образце чернозема, загрязненном нефтью, основанная на результатах анализа метабаркодинга. Дерево построено с помощью алгоритма neighbor-joining, масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов.

ровали представители родов *Pyrolobus* (представитель термофилов), *Sulfurisphaera* (представитель факультативных анаэробов, термофилов, ацидофилов) и семейство *Thermoproteaceae*. Так же были выявлены последовательности, характерные для представителей филогенетической группы *Thaumarchaeota* рода *Nitrososphaera*. Представители этого рода активно участвуют в процессе нитрификации в цикле азота и способны к окислению аммиака, что может быть стимулом для дальнейших исследований в области биоремедиации загрязненных нефтью систем. В отношении биоразнообразия архейного анаэробного комплекса, развивающегося в высокотемпературных горизонтах нефтяных месторождений, известны представители рода *Thermococcus* (*Euryarchaeota*) (Назина и соавт., 2006).

Таким образом, в почвах разных типов, загрязненных нефтью (серая лесная, каштановая, чернозем), наблюдается перестройка филогенетической структуры метаболически активной прокариотной компоненты микробного комплекса, по сравнению с незагрязненными системами. Использование методов современного молекулярно-биологического анализа с применением метабаркодинга способ-

ствовало выявлению в загрязненных нефтью почвенных микросомах специфического спектра бактерий, в котором преобладали гаммапротео- и актинобактерии, и архей – представителей *Crenarchaeota*. Определены устойчивые и чувствительные к углеводородам нефти представители почвенного прокариотного комплекса. Среди устойчивых к нефтезагрязнению представителей домена *Bacteria* доминировали следующие: *Nocardioodes*, *Rhodococcus*, *Gaiella*, *Kribella*, *Conexibacter*, *Solirubrobacter*, *Pseudomonocardis*, *Rhodopseudomonas*), среди представителей домена *Archaea*: *Pyrolobus*, *Sulfurisphaera*, семейство *Thermoproteaceae*. Чувствительность к загрязнению проявили представители *Firmicutes*, семейства *Streptococcaceae-Lactovum*, *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria*, роды *Mesorhisobium*, *Nitrobacter*, *Bradyrhizobium*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*), *Bacteroidetes* (*Pedobacter*, *Mucilaginitacter*).

Результаты настоящего исследования могут быть полезны для биодиагностики и биоиндикации природных экосистем, а также для создания новых биопрепаратов, предназначенных для деструкции нефтяных поллютантов в загрязненных почвенных системах.

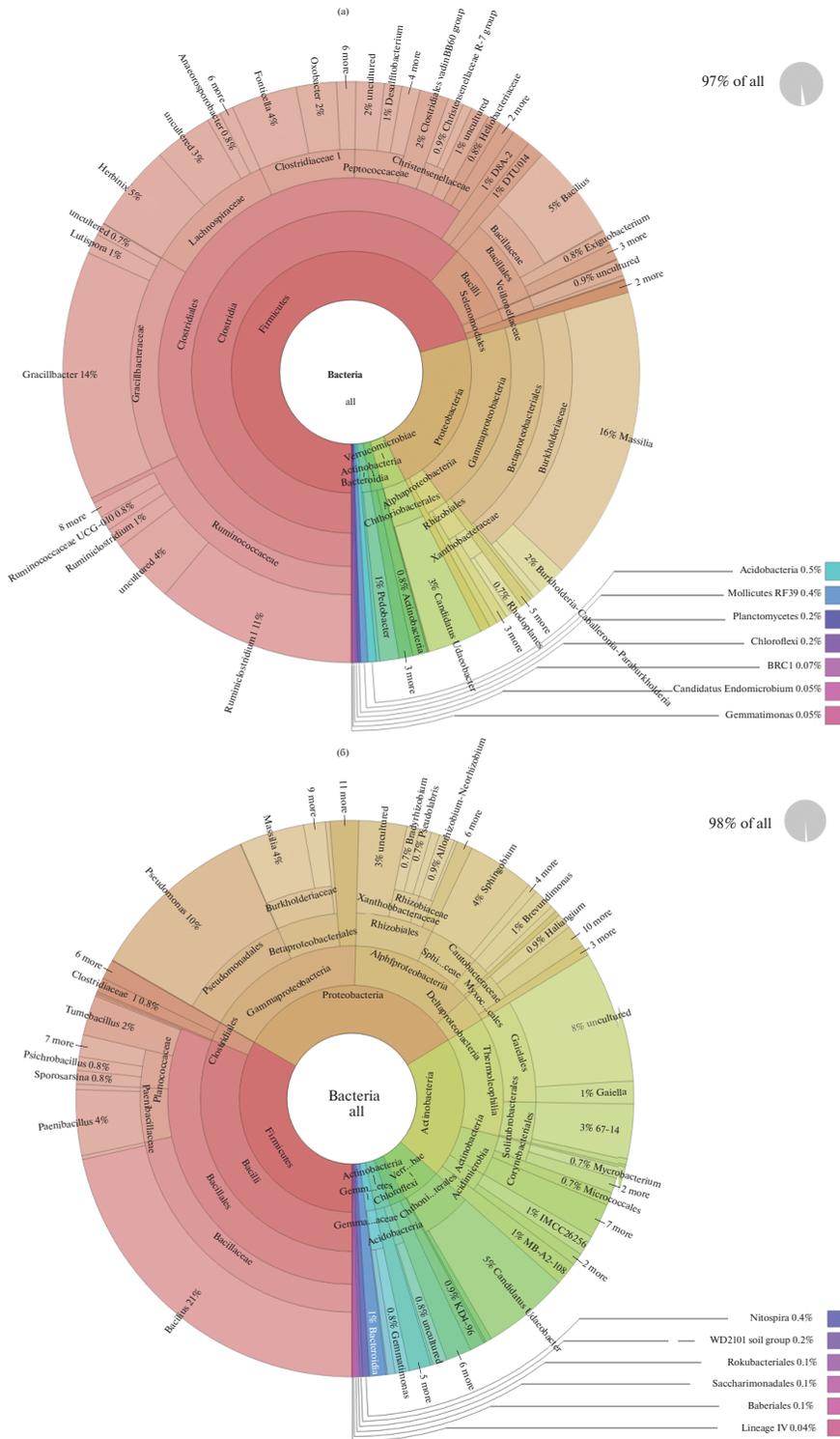


Рис. 7. Филогенетическая карта структуры бактериальной компоненты серой лесной почвы на 20 сут сукцессии в контрольных (а) и опытных (с внесением нефти) (б) образцах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 19-29-05197-мк.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

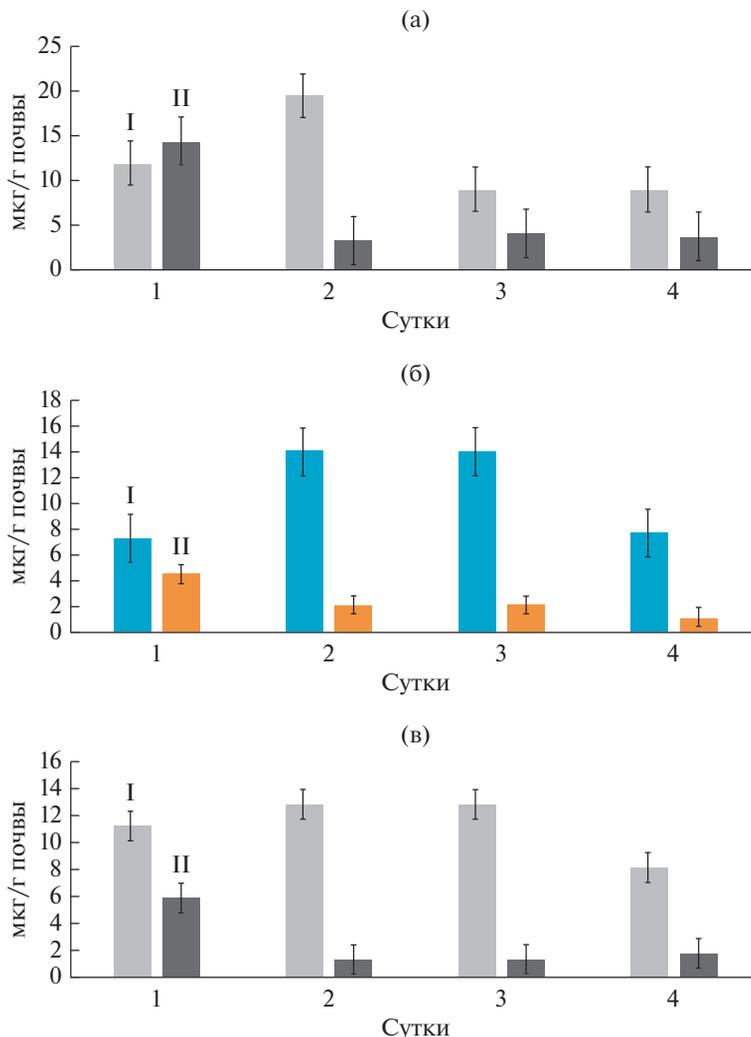


Рис. 8. Биомасса метаболически активных представителей разных филогенетических групп домена *Archaea* (метод FISH) в черноземе (а), серой лесной (б) и каштановой (в) почвах на 20 сут сукцессии, инициированной увлажнением – контроль (I) и увлажнением и внесением нефти (II): 1 – *Crenarchaeota*; 2 – *Thaumarchaeota*; 3 – *Euryarchaeota*; 4 – *Unclassified*.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ветрова А.А., Нечаева И.А., Игнатова А.А., Пунтус И.Ф., Аринбасаров М.У., Филонов А.Е., Боронин А.М. Влияние каталитических плазмид на физиологические параметры бактерий рода *Pseudomonas* и эффективность биодеструкции нефти // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 354–360.
- Vetrova A.A., Nechaeva I.A., Ignatova A.A., Puntus I.F., Arinbasarov M.U., Filonov A.E., Boronin A.M. Effect of catalytic plasmids on physiological parameters and efficiency of oil destruction by *Pseudomonas* bacteria // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 310–316.
- Геннадиев А.Н., Пиковский Ю.И., Жидкин А.П., Ковач Р.Г., Кошовский Т.С., Смирнова М.А., Хлынина Н.И., Цибарт А.С. Факторы и модификации углеводородного состояния почв // *Почвоведение*. 2015. Т. 48. С. 1314–1329.
- Gennadiyev A.N., Pikovskiy Y.I., Zhidkin A.P., Kovach R.G., Koshovskii T.S., Smirnova M.A., Khlynina N.I., Tsi bart A.S.

Factors and features of the hydrocarbon status of soils // *Euras. Soil Sci.* 2015. V. 48. P. 1193–1206.

Гузев В.С., Бондаренко Н.Г., Бызов Б.А. Структура инициированного микробного сообщества как интегральный метод оценки микробиологического состояния почв // *Микробиология*. 1980. Т. 49. С. 134–139.

Guzev V.S., Bondarenko N.G., Byzov B.A. The structure of the initiated microbial community as an integral method for assessing the microbiological state of soils // *Microbiology (Moscow)*. 1980. V. 49. P. 134–139.

Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. Экология актиномицетов. М.: ГЕОС, 2001.

Звягинцев Д.Г., Умаров М.М., Чернов И.Ю. Микробные сообщества и их функционирование в процессах деградации и самовосстановления почв // *Деградация и охрана почв / Под общей ред. акад. РАН Добровольского Г.В. М.: Наука*, 2002. С. 404–454.

Ефименко Т.А., Маланичева И.А., Васильева Б.Ф., Глухова А.А., Сумарукова И.Г., Бойкова Ю.В., Малкина Н.Д., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Антибиотическая ак-

- тивность бактерий – эндобионтов плодовых тел базидиальных грибов // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 740–747.
- Efimenko T.A., Malanicheva I.A., Vasil'eva B.F., Glukhova A.A., Sumarukova I.G., Boikova Yu.V., Malkina N.D., Terekhova L.P., Efremenkova O.V.* Antibiotic activity of bacterial endobionts of basidiomycete fruit bodies // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 740–747.
- Иванова А.А., Ветрова А.А., Филонов А.Е., Боронин А.М.* Биодegradация нефти микробно–растительными ассоциациями // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. С. 191–197.
- Ivanova A.A., Vetrova A.A., Filonov A.E., Boronin A.M.* Oil biodegradation by microbial–plant associations // Appl. Biochem. Microbiol. 2015. V. 51. P. 196–201.
- Ившина И.Б., Костина Л.В., Каменских Т.Н., Жуйкова В.А., Жуйкова Т.В., Безель В.С.* Почвенный микробиоценоз как показатель стабильности луговых сообществ при химическом загрязнении среды тяжелыми металлами // Экология. 2014. № 2. С. 83–93.
- Ivshina I.B., Kostina L.V., Kamenskikh T.N., Zhuikova V.A., Zhuikova T.V., Bezel' V.S.* Soil microbiocenosis as an indicator of stability of meadow communities in the environment polluted with heavy metals // Russ. J. Ecol. 2014. V. 45. P. 83–89.
- Ившина И.Б., Кузюкина М.С., Криворучко А.В.* Иммунизация углеводородокисляющих родококков как фактор усиления нефтяной ремедиации // Иммунизация клетки: биокатализаторы и процессы / Под ред. Ефременко Е.Н. М.: РИОР, 2018. С. 405–424.
- Классификация и диагностика почв СССР. М.: Колос, 1977. 223 с.
- Лысак Л.В., Добровольская Т.Г.* Бактерии в почвах тундры Западного Таймыра // Почвоведение. 1982. № 9. С. 74–78.
- Lysak L.V., Dobrovolskaya T.G.* Bacteria in tundra soils of Western Taimyr // Soviet Soil Sci. 1982. № 9. P. 74–78.
- Мануچارова Н.А., Кутейникова Ю.В., Иванов П.В., Николаева С.К., Трофимов В.Т., Степанов П.Ю., Тяпкина Е.В., Липатов Д.Н., Степанов А.Л.* Молекулярный анализ гидролитической прокариотной компоненты почв, загрязненных нефтепродуктами и восстановленных внесением хитина // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 373–382.
- Manucharova N.A., Kuteinikova Yu.V., Ivanov P.V., Nikolaeva S.K., Trofimov V.T., Stepanov P.Yu., Tyapkina E.V., Lipatov D.N., Stepanov A.L.* Molecular analysis of the hydrolytic component of petroleum contaminated soils and of soils remediated with chitin // Microbiology (Moscow). V. 86. P. 395–402.
- Назина Т.Н., Шестакова Н.М., Григорьян А.А., Михайлова Е.М., Турова Т.П., Полтараус А.Б., Циньсян Фен, Фангшан Ни, Беляев С.С.* Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 70–81.
- Nazina T.N., Shestakova N.M., Grigor'yan A.A., Mikhailova E.M., Tourova T.P., Belyaev S.S., Poltarau A.B., Feng C., Ni F.* Phylogenetic diversity and activity of anaerobic microorganisms of high-temperature horizons of the Dagang oil field (P.R. China) // Microbiology (Moscow). 2006. V. 75. P. 55–65.
- Назина Т.Н., Соколова Д.Ш., Бабич Т.Л., Семёнова Е.М., Ершов А.П., Биджиева С.Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П.* Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения для вытеснения нефти // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 748–761.
- Nazina T.N., Sokolova D.S., Babich T.L., Semenova E.M., Ershov A.P., Bidzheva S.K., Borzenkov I.A., Tourova T.P., Poltarau A.B., Khisametdinov M.R.* Microorganisms of low-temperature heavy oil reservoirs (Russia) and their possible application for enhanced oil recovery // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 773–785.
- Полянская Л.М., Гейдебрехт В.В., Степанов А.Л., Звягинцев Д.Г.* Распределение численности и биомассы микроорганизмов по профилям зональных типов почв // Почвоведение. 1995. № 2. С. 322–328.
- Polyanskaya L.M., Geydenbreht V.V., Stepanov A.L., Zvyagintsev D.G.* Distribution of the number and biomass of microorganisms on the profiles of zonal soil types // Euras. Soil Sci. 1995. V. 27. № 2. P. 322–328.
- 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.Ya., Erkenova M.I., Sokolova T.A., Stepanov A.L., Lobanenkov A.M.* Laboratory simulation of the successive aerobic and anaerobic degradation of oil products in oil contaminated high moor peat // Euras. Soil Sci. 2015. V. 48. № 3. P. 314–324.
- Трофимов С.Я., Розанова М.С.* Изменение свойств почв под влиянием нефтяного загрязнения // Дegradация и охрана почв / Под общей ред. акад. РАН Добровольского Г.В. М.: Наука, 2002. С. 359–373.
- Филонов А.Е., Ахметов Л.И., Пунтус И.Ф., Есикова Т.З., Гафаров А.Б., Кошелева И.А., Боронин А.М.* Горизонтальный перенос катаболических плазмид и биодegradация нафталина в открытой почве // Микробиология. 2010. Т. 79. С. 206–212.
- Filonov A.E., Akhmetov L.I., Puntus I.F., Esikova T.Z., Gafarov A.B., Kosheleva I.A., Boronin A.M.* Horizontal transfer of catabolic plasmids and naphthalene biodegradation in open soil // Microbiology (Moscow). 2010. V. 79. P. 184–190.
- Узких О.С., Хомяков Д.М.* Диагностика нефтезагрязненных почв // Экологические нормы. Правила. Информатика. 2009. № 3. С. 30–36.
- Шаркова С.Ю., Полянская Е.А., Парфенова Е.А.* Состояние микробного комплекса почв при нефтезагрязнении // Изв. Пензенского гос. пед. ун-та им. В.Г. Беллинского. 2011. № 25. С. 614–617.
- Шишов Л.Л., Тонконогов В.Д., Лебедева И.И., Герасимова М.И.* Классификация и диагностика почв России. Смоленск: Ойкумена, 2004. 342 с.
- Amann R.I., Krunholz L., Stahl D.A.* Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology // J. Bacteriol. 1990. V. 172. P. 762–770.
- 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.
- Juretschko S., Loy A., Lehner A., Wagner M.* The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach // Syst. Appl. Microbiol. 2002. V. 25. P. 84–99.
- 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 (Moscow)*. 2014. V. 83. P. 674–683.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.-H. Phylogenetic oligonucleotide probes for the major subclasses of *Proteobacteria*: problems and solutions // *Syst. Appl. Microbiol.* 1992. V. 15. P. 593–600.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Vancanneyt M., Schleifer K.-H. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment // *Microbiology (SGM)*. 1996. V. 142. P. 1097–1106.
- Meier H., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content // *Syst. Appl. Microbiol.* 1999. V. 22. P. 186–196.
- Monciardini P., Sosio M., Cavaletti L., Chiocchini C., Donadio S. New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2002. V. 42. P. 419–429.
- Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoriyan A.A., Ivanova A.E., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermooleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermooleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. P. 433–446.
- Neef A., Amann R., Schlesner H., Schleifer K.-H. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of *Planctomycetes* with 16S rRNA-targeted probes // *Microbiology (SGM)*. 1998. V. 144. P. 3257–3266.
- Rabus R., Wilkes H., Schramm A., Harms G., Behrends A., Amann R., Widdel F. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the beta-subclass of *Proteobacteria* // *Environ. Microbiol.* 1999. V. 1. P. 145–157.
- Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides // *Microbiology (SGM)*. 1994. V. 140. P. 2849–2858.
- Somanadhan B., Kotturi S.R., Yan Leong C., Glover R.P., Huang Y., Flotow H., Buss A.D., Lear M.J., Butler M.S. Isolation and synthesis of falcitidin, a novel myxobacterial-derived acyltetrapeptide with activity against the malaria target falcipain-2 // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2013. V. 66. P. 259–264.
- Sorkhoh N.A., Ghannoum M.A., Ibrahim A.S., Stretton R.J., Rdaman S.S. Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* strains isolated from soil and marine environments in Kuwait // *Environ. Pollut.* 1990. V. 65. P. 1–18.
- Stahl D.A., Amann R. Development and application of nucleic acid probes // *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* / Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M. N.Y.: Wiley, 1991. P. 205–248.
- Itoh T., Yamanoi K., Kudo T., Ohkuma M., Takashina T. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011. V. 61. P. 1281–1285.
- Teira E., Reinthaler T., Peinthal J., Herndl G.J. Combining catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization and microautoradiography to detect substrate utilization by *Bacteria* and *Archaea* in the deep ocean // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. P. 4411–4414.
- Timonen S., Bomberg M. *Archaea* in dry soil environments // *Phytochem. Rev.* 2009. V. 8. P. 505–518.
- Wagner M., Horn M. The *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006. V. 17. P. 241–249.

Changes in the Phylogenetic Structure of the Metabolically Active Prokaryotic Soil Complex Induced by Oil Pollution

N. A. Manucharova^{1,*}, N. A. Ksenofontova¹, T. D. Karimov¹,
A. P. Vlasova¹, G. M. Zenova¹, and A. L. Stepanov¹

¹Moscow State University, Moscow, 119192 Russia

*e-mail: manucharova@mail.ru

Received December 12, 2018; revised September 14, 2019; accepted November 22, 2019

Abstract—Molecular genetic techniques (FISH and metabarcoding) were used to investigate comparative biodiversity in the prokaryotic complex of soil microcosms of gray forest, chestnut, and chernozem soils before and after oil pollution. At the level of high-rank taxonomic units, the structure of prokaryotic communities from different soil types was similar. In oil-polluted microcosms microbial diversity decreased, and the metabolically active dominants of the *Bacteria* and *Archaea* domains changed compared to the control samples. A specific bacterial complex was found to emerge in experimental samples of all soil types, with predominance of the *Gammaproteobacteria* and *Actinobacteria*, as well as of archaea, among which *Thaumarchaeota* and *Crenarchaeota* prevailed. Members of the soil prokaryotic complex active and inactive in respect to oil pollution were determined. Our results indicate similar succession responses of microbial communities from different soil type to oil pollution.

Keywords: oil-polluted soils, metabolically active prokaryotic complex, fluorescence *in situ* cell hybridization (FISH), high-throughput sequencing