

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



КСЕНОФОНТОВА НАТАЛЬЯ АНДРЕЕВНА

**РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ПРОКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И
ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена на кафедре биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: **Манучарова Наталия Александровна**

доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Назина Тамара Николаевна**

доктор биологических наук, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского, заведующая лабораторией нефтяной микробиологии, главный научный сотрудник

Лобакова Елена Сергеевна

доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра биоинженерии, профессор

Садыкова Вера Сергеевна

доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф.Гаузе», заместитель директора по научной работе, заведующая лабораторией таксономического исследования и коллекции культур микроорганизмов

Защита состоится 13 декабря 2022 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, факультет почвоведения, аудитория М-2.

Тел. 8(495)939-35-46 эл. почта: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/465885869/>

Автореферат разослан «10» ноября 2022 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета МГУ.015.2, к.б.н.



Н. В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В современном мире одними из самых главных загрязнителей и опаснейших угроз для окружающей нас среды являются нефть и полициклические ароматические углеводороды (Микроорганизмы и охрана почв, 1989; Геннадиев и др., 2015; Karlapudi et al., 2018). В настоящее время добыча нефти и производство нефтепродуктов играет немаловажную роль в нашей жизни: более 700 видов нефтепродуктов используется человеком в промышленности и быту. Человечество столкнулось с проблемой: чем больше масштабы производства, тем больше масштабы загрязнения окружающей среды нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) (Stankevich, Emtsev, 2002). Высокие концентрации нефти и ПАУ не только наносят ущерб сельскому и лесному хозяйствам, но и загрязняют поверхностные и грунтовые воды в результате попадания поллютантов в водоносные горизонты, реки и водоемы. Следствием нефтяных разливов являются глубокие изменения физических, химических и биологических свойств почв (Трофимов, 2002), в том числе изменения численности и состава почвенных микроорганизмов (Звягинцев и др., 2002; Назина и др., 2017). Кроме того, процесс самовосстановления биоценозов идет не один десяток лет. Как утверждают многочисленные исследования, первыми откликаются на воздействие нефти и ПАУ микробиологические параметры. При загрязнении происходят адаптация и перестройка функциональной структуры сообщества, оно начинает активную деятельность по окислению углеводородов (Трофимов, 2002; Узких и др., 2009; Толпешта и др., 2015). В связи с этим крайне важным в нынешних условиях является поиск и дальнейшая селекция микроорганизмов, способных разлагать нефть и ПАУ из мест высокой концентрации (Любакова и др., 2014).

Цель: Оценка биологического разнообразия и экологических функций метаболически активных прокариотных сообществ почв, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ).

В задачи исследования входило:

- Оценка численности и биомассы метаболически активных клеток и структуры метаболически активного прокариотного сообщества почв, загрязненных нефтью и ПАУ.
- Изучение филогенетического разнообразия прокариотной составляющей микробного комплекса исследуемых почв.
- Детекция в загрязненных почвах функциональных генов *bssA*, *alkB*, *xylE* и *nifH*, маркирующих начальный этап деградации углеводородов и нитрогеназную активность, соответственно.

- Определение эффективности применения агромелиоративных методов рекультивации загрязненных нефтью торфяных почв с помощью характеристики функциональной и филогенетической структуры прокариотной компоненты микробного комплекса.

Научная новизна. Впервые для гумусовых горизонтов зональных типов почв, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами проведена оценка метаболически активного прокариотного сообщества. Установлено уменьшение численности и биомассы метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами. Доля метаболически активных компонент от всех выявляемых клеток прокариот в образцах гумусовых горизонтов рассматриваемых загрязненных зональных почв (чернозем, серая лесная, каштановая, дерново-подзолистая) сокращалась до 30 %, а для образцов исследованного торфа, загрязненного углеводородами, она составляла 10 % от всего выявляемого прокариотного сообщества. Установлено формирование специфического метаболически активного прокариотного комплекса, способного к деструкции нефти и ПАУ, состав которого определяется типом почв, формирующихся в разных климатических условиях. Определены чувствительные и устойчивые к загрязнению формы. На фоне снижения метаболически активной биомассы в сообществе прокариот, а также сокращения биоразнообразия в загрязненных образцах по сравнению с контролем определено увеличение содержания функциональных генов, отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xylE*), алкан-монооксигеназы (*alkB*) и бензил-сукцинатсинтазы (*bssA*), маркирующих начальный этап деградации углеводородов. Внесение в загрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидролитической кислотности) приводит к возрастанию биомассы клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) и значимому уменьшению содержания нефтепродуктов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Определение потенциально возможных метаболически активных устойчивых видов прокариот - разрушителей углеводородов и выявление наличия функциональных генов в исследуемых почвах, поможет получить информацию, которая полезна для биоиндикации и биоремедиации почв, загрязненных углеводородами, а также увеличения их хозяйственной значимости и ценности.

Положения, выносимые на защиту:

1. В почвах, загрязненных нефтью и ПАУ, снижается численность и биомасса метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами. Уменьшается филогенетическое

разнообразии прокариотной составляющей, происходит смена доминант и формирование специфического прокариотного сообщества. Для исследуемых почв выявлены устойчивые и чувствительные к нефтезагрязнению представители доменов *Bacteria* и *Archaea*.

2. Структура прокариотной компоненты в почвах с поллютантами различается, в зависимости от типа почв, формирующихся в разных климатических зонах. Для образцов почв южных широт доминирующая роль среди деструкторов принадлежит представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт – протеобактериям. Таким образом, тип почвы и экологические факторы оказывают координирующее влияние на развитие доминантных компонент гидролитического комплекса.
3. Значимым фактором, влияющим на структуру прокариотного комплекса в почвах с поллютантами, является время, прошедшее с момента загрязнения. По прошествии 7 лет после разлива нефти установлено дальнейшее снижение бактериального разнообразия и рост содержания функциональных генов, кодирующих синтез ферментов катехол - 2, 3 – диоксигеназы (*xylE*) и алкан-монооксигеназы (*alkB*), маркирующих деструкцию углеводов.
4. В целях ремедиации нефтезагрязненных торфяных почв рекомендуется использовать минеральные удобрения (NPK) на фоне известкования – это приводит к увеличению биомассы клеток, числа копий функциональных генов (*bssA*, *nifH*), маркирующих деструкцию углеводов и нитрогеназную активность, а также к снижению содержания нефтепродуктов.

Степень достоверности и апробация результатов

Личный вклад автора. Работа является результатом оригинальных исследований. Автор принимал участие в определении направлений исследований, разработке схем экспериментов, обработке данных, обсуждении полученных результатов и подготовке публикаций. Основные экспериментальные результаты получены лично автором.

Степень достоверности результатов. Все полученные результаты являются оригинальными, их достоверность обусловлена большим объемом полученных данных, воспроизводимостью результатов в повторностях, использовании классических и современных подходов и методов, статистической обработке полученных данных. Степень достоверности подтверждается опубликованными по теме работы статьями в рецензируемых научных журналах.

Апробация работы. Основные теоретические и практические результаты диссертационного исследования были изложены в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus), представлены и обсуждены на VIII Съезде Общества Почвоведов им. В. В. Докучаева (Москва, 2022). Материалы исследования докладывались и обсуждались на заседаниях кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В.Ломоносова. Результаты исследования были использованы при выполнении работ по гранту РФФИ 21-14-00076 «Разнообразие и биотехнологический потенциал почвенного микробиома в условиях антропогенной и абиогенной нагрузки».

Публикации. По результатам работы были опубликованы 3 печатные работы: из них 3 статьи (объемом 2,33 п.л.) в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад соискателя был определяющим. Также автором опубликовано 8 печатных работ (объемом 5.3 п.л.) по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 139 страницах печатного текста, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение, выводы и список литературы. Диссертация включает 17 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 227 наименований, в том числе 116 – на иностранных языках.

Выполнение работы было поддержано грантом РФФИ № 21–14–00076 и при частичной финансовой поддержке в рамках крупного научного проекта Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2020-805 от 2 октября 2020 г.) «Актуальные научные задачи стратегии адаптации потенциала землепользования России в современных условиях беспрецедентных вызовов (экономический кризис, изменение климата, кризис глобальных тенденций природопользования)».

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю Манучаровой Н. А. за помощь в выборе тематики исследований, ценные советы, помощь в подготовке диссертации и поддержку на всех этапах работы. Автор благодарен Арзамазовой А. В. за помощь в проведении агрохимических анализов и опыта с внесением минеральных удобрений и Заварзиной А. Г. за помощь в измерении молекулярно-массовых распределений органического вещества водных и щелочных вытяжек и работу на жидкостном хроматографе нормального давления

BioLogicLP(BioRad)(<https://istina.msu.ru/equipment/card/374679701/>). Автор выражает благодарность всему научно-педагогическому составу кафедры биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» и лаборатории микробиологии почв ФГБНУ ФИЦ «Почвенный институт имени В.В.Докучаева», а именно Семенову М. В., Тхакаховой А. К., Никитину Д.А., Кутовой О. В., Железовой А. Д., Ивановой Е. А. за их ценные советы и неоценимую поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены современные представления о влиянии нефти и полициклических ароматических углеводородов на почву, особое внимание уделяется воздействию нефтепродуктов на биологическую активность почвы, изменению состояния почвенного микробиома, трансформации нефти и нефтепродуктов в почве. Также рассматривались возможности почвы к самоочищению, допустимые концентрации поллютантов, средства по борьбе с загрязнением почвы нефтью и ПАУ. Рассматривалась способность микроорганизмов к деструкции углеводородов и функциональные гены, отвечающие за данный процесс. Также приводится описание почвенной метагеномики: сущности метода и места в научном знании.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования выступали прокариотные сообщества почв различных климатических зон (чернозем, каштановая, серая лесная, дерново-подзолистая, торфяная), загрязненных нефтью или полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). В качестве контроля рассматривались незагрязненные образцы. Некоторые их характеристики представлены в таблице 1.

Исследовались почвы, загрязненные как в природных экосистемах (на месте разлива нефти, на территории угольного завода), так и в модельных опытах. При проведении модельных экспериментов почвенные образцы увлажняли водой до 60% от массы почвы и поддерживали ее в течении всего эксперимента, в опытные образцы нефть добавляли в количестве, превышающем показатели сильнозагрязненных почв (20% от массы почвы). Модельные эксперименты проводили в течение 1 месяца. Ниже представлены некоторые характеристики вносимой нефти (таблицы 2, 3) и содержание ПАУ в образцах (таблица 4).

Таблица 1 - Исследуемые почвы

Название почвы	Название по WRB	Содержание гумуса, %	pHводн.	Глубина отбора, см	Место отбора
Чернозем типичный среднесуглинистый на лессовидных суглинках	Voronic Chernozems	8	7,5	10	Волгоградская область (модельный эксперимент) Волгоградская область (загрязнение нефтью в течение 7 лет)
Серая лесная (обычная) маломощная среднесуглинистая на покровных суглинках	Haplic Luvisols (Abruptic)	5	6,9	15	Тульская область (модельный эксперимент)
Каштановая среднесуглинистая на лессовидных суглинках	Haplic Arenic Kashtanozem	4,18	7,5	12	Волгоградская область (модельный эксперимент)
Дерново-подзолистая глеевая сверхглубокоосветленная	Umbric Luvisol	2,9	5,3	5-10	Московская область (почва на территории завода, загрязненная ПАУ)
Торфяная олиготрофная	Fluvic Histosol	5,36	4,1	0-10	Сибирь, Ханты-Мансийский район (почва под скважиной)

Таблица 2 - Характеристика нефти

Нефть	Нефтегазоносный бассейн	Месторождение	Глубина отбора, м	Плотность, г/см ³	Вязкость (условная и кинематическая) при 200°C, мм ² /с
Кубанская	Азово-Кубанский	Кубанская площадь	2800–2832	0,835	1,5 4,9

Таблица 3 - Химические свойства нефти

Класс соединения	Соединение	Формула	Молекулярный вес
Парафины	n-Гексаны	C ₆ H ₁₄	87,186
	2-метилпентан	C ₆ H ₁₄	87,186
	n-гептан	C ₇ H ₁₆	100,205
Нафтены	Циклогексан	C ₆ H ₁₂	84,162
	Метилциклогексан	C ₇ H ₁₄	98,189
Ароматические соединения	Бензол	C ₆ H ₆	78,114
	Толуол	C ₇ H ₈	92,141

Таблица 4 – Содержание ПАУ в исследуемых образцах дерново-подзолистой почвы

Место отбора образца	Фенантрен, нг/г почвы	Хризен, нг/г почвы	Антрацен, нг/г почвы	Бенз(а)пирен, нг/г почвы	Содержание ПАУ в почве, нг/г	Сорг, %
Луг, 0,3 км от завода	19289,5	1937,5	1033,0	514,6	26818,1	4,6
Лес, 0,3 км от завода	9416,9	6344,0	677,1	1518,7	29128,3	10,8
Лес, контроль, 12 км от завода	133,7	40,9	14,5	2,0	443,1	3,3
Пашня, контроль, 12 км от завода	44,1	4,6	0,0	0,1	74,3	2,9

Для характеристики прокариотного комплекса почв, подвергшихся загрязнению нефтью и ПАУ, были использованы следующие методы:

1. Люминисцентно - микроскопический метод (с использованием различных флуорохромов): общую численность прокариот в почвах определяли с помощью красителя акридина оранжевого, относящегося к флуорохромам. Численность метаболически активных клеток прокариот и клеток, содержащих функциональный ген алкан-монооксигеназы, оценивали методом *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (метод FISH) (Kok et al., 1989; Whyte et al., 1996; Whyte et al., 2002). Подсчет проводили с использованием люминесцентного микроскопа ZEISS Microscope Axioskop 2 plus (Германия) со светофильтром Filterset 09 (λ 450-490 нм) и Filter set 15 (λ 546 нм) для Су3-меченых зондов.

3. Выделение ДНК - Из образцов почвы производилось выделение тотальной ДНК. Выделение ДНК проводилось с помощью PowerSoil DNA Isolation Kit компании MOBio в соответствии с рекомендациями производителя в трехкратной повторности. Детекция качества выделения ДНК проводилась при помощи горизонтального гель-электрофореза с окрашиванием этидиум бромидом.

4. RTPCR на 16S р-РНК - Для определения концентрации очищенного препарата почвенной ДНК реакцию проводили в амплификаторе CFX96 компании Bio-Rad (США) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле в соответствии с рекомендациями производителя. С целью выявления наличия функциональных генов (*bssA*, *nifH*, *alkB*, *xylE*) была проведена полимеразноцепная реакция в реальном времени (RTPCR) (Whyte et al., 2002; Bürgmann et al., 2003; Hendrickx et al., 2006; Perry, 2014; Manucharova et al., 2021).

5. Высокопроизводительное секвенирование гена 16S рРНК и обработка данных - Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с использованием пары универсальных праймеров к переменному участку V4 гена 16S рРНК – F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) (Bates et al., 2010). Подготовку проб и секвенирование выполняли на секвенаторе Illumina Miseq, время прочтения 39 ч, количество pair-endreads (парных прочтений) – 8 млн. Полученные данные обрабатывались в программе SYLVA и ezbiocloud.

6. Агрехимические приемы ремедиации нефтезагрязненных почв - В качестве мелиоранта в образец нефтезагрязненного торфа вносили $\text{Ca}(\text{OH})_2$ соответствии со схемой опыта. После добавления $\text{Ca}(\text{OH})_2$ образцы почвы выдерживались в течение 2 недель. Кислотность нейтрализовали по 0,5 Нг и 1 Нг. После этого были внесены удобрения: N (в форме NH_4NO_3); P (в форме $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$); K (в форме K_2SO_4). При проведении эксперимента создавали 2 уровня минерального питания:

- Средний (0,5 NPK) N – 20 мг/100 г, P – 30 мг/100 г, K – 30 мг/100 г
- Повышенный (1 NPK) N – 40 мг/100 г, P – 50 мг/100 г, K – 50 мг/100 г

Также в некоторые варианты опыта была внесена культура бактерий, способных как к росту на среде Эванса с нефтью в качестве единственного источника углерода (Anokhina et al., 2006), так и к росту на среде Эшби без источников азота (Методы почвенной микробиологии, 1991). По результатам секвенирования исследуемая культура относится к роду *Pseudomonas sp.*

7. Измерение остаточных нефтепродуктов - Проводили в соответствии с методикой выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органоминеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии (ПНД Ф 16.1:2.2.22-98).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Численность метаболически активных прокариот в исследуемых почвенных образцах

Анализ общей численности прокариот и пересчет на их биомассу для всех типов исследуемых почв (чернозема, серой лесной, каштановой и торфяной) показал, что в опытных вариантах с внесением нефти оба показателя были ниже, чем в контрольных образцах.

Так для чернозема к 21 суткам 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 (рисунок 1).

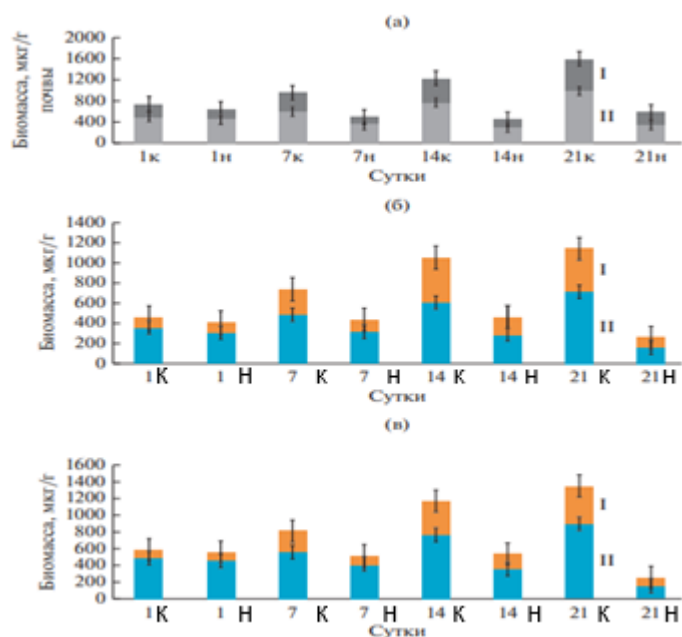


Рисунок 1 - Динамика биомассы прокариот в черноземе (а), серой лесной (б), каштановой (в) в процессе сукцессии, инициированной увлажнением с внесением нефти (н) и в контроле (к): I – биомасса метаболически активных клеток прокариот; II – биомасса клеток, не идентифицированных используемыми зондами (в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

В незагрязненной нефтью торфяной олиготрофной почве биомасса прокариот достигала в среднем 65 мкг/г почвы (рисунок 2, А), а биомасса метаболически активных клеток прокариот не превышала 6.5 мкг/г почвы (рис. 2, 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 (рисунок 2, А), а биомасса метаболически активных клеток в загрязненных образцах не превышала 3.5 мкг/г, что составляет только 5% от всех выявляемых прокариот (рисунок 2, Б).

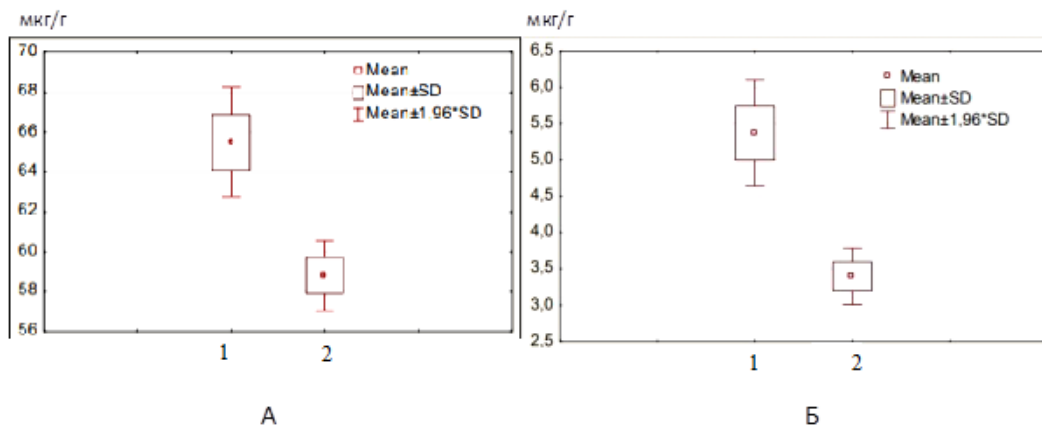


Рисунок 2 - Общая биомасса прокариот (А) и их метаболически активных клеток (Б) в торфяной олиготрофной почве: 1 – контроль (без нефти), 2 –загрязненной нефтью.

Общая биомасса прокариот в образцах дерново-подзолистой почвы, загрязнённой ПАУ, снижалась по мере приближения к источнику загрязнения, так в образцах контроля биомасса прокариот достигала 400 мкг/г почвы, ближе к источнику загрязнения – в почве под лугом 260-270 мкг/г почвы, а под лесом – 200-215 мкг/г, то есть уменьшалась почти в половину от показателей контроля. Биомасса метаболически активных клеток прокариот в почвах снижалась по мере увеличения концентрации ПАУ (рисунок 3). В частности, значения биомассы составляли 230–240 мкг/г в образцах контроля, при этом не превышали 185 и 135 мкг/г почвы в образцах, которые были отобраны вблизи углеперерабатывающего завода.

Таким образом, в почвах, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами происходит уменьшение численности и биомассы метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами.

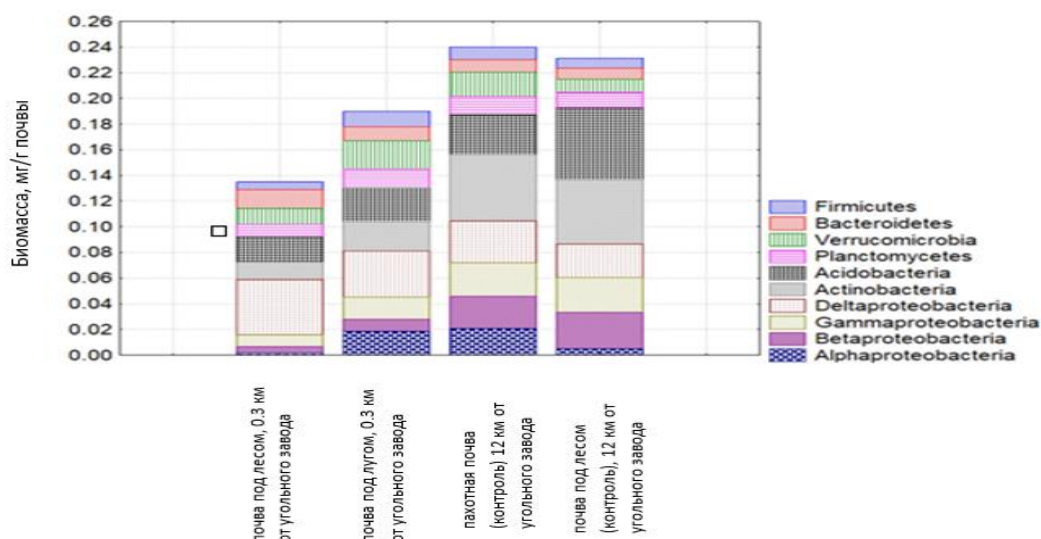


Рисунок 3 – Биомасса и структура метаболически активного комплекса прокариот в образцах дерново-подзолистой почвы разной степени удаленности от источника загрязнения

Доля метаболически активных компонентов от всех выявляемых клеток прокариот сокращалась до 30 % для образцов гумусовых горизонтов загрязненных зональных почв (чернозем, каштановая, серая лесная, дерново-подзолистая), а для образцов исследованного торфа, загрязненного углеводородами, она составляла 10 % от всего выявляемого прокариотного сообщества.

Филогенетическая структура метаболически активной прокариотной компоненты почв загрязненных нефтью и ПАУ

Во всех исследуемых почвенных образцах среди метаболически активных прокариот преобладали представители домена *Bacteria* (90%), а доля архей, составляла около 10% как в опытных, так и в контрольных образцах.

Метаболически активная бактериальная компонента торфяной верховой незагрязненной нефтью почвы представлена на 50 % представителями филумов *Proteobacteria* и *Acidobacteria* (по 25% от всего выявляемого бактериального комплекса) (рисунок 4, А).

Представители филогенетических групп *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* были обнаружены в сообществе в меньших количествах. Представители *Firmicutes* входили в спектр минорных компонентов.

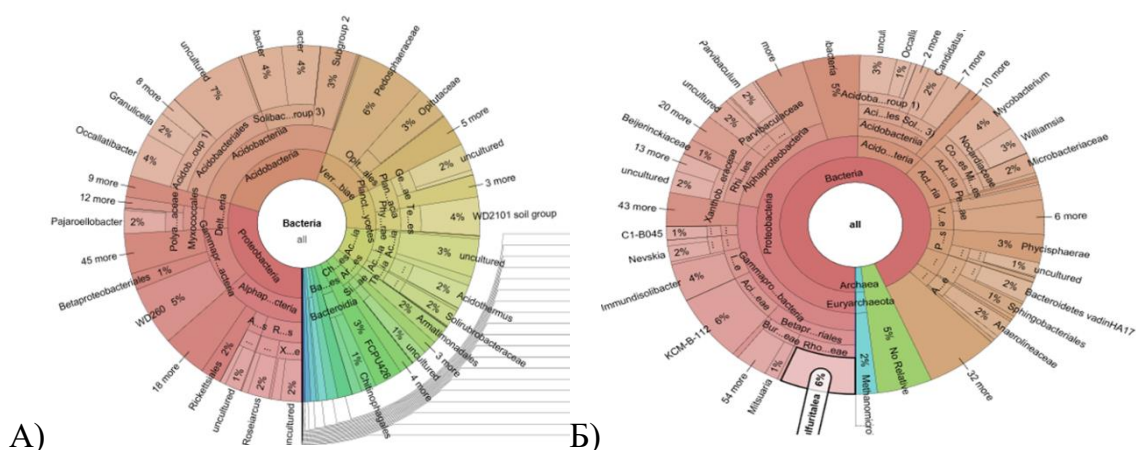


Рисунок 4 - Филогенетическая карта структуры бактериальной компоненты болотной торфяной верховой почвы (а-контроль, б- нефтезагрязненной почвы).

В торфе, загрязненном нефтью (рисунок 4, Б), происходит смена доминант. 50% от всех выявляемых бактерий занимают представители *Proteobacteria*. Увеличение происходит за счет появления видов, которые не встречались в незагрязненной почве. В бактериальном комплексе загрязненного торфа возрастает доля актинобактерий, причем, если в контрольной почве среди актинобактерий доминировали представители порядка *Frankiales* (род *Acidothermus*), то в опытном варианте начинают доминировать представители порядков *Micrococcales* и *Corinebacterales* (представители родов *Micobacterim* и *Williamsia*).

Бактериальный компонент незагрязненной дерново-подзолистой почвы характеризовался преобладанием нескольких филумов: *Proteobacteria*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. При этом протеобактерии и ацидобактерии составляли примерно равные доли от общего выявленного бактериального сообщества в почве под лесной растительностью (38 и 32 % соответственно), а в почве под луговой растительностью доля актинобактерий возрастала до 25%, при этом доля ацидобактерий снижалась до 15%. В образцах, отобранных вблизи источника загрязнения, происходила смена доминант и

весь комплекс бактериальной компоненты претерпевал изменения. В почве, подвергшейся загрязнению полициклическими ароматическими углеводородами, наблюдалось увеличение биомассы метаболически активных представителей таких филогенетических групп, как *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Chloroflexi*.

При оценке структуры метаболически активного прокариотного комплекса по показателям численности и биомассы представителей домена Bacteria в образцах чернозема типичного (рисунок 5, А) выявлено преобладание представителей *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Значения метаболически активной биомассы представителей этих групп в загрязненном нефтью черноземе, по результатам метода FISH, достигали 280 и 200 мкг/г почвы, соответственно. Среди актинобактерий в опытных вариантах с нефтью доминировали представители следующих групп: Subclass *Rubrobacteridae* (роды *Gaiella*, *Solirubrobacter*); Subclass *Actinobacteridae* (suborder *Propinobacterineae* (*Nocardioides*, *Kribella*); *Micromonosporineae* (*Catelliglobospora*, *Micromonospora*); *Corynebacterineae* (*Rhodococcus*); *Pseudonocardineae* (*Pseudonocardia*); *Micrococcinea* (*Cellulomonas*, *Agromyces*); *Streptomycineae* (*Streptomyces*); *Streptosporangineae* (*Thermomonosporaceae*, *Streptosporangium*) (рисунок 5, Б). Отметим, что многие представители родов *Plumatobacter*, *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).

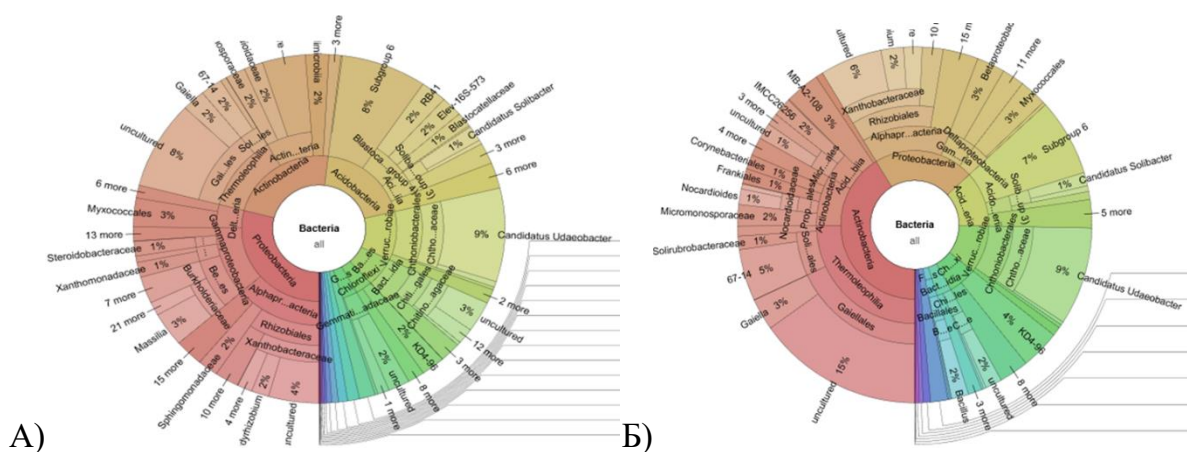


Рисунок 5 - Филогенетическая карта прокариотной компоненты чернозема типичного (а – контроль, б - загрязненного нефтью)

Таким образом, в почвенном прокариотном сообществе при загрязнении углеводородами отмечается снижение разнообразия за счет выхода в

доминанты определенных родов – автохтонной микрофлоры, специфичной для определенных условий. Для образцов почв южных широт (чернозем и каштановая почвы) доминирующая роль среди гидролитиков принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт (торфяная почва, дерново-подзолистая) – протеобактериям. Таким образом, тип почвы и экологические факторы оказывали координирующее влияние на развитие доминантных компонент гидролитического комплекса.

Длительное воздействие нефтяных загрязнений на структуру прокариотного комплекса чернозема типичного

Важным фактором в изменении микробного комплекса почв под воздействием нефтяных разливов становится время. На первых этапах происходит быстрая активация микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые в первую очередь начинают разлагать легкие фракции нефти, при этом происходит ингибирование остальных представителей микробного сообщества. В процессе сукцессии, с течением времени, филогенетическое разнообразие изменяется. Данные об изменениях филогенетической структуры прокариотного комплекса чернозема типичного скомпонованы в таблицу (таблица 5).

Основными доминантными филумами являлись *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Bacteroidetes*. В незагрязненном типичном черноземе *Bacteroidetes* не являются доминантой, ведущую позицию занимают *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. В свежем нефтяном разливе ситуация остается примерно такой же, но меняются представители. При длительном воздействии загрязнения углеводородами (7 лет) формируется устойчивое сообщество, сформированное из адаптированных к определенным условиям компонент. Актинобактерии перестают занимать лидирующие позиции, им на смену приходят *Bacteroidetes*, представленные следующими видами: *Flavobacteriales* (*Salinimicrobium*, *Gramella*, *Salisentibacter*), *Cytophagales*, *Sphingobacteria*.

Проявляются устойчивые к нефтезагрязнению формы: среди протеобактерий *Sphingomonadeles* и *Rhizobiales*, а среди актинобактерий *Nocardioideles* и *Gaiella*. Данные представители актинобактерий являются не только устойчивыми по отношению к нефтяным загрязнениям, но и проявляют высокий потенциал к борьбе с фитопатогенами, например *Nocardia* представляется перспективной для химического изучения с целью обнаружения новых противогрибковых антибиотиков (Садыкова и др., 2020).

Таблица 5 - Изменение структуры прокариотного комплекса чернозема при длительном воздействии нефтепродуктов

Чернозем	<i>Proteobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>
Контроль	<i>Alpha-Sphingomonadales</i> <i>Rhizobiales</i> (<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Methobacteraceae</i> , <i>Reyranella</i> , <i>Skermanella</i>) <i>Beta- Burkholderia</i>	<i>Frankiales</i> <i>Propionibacteriales</i> (<i>Nocardiodaceae</i> , <i>Propionibacteriaceae</i>) <i>Micrococcales</i> (<i>Arthrobacter</i>) <i>Rubrobacteria</i> (<i>Gaiella</i> , <i>Rubrobacter</i>)	<i>Vicinamibacter</i> <i>Blastocatellales</i> (<i>Arenimicrobium</i> , <i>Stenotrophobacter</i>)	Не является доминантой
Свежий разлив	<i>Alpha-Sphingomonadeles</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Beta-Burkholderiales</i>	<i>Acidimicrobiales</i> <i>Frankiales</i> (<i>Blastococcus</i>) <i>Corynebacteriales</i> (<i>Mycobacterium</i>) <i>Propionibacteriales</i> (<i>Nocardioides</i>) <i>Streptomyces</i> <i>Pseudomonodaceae</i> <i>Rubrobacteria</i> (<i>Gaiella</i>) <i>Thermoleophilia</i>	<i>Vicinamibacter</i> <i>Blastocatellales</i> (<i>Arenimicrobium</i> , <i>Stenotrophobacter</i>) <i>Solibacteriales</i>	Не является доминантой
Старый разлив (7 лет)	<i>Alpha-Sphingomonadeles</i> (<i>Sphingomonas</i> , <i>Altererythrobacter</i>) <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodobacterialles</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Gamma-Xanthomonadaceae</i> (<i>Lysobacter</i>) <i>Oceanospirillales</i> (<i>Alcanivorax</i> , <i>Halomonas</i>) <i>Steroidobacter</i>	<i>Frankiales</i> <i>Corynebacteria</i> (<i>Mycobacterium</i> , <i>Dietzia</i>) <i>Propionibacteriales</i> (<i>Nocardioides</i>) <i>Micrococcales</i> <i>Thermoleophilia</i> <i>Rubrobacteria</i> (<i>Gaiella</i>) <i>Acidimicrobiales</i>	Не является доминантой	<i>Flavobacteriales</i> (<i>Salinimicrobium</i> , <i>Gramella</i> <i>Salisentibacter</i>) <i>Cytophagales</i> <i>Sphingobacteria</i>

*красным выделены устойчивые к нефтезагрязнению представители прокариот

Оценка разнообразия и активности прокариотного сообщества загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почвы в условиях разного минерального питания

Была проведена оценка разнообразия и активности прокариотного сообщества торфяной олиготрофной почвы, загрязненной нефтью в условиях разного минерального питания.

Внесение минеральных солей (источники питания NPK и известь) в почву, загрязненную нефтью, увеличивало биомассу прокариот (таблица 6). Наибольшее увеличение биомассы прокариот отмечается в вариантах с внесением повышенной дозы минерального питания (N40P50K50) при низкой (0,5 Нг) гидролитической кислотности. Она достигает значений 130 мкг/г почвы – эти данные в два раза выше тех, которые отмечены в загрязненной почве без внесения солей (вариант КН, нефтезагрязненный). Дополнительное внесение в почву культур бактерий-деструкторов углеводов при наличии минеральных солей не приводило к статистически значимому росту биомассы прокариот в образцах.

Таблица 6 - Убыль нефтепродуктов и суммарная биомасса прокариот в загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почве в фоновом варианте и с внесением удобрений в соответствии со схемой опыта

Вариант	Убыль нефтепродуктов, %	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

Похожие результаты получены молекулярно-биологическими методами, такими как RT-PCR и FISH. Количество копий генов бактерий и архей достигало максимальных значений в опытных образцах с повышенным уровнем минерального питания и 0,5Нг.

В вариантах с внесением повышенного уровня NPK и нейтрализованной на половину гидролитической кислотностью также отмечается статистически значимое (более, чем в два раза) увеличение биомассы метаболически активных клеток бактерий и архей, в сравнении с вариантами контроля (КН) (рисунок 6, А, Б).

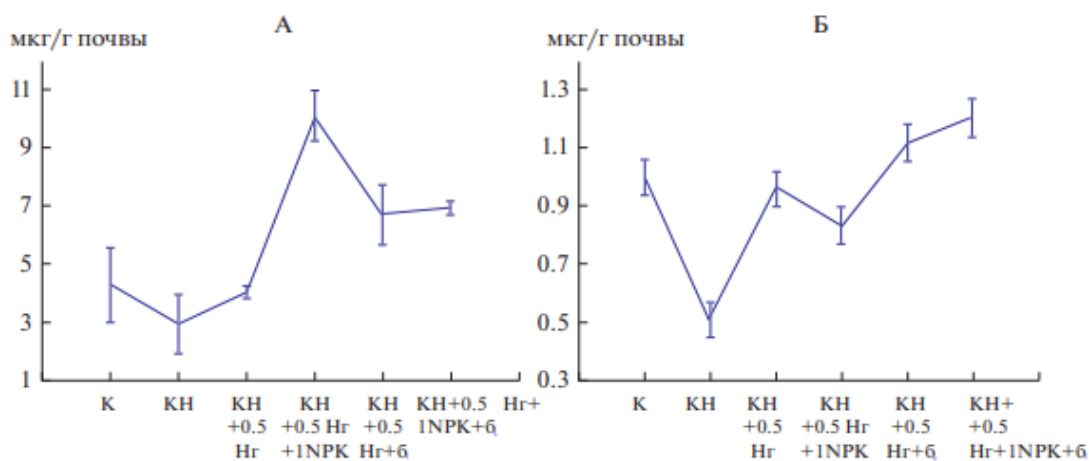


Рисунок 6 - Биомасса метаболически активных клеток бактерий (А) и архей (Б) в фоновой почве и с внесением удобрений и извести

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 значительно возрастает доля метаболически активных представителей филума *Actinobacteria*. 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).

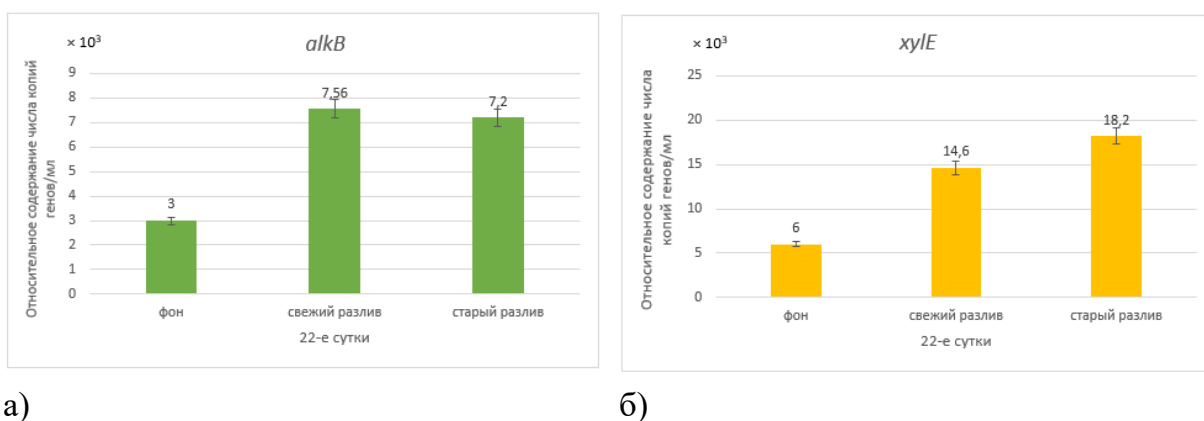
В структуре метаболически активных представителей домена *Archaea* в загрязненных образцах также происходит перестройка комплекса по сравнению с контрольной почвой. Если в контроле доминирует группа *Euryarchaeota*, то в загрязненной почве – *Crenarchaeota*. Применение агрохимических средств приводит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

Таким образом, применение ремедиации к загрязненным нефтью образцам торфа, а именно внесение полного минерального питания на фоне известкования (0.5Нг) приводит к возрастанию (более чем в 2 раза) биомассы метаболически активных клеток бактерий и архей. Установлено изменение филогенетической 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 (0.5Нг) известкования приводит к частичному восстановлению структуры прокариотного комплекса. Полученные результаты могут быть полезны при биоиндикации и оценке процесса восстановления загрязненных почвенных систем.

Детекция функциональных генов, связанных с деструкцией углеводов (*alkB*, *xylE*, *bssA*) и самовосстановлением систем (*nifH*)

В рамках данной работы были изучены функциональные гены, непосредственно связанные с микроорганизмами-деструкторами углеводов нефти.

В образцах чернозема, загрязненного углеводородами нефти, было определено наличие функциональных генов *alkB*, *xylE* кодирующих синтез ферментов алканмонооксигеназы и катехол-диоксигеназы соответственно. Исследования проводили на разные сроки загрязнения поллютантом. В образцах с длительным сроком воздействия углеводов (более 7 лет) отмечалось наибольшее содержание исследуемых генов, в контрольных, незагрязненных вариантах – их наименьшее содержание (рисунок 7 А, Б). В вариантах свежего нефтяного разлива обнаружено повышенное содержание копий функциональных генов по сравнению с контролем, что может говорить об активной работе метаболически активного микробиологического сообщества, способного к деструкции углеводов.



а)

б)

Рисунок 7 - Относительное содержание копий гена *alkB* (а) и *xylE* (б) в черноземе в ходе сукцессии, инициированной увлажнением

В образцах дерново-подзолистой почвы, загрязненной полициклическими ароматическими углеводородами, также определяли содержание числа функциональных генов *alkB*. Была отмечена схожая закономерность: в контрольных вариантах незагрязненной почвы (12 км от завода) наблюдалось пониженное содержание копий по сравнению с загрязненными территориями (рисунок 8). Причем эта особенность прослеживалась как для дерново-подзолистой почвы под лесом, так и для этой же почвы под лугом.

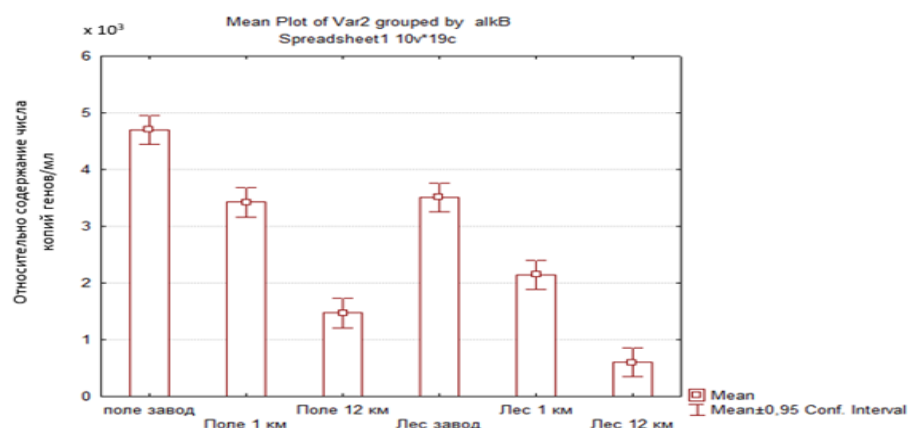


Рисунок 8 – Относительное содержание копий гена *alkB*, кодирующего алкан-монооксигеназу, в исследуемых образцах дерново-подзолистой почвы

Таким образом, во всех исследуемых образцах определено наличие функциональных генов. В загрязнённых почвах на фоне снижения биомассы метаболически активных прокариот установлен рост копий генов, отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xylE*) и алкан-монооксигеназы (*alkB*), в 2-4 раза по сравнению с контролем. На длительных сроках загрязнения наблюдается последствие поллютанта и дальнейшее увеличение численности генов в сравнении со свежим разливом.

Образцы нефтезагрязненного торфа, подверженного агроремедиации были исследованы на наличие бактериальных генов, указывающих на протекание процессов деградации углеводородов и ремедиации почвенной системы. С точки зрения восстановления нарушенной почвы рассматривали ее способность к самообеспечению азотом. В связи с этим, оценивали наличие в образцах торфа гена *nifH* (рисунок 9), ответственного за синтез фермента нитрогеназы.

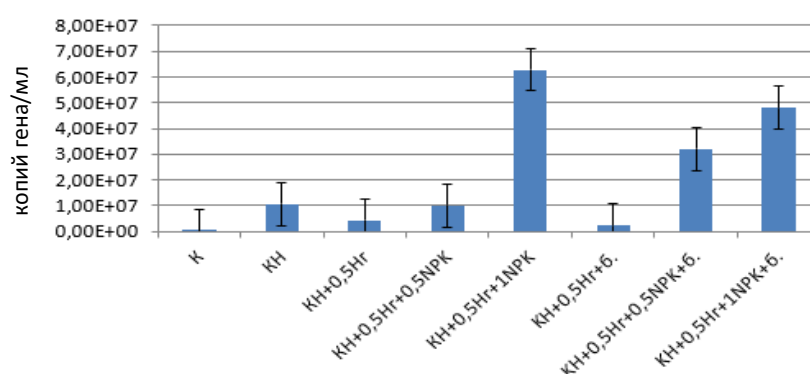


Рисунок 9 - Число копий гена (копий/мл) *nifH* в исследуемых образцах

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.

В ходе эксперимента в образцах нефтезагрязненного торфа также оценивали наличие генов, отвечающих за начальный этап разрушения циклических углеводородов в анаэробных условиях. В частности, при бактериальной деструкции толуола, происходит синтез фермента бензил-сукцинатсинтазы, кодируемой геном *bssA* (рисунок 10). Максимальные значения числа копий генов *bssA*, как и в случае с геном *nifH*, отмечались в варианте с повышенной дозой удобрений и неполной дозой гидролитической кислотности, что можно объяснить наибольшей численностью метаболически активных клеток в сообществе данного варианта опыта.

Наибольшие значения числа копий гена *bssA* коррелируют с убылью содержания нефтепродуктов в исследуемых вариантах опыта. Наименьшее содержание нефтепродуктов после завершения опыта зафиксировано для варианта с большей дозой минеральных удобрений и неполной дозой мелиоранта (рисунок 11).

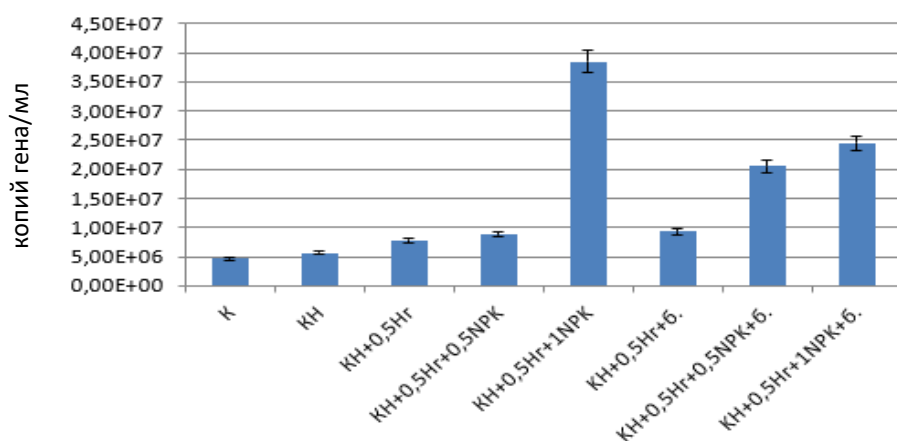


Рисунок 10 - Число копий гена (копий/мл) гена *bssA* в исследуемых вариантах опыта

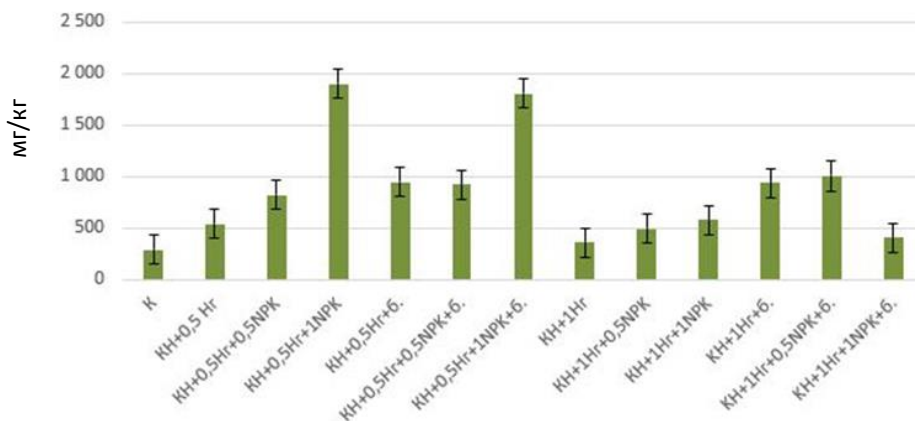


Рисунок 11 - Убыль нефтепродуктов, измеренная после завершения вегетационного опыта, мг/кг почвы

Таким образом, наибольшие значения числа копий функциональных генов (*bssA* 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема нефтяного загрязнения окружающей среды углеводородами является одной из важнейших в современном мире. Из-за активной антропогенной деятельности человека огромный массив почв страдает от воздействия сложных углеводородов, меняя при этом свою структуру и свойства.

В литературе имеются сведения, указывающие на формирование биопленок углеводородокисляющими микроорганизмами и переход наиболее эффективных деструкторов в своей биомассе в некультивируемые формы (Shapiro et al., 2021). С помощью методов современной метагеномики были изучены изменения в прокариотном сообществе почв разных типов, происходящие под влиянием нефтяного загрязнения и загрязнения полициклическими ароматическими углеводородами. Были проанализированы как «естественно-загрязненные» почвы, такие как чернозем типичный, каштановая (Волгоградская область), дерново-подзолистая (Московская область), торфяная олиготрофная (Сибирь), так и почвы с внесением нефти в лабораторных условиях в рамках модельного опыта (чернозем, серая-лесная и каштановая). Для каждой из вышеупомянутых почв при загрязнении характерно снижение численности и биомассы метаболически активных представителей прокариотного комплекса по сравнению с незагрязненными системами. Доля метаболически активных компонент от всех выявляемых клеток прокариот в образцах гумусовых горизонтов рассматриваемых загрязненных зональных почв (чернозем, серая лесная, каштановая, дерново-подзолистая) сокращалась до 30 %, для образцов исследованного торфа, загрязненного нефтью, она составляла 10 % от всего выявляемого прокариотного сообщества.

В процессе микробной сукцессии снижается микробное разнообразие и происходит смена доминант. Происходят адаптация и кардинальная перестройка структуры функционального сообщества, выражающиеся в развитии популяций микроорганизмов, перерабатывающих углеводороды и потребляющих значительное количество азота (Звягинцев и др., 2002; Узких и др., 2009). Формируется специфический прокариотный комплекс. Установлены чувствительные и устойчивые к нефтяному загрязнению представители прокариотного комплекса почв. Выявлено, что в доминанты выходит автохтонная микрофлора, специфичная для каждой почвы. Для

образцов нефтезагрязненных почв южных широт доминирующая роль принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт – протеобактериям. Таким образом, тип почвы и экологические факторы оказывали координирующее влияние на развитие доминантных компонент гидролитического комплекса. В образцах нефтезагрязненного торфа определяются хемолитоавтотрофы, отвечающие за деградацию ароматических соединений.

Условно представляется возможным поделить процесс разложения нефтепродуктов на 3 этапа, каждому из которых свойственны определенные изменения в углеводородном составе. Ориентировочно через четыре года после попадания углеводородов в почву система характеризуется высокой концентрацией смолисто-асфальтовых фракций, при этом происходит снижение количества соединений ароматического ряда (Солнцева и др, 1985; Оборин и др., 1988; Макарова, 2000; Одинцова, 2003). В настоящей работе было определено влияние времени, прошедшего с момента попадания в почву углеводородов нефти, на структуру прокариотного сообщества. По прошествии 7 лет после нефтеразлива бактериальное разнообразие продолжает сокращаться. Выявляются устойчивые и чувствительные к нефтезагрязнению представители филумов. К устойчивым среди филума *Actinobacteria* относятся бактерии рода *Gaiella* и *Arthrobacter*.

В образцах загрязнённого чернозема и дерново-подзолистой почвы установлен рост копий генов, отвечающих за синтез алкан-монооксигеназы (*alkB*) и катехол-диоксигеназы (*xylE*), в 2–4 раза по сравнению с контролем. На длительных сроках загрязнения наблюдается последствие поллютанта и дальнейшее увеличение численности генов в сравнении со свежим разливом. Механизм работы гена *xylE* хорошо изучен на плазмиде TOL, выделенной из *Pseudomonas putida*, чаще обнаруживается у грамм- прокариот, однако он также встречается и у грам⁺ бактерий родов *Arthrobacter* и *Rhodococcus*. (Burlage et al., 1989; Ramos et al., 1997; Hendrickx et al., 2006). Алкан - монооксигеназа (*alkB*) катализирует начальную стадию деструкции алканов, данный фермент окисляет концевые метильные фрагменты углеводородной цепи до спиртов. Однако существует сложность в оценке потенциала биодеструкции алканов, так как разнообразие генов *alkB* велико и может различаться даже в пределах одного вида. В литературе отмечается, что нет четкой корреляции между процессами деградации нефтяных поллютантов и количеством экспрессирующихся генов *alkB* (Whyte et al., 1996; Paisse et al., 2011).

В настоящее время идет активная борьба с нефтезагрязнениями и обсуждаются дальнейшие возможности ремедиации почв с поллютантами.

Биостимуляция включает внесение источников азота, фосфора, калия, акцепторов электронов и воды для стимуляции активности автохтонного микробного сообщества, тогда как биоаугментация предполагает внесение экзогенных микроорганизмов для увеличения активности целевой группы. Часто оба метода используются одновременно. Деградация нефти происходит под воздействием почвенных микробных сообществ вследствие “самоочищающей способности” почв (Sutton et al., 2013). В рамках данной работы было выяснено, что внесение в нефтезагрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидролитической кислотности) приводит к возрастанию биомассы клеток прокариот более, чем в 2 раза. Увеличивается число копий функциональных генов *bssA* и *nifH*, которые отвечают за деструкцию углеводородов нефти и восстановление почв. Благодаря внесению удобрений с соблюдением определенных требований происходит частичное восстановление метаболически активного прокариотного комплекса.

В связи со всем вышесказанным можно прийти к выводу, что ремедиация почв, загрязненных углеводородами, является процессом сложным, в связи со сложностью строения углеводородов, однако, с помощью современных методов молекулярной биологии, открываются новые пути для решения стоящей перед учеными задачи по восстановлению потенциала нефтезагрязненных почв и их дальнейшему введению в сельскохозяйственный оборот.

ВЫВОДЫ

1. В почвах, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами установлено уменьшение численности и биомассы метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами. Доля метаболически активных компонентов от всех выявляемых клеток прокариот сокращалась до 30 % для образцов гумусовых горизонтов загрязненных зональных почв (чернозем, каштановая, серая лесная, дерново-подзолистая), для образцов исследованного торфа, загрязненного углеводородами, она составляла 10 % от всего выявляемого прокариотного сообщества.
2. Установлено снижение микробного разнообразия и смена метаболически активных доминантов доменов *Bacteria* и *Archaea* в почвах, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами, по сравнению с контрольными образцами. Определено формирование специфического комплекса бактерий с доминантами определенных родов автохтонной микрофлоры, различающихся в зависимости от типа почв. Для образцов нефтезагрязненных почв южных широт доминирующая роль

принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт – протеобактериям.

3. В почвах, загрязнённых нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами, на фоне снижения биомассы метаболически активных прокариот по сравнению с контролем наблюдается увеличение содержания функциональных генов, отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xylE*), алкан-монооксигеназы (*alkB*) и бензил-сукцинатсинтазы (*bssA*), маркирующих начальный этап деградации углеводородов.
4. При долгосрочном влиянии поллютанта (7 лет после разлива нефти) в образцах чернозема выявлен рост содержания копий функциональных генов, кодирующих синтез ферментов катехол-2,3-диоксигеназы (*xylE*) и алкан-монооксигеназы (*alkB*) при одновременном снижении бактериального разнообразия.
5. Внесение в загрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидrolитической кислотности) приводит к возрастанию более чем в 2 раза биомассы клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) и значимому уменьшению содержания нефтепродуктов. Внесение полного минерального удобрения на фоне известкования в загрязненную нефтью торфяную почву сопровождается изменением филогенетической структуры и частичным восстановлением метаболически активного прокариотного комплекса.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и RSCI по теме диссертации:

1. 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. Q4; IF (РИНЦ)=1.95. DOI: 10.31857/S0026365620020093 [Manucharova, N. A., Ksenofontova, N. A., Karimov, T. D., Vlasova, A. P., Zenova, G. M., Stepanov, A. L. Changes in the phylogenetic structure of the metabolically active prokaryotic soil complex induced by oil pollution //Microbiology. – 2020. – V. 89. – №. 2. – P. 219-230. IF (WoS)=1.51. DOI:10.1134/S0026261720020083]
2. Манучарова Н.А., **Ксенофонтова Н.А.**, Белов А.А., Каменский Н.Н., Арзамазова А.В., Зенова Г.М., Кинжаев Р.Р., Трофимов С.Я., Степанов А.Л. Прокариотный компонент нефтезагрязненной торфяной олиготрофной почвы при разном уровне минерального питания //Почвоведение. – 2021. – №. 1. – С. 80-89. Q4; IF (РИНЦ) = 2.81. DOI: 10.31857/S0032180X2101010X [Manucharova, N. A., Ksenofontova, N. A., Belov, A. A., Kamenskiy, N. N., Arzamazova, A. V., Zenova, G. M., Kinzhaev R. R., Trofimov S. Ya., Stepanov, A. L. Prokaryotic component of oil-contaminated oligotrophic peat soil under different levels of mineral nutrition: Biomass, diversity, and activity //Eurasian Soil Science. – 2021. – V. 54. – №. 1. – P. 89-97. IF (WoS)=1,37. DOI: 10.1134/S1064229321010105]
3. Manucharova N.A., Pozdnyakov L.A., Vlasova A.P., Yanovich A.S., **Ksenofontova N.A.**, Kovalenko M.A., Stepanov P.Y., Gennadiev A.N., Golovchenko A.V., Stepanov A.L. Metabolically Active Prokaryotic Complex in Grassland and Forests' Sod-Podzol under Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Influence //Forests. – 2021. – V. 12. – №. 8. – P. 1103. Q1; IF (WoS)=3.28. DOI: 10.3390/f12081103