

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОЧВЕННЫХ МИКРОБИОМОВ

УДК 631.46

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПРОКАРИОТНОГО КОМПОНЕНТА СОВРЕМЕННЫХ, РЕЛИКТОВЫХ ПОЧВ И ГРУНТОВ АНТАРКТИДЫ

© 2023 г. Н. А. Манучарова^а, *, М. А. Коваленко^а, М. Г. Алексеева^а,
А. Д. Бабенко^а, А. Л. Степанов^а

^аМГУ им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 17.10.2022 г.

После доработки 04.01.2023 г.

Принята к публикации 05.01.2023 г.

Установлены закономерности распространения и зависимости функциональной активности метаболически активных прокариот от основных экологических факторов. В исследовании применяли молекулярно-биологические и биоинформатические подходы. Спектр исследуемых образцов включал современные почвы Волгоградской, Тульской, Московской областей, Сибири и северной части Центральной Камчатки, реликтовые местообитания Волгоградской области и Центральной Камчатки, многолетнемерзлые грунты Антарктиды, о. Кинг-Джордж. Рассматривали воздействие антропогенных и абиогенных нагрузок на развитие прокариотного сообщества. В почвах, подверженных антропогенным или абиогенным нагрузкам, наряду с сокращением разнообразия и численности прокариот установлено увеличение количества генов, маркирующих способность сообщества к биодegradации ксенобиотиков, а также генов, кодирующих превращения азота и уровень метаболизма кофакторов и витаминов. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля. Археи играют ведущую роль в процессе нитрификации в ненарушенных почвах. Выявленные закономерности указывают на высокий метаболический потенциал прокариотного компонента рассматриваемых объектов и открывают возможности для биотехнологического использования штаммов, выделенных из реликтовых местообитаний.

Ключевые слова: бактерии, археи, функциональные гены, гидролитическое сообщество, нефть, азотный цикл

DOI: 10.31857/S0032180X22601311, **EDN:** IEWDLZ

ВВЕДЕНИЕ

К современным научным проблемам микробиологической технологии относятся выяснение свойств почв, способствующих сохранению разнообразия и получение консорциумов микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом (способностью к гидролизу природных полимеров и ксенобиотиков, азотфиксации, синтезу вторичных метаболитов).

Для сохранения биоразнообразия почвенного микробиома в условиях антропогенной и абиогенной нагрузок существенное значение имеет протекторная функция почвы — консервация в жизнеспособном состоянии различных переживающих стадий организмов. Основными механизмами перехода в покоящееся состояние является способность образовывать споры, цистоподобные покоящиеся клетки [6, 7], приобретать некультивируемое состояние [27]. Если способ-

ность образовывать споры является строго штаммо- и видоспецифичной чертой, то способность образовывать цистоподобные покоящиеся клетки, предназначенные для длительного выживания и сохранения вида, оказалась свойственна не только неспорообразующим, но и спорообразующим бактериям. Эта способность реализуется в случаях, когда спорообразование репрессировано, например, в условиях катаболитной репрессии [7, 8]. Особое значение феномен торможения жизненной активности приобретает в современной биотехнологии, в частности при хранении и приготовлении активного посевного спорового материала. Например, обработка спор микроорганизмов низкими температурами увеличивает выход конечного продукта, в частности антибиотиков, улучшает качество винной продукции, повышает урожайность сельскохозяйственных культур и содержание в них сахаров [5]. Такие реактивированные покоящиеся формы микроорганизмов ча-

сто обладают свойствами, отличными от их кол-лекционных аналогов, и могут использоваться в биотехнологии [38].

Значительный интерес представляют микроорганизмы, выделенные из экстремальных местообитаний, по мнению некоторых авторов именно они характеризуются большей биологической активностью по сравнению со штаммами, выделенными из почв умеренных широт [8, 38]. Проблема представляет как практический (выявление продуцентов биологически активных веществ), так и теоретический интерес (изучение новых неисследованных ранее таксонов прокариот).

Усиление биотехнологических свойств микроорганизмов путем интродукции высокоактивных метафункциональных селекционных штаммов и создания условий для их деятельности в природных системах и агроценозах — один из перспективных подходов биоремедиации загрязненных систем.

Цель работы — выявление специфики развития прокариот, обладающих биотехнологическим потенциалом (осуществляющих деструкцию биополимеров, углеводов; способных к синтезу вторичных метаболитов; процессу азотфиксации) в почвенных экосистемах, установление закономерностей их распространения и зависимости функциональной активности от основных экологических факторов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись прокариотные сообщества современных почв (дерново-подзолистой, торфяной олиготрофной, чернозема, серой лесной, каштановой, бурой пустынно-степной), реликтовых местообитаний (подкурганые каштановые почвы, погребенные вулканические слоисто-пепловые почвы Камчатки), многолетне-мерзлых грунтов Антарктиды (табл. 1).

Исследовали воздействие антропогенного фактора на прокариотные сообщества почв как в природных экосистемах (например, на месте разлива нефти или поступления и накопления полициклических ароматических углеводов), так и в модельных опытах. При проведении модельных экспериментов применяли метод инициации микробной сукцессии увлажнением почвенных образцов водой (до 60% от массы почвы) и добавлением в опытные образцы ресурсов: биополимеров (хитина или пектина) в количестве 0.6% от массы почвы или углеводов в количестве, превышающем показатели сильнозагрязненных почв (20% от массы почвы) [30].

Для исследования почвенных прокариотных сообществ применяли молекулярно-биологические методы оценки (высокопроизводительное секвенирование и биоинформатический анализ

результатов с выявлением доминантов сообщества, обладающих различными биотехнологическими функциями).

Выделение ДНК. Из образцов почвы выделяли тотальную ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью PowerSoil DNA IsolationKit компании MOBio в соответствии с рекомендациями производителя в трехкратной повторности. Детекцию качества выделения ДНК проводили при помощи горизонтального гель-электрофореза с окрашиванием этидиум бромидом.

ПЦР в реальном времени гена 16S рРНК. Концентрацию очищенного препарата почвенной ДНК реакцию определяли на детектирующем амплификаторе DTLite4 (ДНК-Технология, Россия) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле в соответствии с рекомендациями производителя. 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 (Lightcycler — 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 *SuperMixEvaGreenBiorad*, концентрированный буфер с дезок-сирибонуклеотидами, полимеразой Sso7d-fusion, MgCl₂, красителем *EvaGreen* и стабилизаторами. Прибор калибровали по зависимости интенсивности флуоресценции от логарифма концентрации ДНК стандартных растворов.

Оценивали наличие копий генов, кодирующих синтез ферментов, направленных на деструкцию углеводов: алкан-монооксигеназы (*alkB* и *alkM*) (субстрат *n*-алканы) [28, 40], катехол-2,3-диоксигеназа (*xylE*) (субстрат катехолы и прокатехоевые кислоты), 1,2-гидроксинафталиндиоксигеназа (*nahC*) (субстрат нафталин) [14, 23, 30, 40]. Последовательности праймеров и температурные режимы амплификации представлены в табл. 2, 3.

Параллельно проводили оценку функциональной деятельности прокариотного сообщества посредством выявления наличия в системе генов, участвующих в процессах азотного цикла: *nifH* — нитрогеназная активность [20], *amoA* (AOB) — монооксигеназная активность аммонийоокисляющих бактерий [36], *amoA* (AOA) — монооксигеназная активность аммонийоокисляющих архей [21],

Таблица 1. Исследуемые почвы

Почва	Название по WRB	Содержание гумуса, %	pH H ₂ O	Глубина отбора, см	Место отбора
Каштановая остаточно-солонцеватая глубокозасоленная среднечесотенная суглинистая на лесовидных суглинках (современная)	Haplic Arenic Kashtanozem	2.2	7.5	2–10	Волгоградская область 49.39936° N, 46.81083° E
Каштановая несолонцеватая незасоленная погребенная, 3.5 тыс. лет	Haplic Arenic Kashtanozem	0.8	8.3	50–61	Волгоградская область юг Приволжской возвышенности Камышинского района (курган Саломатино, XVI–XV вв. до н.э.)
Каштановая остаточно-солонцеватая незасоленная погребенная, 4.5 тыс. лет	Haplic Arenic Kashtanozem	0.1	7.6	206–215	Волгоградская область юго-восток Среднерусской возвышенности Клетского района в бассейне Дона (курган Перекопка, середина третьего тысячелетия до н.э.)
Вулканическая слоисто-охристая (современная)	Aluandic Andosols Dystric	2.1	5.8	10–20	Северная часть Центральной Камчатки Почвенно-пирокластический чехол северо-западного подножия вулкана Шивелуч 56°49'42" N, 161°19'28" E
Вулканическая слоисто-охристая Погребенная (2500 кал. л. н.)	Aluandic Andosols Dystric	2.5	6.2	110	Северная часть Центральной Камчатки почвенно-пирокластический чехол северо-западного подножия вулкана Шивелуч 56°49'42" N, 161°19'28" E

Таблица 1. Окончание

Почва	Название по WRB	Содержание гумуса, %	pH H ₂ O	Глубина отбора, см	Место отбора
Вечномерзлые грунты морской террасы, сильнопромытые флювиогляциальными водами Возраст отложений 7.5 тыс. лет	Antarctic permafrostrocks	0.1	7.2–9.8 (максимум на глубине 6.5 м)	940	о. Кинг-Джордж, станция Беллинсгаузен 62°10'04" N, 59°12'11" E
Бурая пустынно-степная песчаная почва	Luvic Calcisols	0.6	8.1	2–10	Пустыня Гоби 43°45'00" N, 111°50'00" E
Чернозем типичный среднемошной среднесуглинистый на лесосовидных суглинках	Voronoi Chernozems	8.0	7.5	10	Волгоградская область (модельный эксперимент) Волгоградская область (загрязнение нефтью в течение 7 лет) 51°1'41" N, 40°43'31" E
Серая лесная (обычная) маломощная среднесуглинистая на покровных суглинках	Haplic Luvisols (Abruptic)	5.1	6.9	15	Тульская область (модельный эксперимент) 53°58'23" N, 37°10'34" E
Дерново-подзолистая глеевая сверхглубокоосветленная	Umbric Luvisol	2.9	5.3	5–10	Московская область (почва на территории завода, загрязненная ПАУ, под лесной или под луговой растительностью) 55.728016° N, 38.217825° E
Торфяная олиготрофная (почва под нефтяной скважиной)	Fluvic Histosol	5.4	4.1	0–10	Сибирь, Ханты-Мансийский район 61.31°24'71" N 70.26°76'10" E

Таблица 2. Последовательности праймеров для углеводородокисляющих генов

Ген	Фермент	Нуклеотидная последовательность праймеров (5'–3')
<i>alkB</i>	Алкан-монооксигеназа	f TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGG r CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG
<i>alkM</i>	Алкан-монооксигеназа	f CCTGTCTCATTTGGCGCTCGTTCCTACAGG r GTGATGATCTGAATGTCGTTGTAAGTGG
<i>xylE</i>	Катехол-2,3-диоксигеназа	f CCGCCGACCTGATC(A/T)(C/G)CATG r TCAGGTCA(G/T)CACGGTCA(G/T)GA f GTAATTGCGCCCTGGCTA(C/T)GTICA r GGTGTTACCGTCATGAAGCG(C/G/T)TC
<i>nahC</i>	Нафталин-диоксигеназа	f CAAAA(A/G)CACCTGATT(C/T)ATGG R A(C/T)(A/G)CG(A/G)G(C/G)GACTTCTTTCAA

Таблица 3. Температурные условия для программы RT-PCR, использованные в работе для определения наличия генов в исследуемых образцах

Функциональный ген	<i>alkB</i>	<i>alkM</i>	<i>xylE</i>	<i>nahC</i>
Температурный профиль	1 × 94°C 5 мин 30 × 94°C 1 мин 60°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 3 мин 1 × 4°C – hold	1 × 94°C 5 мин 30 × 94°C 1 мин 60°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 3 мин 1 × 4°C – hold	1 × 95°C 5 мин 35 × 94°C 1 мин 61.5°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 10 мин 1 × 4°C – hold	1 × 94°C 10 мин 30 × 95°C 1 мин 49°C 1 мин 72°C 1 мин 1 × 72°C 3 мин 1 × 4°C – hold

Таблица 4. qPCR-праймеры и температурные условия, использованные в работе для определения наличия генов, участвующих в цикле азота

Праймер	Последовательность (5'–3')	Температурный профиль
<i>nifH</i> : Forward Reverse	GGTTGTGACCCGAAAGCTGA GCGTACATGGCCATCATCTC	94°C 1 мин; 94°C 30 с, 50°C 1 мин, 72°C 30 с – 40 циклов; 72°C 10 мин
<i>amoA</i> (AOB): <i>amoA</i> -1F <i>amoA</i> -2R	GGG GTT TCT ACT GGT GGT CCC CTC KGS AAA GCC TTC TTC	95°C 10 мин; 94°C 45 с, 58°C 45 с, 72°C 45 с – 39 циклов; 95°C 15 с, 60°C 30 с, 95°C 15 с
<i>amoA</i> (AOA): 23F CrenamoA616	ATG GTC TGG CTW AGA CG GCC ATC CAB CKR TAN GTC CA	94°C 45 с, 55°C 45 с, 72°C 45 с – 39 циклов; 95°C 15 с, 60°C 30 с, 95°C 15 с
<i>nirK</i> : <i>nirK</i> 876 <i>nirK</i> 1040	ATY GGC GGV CAY GGC GA GCC TCG ATC AGR TTR TGG TT	95°C 15 мин; 95°C 15 с, 60°C 30 с, 72°C 30 с, 80°C 15 с – 40 циклов; 95°C 15 с, 72°C 30 с

а также *nirK* – нитратредуктазная активность [24]. Последовательности праймеров и температурные режимы амплификации представлены в табл. 4.

Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программы RT-PCR.

Секвенирование и метагеномный анализ. Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК осуществляли с помощью вырожденных праймеров, компле-

ментарных последовательностям как бактерий, так и архей: 341F (CCTACGGGRBGCASCAG) и 806R (GGACTACYVGGGTATCTAAT). Протокол реакции (температурный профиль): 95°C – 3 мин → (95°C – 10 с → 50°C – 10 с → 72°C – 20 с) × 49 циклов. 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. Высокопроизводительное секвенирование ампликонов гена 16S рРНК проводили с использованием прибора GS FLX (Roche, Швейцария) по протоколу Titanium с использованием набора GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+ и пикотитровальной пластины GS Titanium PicoTiterPlate Kit 70–75. Получены ПЦР-фрагменты препаратов метагеномной ДНК с помощью вырожденных праймеров PRK341F и PRK806R, созданы библиотеки, пригодные для секвенирования и далее определены нуклеотидные последовательности переменных фрагментов генов 16S рРНК при помощи секвенатора. Анализ полученных данных проводили при помощи Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) [15]. С помощью инструментов программы осуществляли: 1) проверку качества секвенирования и создание библиотеки сиквенсов; 2) формирование ОТЕ (OTU picking) *de novo* на основе 97, 94, 91, 88, 85, 81% порога сходства сиквенсов методом UCLUST [18]; 3) удаление синглтонов (singletons — ОТЕ, содержащих только один сиквенс) и последовательностей, относящихся к растительным хлоропластам; 4) определение филогенетического состава сообществ на разных таксономических уровнях при помощи базы данных разнообразия гена RDP classifier [40] и построения филогенетического дерева при помощи алгоритма FastTree [35]; 5) расчет показателей общего разнообразия прокариотных сообществ (альфа-разнообразия): видового богатства, индекса Шеннона ($H = -\sum p_i \ln p_i$, где p_i — доля i -го вида в сообществе), индекса Chao1, оценивающего предположительное реальное количество ОТЕ в сообществе $Chao1 = S_{obs} + a/2b$, где S_{obs} — число обнаруженных ОТЕ, a — число ОТЕ, содержащих 1 сиквенс, b — число ОТЕ, содержащих 2 сиквенса), индекса филогенетического разнообразия (PD) [19] (при расчете индексов разнообразия проводили нормализацию данных по образцу с минимальным числом полученных сиквенсов); 6) анализ сходства структуры бактериальных сообществ (бета-разнообразия) при помощи метрики Брея—Кертиса [13]. Визуализацию результатов анализа бета-разнообразия проводили при помощи построения двумерных диаграмм по методу главных компонент. Статистический анализ достоверности различий между группами проводили при помощи непараметрического метода permutational ANOVA/MANOVA (PERMANOVA) [10].

Относительная доля родов в образцах представляет собой отношение количества последовательностей, относящихся к таксону, к общему количеству прочтенных последовательностей в образце после нормализации. Поскольку проанализировали большое количество последовательностей, относившихся к различным родам прокариот,

провели выборку доминантных родов, относительная доля которых в образцах была $\geq 1\%$.

Функциональное разнообразие генов в микробных сообществах предсказывали при помощи программы PICRUSt [29]. Процесс предсказания функциональных генов по результатам секвенирования 16S рРНК состоял из двух этапов. На первом этапе производили предсказание встречаемости генов для каждого отдельно взятого организма согласно референсному филогенетическому дереву Greengenes phylogenetic tree of 16S sequences [17]. Затем сопоставляли предсказанные гены для каждого таксона с относительной встречаемостью данного таксона в образце, оцененному по 16S рРНК. Таким образом осуществляли оценку встречаемости гена в образце. Для сопоставления 16S рРНК с уже секвенированными полными геномами использовали базу бактериальных и архейных геномов IMG database [31]. Функциональную классификацию проводили согласно схеме Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Orthology (KOs) [26].

Дальнейшую обработку результатов вели в программе QIIME [15]. При помощи инструментов программы осуществляли удаление синглтонов и нормализацию данных по образцу с наименьшим количеством определенных генов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Современной задачей любого биолога является полифазный подход к изучению живой системы, включающий характеристики как консервативного, так и функционального геномов. В связи с этим интересным представляется вопрос о субстратной специфичности и активности работы ферментных систем в зависимости от принадлежности микробной популяции к той или иной климатической зоне или вертикальной ярусности, обнаружения функциональных генов в образцах исследуемых почв, отвечающих за возможность самовосстановления микробного сообщества.

С применением молекулярно-биологических методов исследовано прокариотное сообщество погребенных почв, характеризующееся доминированием представителей филума *Actinobacteria*, которое становится более выраженным при внесении субстрата (биополимера хитина) (рис. 1). Представители рода *Phenylbacterium* [32] эффективно разлагающего хлоридазон, антипирин и пирамидон, являющиеся активными трудноразлагаемыми компонентами гербицидов, и род *Janthinobacterium*, известный своими бактерицидными, фунгицидными и вироцидными свойствами благодаря высокому содержанию виолацеина в клетках [1, 34]. Стоит отметить доминирование рода *Chitinophaga*, являющегося продуцентом но-

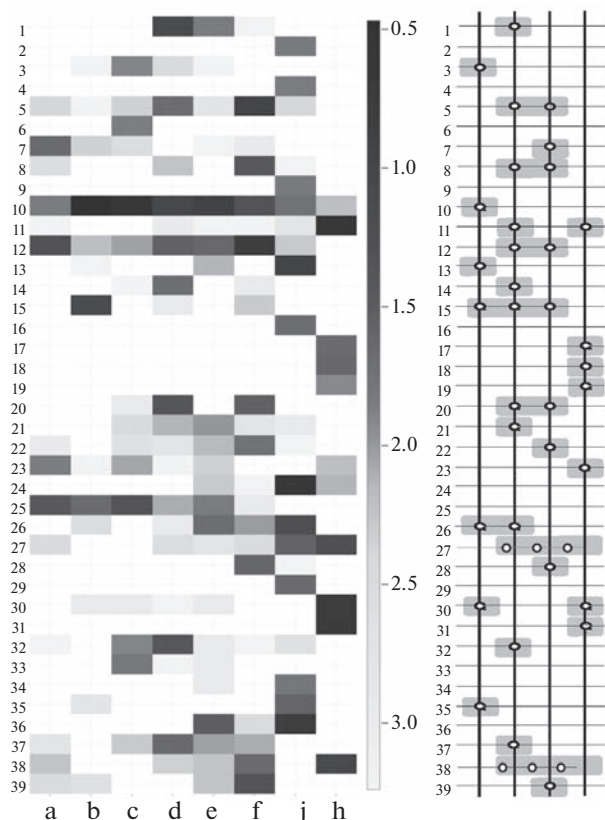


Рис. 1. Доминирующие роды прокариот в исследованных образцах и их относительная доля, проиллюстрированная с помощью (ОТЕ выделены на уровне 97% сходства; приведены только ОТЕ, идентифицированные на уровне рода; за доминантные приняты роды, составляющие >1% от всех выделенных ОТЕ; приведены значения десятичного логарифма от доли рода). На схеме справа приведены роды, относительная доля которых увеличивается при внесении хитина. а – современная каштановая почва; б – современная каштановая почва; инкубированная с хитином; с – почва, погребенная 3500 л. н.; д – почва, погребенная 3500 л. н., инкубированная с хитином; е – почва, погребенная 3500 л. н.; ф – почва, погребенная 4500 л. н., инкубированная с хитином; г – многолетнемерзлый грунт; ж – многолетнемерзлый грунт, инкубированный с хитином. Роды: 1 – *Saccharothrix*, 2 – *Corynebacterium*, 3 – *Agromyces*, 4 – *Rhodococcus*, 5 – *Streptomyces*, 6 – *Euzeyha*, 7 – *Rubrobacter*, 8 – *Chitinophaga*, 9 – *Sediminibacterium*, 10 – *Bacillus*, 11 – *Brevibacillus*, 12 – *Paenibacillus*, 13 – *Bacillus* (rRNA group 2), 14 – *Paenisporosarcina*, 15 – *Solibacillus*, 16 – *Staphylococcus*, 17 – *Clostridium*, 18 – *Coprococcus*, 19 – *Sedimentibacter*, 20 – *Mycoplana*, 21 – *Phenylobacterium*, 22 – *Devosia*, 23 – *Rhodoplanes*, 24 – *Rhizobium*, 25 – *Kaistobacter*, 26 – *Sphingobium*, 27 – *Sphingomonas*, 28 – *Achromobacter*, 29 – *Schlegella*, 30 – *Variovorax*, 31 – *Cupriavidus*, 32 – *Janthinobacterium*, 33 – *Peredibacter*, 34 – *Halomonas*, 35 – *Acinetobacter*, 36 – *Pseudomonas*, 37 – *Stenrobacter*, 38 – *Lysobacter*, 39 – *Thermomonas*.

вого антибиотика фальцитидина, обладающего активностью в отношении малярии, в образцах с субстратом [2, 37].

Прокариотное сообщество многолетнемерзлых грунтов отличаются по родовому составу от

рассматриваемых погребенных каштановых почв. Так, доминирующим родом в образцах грунтов становится *Sediminibacterium*, не обнаруженный в почвенных образцах (рис. 2). В вариантах с добавлением биополимера хитина гидролитической активностью обладали роды *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Rhodoplanes*, *Cupriavidus*, отсутствовавшие в почвенных образцах. Роды *Clostridium*, *Sedimentibacter*, *Rhodoplanes* являются облигатными анаэробами [25].

Ранее исследовали биоразнообразие прокариотного комплекса современных почв в условиях микроекосмов (чернозема, серой лесной и каштановой почв) до и после их загрязнения углеводородами. Установлено, что при внесении субстрата альфа-разнообразие уменьшалось за счет выхода в доминанты определенных родов – автохтонной микрофлоры, специфичной для определенных условий [30]. Установлено уменьшение микробного разнообразия и смена метаболически активных доминантов – представителей доменов *Bacteria* и *Archaea* в микроекосмах, загрязненных нефтью, по сравнению с контрольными образцами в процессе микробной сукцессии. В опытных образцах исследуемых почв, загрязненных углеводородами, выявлено формирование специфического комплекса бактерий и архей. Определены метаболически активные и неактивные в отношении нефтяного загрязнения представители почвенного прокариотного комплекса. Эти результаты опубликованы ранее [30].

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. Среди актинобактерий в этих вариантах опыта доминировали представители следующих групп: субкласс *Rubrobacteridae* (роды *Gaiella*, *Solirubrobacter*); субкласс *Actinobacteridae* (субпорядок *Propionobacterineae* (*Nocardiodetes*, *Kribbella*); *Micromonosporineae* (*Catelliglobospora*, *Micromonospora*); *Corynebacterineae* (*Rhodococcus*); *Pseudonocardineae* (*Pseudonocardia*); *Micrococcineae* (*Cellulomonas*, *Agromyces*); *Streptomycineae* (*Streptomyces*); *Streptosporangineae* (*Thermomonosporaceae*, *Streptosporangium*). Отметим, что многие представители родов *Ilumatobacter*, *Aciditerrimonas*, принадлежащих группе актинобактерий, обнаруженных в исследуемых образцах с нефтью, способны расти в анаэробных условиях и обладают термо- и ацидофилией [39].

Структура бактериального комплекса в загрязненном нефтью торфе изменялась по сравнению с контрольной почвой [30]. Доля филума *Proteobacteria* возрастала до 50% от всех выявляемых



Рис. 2. Анализ методом главных компонент с применением метрики Брея–Кертиса структуры прокариотных сообществ исследуемых образцов с добавлением субстратов (биополимера хитина или углеводов).

бактерий (ранее опубликованные данные) [30]. Среди протеобактерий обнаружены альфа-, гамма- и бета-протеобактерии. Стоит отметить, что увеличение количества протеобактерий происходит за счет появления видов, которые не встречались в незагрязненной почве, например *Sulfuritalea*, принадлежащим к *Betaproteobacteria* семейству *Sterolibacteriaceae*. Данный организм является хемолитоавтотрофом, окисляющим тиосульфаты, серу и водород [12]. Согласно литературным источникам, его используют для деградации ароматических соединений, в частности, для анаэробного разложения бензоатов и фенилацетатов [13].

Анализ бета-разнообразия методом главных компонент с применением метрики Брея–Кертиса на уровне сходства 97% достоверно разделил доминанты гидролитического сообщества между исследуемыми образцами на четыре кластера: современные почвы южных широт (каштановая, чернозем), современные почвы северной и центральной частей России (дерново-подзолистая, торфяная), погребенные почвы и многолетнемерзлые грунты (рис. 2). Такое разделение указывало на то, что при внесении ресурса (биополимера хитина или углеводорода нефти) доминанты гидролитического сообщества различались между образцами современных почв, принадлежащих разным климатическим зонам, реликтовыми почвами и грунтами, следовательно, тип почвы и экологические факторы оказывали координирующее влияние на развитие доминантных компонентов гидролитического комплекса.

Таким образом, определено формирование специфического комплекса бактерий с доминантами определенных родов автохтонной микро-

флоры, различающихся в зависимости от типа почв, который в свою очередь оказывает координирующее влияние на развитие доминантных компонентов гидролитического комплекса.

При анализе функционального генетического разнообразия прокариотного сообщества выявлено, что количество генов, маркирующих способность сообщества к биodeградации ксенобиотиков, выше в погребенных почвах и многолетнемерзлых грунтах по сравнению с современными почвами (рис. 3). Уровень метаболизма ксенобиотиков повышается от современных почв к многолетнемерзлым грунтам. Это касается таких ксенобиотиков, как толуол, стирол, полициклические ароматические углеводороды, нафталин, флуорбензоат, диоксин, хлороциклогексан, хлорбензен, хлоралканы и хлоралкены, капролактамы, бисфенолы, бензоат, атразин и аминоксенобиоты. Увеличение интенсивности разложения ксенобиотиков отмечали И.П. Соляникова с соавт. [4]. Показано, что при переводе штамма *Pseudomonas fluorescens* в покоящееся состояние и последующем выводе из него происходило выщепление фенотипов, характеризовавшихся большей скоростью роста на ароматических субстратах. Поскольку известным является факт, что для биоремедиации целесообразно использовать не отдельные штаммы бактерий-деструкторов, а активные ассоциации, следовательно погребенные местообитания могут иметь биотехнологический потенциал для ремедиации загрязнений ксенобиотиками.

Установлено, что потенциальная активность, измеренная по относительному отклику при внесении субстрата, микробного гидролитического сообщества возрастает в ряду от современной к

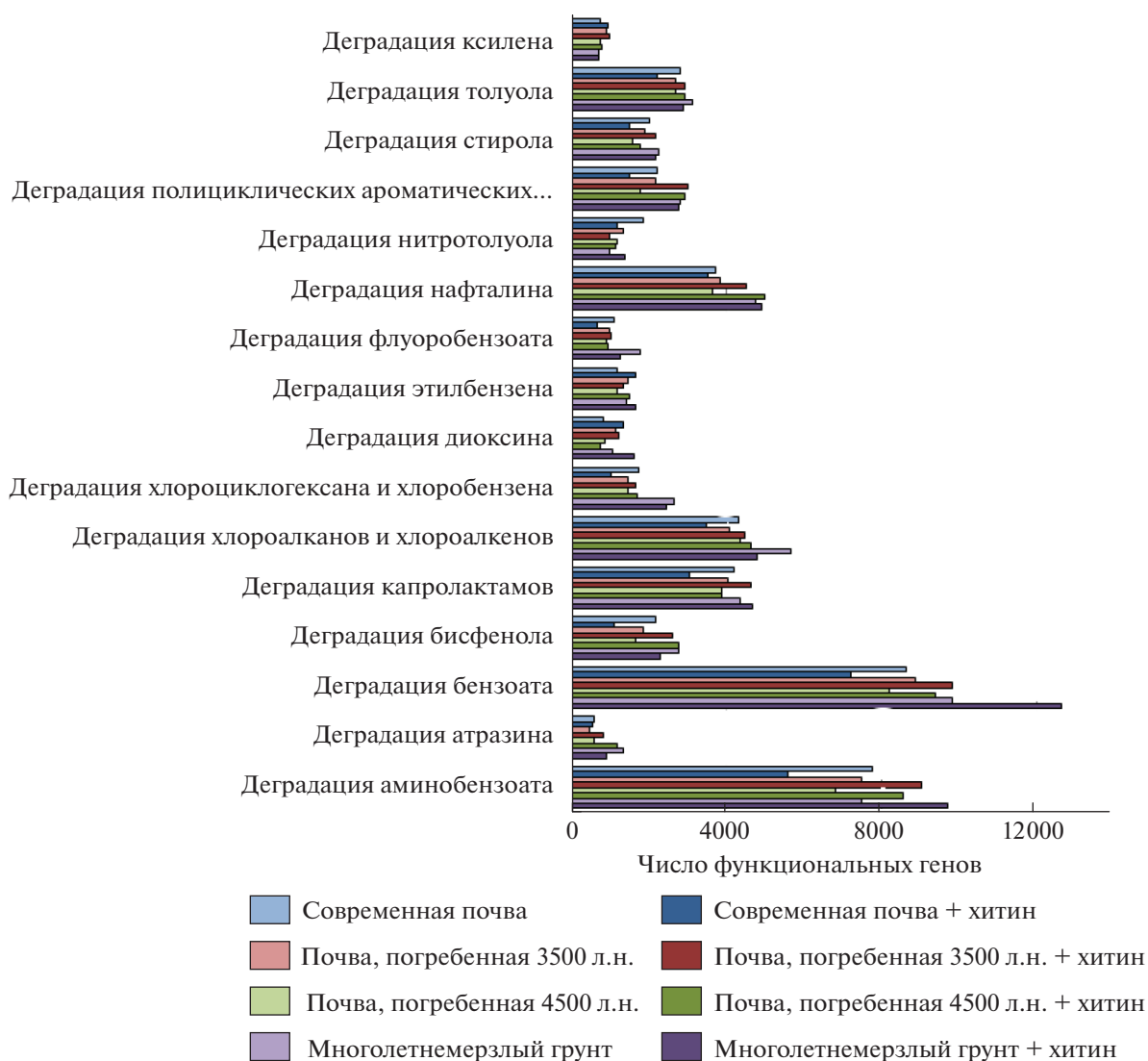


Рис. 3. Биодegradация ксенобиотиков (KEGG классификация уровень 2, абсолютные величины).

палеовулканической почве. Внесение ресурса-субстрата увеличивает долю генов, ответственных за деградацию ксенобиотиков. Например, при внесении полисахарида (хитина) увеличивается количество генов, ответственных за деградацию полициклических ароматических углеводов. Стоит заметить, что присутствие функционального гена не обязательно означает его активность, однако позволяет говорить о потенциальной возможности к осуществлению процессов, кодируемых данными генами. Наибольшее число функциональных генов, маркирующих процессы биодegradации ксенобиотиков, обнаружено в образцах многолетнемерзлых грунтов, что говорит о высоком биотехнологическом потенциале реликтовых микробных сообществ.

Многие незамещенные ароматические углеводороды (бензол, нафталин) расщепляются бакте-

риями до катехола или прокатеховой кислоты. Бензоат является центраболитом деградации многих ароматических углеводов. В рассматриваемых сообществах почв, перечисленных в табл. 1, присутствовали бактерии, обладающие двумя ключевыми ферментами пути аэробной деградации бензоата, которые катаболизируют бензоат до катехола.

При разрыве ароматического кольца в метарасщеплении участвуют ферменты катехол-2,3-диоксигеназа, 1,2-гидроксинафталиндиоксигеназа, которые кодируются соответствующими генами: *xylE* [22], *nahC* [22] и *dmpB* [11], ответственными за преобразование субстратов в полуальдегиды, которые при дальнейшей трансформации образуют пируваты, ацетальдегиды, оксалоацетаты, фумараты, сукцинаты и иные вещества, вовлекаемые в промежуточный метабо-

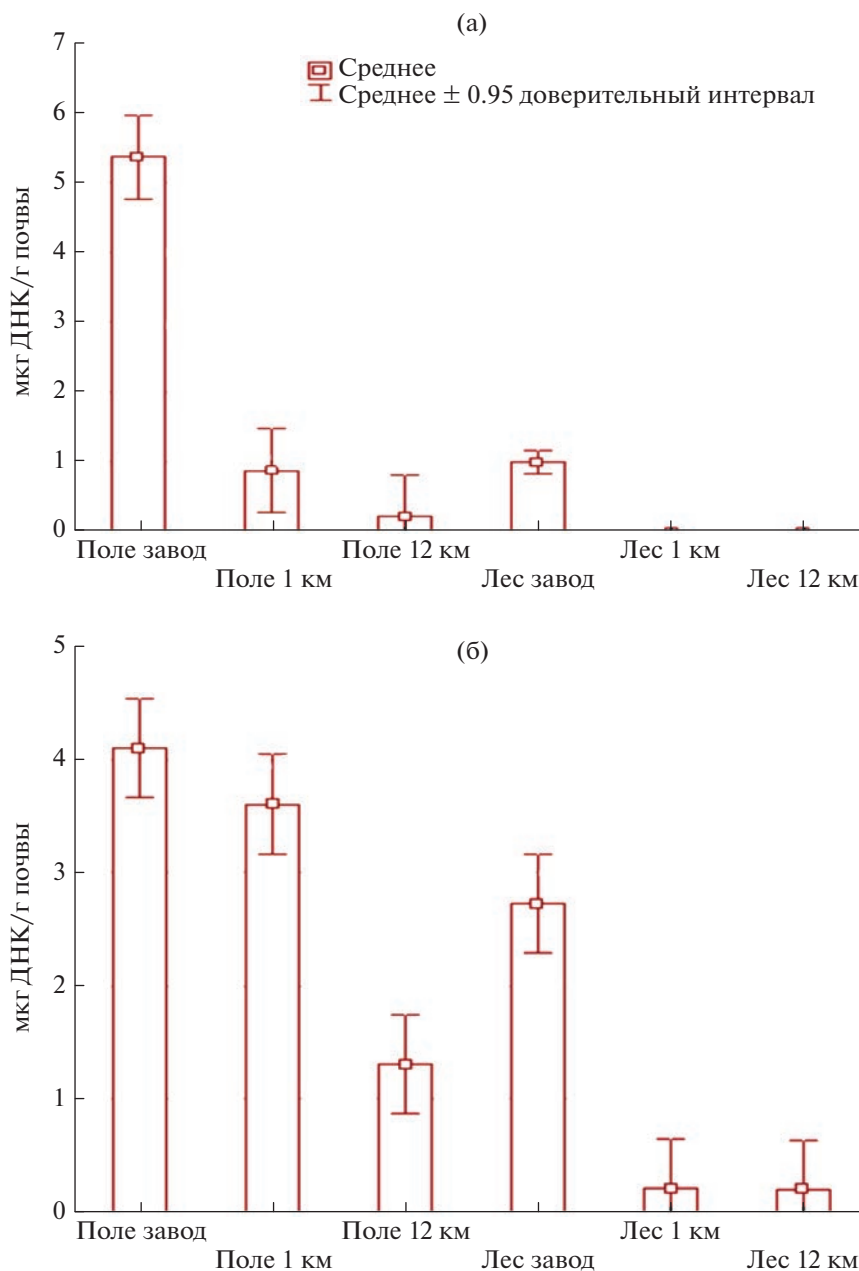


Рис. 4. Содержание копий гена (мкг ДНК/г) *nahC* (а) и *xylE* (б) в исследуемых образцах дерново-подзолистой почвы.

лизм. У бактериальных сообществ предсказано наличие всех ферментов катаболизма катехола, как до сукцинил-КоА, так и до пирувата/ацетил-КоА. В сообществах дерново-подзолистой и торфяной почв за деградацию бензоата отвечали представители Alphaproteobacteria родов *Sphingomonas*, *Bradyrhizobium* и *Pseudolabrys*.

При исследовании загрязненных современных дерново-подзолистых почв на территориях угледобывающего завода или под нефтяными скважинами с использованием количественного анализа *qPCR* числа копий функциональных генов *nahC*, *xylE* показано, что наибольшее их со-

держание (5.4, 4.2 мкг ДНК/г почвы соответственно) обнаружено в образцах, отобранных непосредственно на территории завода, и уменьшалось по мере удаления от него (рис. 4а, 4б). Схожие закономерности прослеживались для почвенных образцов, отобранных как под лесом, так и под лугом.

Исследования проводили в разные сроки загрязнения поллютантом. В образцах чернозема с длительным сроком воздействия углеводородов (более 7 лет) отмечалось наибольшее содержание исследуемых генов *xylE* 18×10^3 копий/мл, тогда как в контрольных, незагрязненных вариантах —

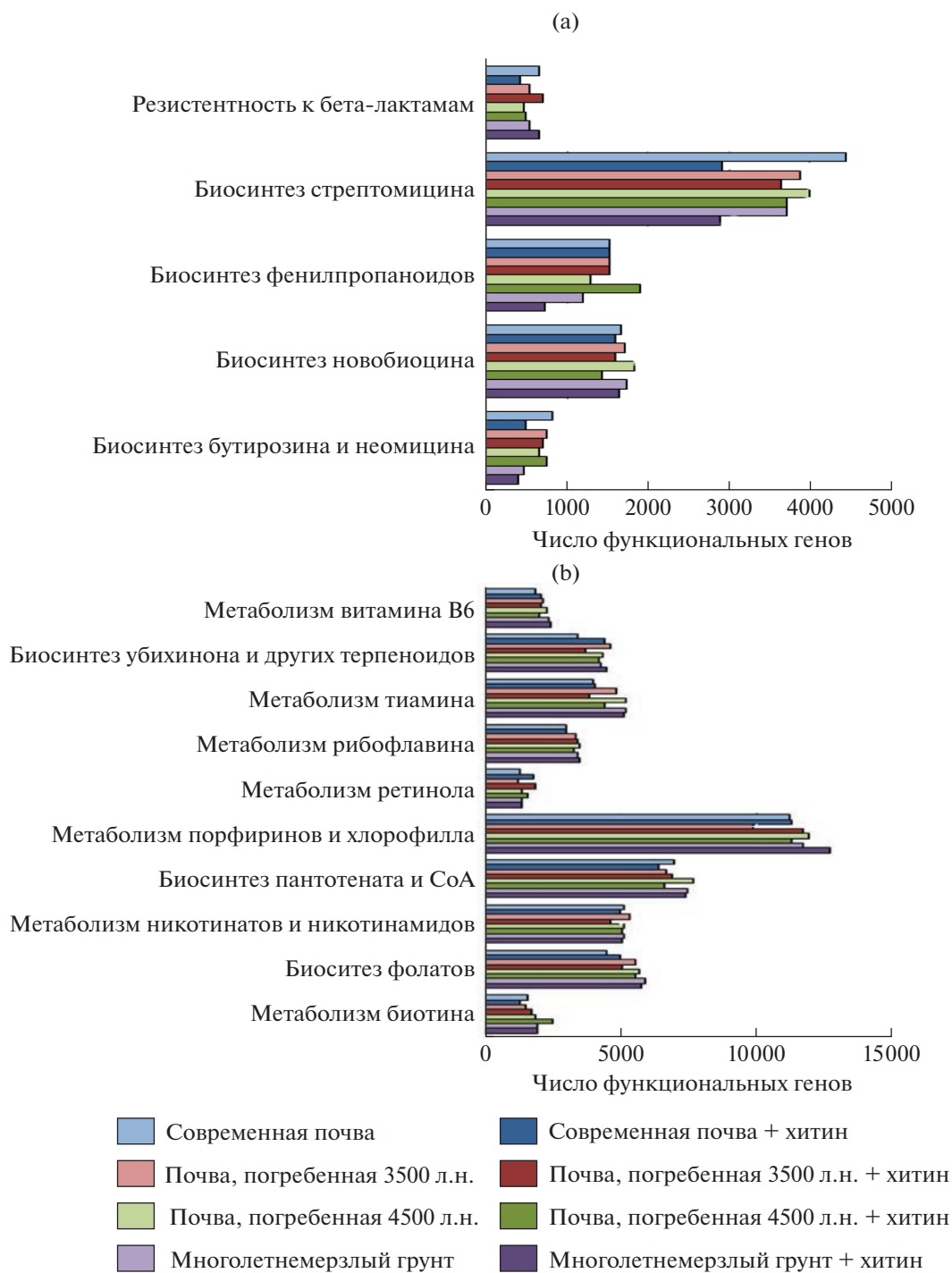


Рис. 5. Биосинтез вторичных метаболитов (а), метаболизм ко-факторов и витаминов (б).

их наименьшее содержание 6×10^3 копий/мл. 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 деградации углеводов. Анализ современной литературы свидетельствует

о высоком микробном потенциале деградации нефти в почве, который катастрофически снижается из-за формирования анаэробных условий в результате промышленного разлива нефти и нефтепродуктов.

Биосинтез вторичных метаболитов, к которым относятся такие антибиотики, как стрептомицин, новобиоцин, бутирозин, неомицин снижается в

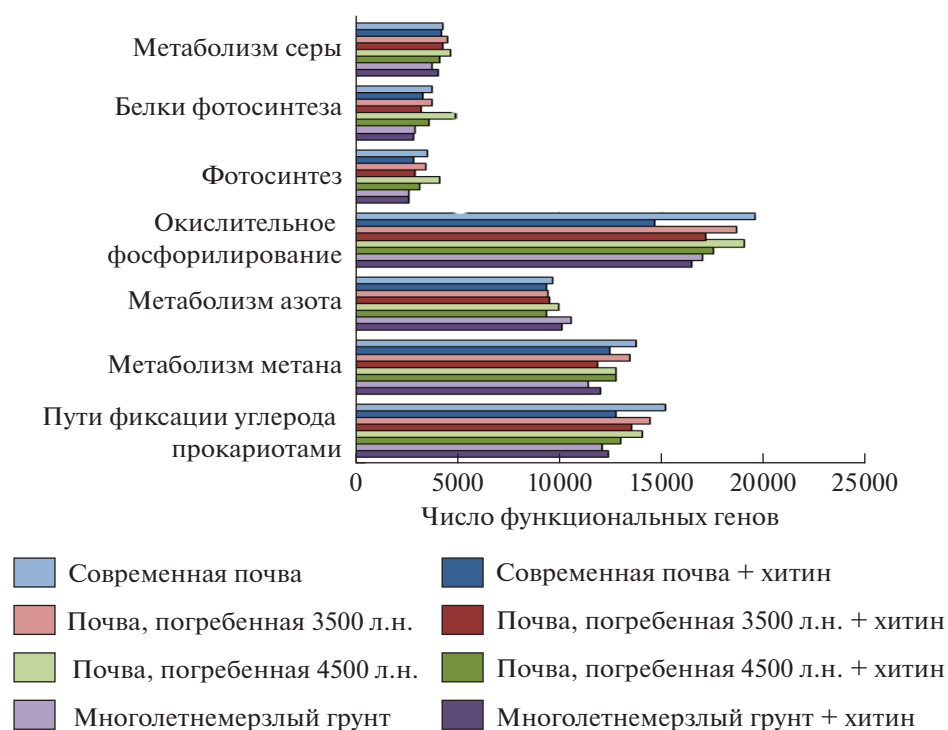


Рис. 6. Основные метаболические процессы, осуществляемые микробными сообществами исследуемых почв и грунтов.

ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам (рис. 5а). Биосинтез антибиотиков группы тетрациклина и ванкомицина примерно одинаков во всех образцах. Несмотря на то, что ранее выявлено, что штаммы, выделенные из многолетнемерзлых грунтов, обладают большей антибиотикоустойчивостью [3], количество генов, кодирующих резистентность к бета-лактамам, в исследуемых образцах не различалось. Уровень метаболизма кофакторов и витаминов в целом повышается в ряду от современных почв к многолетнемерзлым грунтам (рис. 5б). Метаболизм липидов слабо различается между образцами, однако в образцах многолетнемерзлых грунтов повышен синтез глицерофосфолипидов и метаболизм жирных кислот.

Количество генов, кодирующих фотосинтез и окислительное фосфорилирование, закономерно снижалось при переходе от современных почв к погребенным и от погребенных к многолетнемерзлым породам.

Обращает внимание количество генов, кодирующих превращения азота, которое повышено в многолетнемерзлых породах (рис. 6). Показано наличие ряда ключевых генов цикла азота (*nifH*, *amoA*, *nirK*) как в современном, так и погребенном горизонтах исследуемых почв. Наличие копий гена *nifH* бактерий азотфиксаторов, способных обеспечить систему азотом, можно рассматривать как один из этапов самовосстановления почв.

В современных почвах количество генов, отвечающих за возможность фиксации молекулярного азота из воздуха, было больше по сравнению с погребенными и достигало 4.54×10^6 копий гена/г почвы, для погребенного горизонта 2.5×10^4 копий гена/г почвы (рис. 7). Внесение субстрата как в погребенную, так и в современную почвы снижало содержание генов *nifH*. Такую особенность можно объяснить наличием в почве с полимерами (особенно хитином) доступных для микроорганизмов форм азота, что приводит к интенсификации процессов минерализации и снижению нитрогеназной активности. Важно отметить присутствие, хотя и незначительное, гена *nifH* в более глубоких слоях почвы, что указывает на возможный потенциал обитающих там микробных сообществ. Экстремальные среды обитания являются ценным источником ферментов, применимых в прикладных и промышленных областях [8]. На сегодняшний день известны прокариоты, выделенные из экстремальных сред, синтезирующие широкий спектр органических кислот, продуцирующие молекулярный водород, способные к фиксации атмосферного азота в условиях значительно отличающихся от принятых для этих процессов оптимумов, что позволяет вовлекать эти организмы в процессы ремедиации и промышленного синтеза различных веществ [8].

В последние годы интенсивно изучаются архейные сообщества почв, осуществляющие окис-

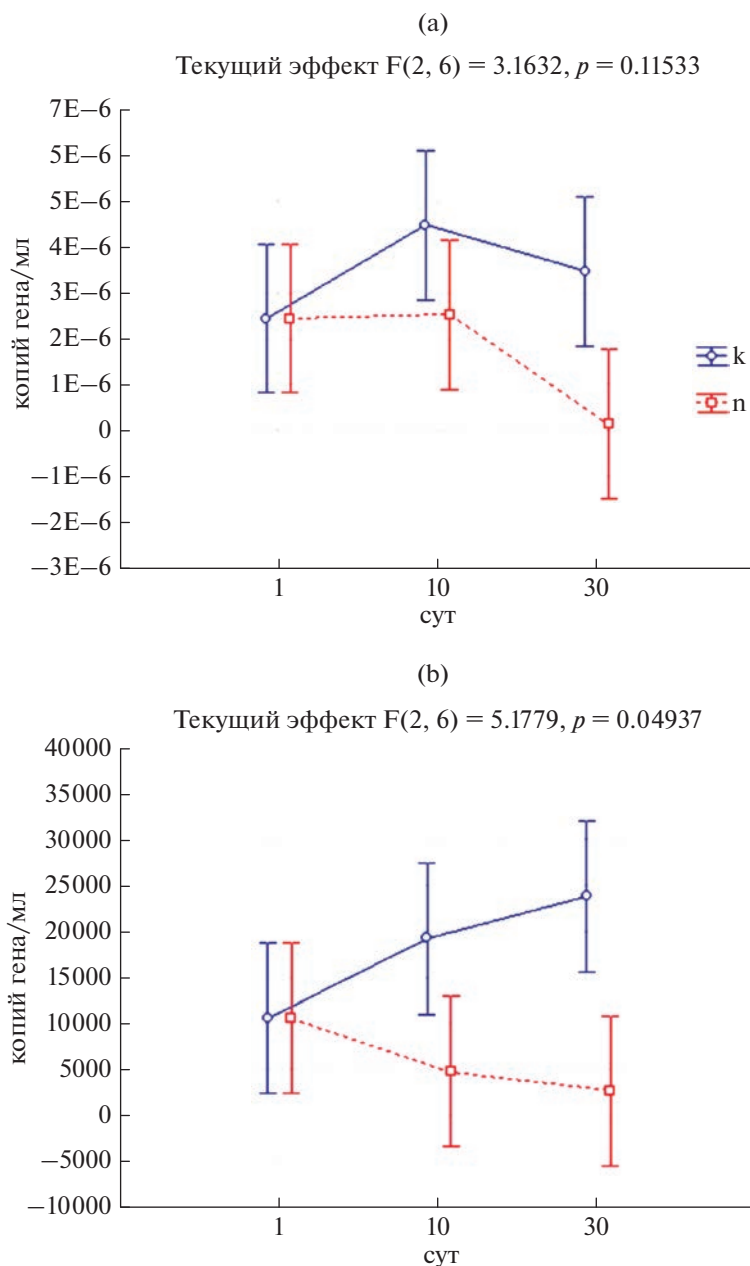


Рис. 7. Динамика присутствия гена *nifH* в современном (а) и погребенном горизонте (б) вулканической перегнойно-охристой почвы с добавлением субстратов (n) и в контроле (k). F — критерий Фишера (отношение выборочных дисперсий), p — значение. Для каждого значения представлены средние величины и стандартные отклонения. 0.95 доверительный интервал.

ление аммония [9], что изменило представления о микробных процессах трансформации азота в почвах. В параллельной серии опытов проведена амплификация ключевого гена нитрификации. Для вулканических почв (как современных, так и погребенных) удалось выявить наличие генов аммоний окисляющих бактерий и архей. Следует отметить увеличение концентрации гена в погребенных образцах к 30 сут сукцессии в контрольных вариантах и варианте с нефтью, что указыва-

ет на реактивацию нитрификаторов к концу сукцессии. Динамика присутствия гена *amoA* в современном горизонте вулканической перегнойно-охристой почвы демонстрирует увеличение его концентрации в бактериальном комплексе в вариантах с нефтью (2.3×10^7 копий ДНК/г почвы) к 10 сут сукцессии. В контроле отмечены низкие содержания гена. В архейном комплексе отмечается увеличение концентрации гена в контрольном варианте к 30 сут (2.5×10^6 копий ДНК/г

почвы), в то время как в варианте с нефтью показатели остаются очень низкими. На основании полученных данных можно сделать вывод, что в почвах без внесения нефти (ненарушенное сообщество) ведущую роль в процессе нитрификации играют археи. Аналогичные результаты получены в работах [9, 16, 33]. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а также его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля. Вклад архей в процесс нитрификации уменьшается при внесении нефти, а также уменьшается с глубиной.

В ходе сукцессии в образцах вулканической перегнойно-охристой почвы обнаружены копии гена *nirK*, использующиеся в качестве молекулярного маркера денитрификации, во всех вариантах опыта (контроль, нефть). Абсолютные значения были наибольшими в современном горизонте (1.25×10^7 копий ДНК/г.п.), в погребенном горизонте они были ниже на два порядка (1.2×10^5 копий ДНК/г.п.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе исследований для характеристики биотехнологического потенциала микробного комплекса оценено разнообразие прокариотной составляющей почвенного микробного сообщества; выявлена способность почвенных систем к процессам, направленным на деградацию труднодоступных соединений, трансформацию окисленных и восстановленных форм азота, определено наличие функциональных генов у микроорганизмов, способных к метаболической активности в почвах, различающихся параметрами основных экологических факторов.

Установлено формирование специфического комплекса бактерий с доминантами определенных родов автохтонной микрофлоры, различающихся в зависимости от типа почв, который в свою очередь оказывает координирующее влияние на развитие доминантных компонентов гидролитического комплекса.

При анализе функционального генетического разнообразия бактериального сообщества (методом восстановления полного метагенома по данным высокопроизводительного секвенирования) установлено, что количество генов, маркирующих способность сообщества к биодegradации ксенобиотиков, кодирующих превращения азота и уровень метаболизма кофакторов и витаминов, больше в реликтовых образцах по сравнению с современными. Показано, что инициация системы ресурсом увеличивает долю генов, ответственных за деградацию ксенобиотиков. Например, при внесении полисахарида повышалось количество генов, ответственных за деградацию полициклических ароматических углеводов.

Стоит отметить, что присутствие функционального гена не обязательно означает его активность, однако позволяет говорить о потенциальной возможности к осуществлению процессов, кодируемых данными генами.

По данным сравнительного количественного анализа генов из разных типов исследуемых почв сделан вывод, что архейные сообщества являются самой многочисленной группой аммоний окисляющих прокариот в почвах. Интерес к исследованию этой группы организмов определяется не только важнейшей ролью нитрификации в азотном цикле почв, но и решением практических вопросов, например, доступностью азота в условиях пониженной концентрации кислорода. Результаты исследований позволяют разработать новые подходы биоремедиации почв от загрязнения углеводородами.

Предположительно, доминанты древних гидролитических прокариотных сообществ могут обладать большей активностью по сравнению с их коллекционными аналогами. Из погребенных образцов выделены штаммы бактерий, обладающие высокой гидролитической активностью, которые в дальнейшем могут быть использованы для биотехнологических целей (например, для создания биопрепаратов при борьбе с фитопатогенами).

Выявленные закономерности указывают на высокий метаболический потенциал прокариотного компонента рассматриваемых объектов и открывают возможности для биотехнологического использования штаммов, выделенных из погребенных почв и многолетнемерзлых грунтов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова (регистрационный номер 122090800042-2) в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации № 2515-р от 2 сентября 2022 г. в целях реализации важнейшего инновационного проекта государственного значения, направленного на создание единой национальной системы мониторинга климатически активных веществ. Микробиологические исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00076). Отбор образцов выполнен в рамках темы государственного задания “Почвенные микробиомы: геномное разнообразие, функциональная активность, география и биотехнологический потенциал”, № 121040800174-6.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта научных интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Добровольская Т.Г., Головченко А.В., Юрченко Е.Н., Якушев А.В., Манучарова Н.А., Лысак Л.В., Костина Н.В. Структура и функции бактериальных сообществ регрессивных пятен верхового торфяника. Микробиология. 2020. Т. 89. № 1. С. 111–120. <https://doi.org/10.31857/S0026365620010061>
2. Кольцова Е.М. Структурно-функциональная характеристика гидролитической составляющей реликтовых прокариотных сообществ. Дис. ... канд. биол. наук. М., 2017. 139 с.
3. Кряжевских Н.А., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Баслеров Р.В., Колганова Т.В., Соина В.С., Манучарова Н.А., Гальченко В.Ф., Эль-Регистан Г.И. Сравнение адаптационного потенциала изолятов из вечномерзлых осадочных пород *Arthrobacter oxydans* и *Acinetobacter lwoffii* и их коллекционных аналогов // Микробиология. 2013. Т. 82. № 1. С. 27–41. <https://doi.org/10.7868/S0026365613010059>
4. Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И., Головлева Л.А. Влияние состояния покоя на штамм *Pseudomonas fluorescens* 26K – деструктор ксенобиотиков // Микробиология. 2013. Т. 82. № 5. С. 552. <https://doi.org/10.7868/S0026365613050145>
5. Феофилова Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 1. С. 5–24. <https://doi.org/10.1023/A:1021774523465>
6. Эль-Регистан Г.И. Покой как форма адаптации микроорганизмов // Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. С. 11–142. <https://search.rsl.ru/ru/record/01002681279>
7. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // Микробиология. 2006. Т. 75. № 4. С. 446–456. <https://doi.org/10.1134/S0026261706040035>
8. Abraham W.R., Nogales B., Golyshin P.N., Pieper D.H., Timmis K.N. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments // Curr. Opin. Microbiol. 2002. V. 5. № 3. P. 246–53. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00323-5](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00323-5)
9. Adair K.L., Schwartz E. Evidence that ammonia-oxidizing archaea are more abundant than ammonia-oxidizing bacteria in semiarid soils of northern Arizona, USA // Microb. Ecol. 2008. V. 56. P. 420–426. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9360-9>
10. Anderson M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance // Austral. Ecol. 2001. V. 26. P. 32–46. https://www.pelagicos.net/MARS6300/homework/hw6/Anderson_2001.pdf
11. Bartilson M., Nordlund I., Shingler V. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase encoding gene of phenol catabolizing *Pseudomonas* CF600 // Gene. 1989. V. 85. P. 233–238. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90487-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90487-3)
12. Boden R., Hutt L.P., Rae A.W. Reclassification of *Thiobacillus aquaesulis* (Wood & Kelly, 1995) as *Annwoodia aquaesulis* gen. nov., comb. nov., transfer of *Thiobacillus* (Beijerinck, 1904) from the *Hydrogenophilales* to the *Nitrosomonadales*, proposal of *Hydrogenophilalia* class. nov. within the 'Proteobacteria', and four new families within the orders *Nitrosomonadales* and *Rhodocyclales* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1191–1205. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001927>
13. Bray J.R., Curtis J.T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin // Ecol. Monogr. 1957. V. 27. № 4. P. 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
14. Bürgmann H., Widmer F., Sigler W.V., Zeyer J. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 1928–1935. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.4.1928-1935.2003>
15. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010. V. 7. № 5. P. 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
16. Chen J., Del Genio A.D., Carlson B.E., Bosilovich M.G. The spatiotemporal structure of twentieth-century climate variations in observations and reanalyses. P. I: Long-term trend // J. Climate. 2008. V. 21. P. 2611–2633. <https://doi.org/10.1175/2007JCLI2011.1>
17. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T. et al. Greengenes, a chimeric-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 7. P. 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
18. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. № 19. P. 2460–1. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
19. Faith D.P., Baker A.M. Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges // Evol. Bioinform. Online. 2006. V. 2. P. 121–128. <https://doi.org/10.4137/ebo.s0>
20. Gaby J.C., Buckley D.H. A comprehensive aligned *nifH* gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria // Database (Oxford). 2014. V. 2014. P. bau001. <https://doi.org/10.1093/database/bau001>
21. Hallin S., Jones C. M., Schlöter M., Philippot L. Relationship between n-cycling communities and ecosystem functioning in a 50-year-old fertilization experiment // ISME J. 2009. V. 53. P. 597–605. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.128>
22. Harayama S., Rekik M. Bacterial aromatic ring cleavage enzymes are classified into two different gene families // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 15328–15333. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)84830-5/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)84830-5/pdf)
23. Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Ruegg I., Bucheli-Witschel M., Faber F. et al. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site // J. Microbiol. Methods. 2006. V. 64. P. 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.018>

24. Henry S., Baudouin E., López-Gutiérrez J.C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR // J. Microbiol. Methods. 2004. V. 59. P. 327–335.
<https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2004.07.002>
25. Hiraiishi A., Ueda Y. *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplane-selegans* sp. nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1994. V. 44. P. 665–673.
<https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-665>
26. Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M., Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. Database issue. P. 109–114.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>
27. Kaprelyants A.S., Mukamolova G. V., Davey H.M., Kell D.B. Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry and cell sorting // Appl. Environ. Microbiol. 1996. V. 62. № 4. P. 1311–1316.
<https://doi.org/10.1128/aem.62.4.1311-1316.1996>
28. Kok M., Oldenhuis R., van der Linden M. P. G., Raatjes P., Kingma J., van Lelyveld P.H. The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene, sequence and expression // J. Biological Chem. 1989. V. 264. P. 5435–5441.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83564-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83564-5)
29. Langille M., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J., Clemente J., Burkepile D. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. № 9. P. 814–821.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
30. Manucharova N.A., Ksenofontova N.A., Belov A.A., Kamenskiy N.N., Arzamazova A.V., Zenova G.M., Kinzhaev R.R., Trofimov S.Y., 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.
<https://doi.org/10.31857/s0032180x2101010x>
31. Markowitz V.M., Chen I.-M.A., Palaniappan K., Chu K., Szeto E., Grechkin Y., Ratner A. et al. IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. Database issue. P. D115–22.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>
32. McIlroy S.J., Nielsen P.H. The Prokaryotes / Eds E. Rosenberg et al. Berlin: Springer, 2014. P. 863–889.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9>
33. Nichols D., Lewis K., Orjala J., Mo S., Ortenberg R., O'Connor P., Zhao C., Vouros P., Kaerberlein T., Epstein S.S. Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow *in vitro* // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 15. P. 496.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00393-08>
34. Pantanella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum* // J. Appl. Microbiol. 2007. V. 102. № 4. P. 992–999.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x>
35. Price M.N., Dehal P.S., Arkin A.P. FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for large alignments // PLoS One. 2010. V. 5. № 3. P. e9490.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
36. Rothauwe J., Witzel K. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: Molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 4704–4712.
<https://doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997>
37. 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. № 5. P. 259–264.
<https://doi.org/10.1038/ja.2012.123>
38. Su X., Chen X., Hu J., Shen C., Ding L. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria // World J. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 29. № 12. P. 2213–2218.
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1390-5>
39. Takashi Itoh, Kaoru Yamanoi, Takuji Kudo, Moriya Ohkuma, Tomonori Takashina. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field // Int. J. Systematic Evolutionary Microbiol. 2011. V. 61. P. 1281–1285.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.023044-0>
40. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. № 16. P. 5261–5267.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
41. Whyte L.G., Schultz A., van Beiden J.B., Luz A.P., Pellizari V., Labbé D., Greer C.W. Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils // FEMS Microbiol. Ecol. 2002. V. 41. P. 141–150.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00975.x>

Biotechnological Potential of Hydrolytic Prokaryotic Component in Soils

N. A. Manucharova^{1, *}, M. A. Kovalenko¹, M. G. Alekseeva¹, A. D. Babenko¹, and A. L. Stepanov¹

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: manucharova@mail.ru

The phylogenetic and functional diversity of a prokaryotic complex with biotechnological potential (carrying out the destruction of biopolymers, hydrocarbons; capable of synthesizing secondary metabolites; nitrogen fixation process) in soil and associated ecosystems has been studied. In order to identify the specifics of the development of metabolically active prokaryotes with biotechnological potential, the patterns of their distribution and the dependence of functional activity on the main environmental factors have been established.

The study used molecular biological and bioinformatic approaches. The range of samples studied included modern soils (Volgograd, Tula, Moscow regions, Siberia and the Northern part of Central Kamchatka), relict habitats (Volgograd Region and Central Kamchatka) and permafrost soils of Antarctica (King George Island). The impact of anthropogenic and abiogenic loads on the development of the prokaryotic community was considered. In soils exposed to anthropogenic or abiogenic loads, along with a decrease in the diversity and abundance of prokaryotes, an increase in the number of genes marking the ability of a community to biodegrade xenobiotics, as well as genes encoding nitrogen transformations and the level of metabolism of co-factors and vitamins was found. The bacterial complex is capable of nitrification with high oil contamination of the soil, and its role also increases in the lower layers of the soil profile. Archaea play a leading role in the nitrification process in undisturbed soils. The revealed patterns indicate a high metabolic potential of the prokaryotic component of the objects under consideration and open up opportunities for biotechnological use of strains isolated from relict habitats.

Keywords: functional genes, hydrolytics, oil, nitrogen cycle, bacteria, archaea