

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРОБИОМА ПОЧВ

© 2024 г. Н. А. Манучарова^{а, *}, А. П. Власова^а, М. А. Коваленко^а, Е. А. Овчинникова^а,
А. Д. Бабенко^а, Г. А. Терегулова^а, Г. В. Уваров^а, А. Л. Степанов^а

^аМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

*e-mail: manucharova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.10.2023 г.

После доработки 02.11.2023 г.

Принята к публикации 03.11.2023 г.

С применением молекулярно-биологических методов и биоинформационного анализа исследовано филогенетическое и функциональное разнообразие прокариотного комплекса почвенных микробиомов. Доминанты гидrolитического сообщества различались между образцами разных климатических зон. Наряду с сокращением разнообразия и численности прокариот в почвах, подверженных антропогенным или абиогенным нагрузкам, установлено возрастание количества генов, маркирующих способность сообщества к биодegradации ксенобиотиков, генов, кодирующих превращения азота и уровень метаболизма кофакторов и витаминов. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а также его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля. Выявленные закономерности указывают на высокий метаболический потенциал прокариотной компоненты рассматриваемых почв.

Ключевые слова: функциональные гены, деструкция углеводов, синтез антибиотиков, нитратредуктазная, нитрогеназная, монооксигеназная активности

DOI: 10.31857/S0026365624020056

Почва представляет собой главный природный банк культур микроорганизмов с полезными для человека свойствами. Выяснение свойств почв, способствующих формированию и сохранению биоразнообразия, получение консорциумов микроорганизмов, обладающих биотехнологическим потенциалом (способность к азотфиксации, гидролизу природных полимеров и ксенобиотиков, синтезу вторичных метаболитов) — важнейшая научная задача современной микробиологии. На основании анализа литературных данных и результатов собственных исследований (Sutton et al., 2013; Samarghandi et al., 2018; Manucharova et al., 2021) нами была высказана гипотеза, что в почвах, подверженных антропогенным или абиогенным нагрузкам, происходит увеличение количества генов, маркирующих устойчивость сообщества к стрессам, например, способность к биодegradации ксенобиотиков, а также ключевых генов метаболизма, например, превращения азота.

Целью исследований являлось выявление специфики устойчивости и развития гидrolитических (хитинолитических, углеводородокисляющих) микробных комплексов, обладающих биотехнологическим потенциалом (гидролиз природных полимеров и ксенобиотиков, способность к азотфиксации, синтез вторичных метаболитов) в почвенных экосистемах, установление закономерностей их

распространения и зависимости функциональной активности от основных экологических факторов.

Для проверки гипотезы нами были проведены исследования филогенетического и функционального разнообразия микробных сообществ широкого набора почвенных объектов с различной степенью нарушенности. В качестве основного стрессового фактора было выбрано воздействие углеводов нефти, полиароматических углеводов (ПАУ) и биополимера хитина в условиях *in situ* и лабораторных экспериментов. Для наиболее полной оценки функций почвенного микробиома в работе использовали комплекс методов анализа генетической информации микробиома, ПЦР-определения генов-биомаркеров, оценки физиологически активной части микробиома и измерения функциональной активности.

Объектами исследования являлись прокариотные сообщества современных почв: дерново-подзолистой (Московская область, почва на территории завода, загрязненная ПАУ, 55.728016° с.ш., 38.217825° в.д.), торфяной олиготрофной (Сибирь, Ханты-Мансийский район (почва под нефтяной скважиной) 61.31°24'71" с.ш., 70.26°76'10" в.д.), чернозема (Волгоградская область (модельный эксперимент, загрязнение нефтью в течение 7 лет) 51°1'41" с.ш., 40°43'31" в.д.),

серой лесной (Тульская область, модельный эксперимент, 53°58'23" с.ш., 37°10'34" в.д.), каштановой (Волгоградская область 49.39936° с.ш., 46.81083° в.д.), бурой пустынно-степной (пустыня Гоби 43°45'00" с.ш., 111°50'00" в.д.) и реликтовых местообитаний: подкурганые каштановые почвы (Волгоградская область, юг Приволжской возвышенности Камышинского района), погребенные вулканические слоисто-пепловые почвы Камчатки (Северная часть Центральной Камчатки, почвенно-пирокластический чехол северо-западного подножия вулкана Шивелуч 56°49'42" с.ш., 161°19'28" в.д.), многолетнемерзлых грунтов Антарктиды (о. Кинг-Джордж, станция Беллинсгаузен 62°10'04" с.ш., 59°12'11" в.д.).

Исследовали воздействие антропогенного фактора на прокариотные сообщества почв как в природных экосистемах (например, на месте разлива нефти (чернозем, торфяная олиготрофная, дерново-подзолистая) или поступления и накопления ПАУ (дерново-подзолистая), так и в модельных опытах с искусственным добавлением углеводов или биополимеров (чернозем, серая лесная, дерново-подзолистая, каштановая, бурая пустынно-степная, подкурганые каштановые почвы, погребенные вулканические слоисто-пепловые почвы Камчатки, грунты Антарктиды). 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). Методика была описана нами ранее (Манучарова и соавт., 2021).

Выделение ДНК проводили с помощью PowerSoil DNA Isolation Kit компании "MOBio" (Германия) в соответствии с рекомендациями производителя в трехкратной повторности.

Оценивали количество копий генов, кодирующих синтез ферментов, направленных на деструкцию углеводов: алкан-монооксигеназы (*alkB* и *alkM*)(субстрат: n-алканы) (Wang et al., 2007), катехол-2,3-диоксигеназа (*xylE*) (субстрат: катехолы и протокатехоевые кислоты), 1,2-гидрокси-нафталиндиоксигеназа (*nahC*) (субстрат: нафталин) (Hendrickx et al., 2006). Параллельно проводили оценку функциональной деятельности прокариотного сообщества посредством выявления наличия в системе генов, участвующих в процессах азотного цикла: *nifH* — нитрогеназная активность (Burgmann et al., 2003), *amoA* (АОВ) — монооксигеназная активность аммоний окисляющих бактерий (Hallin et al., 2009; Gogmachadze et al., 2023), *amoA* (АОА) — монооксигеназная активность аммоний окисляющих архей, *nirK* — нитратредуктазная активность (Henry et al., 2004), а также *chitA* — хитиноподобная

активность (Wang et al., 2017). Определения проводили на детектирующем амплификаторе DTLite4 ("ДНК-Технология", Россия) с измерением интенсивности флуоресценции реакционной смеси на каждом цикле в соответствии с рекомендациями производителя. Общую численность прокариот в почвах определяли с помощью красителя акридиона оранжевого; 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). 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 (Манучарова и соавт., 2021). Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с использованием пары универсальных праймеров к вариабельному участку V4 гена 16S рРНК. Подготовку проб и секвенирование выполняли на секвенаторе Illumina Miseq ("Евроген"). Полученные данные обрабатывались в программе SYLVA и ezbiocloud. Функциональное разнообразие генов в микробных сообществах было предсказано при помощи программы PICRUSt (Langille et al., 2013). Для сопоставления 16spРНК с уже секвенированными полными геномами была использована база бактериальных и архейных геномов IMG database (Markowitz et al., 2012).

Авторами было установлено снижение биомассы и альфа-разнообразия, а так же смена метаболически активных доминантов — представителей доменов *Bacteria* и *Archaea* за счет выхода в доминанты определенных родов — автохтонной микрофлоры, специфичной для определенных условий в микросомах, загрязненных нефтью по сравнению с контрольными образцами в процессе микробной сукцессии (Manucharova et al., 2021). Для образцов нефтезагрязненных почв южных широт доминирующая роль принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт — протеобактериям. Для образцов чернозема падение разнообразия бактерий в результате загрязнения углеводородами составляет 44% (индекс Шеннона снижается с 7.09 до 4.84).

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 части России (дерново-подзолистая, торфяная), погребенные почвы и многолетнемерзлые грунты (рис. 1).

Такое разделение указывало на то, что при внесении ресурса доминанты гидролитического сообщества различались между образцами разных

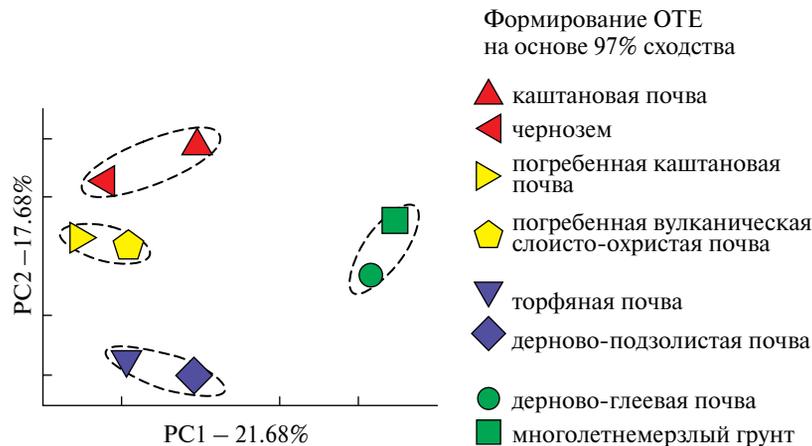


Рис. 1. Анализ методом главных компонент с применением метрики Брея–Кертиса структуры прокариотных сообществ исследуемых образцов с добавлением субстратов (биополимера хитина или углеводов).

климатических зон. На фоне сокращения биоразнообразия в загрязненных образцах по сравнению с контролем определено увеличение содержания функциональных генов (в 2–4 раза), отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xylE*), алкан-монооксигеназы (*alkB*) и 1,2-гидроксинафталиндиоксигеназы (*nahC*), маркирующих начальный этап деградации углеводов. При анализе функционального генетического разнообразия сообщества методом восстановления полного метагенома по данным высокопроизводительного секвенирования гена 16S рРНК было выявлено, что количество генов, маркирующих способность сообщества к биодеградации ксенобиотиков, выше в многолетнемерзлых грунтах по сравнению с современными почвами. Внесение субстрата увеличивает долю генов, ответственных за деградацию ксенобиотиков (рис. 2).

На длительных сроках загрязнения наблюдается последствие поллютанта и дальнейшее увеличение численности функциональных генов в сравнении со свежим разливом. По прошествии 7 лет после нефтеразлива бактериальное разнообразие продолжает сокращаться. Выявлены устойчивые и чувствительные к нефтезагрязнению представители. К устойчивым среди представителей филлума *Actinomycetota* относятся рода *Gaiella* и *Streptomyces*.

Показано наличие ряда ключевых генов цикла азота (*nifH*, *amoA*, *nirK*, *chitA*) как в современных, так и погребенных горизонтах исследуемых почв. Наличие копий гена *nifH* бактерий азотфиксаторов, способных обеспечить систему азотом, можно рассматривать как один из этапов самовосстановления почв. В современных почвах наличие генов,

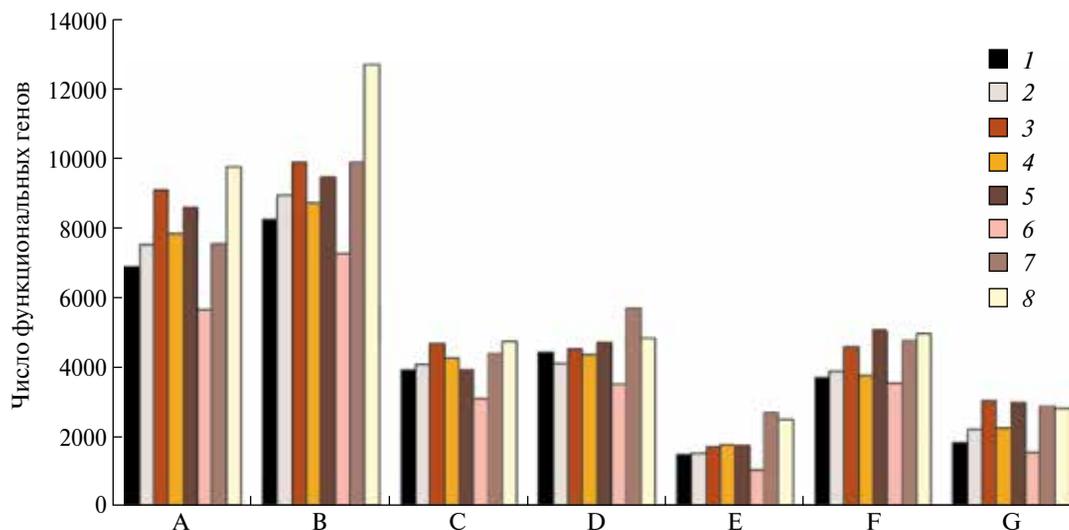


Рис. 2. Биодеградация ксенобиотиков: А — аминокислоты; В — бензоат; С — капролактамы; D — хлороалканы/хлороалкены; Е — хлороциклогексан/хлоробензен; F — нафталин; G — ПАУ. Исследуемые образцы: 1 — чернозем; 2 — чернозем, инкубируемый с ресурсом; 3 — каштановая почва с ресурсом; 4 — каштановая почва; 5 — дерново-подзолистая почва, инкубируемая с ресурсом; 6 — дерново-подзолистая почва; 7 — многолетнемерзлый грунт; 8 — многолетнемерзлый грунт, инкубированный с ресурсом.

отвечающих за возможность фиксации молекулярного азота из воздуха, было выше по сравнению с погребенными и достигало 4.54×10^6 копий гена/г.п., для погребенного горизонта 2.5×10^4 копий гена/г.п. Важно отметить присутствие, хотя и незначительное, гена *nifH* в более глубоких слоях почвы, что указывает на возможный потенциал обитающих там микробных сообществ. Для вулканических почв (как современных, так и погребенных) удалось выявить наличие генов аммоний окисляющих бактерий и архей. 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.п.) к 10 сут сукцессии. Бактериальный комплекс способен к нитрификации при высоком загрязнении почвы нефтью, а также его роль возрастает в нижних слоях почвенного профиля.

Таким образом, влияние антропогенной нагрузки изменяет “метаболический профиль” почвенных сообществ, что выражается как в увеличении количества микроорганизмов, обладающих биотехнологически ценными свойствами (количество функциональных генов), так и в изменении состава этих микроорганизмов, что и открывает возможность для поиска новых биотехнологически ценных штаммов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Состав микробного сообщества почв был определен при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-14-00108).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bürgmann H., Widmer F., Sigler W.V., Zeyer J. mRNA expression 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>
- Hallin S., Jones C.M., Schloter 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>
- Hendrickx B., Junca H., Vosahlova J., Lindner A., Ruegg I., Bucheli-Witschel M., Faber F., Egli T., Mau M., Pieper, D.H., Top E.M., Dejonghe W., Bastiaens L., Springael D. 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. Meth. 2006. V. 64. P. 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.018>
- 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. Meth. 2004. V. 59. P. 327–335. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2004.07.002>
- Gogmachadze L.G., Khusnetdinova K.A., Stepanov A.L., Kravchenko I.K. Microcosm study of ammonium and drying impact on methane oxidation in agricultural soil // J. Agric. Environ. 2023. V. 36. P. 10–22. <https://doi.org/10.23649/JAE.2023.36.7>
- Langille M., Zaneveld J., Caporaso J.G., McDonald D., Knights D., Reyes J., Clemente J., Burkpile D., Vega Thurber R., Knight R., Beiko R., Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences // Nat. Biotechnol. 2013. V. 31. P. 814–821. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>
- 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. P. C. 1103–1117. <https://doi.org/10.3390/f12081103>
- 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 // Euras. Soil Sci. 2021. V. 54. P. 89–97. <https://doi.org/10.31857/s0032180x2101010x>
- Markowitz V.M., Chen I.-M.A., Palaniappan K., Chu K., Szeto E., Grechkin Y., Ratner A., Jacob B., Huang J., Williams P., Huntemann M., Anderson I., Mavromatis K., Ivanova N.N., Kyrpides N.C. IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. Database iss. P. D115–D122. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1044>
- Samarghandi M.R., Arabestani M.R., Zafari D., Rahmani A.R., Afkhami A., Godini K. Bioremediation of actual soil samples with high levels of crude oil using a bacterial consortium isolated from two polluted sites: investigation of the survival of the bacteria // Global NEST J. 2018. V. 20. P. 432–438.
- Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Al-Soud W.A., Langenhoff A.A.M., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H.M., Smidt H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 619–630.

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. P. 5261–5267.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>

Wang Q., Duan B., Yang R., Zhao Y., Zhang L. Screening and identification of chitinolytic actinomycetes and study on the inhibitory activity against turfgrass root rot disease fungi // *J. Biosci. Medic.* 2015 V. 3. P. 56065.
<https://doi.org/10.4236/jbm.2015.33009>

SHORT COMMUNICATIONS

Biotechnological Potential of the Soil Microbiome

N. A. Manucharova^{1,*}, A. P. Vlasova¹, M. A. Kovalenko¹, E. A. Ovchinnikova¹,
A. D. Babenko¹, G. A. Teregulova¹, G. V. Uvarov¹, and A. L. Stepanov¹

¹*Moscow State University, Moscow, 119991, Russia*

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

Received October 15, 2023; revised November 2, 2023; accepted November 3, 2023

Abstract—Molecular biological techniques and bioinformatic analysis were used to investigate the phylogenetic and functional diversity of the prokaryotic complex of soil microcosms. The dominant organisms of the hydrolytic community were different in the samples from different climatic zones. In the soils subject to anthropogenic or abiogenic load, apart from decreased diversity and abundance of prokaryotes, the number of the genes marking the ability to degrade xenobiotics, as well as those encoding nitrogen conversion and metabolism of vitamins and cofactors, was found to increase. Under heavy oil contamination, the bacterial community was capable of nitrification; its role increased in the lower horizons of the soil profile. The patterns revealed in the work indicate high metabolic potential of the prokaryotic component of the studied soils.

Keywords: functional genes, hydrocarbon degradation, antibiotic synthesis, nitrate reductase, nitrogenase, and monooxygenase activities