

УДК 665.637

## ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ НА СОСТАВ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА

© 2013 г. А. В. Панов\*, \*\*, 1, Т. З. Есикова\*\*, С. Л. Соколов\*\*,  
И. А. Кошелева\*, \*\*, А. М. Боронин\*, \*\*

\* Пуцинский государственный естественнонаучный институт

\*\* Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, Пуццо

Поступила в редакцию 01.03.2012 г.

Исследованы динамика численности и состав сообщества аборигенных почвенных микроорганизмов в условиях загрязнения почв нафталином, диоктилфталатом, дизельным топливом и нефтью. ДГГЭ-анализ 16S рДНК, амплифицированной из тотальной почвенной ДНК, выявил, что в незагрязненной почве бактериальное сообщество характеризовалось большим разнообразием, и в нем отсутствовали явно доминирующие виды. В образцах почв, загрязненных нефтью, дизельным топливом и диоктилфталатом, с третьего дня эксперимента доминировали бактерии рода *Pseudomonas*. При загрязнении нафталином на третьи сутки в популяции преобладали бактерии двух родов — *Pseudomonas* и *Paenibacillus*, а к 21-му дню эксперимента доминирующим стал род *Arthrobacter*. Количество аборигенных бактерий-деструкторов в течение эксперимента увеличилось, в среднем, на два порядка. В нативной почве не детектировались ключевые гены катаболизма нафталина — *nahAc* и *nahH*, однако уже через три дня после внесения загрязнителя они обнаруживались в значительном количестве. Из почвы, загрязненной нафталином, на третий день эксперимента были выделены три штамма-деструктора, клетки которых содержали плазмиды биодеградации нафталина группы IncP-9. Причем две из трех плазмид, будучи выделенными из клеток разных штаммов-деструкторов, оказались идентичными.

*Ключевые слова:* нафталин, ДГГЭ-анализ, *Pseudomonas*, гены *nahAc* и *nahH*.

DOI: 10.7868/S0026365613010114

В современных условиях постоянно возрастающего загрязнения окружающей среды почвенным микроорганизмам приходится сталкиваться с огромным разнообразием токсичных устойчивых органических соединений. При этом динамика микробных сообществ, изменение их состава под воздействием того или иного вида поллютантов изучены недостаточно. Исследование лабораторных модельных почвенных систем (МПС) дает возможность понять, как бактериальные сообщества отвечают на специфические загрязнения, и помогает устанавливать закономерности в поведении и функционировании природных сообществ при таких загрязнениях. В представленной работе в качестве загрязняющих агентов использовались нефть и дизельное топливо — широко распространенные в настоящее время многокомпонентные поллютанты окружающей среды, а также диоктилфталат и нафталин. Диоктилфталат — токсичная жидкость, используемая в качестве пластификатора виниловых полимеров, каучуков (для получения морозостойких резино-

вых изделий), эфиров целлюлозы, полистирола, а также как гидравлическая жидкость, диэлектрическая жидкость в конденсаторах. Нафталин — низкомолекулярный ароматический углеводород, который также широко распространен в природе и часто используется как модельное соединение при исследовании процессов деструкции полициклических ароматических углеводородов (ПАУ).

Методом, который позволяет с высокой точностью проследить изменения состава бактериальных сообществ в различных экосистемах под воздействием разнообразных стрессовых факторов, является денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ) [1]. С помощью ДГГЭ исследуются гены 16S рРНК всех представителей бактериального сообщества, что дает возможность определить их родовую принадлежность.

В настоящей работе данный метод использовался для наблюдения за изменениями, происходящими в лабораторных МПС в ответ на присутствие в почве распространенных поллютантов.

<sup>1</sup> Автор для корреспонденции (e-mail: panov\_a\_v@inbox.ru).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объекты исследования.** В работе использовали серую лесную почву, отобранную близ г. Пушкино Московской области и имеющую следующий состав: зола – 91.00% ( $\text{SiO}_2$  – 72.50%, С – 2.89%, Н – 1.05%, N – 0.25%, Р – 0.06%, Са – 0.48%, Mg – 0.14%, Fe – 1.20%, К – 2.47%), рН водной вытяжки 5.5. В лабораторных условиях в почву вносили нафталин в количестве 1 мг/г почвы, нефть – 2 мкл/г почвы, дизельное топливо (ДТ) – 2 мкл/г почвы, диоктилфталат (ДОФ) – 2 мкл/г почвы. Эксперимент проводили в чашках Петри, содержащих по 20 г почвы в каждой. Чашки Петри с почвой инкубировали в термостате при температуре 28°C. Влажность почвы поддерживали на уровне 40% путем полива дистиллированной водой. Эксперимент длился 21 день, пробы отбирали на 0, 3, 10 и 21 сутки. Каждый вариант был выполнен в трех повторях. Аборигенные почвенные бактерии выделяли из почвы и выращивали на агаризованной среде LB [2] и агаризованной минерально-солевой среде Эванса [3] при 28°C. Нафталин и дизельное топливо добавляли на крышку перевернутой чашки Петри. Салицилат натрия, диоктилфталат и нефть вносили в среду в количествах 1 мл/л, 1 мл/л, 10 мл/л, соответственно. При конъюгационном переносе плазмид в качестве реципиента использовали бесплазмидный штамм *P. putida* КТ2442 (*gfp*,  $\text{Km}^r$ ,  $\text{Rif}^r$ ), предоставленный К. Smalla, Германия.

**Варианты МПС.** Вариант I – почва + нафталин; вариант II – почва + ДТ; вариант III – почва + нефть; вариант IV – почва + ДОФ. В каждой контрольной точке эксперимента осуществляли отбор проб в количестве 250 мг для выделения тотальной почвенной ДНК. Высевы из серийных разведений почвенных проб проводили на агаризованную среду LB (для подсчета общей численности микроорганизмов), а также на агаризованную минеральную среду Эванса с нафталином, дизельным топливом, диоктилфталатом и нефтью (для подсчета аборигенных бактерий-деструкторов).

**Выделение суммарной ДНК из почвы.** Суммарную ДНК выделяли из 500 мг почвенного образца с использованием системы Fast DNA® SPIN Kit for soil (“Q-Biogene”, США) по протоколу фирмы-изготовителя.

**Плазмидную ДНК выделяли** методом щелочно-го лизиса [2] с некоторыми модификациями.

**Конъюгационный перенос плазмид** осуществляли согласно [4].

**Экзополисахариды** выделяли согласно [5].

**Полимеразную цепную реакцию** осуществляли в циклере Mastercycler Gradient (“Eppendorf”, Германия). Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, представлены в таблице. Реакции проводили в стандартных условиях с объе-

мом реакционной смеси 25 мкл. В случае ПЦР для ДГГЭ состав реакционной смеси был следующим: 1× буфер для *Taq* ДНК-полимеразы (“Promega”, США), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5% DMSO, 20 пМ каждого праймера, 2 U *Taq* ДНК-полимеразы, 200 мкМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и 25–100 нг ДНК. При амплификации 16S рДНК для ДГГЭ-анализа программируемый цикл был следующим: 5 мин при 94°C; амплификация 35 циклов последовательно: 1 мин при 94°C, 1 мин при 53°C и 30 с при 72°C; в заключение дополнительно 10 мин при 72°C. В случае Вох-ПЦР состав смеси был следующим: 5× буфер Гитчера, 1% DMSO (“Sigma”, США), 0.3 мкг праймера, 0.4 U *Taq* ДНК-полимеразы (“Promega”, США), 1.25 mM дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0.4 мг БСА и 25–100 нг ДНК. В остальных случаях: 1× буфер для *Taq* ДНК-полимеразы (“Promega”, США), 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5% DMSO, 20 пМ каждого праймера, 2 U *Taq* ДНК-полимеразы, 200 мкМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и 25–100 нг ДНК.

**ДГГЭ-анализ** амплифицированных генов 16S рРНК проводили с использованием Dcode System (“Universal Mutation Detection System”, Bio-Rad). 300–500 нг ПЦР-продукта наносили на 9% полиакриламидный гель [13] с градиентом от 40 до 80% (100% денатурирующий гель содержит 7M мочевины и 40% деионизованного формамида). ДГГЭ проводили в 1× *Tris*-acetate-EDTA буфере в течение 6.5 ч при 220 V и 60°C. Гель визуализировали путем окрашивания серебром [14]. Мажорные полосы вырезали из геля, отмывали 20 мкл 0.5% красной кровяной соли  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , затем два раза по 500 мкл деионизованной стерильной водой и замораживали. После нескольких раундов замораживания-оттаивания последовательности реамплифицировали и использовали для секвенирования.

**Секвенирование ДНК** проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3730 Applied Biosystems. Нуклеотидные последовательности анализировали с помощью пакета программ DNASTar и программы BLAST N (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**В рестрикционном анализе** использовали следующие ферменты: для рестрикции гена 16S рРНК – *RsaI*, *MspI* (*HpaII*); для рестрикции плазмид – *EcoRI*. Обработку ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили при 37°C в течение 2 ч в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (все ферменты – производства “Fermentas”, Литва).

**Для ДНК-ДНК гибридизации** образцы разделяли электрофорезом в горизонтальном агарозном геле и переносили из геля на нейлоновые фильтры “Hybon N+” (“Amersham”, Англия) в раство-

ПЦР-праймеры, использованные в работе

Ген	Праймеры	Нуклеотидная последовательность, (5' → 3')	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Ссылка
16S рРНК (для ДГГЭ)	U968GC	[CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCG- GGGCGGGGGCACGGGGG] CAACGCGAACCTAC	440	[6]
	L1401-1378	CGGTGTGTACAAGCCCCGGGAACG		
16S рРНК	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1465	[7]
	1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT		
	BoxA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	—	[8]
<i>repA</i> (IncP-7)	RepAP7F1	GCCCATGCCGAAAAAGGTGTC	412	Волкова О.В. (ИБФМ РАН)
	RepAP7R1	GAATCGTTGATAGGCATCCGAC		
<i>repAB</i> (IncP-9)	repF	CCAGCGCGGTACWTGGG	398	[9]
	repR	GTCGGCAICTGCTTGAGCTT		
<i>nahAc</i>	Ac149f	CCCYGGCGACTATGT	865	[10]
	Ac1014r	CTCRGGCATGTCTTTTTC		
<i>nahG</i>	shc1_up	CGGCKTTHGGTGARGTCGGTG	893	[11]
	shc1_lo	GGCGAGGAARTAGGCGTCCTCAAG		
<i>nahH</i>	23DOF	ATGGATDTDATGGGDTTCAAGGT	721	[12]
	23DOR	ACDGTCADGAADCGDTCGTTGAG		
<i>nahR</i>	nahR_1f	ATGGAAGTGCCTGACCTGG	585	[11]
	nahR_585r	GCCGTAGGAACAGAAGCG		

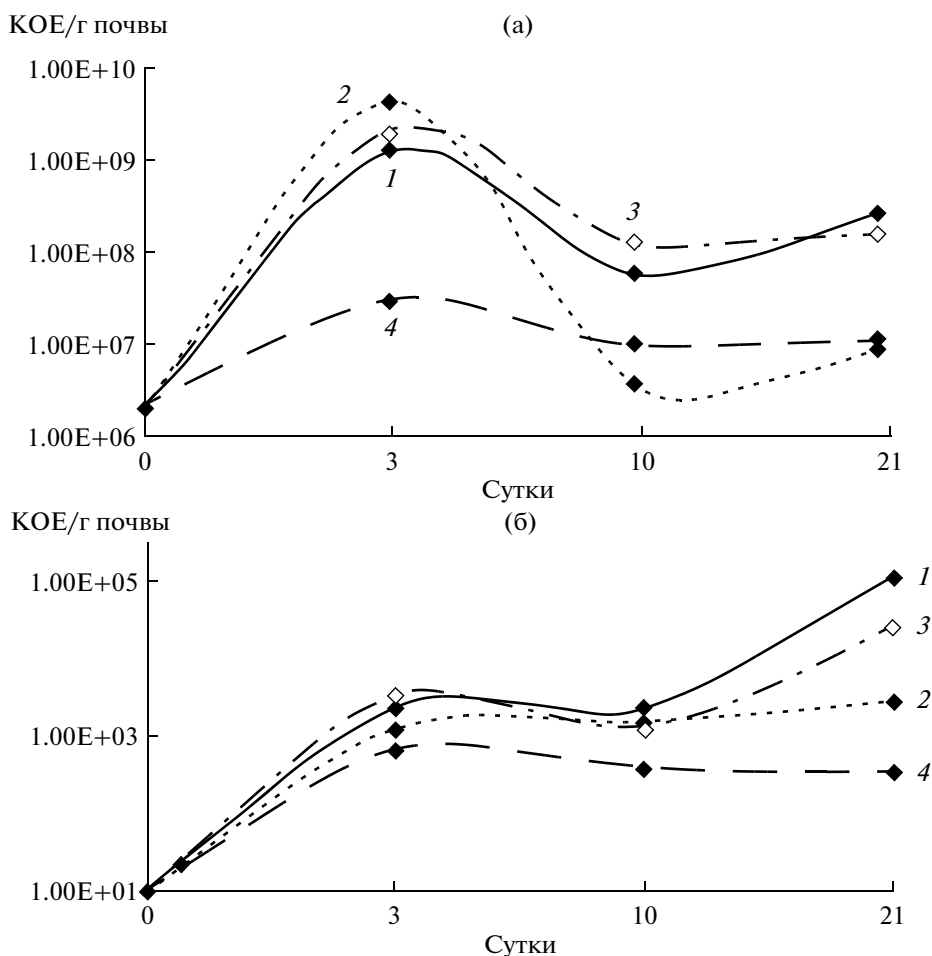
ре 0.4 М NaOH. Перенос вели в течение 3–4 ч, после чего фильтр нейтрализовали вымачиванием в течение 5 мин в растворе 2× SSC (0.3 М NaCl, 0.03 М цитрат натрия, pH 7.0). Предгибридизацию и гибридизацию с ДНК-зондами, амплифицированными с праймерами на гены *nahAc* и *nahH* и меченными диоксигенином (DIG) с использованием PCR DIG Probe Synthesis Kit (“Roche Diagnostics”, Германия), проводили при 62°C (20% формамид) в гибридизационной печи “Binder BFED53” (Германия) с последующей отмывкой мембраны 2 раза по 5 мин в 2× SSC, 0.1% SDS при комнатной температуре и 2 раза по 15 мин в 0.1× SSC, 0.1% SDS при 68°C (по протоколу фирмы изготовителя).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Динамика численности аборигенных штаммов в почве.** Высев из серийных разведений на агаризованную среду LB показал, что используемая в эксперименте почва содержала  $2 \times 10^6$  КОЕ (колониеобразующих единиц) микроорганизмов, культивируемых на данной среде. Общая численность аэробных бактерий к 21 дню эксперимента во всех вариантах повысилась и достигла  $10^7$ – $10^8$  КОЕ/г почвы (рис. 1). До начала эксперимента методом прямого посева в почве не было выявлено клеток

аборигенных штаммов, способных к использованию нафталина, салицилата, ДОФ, ДТ и нефти в качестве единственного источника углерода и энергии. По-видимому, их численность составляла менее  $10^2$  КОЕ/г почвы, т.е. менее предельной величины детектирования бактерий стандартными микробиологическими методами [15]. В ответ на загрязнение в вариантах I, II, III и IV численность *Nah*<sup>+</sup> штаммов возросла уже на третьи сутки более чем на два порядка и достигала  $10^3$  КОЕ/г почвы (рис. 1). На 21 сут численность деструкторов нафталина в вариантах II и IV поддерживалась на том же уровне, в варианте III увеличилась до  $10^4$  КОЕ/г почвы, а в варианте I – до  $10^5$  КОЕ/г почвы. Численность деструкторов ДТ, ДОФ и нефти в течение эксперимента также возросла во всех вариантах, однако выше  $6 \times 10^3$  КОЕ/г почвы к 21 сут не поднималась.

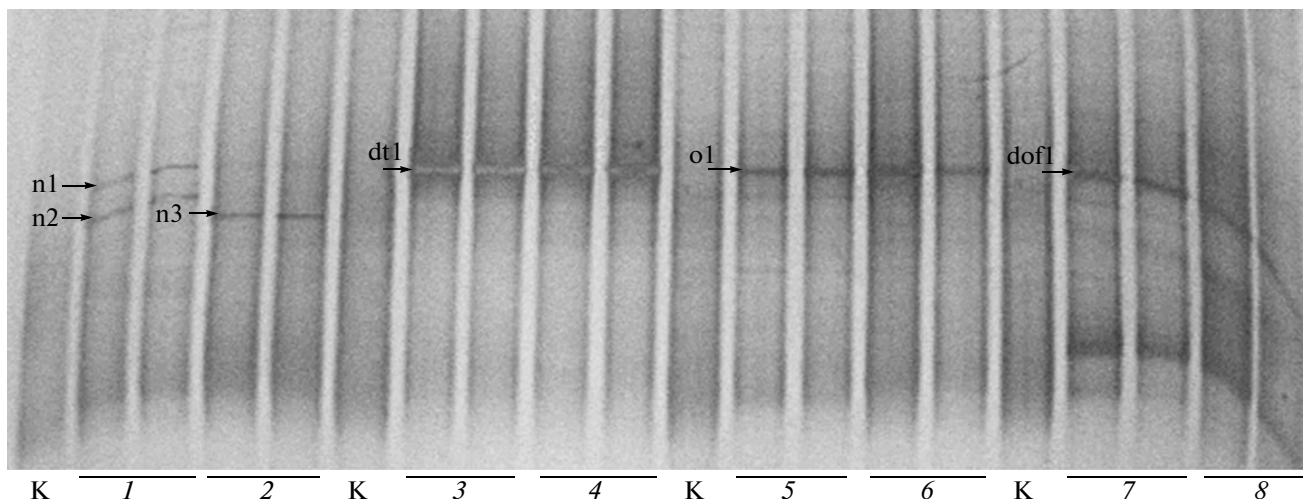
**Изменение состава почвенного бактериального сообщества в течение эксперимента.** ДГГЭ-анализ показал, что в незагрязненной почве бактериальное сообщество характеризовалось большим видовым разнообразием и отсутствием ярко выраженных доминантных групп (рис. 2). Мажорные полосы на ДГГЭ-профиле представляют собой 16S рДНК бактерий, доминирующих в популяции в момент отбора проб. Секвенирование



**Рис. 1.** Диаграмма общей численности: а – аэробных бактерий во всех вариантах МПС за 21 день эксперимента; б – аэробных бактерий-деструкторов нафталина во всех вариантах МПС за 21 день эксперимента. 1 – почва + нафталин; 2 – почва + ДТ; 3 – почва + нефть; 4 – почва + ДОФ.

ДНК, выделенной из мажорных полос dt1, o1, dof1 (рис. 2), выявило, что в образцах почв, загрязненных нефтью, дизельным топливом и диоктилфталатом, уже с третьего дня и до завершения эксперимента доминировали бактерии рода *Pseudomonas* (сходство последовательности амплифицированного фрагмента 16S рДНК составляло 98% с 16S рДНК штамма *Pseudomonas* sp. CL1.82). В МПС, загрязненных нафталином, на третий день в популяции доминировали два рода бактерий – *Pseudomonas* (полоса n1, сходство 98% с последовательностью 16S рДНК штамма *Pseudomonas* sp. CL1.82) и *Paenibacillus* (полоса n2, сходство 99% с последовательностью 16S рДНК штамма *Paenibacillus* sp. La1), однако к 21-м суткам эксперимента картина кардинально менялась, и доминирующим являлся род *Arthrobacter* (полоса n3, сходство последовательности амплифицированного фрагмента 16S рДНК составляло 93% с последовательностью 16S рДНК штамма *Arthrobacter* sp. S6).

**Выделенные штаммы и их плазмиды.** Из варианта МПС I на третьи сутки эксперимента методом прямого высева из почвы были выделены 5 различных штаммов бактерий (NZ3.1, NZ3.2, NO1, NO2 и NO3). Штаммы NZ3.1, NZ3.2, NO2 были способны к росту на жидких и агаризованных средах с нафталином и салицилатом. Штаммы NO1 и NO3 росли как на агаризованных средах с нафталином и салицилатом, так и на чистой агаризованной минеральной среде, т.е. потребляли агар в качестве источника углерода и энергии, а ароматические углеводороды для них токсичны не были. В жидких же средах с нафталином и салицилатом данные штаммы роста не показали. Также было выявлено, что штаммы пенибацилл NO1 и NO3 вырабатывают экзополисахариды в концентрациях 1 и 5 г/л соответственно. Видовую принадлежность штаммов определяли на основании ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) продуктов амплификации гена 16S рРНК с использованием ферментов *RsaI* и *MspI* (*HpaII*). В качестве контрольных видов использовали:



**Рис. 2.** ДГГЭ продуктов амплификации генов 16S рНК из препаратов суммарной ДНК почвы. К – почва (0 день); 1 – почва + нафталин (3 день); 2 – почва + нафталин (21 день); 3 – почва + ДТ (3 день); 4 – почва + ДТ (21 день); 5 – почва + нефть (3 день); 6 – почва + нефть (21 день); 7 – почва + ДОФ (3 день); 8 – почва + ДОФ (21 день).

*Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. aeruginosa* и *P. aureofaciens*. Было показано, что все штаммы-деструкторы нафталина относятся к виду *P. fluorescens*. Рестрикционные профили штаммов NO1 и NO3 отличались от профилей псевдомонад, однако показали сходство между собой. Для определения видовой принадлежности данных штаммов были секвенированы ПЦР-фрагменты их 16S рДНК размером 838 п.н. (частичная последовательность гена 16S рНК штамма NO1 была депонирована в GenBank под номером JF438971). Сиквенс ПЦР-продуктов был на 99% идентичен соответствующей области гена 16S рНК *Paenibacillus* sp. La1, в результате чего штаммы были отнесены к роду *Paenibacillus*. Вох-ПЦР показала, что все выделенные штаммы отличны друг от друга.

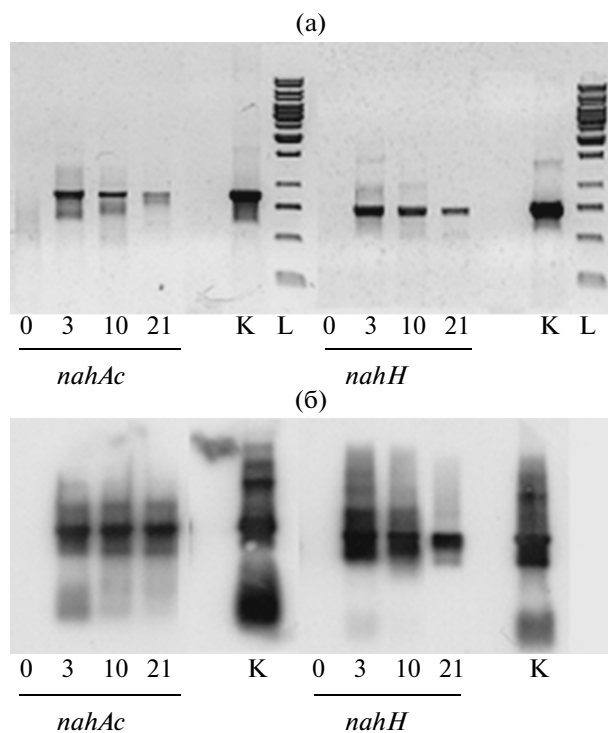
Из штаммов *P. fluorescens* NO2, NZ3.1 и NZ3.2 были выделены плазмиды группы несовместимости R-9. Для определения различий между исследуемыми плазмидами проводили RFLP-анализ (restriction fragment length polymorphism) с использованием эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*. Результаты анализа показали, что рNO2 и рNZ3.2 идентичны, но отличаются по рестрикционным профилям от плазмиды рNZ3.1. Путем конъюгации плазмиды были перенесены в штамм *P. putida* KT2442, который имеет дефектную систему рестрикции чужеродной ДНК и встроенный в хромосому ген *gfp* (зеленого флюоресцирующего белка), что позволяет легко отличать его колонии от колоний других бактерий на твердых средах [16]. Полученные трансконъюганты обладали способностью к росту на минеральных средах с нафталином. Для анализа ключевых генов биodeградации нафталина у исследуемых плазмид были выбраны гены *nahAc*, *nahG*, *nahH* и *nahR*, кодирующие

большую субъединицу нафталин-1,2-диоксигеназы, салицилат-1-гидроксилазу, катехол-2,3-диоксигеназу и регуляторный белок, соответственно. Результаты ПЦР с использованием плазмид, выделенных из трансконъюгантов, в качестве матриц продемонстрировали, что рNO2, рNZ3.1 и рNZ3.2 содержат все ключевые гены утилизации нафталина.

**Содержание генов *nahAc* и *nahH* в загрязненной почве.** Суммарную ДНК из почвенных образцов анализировали на наличие ключевых генов катаболизма нафталина – *nahAc*, кодирующего большую субъединицу нафталин-1,2-диоксигеназы, и *nahH*, кодирующего катехол-2,3-диоксигеназу и имеющего, как правило, плазмидную локализацию. Использовали метод ПЦР со специфичными к данным генам праймерами и, в дальнейшем, гибридизацию с соответствующими зондами. Отбор проб осуществляли на 0, 3, 10 и 21 сут. Результаты ПЦР и гибридизации представлены на рис. 3. До внесения нафталина в почву ни в одном из экспериментальных вариантов ключевые гены биodeградации нафталина не были обнаружены, но уже через три дня после внесения загрязнителя в варианте I детектировалось значительное количество генов *nahAc* и *nahH*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

ДГГЭ-анализ 16S рДНК, амплифицированной из тотальной почвенной ДНК, выявил изменение состава почвенных бактериальных популяций под воздействием используемых в работе соединений. Высевы из почвенных проб в контрольных точках показали, что присутствие загрязнителей (нафталина, нефти, дизельного топлива и диоктилфталата) приводило к возрастанию об-



**Рис. 3.** Электрофореграмма амплификации генов *nahAc* и *nahH* (а) из препаратов суммарной почвенной ДНК, отобранной на 0, 3, 10 и 21 сут эксперимента из МПС I (почва + нафталин). б – ДНК-ДНК-гибридизация продуктов амплификации с DIG-мечеными пробами *nahAc* и *nahH*. К – рNF142.

шей численности бактерий, в том числе, и за счет увеличения популяции бактерий-деструкторов. Подобные результаты получил Дель Панно и соавт. [17] при работе с почвой, загрязненной нефтешламами, где всплеск роста общей численности бактерий и численности бактерий-деструкторов приходился на период до 40-го дня эксперимента. В нашем эксперименте на фоне увеличения численности популяции мы обнаружили снижение видового разнообразия (рис. 2), что соотносится с результатами других немногочисленных исследований, посвященных изучению динамики бактериальных сообществ загрязненных почв [18, 19]. Однако существуют и иные данные, как, например, в работе Ферис и соавт. [20], где при загрязнении речной воды такими компонентами нефти, как ВТЕХ (смесь бензола, толуола, этилбензола и ксилолов) и МТВЕ (метил-терп-бутил-эфир), бактериальное разнообразие в иле не снижалось, но менялась видовая структура микробных сообществ.

В вариантах МПС II, III и IV, начиная с третьего дня эксперимента, в популяции преобладали гаммапротеобактерии (*Pseudomonas* sp.). В варианте I на третьи сутки доминировали бактерии рода *Pseudomonas* и грамположительные бактерии рода *Paenibacillus*. Действительно, из почвы на

третьи сутки эксперимента методом прямого посева были выделены три штамма-деструктора нафталина *P. fluorescens* и два штамма *Paenibacillus* sp. Известно, что многие пенибациллы способны вырабатывать фитогормоны [22], антибиотики [23, 24] и деградировать ароматические углеводороды [25], однако выделенные нами штаммы *Paenibacillus* sp. не утилизировали нафталин, но прекрасно выживали в условиях загрязнения и были способны к росту на агаре как единственном источнике углерода и энергии. К 21-му дню эксперимента произошли кардинальные изменения в составе сообщества: доминирующим таксоном являлся уже актинобактериальный род *Arthrobacter*, который, однако, к тому моменту еще не полностью заместил в популяции протеобактерий, на что указывает присутствие соответствующих им слабых полос на дорожках №2 ДГГЭ-профиля (рис. 2).

В ответ на загрязнение нафталином в почве увеличивалось количество утилизирующих нафталин бактерий. Одновременно увеличивалось и содержание ключевых генов катаболизма нафталина, в частности, генов *nahAc* и *nahH* (рис. 3). Все *nah*-подобные гены (*nah*, *ndo*, *pah*, *dox*) представляют собой консервативную группу и встречаются в штаммах флуоресцирующих псевдомонад [26]. В незагрязненной почве ген *nahAc*, как правило, не детектируется [26, 27]. В работе Парк и Кроули было показано, что через 6 дней после загрязнения почвы нафталином число копий гена *nahAc* увеличивалось с  $5 \times 10^3$  на грамм почвы до  $10^7$  копий [27]. В почвах, загрязненных нефтепродуктами, содержание *nahAc* коррелировало с потенциалом микробных сообществ к деградации нафталина. В данной работе мы также наблюдали увеличение концентрации гена большой субъединицы нафталин-1,2-диоксигеназы, типичного для бактерий рода *Pseudomonas* (рис. 3). Одновременно с содержанием гена *nahAc* происходило увеличение концентрации гена *nahH*, детерминирующего синтез катехол-2,3-диоксигеназы – первого фермента *мета*-пути расщепления катехола (рис. 3). Данный факт является косвенным свидетельством того, что концентрация обоих катаболических генов увеличивалась в почве за счет плазмидосодержащих штаммов, поскольку гены *мета*-пути, как правило, локализуются на плазидах биодеградации, тогда как гены “верхнего” оперона пути утилизации нафталина, включая *nahAc*, могут быть как плазмидными, так и хромосомными [28]. Гены *nahAc* и *nahH* детектировались и на 21 сутки, когда в почве доминировали бактерии рода *Arthrobacter*, которые содержат гены катаболизма ароматических углеводов, негомологичные псевдомонадным. Такой результат связан с тем, что к концу эксперимента в почвенном сообществе актинобактерии еще не полностью заместили бактерии *Pseudomonas* sp. (дорожки № 2 на рис. 2).

Из МПС I были выделены 3 различных штамма псевдомонад, в которых обнаружены плазмиды группы несовместимости P-9, несущие все необходимые для утилизации нафталина гены (*nahAc*, *nahG*, *nahH* и *nahR*), причем две плазмиды из трех оказались идентичны. Факт обнаружения одной и той же плазмиды в двух разных штаммах свидетельствует о том, что в почвенном бактериальном сообществе происходят процессы горизонтального переноса плазмид. Поэтому нельзя исключать возможность передачи генов биодegradации от этих псевдомонад другим видам бактерий сообщества в составе конъюгативных плазмид и транспозонов, которыми, как правило, и контролируется катаболизм ксенобиотиков, в частности, нафталина. Таким образом, увеличение концентрации катаболических генов в почве, загрязненной нафталином, может происходить за счет как большей конкурентоспособности плазмидосодержащих штаммов, так и горизонтального переноса плазмид в подходящие реципиенты.

Известны также и другие гены, контролирующие синтез изофункциональных ферментов, однако неродственные *nah*-подобным генам. Среди них гены *nag* (*Ralstonia* sp.), *nar* (*Rhodococcus* sp.), *phd* (*Comamonas testosteroni*) и *phn* (*Burkholderia* sp.) [26]. Праймеры, использованные в настоящей работе, не позволяют обнаружить гены, неродственные *nah*-генам флуоресцирующих псевдомонад, в том числе, изофункциональные гены бетапротеобактерий и актиномицетов, а также гены анаэробной деградации ароматических углеводов [29]. Поэтому не исключено присутствие в исследованной нами почве других микроорганизмов-деструкторов нафталина, содержащих гены нафталин-1,2-диоксигеназы, негомологичные гену *nahAc*.

В заключение следует отметить, что ДГГЭ-анализ генов 16S рРНК в сочетании с ПЦР-анализом тотальной ДНК почвы на наличие основных генов биодegradации ароматических углеводов позволил установить, что бактериальные сообщества в местах загрязнения менее разнообразны, и их состав и степень разнообразия зависят от вида загрязнителя и от длительности его воздействия. Проведенное нами исследование микробных сообществ загрязненных экосистем выявило тенденцию к доминированию микроорганизмов, способных к утилизации токсических загрязнителей (*Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp.) или, как минимум, к выживанию в их присутствии (*Paenibacillus* sp.). Интересно, что пенициллы, выделенные в нашем эксперименте, продуцировали существенное количество экзополисахаридов — природных носителей, способных повышать выживаемость как самих пенициллов, так и сосуществующих с ними псевдомонад в условиях загрязнения токсичными веществами [30].

Очевидно, что последствия загрязнения тем или иным поллютантом зависят не только от вида

и количества загрязнителя, но и от типа почвы и ее исходного метаболического потенциала, т.е. от тех микроорганизмов, которые присутствовали в данной почве до загрязнения и содержали гены биодegradации. В эксперименте мы наблюдали увеличение общей численности почвенных микроорганизмов после внесения загрязнителя, что происходило, в том числе, и за счет бактерий, неспособных к его деградации. Это позволяет говорить о возможной стимуляции ксенобиотиком использования бактериями почвенного органического вещества, как ранее было показано в нашей лаборатории [31].

Что касается динамики бактериальных сообществ, то на основании полученных нами данных, и принимая во внимание работы [32–34], можно предположить, что при загрязнении среды (вода, почва, ил и др.) нефтью, дизельным топливом, ВТЕХ, бензином, диоктилфталатом чаще всего доминируют протеобактерии, а в местах, где основным поллютантом является нафталин, в большинстве случаев, с течением времени в популяции начинают преобладать актинобактерии, постепенно замещая протеобактерий. При этом, в утилизации нафталина существенную роль могут играть плазмиды, содержащие гены утилизации этого соединения.

Работа выполнена в рамках проекта Министерства образования и науки РФ РНП 2.1.1/10938 и при поддержке гранта МНТЦ 4033.

Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском центре коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН (<http://www.genome-centre.narod.ru>), организованном при поддержке РФФИ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Muyzer G., De Waal E. C., Uitterlinden A. G.* Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 695–700.
2. *Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
3. *Evans W.C., Fernley H.N., Griffiths E.* Oxidative metabolism of phenantrene and anthracene by soil pseudomonads: the ring-fission mechanism // *J. Biochem.* 1965. V. 95. P. 819–831.
4. *Dunn N.W., Gunsalus I.C.* Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida* // *J. Bacteriol.* 1973. V. 114. P. 974–979.
5. *Егоров Н.С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учебное пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
6. *Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser S., Roskot N., Heuer H., Berg G.* Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrich-

- ment and seasonal shifts revealed // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 4742–4751.
7. Weisburg W.G., Barnes S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // *J. Bacteriol.* 1991. V. 73. P. 697–703.
  8. Dombek P.E., Johnson L.K., Zimmerley S.T., Sadowsky M.J. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 2572–2577.
  9. Greated A., Thomas C.M. A pair of PCR primers for IncP-9 plasmids // *Microbiology (UK)*. 1999. V. 145. P. 3003–3004.
  10. Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat J., Garcia-Valdes E., Rosselo-Mora R., Bosch R. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. P. 957–962.
  11. Izmalkova T.Yu., Mavrodi D.V., Sokolov S.L., Kosheleva I.A., Smalla K., Thomas C.M., Boronin A.M. Molecular classification of IncP-9 naphthalene degradation plasmids // *Plasmid*. 2006. V. 56. P. 1–10.
  12. Wilkstrom P., Wiklund A., Anderson A.C., Forsman M. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types // *J. Biotechnol.* 1996. V. 52. P. 107–120.
  13. Cremonesi L., Firpo S., Ferrari M., Righetti P.G., Gelfi C. Double-gradient DGGE for optimized detection of DNA point mutations // *Biotechniques*. 1997. V. 22. P. 326–330.
  14. Heuer H., Wieland G., Schonfeld J., Schonwalder S., Gomes N.C.M., Smalla K. Bacterial community profiling using DGGE or TGGE analysis // *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* / Eds. Rouchelle P. UK, Wymondham: Horizon Scientific Press, 2001. P. 177–190.
  15. Molina L., Ramos C., Duque E., Ronchel M.C., Garcia J.M., Wyke L., Ramos J.L. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions // *Soil Biology & Biochemistry*. 2000. V. 32. P. 315–321.
  16. Regenhardt D., Heuer H., Heim S., Fernandez D.U., Strömpl C., Moore E.R.B., Timmis K.N. Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440 // *Environ. Microbiol.* 2002. № 4. P. 912–915.
  17. Del Panno M.T., Morelli I.S., Engelen B., Berthel-Corti L. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 53. P. 305–316.
  18. Nyman J.A. Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils // *Microbiol. Ecol.* 1999. V. 37. P. 152–162.
  19. Castle D.M., Montgomery M.T., Kirchman D.L. Effects of naphthalene on microbial community composition in the Delaware estuary // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2006. V. 56. P. 55–63.
  20. Feris K.P., Hristova K., Gebreyesus B., Mackay D., Scow K.M. A shallow BTEX and MTBE contaminated aquifer supports a diverse microbial community // *FEMS Microb. Ecol.* 2004. V. 48. P. 589–600.
  22. Lebuhn M., Heulin T., Hartmann A. Production of auxin and other indolic and phenolic compounds by *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from different proximity to plant roots // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1997. V. 22. P. 325–334.
  23. Rosado A.S., Seldin L. Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa* // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1993. № 9. P. 521–528.
  24. Reynaldi F.J., De Giusti M.R., Alippi A.M. Inhibition of the growth of *Ascosphaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey // *Rev. Argent. Microbiol.* 2004. V. 36. P. 52–55.
  25. Daane L.L., Harjono I., Barns S.M., Launen L.A., Palleroni N.J., Haggblom M.M. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 2002. V. 52. P. 131–139.
  26. Tuomi P.M., Salminen J.M., Jorgensen K.S. The abundance of *nahAc* genes correlates with the <sup>14</sup>C-naphthalene mineralization potential in petroleum hydrocarbon-contaminated oxic soil layers // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004. V. 51. P. 99–107.
  27. Park J.-W., Crowley D.E. Dynamic changes in *nahAc* gene copy number during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. P. 1322–1329.
  28. Zylstra G.J., Kim E., Gloyal A.K. Comparative molecular analysis of genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation // *Gen. Engineering*. 1997. V. 19. P. 257–269.
  29. Beller H.R., Kane S., Legler T.C., Alvarez P.J.J. A real-time polymerase chain reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene // *Environ. Sci. Technol.* 2002. V. 36. P. 3977–3984.
  30. Kozzyrovska N.O., Negrutskaya V.V., Kovalchuk M.V., Voznyuk T.N. *Paenibacillus* sp., as a promising candidate for development of a novel technology of inoculant production // *Biopolymers and Cell*. 2005. V. 21. P. 312–318.
  31. Зякун А.М., Боронин А.М., Кочетков В.В., Баскунов Б.П., Лауринавичюс К.С., Захарченко В.Н., Пешенко В.П., Анохина Т.О., Сиунова Т.В. Отношение [<sup>13</sup>C]/[<sup>12</sup>C], как показатель для экспресс-оценки углеводородоокисляющего потенциала микробиоты в почве, загрязненной сырой нефтью // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2012. Т. 48. № 2. С. 232–242.
  32. Greene E.A., Kay J.G., Jaber K., Stehmeier L.G., Voordouw G. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 5282–5289
  33. Hendrickx B., Dejonghe W., Boenne W., Brennerova M., Cernik M., Lederer T., Bucheli-Witschel M., Bastiaens L., Verstraete W., Top E.M., Diels L., Springael D. Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes: an *in situ* mesocosm study // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. P. 3815–3825.
  34. Gomes N.C.M., Kosheleva I.A., Wolf-Rainer A., Smalla K. Effect of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005. V. 54. P. 21–33.