

УДК 632.911.2

doi: 10.26907/2542-064X.2019.2.255-274

## ОЦЕНКА ДИНАМИКИ КОЛИЧЕСТВА ГЕНОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ДЕГРАДАЦИЮ НЕФТЕПРОДУКТОВ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЕ

*Л.Р. Бикташева, А.А. Савельев, П.А. Курынцева,  
С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия*

### Аннотация

Проведено лабораторное моделирование нефтяного загрязнения трех уровней (60, 120 и 250 г/кг) трех типов почв – дерново-подзолистые, серые лесные и чернозем типичный. Установлено, что в течение 120 сут содержание масляных фракций (смеси алифатических и ароматических углеводородов) снижалось в образцах с низким и средним уровнями загрязнения на 10–27% и 2–24% соответственно. Выявлено, что нефтяное загрязнение во всех концентрациях привело к снижению общей численности бактерий по сравнению с незагрязненной почвой в 1.2–5.5 раз. Показано, что количество генов, кодирующих алкан-монооксигеназу (alkI), и генов грамположительных бактерий, кодирующих ферменты деградации ПАУ (GP-PAH), коррелировало с общей численностью бактерий и уменьшалось в случае загрязнения нефтью всех типов почв. Напротив, количество генов, кодирующих алкан-монооксигеназы (alkII и alkIII), а также генов грамотрицательных бактерий, кодирующих ферменты деградации ПАУ (GN-PAH), было выше во всех почвах, загрязненных нефтью, по сравнению с незагрязненными. Статистическая обработка полученных результатов позволила установить, что уровень загрязнения почвы нефтепродуктами является значимым фактором для динамики количества генов групп alkI, alkII, GN-PAH, GP-PAH, а длительность эксперимента – для генов групп alkI, alkIII, GN-PAH, GP-PAH. Тип почв является значимым фактором для динамики числа бактерий и генов групп alkIII и GP-PAH, для остальных групп генов тип почвы не оказывает влияния.

**Ключевые слова:** нефтезагрязненные почвы, биodeградация, алкан-монооксигеназы, диоксигеназы

### Введение

Загрязнение почв является серьезной проблемой для естественных экосистем. Нефтяное загрязнение несет за собой множество негативных эффектов, таких как ухудшение агрохимических характеристик почв, токсическое действие компонентов нефти на организмы и прочие [1, 2].

В естественных условиях за деградацию нефтепродуктов отвечают микроорганизмы, в первую очередь бактерии [3]. Бактериальные организмы имеют множество механизмов, позволяющих им трансформировать углеводороды с помощью внутриклеточных ферментов, образование которых контролируется специфическими генами [4]. Многие исследователи отмечают, что оценка количества

генов, кодирующих катаболические ферменты, ответственные за трансформацию углеводов, позволяет анализировать разнообразие популяций, имеющих потенциал к биодegradации [1, 5–10].

Нефтяные отходы или сырая нефть, загрязняющие почву, как правило, представляют собой сложную смесь из углеводов различного строения. Наиболее полно утилизировать компоненты нефти может микробный консорциум, разные представители которого способны трансформировать различные группы углеводов [11]. Например, представители рода *Alcanivorax* способны деградировать короткоцепочечные и среднецепочечные *n*-алканы, представители рода *Rhodococcus* – трансформировать *n*-алканы, а также бензол, толуол, ксилол и бифенил, представители рода *Pseudomonas* известны способностью деградировать нафталин, фенантрен, пирен и другие полиароматические углеводороды (ПАУ), а представители рода *Alcaligenes* отличаются способностью разлагать антрацен и фенол [12–19].

За деградацию углеводов отвечают целые группы ферментных комплексов. Одним из ключевых ферментов, участвующих в деградации алканов и играющих важную роль в биоремедиации сырой нефти, является алкан-гидроксилаза [20]. Гены, отвечающие за синтез алкан-гидроксилазы, принято классификационно разделять на три группы на основании способности к трансформации алканов определенной длины (с короткой, средней и длинной цепью) [21].

Разложение ароматических соединений (бензола, толуола, этилбензола, ксилола) начинается с прямого окисления ароматического кольца с помощью монооксигеназ или диоксигеназ либо с окисления боковой алкильной цепи, которое катализируется монооксигеназой [22–25]. Расщепление самого кольца происходит при участии катехол 2,3-диоксигеназы [26]. Первый этап деградации нафталина и других низкомолекулярных ПАУ (с двумя-тремя кольцами) осуществляется нафталиндиоксигеназой [27, 28]. К генам, кодирующим способность разлагать ПАУ, относятся *cat-2,3*, *narAa*, *phdA/pdoA2*, *nidA/pdoA1*, *nidA3/fadA1*, *nah*, *nahAc*, *nahA3*, *nagAc*, *ndoB*, *ndoC2*, *pahAc*, *pahA3*, *phnAc*, *phnA1*, *bphAc*, *bphA1*, *dntAc* и *arhA1*.

Активность микроорганизмов при биодegradации нефти во многом определяется составом сообщества и физико-химическими характеристиками почвы и уровнем ее загрязнения [29]. В первую очередь на способность микробного сообщества потреблять углеводороды влияет уровень загрязнения почв. Известно, что их низкая концентрация может стимулировать сообщество, а высокая – ингибировать его. С точки зрения степени воздействия нефти на микробное сообщество, к низкому уровню загрязнения относятся концентрации ниже 10%. Считается, что при таком загрязнении численность и активность микробного сообщества возрастают, тогда как средние и высокие концентрации (более 10%) влияют на сообщество негативно [30, 31]. Согласно известным данным [32, 33], на микробное сообщество, а значит, и на деградацию нефтепродуктов влияют и свойства самой почвы, такие как гранулометрический состав, содержание органических веществ, кислотность и другие характеристики. Эффективность биодegradации нефтепродуктов зависит и от того, насколько изменяется биодоступность углеводов в зависимости от свойств почв [34, 35]. Однако взаимосвязь между факторами окружающей среды и распределением катаболических генов в почвах до сих пор остается неясной.

Цель настоящей работы – оценить взаимосвязи между количеством генов, отвечающих за деструкцию углеводов, и уровнем нефтяного загрязнения, а также длительностью процесса воздействия и типом почв.

## 1. Материалы и методы

**1.1. Схема эксперимента.** Лабораторный эксперимент проводили, используя три типа почв: дерново-подзолистые (ДП) и серые лесные (СЛ) почвы, а также чернозем типичный (ЧТ). Пробы искусственно загрязнялись нефтью до концентрации 60, 120 и 250 г/кг (образцы с низкой концентрацией нефти – НК, средней – СК и высокой – ВК). Образцы нефти были отобраны на Марийском нефтеперерабатывающем заводе (Республика Марий Эл, Россия). В качестве контрольных образцов использовали незагрязненные почвы всех типов. Эксперимент проходил при комнатной температуре и ежедневном перемешивании в течение 120 сут.

**1.2. Оценка содержания нефтепродуктов и их фракционного состава.** Общее содержание нефтепродуктов было оценено в начале и конце эксперимента. Экстракция нефтепродуктов из почв проводилась методом избирательной экстракции хлороформного битумоида типа А (ХБА) в два этапа (первый – холодная экстракция в аппарате Сокслета, второй – горячая экстракция в аппарате Сокслета) [36]. Дальнейшая количественная оценка была проведена гравиметрическим методом. Групповой анализ экстрактов, включающий выделение и определение количественного содержания фракций масел, смол и асфальтенов, проводили с помощью адсорбционно-хроматографического метода Маркуссона – Саханова [37]. В масляных фракциях методом ГЖХ (Кристалл 5000, Хроматэк, г. Йошкар-Ола, Россия) определялся индивидуальный состав алкановых углеводородов нормального и изопреноидного строения.

**1.3. Анализ количества генов методом qPCR.** Общая геномная ДНК была экстрагирована с помощью коммерческого набора FastDNA@SPIN Kit for Soil (Bio101, Qbiogene, Heidelberg, Германия). Образцы ДНК хранились при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Количество специфических генов было проанализировано с помощью количественной ПЦР (qPCR). qPCR-анализ проводили с использованием общебактериальных праймеров 341F/534R [38] и специфических праймеров, представленных в табл. 1. Реакционная смесь включала в себя 0.1 U/мкл полимеразы SynTaq, 1-кратный буфер с красителем SYBR Green, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , по 200 мкМ каждого dNTP, 0.2 мкМ каждого праймера и 1 мкл ДНК.

Аmplификация осуществлялась на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Германия) при следующем режиме: 15 мин при  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  и 39 циклов, включающих 30 с при  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 с при  $T_m$  и 30 с при  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Стандартная кривая для оценки общего числа бактерий была построена с использованием серийного разведения ДНК *Pseudomonas fluorescence*. Стандартная кривая для катаболических генов была построена на основе данных амплификации серии разведений ДНК позитивного клона, несущего искомым ген. Концентрация плазмидной ДНК была измерена с помощью Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Все анализы были выполнены в трех повторностях при эффективности 94% и значениях R2 больше 0.99.

Табл. 1

Праймеры, использованные в работе

Группа генов	Последовательность праймеров	$T_m$	Филогенетическая принадлежность	Ссылки
alk I	CATAATAAAGGGCATC ACCGT GATTCATTCTCGAAA CTCCAAAC	55 °C	<i>Ps. putida</i> ( <i>alkB</i> ), <i>Stenotrophomonas</i> spp. ( <i>alkB</i> )	[21]
alk II	GAGACAAATCGTCTAA AACGTAA TTGTTATTATTCCAAC ATGCTC	55 °C	<i>Acinetobacter</i> spp. ( <i>alkM</i> )	
alk III	TCGAGCACATCCGCGG CCACCA CCGTAGTGCTCGACGT AGTT	55 °C	<i>Ps. fluorescens</i> ( <i>alkB</i> ), <i>Ps. aeruginosa</i> ( <i>alkB1</i> ), <i>Rhodococcus</i> spp. ( <i>alkB1</i> ), <i>Burkholderia</i> spp. ( <i>alkB</i> ), <i>Amycolatopsis</i> spp. ( <i>alkB</i> )	
GP-PAH	CGGCGCCGACAAYTTY GTNGG GGGGAACACGGTGCCR TGDATRAA	56 °C	<i>narAa</i> , <i>phdA/pdoA2</i> , <i>nidA/pdoA1</i> , <i>nidA3/fadA1</i> ( <i>Rhodococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardioides</i> и <i>Terrabacter</i> )	[39]
GN-PAH	GAGATGCATACCACGT KGGTTGGA AGCTGTTGTTTCGGGAA GAYWGTGCMGTT	57 °C	<i>nahAc</i> , <i>nahA3</i> , <i>nagAc</i> , <i>ndoB</i> , <i>ndoC2</i> , <i>pahAc</i> , <i>pahA3</i> , <i>phnAc</i> , <i>phnA1</i> , <i>bphAc</i> , <i>bphA1</i> , <i>dntAc</i> и <i>arhA1</i> ( <i>Pseudomonas</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Commamonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Sphingomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Polaromonas</i> )	

**1.4 Статистическая обработка результатов.** Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. Полученные данные были обработаны с использованием программы Origin 8.5 (OriginLab, США). Дополнительная обработка данных и моделирование проводились в статистической системе R [40].

Был проведен корреляционный анализ взаимосвязей между основными результирующими характеристиками (конечным содержанием алканов, динамикой количества бактерий и катаболических генов) и исходными параметрами образцов (начальными концентрациями нефти, типом почв и днем эксперимента). Для этого была построена модель, оценивающая влияние начальной концентрации нефти, типа почв и длительности эксперимента:

$$\ln(Y_{ijk}) = \alpha_0 + \beta_i + \mu_k + \alpha_1 \cdot \text{oil.fact}_j + \varepsilon_{ijk},$$

где  $Y_{ijk}$  – значение характеристики для  $i$ -го дня наблюдения,  $j$ -й концентрации нефти, и  $k$ -го типа почвы;  $\alpha_0$  – значение логарифма  $Y_{ijk}$  для нулевого дня, нулевой концентрации и почвы ДП, которые являются базой сравнения;  $\beta_i$  – изменение логарифма  $Y_{ijk}$  для  $i$ -го дня наблюдения по сравнению с базой сравнения;  $\text{oil.fact}_j$  – значение  $j$ -й фактической начальной доли нефти,  $\alpha_1$  – коэффициент

для вычисления изменения логарифма  $Y_{ijk}$  за счет доли нефти по сравнению с базой;  $\mu_k$  – изменение логарифма  $Y_{ijk}$  для  $k$ -го типа почвы по сравнению с базой сравнения;  $\varepsilon_{ijk}$  – случайная ошибка (на логарифмической шкале).

Для оценки корреляции содержания алканов на 120-й день от исходных параметров (начальные концентрации нефти и тип почв) была построена модель, аналогичная описанной, однако вместо значения  $Y$  было использовано значение его логарифма.

## 2. Результаты и их обсуждения

**2.1. Оценка общего содержания нефтепродуктов и их фракционного состава.** На первом этапе работ была оценена эффективность утилизации нефтяного загрязнения микробными сообществами трех типов почв (дерново-подзолистая, серая лесная и чернозем типичный) в течение 120 сут. Начальное содержание нефтепродуктов в образцах НК составило 49–53 г/кг, в образцах СК – 85–118 г/кг и в образцах ВК – 182–203 г/кг (табл. 2). При оценке количественного содержания масел (смеси алифатических и ароматических углеводородов), смол и асфальтенов установлено, что сразу после загрязнения в почве преобладали смолы – 35–50%, содержание масел составило 35–49%, наименьшая доля приходилась на асфальтены – 12–17%. Различия в составе фракций нефти для разных типов почв не обнаружены.

Табл. 2

Содержание нефтепродуктов и их фракций в почвах различных типов при их искусственном загрязнении

Образцы	Сутки	Содержание углеводов, г/кг	Групповой состав, %			
			Алифатические и ароматические углеводороды	Смолы	Асфальтены	
НК	ДП	0	50 ± 6	40 ± 4	48 ± 5	12 ± 1
		120	48 ± 5	36 ± 4	46 ± 5	18 ± 2
	СЛ	0	53 ± 6	47 ± 5	40 ± 4	13 ± 1
		120	49 ± 5	34 ± 4	51 ± 6	15 ± 2
	ЧТ	0	49 ± 5	46 ± 5	40 ± 4	14 ± 2
		120	47 ± 5	39 ± 4	50 ± 6	12 ± 1
СК	ДП	0	99 ± 11	49 ± 5	35 ± 4	16 ± 2
		120	95 ± 10	37 ± 4	49 ± 5	14 ± 2
	СЛ	0	112 ± 12	43 ± 5	40 ± 4	17 ± 2
		120	101 ± 11	41 ± 5	42 ± 5	17 ± 2
	ЧТ	0	85 ± 9	43 ± 5	43 ± 5	13 ± 1
		120	85 ± 9	42 ± 5	47 ± 5	11 ± 1
ВК	ДП	0	202 ± 22	44 ± 5	45 ± 5	12 ± 1
		120	198 ± 22	44 ± 5	54 ± 6	17 ± 2
	СЛ	0	203 ± 22	44 ± 5	44 ± 5	13 ± 1
		120	201 ± 22	44 ± 5	44 ± 5	13 ± 1
	ЧТ	0	191 ± 21	35 ± 4	50 ± 6	15 ± 2
		120	189 ± 21	35 ± 4	49 ± 5	12 ± 1

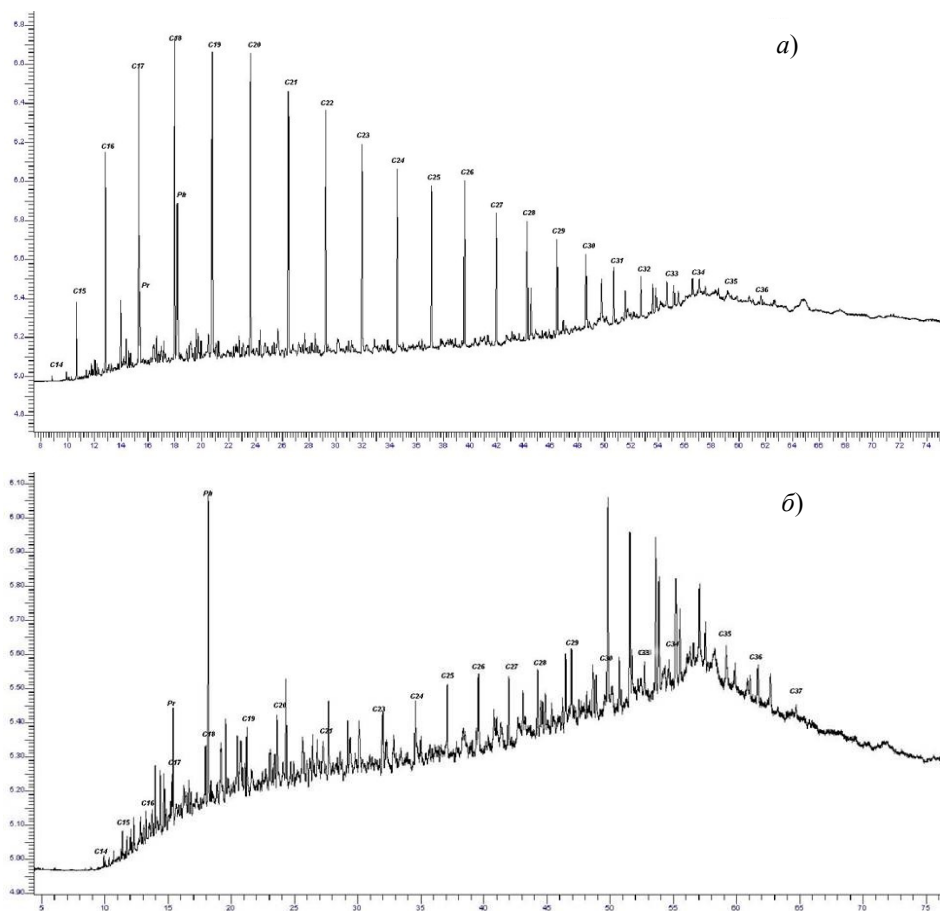


Рис. 1. Хроматограммы масляной фракции образца СЛ с концентрацией нефти 120 г/кг на 0-е (а) и на 120-е (б) сутки после загрязнения

В течение 120 сут эксперимента суммарное содержание углеводородов в почве изменилось незначительно – для образцов НК и СК оно снизилось на 4–10% относительно исходного, а для образцов ВК было сопоставимым с исходным содержанием. При этом содержание ароматических и алифатических углеводородов снизилось, а смол и асфальтенов, соответственно, увеличилось. Так, для образцов НК наблюдалось снижение содержания фракции масел на 10–27% с максимальным снижением в образце СЛ. Образцы СК характеризовались снижением масел на 2–24%, с максимальным снижением для образца ДП.

Для подтверждения деградации короткоцепочечных углеводородов нами был проведен анализ содержания насыщенных алканов непосредственно после загрязнения, а также через 120 сут эксперимента. Анализ проведен на примере образца СЛ с начальной концентрацией нефти 120 г/кг (рис. 1).

Видно, что сразу после загрязнения масляная фракция образца СЛ12 была представлена *n*-алканами с гомологами от C<sub>14</sub> до C<sub>40</sub> с максимумом распределения в среднемoleкулярной области C<sub>17</sub>–C<sub>21</sub>. Однако к концу эксперимента максимум в распределении *n*-алканов сдвинулся в высокомолекулярную область. Это может говорить о том, что низкомолекулярные углеводороды линейного

строения с  $C_{14}$  до  $C_{30}$  подверглись биодegradации. Другие авторы также отмечают, что микробной биодegradации в первую очередь подвергаются обычно нормальные алканы  $C_{10}$ – $C_{20}$  [41–43].

Следует отметить, что снижения содержания алифатических и ароматических соединений для образцов ВК не наблюдалось, в отличие от образцов с меньшим уровнем загрязнения. Это можно объяснить тем, что низкие концентрации нефтепродуктов в почве стимулировали активность углеводородоксилирующей группы микроорганизмов почвы, тогда как высокие ингибировали ее [44, 45].

**2.2. Оценка общей численности бактерий и количества генов, кодирующих ферменты дegradации углеводов.** Загрязнение нефтью может как снижать, так и увеличивать численность бактерий в почве, а также изменять активность микробных сообществ [46–49]. Для этого была проведена оценка общей численности бактерий (на основании числа копий генов 16S рРНК) и числа катаболических генов методом qPCR. Результаты оценки численности бактерий представлены на рис. 2.

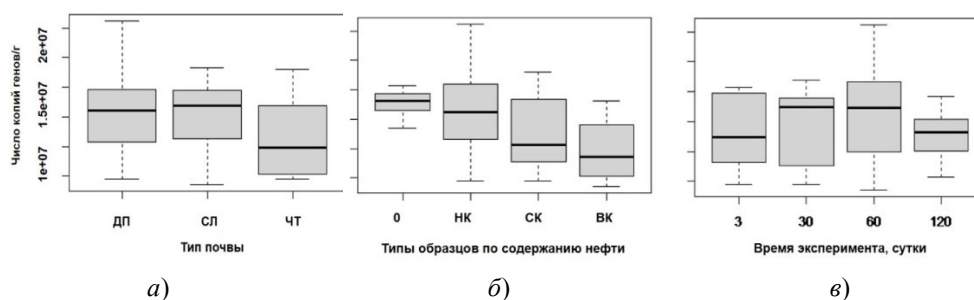


Рис. 2 Численность бактерий в почвах различных типов (а) с разными уровнями загрязнения (б) на 0-е, 30-е, 60-е и 120-е сутки эксперимента (в). На вертикальной оси представлены значения количества копий генов, середина прямоугольника представляет собой среднее значение, прямоугольник – крайнее стандартное отклонение

Начальная численность бактерий в незагрязненных почвенных образцах находилась в пределах  $1.3 \cdot 10^7$  (образец ЧТ) –  $1.4 \cdot 10^7$  (образец ДП) копий генов/г. С повышением степени загрязнения почв численность бактерий снижалась в среднем в 1.2–5.5 раз, а разброс значений увеличивался. Согласно результатам оценки численности для разных типов почв можно отметить некоторое снижение численности бактерий в образцах чернозема типичного. Оценка численности бактерий в зависимости от времени эксперимента показывает некоторое увеличение численности на 30–60-е сутки, и дальнейшее снижение к 120-м суткам.

На следующем этапе была проведена оценка числа генов, кодирующих синтез алкан-монооксигеназ. Содержание катаболических генов было рассчитано в процентах по отношению к количеству копий генов 16S рРНК. Относительное количество генов группы *alkI* в незагрязненных почвах находилось на уровне – 0.00–0.01%, в нефтезагрязненных почвах – в диапазоне 0.00–0.06%, причем в более загрязненных почвах таких генов было меньше. Процентное содержание генов группы *alkII* в незагрязненных почвах было на уровне 0.00–0.02%, в нефтезагрязненных – 0.04–9.85%. Относительное содержание генов

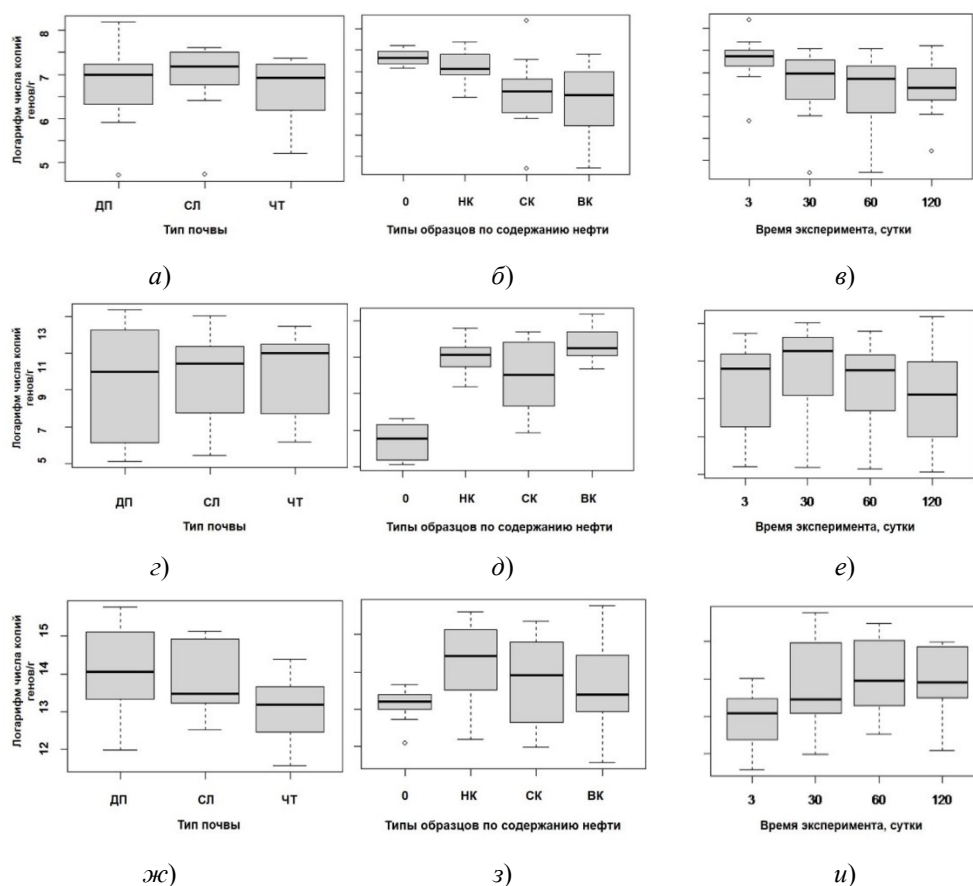


Рис. 3. Количество генов, кодирующих алкан-монооксигеназы (*а, б, в* – группа *alkI*, *г, д, е* – группа *alkII*, *ж, з, и* – группа *alkIII*) в почвах различных типов с разными уровнями загрязнения на 0-е, 30-е, 60-е и 120-е сутки эксперимента. На вертикальной оси представлены значения количества копий генов, середина прямоугольника представляет собой среднее значение, прямоугольник – крайнее стандартное отклонение, а точки – экстремальные значения или выбросы

группы *alkIII* в незагрязненной почве установлено на уровне 0.75–4.23%, в загрязненной – 1.50–26.50%. На рис. 3 представлены данные о разбросе значений и зависимости содержания катаболических генов от типа почвы, уровня загрязненности нефтепродуктами и длительности эксперимента.

Максимальное количество генов группы *alkI* было характерно для незагрязненных почв. Для данной группы генов отмечена следующая закономерность – с появлением нефти и повышением ее концентрации количество генов уменьшается. Ранее несколько исследователей также отмечали отрицательную корреляцию количества генов, кодирующих алкан-монооксигеназы, с концентрацией нефти в почве [50, 51]. Для генов групп *alkII* и *alkIII* наблюдается обратная зависимость: при увеличении концентрации нефти в образцах их количество увеличивалось. Так, на 3-е сутки после загрязнения количество генов группы *alkII* увеличилось во всех образцах в 2–435 раз в среднем, максимальные значения были отмечены на 30-е сутки. Количество генов группы *alkIII*



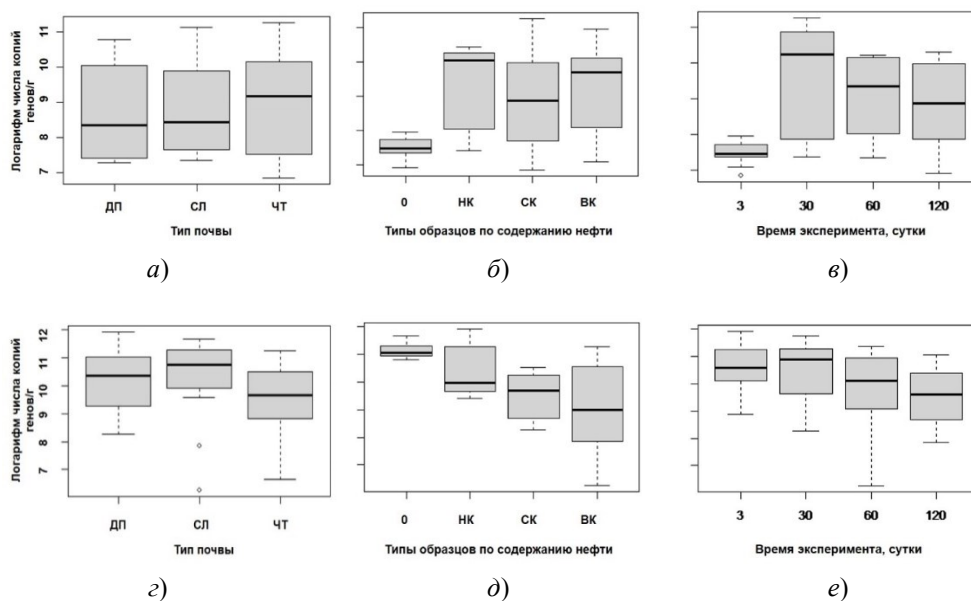


Рис. 4. Количество генов, кодирующих деградацию ПАУ: *a, б, в* – гены группы GN-PAH (грамотрицательные бактерии), *з, д, е* – гены группы GP-PAH (грамположительные бактерии) в почвах различных типов с разными уровнями загрязнения на 0-е, 30-е, 60-е и 120-е сутки эксперимента. Условные обозначения – как на рис. 3

в нефтезагрязненных образцах также было выше, чем в незагрязненных, максимальные значения при этом отмечены для образцов НК. В отличие от генов группы *alkII*, количество генов группы *alkIII* не изменилось сразу после загрязнения почвы нефтью, однако через 30 сут оно превышало таковое в незагрязненной почве в 1.5–3 раз; максимальное же количество генов *alkIII* группы отмечено на 60-е сутки. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными, показывающими повышение числа катаболических генов в загрязненных почвах по сравнению с незагрязненными [6, 52–54]. Можно также отметить, что для генов групп *alkI* и *alkII* не обнаружено различий в их количестве в зависимости от типа почв, тогда как для генов группы *alkIII* можно отметить превышение количества генов в образцах дерново-подзолистых почв по сравнению с остальными типами почв.

Кроме того, нами была проведена оценка способности микробного сообщества к утилизации тяжелых фракций нефти, включающих полиароматические соединения. Результаты оценки количества генов, кодирующих способность микроорганизмов утилизировать ПАУ, представлены на рис. 4.

Количество генов группы GN-PAH, кодирующих способность деградировать ПАУ у грамотрицательных бактерий, составило 0.01–0.03% от общего числа бактерий в незагрязненных почвах и 0.02–2.78% в загрязненных. Для генов группы GP-PAH (грамположительные бактерии) эти количества составили 0.49–1.08% и 0.03–1.36% соответственно.

Загрязнение вызвало различную динамику численности носителей генов, кодирующих деградацию ПАУ, у грамотрицательных и грамположительных

Табл. 3

Анализ направления и величины влияния факторов (содержание нефти, тип почв, день эксперимента), и их статистической значимости для степени деградации алканов, количества бактерий и катаболических генов, проводился с использованием линейных регрессионных моделей. Величины изменения даны по сравнению с контролем

Фактор		Содержание алканов на 120-е сутки	Количество копий генов/г					GP-PAH
			бактерии	alkI	alkII	alkIII	GN-PAH	
Содержание нефти		0.403*	-0.038*	-0.055*	0.223*	0.009	0.071*	-0.113*
Тип почв	ЧТ	0.390	-0.395*	-0.128	0.612	-1.085*	0.209	-0.647*
	СЛ	0.788	0.006	0.269	0.127	-0.287	0.025	0.183
День эксперимента	30	N/A	0.066	-0.542*	1.031	0.934*	2.130*	-0.190
	60		0.177	-0.709*	0.304	1.103*	1.633*	-0.964*
	120		0.058	-0.625*	-0.509	1.069*	1.418*	-1.114*

\* Значимые переменные, при  $Pt(> t) < 0.05$ .

N/A – не оценивали.

бактерий. Так, наименьшее количество генов GN-PAH было обнаружено в незагрязненной почве, загрязнение же привело к значительному увеличению их количества вне зависимости от концентрации нефтепродуктов. Интересно, что непосредственно после загрязнения количество генов группы GN-PAH существенно не изменилось, однако к 30-м суткам достигло своего максимума в большинстве образцов кроме ДП с концентрацией 120 г/кг и ЧТ с концентрацией 250 г/кг. В образцах, относящихся к чернозему типичному, обнаружено превышение количества генов данной группы над образцами других типов почв. Для группы GP-PAH отмечена обратная корреляция между их количеством и уровнем загрязнения почвы нефтепродуктами, так, максимальные значения характерны для незагрязненных почв, тогда как на 3-е сутки после загрязнения их количество снижается в 2–11 раз. Количество генов указанной группы постепенно снижалось в течение эксперимента. Минимальное количество генов этой группы отмечено для образцов, относящихся к чернозему типичному. Различия в динамике количеств катаболических генов, кодирующих синтез диоксигеназ, в грамотрицательных и грамположительных бактериях можно объяснить разными скоростями роста микроорганизмов этих групп. В работах [39, 55] отмечено, что в почвах с недавним загрязнением доминируют представители грамотрицательных бактерий, являющихся *r*-стратегами, тогда как представители грамположительных бактерий являются *K*-стратегами, потребляющими более устойчивые углеводороды в почвах со старым загрязнением.

На заключительном этапе работы была проведена статистическая обработка полученных результатов с использованием моделей, оценивающих значимость факторов, влияющих на степень деградации алканов, численность бактерий, а также на количество генов, кодирующих деградацию углеводородов (табл. 3). Для количества бактерий и катаболических генов для моделирования использовался логарифм зависимой переменной, для степени деградации алканов – значение зависимой переменной.

Согласно анализу полученных данных выявлено, что суммарное содержание нефти является значимым фактором для содержания алканов, тогда как тип почв не является.

Для численности бактерий значимыми факторами являются содержание нефти и тип почв, не является длительность эксперимента. При этом установлена отрицательная корреляция между численностью бактерий и содержанием нефти. Для типа почв чернозем типичный также установлена отрицательная корреляция по сравнению с численностью в дерново-подзолистых почвах. Можно отметить, что различия в численности бактерий для серой лесной и дерново-подзолистой почвы незначимы.

Установлено, что для большинства групп генов содержание нефти является значимым фактором. Так, для генов групп *alkI* и GP-PAH выявлена отрицательная корреляция в зависимости от уровня загрязнения, а для групп *alkII*, GN-PAH – положительная. Для генов группы *alkIII* значимость этого фактора не установлена. Установлено, что тип почв является значимым фактором для генов групп *alkIII* и GP-PAH, при этом минимальное количество генов данных групп отмечено для образцов, относящихся к чернозему типичному. Для генов групп *alkI*, *alkII* и GN-PAH тип почвы не является значимым фактором. Выявлено, что длительность эксперимента является значимым фактором по отношению к большинству исследованных генов (*alkI*, *alkIII*, GN-PAH, GP-PAH), при этом для генов групп *alkI* и GP-PAH выявлена отрицательная корреляция количества генов и дней эксперимента, а для генов *alkIII* и GN-PAH – положительная. Для генов группы *alkII* значимость длительности эксперимента не установлена.

Таким образом, полученные уровни значимости подтверждают описанные ранее результаты. Для большинства генов значимыми факторами оказались содержание нефти в почве (группы генов *alkI*, *alkII*, GN-PAH, GP-PAH), а также длительность эксперимента (группы генов *alkI*, *alkIII*, GN-PAH, GP-PAH). Подтверждается также отрицательная корреляция для общей численности бактерий и количества генов групп *alkI* и GP-PAH и положительная для остальных генов в зависимости от уровня загрязнения и длительности эксперимента. Значимое влияние типа почв установлено для количества бактерий и генов групп *alkIII* и GP-PAH, при этом минимальное количество генов отмечено для образцов чернозема типичного. На количество остальных генов тип почвы не оказывает влияние.

### Заключение

В целом можно заключить, что общая численность бактериальных организмов в нефтезагрязненных почвах ниже по сравнению с незагрязненной почвой. Количество генов групп *alkI* и GP-PAH уменьшается при повышении степени загрязнения почвы нефтепродуктами и при увеличении длительности воздействия нефтяного загрязнения.

Для генов, увеличивающихся в количестве при нефтяном загрязнении, максимальные значения характерны для образцов с низким (группы *alkIII* и GN-PAH) или высоким (группа *alkII*) содержанием нефти. Максимальное количество генов групп *alkII*, GN-PAH и GP-PAH отмечено на 30-е сутки, генов алкан-монооксигеназ группы *alkIII* – на 60-е сутки после нефтяного загрязнения.

Взаимосвязи между количеством генов, отвечающих за деструкцию углеводородов, и типом почв не выявлено.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-7420183).

#### Литература

1. *Liang Y., Zhang X., Wang J., Li G.* Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China // *J. Hazard. Mater.* – 2012. – V. 241–242. – P. 371–378. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.09.055.
2. *Zhang D.C., Mörtelmaier C., Margesin R.* Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil // *Sci. Total Environ.* – 2012. – V. 421–422. – P. 184–196. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.01.043.
3. *Cappello S., Caruso G., Zampino D., Monticelli L.S., Maimone G., Denaro R., Tripodo B., Troussellier M., Yakimov M., Giuliano L.* Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: A microscale simulation study // *J. Appl. Microbiol.* – 2007. – V. 102, No 1. – P. 184–194. – doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03071.x.
4. *Batista S.B., Mounteer A.H., Amorim F.R., Totola M.R.* Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites // *Bioresour. Technol.* – 2006. – V. 97, No 6. – P. 868–875. – doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.020.
5. *Watanabe K., Hamamura N.* Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – V. 14, No 3. – P. 289–295. – doi: 10.1016/s0958-1669(03)00059-4.
6. *Margesin R., Labbé D., Schinner F., Greer C. W., Whyte L.G.* Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, No 6. – P. 3085–3092. – doi: 10.1128/aem.69.6.3085-3092.2003.
7. *Vitte I., Duran R., Hernandez-Raquet G., Mounier J., Jézéquel R., Bellet V., Balaguer P., Caumette P., Cravo-Laureau C.* Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – V. 97, No 9. – P. 4199–4211. – doi: 10.1007/s00253-012-4219-5.
8. *Sun W., Sun X., Cupples A.M.* Presence, diversity and enumeration of functional genes (*bssA* and *bamA*) relating to toluene degradation across a range of redox conditions and inoculum sources // *Biodegradation.* – 2014. – V. 25, No 2. – P. 189–203. – doi: 10.1007/s10532-013-9651-4.
9. *Sun W., Sun X., Cupples A.M.* Identification of *Desulfosporosinus* as toluene-assimilating microorganisms from a methanogenic consortium // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2014. – V. 88. – P. 13–19. – doi: 10.1016/j.ibiod.2013.11.014.
10. *Biktasheva L., Selivanovskaya S., Danilova N., Galitskaya P.* Presence and expression of genes encoding hydrocarbon decomposition ability of microbes in different soil types sampled in Tatarstan republic (Russia) // *18th Int. Multidiscip. Sci. GeoConf. SGEM 2018.* – 2018. – Book 18. – P. 149–154.
11. *Fuentes S., Méndez V., Aguila P., Seeger M.* Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – V. 98, No 11. – P. 4781–4794. – doi: 10.1007/s00253-014-5684-9.

12. Liu Q., Tang J., Bai Z., Hecker M., Giesy J.P. Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China // Sci. Rep. – 2015. – V. 5. – Art. 11068, P. 1–12. – doi: 10.1038/srep11068.
13. Wang W., Shao Z. Genes involved in alkane degradation in the *alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3 // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 94, No 2. – P. 437–448. – doi: 10.1007/s00253-011-3818-x.
14. Nie Y., Liang J.L., Fang H., Tang Y.Q., Wu X.L. Characterization of a CYP153 alkane hydroxylase gene in a Gram-positive *Dietzia* sp. DQ12-45-1b and its “team role” with *alkW1* in alkane degradation // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – V. 98, No 1. – P. 163–173. – doi: 10.1007/s00253-013-4821-1.
15. Tánicsics A., Szoboszlai S., Kriszt B., Kukolya J., Baka E., Márialigeti K., Révész S. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species // J. Appl. Microbiol. – 2008. – V. 105, No 4. – P. 1026–1033. – doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03832.x.
16. Kiyohara H., Nagao K., Kouno K., Yano K. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2 // Appl. Environ. Microbiol. – 1982. – V. 43, No 2. – P. 458–461.
17. Wald J., Hroudova M., Jansa J., Vrchotova B., Macek T., Uhlik O. Pseudomonads rule degradation of polyaromatic hydrocarbons in aerated sediment // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – Art. 1268, P. 1–13. – doi: 10.3389/fmicb.2015.01268.
18. Guo G., Tian F., Ding K., Wang L., Liu T., Yang F. Effect of a bacterial consortium on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and bacterial community composition in Chinese soils // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2017. – V. 123. – P. 56–62. – doi: 10.1016/j.ibiod.2017.04.022.
19. Rehfuess M., Urban J. *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor // Syst. Appl. Microbiol. – 2005. – V. 28, No 5. – P. 421–429. – doi: 10.1016/j.syapm.2005.03.003.
20. Van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment // Oil Gas Sci. Technol. – 2006. – V. 58, No 4. – P. 427–440. – doi: 10.2516/ogst:2003026.
21. Kohno T., Sugimoto, Y., Sei K., Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria // Microbes Environ. – 2002. – V. 17, No 3. – P. 114–121.
22. Kahng H.Y., Malinverni J.C., Majko M.M., Kukor J.J. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. Strain JS150 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – V. 67, No 10. – P. 4805–4816. – doi: 10.1128/AEM.67.10.4805-4816.2001.
23. Zylstra G.J., Gibson D.T. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 1989. – V. 264, No 25. – P. 14940–14946.
24. Furukawa K., Hirose J., Suyama A., Zainki T., Hayashida S. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon) // J. Bacteriol. – 1993. – V. 175, No 16. – P. 5224–5232. – doi: 10.1128/jb.175.16.5224-5232.1993.
25. Burlage R.S., Hooper S.W., Sayler G.S. The TOL (pWW0) catabolic plasmid // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – V. 55, No 6. – P. 1323–1328.
26. Harayama S., Rekik M. Comparison of the nucleotide sequences of the meta-cleavage pathway genes of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* with other meta-cleavage genes suggests that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution // MGG Mol. Gen. Genet. – 1993. – V. 239, No 1–2. – P. 81–89. – doi: 10.1007/bf00281605.

27. Kurkela S., Lehtväslaiho H., Palva E.T., Teeri T.H. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816 // *Gene*. – 1988. – V. 73, No 2. – P. 355–362. – doi: 10.1016/0378-1119(88)90500-8.
28. Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat J., García-Valdés E., Rosselló-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, No 2. – P. 957–962. – doi: 10.1128/aem.68.2.957-962.2002.
29. Afzal M., Yousaf S., Reichenauer T.G., Kuffner M., Sessitsch A. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel // *J. Hazard. Mater.* – 2011. – V. 186, No 2–3. – P. 1568–1575. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.
30. Куреева Н.А., Бакаева М.Д., Тарасенко Е.М. Комплексное биотестирование для оценки загрязнения почв нефтью // *Экология и промышленность России*. – 2004. – № 2. – С. 26–29.
31. Dominguez-Rosado E., Pichtel J., Coughlin M. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: I. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies // *Environ. Eng. Sci.* – 2004. – V. 21, No 2. – P. 157–168. – doi: 10.1089/109287504773087336.
32. Schmidt N., Bolter M. Fungal and bacterial biomass in tundra soils along an arctic transect from Taimyr Peninsula, central Siberia // *Polar Biol.* – 2002. – V. 25, No 12. – P. 871–877. – doi: 10.1007/s00300-002-0422-7.
33. Li X., Lin X., Li P., Liu W., Wang L., Ma F., Chukwuka K.S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation // *J. Hazard. Mater.* – 2009. – V. 172, No 2–3. – P. 601–605. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.044.
34. Colloff M.J., Wakelin S.A., Gomez D., Rogers S.L. Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management // *Soil Biol. Biochem.* – 2008. – V. 40, No 7. – P. 1637–1645. – doi: 10.1016/j.soilbio.2008.01.019.
35. Anderson T.H., Domsch K.H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach // *Soil Biol. Biochem.* – 2010. – V. 42, No 12. – P. 2039–2043. – doi: 10.1016/j.soilbio.2010.06.026.
36. Успенский В.А. Руководство по анализу битумов и рассеянного органического вещества горных пород. – Л.: Недра, 1966. – 316 с.
37. Хуснутдинов И.Ш., Бухаров С.В., Гончарова И.Н. Определение содержания смолисто-асфальтовых веществ: Метод. указания.– Казань: Казан. гос. технол. ун-т, 2006. – 43 с.
38. 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, No 3. – P. 695–700.
39. Cébron A., Norini M.P., Beguiristain T., Leyval C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples // *J. Microbiol. Methods*. – 2008. – V. 73, No 2. – P. 148–159. – doi: 10.1016/j.mimet.2008.01.009.
40. R Core Team. R Development Core Team // *R A Lang. Environ. Stat. Comput.* – 2013. – V. 55. – P. 275–286.
41. Jia J., Zong S., Hu L., Shi S., Zhai X., Wang B., Li G., Zhang D. The dynamic change of microbial communities in crude oil-contaminated soils from oil fields in China // *Soil Sediment Contam.* – 2017. – V. 26, No 2. – P. 171–183. – doi: 10.1080/15320383.2017.1264923.

42. *Fukuhara Y., Horii S., Matsuno T., Matsumiya Y., Mukai M., Kubo M.* Distribution of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2013. – V. 170, No 2. – P. 329–339. – doi: 10.1007/s12010-013-0170-x.
43. *Рогозина Е.А., Моргунов П.А., Тимергазина И.Ф., Шапиро А.И.* Биопрепараты серии Нафтокс для очистки почвы от нефтяного загрязнения // *Нефтегазовая технология теория и практика.* – 2013. – Т. 8, № 2. – С. 1–14. – URL: [http://www.ngtp.ru/rub/7/16\\_2013.pdf](http://www.ngtp.ru/rub/7/16_2013.pdf).
44. *Соколов С.Н., Хадаев И.Р.* Влияние биопрепаратов на снижение остаточной концентрации углеводородов нефти в почве // *Международ. науч.-исследов. журн.* – 2017. – Вып. 6, Ч. 2. – С. 130–136.
45. *Kang H., Gao H., Yu W., Yi Y., Wang Y., Ning M.* Changes in soil microbial community structure and function after afforestation depend on species and age: Case study in a subtropical alluvial island // *Sci. Total Environ.* – 2018. – V. 625. – P. 1423–1432. – doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.180.
46. *Godbout J., Comeau Y., Greer C.* Soil characteristics effects on introduced bacterial survival and activity // *Bioaugmentation for Site Remediation.* – Columbus, OH, Battelle Press, 1995. – P. 115–120.
47. *Oudot J., Merlin F.X., Pinvidic P.* Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments // *Mar. Environ. Res.* – 1998. – V. 45, No 2. – P. 113–125. – doi: 10.1016/S0141-1136(97)00024-X.
48. *Morasch B., Annweiler, E., Warthmann, R.J., Meckenstock, R.U.* The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: Degradation of naphthalene, o-, and m-xylene by sulfate-reducing bacteria // *J. Microbiol. Methods.* – 2001. – V. 44, No 2. – P. 183–191. – doi: 10.1016/S0167-7012(00)00242-6.
49. *Galitskaya P., Biktasheva L., Selivanovskaya S.* Response of soil microorganisms to radioactive oil waste: Results from a leaching experiment // *Biogeosciences.* – 2015. – V. 12, No 12. – P. 3681–3693. – doi: 10.5194/bg-12-3681-2015.
50. *Pérez-de-Mora A., Engel M., Schloter M.* Abundance and diversity of *n*-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: A molecular study on *alkB* homologous genes // *Microb. Ecol.* – 2011. – V. 62, No 4. – P. 959–972. – doi: 10.1007/s00248-011-9858-z.
51. *Yang Y., Wang J., Liao J., Xie S., Huang Y.* Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – V. 99, No 4. – P. 1935–1946. – doi: 10.1007/s00253-014-6074-z.
52. *Zhang Z., Zhao X., Liang Y., Li G., Zhou J.* Microbial functional genes reveal selection of microbial community by PAHs in polluted soils // *Environ. Chem. Lett.* – 2013. – V. 11, No 1. – P. 11–17. – doi: 10.1007/s10311-012-0370-6.
53. *Bengtsson G., Törneman N., de Liphay J.R., Sørensen S.J.* Microbial diversity and PAH catabolic genes tracking spatial heterogeneity of PAH concentrations // *Microb. Ecol.* – 2013. – V. 65, No 1. – P. 91–100. – doi: 10.1007/s00248-012-0112-0.
54. *Ding G.C., Heuer H., Zühlke S., Spiteller M., Pronk G., Heister K., Kögel-Knabner I., Smalla K.* Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 76, No 14. – P. 4765–4771. – doi: 10.1128/AEM.00047-10.
55. *Leys N.M., Rynjaert A., Bastiaens L., Wattiau P., Top E.M., Verstraete W., Springael D.* Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils

contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 51, No 3. – P. 375–388. – doi: 10.1016/j.femsec.2004.09.015.

Поступила в редакцию  
12.03.19

---

**Бикташева Лилия Рамилевна**, младший научный сотрудник НИЛ «Биоконтроль» Института экологии и природопользования

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [biktasheval@mail.ru](mailto:biktasheval@mail.ru)

**Савельев Анатолий Александрович**, доктор биологических наук, профессор кафедры моделирования экологических систем

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [Anatoly.Saveliev.aka.saa@gmail.com](mailto:Anatoly.Saveliev.aka.saa@gmail.com)

**Курьнцева Полина Александровна**, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [polinazwerewa@yandex.ru](mailto:polinazwerewa@yandex.ru)

**Селивановская Светлана Юрьевна**, доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru](mailto:svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru)

**Галицкая Полина Юрьевна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет  
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия  
E-mail: [gpolina33@yandex.ru](mailto:gpolina33@yandex.ru)

---

ISSN 2542-064X (Print)  
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI  
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2019, vol. 161, no. 2, pp. 255–274

---

doi: 10.26907/2542-064X.2019.2.255-274

### Assessment of the Number of Catabolic Genes of Oil-Contaminated Soils

*L.R. Biktasheva*<sup>\*</sup>, *A.A. Saveliev*<sup>\*\*</sup>, *P.A. Kuryntseva*<sup>\*\*\*</sup>,  
*S.Y. Selivanovskaya*<sup>\*\*\*\*</sup>, *P.Y. Galitskaya*<sup>\*\*\*\*\*</sup>

*Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

E-mail: <sup>\*</sup>[biktasheval@mail.ru](mailto:biktasheval@mail.ru), <sup>\*\*</sup>[polinazwerewa@yandex.ru](mailto:polinazwerewa@yandex.ru), <sup>\*\*\*</sup>[Anatoly.Saveliev.aka.saa@gmail.com](mailto:Anatoly.Saveliev.aka.saa@gmail.com),  
<sup>\*\*\*\*</sup>[svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru](mailto:svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru), <sup>\*\*\*\*\*</sup>[gpolina33@yandex.ru](mailto:gpolina33@yandex.ru)

Received March 12, 2019

### Abstract

In this work, laboratory modeling of three levels of oil contamination (60, 120 and 250 g kg<sup>-1</sup>) was carried out for three types of soil: eutric podzoluvisols, haplic greyzem, and haplic chernozems. It was found that the content of fraction of aliphatic and aromatic hydrocarbons decreased in the samples with



low and medium levels of contamination within 120 days. Oil contamination of soil in all concentrations led to a decrease in the total number of bacteria in comparison with uncontaminated soil by 1.2–5.5 times. It was shown that the number of genes belonging to the alkI and GP-PAH groups was in line with the total number of bacteria and decreased after oil contamination. At the same time, the number of alkane-monooxygenase genes belonging to the alkII and alkIII groups, as well as the genes of the GN-PAH group, was higher in the oil-contaminated soils as compared to the uncontaminated ones. Statistical analysis of the results showed that the level of soil contamination is a significant factor for the dynamics of the number of genes belonging to the alkI, alkII, GN-PAH, GP-PAH groups, as well as the duration of the experiment for alkI, alkIII, GN-PAH, GP-PAH groups. Soil type is a significant factor for the dynamics of the number of bacteria and number of genes belonging to the alkIII and GP-PAH groups. For other groups of genes, the type of soil is not a significant factor.

**Keywords:** oil-contaminated soils, biodegradation, alkane monooxygenase, dioxygenase

**Acknowledgments.** The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-7420183).

### Figure Captions

- Fig. 1. GC profile of extracted saturates fraction from the SL sample with oil concentration of 120 g kg<sup>-1</sup> on the first (a) and 120th (b) day following the contamination.
- Fig. 2. Number of bacteria in the soils of different types (a) and with different levels of oil contamination (b) on days 0, 30, 60, and 120 of the experiment (c). The vertical axis represents the number of copies of the genes, the middle of the rectangle represents the mean value, and the rectangle represents the extreme standard deviation.
- Fig. 3. Number of genes encoding alkane monooxygenase (a, b, c – alkI group; d, e, f – alkII group; g, h, i – alkIII group) in the soils of different types and with different levels of contamination on days 0, 30, 60, and 120 of the experiment. The vertical axis represents the number of copies of the genes, the middle of the rectangle represents the mean value, the rectangle represents the extreme standard deviation, and the points represent the extremes or outliers.
- Fig. 4. Number of genes encoding PAH degradation: a, b, c – genes of the GN-PAH group (gram-negative bacteria); d, e, f – genes of the GP-PAH group (gram-positive bacteria) in soils of different types and with different levels of contamination on days 0, 30, 60, and 120 of the experiment. Designations as in Fig. 3.

### References

1. Liang Y., Zhang X., Wang J., Li G. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China. *J. Hazard. Mater.*, 2012, vols. 241–242, pp. 371–378. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.09.055.
2. Zhang D.C., Mörtelmaier C., Margesin R. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. *Sci. Total Environ.*, 2012, vols 421–422, pp. 184–196. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.01.043.
3. Cappello S., Caruso G., Zampino D., Monticelli L.S., Maimone G., Denaro R., Tripodo B., Troussellier M., Yakimov M., Giuliano L. Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: A microscale simulation study. *J. Appl. Microbiol.*, 2007, vol. 102, no. 1, pp. 184–194. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03071.x.
4. Batista S.B., Mounter A.H., Amorim F.R., Totola M.R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol.*, 2006, vol. 97, no. 6, pp. 868–875. doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.020.
5. Watanabe K., Hamamura N. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2003, vol. 14, no. 3, pp. 289–295. doi: 10.1016/s0958-1669(03)00059-4.
6. Margesin R., Labbé D., Schinner F., Greer C. W., Whyte L.G. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 6, pp. 3085–3092. doi: 10.1128/aem.69.6.3085-3092.2003.
7. Vitte I., Duran R., Hernandez-Raque G., Mounier J., Jézéquel R., Bellet V., Balaguer P., Caumette P., Cravo-Laureau C. Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and

- toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, vol. 97, no. 9, pp. 4199–4211. doi: 10.1007/s00253-012-4219-5.
8. Sun W., Sun X., Cupples A.M. Presence, diversity and enumeration of functional genes (bssA and bamA) relating to toluene degradation across a range of redox conditions and inoculum sources. *Biodegradation*, 2014, vol. 25, no. 2, pp. 189–203. doi: 10.1007/s10532-013-9651-4.
  9. Sun W., Sun X., Cupples A.M. Identification of *Desulfosporosinus* as toluene-assimilating microorganisms from a methanogenic consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2014, vol. 88, pp. 13–19. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.11.014.
  10. Biktasheva L., Selivanovskaya S., Danilova N., Galitskaya P. Presence and expression of genes encoding hydrocarbon decomposition ability of microbes in different soil types sampled in Tatarstan republic (Russia). *Proc. 18th Int. Multidiscip. Sci. GeoConf. SGEM 2018*, 2018, book 18, pp. 149–154.
  11. Fuentes S., Méndez V., Aguila P., Seeger M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: Catabolic genes, microbial communities, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 98, no. 11, pp. 4781–4794. doi: 10.1007/s00253-014-5684-9.
  12. Liu Q., Tang J., Bai Z., Hecker M., Giesy J.P. Distribution of petroleum degrading genes and factor analysis of petroleum contaminated soil from the Dagang Oilfield, China. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, art. 11068, pp. 1–12. doi: 10.1038/srep11068.
  13. Wang W., Shao Z. Genes involved in alkane degradation in the *alcanivorax hongdengensis* strain A-11-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, vol. 94, no. 2, pp. 437–448. doi: 10.1007/s00253-011-3818-x.
  14. Nie Y., Liang J.L., Fang H., Tang Y.Q., Wu X.L. Characterization of a CYP153 alkane hydroxylase gene in a Gram-positive *Dietzia* sp. DQ12-45-1b and its “team role” with *alkW1* in alkane degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 98, no. 1, pp. 163–173. doi: 10.1007/s00253-013-4821-1.
  15. Tánácsics A., Szoboszlai S., Kriszt B., Kukolya J., Baka E., Márialigeti K., Révész S. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. *J. Appl. Microbiol.*, 2008, vol. 105, no. 4, pp. 1026–1033. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03832.x.
  16. Kiyohara H., Nagao K., Kouno K., Yano K. Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, vol. 43, no. 2, pp. 458–461.
  17. Wald J., Hroudova M., Jansa J., Vrchotova B., Macek T., Uhlík O. Pseudomonads rule degradation of polyaromatic hydrocarbons in aerated sediment. *Front. Microbiol.*, 2015, vol. 6, art. 1268, pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2015.01268.
  18. Guo G., Tian F., Ding K., Wang L., Liu T., Yang F. Effect of a bacterial consortium on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and bacterial community composition in Chinese soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2017, vol. 123, pp. 56–62. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.04.022.
  19. Rehfuß M., Urban J. *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2005, vol. 28, no. 5, pp. 421–429. doi: 10.1016/j.syapm.2005.03.003.
  20. Van Beilen J.B., Li Z., Duetz W.A., Smits T.H.M., Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol.*, 2006, vol. 58, no. 4, pp. 427–440. doi: 10.2516/ogst:2003026.
  21. Kohno T., Sugimoto, Y., Sei K., Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. *Microbes Environ.*, 2002, vol. 17, no. 3, pp. 114–121. doi: 10.1264/jsme2.17.114.
  22. Kahng H.Y., Malinverni J.C., Majko M.M., Kukor J.J. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. Strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, no. 10, pp. 4805–4816. doi: 10.1128/AEM.67.10.4805-4816.2001.
  23. Zylstra G.J., Gibson D.T. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, no. 25, pp. 14940–14946.
  24. Furukawa K., Hirose J., Suyama A., Zainki T., Hayashida S. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (*bph* operon) and toluene (*tod* operon). *J. Bacteriol.*, 1993, vol. 175, no. 16, pp. 5224–5232. doi: 10.1128/jb.175.16.5224-5232.1993.
  25. Burlage R.S., Hooper S.W., Saylor G.S. The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, vol. 55, no. 6, pp. 1323–1328.

26. Harayama S., Reik M. Comparison of the nucleotide sequences of the meta-cleavage pathway genes of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* with other meta-cleavage genes suggests that both single and multiple nucleotide substitutions contribute to enzyme evolution. *MGG Mol. Gen. Genet.*, 1993, vol. 239, nos. 1–2, pp. 81–89. doi: 10.1007/bf00281605.
27. Kurkela S., Lehvälaiho H., Palva E.T., Teeri T.H. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene*, 1988, vol. 73, no. 2, pp. 355–362. doi: 10.1016/0378-1119(88)90500-8.
28. Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat J., García-Valdés E., Rosselló-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, vol. 68, no. 2, pp. 957–962. doi: 10.1128/aem.68.2.957-962.2002.
29. Afzal M., Yousaf S., Reichenauer T.G., Kuffner M., Sessitsch A. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel. *J. Hazard. Mater.*, 2011, vol. 186, nos. 2–3, pp. 1568–1575. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.
30. Kireeva N.A., Bakaeva M.D., Tarasenko E.M. Integrated biotesting for assessing soil contamination with oil. *Ekol. Prom. Ross.*, 2004, no. 2, pp. 26–29. (In Russian)
31. Dominguez-Rosado E., Pichtel J., Coughlin M. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: I. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies. *Environ. Eng. Sci.*, 2004, vol. 21, no. 2, pp. 157–168. doi: 10.1089/109287504773087336.
32. Schmidt N., Bolter M. Fungal and bacterial biomass in tundra soils along an arctic transect from Taimyr Peninsula, central Siberia. *Polar Biol.*, 2002, vol. 25, no. 12, pp. 871–877. doi: 10.1007/s00300-002-0422-7.
33. Li X., Lin X., Li P., Liu W., Wang L., Ma F., Chukwuka K. S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *J. Hazard. Mater.*, 2009, vol. 172, nos. 2–3, pp. 601–605. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.044.
34. Colloff M.J., Wakelin, S. A., Gomez, D., Rogers, S. L. Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, vol. 40, no. 7, pp. 1637–1645. doi: 10.1016/j.soilbio.2008.01.019.
35. Anderson T.H., Domsch K.H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. *Soil Biol. Biochem.*, 2010, vol. 42, no. 12, pp. 2039–2043. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.06.026.
36. Uspenskii V.A. *Rukovodstvo po analizu bitumov i rasseyannogo organicheskogo veshchestva gornykh porod* [Handbook on Analysis of Bitumens and Dispersed Organic Matter in Rocks]. Leningrad, Nedra, 1966. 315 p. (In Russian)
37. Khusnutdinov I.Sh., Bukharov S.V., Goncharova I.N. *Opreделение soderzhaniya smolisto-asfal'tovykh veshchestv: Metod. ukazaniya* [Determination of Tar-Asphalt Substances: Methodological Guidelines]. Kazan, Kazan. Gos. Tekhnol. Univ., 2006. 43 p. (In Russian)
38. 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, vol. 59, no. 3, pp. 695–700.
39. Cébron A., Norini M.P., Beguiristain T., Leyval C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods*, 2008, vol. 73, no. 2, pp. 148–159. doi: 10.1016/j.mimet.2008.01.009.
40. R Core Team. R Development Core Team. *R A Lang. Environ. Stat. Comput.*, 2013, vol. 55, pp. 275–286.
41. Jia J., Zong S., Hu L., Shi S., Zhai X., Wang B., Li G., Zhang D. The dynamic change of microbial communities in crude oil-contaminated soils from oil fields in China. *Soil Sediment Contam.*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 171–183. doi: 10.1080/15320383.2017.1264923.
42. Fukuhara Y., Horii S., Matsuno T., Matsumiya Y., Mukai M., Kubo M. Distribution of hydrocarbon-degrading bacteria in the soil environment and their contribution to bioremediation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, vol. 170, no. 2, pp. 329–339. doi: 10.1007/s12010-013-0170-x.
43. Rogozina E.A., Morgunov P.A., Timergazina I.F., Shapiro A.I. Biopreparations of the Naftox series for cleaning the soil from oil pollution. *Neftegazov. Tekhnol. Teor. Prakt.*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. 1–14. Available at: [http://www.ngtp.ru/rub/7/16\\_2013.pdf](http://www.ngtp.ru/rub/7/16_2013.pdf). (In Russian)

44. Sokolov S.N., Khadaev I.R. The influence of biological products to reduce the residual concentration of oil hydrocarbons in the soil. *Mezhdunar. Nauchn.-Issled. Zh.*, 2017, no. 6, pt. 2, pp. 130–136. (In Russian)
45. Kang H., Gao H., Yu W., Yi Y., Wang Y., Ning M. Changes in soil microbial community structure and function after afforestation depend on species and age: Case study in a subtropical alluvial island. *Sci. Total Environ.*, 2018, vol. 625, pp. 1423–1432. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.180.
46. Godbout J., Comeau Y., Greer C. Soil characteristics effects on introduced bacterial survival and activity. In: *Bioaugmentation for Site Remediation*. Columbus, OH, Battelle Press, 1995, pp. 115–120. (In Russian)
47. Oudot J., Merlin F.X., Pinvidic P. Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. *Mar. Environ. Res.*, 1998, vol. 45, no. 2, pp. 113–125. doi: 10.1016/S0141-1136(97)00024-X.
48. Morasch B., Annweiler, E., Warthmann, R.J., Meckenstock, R.U. The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: Degradation of naphthalene, o-, and m-xylene by sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 2001, vol. 44, no. 2, pp. 183–191. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00242-6.
49. Galitskaya P., Biktasheva L., Selivanovskaya S. Response of soil microorganisms to radioactive oil waste: Results from a leaching experiment. *Biogeosciences*. 2015, vol. 12, no. 12, pp. 3681–3693. doi: 10.5194/bg-12-3681-2015.
50. Pérez-de-Mora A., Engel M., Schloter M. Abundance and diversity of *n*-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: A molecular study on *alkB* homologous genes. *Microb. Ecol.*, 2011, vol. 62, no. 4, pp. 959–972. doi: 10.1007/s00248-011-9858-z.
51. Yang Y., Wang J., Liao J., Xie S., Huang Y. Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 99, no. 4, pp. 1935–1946. doi: 10.1007/s00253-014-6074-z.
52. Zhang Z., Zhao X., Liang Y., Li G., Zhou J. Microbial functional genes reveal selection of microbial community by PAHs in polluted soils. *Environ. Chem. Lett.*, 2013, vol. 11, no. 1, pp. 11–17. doi: 10.1007/s10311-012-0370-6.
53. Bengtsson G., Törneman N., de Liphthay J.R., Sørensen S.J. Microbial diversity and PAH catabolic genes tracking spatial heterogeneity of PAH concentrations. *Microb. Ecol.*, 2013, vol. 65, no. 1, pp. 91–100. doi: 10.1007/s00248-012-0112-0.
54. Ding G.C., Heuer H., Zühlke S., Spittler M., Pronk G., Heister K., Kögel-Knabner I., Smalla K. Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 76, no. 14, pp. 4765–4771. doi: 10.1128/AEM.00047-10.
55. Leys N.M., Ryngaert A., Bastiaens L., Wattiau P., Top E.M., Verstraete W., Springael D. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2005, vol. 51, no. 3, pp. 375–388. doi: 10.1016/j.femsec.2004.09.015.

**Для цитирования:** Бикташева Л.Р., Савельев А.А., Курынцева П.А., Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю. Оценка динамики количества генов, ответственных за деградацию нефтепродуктов в загрязненной почве // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 2. – С. 255–274. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.2.255-274.

**For citation:** Biktasheva L.R., Saveliev A.A., Kuryntseva P.A., Selivanovskaya S.Y., Galitskaya P.Y. Assessment of the number of catabolic genes of oil-contaminated soils. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 2, pp. 255–274. doi: 10.26907/2542-064X.2019.2.255-274. (In Russian)