

УДК 579.26

4.1.3. Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (биологические науки)

ВЛИЯНИЕ ПОЛЛЮТАНТОВ НА ОТНОСИТЕЛЬНУЮ ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ БИОДЕГРАДАЦИИ

Круглова Мария Николаевна
аспирант
РИНЦ SPIN-код: 5036-4620
mariya-kruglova-98@mail.ru

Самков Андрей Александрович
канд. биол. наук, доцент
РИНЦ SPIN-код: 5056-2186

Волченко Никита Николаевич
канд. биол. наук, доцент
РИНЦ SPIN-код: 4362-0193

Худокормов Александр Александрович
канд. биол. наук, заведующий кафедрой
РИНЦ SPIN-код: 1081-9535

Моисеева Елена Владимировна
Аспирант
РИНЦ SPIN-код: 6155-3411

Реут Елизавета Сергеевна
Магистр

Карасева Эмма Викторовна
канд. биол. наук, доцент
РИНЦ SPIN-код: 2318-6010
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Россия, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149

Проведена оценка относительной представленности бактериальных генов биodeградации в образцах донных отложений лимана Горький после внесения нефти, фенола, мета-ксилола и имидаклоприда в концентрациях 0,625 г/л, 0,5 г/л, 0,5 г/л, 0,05 г/л соответственно. Исследовали относительную представленность следующих бактериальных катаболических генов: нитрофенолмонооксигеназы (*npcB*) и атразинхлоргидролазы (*atzA*), которые относятся к маркерным генам биodeградации пестицидов, а также алканмонооксигеназы (*amoA*), нафталиндииоксигеназы (*nah*), фенолмонооксигеназы (*phe*), толуолдоксигеназы (*tod*), бифенилдоксигеназы (*bph*), которые являются маркерными генами биodeградации углеводородов. Алифатические и ароматические углеводороды – широко распространенные поллютанты, которые входят в состав как

UDC 579.26

4.1.3. Agrochemistry, agro-soil science, plant protection and quarantine (biological sciences)

EFFECT OF POLLUTANTS ON THE RELATIVE ABUNDANCE OF BACTERIAL BIODEGRADATION GENES

Kruglova Maria Nikolaevna
graduate student
RSCI SPIN-code: 5036-4620
mariya-kruglova-98@mail.ru

Samkov Andrey Aleksandrovich
Cand.Biol.Sci., Associate Professor
RSCI SPIN-code: 5056-2186

Volchenko Nikita Nikolaevich
Cand.Biol.Sci., Associate Professor
RSCI SPIN-code: 4362-0193

Khudokormov Aleksandr Aleksandrovich
Cand.Biol.Sci., Head of Department
RSCI SPIN-code: 1081-9535

Moiseeva Elena Vladimirovna
graduate student
RSCI SPIN-code: 6155-3411

Reut Elizaveta Sergeevna
Master

Karaseva Emma Viktorovna
Cand.Biol.Sci., Associate Professor
RSCI SPIN-code: 2318-6010
Kuban State University, Russia, 350040, Krasnodar, Stavropolskaya, 149

The relative abundance of bacterial biodegradation genes was assessed in bottom sediment samples from the Gorky liman after the addition of oil, phenol, meta-xylene, and imidacloprid at concentrations of 0,625 g/L, 0,5 g/L, 0,5 g/L, and 0,05 g/L, respectively. The relative abundance of the following bacterial catabolic genes was studied: nitrophenol monoxygenase (*npcB*) and atrazine chlorohydrolase (*atzA*), which are marker genes for pesticide biodegradation, as well as alkane monoxygenase (*amoA*), naphthalene dioxygenase (*nah*), phenol monoxygenase (*phe*), toluene dioxygenase (*tod*), biphenyl dioxygenase (*bph*), which are marker genes for the biodegradation of hydrocarbons. Aliphatic and aromatic hydrocarbons are widespread pollutants that are components of both petroleum products and landfill leachate. The introduction of pollutants affects the relative abundance of catabolic genes in different directions and to varying degrees.

нефтепродуктов, так и свалочного фильтрата. Было установлено, что внесение поллютантов разнонаправленно и в разной мере влияет на относительную представленность катаболических генов

Ключевые слова: БИОДЕГРАДАЦИЯ, МАРКЕРНЫЕ ГЕНЫ, УГЛЕВОДОРОДЫ, НЕФТЕПРОДУКТЫ, МАЗУТ ПЕСТИЦИДЫ, ПОЛЛЮТАНТЫ

Keywords: BIODEGRADATION, MARKER GENES, HYDROCARBONS, PETROLEUM PRODUCTS, MAZUT PESTICIDES, POLLUTANTS

<http://dx.doi.org/10.21515/1990-4665-207-039>

Введение. Загрязнение окружающей среды является одной из важнейших экологических проблем, которая, несмотря на защитные меры и многочисленные исследования в этой области, с годами не становится менее актуальной. Для оценки изменения состояния биосферы используются различные методы мониторинга. Одним из возможных способов осуществления экологического мониторинга может являться оценка маркерных генов биодegradации ключевых поллютантов и их интермедиатов в микробном сообществе [1, 2].

Бактерии способны деградировать широкий спектр ксенобиотиков, поскольку имеют разнообразные ферментные системы. Во время активного биоразложения загрязняющих веществ количество бактерий, способных использовать данные вещества в качестве источников углерода и энергии, увеличивается. Эти изменения микробиоценоза могут быть изучены путем количественной оценки соответствующих катаболических генов. В настоящее время обнаружены ключевые гены, ответственные за биодegradацию поллютантов, в том числе алифатических и полиароматических углеводородов, которые являются компонентами как нефтепродуктов, так и свалочного фильтрата, образующегося на полигонах твердых бытовых отходов [3].

Среди маркерных бактериальных генов биодegradации углеводородов можно выделить, алканмонооксигеназу (*amoA*), нафталиндиоксигеназу (*nah*), фенолмонооксигеназу (*phe*), толуолдиоксигеназу (*tod*),

<http://ej.kubagro.ru/2025/03/pdf/39.pdf>

бифенилдиоксигеназу (*bph*) и другие. К маркерным генам биodeградации пестицидов можно отнести *npcB*, кодирующий нитрофенолмонооксигеназу – фермент, катализирующий деградацию 4-нитрофенола, использующегося для производства пестицидов [4, 5, 6, 7, 8].

Материалы и методы. Объектом исследования являлись анаэробные микробиоценозы донных отложений лимана Горький Каневского района – зоны накопления поверхностных стоков района интенсивного земледелия. В образцы вносили нефть, фенол, мета-ксилол и имидаклоприд в концентрациях 0,625 г/л, 0,5 г/л, 0,5 г/л, 0,05 г/л соответственно. Образцы ила инкубировались в течение 40 дней в случае с нефтью и имидаклопридом и в течение 50 дней в случае с фенолом и мета-ксилолом. В качестве контроля использовали ил без внесения поллютантов.

Для выделения ДНК из образцов ила использовали набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот из образцов почвы, ила, гнили и прочих образцов, содержащих гуминовые кислоты «МетаГен/MetaGen» (Синтол, Россия). Ил предварительно гомогенизировали в ступке на льду в течение 5 минут. Выделение проводили согласно инструкции к набору.

Для количественной ПЦР использовали 2,5х реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I № M-427 (Синтол, Россия). Реакцию ставили в объеме 25 мкл. ПЦР проводилась в амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen Hilden, Германия). Использованные праймеры: *16S* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'), *nah* (5'-CAAAAACACCTGATTCATGG-3', 5'-ACTACGAGCGACTTCTTTCAA-3'), *tod* (5'-ACCGATGAGGACCTGTACC-3', 5'-CTTCGGTCAAGTAGCTGGTG-3'), *bph1* (5'-GGACGTGATGCTCGACCGC-3', 5'-TGTTCCGGCACGTTCCAGGCCCAT-3'), *phe* (5'-GTGCTGACGAATCTGTTGTTTC-3', 5'-CGCCAGAACCATTATC-3'), *amoA* (5'-ATGGAAAAGCTTCATATGACGACAGAGGCGACG-3', 5'-GCTGAATTCCGGCGACTCCTGCAGGTG-3'), *npcA* (5'-CGCCTACCACGAATTCTGG-

3', 5'-ATTGCCGATGTGCTGAACG-3'), *atzA* (5'-CCATGTGAACCAGATCCT-3', 5'-TGAAGCGTCCACATТАСС-3') [6, 9, 10, 11, 12, 13].

Оценку представленности катаболических генов проводили относительно гена 16S рРНК. Для этого находили отношение Ct 16S рРНК к Ct целевого гена.

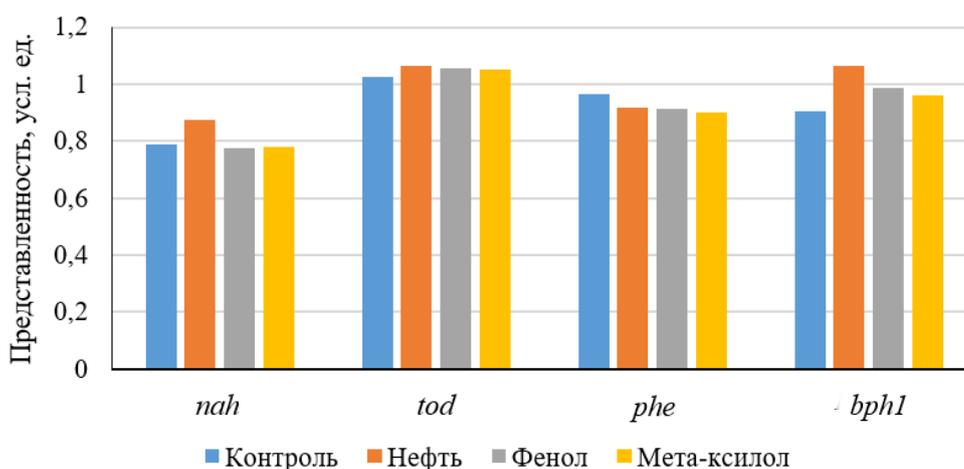
Концентрацию нефтепродуктов и ароматических углеводов в образцах ила определяли флуорометрическим методом. Углеводороды экстрагировали гексаном, а оценку концентрации в полученном экстракте проводили с использованием анализатора «Флюорат-02-3М» («Люмэкс», Россия). Определение концентрации имидаклоприда было проведено с помощью экспресс-методики количественного спектрофотометрического анализа имидаклоприда с использованием универсального двулучевого сканирующего спектрофотометра LEKI SS2110 UV (АО «ЛОиП», Россия).

Результаты. В ходе проведенных исследований было установлено, что на относительную представленность гена, кодирующего нафталиндиоксигеназу (*nah*), положительно влияет внесение нефти – представленность гена *nah* увеличилась на 10,5 %, в то время как внесение фенола и ксилола оказало даже ингибирующий эффект – представленность гена уменьшилась на 1,9 % и на 1,2 % соответственно. Это может быть связано с тем, что концентрация субстратов для данного фермента была выше всего в пробе ила, которая была загрязнена нефтью, поскольку в ней присутствует смесь различных полициклических ароматических соединений, в том числе и нафталин. В связи с этим бактерии, способные использовать данные вещества в качестве источника углерода и энергии, количественно преобладают над остальными.

Внесение всех исследуемых поллютантов – нефти, фенола и метаксилола – снизило относительную представленность гена фенолмонооксигеназы (*phe*). По сравнению с интактным илом,

представленность гена *phe* была ниже на 6,8 %, 5,3 % и на 5,0 % при внесении мета-ксилола, фенола и нефти соответственно.

В то же время, внесение указанных поллютантов положительно

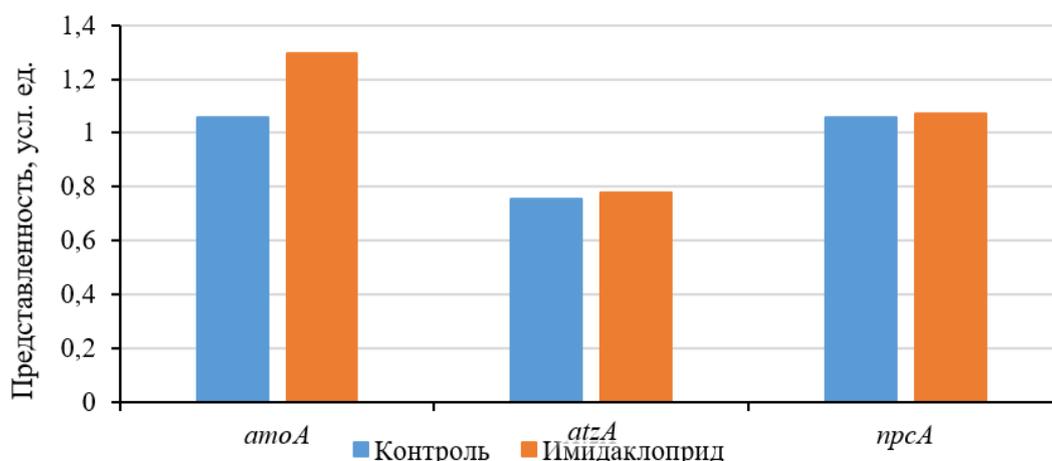


отразилось на представленности генов толуолдиоксигеназы (*tod*) и бифенилдиоксигеназы (*bph1*) относительно гена 16S рРНК. Внесение мета-ксилола в донные отложения увеличило представленность гена *tod* на 2,6 %, фенола – на 2,9 %, а нефти – на 3,5 %. Внесение мета-ксилола увеличило представленность гена *bph1* на 6,0 %, внесение фенола – на 9,2 %, а внесение нефти на 17,5 %. Данные об относительной представленности катаболических генов *nah*, *tod*, *phe* и *bph1* отображены на рисунке 1.

Рис. 1 – Относительная представленность катаболических генов в зависимости от вносимого поллютанта

Присутствие поллютантов также положительно сказалось и на относительной представленности гена алканмонооксигеназы (*amoA*) – при внесении фенола и мета-ксилола относительная представленность целевого гена увеличилась на 0,7 % и на 1,5 %, соответственно, внесение нефти повысило данный показатель на 9,8 %. Внесение имидаклоприда оказало наибольшее влияние на представленность гена *amoA*, увеличив ее на 22,1 %.

Представленность генов нитрофенолмонооксигеназы (*nrcA*) и атразинхлоргидролазы (*atzA*) при внесении имидаклоприда увеличилась на



1,4 % и 2,9 % соответственно. Данные отображены на рисунке 2.

Рис. 2 – Относительная представленность катаболических генов при внесении имидаклоприда

Для подтверждения способности исследуемых микробиоценозов разлагать нефть, фенол, мета-ксилол и имидаклоприд, проводили оценку концентрации данных веществ в образцах. Было установлено, что нефть подверглась деградации на 96,2 %, фенол – на 98,9 %, мета-ксилол – на 75,2 %, имидаклоприд – на 74,4 %. Данные отображены на рисунке 3.

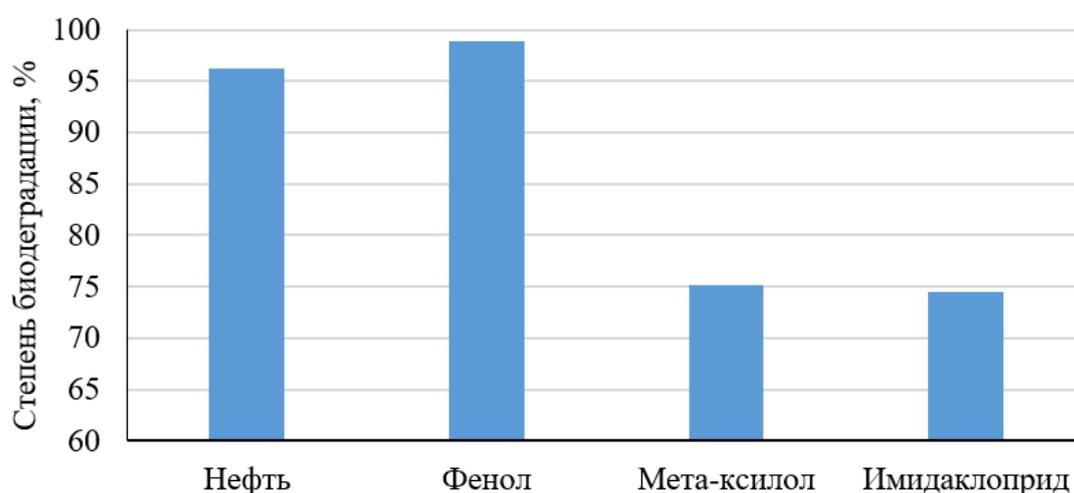


Рисунок 3 – Степень биодegradации загрязнителей

Снижение относительной представленности некоторых

исследованных генов биодegradации относительно генов 16S рРНК может быть связана с тем, что поллютант подвергся быстрому разложению, что привело к утрате преимущества бактерий, обладающих данными катаболическими генами.

Заключение. Внесение поллютантов разнонаправленно и в разной мере влияет на относительную представленность катаболических генов. Внесение нефти стимулировало рост относительной представленности генов *tod*, *atoA*, *nah* и *bph1*. Внесение имидаклоприда увеличило относительную представленность генов *prcA*, *atzA* и *atoA*, по сравнению с представленностью этих генов в интактном иле. Внесение фенола и метаксилола оказало положительный эффект на рост относительной представленности генов *tod*, *bph1* и *atoA*. Таким образом, для оценки биодеструкционного потенциала микробиоценоза требуется расширение числа отвечающих за деструкцию генов или акцент на оценке относительной представленности более универсальных катаболических генов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bagi, A. Abundance and diversity of n-alkane and PAH-degrading bacteria and their functional genes – Potential for use in detection of marine oil pollution / A. Bagi, K. Knapik, T. Baussant // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 810. – P. 1–14.
2. Shahi A. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach / A. Shahi, S. Aydin, B. Ince, O. Ince // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – Vol. 125. – P. 153–160.
3. Volatile and semi-volatile organic compounds in landfill leachate: Concurrence, removal and the influencing factors / X. S. He, Q. Pan, B. D. Xi [et al.] // *Water Research*. – 2023. – Vol. 245. – P. 1-9.
4. Биодegradация н-алканов в нефтезагрязненных донных отложениях при биоэлектрохимической стимуляции / А.А. Самков, Н.Н. Волченко, Т.Н. Мусорина [и др.] // *Микробиология*. – 2024. – Т. 93, № 3. – С. 312-322.
5. Characterization of Biphenyl Catabolic Genes of Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl Degradator *Rhodococcus sp.* strain RHA1 / E. Masai, A. Yamada, J. M. Healy [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – Vol. 61, № 6. – P. 2079–2085.
6. Baldwin, B. R. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR / B. R. Baldwin, C. H. Nakatsu, L. Nies // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – Vol. 69, № 6. – P. 3350–3358.

7. Mechanism of 4-Nitrophenol Oxidation in *Rhodococcus* sp. strain PN1: Characterization of the Two-Component 4-Nitrophenol Hydroxylase and Regulation of Its Expression / M. Takeo, M. Murakami, S. Niihara [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – Vol. 190, № 22. – P. 7367–7374. ISSN 1098-5530.
8. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments / Y. Nie, C. Chi, H. Fang [et al.] // *Scientific Reports*. . – 2014. – Vol. 4. – P. 1–11.
9. Heterologous expression of alkene monooxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* B-276 / T. J. Smith, J. S. Lloyd, S. C. Gallagher [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1999. – № 260. – P. 446–452.
10. Подбор и оптимизация методики выделения суммарной микробной ДНК из сбраживаемой массы биогазовых производств / К. С. Бояршин, Ю. Р. Ходжаев, Е.Ф. Сорокина [и др.] // *Вестник ТвГУ*. – 2019. – Т. 3, № 55. – С. 47–60.
11. The Atrazine Catabolism Genes *atzABC* Are Widespread and Highly Conserved / M. L. De Souza, J. Seffernick, B. Martinez [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – Vol. 180, №7. – P. 1951–1954.
12. Kitagawa, W. A Novel p-Nitrophenol Degradation Gene Cluster from a Gram-Positive Bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101 / W. Kitagawa, N. Kimura, Y. Kamagata // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186, № 15. – P. 4894–4902.
13. Wu B. Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination / B. Wu, T. Lan, D. Lu, Z. Liu // *Environmental Science: Processes & Impacts*. . – 2014. – Vol. 16. – P. 1501–1509.

References

1. Bagi, A. Abundance and diversity of n-alkane and PAH-degrading bacteria and their functional genes – Potential for use in detection of marine oil pollution / A. Bagi, K. Knapik, T. Baussant // *Science of The Total Environment*. – 2022. – Vol. 810. – P. 1–14.
2. Shahi A. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach / A. Shahi, S. Aydin, B. Ince, O. Ince // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2016. – Vol. 125. – P. 153–160.
3. Volatile and semi-volatile organic compounds in landfill leachate: Concurrence, removal and the influencing factors / X. S. He, Q. Pan, B. D. Xi [et al.] // *Water Research*. – 2023. – Vol. 245. – P. 1-9.
4. Biodegradacija n-alkanov v neftezagrijaznennyh donnyh otlozhenijah pri bioelektrohimijskoj stimuljacii / A.A. Samkov, N.N. Volchenko, T.N. Musorina [i dr.] // *Mikrobiologija*. – 2024. – Т. 93, № 3. – С. 312-322.
5. Characterization of Biphenyl Catabolic Genes of Gram-Positive Polychlorinated Biphenyl Degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1 / E. Masai, A. Yamada, J. M. Healy [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – Vol. 61, № 6. – R. 2079–2085.
6. Baldwin, B. R. Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR / B. R. Baldwin, C. H. Nakatsu, L. Nies // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – Vol. 69, № 6. – P. 3350–3358.
7. Mechanism of 4-Nitrophenol Oxidation in *Rhodococcus* sp. strain PN1: Characterization of the Two-Component 4-Nitrophenol Hydroxylase and Regulation of Its Expression / M. Takeo, M. Murakami, S. Niihara [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 2008. – Vol. 190, № 22. – R. 7367–7374. ISSN 1098-5530.
8. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments / Y. Nie, C. Chi, H. Fang [et al.] // *Scientific Reports*. . – 2014. – Vol. 4. – R. 1–11.
9. Heterologous expression of alkene monooxygenase from *Rhodococcus rhodochrous*

B-276 / T. J. Smith, J. S. Lloyd, S. C. Gallagher [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1999. – № 260. – R. 446–452.

10. Podbor i optimizacija metodiki vydelenija summarnoj mikrobnj DNK iz sbrazhivaemoj massy biogazovyh proizvodstv / K. S. Bojarshin, Ju. R. Hodzhaev, E.F. Sorokina [i dr.] // *Vestnik TvGU*. – 2019. – T. 3, № 55. – S. 47–60.

11. The Atrazine Catabolism Genes atzABC Are Widespread and Highly Conserved / M. L. De Souza, J. Seffernick, B. Martinez [et al.] // *Journal of Bacteriology*. – 1998. – Vol. 180, №7. – R. 1951–1954.

12. Kitagawa, W. A Novel p-Nitrophenol Degradation Gene Cluster from a Gram-Positive Bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO101 / W. Kitagawa, N. Kimura, Y. Kamagata // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186, № 15. – R. 4894–4902.

13. Wu B. Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination / B. Wu, T. Lan, D. Lu, Z. Liu // *Environmental Science: Processes & Impacts*. . – 2014. – Vol. 16. – R. 1501–1509.