

УДК 579.8; 579.06; 579.26

**Алёна Александровна Кремза¹, Алина Юрьевна Ларченко²,
Светлана Леонидовна Василенко³, Мария Ивановна Мандрык⁴**

¹студент 4-го курса биологического факультета

Белорусского государственного университета

²мл. науч. сотрудник научно-исследовательской лаб. биотехнологии каф. микробиологии

Белорусского государственного университета

³канд. биол. наук, зав. каф. микробиологии

Белорусского государственного университета

⁴канд. биол. наук, доц., доц. каф. микробиологии

Белорусского государственного университета

Aliona Kremza¹, Alina Larchenka², Svetlana Vasilenko³, Maryia Mandryk⁴

¹4-th year Student of the Department of Microbiology of Belarusian State University

²Junior Science Researcher of the Laboratory of Biotechnology of Department of Microbiology
of Belarusian State University

³Candidate of Biological Sciences, Head of the Department of Microbiology
of Belarusian State University

⁴Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
Associate Professor of the Department of Microbiology
of Belarusian State University

e-mail: mmm-cher@tut.by

РАЗНООБРАЗИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОЧВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ*

Представлены данные о микробиологическом, молекулярно-генетическом анализе почвенного микробного сообщества. Объектами исследования являлись образцы почвы сельскохозяйственного назначения, отобранные на различном расстоянии (50, 75 и 100 м) от Минской кольцевой автодороги (МКАД). Цель – микробиологический, молекулярно-генетический анализ и оценка деградативного потенциала микроорганизмов из почвы сельскохозяйственного назначения. Установлено, что близкое расположение автомагистрали оказывает негативное воздействие на различные физиологические группы почвенных микроорганизмов за исключением деструкторов нефтепродуктов. Молекулярно-генетический анализ почвенной метабеномной ДНК позволил выявить детерминанты, связанные с утилизацией алканов и нафталина, бактерий родов *Rhodococcus* и *Pseudomonas*. Для 42 изолятов исследован спектр утилизируемых углеводородных субстратов. Из них 20 использовали в качестве источника углерода гексадекан, 15 – дизельное топливо, 8 – октан, 5 – о-ксилол, 4 – толуол, 2 – бензол, фенол не утилизировал ни один из исследуемых изолятов. Наибольшим спектром утилизируемых субстратов обладает изолят № 15, выделенный на среде ПДА, что делает его перспективным для использования в природоохранных биотехнологиях.

Ключевые слова: почва, антропогенное воздействие, физиологические группы микроорганизмов, бактерии-деструкторы, углеводороды.

Diversity and Metabolic Potential of Microorganisms from Agricultural Soils

The paper presents data on microbiological, and molecular genetic analysis of the soil microbial community. The objects of study were agricultural soil samples taken at different distances (50, 75 and 100 m) from the Minsk Ring Road (MRR). The aim is microbiological, molecular genetic analysis and assessment of the degradative potential of microorganisms from agricultural soil. It has been established that the proximity of the highway has a negative impact on various physiological groups of soil microorganisms, with the exception of oil decomposers. Molecular genetic analysis of soil metagenomic DNA revealed the determinants associated with the utilization of alkanes and naphthalene, belonging to bacteria of the genera *Rhodococcus* and *Pseudomonas*. For 42 isolates, the spectrum of utilized hydrocarbon substrates was studied. Of these, 20 used hexadecane as a carbon source, 15 – diesel fuel, 8 – octane, 5 – o-xylene, 4 – toluene, 2 – benzene, and none of the studied isolates utilized phenol. Isolate no. 15, isolated on peptone-yeast medium, has the greatest range of utilized substrates, which makes it promising for use in environmental biotechnologies.

Key words: soil, anthropogenic impact, physiological groups of microorganisms, hydrocarbon-degrading bacteria, hydrocarbons.

*Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь (грант 2022 г.), (задание 3.6.2 ГПНИ «Биотехнологии» (2021–2023 гг.)).

Введение

Главным составляющим любой агроэкосистемы является почва. Качественная почва, содержащая достаточное количество разнообразных питательных и минеральных веществ, служит основой хорошего урожая. Почва является наиболее богатой средой обитания для микроорганизмов и характеризуется высоким разнообразием микробных сообществ. В почве протекает множество взаимосвязанных процессов, таким образом она представляет собой сложную систему.

Деятельность человека порой нарушает слаженную работу этой системы, что в итоге приводит к тому, что почва перестает выполнять свои экологические функции в полной мере. Среди такой деятельности можно выделить нерациональное земледелие, которое зачастую вызывает эрозию почв и аридизацию, что проявляется в потере почвенного плодородия. Также последующее использование минеральных удобрений для повышения плодородия почв может оказать негативное влияние на свойства почвы, т. к. не весь азот и фосфор усваивается растениями – значительная их часть вымывается дождем, из-за чего они накапливаются в грунтовых водах, что приводит к загрязнению водоемов и, как следствие, частичному сокращению видового состава [1]. Одной из глобальных проблем, вызванных деятельностью человека, является загрязнение экосистем нефтью и нефтепродуктами.

Углеводороды нефти по-прежнему используются в качестве основного источника энергии и являются наиболее опасными загрязнителями окружающей среды [2]. Нефтяные загрязнения способствуют изменению химического и биологического состава, а также физических свойств всех экосистем [3; 4]. Данные соединения, имеющие разную химическую природу (алифатические, моноароматические, полиароматические и их производные) попадают в окружающую среду в результате аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, при сгорании различных видов топлива, выбросах коксо-, газо- и нефтехимических производств, а также с выхлопными газами автомобилей [5; 6]. Углеводороды, в особенности полициклические ароматические соединения, являются токсичными, мутагенными, канцерогенными и тератогенными для живых организмов [7; 8].

Почва является крайне сложной средой обитания, характеризующейся высокой плотностью микробных популяций (порядка 10^9 клеток/г) и большим разнообразием видов (до 106 видов бактерий и архей в 10 г) [9; 10]. В то же время лишь 1–10 % почвенных микроорганизмов можно культивировать традиционными методами. Оставшиеся 90–99 % относятся к так называемым некультивируемым видам [11; 12]. Любое антропогенное воздействие может как снижать микробное разнообразие и, как следствие, плодородие почв, так и служить селективным фактором для развития микроорганизмов, обладающих хозяйственно полезными свойствами (способность к деградации биополимеров, таких как лигнин и целлюлоза, опасных ксенобиотиков, в частности углеводородов, в т. ч. ароматической природы). Исследование ассоциации микроорганизмов, находящейся в почвах с разной антропогенной нагрузкой, помогает понять структуру микробного сообщества данной почвы, определить характер взаимодействия микроорганизмов и может помочь обнаружить новые штаммы микроорганизмов с практически полезными свойствами (например, способных деградировать сложно разлагаемые, в т. ч. токсичные соединения, продуцировать биологически активные вещества).

В связи с вышеизложенным целью исследования являлись микробиологический, молекулярно-генетический анализ и оценка деградативного потенциала микроорганизмов из почвы сельскохозяйственного назначения.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись образцы почв с различной антропогенной нагрузкой: используемые в сельскохозяйственных нуждах (три пробы почвы с рапсового

поля, отобранные на расстоянии около 50, 75 и 100 м от кольцевой автодороги г. Минска (МКАД) в осенний период в 2019 г.), а также изоляты бактерий, выделенные из данных образцов.

Среды и растворы. Учет общего числа почвенных аэробных и факультативно анаэробных гетеротрофных микроорганизмов проводили на пептонно-дрожжевом агаре (ПДА) (г/л: пептон ферментативный – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 8, агар бактериологический – 15, рН 7,0–7,2). Для определения общего числа олигонитрофильных и азотфиксирующих микроорганизмов использовали среду Эшби; общего числа актиномицетов и микромицетов – среду Чапека [13]. Общее число целлюлолитических микроорганизмов определяли на среде М9 [14] с 0,1 % карбоксиметилцеллюлозой в качестве единственного источника углерода. Количество деструкторов углеводов, а также способность отдельных изолятов утилизировать углеводороды определяли путем высева на плотную минеральную среду М9 [14]. В качестве источников углерода использовали: гексадекан (пары), дизельное топливо (пары), октан (пары), о-ксилол (пары), толуол (пары), бензол (пары), фенол (0,1 %), нафталин (пары).

Выделение метагеномной ДНК осуществляли с использованием набора «Нуклеосорб С» (ОДО «Праймтех», Беларусь) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество выделенной ДНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали набор реагентов производства ОДО «Праймтех», Беларусь. Реакцию проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 1х буфер с ионами Mg^{2+} для ДНК-полимеразы, смесь дНТФ (0,2 ммоль/л каждого нуклеотида), 0,2–0,5 мкмоль/л каждого праймера для соответствующей детерминанты, 1,25 ед. ДНК-полимеразы. При амплификации фрагментов генов *nahAc* и *nahG* в смесь также добавляли 3 % глицерина и 5 % диметилсульфоксида.

Для амплификации генов *alkB* бактерий *Acinetobacter* использовали праймеры *alkF* (GCICAIGARITIRKICAYAA) и *alkR* (GCITGITGTCISWRTGICGYTG) [15]; бактерий *Rhodococcus* и близких родов, рода *Pseudomonas* использовали праймеры *alk-H1F* (CIGIICACGAITIGGICACAAGAAGG), *alk-H3R* (IGCITGITGATCIIITGICGCTGIAG) [16] и режим амплификации 95 °C – 5 мин. (1 цикл); 94 °C – 1 мин., 50 °C – 1 мин., 72 °C – 1 мин. (5 циклов); 94 °C – 1 мин., 55 °C – 1 мин., 72 °C – 1 мин. (30 циклов); 72 °C – 5 мин. (1 цикл). Для амплификации генов *narB* использовали праймеры *NarBForward* (ACGTGCAAGAAGGCGCGAAA), *NarBReverse* (ACGCTCCCGCGAGGCGAGAA) [17] и режим амплификации 95 °C – 5 мин. (1 цикл); 94 °C – 1 мин., 52 °C – 30 с., 72 °C – 40 с. (30 циклов); 72 °C – 5 мин. (1 цикл). Амплификацию генов *nahAc* осуществляли с использованием пары праймеров *Ac149f* (CCCYGGCGACTATGT) и *Ac1014r* (CTCRGGCATGTCTTTTTC) при режиме 94 °C – 5 мин. (1 цикл); 94 °C – 30 с., 46 °C – 30 с., 72 °C – 1,5 мин. (30 циклов); 72 °C – 10 мин. (1 цикл) [18]. Для выявления генов *nahG* применялись праймеры *shc1_up* (CGGCKTTHGGTGARGTCGGTGC) и *shc1_lo* (GGCGAGGAARTAGGCGTCCTCAAG) и режимы амплификации 94 °C – 5 мин. (1 цикл); 94 °C – 1 мин., 50 °C – 1 мин., 72 °C – 1 мин. (30 циклов); 72 °C – 10 мин. (1 цикл) [19]. Наличие плазмид группы IncP-9 определяли с помощью ПЦР с праймерами *orisF* (GCGGGAATGRGTGACTAGCG) и *orisR* (GTCTGTACCCATGTRCCG) при режиме 94 °C – 5 мин. (1 цикл); 94 °C – 30 с., 64 °C – 30 с., 72 °C – 1,5 мин. (7 циклов); 94 °C – 30 с., 68 °C – 30 с., 72 °C – 1,5 мин. (23 цикла); 72 °C – 10 мин. (1 цикл) [20]. Плазмиды группы IncP-7 обнаруживали с использованием пары праймеров *rep7f* (CCCTATCTCACGATGCTGTA), *rep7r* (GCACAAACGGTCGTCAAG) и режима 94 °C – 5 мин. (1 цикл); 94 °C – 1 мин., 50 °C – 1 мин., 72 °C – 1 мин. (30 циклов); 72 °C – 10 мин. (1 цикл) [20].

Размеры полученных ПЦР-продуктов оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле (0,7 %).

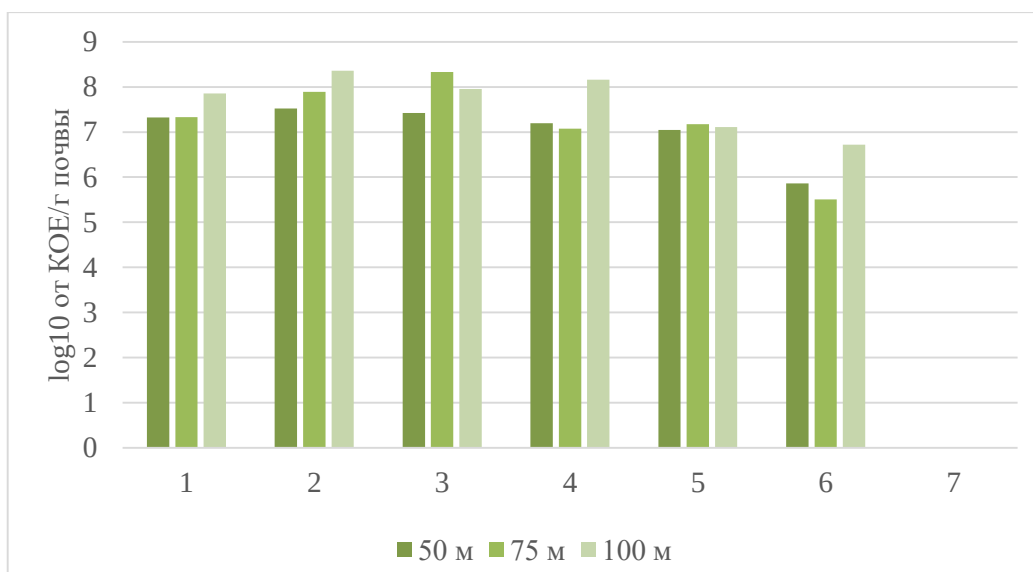
Результаты и их обсуждение

Почва богата микроорганизмами, обладающими различными свойствами и способными утилизировать широкий спектр субстратов, в который также входят и нефтепродукты. При антропогенном воздействии на окружающую среду изменяется качественный и количественный состав почвы, что влияет на ее микробиоту.

Автомобили являются источником разнообразных загрязнителей, в т. ч. углеводородов. Для того чтобы установить, как изменяется количество микроорганизмов разных групп в зависимости от удаленности источника загрязнения, были проведены высевы из образцов почвы сельскохозяйственного назначения, взятых около МКАД на расстоянии 50, 75 и 100 м от нее.

В результате анализа данных о количественном и качественном составе культивируемых микроорганизмов (рисунок 1) установлено, что наблюдается увеличение количества микроорганизмов на расстояниях 75 и 100 м от МКАД по сравнению с более близким расположением (50 м). Это говорит о более высокой антропогенной нагрузке на почву по мере приближения к МКАД.

Количество деструкторов нефтепродуктов (для их выявления в качестве источника углерода использовалось дизельное топливо (ДТ)) было близким к общему числу гетеротрофных микроорганизмов, в то же время количество деструкторов ПАУ (на примере нафталина) было в 10–50 раз ниже общего числа гетеротрофов, а деструкторов фенола выявлено не было (рисунок 1).



- 1 – Гетеротрофные аэробные и факультативно анаэробные (среда ПДА);
 2 – Олигонитрофильные (среда Эшби); 3 – Целлюлолитические (М9 + КМЦ);
 4 – Актиномицеты и микромицеты (среда Чапека); 5 – Деструкторы нефтепродуктов (М9 + ДТ);
 6 – Деструкторы нафталина (М9 + нафталин); 7 – Деструкторы фенола (М9 + фенол).

Рисунок 1 – Изменение количества микроорганизмов разных физиологических групп (представлено в виде десятичного логарифма от КОЕ/г почвы) в зависимости от расстояния от МКАД

Необходимо отметить, что культуральные методы не позволяют оценить микробного разнообразия почв и других сред в полной мере. Существует большое количество некультивируемых видов микроорганизмов, выявление которых в среде стало возможным благодаря молекулярно-генетическим методам.

Для выделения метагеномной ДНК использовали усредненную пробу почвы. ПЦР-анализ проводили со специфическими праймерами для выявления детерминант путей деградации углеводов. Для выявления алканмонооксигеназ были использованы две пары праймеров. Пара праймеров *alk-H1F* + *alk-H3R* позволяет амплифицировать участки генов *alkB* бактерий рода *Rhodococcus* и близких к ним родов, а также рода *Pseudomonas*. Пара праймеров *alkF* + *alkR* позволяет амплифицировать участки специфических генов *alk* бактерий рода *Acinetobacter*. Таким образом, в совокупности данные пары праймеров позволяют выявить в почве алканокисляющие бактерии различных систематических групп.

Как видно из таблицы 1, в образцах метагеномной ДНК выявлены детерминанты *nahG* и *nahAc*, что говорит о присутствии бактерий – деструкторов нафталина рода *Pseudomonas*. В то же время генов *narB*, характерных для нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus*, не выявлено. Не обнаружено и плазмид групп *IncP-7* и *IncP-9*, которые нередко несут детерминанты биodeградации углеводов. Не установлено наличие генов *alkB* бактерий *Acinetobacter*, *Rhodococcus* и других, хотя деструкторы этих соединений были выявлены культуральными методами. Это может быть связано с относительно низкой плотностью их популяций.

Таблица 1 – ПЦР-анализ почвенной метагеномной ДНК

Детерминанта	Функция	Наличие детерминанты в образце
<i>alk</i> (<i>Acinetobacter</i>)	Кодирует алканмонооксигеназу (фермент, активирующий алканы)	–
<i>alkB</i> (<i>Rhodococcus</i> и др.)	Кодирует алканмонооксигеназу (фермент, активирующий алканы)	–
<i>narB</i>	Кодирует цис-нафталиндигидродиолдегидрогеназу (фермент пути деградации нафталина у бактерий рода <i>Rhodococcus</i>)	–
<i>nahAc</i>	Кодирует α -субъединицу нафталиндиоксигеназы (фермент пути деградации нафталина у бактерий рода <i>Pseudomonas</i>)	+
<i>nahG</i>	Кодирует салицилатгидроксилазу (фермент пути деградации нафталина у бактерий рода <i>Pseudomonas</i>)	+
<i>oriV</i> <i>IncP-9</i>	Область начала репликации плазмид группы <i>IncP-9</i> , которые зачастую несут пути биodeградации углеводов	–
<i>rep</i> <i>IncP-7</i>	Реп-область плазмид группы <i>IncP-7</i> , которые зачастую несут пути биodeградации углеводов	–

Примечание – – – детерминанта не выявлена, + – детерминанта выявлена.

Поскольку в исследованных образцах почвы с помощью культуральных и молекулярно-генетических методов выявлены бактерии – деструкторы углеводов различных классов – представлялось интересным изучить деградативный потенциал отдельных бактериальных изолятов с целью выявления перспективных для природоохран-ных биотехнологий.

Из образцов почвы на основании морфологии колоний для дальнейших исследований со среды ПДА было выделено 12 изолятов, со среды Эшби – 7, со среды М9 с КМЦ – 16 и со среды М9 с дизельным топливом – 7 изолятов. Всего было изучено 42 изолята.

В качестве субстратов были использованы: дизельное топливо (смесь углеводородов: алифатические – до 10–40 %; циклоалканы – 20–60 %; ароматические – 15–30 %), алифатические углеводороды (октан, гексадекан); ароматические углеводороды и их производные (бензол, толуол, о-ксилол, фенол).

Среди 42 исследованных изолятов к утилизации углеводородов способен 21 изолят. Как видно из таблицы 2, 20 изолятов использовали в качестве источника углерода гексадекан, 15 – дизельное топливо, 8 – октан, 5 – о-ксилол, 4 – толуол, 2 – бензол, фенол не утилизировал ни один из исследуемых изолятов. Это соответствует данным о том, что ароматические углеводороды труднее поддаются разложению по сравнению с алифатическими, а алифатические углеводороды с длиной цепи более 12 углеродных атомов (например, гексадекан) расщепляются проще, чем алканы с меньшей длиной цепи, поскольку алканы с короткой цепью обладают большей токсичностью [21–24].

Среди исследованных изолятов отмечают как те, которые способны к росту на алифатических и ароматических субстратах – изоляты № 15 с ПДА, № 1 с М9 + ДТ, № 15 и 16 с М9 + КМЦ, так и те, которые способны утилизировать только один класс соединений: алифатические – изоляты № 2, 4, 10, 11 со среды Эшби, № 2, 3, 4, 9.1 с М9 + ДТ, № 12 с ПДА, № 2, 3, 11, 12, 13, 14, 19 – со среды М9 + КМЦ; ароматические – изолят № 1 со среды Эшби.

Таблица 2 – Способность почвенных изолятов бактерий утилизировать углеводороды

Среда, на которой выделены изоляты	№ изолята	Способность изолятов расти на среде М9, содержащей							Всего утилизируемых субстратов
		ДТ	О	ГД	Б	Т	К	Ф	
Эшби	2, 4, 10	+	+	+	–	–	–	–	3
	1	–	–	–	+	+	+	–	3
	11	–	+	+	–	–	–	–	2
	9, 12, 13	–	–	–	–	–	–	–	0
М9 + ДТ	1	+	–	+	–	–	+	–	3
	2, 3, 4	+	–	+	–	–	–	–	2
	9	–	–	+	–	–	–	–	1
	10	–	–	–	–	–	–	–	0
ПДА	15	+	+	+	+	+	+	–	6
	12	+	–	+	–	–	–	–	2
	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 14	–	–	–	–	–	–	–	0
М9 + КМЦ	15, 16	+	–	+	–	+	+	–	4
	2, 12, 14	+	+	+	–	–	–	–	3
	3	+	–	+	–	–	–	–	2
	11, 13, 19	–	–	+	–	–	–	–	1
	6, 4, 7, 8, 10, 17, 18	–	–	–	–	–	–	–	0
Всего изолятов, утилизирующих субстрат		15	8	20	2	4	5	0	–

Примечания – – роста нет, + – активный рост; ДТ – дизельное топливо; О – октан; ГД – гексадекан; Б – бензол; Т – толуол; К – о-ксилол; Ф – фенол.

Наибольшим спектром утилизируемых субстратов обладает изолят № 15, выделенный на среде ПДА. Он использует в качестве источника углерода как алифатические, так и ароматические углеводороды. Среди исследованных субстратов изолят № 15 не растет только на среде с фенолом (0,1 %). Таким образом, изолят № 15, выделенный на среде ПДА, можно отнести к перспективным деструкторам углеводородов нефти.

Заключение

В результате проведенного микробиологического и молекулярно-генетического анализа проб почвы, подвергавшейся антропогенному воздействию разного вида (сельскохозяйственное применение, близкое расположение автомагистрали), установлено, что с ростом антропогенной нагрузки (близкое расположение автомагистрали МКАД) наблюдается снижение количества различных физиологических групп микроорганизмов в почве. ПЦР-анализ метагеномной ДНК, выделенной из почвы, позволил выявить детерминанты *nahG* и *nahAc*, что говорит о присутствии бактерий – деструкторов нафталина рода *Pseudomonas*.

Для 42 изолятов исследован спектр утилизируемых углеводородных субстратов. Из них 20 использовали в качестве источника углерода гексадекан, 15 – дизельное топливо, 8 – октан, 5 – о-ксилол, 4 – толуол, 2 – бензол, фенол не утилизировал ни один из исследуемых изолятов. Всего к утилизации углеводородов способен 21 изолят. Наибольшим спектром утилизируемых субстратов обладает изолят № 15, выделенный на среде ПДА. Он использует в качестве источника углерода как алифатические, так и ароматические углеводороды. Среди исследованных субстратов изолят № 15 не растет только на среде с фенолом (0,1 %).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заславский, М. Н. Эрозиоведение. Основы противоэрозионного земледелия / М. Н. Заславский. – М. : Высш. шк., 1987. – 376 с.
2. Янин, Е. П. Ремедиация территорий, загрязненных химическими элементами: общие подходы, правовые аспекты, основные способы / Е. П. Янин // Проблемы окружающей среды и природных ресурсов. – 2014. – № 3. – С. 3–105.
3. Шамраев, А. В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А. В. Шамраев, Т. С. Шорина // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. – 2009. – № 6 (100). – С. 642–645.
4. Effects of crude oil, oil components, and biodegradation on plant growth / Baek Kyung-Hwa [et al.] // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2004. – Vol. 39, iss. 9. – P. 2465–2472.
5. Углеводороды в почвах: происхождение, состав, поведение (обзор) / А. Н. Геннадиев [и др.] // Почвоведение. – 2015. – № 10. – С. 1195–1195.
6. Коломин, В. В. Автотранспорт как приоритетный источник загрязнения атмосферного воздуха (обзор литературы) / В. В. Коломин, В. С. Рыбкин // Естеств. науки. – 2015. – № 1. – С. 26–34.
7. Struzeski, E. J. Jr. Chemical treatment of oil spills / E. J. Struzeski Jr., R. T. Dewling // Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills. – 1969. – Iss. 1. – P. 217–222.
8. Obi, E. O. Techniques of Oil Spill Response in the sea / E. O. Obi, F. A. Kamgba, D. A. Obi // IOSR Journal of Applied Physics. – 2014. – Vol. 6, iss. 1. – P. 36–41.
9. Daniel, R. The metagenomics of soil / R. Daniel // Nature Reviews Microbiology. – 2005. – Vol. 3, iss. 6. – P. 470–478.

10. Prosser, J. I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use of 'omics' in soil microbial ecology / J. I. Prosser // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – Vol. 13, iss. 7. – P. 439–446.
11. The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil microbial community structure analysis / S. Zielinska [et al.] // *Microbiology Open*. – 2017. – Vol. 6, iss. 4. – Art. e00453.
12. Семенов, М. В. Метабаркодинг и метагеномика в почвенно-экологических исследованиях: успехи, проблемы и возможности / М. В. Семенов // *Журн. общ. биологии*. – 2019. – Т. 80, № 6. – С. 403–417.
13. Звягинцев, Д. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии : учеб. пособие / Д. Г. Звягинцев. – М. : Изд-во МГУ, 1992. – 304 с.
14. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер ; пер. с англ. Ю. Н. Зографа [и др.] ; под ред. и с предисл. С. И. Алиханяна. – М. : Мир, 1976. – 436 с.
15. Kloos, K. A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization / K. Kloos, J. Ch. Munch, M. Schlöter // *Journal of Microbiological Methods*. – 2006. – Vol. 66, iss. 3. – P. 486–496.
16. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation of hexadecane by replicated river biofilms / M. R. Chénier [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – Vol. 69, nr. 9. – P. 5170–5177.
17. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN / V. Andreoni [et al.] // *Environmental Microbiology*. – 2000. – Vol. 2, iss. 5. – P. 572–577.
18. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region / M. Ferrero [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – Vol. 68, nr. 2. – P. 957–962.
19. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* / Т. Ю. Измалкова [и др.] // *Микробиология*. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 70–78.
20. PCR primers for detection and characterization of IncP-9 plasmids / R. Krasowiak [et al.] // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2002. – Vol. 42, iss. – P. 217–225.
21. Degradation potential of alkanes by diverse oil-degrading bacteria from deep-sea sediments of Haima cold seep areas, South China Sea / Lyu Lina [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – Vol. 13. – Art. 920067.
22. Nzila, A. Current Status of the Degradation of Aliphatic and Aromatic Petroleum Hydrocarbons by Thermophilic Microbes and Future Perspectives / A. Nzila // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2018. – Vol. 15, iss. 12. – Art. 2782.
23. Hassanshahian, M. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance) / M. Hassanshahian, M. S. Zeynalipour, F. H. Musa // *Marine Pollution Bulletin*. – 2014. – Vol. 82, iss. 1–2. – P. 39–44.
24. Assessing environmental drivers of microbial communities in estuarine soils of the Aconcagua River in Central Chile / S. Fuentes // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2015. – Vol. 91, iss. 10. – Art. fiv110.

REFERENCES

1. Zaslavskij, M. N. Eroziiviedeniye. Osnovy protivooerozionnogo ziemiiedeliya / M. N. Zaslavskij. – M. : Vysh. shk., 1987. – 376 s.
2. Yanin, Ye P. Riemiiediacija tierritorij, zagriaznennykh khimichieskimi eliementami: obshchiye podkhody, pravovyie aspiieky, osnovnyie sposoby / E. P. YAnin // *Probiemy okruzhajushchiej sriedy i prirodnkh riesursov*. – 2014. – № 3. – S. 3–105.

3. Shamrajev, A. V. Vliianije niefti i nieftieproduktov na razlichnyje komponenty ok-
ruzhajushchiej sriedy / A. V. Shamrajev, T. S. Shorina // Viest. Orenburg. gos. un-ta. – 2009. –
№ 6 (100). – S. 642–645.
4. Effects of crude oil, oil components, and biodegradation on plant growth / Baek Kyung-
Hwa [et al.] // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2004. – Vol. 39, iss. 9. –
P. 2465–2472.
5. Uglievodorody v pochvakh: proiskzhzhodnienije, sostav, poviedienije (obzor) / A. N. Gien-
nadijev [i dr.] // Pochvoviedenie. – 2015. – № 10. – S. 1195–1195.
6. Kolomin, V. V. Avtotransport kak prioritietnyj istochnik zagriaznenija atmosfernogo
vozdukh (obzor litieratury) / V. V. Kolomin, V. S. Rybkin // Esteistv. nauki. – 2015. – № 1. –
S. 26–34.
7. Struzeski, E. J. Jr. Chemical treatment of oil spills / E. J. Struzeski Jr., R. T. Dewling //
Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills. – 1969. – Iss. 1. –
P. 217–222.
8. Obi, E. O. Techniques of Oil Spill Response in the sea / E. O. Obi, F. A. Kamgba,
D. A. Obi // IOSR Journal of Applied Physics. – 2014. – Vol. 6, iss. 1. – P. 36–41.
9. Daniel, R. The metagenomics of soil / R. Daniel // Nature Reviews Microbiology. –
2005. – Vol. 3, iss. 6. – P. 470–478.
10. Prosser, J. I. Dispersing misconceptions and identifying opportunities for the use
of ‘omics’ in soil microbial ecology / J. I. Prosser // Nature Reviews Microbiology. – 2015. –
Vol. 13, iss. 7. – P. 439–446.
11. The choice of the DNA extraction method may influence the outcome of the soil
microbial community structure analysis / S. Zielinska [et al.] // Microbiology Open. – 2017. –
Vol. 6, iss. 4. – Art. e00453.
12. Sieimioenov, M. V. Mietabarkoding i mietagienomika v pochvienno-ekologichie-
skkih issliedovanijakh: uspiekhi, problemi i vozmozhnosti / M. V. Siemionov // Zhurn. ob-
shch. biologii. – 2019. – T. 80, № 6. – S. 403–417.
13. Zviagincev, D. G. Mietody pochviennoj mikrobiologii i biokhimii : uchieb. posobije /
D. G. Zviagincev. – M. : Izd-vo MGU, 1992. – 304 s.
14. Millier, Dzh. Ekspierimenty v moliekuliarnoj gienetike / Dzh. Miller ; pier. s angl.
Yu. N. Zografa [i dr.] ; pod ried. i s priedisl. S. I. Alikhaniana. – M. : Mir, 1976. – 436 s.
15. Kloos, K. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous
genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization / K. Kloos, J. Ch. Munch, M. Schlöter //
Journal of Microbiological Methods. – 2006. – Vol. 66, iss. 3. – P. 486–496.
16. Impact of seasonal variations and nutrient inputs on nitrogen cycling and degradation
of hexadecane by replicated river biofilms / M. R. Chénier [et al.] // Applied and Environmental
Microbiology. – 2003. – Vol. 69, nr. 9. – P. 5170–5177.
17. Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain
1BN / V. Andreoni [et al.] // Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 2, iss. 5. – P. 572–577.
18. Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas*
strains isolated from the western Mediterranean region / M. Ferrero [et al.] // Applied and En-
vironmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68, nr. 2. – P. 957–962.
19. Raznoobrazije gienetichieskikh sistem biodiegracii naftalina u shtammov *Pseudomo-
nas fluorescens* / T. Yu. Izmalkova [i dr.] // Mikrobiologija. – 2005. – T. 74, № 1. – S. 70–78.
20. PCR primers for detection and characterization of IncP-9 plasmids / R. Krasowiak
[et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2002. – Vol. 42, iss. – P. 217–225.
21. Degradation potential of alkanes by diverse oil-degrading bacteria from deep-sea sedi-
ments of Haima cold seep areas, South China Sea / Lyu Lina [et al.] // Frontiers in Microbiol-
ogy. – 2022. – Vol. 13. – Art. 920067.

22. Nzila, A. Current Status of the Degradation of Aliphatic and Aromatic Petroleum Hydrocarbons by Thermophilic Microbes and Future Perspectives / A. Nzila // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2018. – Vol. 15, iss. 12. – Art. 2782.

23. Hassanshahian, M. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance) / M. Hassanshahian, M. S. Zeynalipour, F. H. Musa // Marine Pollution Bulletin. – 2014. – Vol. 82, iss. 1–2. – P. 39–44.

24. Assessing environmental drivers of microbial communities in estuarine soils of the Aconcagua River in Central Chile / S. Fuentes // FEMS Microbiology Ecology. – 2015. – Vol. 91, iss. 10. – Art. fiv110.

Рукапіс наступіў у рэдакцыю 14.09.2023