

**Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«ЮЖНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

На правах рукописи



ПУЛИКОВА ЕЛИЗАВЕТА ПЕТРОВНА

**МИКРОБНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ АЗОТА В ТЕХНОГЕННО
НАРУШЕННЫХ ПОЧВАХ ЧЕРНОЗЕМНОЙ ЗОНЫ ЮГА РОССИИ**

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1.5.19. Почвоведение (биологические науки)

1.5.15. Экология (биологические науки)

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Минкина Т. М.

кандидат биологических наук, доцент Горовцов А. В.

Ростов-на-Дону – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Влияние загрязнения на микробиом почв.....	11
1.3 Основные процессы цикла азота в почве	15
1.4 Влияние ТМ на процессы цикла азота	22
1.4 Влияние ПАУ на процессы цикла азота.....	25
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Техногенно нарушенные почвы углеотвалов	28
2.2 Техногенно нарушенные почвы бывшего шламонакопителя.....	29
2.3 Искусственно загрязненные почвы модельного эксперимента	30
2.4 ПАУ-деструкторы и нитрификаторы	32
ГЛАВА 3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
3.1 Методики отбора и подготовки образцов почвы	33
3.2 Определение физических, химических и физико-химических свойств почвы.....	33
3.3 Определение содержания аммония, нитрита и нитрата в почве.....	34
3.4 Определение содержания ТМ и ПАУ в почве	35
3.5 Определение микробиологических свойств почв	36
3.6 Выделение и анализ ПАУ-деструкторов-денитрификаторов и накопительной культуры нитрификаторов.....	38
3.7 Извлечение, секвенирование ДНК и метагеномный анализ	41
3.8 Статистический анализ	43
ГЛАВА 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИЧЕСКИХ, ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТЕХНОГЕННО НАРУШЕННЫХ ПОЧВ, СОДЕРЖАНИЕ И ПОДВИЖНОСТЬ В НИХ ТМ	45
4.1 Физические, химические и физико-химические свойства техногенно нарушенных почв	45
4.2 Содержание ТМ и ПАУ в техногенно нарушенных почвах.....	47
ГЛАВА 5 АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ И ЧИСЛЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ, ВОВЛЕЧЕННОЙ В ПРОЦЕССЫ ЦИКЛА АЗОТА, В ТЕХНОГЕННО НАРУШЕННЫХ ПОЧВАХ УГЛЕОТВАЛОВ	53
5.1 Обилие аммонификаторов и активность уреазы в почвах	53
5.2 Обилие денитрификаторов и активность процессов нитрат- и нитритредукции	55
5.3 Активность процессов нитрификации и содержание нитрита и нитрата в почвах	57
5.4 Метагеномная оценка микробных сообществ техногенно нарушенных почв углеотвалов	59
5.5 Связь микробных показателей со свойствами техногенно нарушенных почв углеотвалов	66
ГЛАВА 6 ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО И КРАТКОСРОЧНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ ТМ НА АКТИВНОСТЬ НИТРИФИКАЦИИ.....	72
6.1 Нитрифицирующая активность хемоземов бывшего шламонакопителя	72
6.2 Метагеномный анализ хемоземов бывшего шламонакопителя.....	75
6.3 Влияние краткосрочного загрязнения почвы Zn на активность нитрификации	88
ГЛАВА 7 ДЕГРАДАЦИЯ ПАУ ДЕНИТРИЦИРУЮЩИМИ И НИТРИФИЦИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ.....	90
7.1 Результаты анализа метагенома накопительной культуры нитрификаторов.....	90

7.2 Сборка индивидуальных геномов нитрификаторов.....	92
7.3 Анализ генов нитрификации, обнаруженных в геномах из накопительной культуры	93
7.4 Влияние ПАУ и ТМ на активность нитрификации накопительной культуры.....	94
7.5 Анализ генома ПАУ-деградирующего денитрификатора.....	96
7.6 Деградация ПАУ в почве консорциумом микроорганизмов	97
ВЫВОДЫ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
ПРИЛОЖЕНИЕ А	136

ВВЕДЕНИЕ

Азот (N) является ключевым элементом биогеохимических циклов. Техногенное загрязнение тяжелыми металлами (ТМ), полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ) нарушает баланс азотного цикла, усиливая эмиссию оксида азота (I) (N_2O) и потерю минеральных форм азота (Hui-Juan et al., 2018). Процессы трансформации азота более чувствительны к загрязнению, чем процессы цикла углерода, что делает их репрезентативными индикаторами экологического состояния почв (Pulikova, Gorovtsov, 2022).

Изучение динамики трансформации азота в почвах и использование микробных консорциумов может стать ключевым инструментом для восстановления почвенного покрова (Kumari, Maiti, 2022; Pulikova et al., 2024). Совместное применение ПАУ-деградирующих и нитрифицирующих микроорганизмов демонстрирует потенциал для эффективной ремедиации почв в условиях чередования аэробных и анаэробных фаз, где нитрат служит акцептором электронов в анаэробной деградации ПАУ (Ribeiro et al., 2018). Нитрификаторы-хемолитотрофы не только участвуют в процессах цикла азота, но и секвестрируют диоксид углерода (CO_2), способствуя развитию низкоуглеродных стратегий (Liang, 2020).

Для разработки способов ремедиации антропогенно-преобразованных почв и почвоподобных техногенных образований (техноземов) важно изучить адаптационный потенциал почвенного сообщества нитрифицирующих микроорганизмов в условиях загрязнения ТМ и ПАУ (Liu et al., 2019). Установление механизмов адаптации микробных сообществ к длительному экстремальному загрязнению, позволит восстановить активность даже самых чувствительных к загрязнению микроорганизмов – автотрофных нитрификаторов или заменить их более устойчивой альтернативной группой – гетеротрофными нитрификаторами (Naz et al., 2022).

Цель исследования: изучить процессы цикла азота в техногенно нарушенных почвах углеотвалов и бывшего шламонакопителя, а также эффективность применения нитрифицирующих бактерий в деструкции ПАУ.

Основные задачи исследования:

1. Проанализировать микробную трансформацию азота в почвах углеотвалов для выявления наиболее чувствительного к техногенному воздействию процесса.

2. Оценить состав и адаптационный потенциал сообщества нитрификаторов при длительном загрязнении почв бывшего шламонакопителя экстремально высокими концентрациями Zn.

3. Изучить процессы нитрификации в почвах при краткосрочном искусственном загрязнении Zn.

4. Оценить эффективность применения накопительной культуры нитрифицирующих микроорганизмов при ремедиации почв углеотвалов.

Научная новизна.

Впервые проанализирована активность ферментов гетеротрофной нитрификации – диоксигеназы пировиноградного оксима и нитроалканоксидазы в почвах. Впервые проанализирована активность автотрофной и гетеротрофной нитрификации в загрязненных почвах для сравнения устойчивости данных процессов к воздействию поллютантов. Обнаружено, что при длительном экстремальном загрязнении Zn в почве формируется сообщество нитрификаторов с доминированием комаммокс-бактерий Nitrospirota и бактерий, окисляющих пировиноградный оксим. Предложено использование консорциума из денитрифицирующих и деградирующих ПАУ бактерий и автотрофных нитрификаторов для увеличения эффективности ремедиации техногенно нарушенных почв за счет образования нитрата как акцептора электронов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Активность автотрофной нитрификации в техногенно нарушенных почвах углеотвалов является более чувствительной к загрязнению ТМ по сравнению с активностью ферментов цикла азота: нитратредуктазы, нитритредуктазы и уреазы. Засоление и подкисление почвы увеличивают подвижность ТМ и усиливают их отрицательное действие на процессы нитрификации. Накопление ПАУ в эмбриоземах в концентрации свыше 6 000 нг/г не оказывает выраженного ингибирующего воздействия на нитрификацию. В черноземе обыкновенном, лугово-черноземной почве и почвах углеотвалов доминируют аммоний-окисляющие археи *Nitrososphaerota*.

2. При краткосрочном загрязнении Zn лугово-черноземной почвы активность нитрификации снижается значительно, чем при длительном экстремальном загрязнении Zn хемоземов бывшего шламонакопителя. Многолетнее экстремальное загрязнение почв полностью изменяет состав нитрифицирующего сообщества: среди автотрофов доминируют комаммокс бактерии *Nitrospirota*, а среди гетеротрофов – бактерии, окисляющие пировиноградный оксим. В геномах нитрификаторов отмечается высокое обилие генов *copB*, *cusAB*, *czcABC*, *zntA*, *zurT*, ответственных за синтез белков системы экспорта ТМ из клетки.

3. Консорциум бактерий, состоящий из окисляющей аммоний *Nitrosomonas communis*, окисляющей нитрит *Nitrolancea* и денитрифицирующего ПАУ-деструктора *Enterobacter ludwigii*, является эффективным при ремедиации загрязненных ПАУ почв. Нитрификаторы усиливают деградацию ПАУ в почве за счет образования нитрата как акцепторов электронов.

Теоретическое и практическое значение. Изучен адаптационный потенциал сообщества нитрифицирующих микроорганизмов в экстремально загрязненных почвах. Отмечено доминирование аммоний-окисляющих архей в незагрязненных почвах и почвах углеотвалов и комаммокс бактерий, гетеротрофных нитрификаторов в хемоземах бывшего шламонакопителя. Рассмотрены новые механизмы детоксикации микроорганизмами токсичных

соединений – гидроксилamina и окиси азота, образующихся в процессе нитрификации в загрязненных почвах.

Предложен новый принцип, согласно которому деградация ПАУ усиливается за счет образования нитрифицирующими микроорганизмами акцептора электрона – нитрата. Получен микробный консорциум из автотрофных нитрификаторов и денитрификатора, применение которого позволяет эффективно восстанавливать загрязненные ПАУ почвы за счет деградации фенантрена и пирена.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Тема диссертационной работы соответствует паспорту специальности 1.5.19. Почвоведение пунктам «7. Теоретические и научно-методические вопросы биологии и биохимии почв», «9. Теоретические и научно-методические вопросы экологического почвоведения» и пункту «10. Почва в глобальном круговороте углерода и других биогенных элементов» и паспорту специальности 1.5.15. Экология пунктам «1. Закономерности влияния абиотических и биотических факторов на организмы. Экофизиология (факториальная экология). Адаптации организмов к различным факторам среды. Жизненные формы и адаптивные типы. Изменение организмами среды обитания», «7. Циклы биогенных элементов в экосистемах, биомах и биосфере в целом. Глобальные процессы в биосфере, обусловленные деятельностью организмов» и «10. Антропогенное воздействие на популяции, сообщества и экосистемы. Биологические эффекты загрязнения среды токсичными веществами (экотоксикология). Разработка биологических методов и критериев оценки состояния среды, биоиндикация, биотестирование, биомониторинг. Разработка экологически обоснованных норм воздействия хозяйственной деятельности человека на живую природу».

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обусловлена соблюдением используемой общепринятой методологией выполняемых работ в почвоведении и микробиологии, количеством полевых и лабораторных повторностей. Использовались гостированные методики, применена статистическая обработка экспериментальных данных.

Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на международных и российских конференциях, международных научных школах, форумах и съездах: «Эволюция почв и развитие научных представлений в почвоведении» в 2022; «Ломоносов» в 2022 и 2024; «Инженерная экология» в 2023, «Мониторинг, охрана и восстановление почвенных экосистем в условиях антропогенной нагрузки» в 2022, 2023 и 2024; «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» в 2022; «Современное состояние черноземов» в 2023; «Степная Евразия – устойчивое развитие» в 2022; «Матрица почвоведения» в 2023; «Эволюция биосферы, биогеохимические циклы и биогеохимические технологии: связь фундаментальных и прикладных исследований» в 2023; «Здоровье почвы – гарант устойчивого развития» в 2023; X съезд Общества почвоведов им. В.В. Докучаева в 2024.

Личный вклад автора. Экспериментальная работа, обработка, анализ и описание результатов выполнены лично автором в период с 2021 по 2025 год. Лабораторные анализы проведены на кафедре почвоведения и оценки земельных ресурсов, а также в лаборатории «Биоинженерия ризосферы» Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета.

Публикации. По теме диссертационного исследования опубликовано 6 работ, входящих в международные библиографические и реферативные базы данных Scopus и Web of Science.

1. Heterotrophic nitrification in soils: Approaches and mechanisms / E. P. Pulikova, A. V. Gorovtsov, Ya. Kuzyakov [et al.] // Soil Biology and Biochemistry. – 2025. – Vol. 202. – P. 109706. – DOI 10.1016/j.soilbio.2024.109706. K1

2. Effects of bulk forms and nanoparticles of zinc and copper oxides on the abundance, nitrogen cycling and enzymatic activities of microbial communities, morphometric parameters and antioxidant status of *Hordeum vulgare* L. / E. P. Pulikova, F. D. Ivanov, I. A. Alliluev [et al.] // Environmental Geochemistry and Health. – 2024. – Vol. 46, No. 12. – P. 494. – DOI 10.1007/s10653-024-02258-y. K1

3. Soil physicochemical and microbial properties affect nitrogen cycling in technogenically transformed coal dump soils / E. P. Pulikova, K. A. Demin, F. D. Ivanov

[et al.] // Applied Soil Ecology. – 2024. – Vol. 202. – P. 105562. – DOI 10.1016/j.apsoil.2024.105562. K1

4. New Approaches for Assessing the Transformation of Soil Microbial Communities in the Soil Surface Horizons of Rostov-on-Don / E. P. Pulikova, F. D. Ivanov, E. S. Lacynnik [et al.] // Eurasian Soil Science. – 2025. – Vol. 58, No. 5. – P. 1-10. – DOI 10.1134/S106422932460386X. K1

5. Microbiological status of natural and anthropogenic soils of the Taganrog Bay coast at different levels of combined pollution with heavy metals and PAHs / E. P. Pulikova, F. Ivanov, A. V. Gorovtsov [et al.] // Environmental Geochemistry and Health. – 2023. – Vol. 45, No. 12. – P. 9373-9390. – DOI 10.1007/s10653-022-01405-7. K1

6. Pulikova E. P. Nitrogen cycling processes in urban soils: stocks, fluxes, and microbial transformations / E. P. Pulikova, A. V. Gorovtsov // Soils in Urban Ecosystem / A. Rakshit, S. Ghosh, V. Vasenev, H. Pathak, V. D. Rajput (eds.). – Singapore: Springer Nature, 2022. – P. 101-135. – DOI 10.1007/978-981-16-8914-7_6. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-16-8914-7_6 (data access 10.07.2025)

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 143 страницах, содержит 15 таблиц, 35 рисунков. Список литературы включает 292 источника, из них 269 на иностранных языках.

Финансовая поддержка работы. Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2023-587, FENW-2024-0001 и Программы стратегического академического лидерства Южного федерального университета («Приоритет 2030»).

Благодарности. Автор выражает особую благодарность научному руководителю доктору биологических наук, профессору Т.М. Минкиной за руководство и содействие в написании работы, и научному руководителю доценту кафедры биохимии и микробиологии Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета кандидату биологических наук А.В.

Горовцову за руководство, поддержку и ценные советы. Автор выражает благодарность К.А. Дёмину за содействие в обработке метагеномных данных, и всем сотрудникам кафедры почвоведения и оценки земельных ресурсов, сотрудникам кафедры экологии и природопользования, сотрудникам лаборатории «Агробиотехнологии для повышения плодородия почв и качества сельскохозяйственной продукции», научно-исследовательской лаборатории мониторинга биосферы Академии биологии и биотехнологии Южного федерального университета и сотрудникам Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН за помощь в проведении исследований на разных этапах.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Влияние загрязнения на микробиом почв

Современные процессы урбанизации и индустриализации трансформируют природные ландшафты, оказывая разрушительное воздействие на почвенный покров. Помимо механического воздействия на почву в процессе промышленной деятельности также образуются токсифабрикаты. Токсифабрикаты, представляющие собой токсичные химически активные материалы, могут способствовать образованию техногенно нарушенных почв, поскольку они препятствуют нормальному почвообразовательному процессу и требуют специальных дезактивационных мероприятий для безопасного использования. К источникам таковых материалов относятся шламо- и хвостохранилища токсичных отходов промышленных предприятий; отвалы вскрышных пород и других месторождений; вязкие нефтепродукты; городские отходы, содержащие ядохимикаты и минеральные удобрения; незакрытые отвалы промышленных предприятий (Коркина, 2015).

Угольная промышленность вносит значительный вклад в экономическое развитие страны, однако в то же время оказывает огромное неблагоприятное воздействие на земельные ресурсы (Feng et al., 2019). Топливо-энергетическая отрасль, связанная с разработкой угольных месторождений подземным (шахтным) способом, приводит к образованию антропогенных морфоструктур – породных углеотвалов, которые оказывают деструктивное воздействие на зональные почвенные экосистемы. В России крупнейшими угольными бассейнами являются Кузнецкий, Печорский, Южно-Якутский и восточная часть Донецкого бассейна (Восточный Донбасс). Последний, с разведанными запасами угля в 6,5 млрд т, занимает почти всю центральную часть Ростовской области (Экологический вестник Дона..., 2019). Вся северо-западная часть Ростовской области связана с угледобывающей отраслью и в настоящее время является одним из наиболее проблемных в экологическом отношении регионов. На территории Ростовской области находится не менее 600 углеотвалов (Большенко, 2006).

Добыча угля приводит к сокращению площади растительного покрова, изменению ландшафта, нарушению гидрологического режима почв (Feng et al., 2019; Sleptsov, 2020). В отвалах угольных шахт содержатся избыточные содержания Zn, Cu, Ni, Pb, Cd и Cr (Ribeiro et al., 2010; Silva et al., 2010). Эти металлы в основном образуются в результате окисления некоторых легко выветриваемых и богатых металлами минералов, в частности железного колчедана (FeS_2), сфалерита (ZnS) и халькопирита (CuFeS_2) (Ribeiro et al., 2010). В почвах, прилегающих к углеотвалам, также обнаруживаются значительные концентрации углеводородов, как алифатических, так и полиароматических (Ouyang et al., 2018; Dudnikova et al., 2023). В почвах преобладают двух-, трех- или четырехкольчатые ПАУ (Ouyang et al., 2018). Они могут изначально присутствовать в угле или образовываться при сгорании угля во время горения углеотвалов (Liu et al., 2012; Mukhopadhyay et al., 2017). ПАУ, так же как и ТМ, являются приоритетными загрязнителями, сильными химическими канцерогенами и тератогенами (Lawal, 2017). Они могут накапливаться в окружающей среде и биологических системах, представляя угрозу для живых организмов, включая человека (Bansal, Kim, 2015).

Помимо угольной промышленности химическая промышленность является одной из наиболее развитых и значимых отраслей в стране, однако сточные воды промышленных предприятий представляют собой серьезную угрозу для окружающей среды, в особенности для почвенного покрова. Шламонакопители представляют собой искусственные водоемы, в которых накапливаются осадки из сточных вод промышленных предприятий. Сточные воды содержат разнообразные вредные компоненты: кислоты, ТМ, а также другие органические и неорганические соединения. При изготовлении вискозного волокна используются растворы серной кислоты, сульфата натрия, аммония и цинка. Утилизация шламонакопителей требует специализированных технологий и оборудования. Процесс включает в себя откачивание шлама, его обезвоживание и дальнейшую переработку. Однако, несмотря на рекультивационные мероприятия, в почве на протяжении долгого периода содержится экстремально высокое содержание поллютантов (Циркина, 2010).

Загрязнение почвенного покрова в результате добычи полезных ископаемых и складирования отходов промышленности является глобальной проблемой, влияющей на здоровье человека, продовольственную безопасность, сохранение биоразнообразия, микробиологический статус почв, от которого напрямую зависит здоровье и плодородие почвы (Abdu et al., 2017; Aponte et al., 2021; Faskhutdinova et al., 2021; Khan et al., 2021; Qin et al., 2021). Микроорганизмы и ферменты играют важную роль в биогеохимических циклах почвы как основные движущие силы биохимических реакций (Basu et al., 2021). Изменение микробного сообщества почв, испытывающих на себе влияние промышленности, может негативно отражаться на содержании элементов минерального питания в почвах (P, K и N) (Ezeokoli et al., 2019; Arcila-Galvis et al., 2022). Для оценки состояния почвы вблизи антропогенных источников, а также с целью разработки эффективных стратегий рекультивации почв изучаются ее различные физические, химические и биологические свойства (Mukhopadhyay et al., 2016). Разнообразие микробных сообществ почвы и ферментативная активность (дегидрогеназы, глюкозидазы, щелочные и кислые фосфатазы, уреазы, инвертазы, полифенолоксидаза и т. д.) часто используются для мониторинга круговорота питательных веществ, переноса энергии в почве и эффективности процессов рекультивации почв (Li et al., 2012; Maiti, Ahirwal, 2019). В настоящее время исследования в основном сосредоточены на изучении негативного влияния механизированной добычи угля на микробные сообщества почвы. Несмотря на это, лишь в немногих исследованиях изучалось, как отходы отвалов угледобычи влияют на микробиологические, физиологические и метаболические процессы в почвах, окружающих районы добычи, которые могут использоваться в сельском хозяйстве (Jiang et al., 2021).

Микробное разнообразие в деградированных почвах обычно ниже, чем в плодородных, здоровых почвах. В почве естественного леса обнаружено большее количество генов, связанных с круговоротом C, круговоротом P, S и N по сравнению с заросшими растительностью террасами отвалов (Arcila-Galvis et al., 2022). Множественный корреляционный анализ между бактериальными сообществами и геохимическими параметрами показал, что pH, общий

органический С, общий N, As, Pb и Cu были основными факторами, влияющими на структуру бактериальных сообществ (Liu et al., 2019; Kou et al., 2023).

Зачастую поллютанты в почве снижают активность микроорганизмов, однако микробные сообщества способны вырабатывать устойчивость к загрязняющим веществам посредством различных механизмов адаптации (Naz et al., 2022), таких как экспрессия специфических генов и физиологические изменения, замена чувствительных видов на толерантные, изменения во взаимодействиях микробов и адаптивные мутации (Azarbad et al., 2015; Li et al., 2017). Особенно интересны механизмы адаптации микробных сообществ, подвергшихся длительному экстремальному загрязнению. Например, в почвах, хронически загрязненных Pb, As и Zn, была обнаружена разнообразная структура микробного сообщества, а в почвах, загрязненных ПАУ, было обнаружено обилие ПАУ-деградирующих штаммов микроорганизмов (Epelde et al., 2015; Ma et al., 2022).

В загрязненных почвах изменяется состав сообщества в сторону увеличения численности толерантных к поллютантам штаммов микроорганизмов. Так, представители *Pseudomonadota* доминировали в почве с высоким содержанием потенциально токсичных элементов (Jiang et al., 2021; Yin et al., 2023). Наличие высоких концентраций ТМ сформировало микробиом и резистом почв хвостохранилища шахты, где было обнаружено 76 генов, ответственных за устойчивость к ТМ (Jiang et al., 2021). Преобладание протеобактерий в пластовых водах углеотвалов указывает на вероятную деградацию ароматических углеводов, связанную с органикой угля (Jha et al., 2022). Более того, в исследовании было установлено, что внесение различных ароматических соединений приводит к обогащению микркосма субстрат-специфическими сообществами микробов (Campbell et al., 2021). Было показано, что длительный контакт с ароматическими соединениями стимулирует бактериальные штаммы использовать ПАУ в качестве источника С и энергии (Smulek et al., 2020).

Рассмотрение фундаментальных функций почвенных микроорганизмов, таких как преобразование азота в загрязненных почвах, может дать ценную

информацию об аспектах восстановления и управления этими территориями, поскольку азот является жизненно важным питательным элементом для всех форм жизни (Liang, et al., 2021; Kumari, Maiti, 2022; Zhong et al., 2023). О связи между активностью ферментов цикла азота и свойствами почвы при долгосрочном воздействии ТМ и ПАУ известно немного (Ciarkowska et al., 2014; Feng et al., 2019). Изучение динамики трансформации азота в техногенно нарушенных почвах информативно для понимания механизмов восстановления почвенного покрова посредством ремедиации (Kumari, Maiti, 2022).

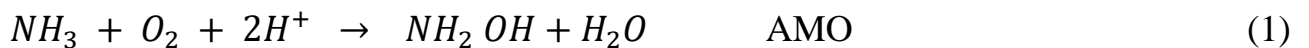
1.3 Основные процессы цикла азота в почве

Азот играет важную роль в биогеохимических циклах, поэтому с его трансформацией в природе связаны такие важнейшие проблемы современной биологии, как сохранение биологического разнообразия и устойчивое развитие биосферы (Звягинцев, 1991; Умаров и др., 2007). Циклы углерода и азота сильно взаимосвязаны в почве, тем не менее участие микробиоты почв в глобальном круговороте химических элементов относительно хорошо изучено только для углерода (Умаров и др., 2007; Menyailo et al., 2018).

Цикл азота в почве состоит из основных процессов: азотфиксации, аммонификации, нитрификации и денитрификации. Большой запас азота представлен в виде молекулярного N_2 в атмосфере. Растения не способны усваивать такой азот, поэтому они получают его в виде неорганических соединений в почве, которые образовались в результате ферментативной реакции фиксации атмосферного азота нитрогеназами бактерий. Неорганический азот из органического возвращается в почву в процессе минерализации, а именно аммонификации. Содержание аммония в почве обычно незначительно, но в отличие от иона нитрата, который находится в почвенном растворе, аммоний, будучи всегда в комплексе, пребывает в фиксированном состоянии. Его концентрация зависит от количества поступающего органического азота и от количества углеродсодержащих соединений (Андреюк, Валагурова, 1992).

Аммонийный азот частично окисляется в нитраты. Этот процесс называется нитрификацией, которая осуществляется нитрифицирующими микроорганизмами (Шлегель, 1987). Нитрификаторы представлены двумя группами, каждая из которых проводит один из двух этапов окисления азота. Бактерии, окисляющие аммоний до нитрита, принадлежат к родам *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio*. Из бактерий, осуществляющих вторую фазу нитрификации (превращение нитрита в нитраты), лучше других изучены представители родов *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*, *Nitrospina* (Практикум по микробиологии, 2005; Умаров и др., 2007). Также известны аммоний-окисляющие археи, вклад которых в процесс нитрификации может преобладать над вкладом бактерий (Gubry-Rangin et al., 2010). Ранее предполагалось, что ни один микроорганизм не способен окислять одновременно аммоний и нитрит в одной и той же клетке, но недавние исследования показали, что бактерии рода *Nitrospira* могут полностью окислять аммоний до нитрата (комаммокс) (Hu et al., 2017; 2021).

Аэробные автотрофные аммоний-окисляющие бактерии (АОВ) и археи (АОА) окисляют аммоний до гидроксиламина с помощью аммоний монооксигеназы (АМО) (ур. 1). Затем образуется оксид азота с участием гидроксиламиноксидоредуктазы (НАО) и медного металлоферментного комплекса (Cu-МЕ) у бактерий и архей, соответственно (Stein, 2019) (ур. 2). Затем оксидоредуктаза оксида азота (нитрозоцианин или нитрит редуктаза *nirK*) превращает оксид азота в нитрит (ур. 3). Окисление нитрита, основной биохимический путь, по которому образуется нитрат, катализируется нитритоксидоредуктазой (NXR) (ур. 4) (Kuypers et al., 2018; Stein, 2019).



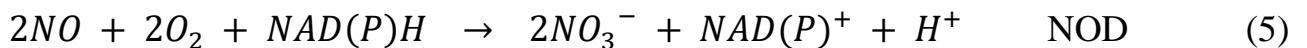
Помимо автотрофных бактерий, к нитрификации способны и многие гетеротрофы, и их вклад в общую нитрификацию может превышать вклад

автотрофной нитрификации (Zhang et al., 2023; Pulikova et al., 2025). Гетеротрофная нитрификация является гораздо менее изученным процессом. Это образование гидроксиламина, нитрита и нитрата гетеротрофными микроорганизмами посредством окисления неорганических или органических соединений азота. В неблагоприятных для автотрофных нитрификаторов условиях основными производителями нитрата являются гетеротрофные нитрификаторы (Li et al., 2018; Zhang et al., 2018). Гетеротрофную нитрификацию осуществляют представители различных групп микроорганизмов: плесневые грибы, дрожжи, бактерии (Wainwright, 1995; Hagihara et al., 2018; He et al., 2020; Martikainen, 2022; Gao et al., 2023). Многие почвенные денитрифицирующие бактерии являются гетеротрофными нитрификаторами, которые в аэробных условиях окисляют нитриты до нитрата, а после этот же нитрат (в благоприятных для денитрификации условиях) восстанавливают до промежуточных продуктов денитрификации или до молекулярного азота. Осуществляется процесс восстановления такими же ферментами, что и при обычной денитрификации. В отличие от обычных денитрификаторов, гетеротрофные нитрифицирующие бактерии способны денитрифицировать и в аэробных условиях (Wrage et al., 2001). Некоторые из них (*Thiosphaera pantotropha*) способны осуществлять одновременно гетеротрофную нитрификацию и аэробную денитрификацию. Автотрофные нитрификаторы тоже способны к денитрификации, которая обеспечивает их дополнительной энергией. Преимущественно восстановление нитрита проходит в условиях недостатка кислорода (Умаров и др., 2007).

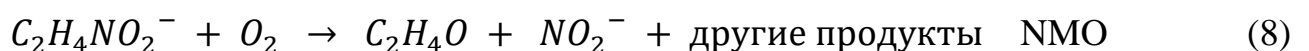
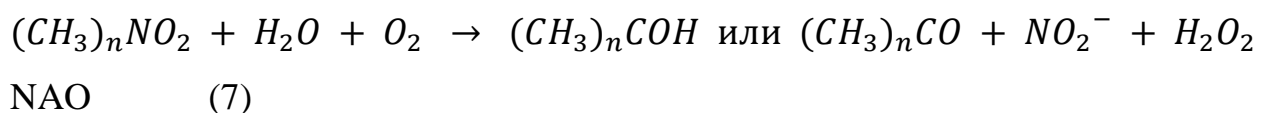
Первый путь (рисунок 1) гетеротрофной нитрификации характеризуется окислением неорганических соединений азота (аммония, гидроксиламина) до нитрита и нитрата в присутствии органических соединений (Li et al., 2018). Органическими субстратами, ускоряющими нитрификацию, являются ацетат, сукцинат, цитрат, пируват, фумаровая кислота, глюкоза, сахароза, лактат и другие (Huang et al., 2013; Yang et al., 2019). Бактерии, окисляющие аммоний в присутствии источников органического вещества, имеют ферменты, схожие с ферментами автотрофных нитрификаторов (гены *amo*, *hao*, *nxr*) (Boer, Kowalchuk,

2001; Zhu et al., 2020). Помимо окисления нитрита, NXR выполняет еще одну функцию — восстановление нитрата (Chicano et al., 2021). Гетеротрофные нитрификаторы окисляют азот без получения энергии. Источником энергии является окисление органических соединений посредством аэробного дыхания (Guo et al., 2013). Биологическая роль гетеротрофной нитрификации обсуждается в некоторых обзорах, но не до конца понятно, почему нитрификаторы окисляют аммоний до нитрита, если не производится энергия. Одним из обоснований окисления азота гетеротрофными микробами является сопряженная нитрификация-денитрификация, которая приводит к производству энергии и росту. Этот процесс может повысить конкурентоспособность в изменяющихся условиях окружающей среды (Martikainen, 2022). Уравнения 1-4 описывают активность ферментов, общих для автотрофной и гетеротрофной нитрификации.

Диоксигеназа оксида азота (NOD) (ур. 5) является важным исключением, поскольку она встречается только у гетеротрофных нитрификаторов:



Второй путь нитрификации характеризуется окислением органического азота. В органической трансформации азота участвуют другие ферменты, уникальные для гетеротрофной нитрификации: диоксигеназа пировиноградного оксида (POD), нитроалканоксидаза (NAO) и нитронатмонооксигеназа (NMO) (ур. 6-8):



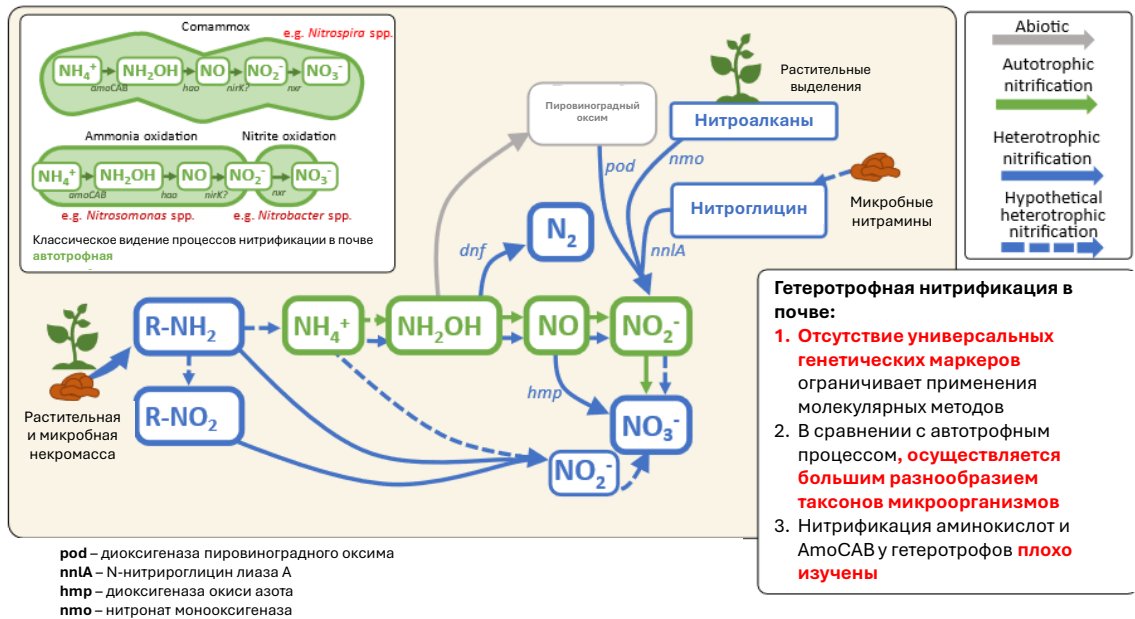
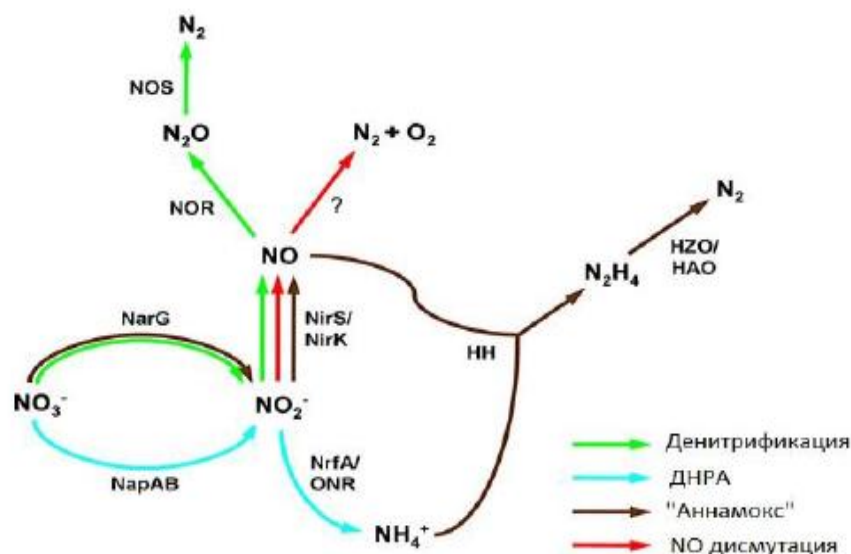


Рисунок 1 – Пути автотрофной и гетеротрофной нитрификации бактерий (Pulikova et al., 2025)

Судьба нитрата, образовавшихся в процессе нитрификации, разнообразна. Один из видов утилизации нитрата и нитрита – это их восстановление, в результате чего азот переходит в более восстановленную форму. Этот процесс называется денитрификация (рисунок 2), который осуществляется в анаэробных условиях с образованием молекулярного азота и оксидов азота. Энергетическое значение денитрификации для клетки заключается в том, что в анаэробных условиях во время брожения из субстрата извлекается намного меньше энергии в виде АТФ, нежели при аэробных условиях в результате фосфорилирования. В анаэробных условиях в процессе биохимической эволюции возник и сохранился такой тип метаболизма, который возможен в отсутствии молекулярного кислорода за счет того, что водород от органического субстрата переносится на «связанный кислород». «Носителями кислорода» являются нитраты, сульфаты, карбонаты и прочие соединения. От дыхания данный тип метаболизма отличается конечным акцептором, в первом случае это кислородсодержащие соединения, во втором – молекулярный кислород, поэтому такой процесс называется анаэробным дыханием. Все бактерии такого рода обладают системой переноса электронов,

содержат цитохромы (Шлегель, 1987). Основные пути превращения нитрита и нитрата представлены на рисунке 2.



? – неохарактеризованный на сегодняшний день фермент, Nar – мембраносвязанная нитратредуктаза, Nar – периплазматическая нитратредуктаза, HZO – гидразинокисляющий фермент, HH – гидразингидролаза, Nir – нитритредуктаза, NOR - NO редуктаза, NOS – N₂O редуктаза, Nrf – нитритредуктаза, ONR- цитохромередуктаза, ДНРА – диссимиляционная нитритредукция до аммония (Kumar, Lin, 2010)

Рисунок 2 – Возможные пути восстановления нитрата до газообразного N: процессы, ферменты, промежуточные соединения

Утилизация нитрата у микроорганизмов идет несколькими путями: ассимиляционная нитратредукция – извлечение азота на синтез азотсодержащих соединений клетки, и диссимиляционная нитратредукция с выходом конечных соединений из клетки (Шлегель, 1987). Диссимиляционная нитратредуктаза кодируется *nar* и *nar* генами, ассимиляционная – *nas* геном.

Первый этап восстановления нитрата происходит в присутствии нитратредуктазы двух типов: одна встроена в цитоплазматическую мембрану (Nar), другая находится в периплазматическом пространстве (Nar). Все они в активном центре содержат молибденовый кофактор. Индуцируется Nar наличием нитрата и нитрита, а также геном *fnr*, который активизируется только в анаэробных условиях.

Экспрессия генов и синтез Nap сохраняется и в присутствии кислорода (Zumft, 1997). Дальнейшее превращение нитрита осуществляется тремя различными ферментами. Фермент NrfA и NirBD (диссимиляционная нитритредукция до аммония), локализованный в периплазме, представляет собой цитохром c, который восстанавливает нитрит до аммония, тогда как ферменты NirK и NirS восстанавливают нитрит до оксида азота (Cruz-Garcia et al., 2007).

Диссимиляционная нитритредуктаза восстанавливает нитриты до окиси азота. Различают два типа нитритредуктаз. Три четверти изученных денитрификаторов являются обладателями нитритредуктазы cd1Nir-типа, остальные имеют CuNir-тип нитритредуктазы. Оба типа локализованы в периплазматическом пространстве (Умаров, Кураков, Степанов, 2007). Два типа нитритредуктаз не являются структурно родственными и содержат разные простетические группы. Один содержит Cu в качестве окислительно-восстановительного активного металла (CuNir), а другой использует Fe, связанное с гемом (cd1) (Zumft, 1997; Lory, 2013).

Редуктаза окиси азота (NOR) – отдельный фермент в цепи денитрификации, который связан с мембраной. Он является механизмом защиты, восстанавливая окись азота до закиси азота, снижая токсическое воздействие окиси азота на клетку (Умаров, Кураков, Степанов, 2007). Хотя метаболизм NO является врожденным для денитрификаторов, соединение токсично и для этой группы бактерий. Токсичность NO является следствием его реакционной способности с белками, содержащих переходные металлы, и кислородом и его способности реагировать с аминами и тиолами. Fe и Cu-содержащие ферменты являются основными мишенями NO. NO мутагенен по отношению к бактериальной ДНК. В микроаэрофильных или аэробных условиях экспрессия NO редуктазы подавляется при относительно высоких концентрациях кислорода (Zumft, 1997).

Редуктаза закиси азота (NOS) осуществляет последний этап денитрификации. Посредством восстановления закиси азота в молекулярный азот (Умаров и д., 2007). Nos является гомодимером с четырьмя атомами Cu на субъединицу. Один из медных центров был структурно определен как сайт CuA

(Lory, 2013). Две субъединицы фермента локализованы на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Многие денитрифицирующие бактерии растут за счет N_2O в качестве единственного акцептора электронов для окисления органических соединений, это отражает роль обязательного свободного промежуточного соединения N_2O . Участие комплекса цитохрома *bc1* в восстановлении N_2O было продемонстрировано для *Pseudomonas denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodobacter capsulatus*. Перенос электрона через цитохром *bc1* сопровождается переносом протона через мембрану (Zumft, 1997).

Активный процесс денитрификации является причиной обеднения почв N, в том случае, он усиливается, когда почва излишне уплотнена и в ней созданы анаэробные условия (Гусев, Минеева, 2003), но есть и полезные аспекты данного процесса. Одним из них является уменьшение кислотности почвы, повышение ее окислительно-восстановительного потенциала, биосинтез некоторых биологически активных соединений (Андреюк, Валагурова, 1992).

1.4 Влияние ТМ на процессы цикла азота

ТМ были определены как важный фактор, влияющий на денитрификацию (Hui-Juan et al., 2018). Например, Cu является структурным компонентом ферментов, кодируемых генами *nirK* и *nosZ*, а молибдат-ион является компонентом для Mo-кофактора нитратредуктазы, ион Fe необходим для цитохромных субъединиц нитрат- и нитритредуктаз. Отсутствие этих металлов может привести к снижению скорости денитрификации и увеличению эмиссии закиси азота – при отсутствии ионов Cu (Saggar et al., 2013).

Влияние ТМ на активность денитрификации разнообразно и характер воздействия (увеличение/уменьшение денитрифицирующей активности, обилия микробов, эмиссии N_2O) зависит от многих факторов. Таковыми факторами являются доступность и сорбция металлов, которая может отличаться в зависимости от конкретного металла, кислотности почвы, гранулометрического состава, состава сообщества микроорганизмов, формирующегося в разных почвах (Kandeler et al., 1996; Markiewicz-Patkowska, 2005; Shun et al., 2018).

Предполагалось, что ферменты денитрификации очень чувствительны к ТМ, так как они обычно находятся внутри клеточной мембраны или периплазматического пространства. Поэтому было предположено, что денитрификаторы адаптировались, выбрав металлоустойчивые формы ферментов. Состав сообщества в загрязненной металлами среде может измениться в сторону увеличения металл-толерантных бактерий. Таким образом, сообщество денитрифицирующих микробов адаптируется к повышенным уровням Рb путем выбора устойчивых к металлу форм нитритредуктаз (Sobolev, Begonia, 2008). Выделенные денитрификаторы из загрязненных почв показали большую устойчивость N_2O -редуктазы к Cd, Cu и Zn, нежели ферменты, восстанавливающие нитрат до закиси азота (Holtan-Hartwig et al., 2002).

Zn, Pb, Cu и Cd оказывают существенное влияние на количество денитрифицированного азота. Перечисленные металлы могут усиливать высвобождение N_2O (Hui-Juan et al., 2018). Даже при низких концентрациях Cu активность денитрификаторов снижалась в литоральных песчаных отложениях, что приводило к накоплению как N_2O , так и NO_2^- , а также к замедлению скорости поглощения NO_3^- (Magalhães et al., 2011). Редуктаза закиси более чувствительна к ТМ (Cd, Cu, Zn), поэтому на восстановление ее активности уходит больше времени, чего нельзя сказать о нитрат/нитрит редуктазах, активность которых в почве уже после двух месяцев полностью восстанавливается (Holtan-Hartwig et al., 2002).

Активность денитрификаторов сильно отрицательно коррелировала с концентрациями Cu, Zn, содержание которых повышалось по мере приближения к автомобильной трассе (Nikolaeva et al., 2019). К значительному загрязнению Cu в почвах рисовых полей особенно чувствительны денитрификаторы, содержащие *nirK* и *nosZ*, (Liu et al., 2016; 2018). Концентрации 25 и 50 мг Hg/кг сухой почвы, наоборот, оказывают кратковременное стимулирующее действие на денитрифицирующую активность (Zhou et al., 2012).

Среди микроорганизмов чувствительной к загрязнению ТМ группой являются нитрификаторы. Активность нитрификации включена в Перечень избранных микробных индикаторов и методов, используемых для мониторинга

смесей загрязняющих веществ (Ramakrishnan et al., 2011). К представителям автотрофной нитрификации относятся аммоний-окисляющие археи, такие как *Thaumarchaeota* (Zhalnina et al., 2012), а также представители β -протеобактерий и γ -протеобактерий, нитрит-окисляющие представители α -протеобактерий, β -протеобактерий, γ -протеобактерий, а также *Nitrospirota*, *Chloroflexota*, *Nitrospinota* и *Nitrospinota* (Hayatsu et al., 2021). Численность и активность этих групп часто используются в качестве биоиндикаторов загрязнения окружающей среды (Li et al., 2020). Активность нитрификации может снизиться в четыре раза при загрязнении почвы Zn в 240 мг/кг (Tang et al., 2020; Lu et al., 2022). Отмечено снижение активности нитрификации в почвах загрязненных Pb, Cu, Cd и Zn (Nieder, Benbi, 2008; Zheng et al., 2017).

Микроэлементы в концентрации 5 мкмоль/г почвы Ag, Hg, Cd, Ni, Cr, Pb, B, Al, Se и Mo являются наиболее сильными ингибиторами нитрификации (Khan, 2000; Yan et al., 2013). Активность нитрификации чувствительнее к Cu, относительно процессов минерализации, поэтому даже низкие концентрации Cu (10-100 мкг/г), добавленные в песчаную и аллювиальную почву, показывают значительное негативное влияние на рост нитрификаторов (El-Ghamry et al., 2000; Kostov, Van Cleemput, 2001). Дисбаланс в процессах трансформации азотистых соединений серьезно влияет на почву и окружающую среду. Например, нарушение денитрификации и нитрификации может привести к загрязнению почвы нитритами и нитратами, выбросу парникового газа (закиси азота) в атмосферу и дефициту азота в почвах (Kumari, Maiti, 2022; Yu et al., 2019). Однако нитрификаторы также способны адаптироваться к длительным условиям загрязнения (Liu et al., 2015a; Ma et al., 2022). Адаптация происходит как среди архей, окисляющих аммоний, так и среди бактерий (Mertens et al., 2009; Liu et al., 2019). Виды комаммокс *Nitrospira* демонстрируют более высокий адаптивный потенциал (Li et al., 2023 a,b). Бактерии комаммокс способны окислять как аммоний, так и нитрит, что отличает их от канонических бактерий, окисляющих только аммоний или нитрит (Daims et al., 2015; Van Kessel et al., 2015).

В настоящее время влияние ТМ на активность гетеротрофной нитрификации в почвах остается практически неизвестным несмотря на то, что данный тип загрязнения широко распространен во всем мире. В почвах, подвергающихся длительному воздействию загрязняющих веществ, структура сообщества нитрифицирующих микроорганизмов изменяется. В загрязненных почвах доминируют представители нитрификаторов, устойчивые к загрязняющим веществам. Они обеспечивают высокую активность нитрификации и прогрессирование последующих стадий процессов цикла азота даже в загрязненных почвах (Ruymers et al., 2010).

1.4 Влияние ПАУ на процессы цикла азота

Существует большое количество исследований, посвященных изучению бактерий, деградирующих алифатические углеводороды в загрязненных почвах (Dombrowski et al., 2016; Kadri et al., 2018; Medić et al., 2020). Разрабатываются эффективные бактериальные консорциумы для очистки загрязненных территорий от токсичных углеводородов (Patowary et al., 2016; Xu et al., 2018), в то время как ПАУ ввиду низкой биодоступности подвергаются деградации значительно труднее (Crampton et al., 2014). По этой причине выделение местных штаммов, деградирующих ПАУ в почве особенно актуально. Внесение бактериального консорциума из аборигенных ПАУ-деструкторов в загрязненную почву приводит к более эффективной биоремедиации почв (Wu et al., 2013; Lu et al., 2019).

Широкая распространенность путей метаболизма, основанных на активности моно- или диоксигеназы, демонстрирует, что аэробные условия благоприятны для разложения ПАУ (Peng et al., 2008). Их разрушение возможно и в анаэробных условиях. Максимально интенсивно деградация ПАУ происходит при сопряжении данного процесса с процессами денитрификации и сульфатредукции (Zhang et al., 2020; Nan et al., 2021). Наличие источника нитрата важно для повышения эффективности биodeградации ПАУ в анаэробных микронивах. Дополнительный источник азота в виде солей нитрата способствует увеличению интенсивности разложения ПАУ (Premnath et al., 2021). Внесение соединений азота увеличивает

численность и разнообразие почвенного микробного сообщества, активирует гены, участвующие в детоксикации ПАУ (Wang et al., 2022).

Некоторые денитрификаторы известны тем, что способны использовать загрязняющие вещества в качестве дополнительных источников С (Throbäck, 2006), например некоторые штаммы *Pseudomonas stutzeri* могут разлагать нафталин, фенантрен и β -кетoadипат, бензоат (Galmés, 2016). К тому же денитрификаторы являются одними из самых разнообразных функциональных групп с представителями почти всех филогенетических групп бактерий, поэтому ниша денитрификаторов менее ограничена относительно аммоний-окисляющих микроорганизмов (Throbäck, 2006). Способность денитрификаторов использовать углеводороды в качестве источника энергии определяет их применение в биоремедиации подземных вод и почв, загрязненных моноароматическими углеводородами. За счет присутствия углеводов может происходить увеличение количества денитрифицирующих микроорганизмов. Снижение активности нитратредуктазы компенсируется увеличением количества денитрифицирующих микроорганизмов (Vazquez-Duhalt, 1989). Также было исследовано влияние углеводов не только на общую нитритредуктазу, но и на разные формы этого фермента. Генотип *nirS* более чувствителен к углеводородам, чем генотип *nirK* (Bissett et al., 2013). Тем не менее в почве с увеличенной концентрацией 2,4,6-тринитротолуола обилие *nirS*-денитрификаторов было выше по сравнению с *nirK*-денитрификаторами, это связано с тем, что денитрификаторы с цитохромсодержащей нитритредуктазой способны разлагать тринитротолуол (Throbäck, 2006). Активность денитрификации в почвах, загрязненных ПАУ, может снижаться по причине ингибирования нитрификации, поскольку продукты жизнедеятельности нитрифицирующих микроорганизмов являются одним из естественных источников нитрата в почве (Li et al., 2020; Hayatsu et al., 2021).

По отношению к углеводородам было обнаружено, что нитрификаторы способны окислять их посредством фермента АМО (Urakawa et al., 2019). Демонстрируется устойчивость сообщества нитрификаторов в почве к воздействию ПАУ (Wu et al., 2016; Manucharova et al., 2021). Распространены

случаи сосуществования автотрофных нитрификаторов и гетеротрофных микроорганизмов ПАУ-деструкторов в различных средах (Sun et al., 2019; Yuan et al., 2020), что указывает на перспективность использования консорциумов нитрификаторов и ПАУ-деструкторов для ремедиации загрязненных почв. Несмотря на большое количество исследований совместного использования автотрофных нитрификаторов и гетеротрофных микроорганизмов для очистки сточных вод (Katipoglu-Yazan et al., 2015; Thandar et al., 2016; Yu et al., 2018; Zhao et al., 2023), для ремедиации почв таких исследований не проводилось.

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Техногенно нарушенные почвы углеотвалов

Восточный Донбасс — крупнейший угольный бассейн на западе России и важный центр добывающей топливно-энергетической промышленности (рисунок 3). Для оценки влияния химического загрязнения на микробиологические процессы цикла азота были отобраны образцы 0-20 см слоя длительно загрязненных почв с подножья углеотвала (эмбриозем – *Epileptic Technosols* по WRB, 2022) шахты «Аютинская» и его склона (технозем – *Spolic Technosols* по WRB, 2022), перекрытого глинистым материалом, а также почв с подножья углеотвала шахты «Майская» (город Шахты, Ростовская область). Основанная в 1943 году угледобывающая компания «Аютинская» прекратила свою деятельность в июле 2006 года из-за подтопления шахт грунтовыми водами. Шахта расположена на северном крыле Грушевско-Несветаевской синклинали в поселке Аюта (город Шахты Ростовской области). По официальным данным, склон отвала был засыпан глинистыми материалами (Экологическая ситуация в городе Шахты, 2022). Шахта «Майская» расположена на южном крыле Грушевско-Несвелаевской синклинали примерно в 9 км западнее микрорайона Майский, который относится к административному округу города Шахты. Эксплуатация шахты «Майская» была прекращена в 90-х годах, но в настоящее время угольный отвал используется как источник материала для дорожного строительства. В результате внутренние массы отвала обнажены, подвержены водной и ветровой эрозии, что приводит к загрязнению прилегающей территории.

В качестве фоновой незагрязненной почвы для сравнения с почвами районов угледобычи исследовался чернозем обыкновенный карбонатный (*Calcic Chernozem* по WRB, 2022; чернозем миграционно-сегрегационный по Классификации почв России, 2004) особо охраняемой природной территории (ООПТ) «Персиановская заповедная степь», расположенной в 22 и 33 км от углеотвалов шахт «Майская» и «Аютинская», соответственно. Морфологическое описание профиля чернозема обыкновенного карбонатного представлено в таблице 9 приложения А.

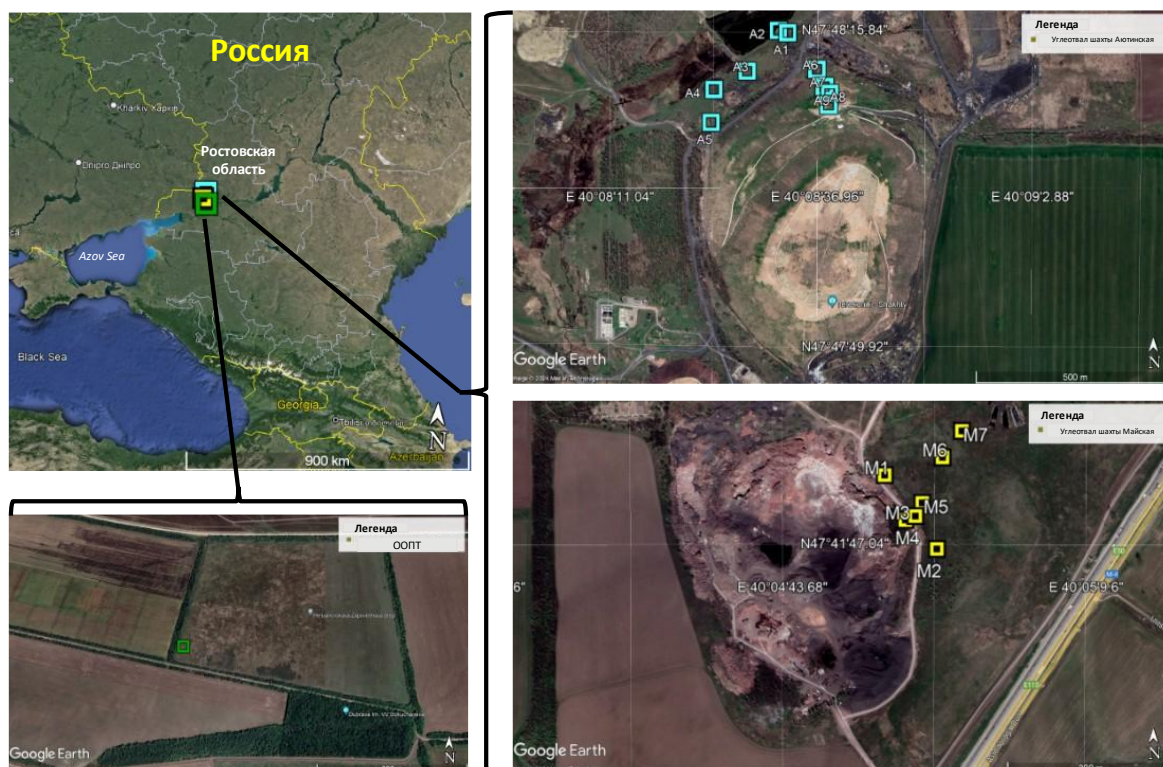


Рисунок 3 – Схематическая карта мест отбора почвенных проб угольных отвалов: угольные отвалы шахт «Аютинская» и «Майская»

2.2 Техногенно нарушенные почвы бывшего шламонакопителя

Для анализа адаптационного потенциала сообщества нитрифицирующих микроорганизмов были выбраны хемоземы (Spolic Technosols по WRB, 2022) с экстремальным уровнем загрязнения ТМ (Zn, Cu, Pb, Cd), расположенные в районе бывшего озера Сорное в пойме реки Северский Донец в Каменск-Шахтинском районе Ростовской области (рисунок 4). С 1950-х до середины 1990-х годов озеро Сорное служило резервуаром для сточных вод химического завода «Каменскволокно». Площадь шламохранилища превышала 0,02 км². За последние 30 лет водоем пересох, и на его поверхности начал формироваться почвенный покров. В настоящее время растительный покров представлен такими видами, как *Verbascum thapsus*, *Phragmites australis*, *Urtica dioica* и различными мхами. В качестве фоновой почвы была использована незагрязненная лугово-черноземная почва (Stagnic Fluvisol Humic по WRB, 2022; чернозем гидрометаморфизованный по Классификации почв России, 2004) поймы реки Северский Донец вблизи (от 1

км) бывшего шламонакопителя озера Сорного. Морфологическое описание профиля лугово-черноземной почвы представлено в таблице 10 приложения А.



Рисунок 4 – Схематическая карта мест отбора хемоземов бывшего шламонакопителя озера Сорное; Фон – незагрязненная лугово-черноземная почва

2.3 Искусственно загрязненные почвы модельного эксперимента

Для определения влияния краткосрочного загрязнения ТМ на активность нитрификации был проведен модельный эксперимент по изучению влияния Zn как доминирующего поллютанта на состояние сообщества нитрифицирующих микроорганизмов тяжелосуглинистых почв естественного ландшафта. В качестве незагрязненной почвы была использована лугово-черноземная почва (Stagnic Fluvisol Humic по WRB, 2022) поймы реки Северский Донец вблизи (от 1 км) бывшего

шламонакопителя озера Сорного (местоположение – N 48°21'06.67", E 40°14'09.57) (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Фото площадок отбора фоновой незагрязненной лугово-черноземной почвы (Stagnic Fluvisol Humic по WRB, 2022) вблизи бывшего шламонакопителя озера Сорного

На площадке площадью 1 м² образцы отбирались по диагонали в пяти точках (слой 0-20 см), из которых составлялась усредненная проба. Свойства использованной в модельном опыте почвы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Физические, физико-химические и химические свойства незагрязненной лугово-черноземной почвы (Stagnic Fluvisol Humic по WRB, 2022), слой 0–20 см

Название типа почвы	pH	CaCO ₃ , %	C _{орг} , %	ЕКО, ммоль/100 г	Сухой остаток, %	Физ. глина, %	Ил, %	Общее содержание Zn, мг/кг
Лугово-черноземная почва	7,32	1,70	2,03	39,4	0,09	53,1	32,4	110

Эксперимент проводился в горшках с закрытой дренажной системой, содержащих 2 кг почвы, очищенной от растительных остатков и просеянной через

сито (ячейка 3 мм). Для насыщения почвы использовались эталонные соединения ZnO (ч.д.а., ZnO, ГОСТ 10262-73). Опыт ставили в трехкратной повторности. При выборе дозы руководствовались государственным нормативом, количество вносимых загрязняющих веществ составило: Zn – 2200 мг/кг (10 ОДК) (ГН 2.1.7.2511-09). Порошкообразный ZnO тщательно перемешивали с почвой и инкубировали в течение трех месяцев. Влажность почвы поддерживали $60 \pm 2\%$ путем внесения дистиллированной воды. Дополнительные удобрения и пестициды в ходе эксперимента не вносили.

2.4 ПАУ-деструкторы и нитрификаторы

Культура ПАУ-деградирующего микроорганизма была выделена из эмбриоземов углеотвала шахты Самбековская (г. Новошахтинск, Ростовская область) методом микробиологического посева. Суммарное содержание ПАУ в почве составляло 6826 нг/г, а содержание бенз[а]пирена превышало ПДК в 19,1 раза. Детальная характеристика штаммов приводится в разделе 3.6. Выделение и анализ ПАУ-деструкторов-денитрификаторов и накопительной культуры нитрификаторов.

Согласно результатам анализа активности нитрификации почв углеотвалов и анализу метагенома для выделения нитрификаторов (Pulikova et al., 2024) был выбран техногенно нарушенный чернозем обыкновенный углеотвала шахты Майская с наибольшей активностью нитрификации и высоким обилием нитрифицирующих микроорганизмов (M7). Выбранный образец характеризуется высоким содержанием ПАУ – 6368 нг/г.

ГЛАВА 3 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Методики отбора и подготовки образцов почвы

Для оценки влияния химического загрязнения и техногенных материалов на микробиологическую активность процессов цикла азота были отобраны образцы эмбриоземов и техноземов (поверхностный слой 0-20 см) со следующих контрастных групп исследуемых участков: подножье угольного отвала шахты «Аютинская» (А1-А5) и шахты «Майская» (М1-М7), склон угольного отвала, перекрытый глинистым материалом шахты «Аютинская» (А6-А9). Для оценки влияния экстремального загрязнения ТМ на активность нитрификации было отобрано 14 образцов хемоземов бывшего шламонакопителя (0-20 см).

Образцы хранились при температуре +4 °С не более недели для микробиологического и метагеномного анализов. Оставшиеся почвы высушивались до воздушно-сухого состояния и просеивались для анализа физических, химических и физико-химических свойств и уровня загрязнения ТМ и ПАУ (ГОСТ 17.4.4.02-2017).

3.2 Определение физических, химических и физико-химических свойств почвы

Анализ гранулометрического состава проводился методом пипетки с пирофосфатной процедурой подготовки почвы (Вадюнина, Корчагина, 1986). Значение рН измерялось потенциометрически в надосадочной суспензии почвы и воды в соотношении 1:2,5 (ГОСТ 26423-85). Содержание карбоната кальция (CaCO_3) — газовольюметрическим методом (Аринушкина, 1970). Содержание плотного остатка определялось по ГОСТ 26423-85. Содержание $C_{\text{орг}}$ определяли бихроматным окислением, водорастворимого органического вещества (ВОВ) определяли аналогичным образом по водоекстрагируемому органическому веществу. Содержание органического углерода ($C_{\text{орг}}^{700}$), включая сажу и антрацит, определяли сжиганием почвы при 700 °С (3 ч, в муфельной печи СНОЛ 10/11-В (Технотерм, Россия) (Cumming, 1989; Gustafsson et al., 1996). Емкость катионного обмена (ЕКО) определяли методом Бобко-Аскинази в модификации Алешина и

Горбунова (ГОСТ 17.4.4.01-84). Общее содержание углерода, азота и серы анализировали с помощью элементного анализатора ЕМА 502 CHNS-O в соответствии с ISO 10694 и ISO 13878.

3.3 Определение содержания аммония, нитрита и нитрата в почве

Для определения содержания водорастворимых форм азота почвенные образцы заливали 2 М раствором хлорида калия. После инкубирования в течение 24 часов из каждой колбы отбирали гомогенат в центрифужные пробирки, после чего проводили центрифугирование в течение 5 минут со скоростью 7000 оборотов в минуту.

Содержание аммония в почве было определено согласно ГОСТ 26489-85. Для окрашивания были использованы раствор из салициловокислого натрия, виннокислого калия-натрия, гидроокиси натрия, нитропруссидного натрия и трилона Б, и раствор гипохлорита натрия с массовой долей 0,125%. После окрашивания раствор фотоколориметрировали при длине волны $\lambda = 655$ нм.

Для определения концентрации нитрита полученный надосажок отбирали по 1 мл в чистые пробирки. К ним добавляли по 3 мл дистиллята и 1 мл Грисса, приготовленный согласно ПНД Ф 16.1:2:2.2:3.51-08, доводя, таким образом, общий объем жидкости до 5 мл, и помещали на инкубирование в темное место на срок 40 минут. По истечении данного времени производили фотоколориметрическое измерение полученных образцов при длине волны $\lambda = 540$ нм. Калибровочная кривая была сделана в соответствии с ПНД Ф 16.1:2:2.2:3.51-08.

Для определения концентрации нитрата полученный надосажок отбирали по 1 мл в чистые пробирки и добавляли по 2 мл щелочного раствора и по 2 мл раствора восстанавливающего раствора. После раствор инкубировали 10 минут и окрашивали 1 мл реактива Грисса. Щелочной раствор был приготовлен из 5 г пиррофосфорнокислого натрия, 8 г гидроксида натрия и 1000 мл дистиллированной воды, а восстанавливающий раствор из 200 мл раствора гидразина (27,5 г/л) и 6 мл раствора сульфата меди (2,5 г/л) и 794 мл дистиллированной воды. Приготовление щелочного и восстанавливающего растворов, окрашивание, построение

калибровочной кривой проводилось согласно ГОСТ 26488-85. Содержание нитрата также определяли фотоколориметрически при длине волны $\lambda = 540$ нм.

3.4 Определение содержания ТМ и ПАУ в почве

Валовое содержание Mn, Ni, Cu, Zn и Pb в почве определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа на спектрометре Spectroscan MAX-GV (Спектрон, Россия) (Pukhovski, 2002). Содержание подвижных форм ТМ анализировали в почвенной вытяжке, полученной с использованием ацетатно-аммонийного буферного раствора с pH 4,8. Содержание металлов в вытяжках анализировали методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на (МГА-915МД (Люмэкс, Россия). Суммарный показатель загрязнения почвы ТМ (Z_c) был рассчитан согласно уравнению 9:

$$Z_c = \sum K_c - (n - 1) \quad (\text{ур. 9})$$

где K_c – коэффициент концентрации, равный отношению валового содержания ТМ в почве/содержания подвижных форм ТМ в почве к его фоновому значению ($K_c = C_i/C_{fi}$), а n – число химических элементов с $K_c > 1$ (СанПиН 1.2.3685-21). Z_c классифицируется по следующим уровням загрязнения (МУ 2.1.7.730-99): допустимый (< 16), умеренный (16–32), опасный (32–128), чрезвычайно опасный (> 128).

Экстракцию ПАУ из образцов почвы проводили гексаном в 3 повторностях. Предварительно мешающая липидная фракция удалялась кипячением 1 г образца в 2% растворе КОН. Концентрацию ПАУ в экстракте определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent 1260 (ISO 13877-2005). Были идентифицированы приоритетные ПАУ, включенные в список приоритетных загрязняющих веществ США: нафталин, фенантрен, антрацен, аценафтен, аценафтилен, флуорен, пирен, хризен, бензо[а]антрацен, флуорантен, бензо[б]флуорантен, бензо[к]флуорантен, бензо[а]пирен, дибензо[а, h]антрацен, бензо[g, h, i]перилен.

3.5 Определение микробиологических свойств почв

С целью установления наиболее чувствительного показателя к техногенному воздействию в техногенно нарушенных почвах были проанализированы основные процессы цикла азота (аммонификация, нитрификация и денитрификация).

Разведения почвы готовили по стандартной методике. Численность аммонифицирующих бактерий определяли методом чашечного подсчета на мясо-пептонном питательном агаре (Нетрусов и др., 2005). Активность уреазы определяли с помощью модифицированного индофенольного метода. Поглощение полученного раствора измеряли при $\lambda = 655$ нм. Процедура основана на фотометрическом измерении аммонийного N, образующегося при гидролизе мочевины путем образования окрашенных комплексов с салицилатом в нитропруссиде (Kandeler et al., 2011).

Для оценки численности денитрифицирующих организмов использовали метод наиболее вероятного числа (НВЧ) денитрификаторов (Rathsack, 2014). Активность нитрат- и нитритредуктазы определяли модифицированным методом Галстяна (Хазиев, 2005). В почву вносили растворы нитрита/нитрата (процесс восстановления нитрита/восстановления нитрата соответственно). Активность нитратредукции определяли по прибыли нитрита, активность нитритредукции по убыли нитрита после 24 ч инкубации при 30 °С.

Экспресс-метод определения потенциальной скорости нитрификации автотрофными бактериями и археями был осуществлен путем инкубации образцов почвы с добавлением сульфата аммония в течение 2–4 часов (ISO 15685). Для определения активности архей, окисляющих аммоний, в почву добавляли раствор аллилтиомочевины в конечной концентрации 2 мкМ. Выбор ингибирующей концентрации был основан на литературных данных, а именно, что концентрация 2 мкМ аллилтиомочевины подавляет активность бактерий, но не активность архей (Shen et al., 2013). Определение активности процесса коаммокс в почвенной суспензии осуществлялось путем добавления хлората в концентрации 1 мМ (Wang et al., 2020; Sun et al., 2022).

Для стимуляции активности нитрифицирующих микроорганизмов, находящихся в состоянии покоя, почву инкубировали с раствором аммония (200 мкг N/г) в течение недели. Эта дополнительная процедура была осуществлена для учета активности клеток метаболически неактивных из-за низкой концентрации аммония в почве. Почву увлажняли до влажности почвы 60% и хранили в темноте при температуре 25 °С. После периода инкубации в пробах также анализировали активности нитрификации, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Методы определения активности автотрофных нитрификаторов экспресс-методом

№	Процессы	Метод определения активности, мкг N г/ч	Ингибитор, доза	Ссылки
1	Нитрификация АОА и АОВ	Накопленный нитрит и нитрат	-	ISO 15685
2	Нитрификация NOB	Накопленный нитрат	-	ГОСТ 26488-85
3	Нитрификация АОА	Накопленный нитрит и нитрат	Аллилтиомочевина, 2 мкМ	Shen et al., 2013
4	Нитрификация АОВ	Разница в накопленных нитритах и нитратах между №1 и №3	Аллилтиомочевина, 2 мкМ	Shen et al., 2013
5	Комаммокс	Разница в накопленных нитритах и нитратах между №1 и №5	Хлорат, 1 мМ	Wang et al., 2020; Sun et al., 2022

Общая и гетеротрофная нитрифицирующая активность была определена по накоплению нитрита и нитрата в течение 7-дневного инкубационного периода. К образцам почвы добавляли различные источники азота в концентрации 200 мкг N/г почвы: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, нитропропан и пировиноградный оксим. Выбор субстратов основывался на том факте, что пировиноградный оксим и нитропропан являются субстратами для ферментов гетеротрофной нитрификации – диоксигеназы

пировиноградного оксима (POD), нитроалканоксидазы (NAO) (Fitzpatrick et al., 2005; Tsujino et al., 2017).

3.6 Выделение и анализ ПАУ-деструкторов-денитрификаторов и накопительной культуры нитрификаторов

Первичное выделение штаммов ПАУ-деструкторов

Микроорганизмы-деструкторы ПАУ выделялись из почв методом микробиологического посева. Почвенное разведение наносилось на поверхность агаризованной минеральной основы Эванса, 8,71 г K_2HPO_4 , 1 мл 5М NH_4Cl , 1 мл 0,1М Na_2SO_4 , 1 мл 62 мМ $MgCl_2$, 1 мл 1 мМ $CaCl_2$, 1 мл 5 мкМ $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$; 1 мл раствора микроэлементов, рН 7,0. Состав раствора микроэлементов (в 1% HCl): 0,41 г/л ZnO; 5,4 г/л $FeCl_2 \times 6H_2O$; 2,0 г/л $MnCl_2 \times 4H_2O$; 0,17 г/л $CuCl_2 \times 2H_2O$; 0,48 г/л $CoCl_2 \times 6H_2O$; 0,06 г/л H_3BO_3 . На внутреннюю поверхность крышек чашек Петри вносили 200 мг фенантрена, в качестве единственного источника С, после чего инкубировали чашки Петри при температуре 25°C.

Отбор и идентификация штаммов ПАУ-деструкторов

После посева изоляты, выросшие в течение первых 2 суток, выделяли в чистые культуры на агаризованной среде Эванса с фенантrenom. Штаммы, продемонстрировавшие стабильный рост в течение 1–2 суток, переносили в жидкую среду Эванса. Для отбора эффективных деструкторов использовали критерий накопления биомассы, оцениваемый по мутности среды (Zapata, Ramirez-Arcos, 2015): если на вторые сутки мутность превышала 0,5 единиц по шкале МакФарланда, штамм включался в коллекцию деструкторов. Отобранные деструкторы идентифицировали методом секвенирования гена 16S рРНК. Амплификацию осуществляли с универсальными праймерами 27f/1492r в следующих условиях: денатурация при 95°C — 10 минут, далее 35 циклов при 94°C — 45 секунд, 56°C — 45 секунд, 72°C — 90 секунд и 72°C — 10 минут. Амплификация проводилась с использованием амплификатора CFX Touch 1000.

Последовательности гена 16S рРНК были классифицированы с помощью nucleotide blast.

Определение активности денитрификации ПАУ-деструкторов

Поскольку анаэробная деградация ПАУ осуществляется в процессе денитрификации, то у штаммов была определена способность к нитритредукции и нитратредукции. Активности нитритредуктазы и нитратредуктазы бактерий были определены по активности утилизации нитрита и образования нитрита из нитрата, соответственно (Vuxton, 2011). Для этого 1 мл суспензии суточных культур бактерий (0,5 по стандарту мутности МакФарланда) вносили в стерильный мясопептонный бульон с 0,01% содержанием NaNO_2 и 0,2% KNO_3 . Бактериальные культуры инкубировались при 30 °С в течение 24 часов, после чего в бульоне определяли содержание нитрита путем окрашивания реактивом Грисса (ПНД Ф 16.1:2:2.2:3.51-08).

Таким образом, был выделен штамм (*Enterobacter ludwigii* – 99,65% идентичности), деградирующий фенантрен, способный к денитрификации. Активность нитрат- и нитритредукции составляла $2,6 \pm 0,06$ и $0,22 \pm 0,05$ мкг N/мл суспензии штамма.

Получение накопительной культуры нитрификаторов

Свежая почва вносилась в колбу со средой Виноградского в соотношении 1:10 (состав среды в процентах $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 0,2; K_2HPO_4 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; NaCl – 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,04; CaCO_3) (ГОСТ Р 54653-2011). После трехнедельной инкубации, смесь разбавляли свежей средой Виноградского в соотношении 1:10. Накопительную культуру нитрификаторов в течение 4 месяцев переносили в стерильную среду Виноградского раз в 3 недели в соотношении 1:10 (Jung et al., 2011; Tourna et al., 2011). Контроль роста культуры фиксировали по наличию в среде образовавшихся нитрита и нитрата окрашиванием реактивом Грисса (ПНД Ф 16.1:2:2.2:3.51-08). Накопительную культуру инкубировали при температуре 30 °С без доступа света.

Определение активности нитрификации накопительной культуры нитрификаторов

Активность нитрификации определялась в соответствии с методикой ISO 15685. Для этого 1 мл накопительной культуры нитрификаторов вносили в конические колбы с 9 мл раствором сульфата аммония (конечная концентрация 1 ммоль/л) и сульфата аммония с хлоратом натрия (конечная концентрация 2 ммоль/л). рН растворов равнялся 7,4. Колбы инкубировали 2-4 часа на шейкере без доступа света, после чего раствор окрашивали реактивом Грисса. Используя планшетный ридер Fluostar Omega (BMG Labtech, Германия), определяли оптическую плотность окрашенных растворов при $\lambda = 540$ нм.

Определение влияния ПАУ и ТМ на активность накопительной культуры нитрификаторов

Для тестирования устойчивости накопительной культуры нитрификаторов к поллютантам нитрифицирующую активность определяли посредством инкубации нитрификаторов в растворе с добавлением сульфата аммония и хлората как описано в разделе выше. В конические колбы вносили растворы аммония и хлората, после чего вносили нафталин, бифенил, фенантрен, флуорен, пирен, растворенные в ДМСО, с конечной концентрацией 10, 100, 1 000, 10 000, 100 000, 100 000 нг/мл и растворы Cd, Zn, Ni, Pb и Cu, с конечной концентрацией 0.01, 0.1, 1, 10 мг/кг. Концентрации поллютантов выбраны в соответствии с исследованиями Klimowicz-Pawlas, Maliszewska-Kordybach (2010), Kapoor et al. (2015) и Suszek-Łopatka et al. (2016).

Анализ деградации ПАУ консорциумом нитрификаторов и ПАУ-деструкторов

Для анализа деградации ПАУ микроорганизмами (деструкторами, нитрификаторами и их консорциумом) был заложен модельный эксперимент с использованием загрязненной легкосуглинистой почвы углеотвала. Содержание

ПАУ составляло 15 000 нг/г, рН – 7,01, $C_{\text{орг}}$ – 4,9%. В почву были внесены *Enterobacter ludwigii* в концентрации 3×10^8 клеток/г почвы и нитрификаторы с активностью окисления аммония и нитрита – $2,02 \pm 0,19$ и $0,98 \pm 0,0$ мкг N/ч/г. Для стимуляции деградации ПАУ, сопряженной с денитрификацией, в почву был внесен раствор нитрата калия с массовой долей азота – 6,4 мг/г. На протяжении месяца в почве поддерживалась 60% влагоемкость при температуре 30 °С. По истечении инкубационного периода было определено остаточное содержание ПАУ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Infinity 1260 Agilent в соответствии со стандартами ISO 13877.

Варианты опыта:

1. Контроль – загрязненная почва без внесения микроорганизмов
2. *Enterobacter* – с внесением *Enterobacter ludwigii*
3. Нитрификаторы – с внесением накопительной культуры нитрификаторов
4. *Enterobacter* + NO_3^- – с внесением *Enterobacter ludwigii* и раствора нитрата
5. *Enterobacter* + Нитрификаторы – с внесением *Enterobacter ludwigii* и накопительной культуры нитрификаторов

3.7 Извлечение, секвенирование ДНК и метагеномный анализ

Выделение тотальной почвенной ДНК осуществлялось с использованием набора FastDNA™ Spin Kit for Soil. Для подготовки библиотек применяли набор NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (NEB) в соответствии с инструкцией производителя. Фрагментация геномной ДНК проводилась на приборе Covaris S220. Качество полученных библиотек оценивали с помощью системы Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) и набора Agilent High Sensitivity DNA. Количественное определение концентрации ДНК в образцах выполняли на приборе Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Секвенирование проводили на платформе MGI (Complete Genomics) на базе института биохимии и физиологии микроорганизмов (ИБФМ РАН).

Анализ данных был выполнен следующим образом. Контроль качества: последовательности адаптеров, низкокачественные прочтения ($Q < 10$) и короткие

прочтения (< 40 п.н.) были удалены с помощью Trimmomatic ver. 0.38 (Bolger, Lohse и Usadel, 2014). Прочтения, соответствующие человеческой ДНК, были удалены с помощью программы bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012) с использованием сборки генома человека T2T. Анализ метагеномных таксономических профилей: отфильтрованные по качеству прочтения с этапа контроля качества были подвергнуты таксономической классификации с помощью программы Kraken2 (Wood et al., 2019) с набором данных PlusPFP.

Сборка и биннинг: Проверенные по качеству прочтения собирались в контиги с помощью metaSPAdes (Nurk et al., 2017) с параметрами по умолчанию. Затем контиги объединялись с помощью трех независимых программ с параметрами по умолчанию: Metabat2, CONCOCT и Maxbin2 (Kang et al., 2019; Alneberg et al., 2014; Wu et al., 2016). Бины, полученные с помощью этих инструментов, объединялись в консенсусные бины с помощью DAS-Tool (Sieber et al., 2018). Контроль качества и статистика сборки бинов оценивались с помощью программы CheckM (Parks et al., 2015). Бины с полнотой сборки >60%, уровнем загрязнения <15% и количеством контигов <1000 считались отдельными бактериальными геномами, собранными из метагенома (MAG – metagenome assembled genomes).

Все MAGи были классифицированы с использованием инструментов GTDB (' gtdbtk classify_wf ' module) (Chaumeil et al., 2022; Parks et al., 2022). Все MAGи были аннотированы с помощью программного обеспечения eggNOG mapper (Huerta-Cepas et al., 2019; Cantalapiedra et al., 2021) с базой данных MMseqs2. Результаты аннотации были проверены на наличие генов метаболизма азота на основе номеров KEGG, присвоенных eggNOG mapper. Полный список генов метаболизма азота приведен в дополнительной таблице 11 Приложения А. В случае некоторых белков (а именно, *сусА*, *ниrК*, *сytL*, нитрозоцианин, *пхrABC*, диоксигеназа пировиноградного оксима) наборы референтных белков, загруженных из баз данных NCBI и AnnoTree (Mendler et al., 2019), были проиндексированы и по ним был выполнен поиск с использованием программного обеспечения diamond («diamond blastp -k 0 --ultra-sensitive --id 50 -- query-cover 50 -

-subject-cover 50 -- evaluate 0.0000001») (Buchfink et al., 2023). Предполагаемая метаболическая стратегия и роль MAGов в сообществе были выведены на основе комбинации таксономии GTDB, аннотации генов и данных о ферментативной активности.

Необработанные метагеномные считывания были сопоставлены с MAG-сборками и отдельными генами метаболизма N, реконструированными из метагеномного набора данных с использованием coverM (Aroney et al., 2024). Кроме того, необработанные метагеномные считывания были сопоставлены с набором ключевых генов нитрификации, полученных из сборок нитрифицирующих бактерий и архей. В обоих случаях были представлены такие статистические данные, как mean, trimmed_mean, coverage_bases, variance, relation_abundance, length, count, reads_per_base, rpkm, tpm. Значения GCPM (копий генома на миллион прочтений) рассчитывались на основе покрытия контигов MAG с использованием следующей формулы: $GCPM_m = \frac{\sum_{c=1}^n TPM_c \times length_c}{\sum_{c=1}^n length_c}$, где GCPM_m — значение GCPM MAG m, TPM_c — TPM контига c в MAG m, длина_c — длина контига c в MAG m, а n — количество контигов в MAG.

3.8 Статистический анализ

Все исследуемые параметры определялись в трехкратной повторности. Результаты физических, химических и физико-химических свойств и микробиологического анализа исследуемых образцов почв статистически обрабатывались с использованием программного обеспечения STATISTICA 12 (StatSoft, США) и R 4.3.2. Нормальность данных проверялась с помощью теста Шапиро–Уилка. Рассчитывались описательные статистики, включающие среднее, медиану, минимальное и максимальное значения, стандартное отклонение (SD) и коэффициент вариации (CV). Значения, полученные для разных анализов, представлялись как среднее ± SD. Тест Краскела–Уоллиса использовался для сравнения активности нитрификации, содержания водорастворимого азота по степени загрязнения. Для определения достоверности данных применялся

однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA); в качестве апостериорного теста использовался тест Тьюки. Рассчитывались коэффициенты корреляции Спирмена. Для определения вклада влияния физических, химических и физико-химических параметров почвы на микробиологические процессы цикла азота в качестве факторного анализа использовался анализ главных компонент (РСА).

ГЛАВА 4 ХАРАКТЕРИСТИКА ФИЗИЧЕСКИХ, ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТЕХНОГЕННО НАРУШЕННЫХ ПОЧВ, СОДЕРЖАНИЕ И ПОДВИЖНОСТЬ В НИХ ТМ

4.1 Физические, химические и физико-химические свойства техногенно нарушенных почв

Техногенно нарушенных почвы угольных отвалов по своим физическим, химическим и физико-химическим характеристикам отличаются от природных аналогов. Значение рН чернозема обыкновенного карбонатного составило 7,68, эмбриоземов подножия угольного отвала шахты «Аютинская» составило 7,31-7,61 (таблица 3). Напротив, техноземы рекультивированного склона имели более высокие значения рН (от 8,29 до 8,54) и содержания CaCO_3 . Значения рН техногенно нарушенных почв угольного отвала шахты «Майская» варьировали в более широких пределах от 4,04 до 8,80.

Содержание $\text{C}_{\text{орг}}$ в техногенно нарушенных почвах углеотвалов шахт «Аютинская» и «Майская» варьировало в широких пределах — от 0,27% до 4,23%, даже превышая содержание в черноземе обыкновенном карбонатном (таблица 3). Это свидетельствует о неоднородности состава и большом количестве включений угольной фракции, что согласуется с морфологическими полевыми описаниями и визуальной диагностикой. Низкое содержание ВОВ в техноземах углеотвала шахты Аютинская объясняется тем, что техноземы содержат материал горизонта С (лессовидный суглинок), привезенный для рекультивации склонов. Эмбриоземы А4 и М3, представляющие собой смесь почвы и примесей частиц угольной фракции, также имели низкое содержание ВОВ (0,03-0,44 г/кг), тогда как фоновые почвы содержали 1,55 г/кг ВОВ. Данные по содержанию ВОВ представлены в таблице 12 приложения А. Значения ЕКО варьирует незначительно от 34,0 до 49,8 ммоль/100 г.

Наибольшее содержание сухого остатка отмечено в эмбриоземах угольного отвала шахты «Аютинская», тогда как в черноземе обыкновенном содержание было в 6 раз ниже. Эмбриоземы углеотвалов имеют сульфатное засоление от слабой до сильной степени. Наибольшее содержание частиц илистой фракции

отмечено в техноземах угольного отвала шахты «Аютинская» на склоне (площадки А7-А9) (рисунок 3). Песчаная фракция преобладала в эмбриоземах А3, А4 и А5, что не является типичным наблюдением для фоновых почв.

Хемоземы бывшего шламонакопителя имели более высокий рН, чем незагрязненная лугово-черноземная почва (таблица 3). Содержание $C_{орг}$ в незагрязненных почвах было выше, чем в хемоземах. Содержание сухого остатка в лугово-черноземной почве было ниже 0,1%, а в хемоземах в среднем составило 0,35%. Последние характеризовались сульфатным и хлоридно-сульфатным засолением. По гранулометрическому составу лугово-черноземная почва представляет собой суглинки, а гранулометрический состав хемоземов варьирует от супесей до суглинков.

Таблица 3

Физические, химические и физико-химические свойства чернозема обыкновенного карбонатного, лугово-черноземной почвы и техногенно нарушенных почв, n – количество биологических повторностей

Показатели	рН	CaCO ₃ , %	C _{орг} , %	ЕКО, ммоль/100 г	Сухой остаток, %	Физ. глина, %	Ил, %
Чернозем обыкновенный карбонатный Персиановской степи, n = 3							
Среднее	7,68	0,35	3,77	37,1	0,19	52,0	30,0
Диапазон	7,55-	0,32-	3,62-	34,0-	0,18-	46,2-	27,5-
	7,81	0,38	3,92	40,2	0,20	58,4	32,5
Эмбриозем углеотвала шахты Аютинская, n = 5							
Среднее	7,41	0,50	3,40	41,2	1,17	37,3	17,4
Диапазон	7,31-	0,01-	2,74-	29,4-	0,16-	20,2-	7,6-24,0
	7,61	1,97	4,23	59,4	2,41	54,8	
Технозем углеотвала шахты Аютинская, n = 4							
Среднее	8,38	4,42	1,22	40,2	0,10	54,3	29,4
Диапазон	8,29-	2,51-	0,27-	29,8-	0,08-	41,9-	22,1-
	8,54	6,76	2,28	49,6	0,13	58,8	32,8

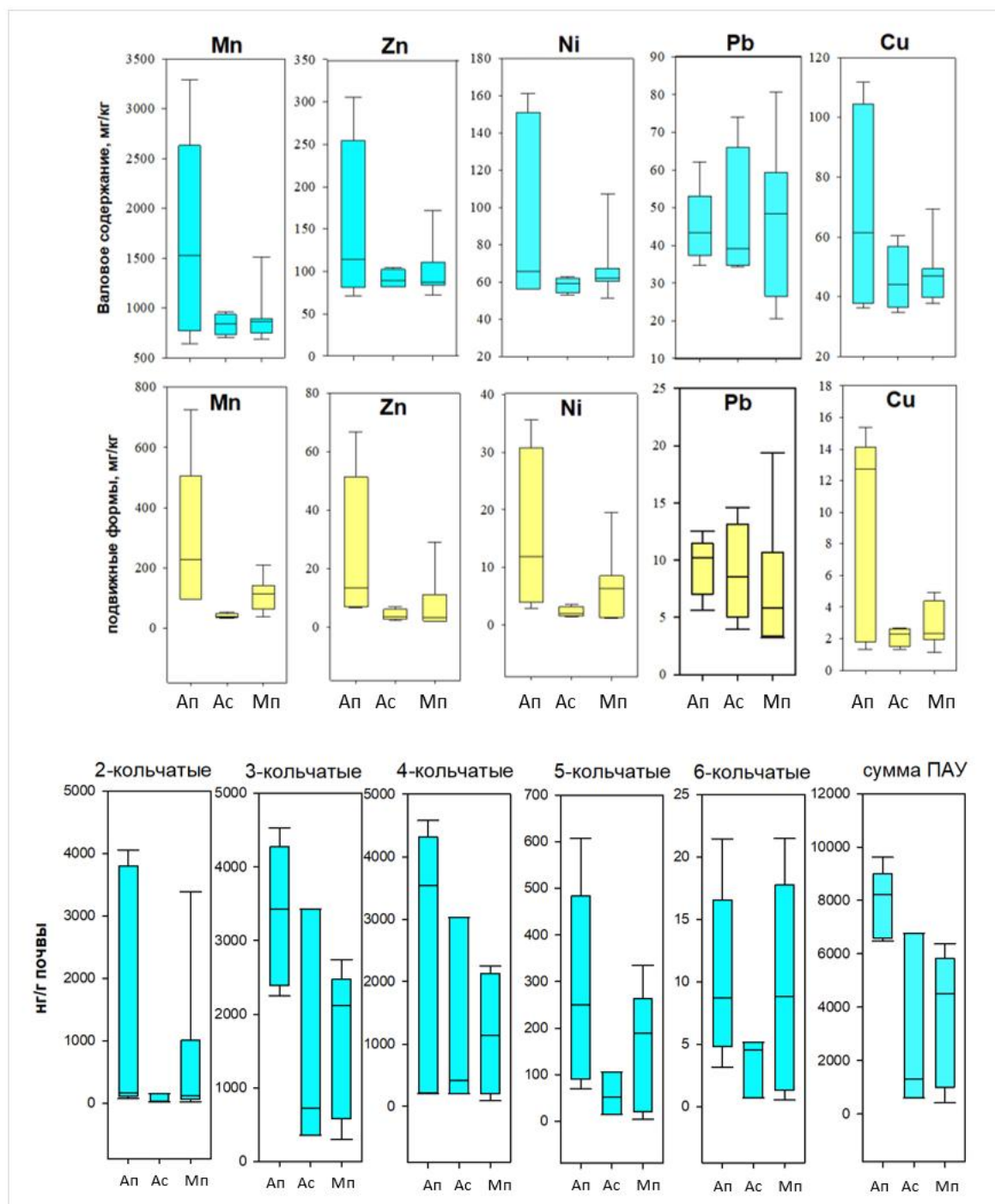
Эмбриозем углеотвала шахты Майская, n = 7							
Среднее	7,61	1,47	1,95	41,5	0,37	45,5	23,9
Диапазон	4,04-	0,05-	1,17-	35,4-	0,09-	16,7-	10,2-
	8,8	2,22	3,34	49,8	1,60	63,2	34,0
Лугово-черноземная почва, n = 3							
Среднее	7,32	1,70	2,03	39,5	0,09	53,1	32,4
Диапазон	7,15-	1,55-	1,96-	36,7-	0,08-	48,1-	29,2-
	7,5	1,86	2,10	42,3	0,10	57,9	35,6
Хемозем бывшего шламонакопителя озера Сорное, n = 11							
Среднее	8,32	1,1	1,16	39,3	0,35	43,2	15,1
Диапазон	8,15-	0,52-	0,05-	32,3-	0,12-	27,3-	5,16-
	8,41	1,51	1,39	43,4	0,75	52,2	38,8

4.2 Содержание ТМ и ПАУ в техногенно нарушенных почвах

Валовое содержание ТМ в техногенно нарушенных почвах углеотвалов шахт Майская и Аютинская незначительно преобладало над содержанием в фоновом аналоге – черноземе обыкновенном карбонатном (рисунок 6). Наиболее загрязненным образцом являлся эмбриозем А5 (рисунок 3), где валовое содержание Mn, Zn и Ni составляло 3300, 305 и 161 мг/кг, соответственно. В техногенно нарушенных почвах углеотвалов процент содержания подвижных форм от валового содержания повысился с 7 до 22% для Mn, Zn, Ni и Cu. Содержание подвижных форм Mn, Zn и Ni в эмбриоземе А5 составляло 725, 67 и 36 мг/кг, соответственно. Среди почв угольного отвала шахты «Майская» наименее загрязненными были техногенно нарушенные черноземы обыкновенные, расположенные по мере удаления от подножья углеотвала (М4-М7).

Коэффициенты вариации подвижных Mn, Zn, Ni и Cu в эмбриоземах углеотвала шахты Аютинская составили от 74% до 98%, для рекультивированных техноземов склона этот показатель составил от 20% до 45% (таблица 13 приложения А). Высокие коэффициенты вариации получены для подвижных форм Zn, Ni и Pb (126, 100 и 73%, соответственно) в техногенно нарушенных почвах углеотвала шахты Майская. Высокие значения CV указывают на антропогенный

источник поступления ТМ в почвы (Argyaki, Kelepertzis, 2014). Почвы склона угольного отвала характеризуются умеренным загрязнением, поскольку склон ранее подвергался механической рекультивации, что снизило CV и степень загрязнения ТМ в 4 раза. Перекрытие выработанных земель материалами является одним из первых этапов рекультивации почв; также он эффективен для рекультивации горящих угольных отвалов (Tsolova et al., 2014; Frouz, 2021; Szadek et al., 2023). Поскольку высокие концентрации ТМ иногда совпадают с низкими значениями рН, можно также предположить, что более низкий рН почвы у подножия по сравнению со склоном угольного отвала шахты Аютинская увеличил биодоступность ТМ (Maiti, Ahirwal, 2019).



Ап – подножье углеотвала шахты Аютинская, Ас – склон углеотвала шахты Аютинская, Мп – подножье углеотвала шахты Майская

Рисунок 6 – Содержание поллютантов в техногенно нарушенных почвах углеотвалов

Все техногенно нарушенные почвы углеотвалов имели допустимое или умеренное загрязнение (Z_c по валовому содержанию) (таблица 4). Расчет Z_c , проведенный с учетом содержания только подвижных ТМ, показал более высокий

уровень загрязнения. Эмбриоземы А3-А5, М2 имели опасный и чрезвычайно опасный уровень загрязнения. Напротив, эмбриоземы А1, А2, и М3-М6 имели умеренно-опасный уровень загрязнения. Наименее загрязненными почвами среди угольного отвала шахты Аютинская были рекультивированные техноземы склона (А6-А9 – допустимый уровень). Среди почв угольного отвала шахты «Майская» отмечено снижение Z_c по мере удаления техногенно нарушенных черноземов обыкновенных М4-М7 от подножия угольного отвала.

Таблица 4

Суммарный показатель загрязнения ТМ в техногенно нарушенных почвах
углеотвалов

Название типа почвы	Образцы	Z_c по валовому содержанию	Категория загрязнения почв	Z_c по подвижным формам	Категория загрязнения почв
Эмбриозем углеотвала шахты Аютинская	А1	3,41	Допустимая	16,97	Умеренно опасная
	А2	5,20	Допустимая	21,05	Умеренно опасная
	А3	12,20	Допустимая	83,09	Опасная
	А4	3,93	Допустимая	46,44	Опасная
	А5	16,75	Умеренно опасная	131,90	Чрезвычайно опасная
Технозем углеотвала шахты Аютинская	А6	4,50	Допустимая	11,53	Допустимая
	А7	3,57	Допустимая	9,14	Допустимая
	А8	3,76	Допустимая	10,26	Допустимая
	А9	5,44	Допустимая	14,09	Допустимая
Эмбриозем углеотвала шахты Майская	М1	4,85	Допустимая	9,36	Допустимая
	М2	5,84	Допустимая	47,86	Опасная
	М3	2,11	Допустимая	26,05	Умеренно опасная
	М4	4,48	Допустимая	22,82	Умеренно опасная
	М5	4,93	Допустимая	19,32	Умеренно опасная
	М6	6,05	Допустимая	17,76	Умеренно опасная
	М7	6,19	Допустимая	11,05	Допустимая

В большинстве исследованных техногенно нарушенных почв углеотвала шахты Аютинская высокие коэффициенты загрязнения обусловили высокие концентрации подвижных форм Ni, Pb, Zn, Cu и Mn (в порядке убывания). Наибольший вклад в повышение Zс отвала шахты «Майская» внесли Ni, Pb, Mn, Cu и Zn.

По отношению к ПАУ наиболее загрязненными почвенными образцами были эмбриоземы подножья углеотвала шахты Аютинская, особенно эмбриозем А4. Приоритетными поллютантами были 3 и 4-кольчатые ПАУ, а именно фенантрен и пирен (рисунок 6). Менее загрязненными техногенно нарушенными почвами были техноземы склона углеотвала, поскольку они ранее подвергались рекультивации. Содержание ПАУ в почвах углеотвала шахты Майская сильно варьировало.

Суммарное содержание Zn, Pb и Cu в хемоземах бывшего шламонакопителя озера Сорное в среднем в 850, 10 и 8 раз выше, чем в фоновых почвах – лугово-черноземных (рисунок 7). Валовое содержание Zn варьирует от 81 до 117 г/кг почвы. Уровень загрязнения почв ТМ по Zс соответствует сильно загрязненным. Zс для всех загрязненных почв варьировал от 700 до 1300. Содержание подвижных форм варьировало от 3300 до 9600 мг/кг Zn, от 26 до 34 мг/кг Pb и от 10 до 20 мг/кг Cu (рисунок 6). Суммарное содержание ПАУ в хемоземах бывшего шламонакопителя составляет в среднем 3500 нг/г, что значительно ниже, чем в эмбриоземах углеотвалов.

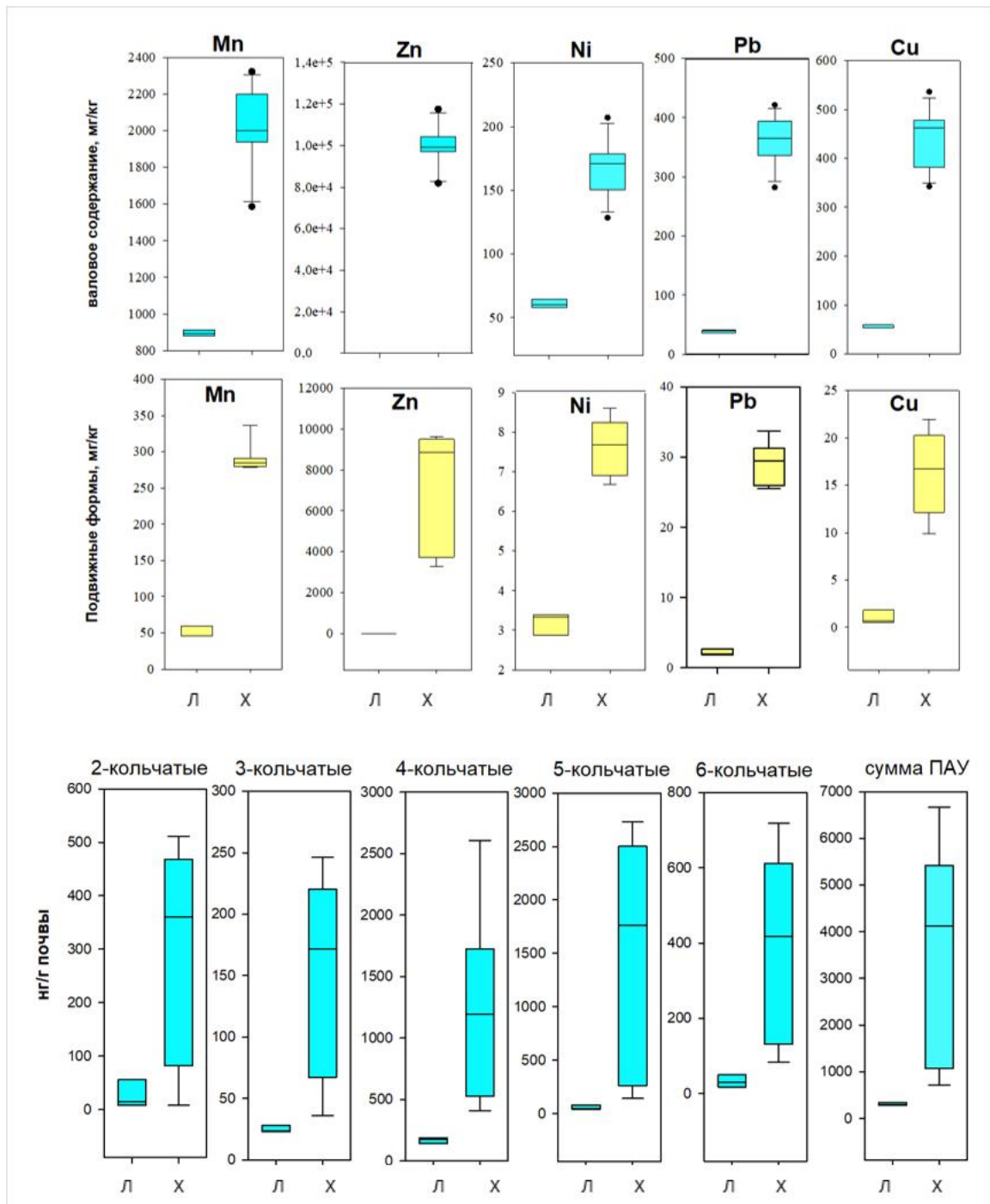
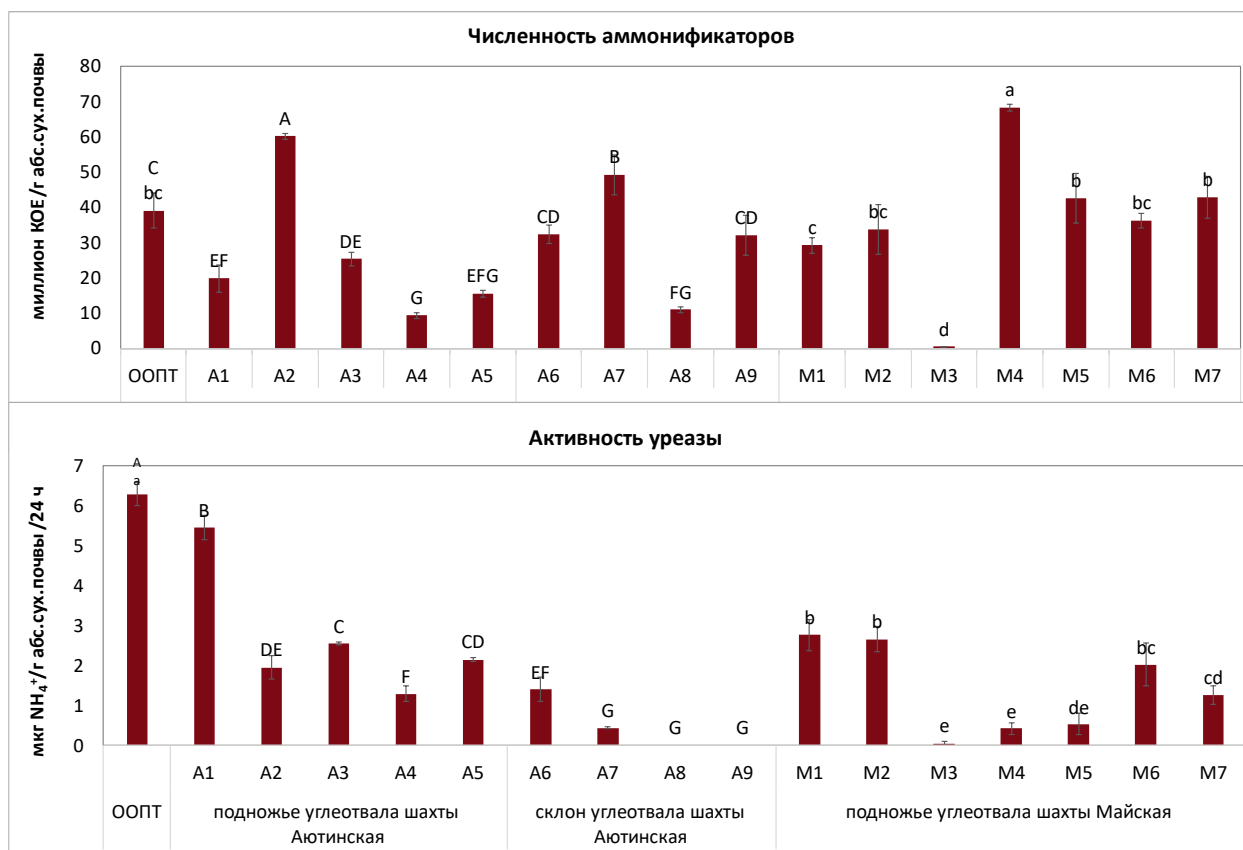


Рисунок 7 – Содержание поллютантов в Л – лугово-черноземной почве, Х – хемоземах бывшего шламонакопителя озера Сорное

ГЛАВА 5 АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ И ЧИСЛЕННОСТИ МИКРОБИОТЫ, ВОВЛЕЧЕННОЙ В ПРОЦЕССЫ ЦИКЛА АЗОТА, В ТЕХНОГЕННО НАРУШЕННЫХ ПОЧВАХ УГЛЕОТВАЛОВ

5.1 Обилие аммонификаторов и активность уреазы в почвах

Численность аммонификаторов в эмбриоземе А2 была выше, чем в черноземе обыкновенном карбонатном ООПТ Персиановской степи. Напротив, в техногенно нарушенных почвах А4, А5 и А8 их было в 2-4 раза меньше, чем в фоновых почвах. Самая низкая численность аммонификаторов в почвах угольного отвала шахты Майская отмечена в эмбриоземе М3. Высокая численность отмечена в менее загрязненных техногенно нарушенных черноземах обыкновенных М4-М7 (рисунок 8). Среди почв угольного отвала шахты «Аютинская» наибольшая активность уреазы выявлена в эмбриоземе А1, наименьшая – в техноземах А7 и А8, где активность равна нулю. В эмбриоземах М1 и М2 угольного отвала шахты «Майская» выявлены высокие значения активности уреазы относительно эмбриоземов М3-М5 (рисунок 8). Выявленная активность оказалась в 2 раза ниже, чем в черноземе обыкновенном карбонатном.



Разные буквы (заглавные) в верхней части столбца указывают на существенную разницу между фоновыми почвами – черноземом обыкновенным карбонатным и техногенно нарушенными почвами углеотвала шахты Аютинская, разные буквы (строчные) указывают на существенную разницу между фоновыми почвами – черноземом обыкновенным карбонатным и техногенно нарушенными почвами углеотвала шахты Майская по Тьюки ($p < 0,05$)

Рисунок 8 – Обилие аммонификаторов и активность уреазы в техногенно нарушенных почвах углеотвалов

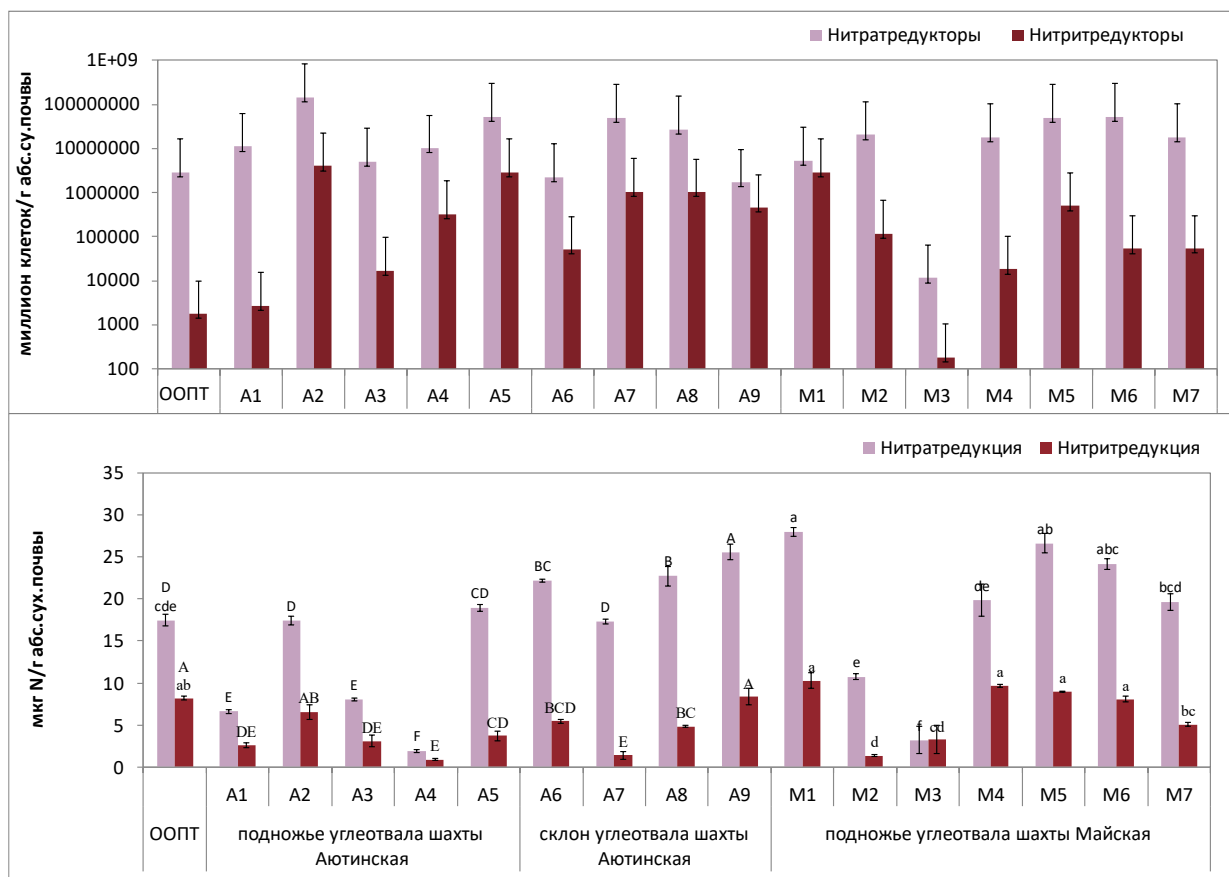
Активность уреазы в почвах является одним из основных процессов при котором происходит гидролиз мочевины (Kooch, Noghre, 2020), что может увеличить содержание азота в почве. Только содержание ВОВ повлияло на активность уреазы в почвах угольных отвалов шахт Аютинская и Майская. Увеличение микробной биомассы почвы и активности ферментов тесно связано с ростом лабильного ВОВ (Song et al., 2012; Shao et al., 2015). Это возможно, связано с тем, что ВОВ обеспечивает микроорганизмы углеродом и азотом и влияет на подвижность ТМ (Kim et al., 2015; Sun et al., 2019). Поскольку техноземы склонов

имели низкое содержание ВОВ, активность уреазы в рекультивированных почвах была в 4,5 и более раз ниже, чем в незагрязненном черноземе обыкновенном карбонатном.

5.2 Обилие денитрификаторов и активность процессов нитрат- и нитритредукции

Данные по численности денитрификаторов представлены на рисунке 9. Наибольшая численность нитратредукторов и содержания нитрита в почвах угольного отвала шахты «Аютинская» выявлена в эмбриоземе А2, примерно в 50 и 2000 раз выше, чем в черноземе обыкновенном карбонатном. Наименьшая численность нитритредукторов отмечена в эмбриоземе А1. В почвах угольного отвала шахты «Майская» наибольшая численность нитратредукторов обнаружена в почвах М5 и М6. Наименьшая численность нитратредукторов и нитритредукторов зафиксирована в эмбриоземе М3 (рисунок 9).

Наибольшая денитрифицирующая активность в почвах угольного отвала Аютинская отмечена в техноземе рекультивированного склона. Наименьшая активность выявлена в эмбриоземе А4 (рисунок 9). Среди почв угольных отвалов шахты Майская наибольшая денитрифицирующая активность наблюдается в эмбриоземе М1, а наименьшая активность нитрат- и нитритредуктаз – в эмбриоземах М3 и М2. Снижение активности нитритредукции обнаружено в почвах М4-М7 по мере удаления от угольного отвала и снижения уровня загрязнения.



Разные буквы (заглавные) в верхней части столбца указывают на существенную разницу между фоновыми почвами – черноземом обыкновенным карбонатным и техногенно нарушенными почвами углеотвала шахты Аютинская, разные буквы (строчные) указывают на существенную разницу между фоновыми почвами – черноземом обыкновенным карбонатным и техногенно нарушенными почвами углеотвала шахты Майская по Тьюки ($p < 0,05$)

Рисунок 9 – Обилие денитрифицирующих микроорганизмов и их активность

Высокие концентрации подвижных Zn и Cu снижали активность денитрификации. Чувствительность процессов денитрификации к ТМ (в частности, Zn, Cu, Ni) подтверждается и другими исследованиями (Nikolaeva et al., 2019). Zou et al. (2013) указали, что Cu является наиболее ингибирующим ТМ среди изученных металлов. Cu замедляла денитрификацию, ингибируя 50% активности нитратредуктазы при концентрации растворимой Cu 0,7 мг/л (Zou et al., 2013).

Несмотря на негативное влияние ТМ на процессы денитрификации, ТМ не оказали ингибирующего эффекта на численность денитрификаторов. Это связано с развитием денитрифицирующих бактерий с разной степенью устойчивости к

металлам (Sobolev, Begonia, 2008). Более того, в сильно загрязненных почвах может увеличиваться численность аэробных денитрифицирующих бактерий, толерантных или устойчивых к различным ТМ (Lu et al., 2022; Luo et al., 2022). Стоит отметить, что не все микроорганизмы в почве активны. При учете численности денитрифицирующих микроорганизмов методом НВЧ также учитываются клетки, находящиеся в состоянии покоя (Blagodatskaya, Kuzyakov, 2013), которые не проявляют активности денитрификации. Важно отметить, что некоторые денитрифицирующие бактерии, а именно *Bacillus*, могут образовывать метаболически инертные эндоспores в неблагоприятных условиях (Verbaendert, De Vos, 2011). Засоление незначительно повлияло на процессы денитрификации, что может быть связано с адаптацией к длительной засоленности (Lancaster et al., 2016), хотя ранние исследования указывали на негативный эффект (Marks et al., 2016; Meng et al., 2020).

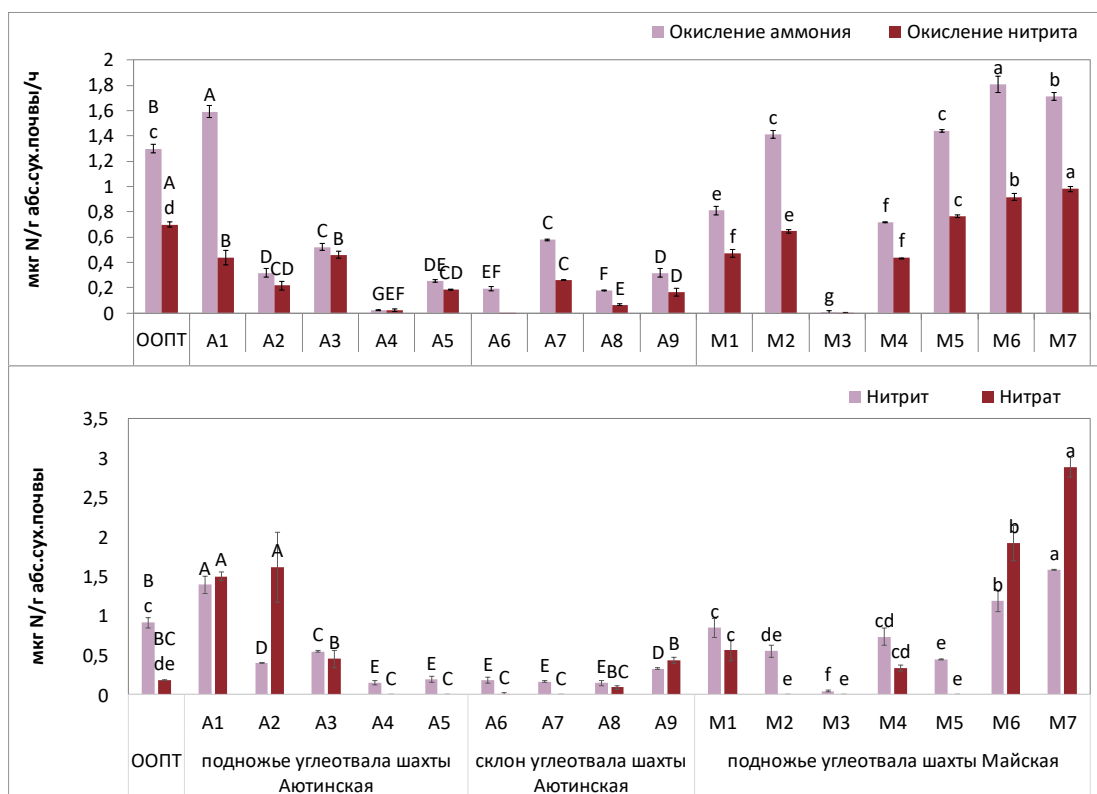
5.3 Активность процессов нитрификации и содержание нитрита и нитрата в почвах

Наибольшая активность окисления аммония и нитрита в почвах угольного отвала шахты Аютинская обнаружена в эмбриоземе А1, наименьшая – нитрифицирующей – в эмбриоземе А4 (рисунок 10). Это в 30 раз меньше нитрифицирующей активности чернозема обыкновенного карбонатного ООПТ Персиановской степи. Техноземы склона также характеризуются низкой активностью нитрификации. Низкая активность нитрификации обнаружена в эмбриоземе с высоким содержанием угля в почве и низким значением рН (М3). Активность в эмбриоземе М3 была в 250 раз ниже, чем в фоновых почвах. Величина рН < 5,5 отрицательно влияет на автотрофных нитрификаторов. Кроме того, почвы с высоким рН, значительно выше 8,0, содержат карбонаты, которые могут служить источником CO₂, необходимого для роста автотрофных организмов (Zhao et al., 2012).

В техногенно нарушенных почвах М4-М7 прослеживается следующая закономерность: активность нитрификации увеличивается по мере удаления от

отвала и снижения уровня загрязнения ТМ, поэтому высокая активность окисления нитрита зафиксирована в почве М7.

В эмбриоземе А1 зафиксировано самое высокое содержание нитрита и нитрата по сравнению с другими почвами угольного отвала шахты «Аютинская» (рисунок 10). Максимальные концентрации нитрита и нитрата среди почв угольного отвала шахты «Майская» отмечены в почвах М6 и М7, удаленных от угольного отвала. Стоит отметить, что содержание нитрата в этом образце почвы, оценивается как оптимальное для роста растений, в то время как в других техногенно нарушенных почвах содержание составляет менее 10 мг/кг почвы. Уровень нитрата для оптимального роста растений не должен опускаться ниже 10 мг/кг и не должен превышать 50 мг/кг (Bagshaw et al., 2010). Минимальные концентрации соединений, напротив, обнаружены в эмбриоземе М3.



Разные буквы (заглавные) в верхней части столбца указывают на существенную разницу между фоновыми почвами – черноземом обыкновенным карбонатным и техногенно нарушенными почвами углеотвала шахты Аютинская, разные буквы (строчные) указывают на существенную разницу между фоновыми почвами – черноземом обыкновенным карбонатным и техногенно нарушенными почвами углеотвала шахты Майская по Тьюки ($p < 0,05$)

Рисунок 10 – Активность нитрификации и содержание нитрита и нитрата

Активность нитрификации отрицательно связана с содержанием подвижных форм Ni и степенью загрязнения ТМ. Считается, что нитрификаторы являются наиболее чувствительной группой к ТМ, особенно к Ni и Cd (Karoor et al., 2015; Aslan, Sozudogru, 2017; Tang et al., 2019). В то же время, даже при длительном загрязнении, нитрифицирующая активность была ниже в почвах, загрязненных ТМ, чем в незагрязненных почвах (Lu et al., 2022). Однако, Rusk et al. (2004) обнаружили, что в течение 17 месяцев нитрифицирующее сообщество адаптируется и становится более устойчивым к ТМ.

Засоление (сухой остаток) в почвах угольных отвалов снизило активность нитрификации. Негативное влияние высоких концентраций хлорид-ионов также подтверждено Akhtar et al. (2012) и Megda et al. (2014). Повышенное содержание растворимых солей часто встречается в почвах угольных шахт (Hilton et al., 2019; Krechetov et al., 2019), в основном из-за геологического выветривания первичных и вторичных минералов в породах (Li et al., 2014).

5.4 Метагеномная оценка микробных сообществ техногенно нарушенных почв углеотвалов

Различия в таксономическом составе микробиома в черноземе обыкновенном карбонатном и в техногенно нарушенных почвах углеотвалов были незначительны (рисунок 11). Наблюдалось более высокое обилие представителей *Bradyrhizobium* в фоновых почвах ООПТ по сравнению с почвами угольных отвалов. Напротив, в эмбриоземах угольных отвалов наблюдалось увеличение обилия представителей семейства Shingomonadaceae и рода *Sphingomonas*.

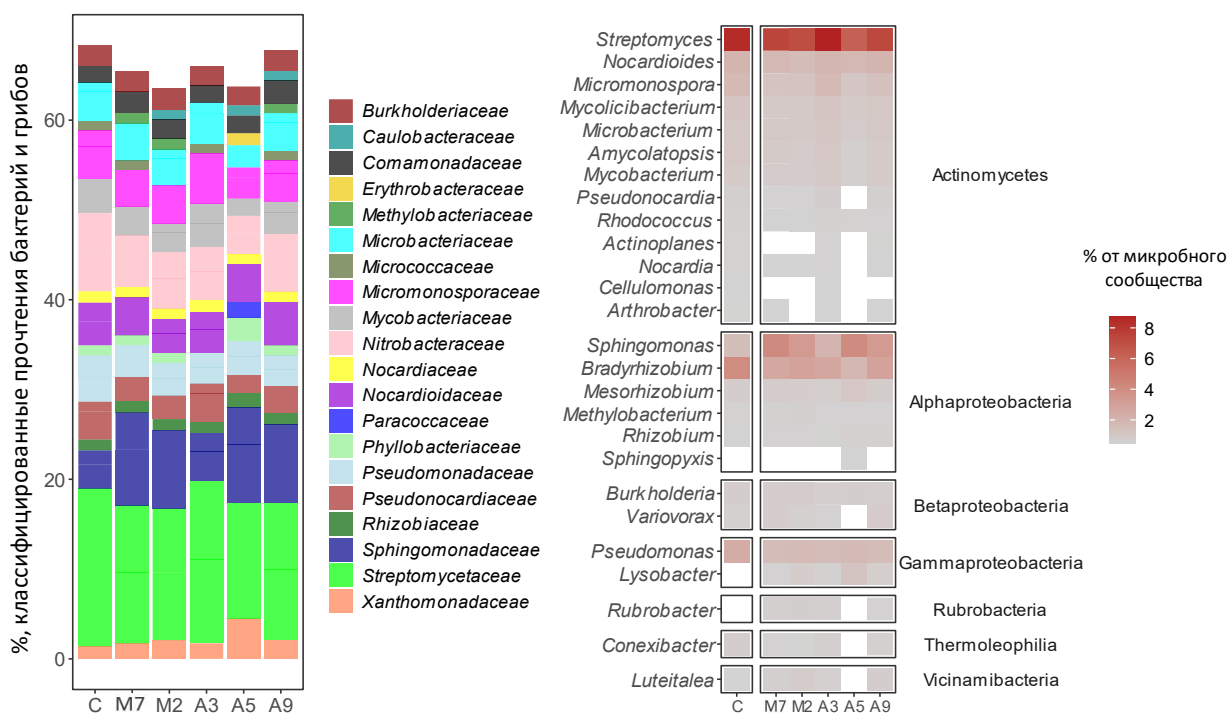


Рисунок 11 – Численность доминирующих родов микроорганизмов в техногенно нарушенных почвах угольных отвалов

Наибольшее количество прочтений, классифицированных как автотрофные нитрификаторы, зафиксировано в техногенно нарушенных почвах A5 и M7, демонстрирующих четкие различия в составе архей и бактерий (таблица 5). Эмбриозем A5 характеризуется доминированием аммоний-окисляющих архей (АОА), тогда как в техногенно нарушенном черноземе обыкновенном M7 обнаружено преобладание аммоний-окисляющих бактерий (АОВ). Наименьшее количество прочтений нитрификаторов выявлено в техноземе склона угольного отвала шахты Аютинская (A9).

Численность нитрификаторов в техногенно нарушенных почвах угольных отвалов по данным метагеномного профилирования.

Образец	АОА		АОВ		NOB	
	% классифицированных прокариотических и грибковых прочтений	количество прочтений	% классифицированных прокариотических и грибковых прочтений	количество прочтений	% классифицированных прокариотических и грибковых прочтений	количество прочтений
ООПТ	0,06	11307	0,03	5561	0,11	21524
A3	0,04	13465	0,02	8261	0,11	35953
A5	0,25	35274	0,04	5268	0,15	20985
A9	0,01	974	0,03	2276	0,12	10268
M2	0,05	11739	0,03	7770	0,13	32478
M7	0,06	15553	0,03	8180	0,13	36540

Среди нитрифицирующих архей доминирующими представителями являются рода *Nitrososphaera* и *Candidatus Nitrosocosmicus*. Это доминирование особенно заметно в почве, сильно загрязненной ТМ, например эмбриозем А5, где процент этого микробного сообщества составляет более 0,1% (рисунок 12). Бактерии, окисляющие аммоний, в основном относятся к родам *Nitrospira*, *Nitrosomonas* и *Nitrosococcus*, в то время как бактерии, окисляющие нитрит, представлены *Nitrospira* и *Nitrobacter*.

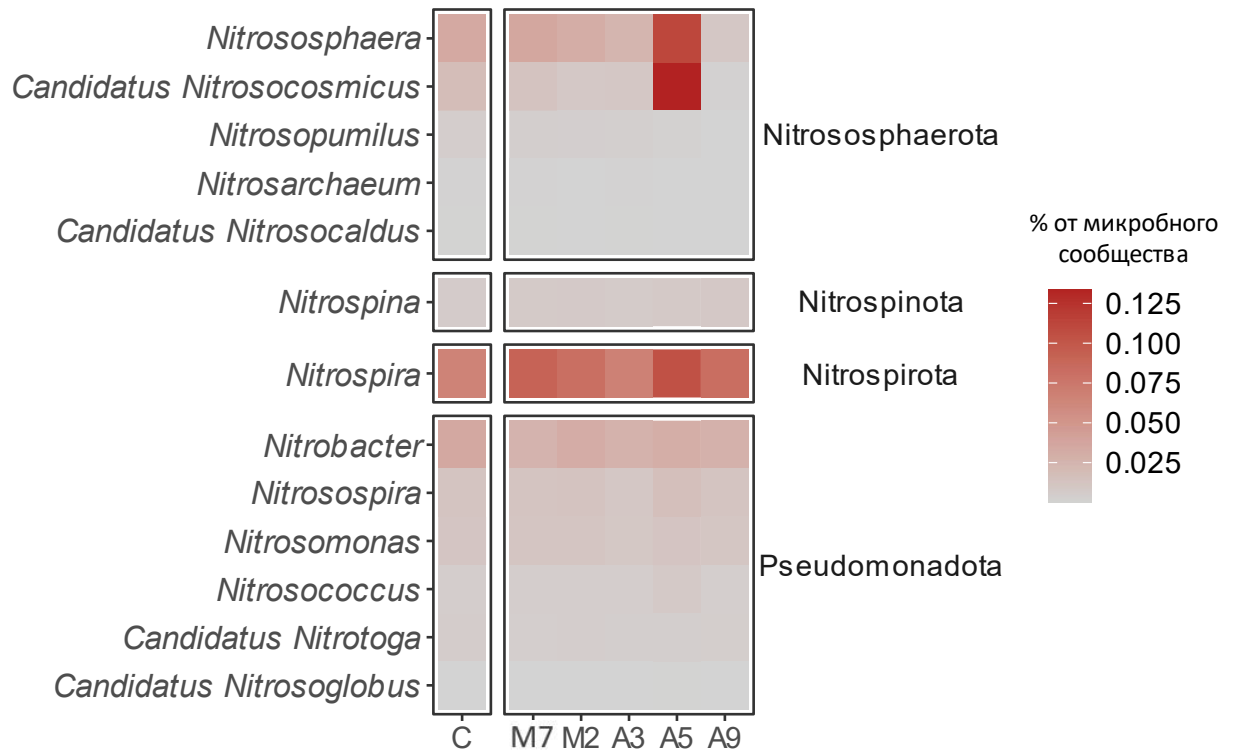
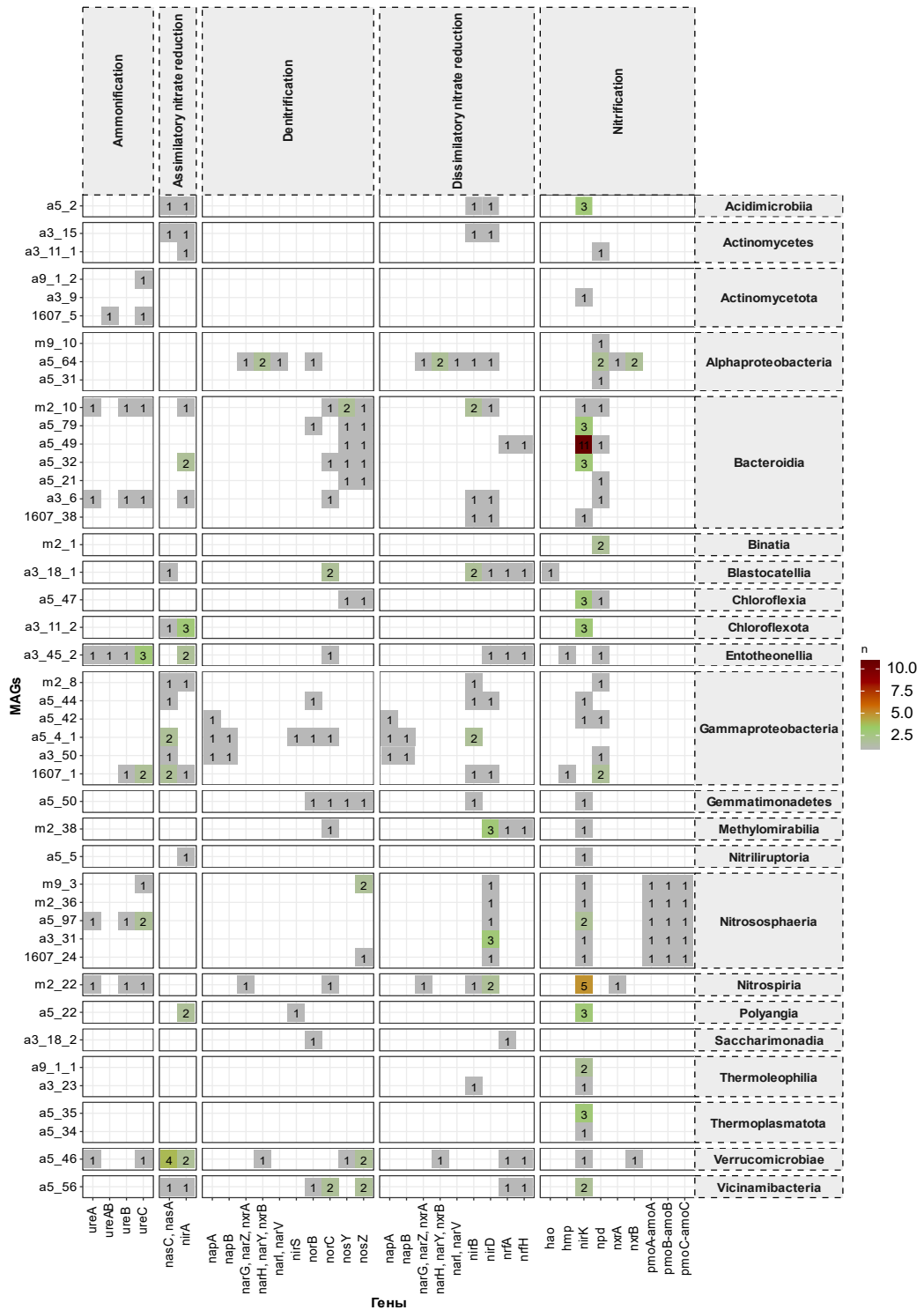


Рисунок 12 – Распространенность доминирующих родов нитрификаторов в техногенно нарушенных почвах угольных отвалов

Примечательно, что, несмотря на пагубное воздействие хранения угольных отходов на денитрификацию, нитрификацию и активность уреазы, не наблюдалось существенных различий в таксономическом составе микробных сообществ. В частности, наблюдалось значительное увеличение численности представителей рода *Sphingomonas* в эмбриоземах угольных отвалов. Виды *Sphingomonas* хорошо известны своей способностью разлагать полиароматические и алифатические углеводороды (Asaf et al., 2020; Zhou et al., 2022). В нарушенных почвах в результате деятельности по добыче угля наиболее распространенным оказался род *Sphingomonas* (Quadros et al., 2016). Состав сообществ нитрифицирующих микроорганизмов остался в значительной степени неизменным, за исключением эмбриоземов, сильно загрязненных ТМ. В частности, наблюдалось заметное преобладание архей, окисляющих аммоний, особенно из родов *Nitrososphaera* и *Nitrosocosmicus*. Виды *Nitrososphaera* известны своей устойчивостью к ТМ и засолению (Spang et al., 2012; Sun et al., 2022). Важная роль АОА в окислении

аммония в почвах угольных отвалов рассматривалась ранее (Liu et al., 2021b), и наше исследование подтверждает это наблюдение. Следовательно, за последние 20-30 лет в почвах угольных отвалов разнообразное микробное сообщество восстановилось; однако активность микроорганизмов позволяет предположить, что сообщество остается в подавленном состоянии.

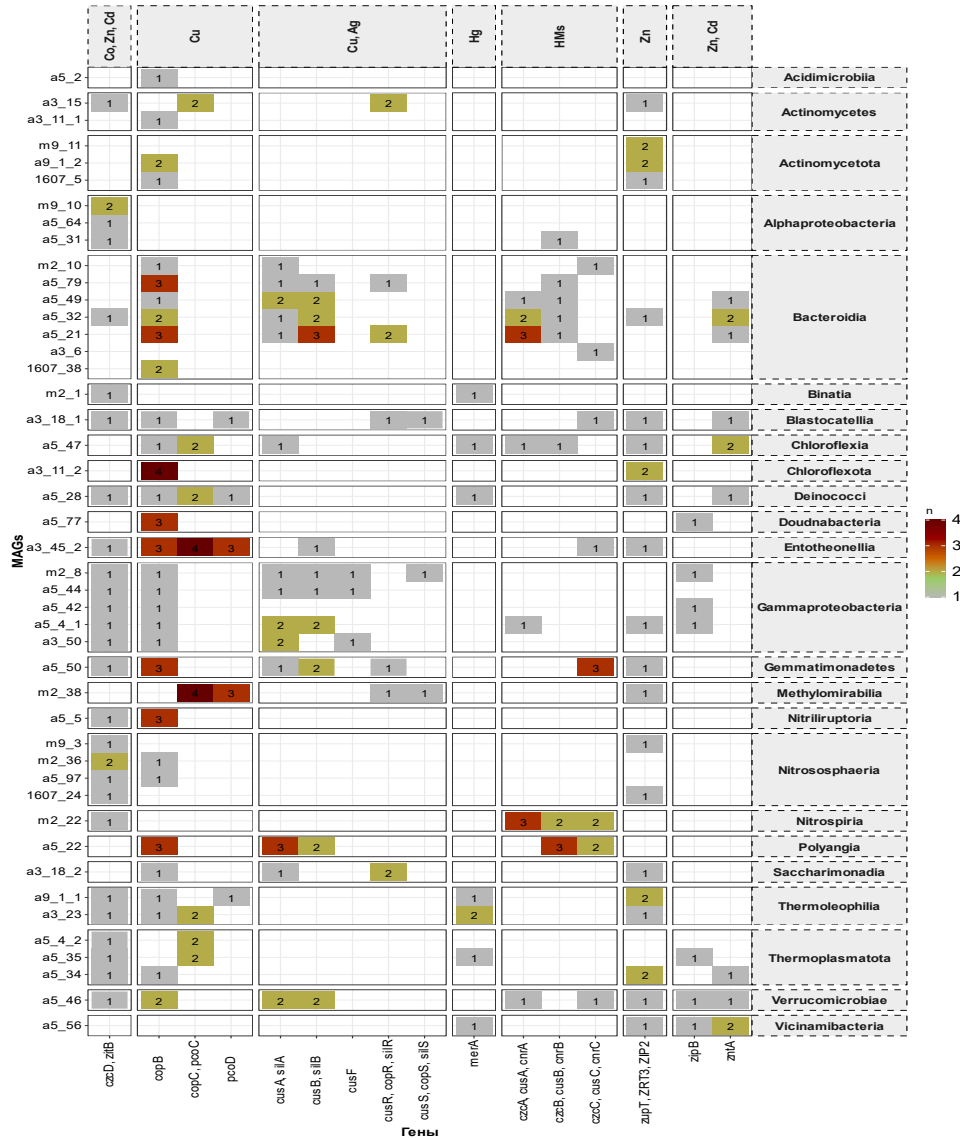
Из метагеномных данных почв углеотвалов было собрано 41 геномов микроорганизмов, ответственных за процессы цикла азота (рисунок 13). Наиболее распространенным геном нитрификации являлся ген, кодирующий нитроалканоксидазу. В геномах аммоний-окисляющих архей были найдены гены, кодирующие все субъединицы аммоний монооксигеназы (*amoCAB*), а также ген *nirK*. Гены автотрофной нитрификации были обнаружены только у аммоний-окисляющих архей. Гетеротрофных нитрификаторов, способных к окислению неорганического N, обнаружено не было. Среди генов, кодирующих нитритредуктазу, наиболее распространенным был ген *nirK*. Гены, кодирующие редуктазу закиси азота были обнаружены у представителей Chitinophagales.



По оси ординат указаны названия геномов, 1607_ – геномы, собранные из метагенома чернозема обыкновенного карбоантного; a_ – геномы, собранные из метегеномов техногенно нарушенных почв углеотвала шахты Аютинская, m_ – геномы, собранные из метегеномов техногенно нарушенных почв углеотвала шахты Майская

Рисунок 13 – Гены, ответственные за цикл N, в собранных геномах в техногенно нарушенных почвах

В целом, численность генов, ответственных за устойчивость к ТМ, была выше в геномах из техногенно нарушенных почв, чем в фоновых (рисунок 14). Наибольшее количество генов устойчивости было обнаружено по отношению к Zn и Cu. Численность генов в геномах даже из сильно загрязненной почвы редко превышало 10 копий.



По оси ординат указаны названия геномов, 1607_ – геномы, собранные из метагенома чернозема обыкновенного карбоантного; a_ – геномы, собранные из метегеномов техногенно нарушенных почв углеотвала шахты Аютинская, m_ – геномы, собранные из метегеномов техногенно нарушенных почв углеотвала шахты Майская. n – количество копий генов

Рисунок 14 – Распространенность генов устойчивости к ТМ в собранных геномах техногенно нарушенных почвах углеотвалов

5.5 Связь микробных показателей со свойствами техногенно нарушенных почв углеотвалов

Корреляционный анализ проводился на основе проб, отобранных на территории подножья угольных отвалов шахт «Майская» и «Аютинская» (таблица 6). Корреляционный анализ показателей физических, химических и физико-химических и биологических свойств техноземов склона отвалов не проводился, так как угольный отвал шахты «Аютинская» был подвергнут рекультивации и засыпан глинистыми материалами. Отсутствие или наличие значимых корреляционных связей будет обусловлено различием исходных физических, химических и физико-химических свойств привезенных материалов и фоновых почв.

Обилие аммонификаторов положительно коррелировало с рН почвы ($r=0,83$) и отрицательно с концентрацией подвижного Zn и содержанием $C_{орг}^{700}$ ($r=-0,66$ и $-0,58$, соответственно). Активность уреазы достоверно и положительно коррелировала только с содержанием ВОВ ($r=0,71$). Несмотря на отсутствие корреляции численности денитрифицирующих бактерий с содержанием ТМ, скорость процесса денитрификации (нитрит- и нитратредукции) отрицательно коррелировала с концентрацией подвижного Zn ($r=-0,80$ и $-0,69$). Активность окисления аммония и нитрита отрицательно коррелировала с содержанием песчаной фракции ($r=-0,94$ и $-0,79$) и % сухого остатка ($r=-0,73$). Скорость окисления аммония отрицательно коррелировала со степенью загрязнения ТМ ($r=-0,64$), скорость окисления нитрита – с содержанием $C_{орг}^{700}$ ($r=-0,60$). Среди всех проанализированных ПАУ только содержания фенантрена и антрацена положительно коррелировали с активностью нитрификации ($r=0,64-0,66$), а также содержание бенз[g,h,i]перилена с численностью нитратредукторов ($r=0,77$) (таблица 6).

Корреляционный анализ по Спирмену физических, химических, физико-химических, содержания ТМ и ПАУ и микробиологических показателей техногенно нарушенных почв подножья угольных отвалов шахт Аютинская и Майская

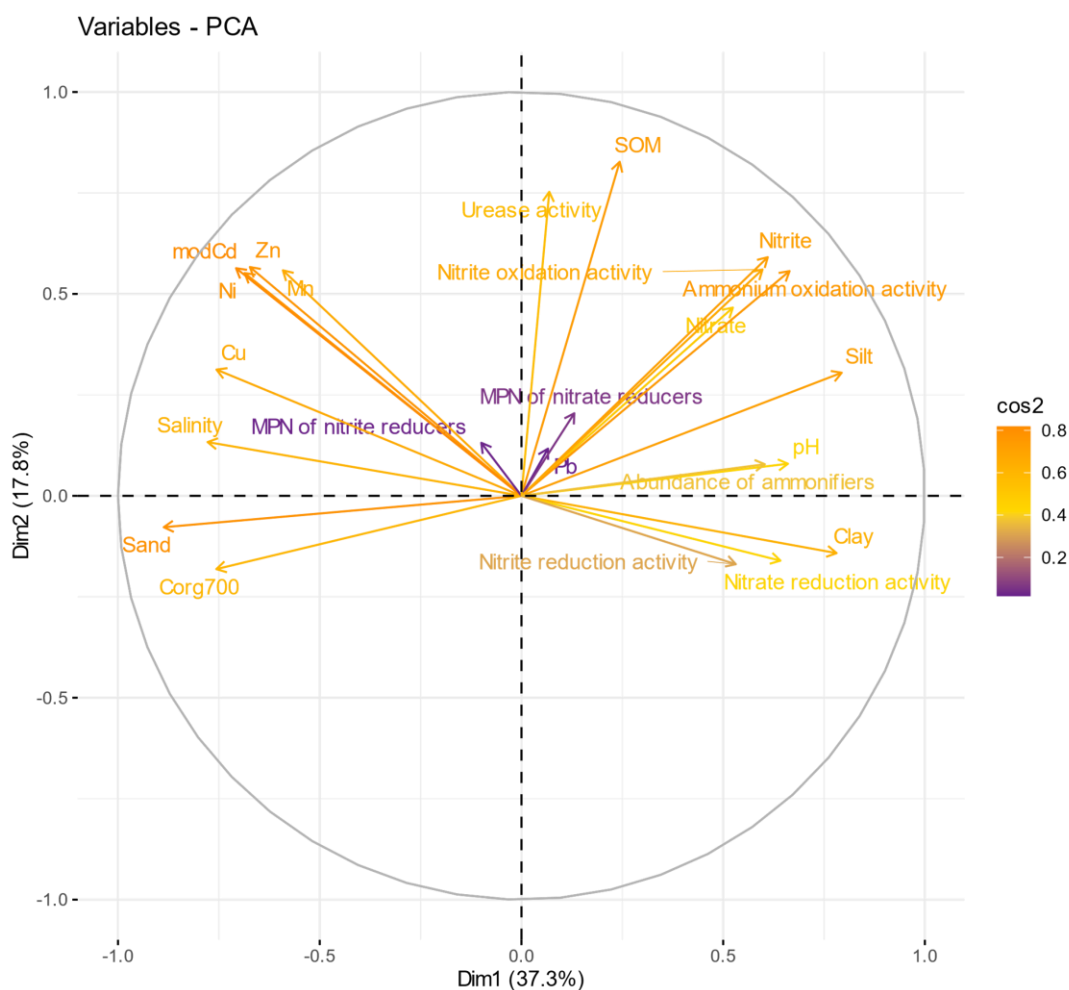
Параметры	Численность нитрат редукторов	Численность нитрит редукторов	Нитрат редукция	Нитрит редукция	Окисление аммония	Окисление нитрита	Аммонификаторы	Уреаза
рН	0,57	0,12	0,50	0,38	0,57	0,58 *	0,83***	-0,34
Песок (1,0-0,05 мм), %	-0,40	-0,09	-0,57	-0,36	-0,94 ***	-0,79 **	-0,46	-0,46
Глина (0,01-0,001 мм), %	0,31	0,01	0,42	0,24	0,83 ***	0,71 *	0,47	0,57
Ил (<0,001 мм), %	0,54	0,27	0,69 *	0,48	0,74 **	0,69 *	0,52	0,36
Физ. глина (<0,01 мм), %	0,40	0,09	0,57	0,36	0,94 ***	0,79 **	0,46	0,46
ВОВ, г/кг	0,17	-0,13	-0,02	-0,20	0,55	0,50	0,26	0,71 **
Сухой остаток, %	0,00	0,38	-0,23	-0,01	-0,73 **	-0,73 **	-0,41	-0,31
Подвижная форма Zn, мг/кг почвы	-0,10	-0,11	-0,69 *	-0,80**	-0,45	-0,41	-0,66 *	0,31
Подвижная форма Ni, мг/кг почвы	-0,15	-0,08	-0,45	-0,50	-0,61 *	-0,52	-0,44	0,06
Валовое содержание Pb, мг/кг почвы	0,39	0,34	0,58 *	0,55	0,24	0,22	0,31	0,17

Продолжение таблицы 6

Zc	-0,01	-0,07	-0,51	-0,53	-0,64*	-0,52	-0,38	-0,11
Нитрит, мкг N-NO ₂ ⁻ /Г почвы	0,09	-0,17	0,45	0,29	0,89***	0,77**	0,48	0,39
Нитрат, мкг N-NO ₃ ⁻ /Г почвы	0,20	-0,03	0,30	0,33	0,60 *	0,51	0,49	0,22
C _{орг} ⁷⁰⁰ , %	-0,36	-0,42	-0,51	-0,31	-0,57	-0,60 *	-0,58*	-0,43
Фенантрен, нг	0,22	-0,11	0,39	0,12	0,50	0,66*	0,42	0,32
Антрацен, нг	0,14	-0,07	0,35	0,05	0,47	0,64*	0,33	0,40
Бенз[g,h,i]перилен, нг	0,77**	0,54	0,40	0,15	0,60	0,56	0,55	0,24
сумма ПАУ, нг	0,25	0,23	0,00	-0,34	0,08	0,27	-0,01	0,09

* - p < 0,05, ** - p < 0,01, *** - p < 0,001

В ходе проведения PCA были выделены два основных фактора, которые объясняли дисперсию показателей биологической активности на 37,3 и 17,8% (55,1%) (рисунок 15). Из рисунка 15 видно, что влияние двух факторов на взаимосвязанные стадии одного процесса, такие как окисление аммония и нитрита (нитрификация), восстановление нитрата и нитрита (денитрификация), НВЧ нитрат- и нитритредукторов, было одинаковым.



cos2 относится к градиенту качества, чтобы выделить наиболее важные переменные при объяснении вариаций, сохраняемых главными компонентами. SOM – ВОВ, MPN – НВЧ, modCd – Zc по подвижным формам ТМ

Рисунок 15 – Положение изучаемых параметров в плоскости главных компонент. Показаны только значимые корреляции

Фактор 1 из показателей биологических свойств был положительно связан с активностью нитратредукцией, нитритредукцией, окисления аммония и обилием аммонификаторов, а из физических, химических и физико-химических – с наличием низких концентраций техногенного $C_{\text{орг}}^{700}$ в почве, с высоким процентом илистой и глинистой фракции, слабощелочным рН почвы, низким содержанием подвижных Cu, Zn, Ni и более высоким содержанием нитрита и нитрата в почвах. Фактор 2 был положительно связан с окислением аммония и нитрита и активностью уреазы, а также с содержанием нитрита и ВОВ.

Было обнаружено, что соотношение фракций частиц почвы оказывает значительное влияние на биологическую активность почвы и структуру микробного сообщества. В районах добычи угля почва меняют текстуру и состав, влияя на питательные вещества, влажность и другие физические, химические и биологические свойства (Wang et al., 2023). Гранулометрический состав почвы может напрямую влиять на денитрификацию, поскольку аэрация затруднена в почвах с высоким содержанием глины и ила (Mentges et al., 2016), что благоприятно для денитрификации (Yuan et al., 2021).

Содержание угольной пыли в образцах почвы существенно повлияло на состав почвы, внося вклад в песчаную фракцию (размер частиц $> 0,05$ мм). Как денитрификация, так и нитрификация были более активны в почвах с высоким содержанием глины и ила (содержащих меньшее количество угольной пыли). Однако, если рассматривать отдельно техноземы склонов, то активность нитрификации снизилась относительно как чернозема обыкновенного, так и эмбриоземов, что, вероятно, связано с высоким содержанием глины в материалах, используемых для рекультивации.

Активность нитрификации, денитрификации и обилие аммонификаторов были чувствительны к содержанию $C_{\text{орг}}^{700}$ в почвах. Однако публикаций о влиянии угля на микробные сообщества почвы немного, хотя угольные частицы являются одним из основных компонентов, попадающих в почву в результате горнодобывающей деятельности.

Среди проанализированных показателей цикла азота наиболее чувствительным процессом в техногенно нарушенных почвах являлся процесс нитрификации. Обнаружены отрицательные корреляции активности нитрификации и засоления, уровня загрязнения ТМ. Было выявлено доминирование аммоний-окисляющих архей в почвах с высоким содержанием ТМ. Таким образом, дальнейшей целью нашей работы стало изучение процессов нитрификации в почвах с краткосрочным и долгосрочным загрязнением ТМ.

ГЛАВА 6 ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО И КРАТКОСРОЧНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ ТМ НА АКТИВНОСТЬ НИТРИФИКАЦИИ

6.1 Нитрифицирующая активность хемоземов бывшего шламонакопителя

Содержание аммония в лугово-черноземной почве и в хемоземах бывшего шламонакопителя достоверно не различалось и составляло 20 мкг/г (рисунок 16), в то время как содержание нитрита и особенно нитрата было значительно выше в лугово-черноземной почве.

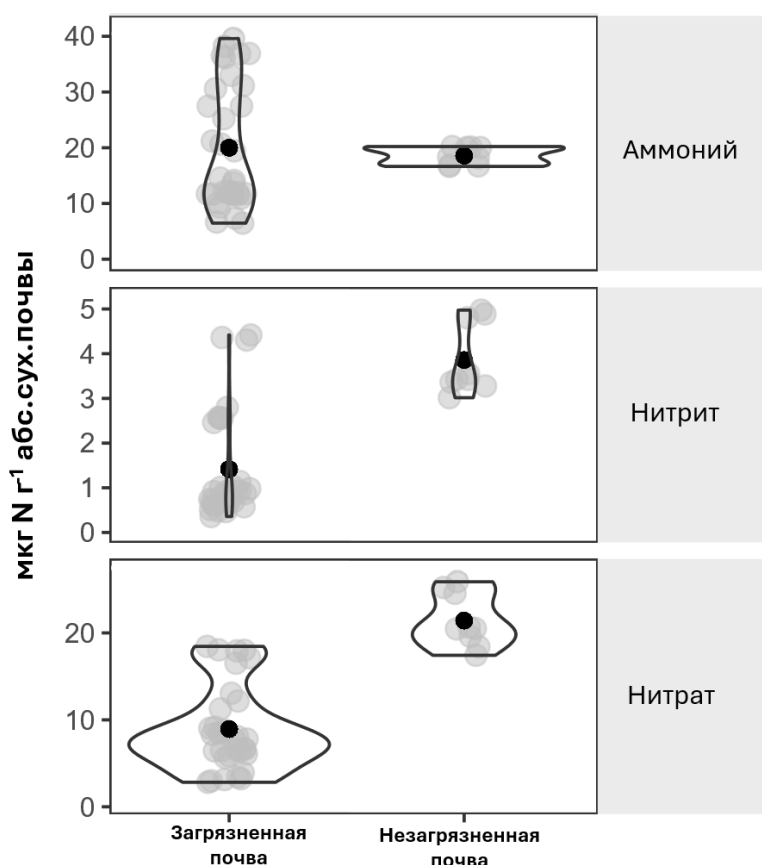
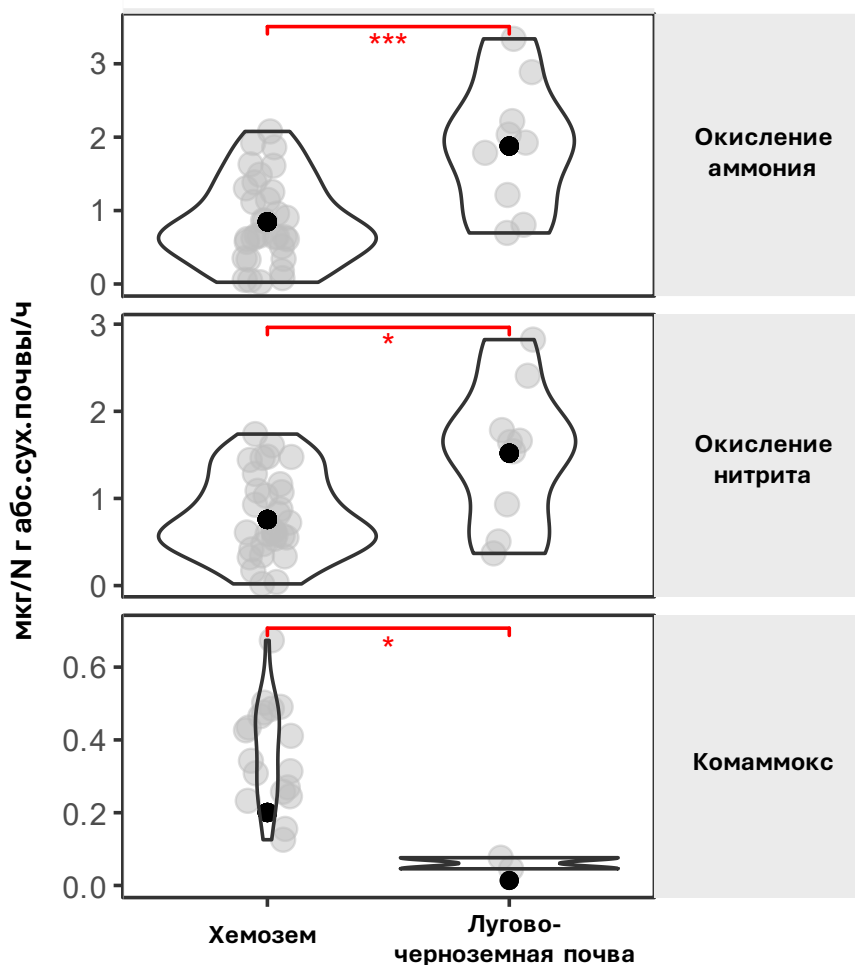


Рисунок 16 – Содержание водорастворимых форм азота в лугово-черноземных почвах и хемоземах

Активность автотрофной нитрификации в лугово-черноземных почвах в 2 раза превышала активность в хемоземах бывшего шламонакопителя (рисунок 17). Содержание нитрата в фоновых почвах также было выше, чем в хемоземах (21 против 9 мкг/г) (рисунок 16). Стоит отметить важную роль процесса комаммокс в хемоземах. В почвах бывшего шламонакопителя более 50% общей активности обусловлено активностью полных окислителей аммония. В таблице 14 приложения

А представлена значимость изменения показателей в лугово-черноземных почвах и хемоземах.

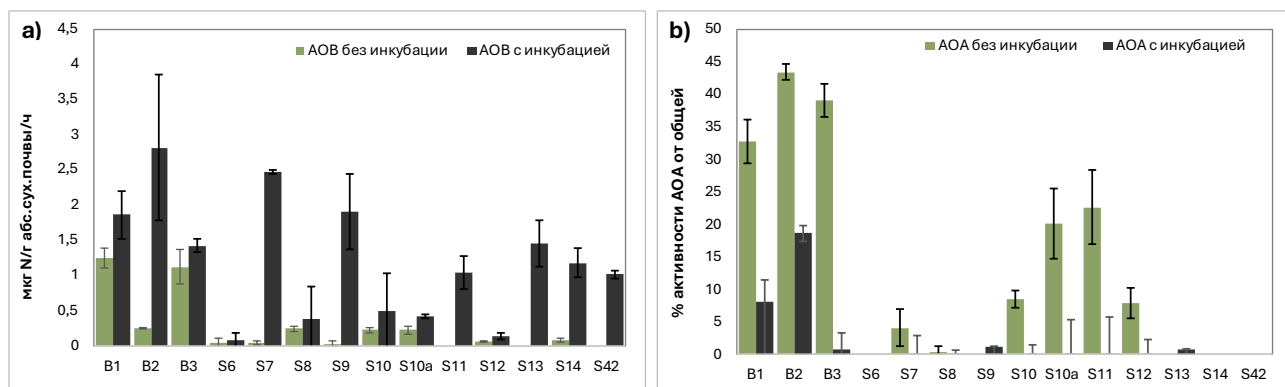


* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$ и *** – $p < 0,001$, NS – не значимо

Рисунок 17 – Активность автотрофной нитрификации в лугово-черноземных почвах и хемоземах: активность окисления аммония, окисления нитрита и комаммокса автотрофными микроорганизмами, экспресс-тест

После инкубации почвы с раствором аммония обнаружено увеличение активности нитрификации как в лугово-черноземных почвах, так и в хемоземах. Увеличение активности нитрификации связано с активностью аммоний-окисляющих бактерий, а не архей, поскольку аллилтиомочевина (ингибитор бактерий) снизила более чем на 80% активности окисления аммония (рисунок 18b).

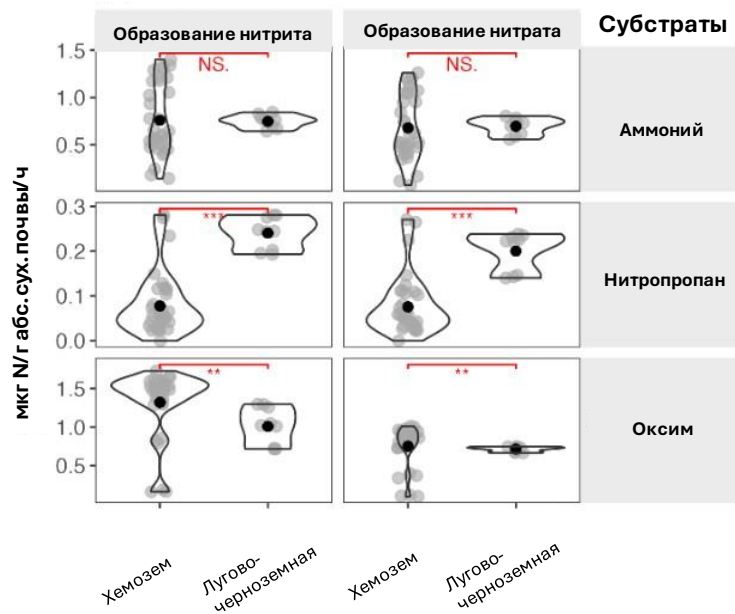
В некоторых образцах почвы активность нитрификации была ниже предела обнаружения.



В – лугово-черноземная почва, S – хемозем

Рисунок 18 – Автотрофное окисление NH_4^+ а) аммоний-окисляющими бактериями (АОВ); б) аммоний-окисляющими археями (АОА), экспресс-тест, после недельной инкубации с аммонием

Общая активность окисления аммония и нитрита достоверно не различалась в лугово-черноземных почвах и хемоземах (рисунок 19). Активность гетеротрофной нитрификации варьировала в зависимости от субстрата. Активность окисления нитроалканов была выше в лугово-черноземных почвах, чем в хемоземах. Активность окисления пировиноградного оксима, наоборот, была выше в хемоземах. Наиболее предпочтительным субстратом для окисления форм азота является пировиноградный оксим. При этом присутствие оксима стимулирует большее образование нитрита, чем других субстратов.



* – при $p < 0,05$, ** – при $p < 0,01$ и *** – $p < 0,001$, NS – не значимо

Рисунок 19 – Активность нитрификации в незагрязненных и загрязненных почвах: активность образования нитрита и нитрата из источников N: аммония, нитропропана и пировиноградного оксима

6.2 Метагеномный анализ хемоземов бывшего шламонакопителя

Данные метагеномного анализа подтверждают выводы, полученные при анализе нитрифицирующей активности почв. Численность АОА в лугово-черноземных почвах преобладает над численностью таковых в хемоземах бывшего шламонакопителя (рисунок 20). Численность АОВ и НОВ, напротив, выше в хемоземах в среднем в 2-3 раза.

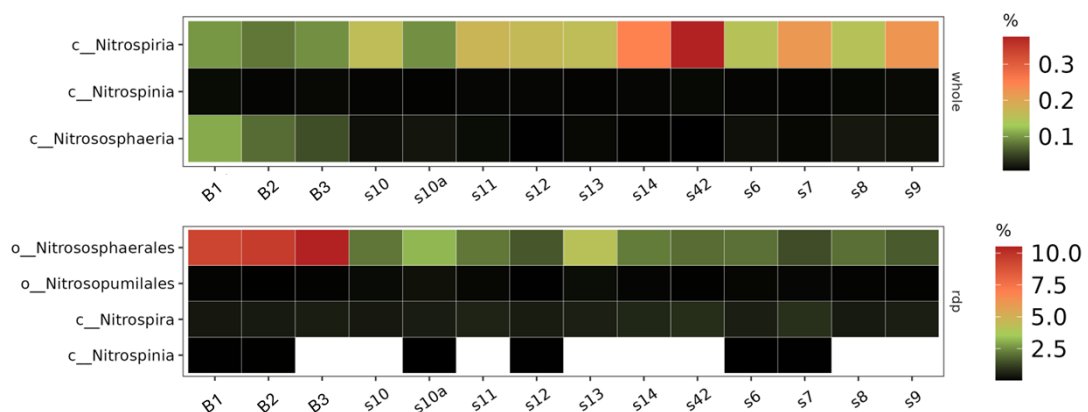
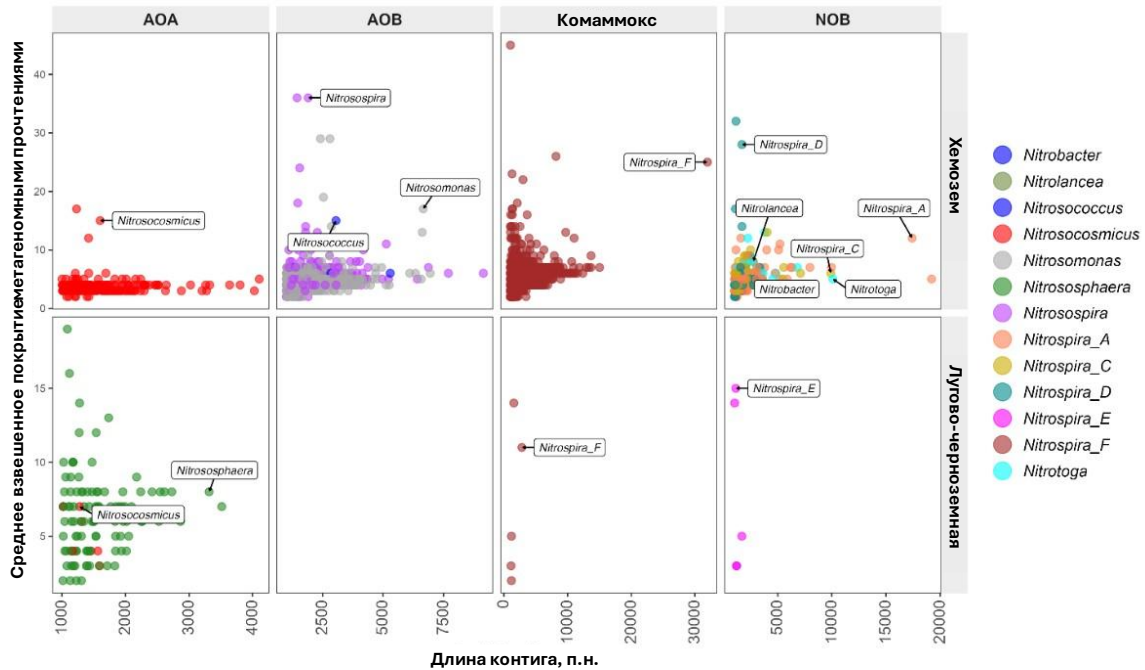


Рисунок 20 – Обилие нитрифицирующих микроорганизмов на уровне филумов и порядков в хемоземах шламонакопителя (s) и лугово-черноземных почвах (B)

Разнообразие родов автотрофных нитрификаторов в экстремально загрязненных почвах представлено родами *Nitrosospira*, *Nitrosomonas* и *Nitrosococcus* среди АОВ, *Nitrospira*, *Nitrospina* и *Nitrolancea* среди НОВ. В фоновых почвах доминировали аммоний-окисляющие археи, представленные *Nitrososphaera*, *Candidatus Nitrosocosmicus* (рисунок 21).

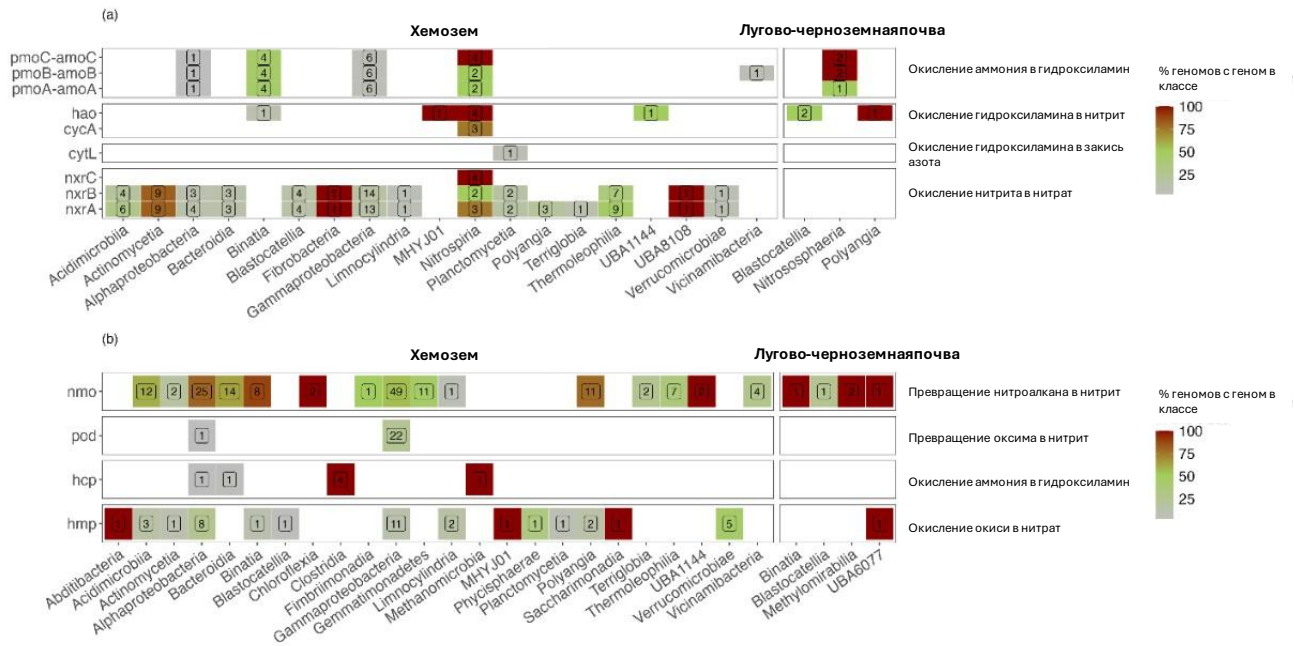


Каждая точка представляет собой один контиг, который не попал ни в один из бинов. Показаны только контиги, которые были классифицированы как нитрифицирующие микроорганизмы на уровне рода. АОА — контиги, принадлежащие к археям, окисляющим аммоний, АОВ — к бактериям, окисляющим аммоний, Комаммокс — к *Nitrospira*, полностью окисляющим аммоний до нитрата, НОВ — к бактериям, окисляющим нитрит. Контиги были классифицированы на основе предсказанного выравнивания ORF с белками в референтной базе данных белков GTDB с использованием программного обеспечения CAT-rack. Рассматриваются только контиги с не менее чем 3-кратным покрытием и классифицированные на основе не менее чем двух ORF

Рисунок 21 – Диаграмма рассеяния длины и покрытия неотсортированных КОНТИГОВ

Гены автотрофной нитрификации *amoCAB* были обнаружены в собранных геномах, принадлежащих к классам Nitrososphaeria (лугово-черноземные почвы), Vinatia и Gammaproteobacteria (хемоземы) (рисунок 22). Гены, кодирующие как фермент нитритоксидоредуктазу, так и аммоний монооксигеназу – *nhr* и *amoCAB*, соответственно, были обнаружены в геномах представителей автотрофной нитрификации: Nitrospiria и Nitrososphaeria, соответственно. Представители комаммокс-процесса были обнаружены только в хемоземах.

Ген, кодирующий нитроалканазы (*nmo*), широко представлен среди собранных геномов (в 117 геномах из 330) (рисунок 22). Ген *pod* был обнаружен только у 16 представителей класса Gammaproteobacteria, а именно у представителей семейства Burkholderiales и четырех представителей рода *Pseudomonas*. Ген, кодирующий диоксигеназу оксида азота (*hmp*), был обнаружен в 26 геномах, относящихся к различным классам (Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Verrucomicrobia и другим). NO образуется микроорганизмами как промежуточный продукт денитрификации и нитрификации (Schreiber et al., 2012). Одним из ферментов, детоксифицирующих NO, является диоксигеназа оксида азота (*hmp*) (Tang et al., 2023b). Этот фермент участвует в детоксикации токсичных продуктов NO до NO_3^- (Gardner et al., 2000). Присутствие этого фермента снижает выбросы оксидов азота (Loick et al., 2016).

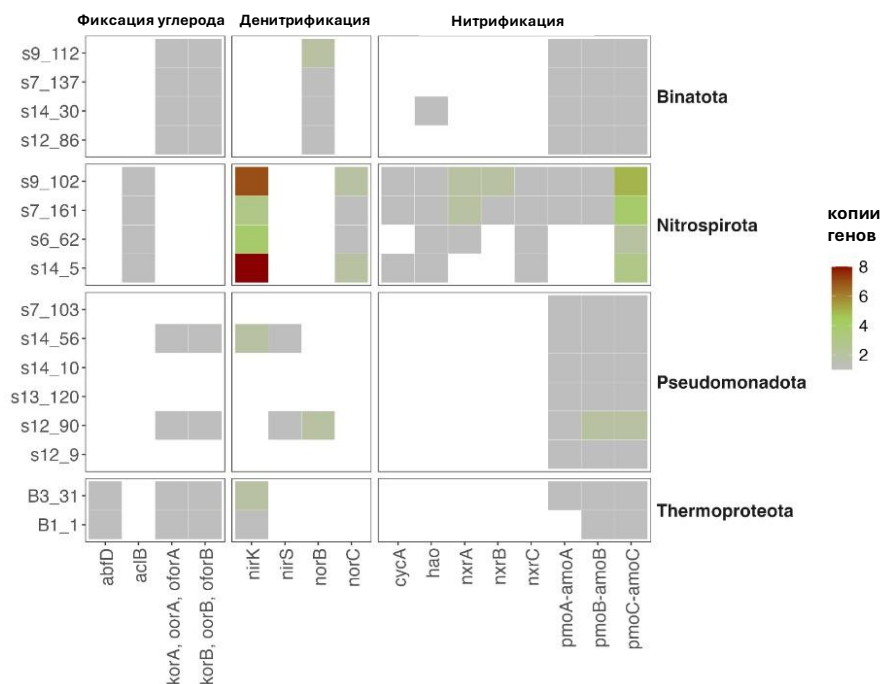


Ген *amoCAB* кодирует монооксигеназу аммония, *nirK* – нитритредуктазу или редуктазу оксида азота, *hao* и *cusA* – гидросиламиноксидоредуктазу, *cytL* – цитохром P460, *nxr* – нитритоксидоредуктазу, *nmo* – нитронатмонооксигеназу, *pod* – диоксигеназу пировиноградного оксида, *hcp* – гидросиламинредуктазу, *hmp* – диоксигеназу оксида азота

Рисунок 22 – Гены нитрификации в собранных геномах из лугово-черноземных почв и хемоземов: (а) гены автотрофной нитрификации, (б) гены гетеротрофной нитрификации

Поскольку наличие генов, ответственных за фиксацию CO_2 , является маркером автотрофного типа питания, на рисунке 23 представлены результаты поиска генов восстановительного цитратного и гидроксипропионат-гидроксибутилатного циклов. МАГи, принадлежащие к филуму Nitrospirota (*s9_102*, *s7_161*, *s6_62*, *s14_5*), содержат ген *acIb*, кодирующий белок восстановительного цитратного цикла фиксации CO_2 (рисунок 23). Среди представителей филума Pseudomonadota два генома, классифицируемые как Porticossaceae и Gammaproteobacteria, содержат гены восстановительного цитратного цикла *korA*, *korB* – rTCA cycle (*s14_56* и *s12_90*). Два генома, принадлежащие к роду *Nitrososphaera* (*B1_1* и *B3_31*), фиксируют CO_2 через

гидроксипропионат-гидроксibuтилaтный цикл (ген *abf D* - 4-гидроксibuтилaрил-КоА дегидрaтaзa) и вoсстaнoвительный цитрaтный цикл (rTCA cycle).



В – названия геномов, собранных их метагеномов лугово-черноземной почвы и s – названия геномов, собранных из метагеномов хемозема. Гены, кодирующие ферменты денитрификации: *nirK* и *nirS* – нитритредуктаза, *norB* и *norC* – редуктаза оксида азота. Ген фиксации CO₂: *kor* – ген восстановительного цитратного цикла rTCA, *acl* – белка восстановительного цитратного цикла, *abf* – гидроксипропионат-гидроксibuтилaтного цикла

Рисунок 23 – Гены фиксации CO₂ в собранных геномах нитрификаторов в незагрязненных и загрязненных почвах

Среди генов, ответственных за устойчивость к ТМ, в геномах особенно широко были распространены *copB*, *cus AB*, *czcABC*, *zntA*, *zurT*, ответственные за трансляцию белка системы оттока ТМ (рисунок 24). В геномах Nitrospirota выявлено от 18 до 27 генов устойчивости к ТМ, тогда как в двух геномах Nitrososphaeria – всего 2 гена. Наибольшее число копий генов (*cusA*, *silA*) обнаружено у аммоний-окисляющей *Vinatia* из хемоземов (от 10 до 34 генов), тогда как в геноме из лугово-черноземных почв – всего 2 гена. Большое разнообразие генов металлорезистентности (MRG) также было обнаружено в геномах представителей, обладающих генами *pod*. Так, для представителей филума

Pseudomonadota характерно наличие более 20 генов. При сравнении обилия генов в хемоземах шламонакопителя и эмбриоземах углеотвалов стоит отметить, что количество генов, ответственных за устойчивость к ТМ, в хемоземах шламонакопителя значительно выше.

Наибольший вклад в образование нитрита и нитрата из аммония среди автотрофных нитрификаторов в загрязненных почвах внесли АОВ и NOB, тогда как в лугово-черноземной почве более 30% общей активности нитрификации принадлежало АOA (рисунок 18). Геномы, принадлежащие *Nitrososphaera*, были собраны из метагеномов незагрязненных почв, тогда как в хемоземах были обнаружены только бактериальные геномы. Собранные геномы *Nitrososphaera* из незагрязненных почв содержат гены *amoCAB* и *nirK*. Гены, кодирующие гидроксиламиноксидоредуктазу, отсутствовали. В настоящее время неизвестно, какой фермент выполняет функцию НАО в археях, окисляющих аммоний (Wright et al., 2023). Carini et al. (2018) предположили, что нитрит-оксидоредуктаза, кодируемая *nirK*, участвует как в окислении гидроксилamina, так и в окислении оксида азота до нитрита (Stein, 2019).

Несмотря на то, что АOA считаются более устойчивыми нитрификаторами, чем АОВ (Li et al., 2009; Ollivier et al., 2012; Subrahmanyam et al., 2014; Liu et al., 2021; Wang et al., 2023), было обнаружено, что АОВ могут доминировать в сильно загрязненных почвах (Subrahmanyam et al., 2014; Liu et al., 2018). Доминирование АОВ над археями связано с несколькими причинами. Устойчивость сообщества нитрификаторов в первую очередь связана с развитием толерантности к ТМ в пределах различных флотипов АОВ, а не с появлением определенных флотипов (Mertens et al., 2009; Ruymers et al., 2012). Устойчивость к высыханию также является фактором дифференциации ниш для АOA и АОВ (Bello et al., 2019; Séneca et al., 2020). Поскольку хемоземы бывшего шламового резервуара высыхают в летний период (таблица 15 приложения А), чувствительные к засухе АOA погибают. Археи лучше приспособлены к постоянным условиям окружающей среды, но чувствительны к изменяющимся условиям (Valentine, 2007).

Среди АОВ наиболее распространенными в хемоземах оказались представители рода *Nitrospira* (рисунок 21). Собранные геномы, принадлежащие Nitrospirota, содержали гены, ответственные за окисление аммония, гидроксилamina и нитрита, что указывает на наличие процесса комаммокса, а также гены фиксации CO₂ (*acIB*). Из двух кандидатов на роль оксидоредуктазы

оксида азота в геномах был обнаружен только *nirK*. Ген *ncuA*, кодирующий нитрозоцианин, отсутствовал, однако предполагается, что нитрозоцианин играет важную роль в этом процессе (Stein, 2019). Ген *nirK* присутствует во всех геномах *Nitrospira* (Sakoula et al., 2021).

Активность комаммокса в хемоземах достигала более 50% от общей активности нитрификации (рисунок 17), что также согласуется с данными Li et al. (2023b) и Tang et al. (2023a). Высокий уровень Cu может стимулировать рост комаммокс бактерий *Nitrospira* (Tang et al., 2023a). В собранных геномах Nitrospirota из экстремально загрязненных почв обнаружено более 18 генов *czc*, *sor* и *cus*, кодирующих белки системы оттока катионов. Белки *sorAB*, обнаруженные только в комаммокс *Nitrospira*, обеспечивают более высокую толерантность к Cu^{2+} (Ayub et al., 2022). Большая геномная гибкость и адаптивность были ранее выявлены в геномах *Nitrospira* (Poghosyan et al., 2019). Juliastuti et al. (2003) и Radniecki et al. (2009) обнаружили, что 1,2-6 мг/кг Zn^{2+} практически полностью подавляли активность АМО. В то же время, в нашем исследовании активность нитрификаторов из загрязненных почв оставалась на высоком уровне несмотря на то, что содержание Zn^{2+} в водных порах в загрязненной почве составляло более 10 мг/кг.

Комаммокс *Nitrospira sp.* доминирует в средах с низким содержанием аммония, что обусловлено способностью комаммокса генерировать больше энергии за счет полного окисления аммония до нитрата и их более эффективного пути фиксации С (Palomo et al., 2018; Ghimire-Kafle et al., 2024). Также предполагается, что субъединица *amoC* может играть роль в стабилизации функции окисления аммония в периоды покоя или энергетического стресса (Qin et al., 2018; Koch et al., 2019). В собранных геномах было обнаружено преобладание копий *amoC* относительно *amoA* и *amoB*. В *Nitrospira* обнаружены одна копия оперона *amoCAB* и два гена *amoC* (Li et al., 2023a).

Среди представителей автотрофных нитрифицирующих бактерий на уровне прочтений были идентифицированы представители аммоний-окисляющих бактерий — роды *Nitrosospira*, *Nitrosomonas* и *Nitrosococcus*. Из собранных

геномов из загрязненных почв три генома, обладающих *amoCAB*, относились к филуму Pseudomonadota и Desulfobacterota. Один геном был классифицирован как Porticossacea. Представители этого семейства не являются автотрофными нитрификаторами. Представитель семейства Porticossaceae участвует в деградации циклоалканов (Arrington et al., 2023). Вторым геном, классифицирован как Gammaproteobacteria. Среди представителей этого семейства роды *Nitrosococcus* и *Nitrosoglobus* известны как автотрофные аммоний-окисляющие бактерии (Hayatsu et al., 2021). Геном содержал гены, отвечающие за фиксацию CO₂ (*korA*, *korB*), что указывает на автотрофный способ питания. Ферменты аммоний монооксигеназы были также идентифицированы в геноме *Methylostis* sp. и *Binatia* sp., однако они в первую очередь выполняют функции метанмонооксигеназ, поскольку эти микроорганизмы являются метанотрофами (Smith et al., 2011; Murphy et al., 2021). В средах с высоким содержанием аммония они могут вносить вклад в окисление аммония (Martikainen, 2022). Среди видов, окисляющих аммоний, наибольшее количество генов устойчивости к ТМ обнаружено у представителей Binatota.

После инкубации хемоземов с аммонием активность автотрофной нитрификации не всегда восстанавливалась, однако в этих образцах наблюдалось высокое содержание нитрата (рисунок 16), что может быть связано с наличием гетеротрофной нитрификации в этих почвах. Гетеротрофная нитрификация делится на два пути: первый путь характеризуется окислением неорганических соединений азота до нитрита и нитрата в присутствии органических соединений, второй путь нитрификации характеризуется образованием нитрита и нитрата из органического азота (Li et al., 2018; Martikainen, 2022). Гетеротрофная нитрификация почвенного органического азота в этом случае отсутствовала, поскольку содержание нитрифицированного аммония коррелировало с активностью нитрификации ($r = 0,90$, $p < 0,001$). Представители гетеротрофных нитрификаторов, классифицируемые как Pseudomonadales (четыре MAG), были обнаружены в хемоземах. Наличие аннотированных ферментов *amoCAB* и отсутствие ферментов фиксации CO₂ в собранных геномах указывают на их принадлежность к гетеротрофным нитрификаторам. Представители семейства

Pseudomonadales из родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter* обладают активностью аммоний монооксигеназы (Lang et al., 2020; Zhang et al., 2020; Huang et al., 2022; Liu et al., 2022).

Наименее предпочтительным субстратом для нитрификации в загрязненных почвах был нитропропан. Низкая активность NAO в хемоземах обусловлена низким обилием плесневых грибов (рисунок 18, 25). Первоначально нитроалканоксидазы были обнаружены в таких грибах, как *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Williopsis saturnus* var. *mrakii* и *Neurospora crassa* (Kido et al., 1978; Zhang et al., 2002). Отсутствие связи между активностью NAO и количеством плесневых грибов в почвах демонстрирует значительный вклад бактерий в детоксикацию нитроалканов, учитывая, что NAO широко представлен в собранных геномах бактерий. Кроме того, высокая активность нитроалканоксидазы в лугово-черноземной почве может быть связана с обильной растительностью, тогда как растительное покрытие в загрязненных почвах составляло менее 50% (рисунок 25). Растения вырабатывают нитротоксины для защиты, которые впоследствии детоксицируются микробными нитроалканоксидазами (Francis et al., 2012; Rogowska-van der Molen et al., 2022).

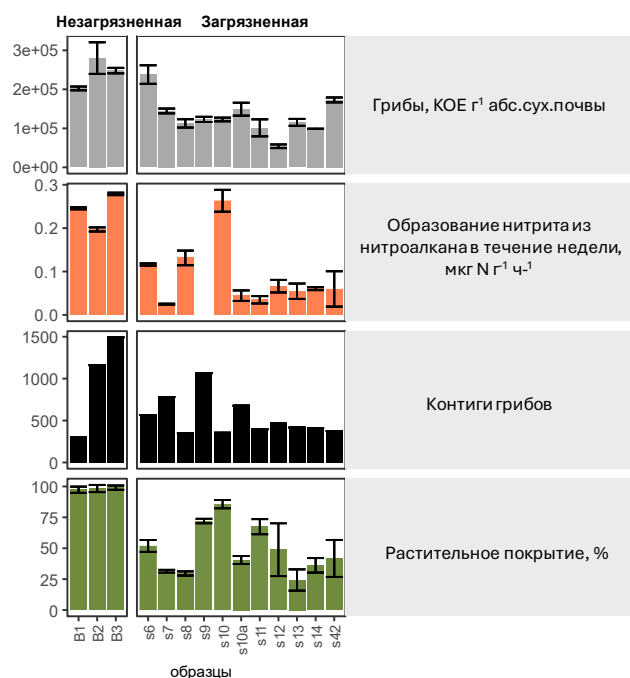


Рисунок 25 – Активность нитроалканоксидазы и численность плесневых грибов в лугово-черноземных почвах (B) и хемоземах бывшего шламонакопителя (s)

Активность гетеротрофной нитрификации пировиноградного оксима была выше в хемоземах, чем в лугово-черноземных почвах. Этот процесс осуществляли представители семейства Burkholderiales. POD широко представлен в геномах, отнесенных к Burkholderiales, особенно к роду *Pseudomonas* (Tsujino et al., 2023). Некоторые представители семейства Burkholderiales (*Cupriavidus pauculus*) способны нитрифицировать в присутствии высокого содержания Cu или Ni (Ramirez et al., 2014). Собранные геномы содержали более 20 генов *cis* и *czc*, ответственных за синтез белков систем оттока ТМ.

Высокая активность POD в загрязненных почвах может быть обусловлена детоксикацией токсичного гидроксиламина, который образуется и накапливается в больших количествах после аммонийного голодания АОВ (Soler-Jofra et al., 2021). Гидроксиламин продуцируют все нитрифицирующие микроорганизмы: археи, бактерии и эукариоты (включая гетеротрофных нитрификаторов) (Ermel et al., 2018). Gao et al (2022) обнаружили антагонистическое действие представителей рода *Alcaligenes* на род *Bacillus* через высвобождение гидроксиламина. Существует множество механизмов его утилизации в N_2 , NH_3 гидроксиламинооксидазой, гидроксиламинредуктазой (Cabello et al., 2004; Wu et al., 2022). Одним из механизмов является превращение гидроксиламина в безопасный пировиноградный оксим. Гидроксиламин попадает в клетку гетеротрофного нитрификатора, взаимодействует с пируватом и превращается в пировиноградный оксим. Затем POD высвобождает пируват, необходимый для аэробного метаболизма, а нитрит как побочный продукт либо покидает клетку, либо восстанавливается в процессе денитрификации (Tsujino et al., 2017). Помимо POD, геномы также содержали гены, кодирующие ферменты нитритоксидоредуктазу (*nirK*, *nirS*) и редуктазу оксида азота (*norBC*) дыхательной цепи денитрификации.

Гены *nirK* и *nirS*, которые отвечают за окисление NO до NO_2^- и NO_2^- до NO_3^- , соответственно, были обнаружены в геномах семейств Acidimicrobiales и Solirubrobacterales (рисунок 26). Solirubrobacterales являются аэробными микроорганизмами (Rosenberg et al., 2014). Thermoleophilaceae могут расти только

на н-алканах C12–19, циклогексане, циклогептане, спиртах C12–18 и кетонах C13–19 (Yakimov et al., 2003), а также могут использовать нитроалканы в качестве источника азота (Rosenberg et al., 2014). Ген *nmo*, кодирующий нитроалканазу, был обнаружен в геномах. Также в геномах были обнаружены гены, кодирующие ассимиляционную нитритредуктазу (*nasC*, *nasA*, *nirA*). Более того, в одном из геномов было идентифицировано 16 копий гена *copB* что указывает на высокую устойчивость к ТМ. Таким образом, микроорганизмы способны использовать нитроалканы в качестве источника азота с помощью нитроалканоксидазы, нитритоксидоредуктазы и ассимиляционной нитритредуктазы. Функция *nxrAB* у актинобактерий в настоящее время неясна, как и их способность к окислению нитрита. Vikram et al. (2015) идентифицировали гены *nxrAB*, которые продемонстрировали гомологию с неклассифицированными актинобактериями. Таким образом, предположено наличие нового механизма детоксикации NO и NO₂⁻ у представителей семейств Acidimicrobiales и Solirubrobacterales.

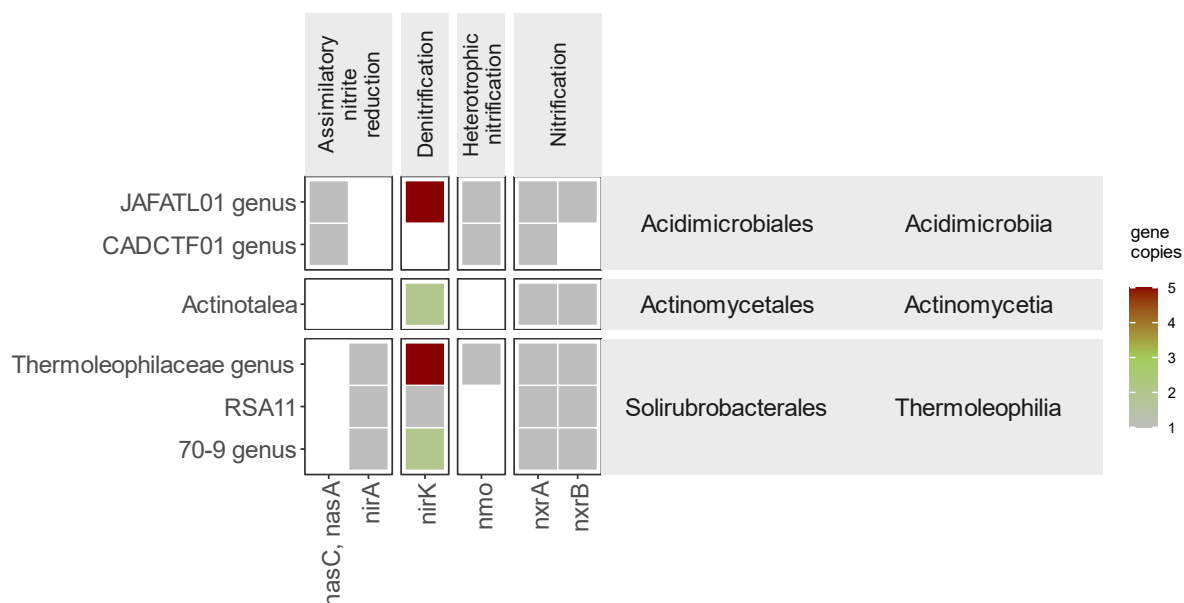
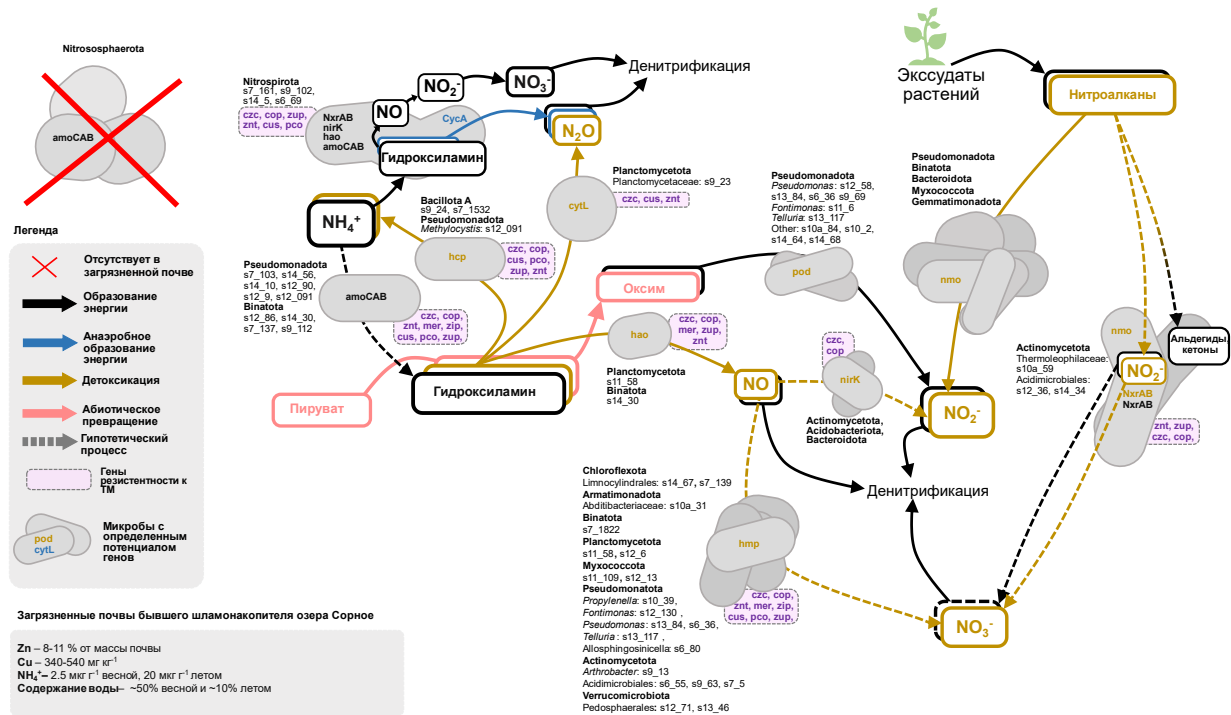


Рисунок 26 – Гены нитрификации у представителей Acidimicrobiales и Solirubrobacterales

Таким образом, в экстремально загрязненных почвах формируется нитрифицирующее сообщество, в котором среди автотрофных нитрификаторов доминируют АОВ, а именно комаммокс бактерии. Движущими факторами такой

трансформации сообщества являются экстремальное загрязнение почвы Zn, варьирование содержания аммония и влажности почвы. Мы предполагаем, что в почвах образуется большое количество токсичных соединений N, поэтому среди гетеротрофных нитрификаторов формируются следующие механизмы защиты: от гидросиламина – POD и от оксида азота – HMP, NirK и NXR (рисунок 27).



amoCAB кодирует монооксигеназу аммония, *nirK* – нитритредуктазу или редуктазу оксида азота, *hao* и *cusA* – гидросиламинооксидоредуктазу, *cytL* – цитохром P460, *nxr* – нитритоксидоредуктаза, *nmo* – нитронатмонооксигеназа, *pod* – диоксигеназа пировиноградного оксима, *hcp* – гидросиламинредуктаза, *hmp* – диоксигеназа оксида азота. MRG: *mer* – редуктаза ртути, *pco*, *cop* – белок устойчивости к Cu, *cus* – белок системы оттока Cu/Ag, *mts* – белок, связывающий субстрат транспортной системы Fe/Zn/Mn/Cu, *czc* – белок системы оттока ТМ, *zip* – транспортер Zn и Cd, *zur* – транспортер Zn

Рисунок 27 – Предполагаемый механизм детоксикации токсичных соединений азота в загрязненных почвах

6.3 Влияние краткосрочного загрязнения почвы Zn на активность нитрификации

После внесения ZnO в почву содержание подвижных форм Zn увеличилось с 3 до 212 мг/кг (таблица 7).

Валовое содержание и содержание подвижных форм Zn в почвах
модельного опыта

Вариант загрязнения	Zn, мг/кг		% подвижных форм от валового содержания Zn
	Валовое содержание	Подвижные формы	
Контроль	110±5.52	3.02±0.15	2.73±0.14
Zn	2282±114	212±10.6	9.29±0.46

Внесение 2200 мг/г Zn в лугово-черноземную почву (Stagnic Fluvisol Humic по WRB, 2022) значительно снизило активность окисления аммония и нитрита в 14,0 и 9,40 раз соответственно (рисунок 28). В то же время, при длительном загрязнении более чем 100 000 мг/кг Zn активность нитрификации снизилась всего лишь в 2 раза.

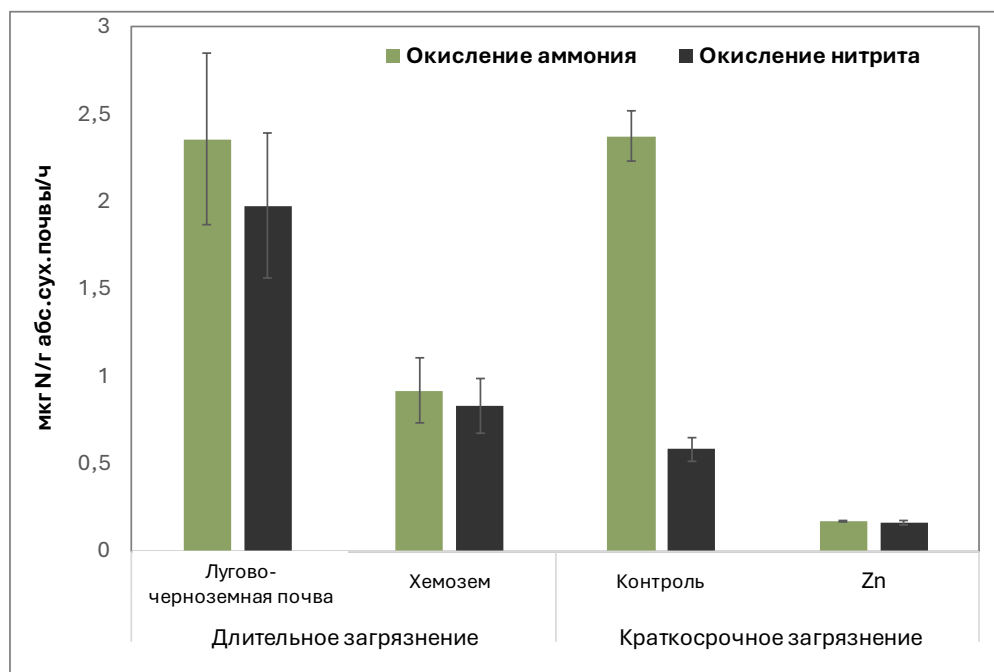


Рисунок 28 – Активность нитрификации при длительном загрязнении (81-117 г/кг Zn) и краткосрочном загрязнении ZnO (2282 мг/кг Zn) в модельном эксперименте

Данный факт объясняется тем, что при краткосрочном загрязнении ТМ у нитрификаторов не успевают выработаться адаптационные механизмы, что приводит к резкому снижению активности нитрификации.

ГЛАВА 7 ДЕГРАДАЦИЯ ПАУ ДЕНИТРИЦИРУЮЩИМИ И НИТРИФИЦИРУЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

7.1 Результаты анализа метагенома накопительной культуры нитрификаторов

Для получения накопительной культуры нитрификаторов с целью ремедиации почв, загрязненных ПАУ, был выбран техногенно нарушенный чернозем обыкновенный углеотвала шахты Майская на площадке М7, характеризующийся высокой активностью нитрификации. Почвенный образец М7 и накопительная культура значительно различаются по доминирующим родам бактерий (рисунок 29а). В почвенном метагеноме среди всех прокариот преобладали *Streptomyces* – 7,4%, *Sphingomonas* – 4,18%, в накопительной культуре преобладали рода *Nitrosomonas* – 16,9%, *Pseudomonas* – 4,85%, *Streptomyces* – 4,8% и *Nitrospira* – 2,17. Доля нитрифицирующих бактерий в накопительной культуре относительно всех классифицированных бактерий и архей составила 19,1% (0,2% для площадки М7).

На рисунке 29б показано, что почвенное сообщество нитрификаторов разнообразно и представлено в основном родами *Nitrososphaera*, *Nitrosomonas* (окислители аммония) и *Nitrospira*, *Nitrobacter* и *Nitrospirillum* (окислители нитрита). В накопительной культуре доминирующими родами были *Nitrosomonas* и *Nitrospira*.

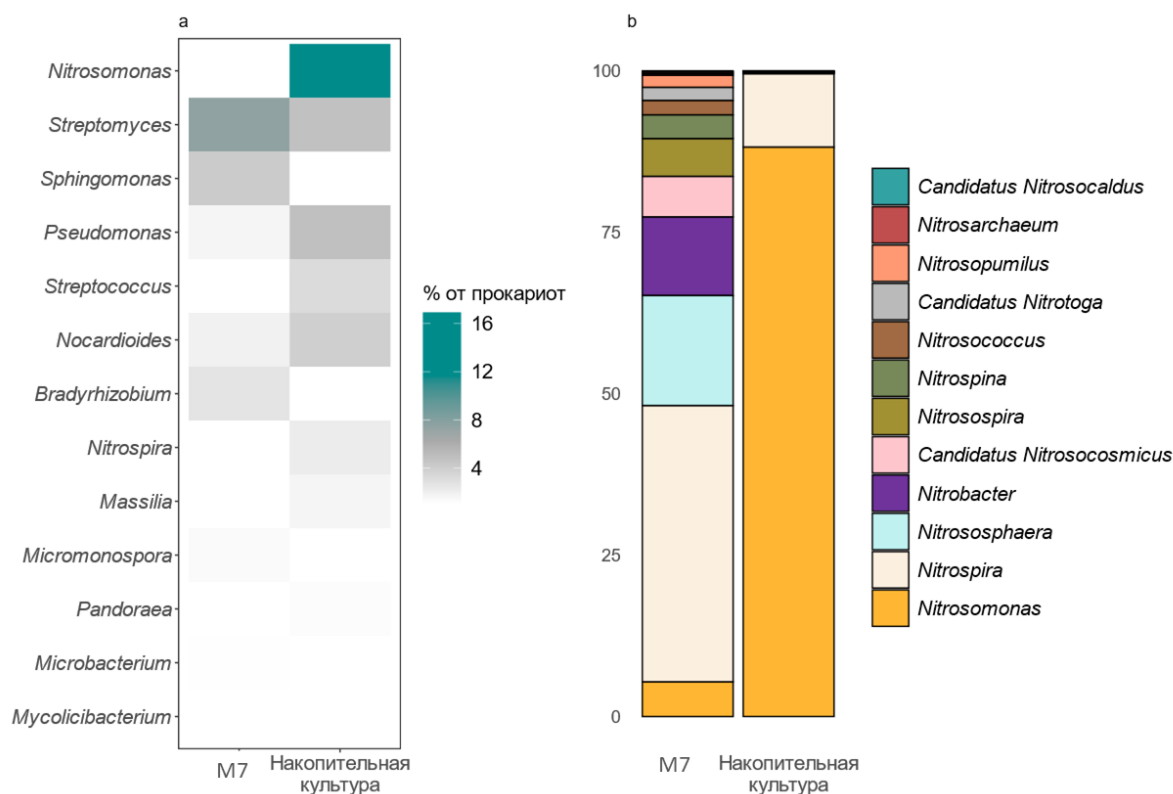


Рисунок 29 – Накопление нитрифицирующих микроорганизмов, выделенных из почвенного образца М7: *a* – доминирующие рода прокариот в техногенно нарушенном черноземе обыкновенном М7 и накопительной культуре нитрификаторов, (в процентах от всех прокариотических прочтений образца); *b* – таксономический состав нитрификаторов почвенного образца и накопительной культуры (за 100% взята сумма родов нитрифицирующих архей и бактерий)

Процент содержания представителей доминирующих родов *Nitrosomonas* и *Nitrospira* в почвенном образце от общего количества прочтений составил 0,01 и 0,09%. Таким образом, обилие *Nitrosomonas* и *Nitrospira* в накопительной культуре в 1600 и в 30 раз, соответственно, выше обилия в почвенном образце.

Доминирующими представителями накопительной культуры являлись *Nitrosomonas*, *Nitrolancea* и *Nitrospira*. Представители этих родов являются одними из наиболее распространенных бактерий в почвах загрязненных ТМ, а также в системах очистки сточных вод угольных шахт (Subrahmanyam et al., 2014; Ma et al., 2015; Nemmat-Jou et al., 2018). При этом в сильнозагрязненной почве содержалось больше аммоний-окисляющих бактерий, чем аммоний-окисляющих архей

(Subrahmanyam et al., 2014). *Nitrosomonas communis* также обнаруживалась в отложениях зоны приема промышленных сточных вод (Zhang et al., 2016). Представители Thermomicrobiaceae, а именно *Nitrolancea*, могут адаптироваться к высокому засолению (Liang et al., 2022), что важно при ремедиации почв углеотвалов, поскольку почвы там зачастую характеризуются высоким уровнем содержания водорастворимых солей (Li et al., 2014).

7.2 Сборка индивидуальных геномов нитрификаторов

В результате сборки геномов из трехмесячной накопительной культуры было получено 35 бинов, из них 27 прошли контроль качества (полнота сборки >60%, контаминация <15%) и считались MAG'ами. По результатам таксономического анализа большинство геномов вошло в порядки Burkholderiales (Gammaproteobacteria) и Actinomycetales (Actinomycetota), и Saccharimonadales (Patescibacteria). Четыре собранных генома были аффилированы с таксонами, для которых известна нитрификация. Среди них – геном *Nitrosomonas communis* (далее – sfAOB_NC), два генома порядка Nitrospirales (далее sfNOB_N1 и sfNOB_N2), а также геном бактерии семейства Thermomicrobiaceae (далее – sfNOB_T). Статистики сборки данных геномов приведены в таблице 11. Четыре собранных генома нитрификаторов представляют значительную долю всех прочтений в метагеномном образце (19%).

В течение одного года хранения и культивирования сообщество накопительной культуры сместилось в сторону увеличения доли нитрифицирующих бактерий с 19% до 38% (таблица 8). Доминирующими представителями были аммоний-окисляющие бактерии - *Nitrosomonas communis* (NR2_44) и нитрит-окисляющие бактерии - *Nitrolancea* (NR2_7). Полнота сборки генома составила более 90%, а уровень загрязнения был ниже 10%.

Таксономия и статистика сборки геномов нитрификаторов. ААI – процент средней аминокислотной идентичности собранного генома с ближайшим видом

MAGs	Таксономия	Полнота сборки, %	Контаминация, %	К-во контигов	Ближайший вид	ААI, %	Прочтения, %
Накопительная культура спустя трех месяцев накопления							
sfAO B_NC	<i>N. communis</i>	98,1	5,70	297	<i>N. communis</i>	99,1	6,10
sfNO B_N1	Nitrospirales	60,4	0	355	Nitrospiraceae species	66,6	0,40
sfNO B_N2	Nitrospirales	98,1	4,70	97	Nitrospiraceae species	62,9	11,7
sfNO B_T	Thermomicrobiaceae	60,4	0	202	<i>Nitrolancea hollandica</i>	75,8	0,80
Накопительная культура спустя год накопления							
NR2_7	<i>Nitrolancea</i>	93,0	4,86	395	<i>Nitrolancea hollandica</i>	84,6	11,1
NR2_44	<i>Nitrosomonas communis</i>	99,8	7,30	180	<i>Nitrosomonas communis</i>	98,5	27,3

7.3 Анализ генов нитрификации, обнаруженных в геномах из накопительной культуры

У sfAOB_NC и NR2_44 (*Nitrosomonas communis*) обнаружены две копии генов, кодирующих субъединицы аммониймонооксигеназы (*AmoA*, *AmoB*, *AmoC*), а также гены, кодирующие субъединицы редуктазы оксида азота (*norB*, *norC*). В геноме *Nitrolancea* (NR2_7) обнаружены все гены, кодирующие ферменты окисления нитрита до нитрата (*nxrAB*), а также гены, отвечающие за ассимиляционное восстановление нитрата и нитрита (*nas* и *nir*). У sfNOB_N1 и sfNOB_N2 (Nitrospirales) были идентифицированы гены, кодирующие окисление нитрита до нитрата – нитритоксидоредуктазу (*nxrA*), а также гены, кодирующие

нитратредуктазы (*narA*, *narB*, *narH*, *narL*, *narJ*), нитритредуктазы (*nirK*, *nirA*, *nirB*, *nirD*) и редуктазу оксида азота (*norC*) (рисунок 30).

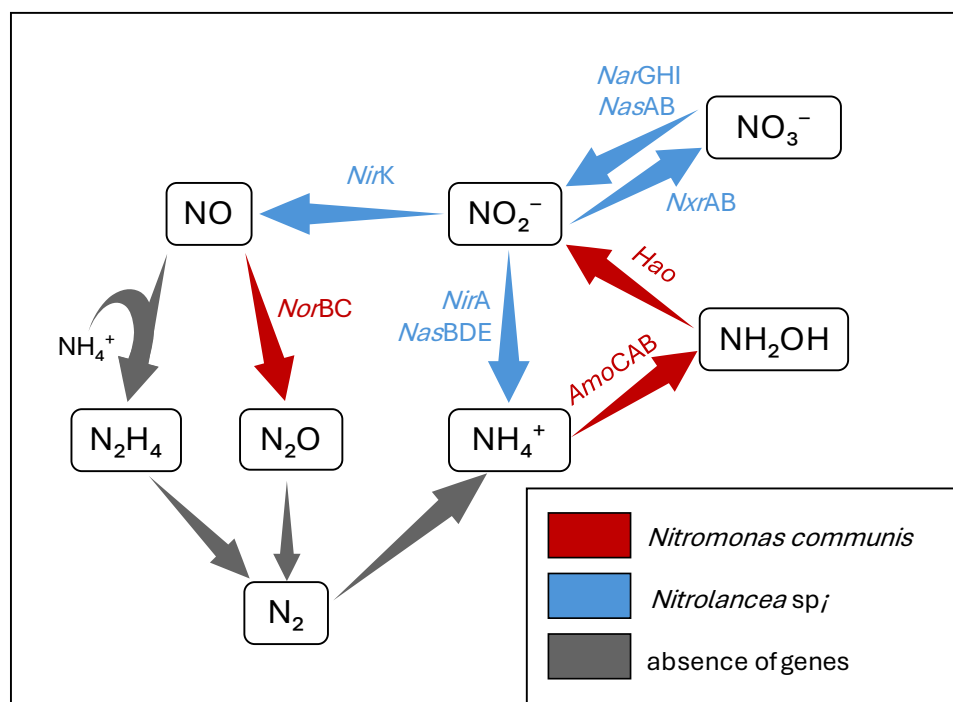


Рисунок 30 – Гены, кодирующие ферменты цикла азота, в собранных геномах нитрифицирующих микроорганизмов

7.4 Влияние ПАУ и ТМ на активность нитрификации накопительной культуры

Активность окисления аммония накопительной культуры составляла $30,3 \pm 2,8$ мкг N/ч/г, окисление нитрита – $14,7 \pm 0,0$ мкг N/ч/г. Наиболее биодоступным и соответственно токсичным углеводородом оказались низкомолекулярные соединения (нафталин и бифенил). Наименее токсичным был пирен (рисунок 31). Пирен негативно повлиял на активность окисления аммония только при внесении в дозе 10 000 нг/г и выше, меньшая концентрация снизила активность АМО не более чем на 20% относительно контрольных значений.

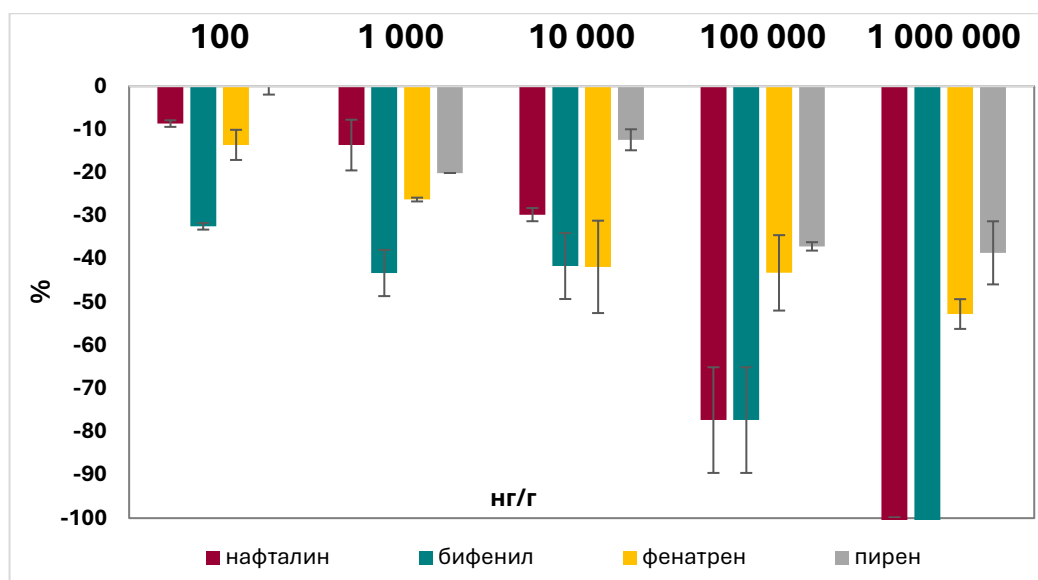


Рисунок 31 – Влияние ПАУ на активность нитрификации накопительной культуры

В отличие от ПАУ, ТМ оказывают более выраженное негативное влияние на биологические процессы. Внесение Cu, Ni и Cd в концентрациях 0,01-0,1 мг/кг значительно снизило активность нитрификации (рисунок 32). Наиболее токсичными элементами оказались Cd и Ni. При добавлении 10 мг/кг активность снизилась на 81% относительно контрольного варианта. Менее токсичными ТМ оказались Pb и Zn. Значимое снижение активности нитрификации наблюдалось только при добавлении 1 и 10 мг/кг данных металлов.

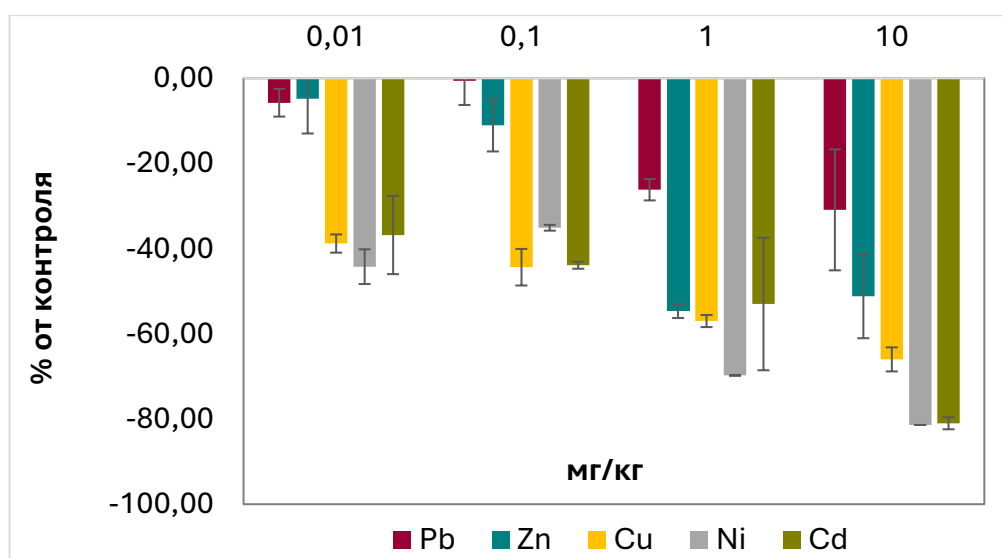


Рисунок 32 – Влияние ТМ на активность нитрификации накопительной культуры нитрификаторов

Влияние анализируемых ПАУ на накопительную культуру различалось в зависимости от молекулярной массы полиарена. Низкомолекулярные ПАУ сильнее ингибировали активность окисления аммония по сравнению с высокомолекулярными. Исследователями Petersen et al., (2008) также наблюдалось отсутствие ингибирующего действия низких концентраций пирена на активность нитрификации. Это связано с тем, что 4-х кольчатый пирен, в отличие от 2-х кольчатых нафталина и бифенила, менее биодоступен (Alegbeleye et al., 2017). В то же время, нафталин и бифенил, наоборот, сильнее подавляли активность нитрификации накопительной культуры. Вероятно, это связано с тем, что соокисление нафталина *Nitrosomonas* приводит к необратимому ингибированию ферментов окисления аммония (Chang et al., 2002). Более того, после разложения крупных молекул углеводорода образуются более токсичные соединения (Urakawa et al., 2019). Для преодоления этой проблемы хорошим решением может быть создание консорциумов из нитрифицирующих микроорганизмов и гетеротрофных ПАУ-деструкторов. Причем первые могут инициировать начальные этапы окисления, снижая гидрофобность ПАУ, а вторые реализовывать дальнейшую деградацию ПАУ, удаляя из среды токсичные для нитрификаторов продукты окисления углеводородов. По отношению к ТМ накопительная культура была чувствительна к высоким концентрациям Ni и Cd. Hu et al. (2002); Aslan, Sozudogru (2017) и Кароог et al., (2015) обнаружили, что Ni и Cd. оказывают более сильное ингибирующее действие на нитрифицирующие организмы, чем другие ТМ.

7.5 Анализ генома ПАУ-деградирующего денитрификатора

Среди ПАУ-деструкторов был выбран один штамм, идентифицированный как *Enterobacter ludwigii*. Полнота сборки генома составляла 99,97%, а контаминация – 0,14%. Наличие процессов денитрификации у штамма *Enterobacter* также подтверждается наличием генов, ответственных за диссимиляционную и ассимиляционную нитратредукцию (рисунок 33). Были обнаружены гены, ответственные за нитрификацию: все субъединицы аммоний монооксигеназы, все

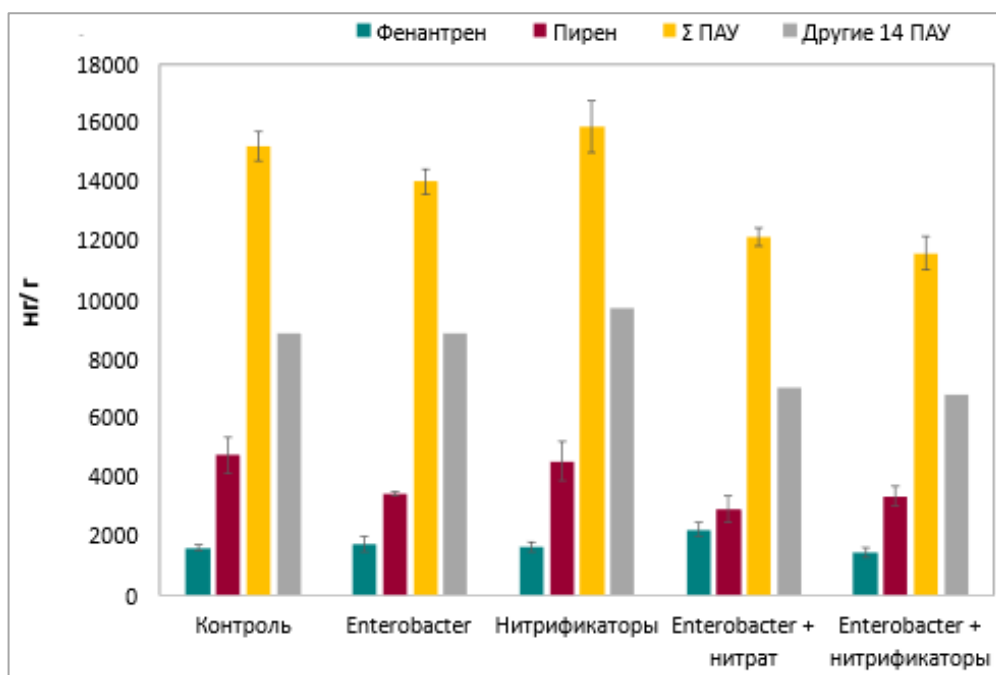


Рисунок 34 – Остаточное содержание фенантрена и пирена после инкубации штаммов и их консорциума в загрязненной почве углеотвала

В процессе анаэробной деградации ПАУ опосредованной нитратредукцией происходит значительное накопление нитрита, который ингибирует процесс разложения ПАУ (Zhou et al., 2023). По этой причине при составлении консорциумов микроорганизмов необходимо использовать ПАУ-деструкторов, способных осуществлять не только нитратредукцию, но и нитритредукцию. Выделенные штаммы, принадлежащие к роду *Enterobacter*, проявили нитратредуктазную и нитритредуктазную активности. ПАУ-деградирующие штаммы *E. kobei* и *E. ludwigii* ранее выделялись другими исследователями из почв, загрязненных нефтепродуктами (Nawaz et al., 2023; Pacwa-Płociniczak et al., 2023). Таким образом, их использование в качестве биопрепарата позволит избежать накопления нитрита в почвах, образовавшегося в процессе нитратредукции. Помимо этого, нитрификаторы обеспечивают деструкторов ПАУ конечными акцепторами электронов в виде нитрата, что способствует разложению полиаренов в анаэробных областях, часто наблюдаемых в гетерогенных условиях почвы, особенно при избыточном увлажнении (рисунок 35) (Philippot et al., 2007; Yang et al., 2020).

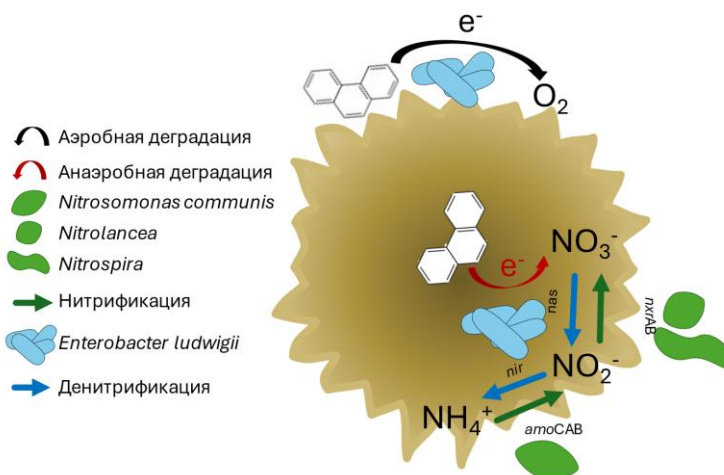


Рисунок 35 – Схема деградации ПАУ консорциумом бактерий, разлагающих ПАУ, и нитрификаторов

Выявлено, что консорциум из нитрификаторов и денитрифицирующего ПАУ-деструктора оказался наиболее эффективным. Отдельное внесение штамма деструктора привело к меньшей деградации фенантрена и пирена. Для штаммов рода *Enterobacter* ранее была отмечена возможность эффективно разлагать различные ПАУ (Khatoon et al., 2019; Sheng et al., 2008). Отдельно нитрификаторы не проявили явной эффективности в деградации смеси ПАУ. В процессе нитрификации возможно образование промежуточного продукта – гидроксилamina, который токсичен для микроорганизмов (He et al., 2021). По этой причине стоит отметить наличие у штамма ПАУ-деструктора гена, кодирующего фермент редуктазу гидроксилamina. Таким образом, внесение штамма *Enterobacter ludwigii* с целью разложения ПАУ не приведет к накоплению токсичных соединений азота. Более того, у деструктора денитрификация осуществляется за счет диссимиляционной нитратредукции, что означает возможность возврата аммония в окружающую среду (Cheng et al., 2022).

ВЫВОДЫ

1. В почвах углеотвалов шахты Майской и Аютинской города Шахты Ростовской области обнаружено умеренно-опасное и чрезвычайно опасное загрязнение Ni, Pb, Zn. Повышенное содержание $C_{\text{орг}}^{700}$ и подвижных форм ТМ, засоление и подкисление почв отрицательно влияют на активность процессов нитрификации и денитрификации. Более чувствительным биологическим показателем является активность нитрификации, которая в эмбриоземах и техноземах углеотвалов снизилась значительно по сравнению с исходной почвой, принятой за фон – черноземом обыкновенным.

2. В техноземах углеотвалов, прошедших механическую рекультивацию, несмотря на снижение уровня засоления и загрязнения ТМ до допустимого уровня, обнаружено снижение численности нитрифицирующих микроорганизмов, активности нитрификации и уреазы ввиду увеличения содержания глинистой фракции и снижения содержания $C_{\text{орг}}$ в почве.

3. Хемоземы бывшего шламонакопителя характеризуются высоким длительным загрязнением ТМ, особенно Zn (в среднем 100 000 мг/кг), что привело к снижению активности нитрификации в 2 раза относительно лугово-черноземных почв. Загрязнение лугово-черноземной почвы Zn в условиях модельного эксперимента в концентрации 2200 мг/кг снизило активность нитрификации в 10 раз.

4. В хемоземах бывшего шламонакопителя доминируют комаммокс бактерии Nitrospirota, окисляющие и аммоний, и нитрит, в геномах которых были обнаружены гены устойчивости к ТМ: *cop*, *cus*, *czc*. Хемоземы бывшего шламонакопителя характеризовались повышенной активностью образования нитрита из оксима пировиноградной кислоты представителями филума Pseudomonadota. В их геномах обнаружено более 20 генов резистентности к тяжелым металлам. Активность нитроалканоксидазы в лугово-черноземных почвах была выше в 3 раза.

5. В геноме штамма *Enterobacter ludwigii*, выделенном из техногенно нарушенных почв углеотвалов, обнаружены гены, ответственные за

денитрификацию (*nar* и *nir*) и гены, ответственные за деградацию гидроксифенилацетата, гомологи генов, ответственных за деградацию фенантрена, пирена и фталата (*pht4*, *pht3*, *phtAaBC*, *phdE*, *phdK*, *nahB*).

6. Совместное внесение *Enterobacter ludwigii* в концентрации 3×10^8 клеток микроорганизмов/г и накопительной культуры нитрификаторов с активностью окисления аммония – $2,02 \pm 0,19$ мкг N/ч/г почвы, а также *Enterobacter ludwigii* и нитрата калия значительно ускорило разложение ПАУ до 30% за короткий период (1 месяц). Накопительная культура нитрифицирующих микроорганизмов состояла на 38% из аммоний-окисляющей бактерии *Nitrosomonas communis* и нитрит-окисляющей бактерии *Nitrolancea*. Нитрификаторы продемонстрировали устойчивость к пирену, Zn и Pb.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреюк Е.И., Валагурова Е.В. Основы экологии почвенных микроорганизмов. - К.: Изд-во "Наук. думка". – 1992. – 224 с.
2. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во Моск. ун-та. – 1970. – 561 с.
3. Большенко В.В. Эколого-экономическая оценка использования техногенных месторождений (на примере Восточного Донбасса) : дис. – Ростов-на-Дону, 2006.
4. Вадюнина А.Ф., Корчагина З.А. Методы исследования физических свойств почв. М.: Агропромиздат. – 1986. – 416 с.
5. ГН 2.1.7.2511-09. Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве. – 12 с.
6. ГОСТ 10262-73. Реактивы. Цинка окись. Технические условия. – 18 с.
7. ГОСТ 17.4.4.01-84. Охрана природы. Почвы. Методы определения емкости катионного обмена. – 7 с.
8. ГОСТ 17.4.4.02-2017. «Межгосударственный стандарт. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».
9. ГОСТ 26423-85. Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки. – 8 с.
10. ГОСТ 26423-85. Почвы. Методы определения удельной электрической проводимости, рН и плотного остатка водной вытяжки. – 8 с.
11. ГОСТ 26488-85. Почвы. Определение нитратов по методу ЦИНАО. – 4 с.
12. ГОСТ 26489-85 Почвы. Определение обменного аммония по методу ЦИНАО. – 5 с.
13. ГОСТ Р 54653-2011 Удобрения органические. Методы микробиологического анализа. – 27 с.

14. Коркина Е.А. Самовосстановление нарушенных техногенезом почв Среднего Приобья: Монография / Отв. ред. Г.Н.Гребенюк. — Нижневартовск: Изд-во НВГУ. – 2015. — 158 с.
15. Методы почвенной микробиологии и биохимии: Учеб. пособие / Под ред. Д. Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ. – 1991. – 304 с.
16. Нетрусов А.И., Егорова, М.А., Захарчук, Л. М., Динариева, Т.Ю. Практикум по микробиологии //М.: Академия. – 2005. – Т. 608. – С. 0.
17. ПНД Ф 16.1:2:2.2:3.51-08. Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой доли нитритного азота в почвах, грунтах, донных отложениях, илах, отходах производства и потребления фотометрическим методом с реактивом Грисса. – 22 с.
18. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для высших учеб. заведений/под ред. А.И. Нетрусова. - М.: Академия. – 2005. – 608 с.
19. Умаров М.М., Кураков А.В., Степанов А.Л. Микробиологическая трансформация азота в почве / М.: ГЕОС. – 2007. – 138 с.
20. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука. – 2005. – 252 с.
21. Циркина О.Г. (сост.), Производство химических волокон // Методические указания для студентов всех специальностей. – Иваново: ИГТА. – 2010. – 64 с.
22. Шлегель Г. Общая микробиология: Пер.с нем.- М.: Мир. – 1987. – 567 с., ил.
23. Экологическая ситуация в городе Шахты [Электронный ресурс] // Pandia.ru: [сайт]. URL: <https://pandia.ru/text/79/450/51797.php> (дата обращения: 27.02.2022)
24. Abdu N., Abdullahi A.A., Abdulkadir A. Heavy metals and soil microbes // Environmental chemistry letters. – 2017. – V. 15. – № 1. – P. 65-84. DOI: 10.1007/s10311-016-0587-x

25. Akhtar M., Hussain F., Ashraf M.Y., Qureshi T.M., Akhter J., Awan A.R. Influence of salinity on nitrogen transformations in soil // *Communications in soil science and plant analysis*. – 2012. – V. 43. – № 12. – P. 1674-1683
26. Alegbeleye O.O., Opeolu B.O., Jackson V.A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation // *Environmental management*. – 2017. – V. 60. – P. 758-783
27. Alneberg J., Bjarnason B.S., De Bruijn I., Schirmer M., Quick J., Ijaz U.Z., ... Quince C. Binning metagenomic contigs by coverage and composition // *Nature methods*. – 2014. – V. 11. – № 11. – P. 1144-1146. DOI: 10.1038/nmeth.3103
28. Aponte H., Mondaca P., Santander C., Meier S., Paolini J., Butler B., ... Cornejo P. Enzyme activities and microbial functional diversity in metal (loid) contaminated soils near to a copper smelter // *Science of The Total Environment*. – 2021. – V. 779. – 146423
29. Arcila-Galvis J. E., Marín C., Ortega-Cuadros M., Muñoz-Perez J.M, Arias T.A. Metagenomic Assessment of Soil Microbial Communities in a Coal Mine Spoil Dump Under Reclaimed Vegetation in La Guajira, Colombia // *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. – 2022. – V. 22. – №. 4. – P. 4377-4390
30. Argyraki A., Kelepertzis E. Urban soil geochemistry in Athens, Greece: the importance of local geology in controlling the distribution of potentially harmful trace elements // *Sci. Total Environ*. – 2014. – V. 482. – P. 366-377. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.02.133
31. Aroney S.T.N., Newell R.J.P., Nissen J., Camargo A.P., Tyson G.W., Woodcroft B.J. CoverM: Read coverage calculator for metagenomics // *Zenodo*. – 2024
32. Arrington E.C., Tarn J., Kittner H.E., Kivenson V., Liu R.M., Valentine D.L. Methylated cycloalkanes fuel a novel genus in the Porticoccaceae family (Ca. Reddybacter gen. nov) // *Environmental Microbiology*. – 2023. – V. 25. – № 12. – P. 2958-2971. DOI: 10.1111/1462-2920.16474
33. Asaf S., Numan M., Khan A.L., Al-Harrasi A. Sphingomonas: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth // *Critical*

Reviews in Biotechnology. – 2020. – V. 40. – № 2. – P. 138-152. DOI: 10.1080/07388551.2019.1709793

34. Aslan S., Sozudogru O. Individual and combined effects of nickel and copper on nitrification organisms // *Ecological Engineering*. – 2017. – V. 99. – P. 126-133

35. Ayub H., Kang M.J., Farooq A., Jung M.Y. Ecological aerobic ammonia and methane oxidation involved key metal compounds, Fe and Cu // *Life*. – 2022. – V. 12. – № 11. – P. 1806. DOI: 10.3390/life12111806

36. Azarbad H., Niklińska M., Laskowski R., van Straalen N.M., van Gestel, C.A., Zhou J., ... Röling W.F. Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2015. – V. 91. – № 1. – P. 1-11. DOI: 10.1093/femsec/fiu003

37. Bagshaw J., Moody P., Pattison T. Soil health for vegetable production in Australia—Part 4: Measuring soil health // *The State of Queensland, Department of Employment, Economic Development and Innovation*. – 2010. – P. 1-45

38. Basu S., Kumar G., Chhabra S., Prasad R. Role of soil microbes in biogeochemical cycle for enhancing soil fertility // *In New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier. – 2021. – P. 149-157. DOI: 10.1016/B978-0-444-64325-4.00013-4

39. Bello M.O., Thion C., Gubry-Rangin C., Prosser J.I. Differential sensitivity of ammonia oxidising archaea and bacteria to matric and osmotic potential // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2019. – V. 129. – P. 184-190. DOI: 10.1016/j.soilbio.2018.11.017

40. Bissett A., Brown M.V., Siciliano S. D., Thrall P.H. Microbial community responses to anthropogenically induced environmental change: towards a systems approach // *Ecology Letters*. – 2013. – V.16. – P. 128-139.

41. Blagodatskaya E., Kuzyakov Y. Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2013. – V. 67. – P. 192-211. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.08.024

42. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. – 2014. – V. 30. – № 15. – P. 2114-2120

43. Bollmann A., Bär-Gilissen M.J., Laanbroek H.J. Growth at low ammonium concentrations and starvation response as potential factors involved in niche differentiation among ammonia-oxidizing bacteria // *Applied and environmental microbiology*. – 2002. – V. 68. – №. 10. – P. 4751-4757. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4751-4757.2002>
44. Buchfink B., Ashkenazy H., Reuter K., Kennedy J.A., Drost H.G. Sensitive clustering of protein sequences at tree-of-life scale using DIAMOND DeepClust // *bioRxiv*. – 2023
45. Buxton R. Nitrate and nitrite reduction test protocols // *American Society for Microbiology*. – 2011. – P. 1-20
46. Cabello P., Pino C., Olmo-Mira M.F., Castillo F., Roldán M.D. Moreno-Vivián, C., Hydroxylamine assimilation by *Rhodobacter capsulatus* E1F1: requirement of the hcp gene (hybrid cluster protein) located in the nitrate assimilation nas gene region for hydroxylamine reduction // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – V. 279. – № 44. – P. 45485-45494. DOI: 10.1074/jbc.M404417200
47. Campbell B., Gong S., Greenfield P., Midgley D., Paulsen I., George S. Aromatic compound-degrading taxa in an anoxic coal seam microbiome from the Surat Basin, Australia // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2021. – V. 97. – №. 5. – P. fiab053.
48. Cantalapiedra C.P., Hernández-Plaza A., Letunic I., Bork P., Huerta-Cepas J. eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale // *Molecular biology and evolution*. – 2021. – V. 38. – № 12. – P. 5825-5829
49. Carini P., Dupont C.L., Santoro A.E. Patterns of thaumarchaeal gene expression in culture and diverse marine environments // *Environmental Microbiology*. – 2018. – V. 20. – № 6. – P. 2112-2124. DOI: 10.1111/1462-2920.14107
50. Chang S.W., Hyman M.R., Williamson K.J. Cooxidation of naphthalene and other polycyclic aromatic hydrocarbons by the nitrifying bacterium, *Nitrosomonas europaea* // *Biodegradation*. – 2002. – V. 13. – P. 373-381

51. Chaumeil P.A., Mussig A.J., Hugenholtz P., Parks D.H. GTDB-Tk v2: memory friendly classification with the genome taxonomy database // *Bioinformatics*. – 2022. – V. 38. – № 23. – P. 5315-5316
52. Chicano T.M., Dietrich L., de Almeida N.M., Akram M., Hartmann E., Leidreiter F., ... Barends T.R. Structural and functional characterization of the intracellular filament-forming nitrite oxidoreductase multiprotein complex // *Nature microbiology*. – 2021. – V. 6. – № 9. – P. 1129-1139. DOI: 10.1038/s41564-021-00934-8
53. Ciarkowska K., Sołek-Podwika K., Wieczorek J. Enzyme activity as an indicator of soil-rehabilitation processes at a zinc and lead ore mining and processing area // *J. Environ. Manage.* – 2014. – V. 132. – P. 250-256. DOI: 10.1016/j.jenvman.2013.10.022
54. Crampon M., Bureau F., Akpa-Vinceslas, M., Bodilis J., Machour N., Le Derf F., Portet-Koltalo F., Correlations between PAH bioavailability, degrading bacteria, and soil characteristics during PAH biodegradation in five diffusely contaminated dissimilar soils // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2014. – V. 21. – P. 8133-8145
55. Cruz-García C., Murray A.E., Klappenbach J.A., Stewart V., Tiedje J.M. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Journal of bacteriology*. – 2007. – V. 189. – № 2. – P. 656-662.
56. Cruz-García C., Murray A.E., Klappenbach J.A., Stewart V., Tiedje J.M. Respiratory nitrate ammonification by *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Journal of bacteriology*. – 2007. – V. 189. – № 2. – P. 656-662.
57. Cumming J.W. A DTG combustion study on anthracitic and other coal chars // *Thermochim. Acta*. – 1989. – V. 155. – P. 151-161. DOI: 10.1016/0040-6031(89)87143-6
58. Daims H., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Schleifer K.H., Wagner M., In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants // *Applied and environmental microbiology*. – 2001. – V. 67. – № 11. – P. 5273-5284. DOI: 10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001

59. De Boer W., Kowalchuk G.A., Nitrification in acid soils: micro-organisms and mechanisms // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2001. – V. 33. – № 7-8. – P. 853-866. DOI: 10.1016/S0038-0717(00)00247-9
60. Dombrowski N., Donaho J.A., Gutierrez T., Seitz K.W., Teske A.P., Baker B.J. Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill // *Nature microbiology*. – 2016. – V. 1. – № 7. – P. 1-7
61. Dudnikova T., Sushkova S., Minkina T., Barbashev A., Ferreira C.S.S., Antonenko E., Bakoeva G. Main factors in polycyclic aromatic hydrocarbons accumulations in the long-term technogenic contaminated soil // *Eurasian Journal of Soil Science*. – 2023. – V. 12. – № 3. – P. 282-289
62. El-Ghamry A. M., Subhani A., Moh'd W., Changyong H., Zhengmiao X. Effects of copper toxicity on soil microbial biomass // *Pak. J. Biol. Sci.* – 2000. – V. 3. – P. 907-910
63. Epelde L., Lanzen A., Blanco F., Urich T., Garbisu C. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine // *FEMS microbiology ecology*. – 2015. – V. 91. – № 1. DOI: 10.1093/femsec/fiu007
64. Ermel M., Behrendt T., Oswald R., Derstroff B., Wu D., Hohlmann S., ... Sörgel M. Hydroxylamine released by nitrifying microorganisms is a precursor for HONO emission from drying soils // *Scientific reports*. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1877. DOI: 10.1038/s41598-018-20170-1
65. Falih A.M., Wainwright M. Nitrification, S-oxidation and P-solubilization by the soil yeast *Williopsis californica* and by *Saccharomyces cerevisiae* // *Mycological Research*. – 1995. – V. 99. – № 2. – P. 200-204. DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80886-1
66. Faskhutdinova E.R., Osintseva M.A., Neverova O.A. Prospects of using soil microbiome of mine tips for remediation of anthropogenically disturbed ecosystems. – 2021.
67. Feng Y., Wang J., Bai Z., Reading L. Effects of surface coal mining and land reclamation on soil properties: A review // *Earth. Sci. Rev.* – 2019. – V. 191. – P. 12-25. DOI: 10.1016/j.earscirev.2019.02.015

68. Fitzpatrick P.F., Orville A.M., Nagpal A., Valley M.P., Nitroalkane oxidase, a carbanion-forming flavoprotein homologous to acyl-CoA dehydrogenase // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2005. – V. 433. – № 1. – P. 157-165. DOI: 10.1016/j.abb.2004.08.021
69. Francis K., Nishino S.F., Spain J.C., Gadda G. A novel activity for fungal nitronate monooxygenase: detoxification of the metabolic inhibitor propionate-3-nitronate // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2012. – V. 521. – № 1-2. – P. 84-89. DOI: 10.1016/j.abb.2012.03.015
70. Frouz J. Soil recovery and reclamation of mined lands // *In Soils and landscape restoration*. – Academic Press. – 2021. – P. 161-191. DOI: 10.1016/B978-0-12-813193-0.00006-0
71. Galmés I.B. Understanding the aromatic hydrocarbon degradation potential of *pseudomonas stutzeri*: a proteo-genomic approach: Universitat de les Illes Balears. – 2016.
72. Gao W., Fan C., Zhang W., Li N., Liu H., Chen M. Heterotrophic nitrification of organic nitrogen in soils: process, regulation, and ecological significance // *Biology and Fertility of Soils*. – 2023. – V. 59. – № 3. – P. 261-274. DOI: 10.1007/s00374-023-01707-7
73. Gardner P.R., Gardner A.M., Martin L.A., Dou Y., Li T., Olson J.S., ... Riggs A.F., Nitric-oxide dioxygenase activity and function of flavohemoglobins: sensitivity to nitric oxide and carbon monoxide inhibition // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – V. 275. – № 41. – P. 31581-31587. DOI: 10.1074/jbc.M004141200
74. Ghimire-Kafle S., Weaver Jr, M.E., Kimbrel M.P., Bollmann A. Competition between ammonia-oxidizing archaea and complete ammonia oxidizers from freshwater environments // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2024. – V. 90. – № 3. – P. e01698-23. DOI: 10.1128/aem.01698-23
75. Gubry-Rangin C., Nicol G.W., Prosser J.I. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils // *FEMS microbiology ecology*. – 2010. – V. 74. – № 3. – P. 566-574.

76. Guo J., Peng Y., Wang S., Ma B., Ge S., Wang Z., ... Zhang L. Pathways and organisms involved in ammonia oxidation and nitrous oxide emission // *Critical reviews in environmental science and technology*. – 2013. – V. 43. – № 21. – P. 2213-2296. DOI: 10.1080/10643389.2012.672072
77. Gustafsson Ö., Haghseta F., Chan C., MacFarlane J., Gschwend P.M., Quantification of the dilute sedimentary soot phase: Implications for PAH speciation and bioavailability // *Environmental Science & Technology*. – 1996. – V. 31. – № 1. – P. 203-209
78. Hagihara R., Katsuyama Y., Sugai Y., Onaka H., Ohnishi Y. Novel desferrioxamine derivatives synthesized using the secondary metabolism-specific nitrous acid biosynthetic pathway in *Streptomyces davawensis* // *The Journal of Antibiotics*. – 2018. – V. 71. – № 11. – P. 911-919. DOI: 10.1038/s41429-018-0088-1
79. Han X., Wang F., Zhang D., Feng T., Zhang L. Nitrate-assisted biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water-level-fluctuation zone of the three Gorges Reservoir, China: Insights from in situ microbial interaction analyses and a microcosmic experiment // *Environmental Pollution*. – 2021. – V. 268. – P. 115693
80. Hayatsu M., Katsuyama C., Tago K. Overview of recent researches on nitrifying microorganisms in soil // *Soil Science and Plant Nutrition*. – 2021. – V. 67. – № 6. – P. 619-632. DOI: 10.1080/00380768.2021.1981119
81. He T., Wu Q., Ding C., Chen M., Zhang M. Hydroxylamine and nitrite are removed effectively by *Streptomyces mediolani* strain EM-B2 // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2021. – V. 224. – P. 112693. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112693
82. He T., Xie D., Ni J., Li Z., Li Z. Characteristics of nitrogen transformation and intracellular nitrite accumulation by the hypothermia bacterium *Arthrobacter arilaitensis* // *Science of the Total Environment*. – 2020. – V. 701. – P. 134730. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134730

83. Hemmat-Jou M.H., Safari-Sinegani A.A., Mirzaie-Asl A. Tahmourespour, A.A., Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach // *Ecotoxicology*. – 2018. – V. 27. – P. 1281-1291
84. Hilton M., Shaygan M., McIntyre N., Baumgartl T., Edraki M. The effect of weathering on salt release from coal mine spoils // *Minerals*. – 2019. – V. 9. – P. 760. DOI: 10.3390/min9120760
85. Holtan-Hartwig L., Bechmann M., Høyås T.R., Linjordet R., Bakken L.R. Heavy metals tolerance of soil denitrifying communities: N₂O dynamics // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2002. – V. 34. – № 8. – P. 1181-1190
86. Hu H.W., He J.Z. Comammox—a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle // *Journal of Soils and Sediments*. – 2017. – V. 17. – P. 2709-2717. DOI: 10.1007/s11368-017-1851-9
87. Hu J., Zhao Y., Yao X., Wang J., Zheng P., Xi C., Hu B. Dominance of comammox *Nitrospira* in soil nitrification // *Science of the Total Environment*. – 2021. – V. 780. – P. 146558. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146558
88. Hu Z., Chandran K., Grasso D., Smets B.F. Effect of nickel and cadmium speciation on nitrification inhibition // *Environmental science & technology*. – 2002. – V. 36. – № 14. – P. 3074-3078
89. Huang M.Q., Cui Y.W., Huang J.L., Sun F.L., Chen S. A novel *Pseudomonas aeruginosa* strain performs simultaneous heterotrophic nitrification-aerobic denitrification and aerobic phosphate removal // *Water Research*. – 2022. – V. 221. – P. 118823. DOI: 10.1016/j.watres.2022.118823
90. Huang X., Li W., Zhang D., Qin W. Ammonium removal by a novel oligotrophic *Acinetobacter* sp. Y16 capable of heterotrophic nitrification–aerobic denitrification at low temperature // *Bioresource technology*. – 2013. – V. 146. – P. 44-50. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.07.046
91. Huerta-Cepas J., Szklarczyk D., Heller D., Hernández-Plaza A. Forslund, S.K., Cook, H., ... Bork, P., eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses // *Nucleic acids research*. – 2019. – V. 47.

92. Hui-Juan X.U., Delgado-Baquerizo M., Fu-Xia P.A.N., Xin-Li A.N., Singh B.K., Sardar K.H.A.N., Gang LI, Jian-Feng TANG, Xiao-Feng ZHAO, Huai-Ying YAO, Yong-Guan Z.H.U. Relative importance of urban and non-urban land-use types for potential denitrification derived N₂O: insights from a regional study // *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*. – 2018. – V. 109. – № 3-4. – P. 453-460
93. ISO 10694. Soil quality - Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)
94. ISO 11260:2018. Soil quality — Determination of effective cation exchange capacity and base saturation level using barium chloride solution
95. ISO 13878-1998 Soil Quality - Determination of Total Nitrogen Content by Dry Combustion ("Elemental Analysis")
96. ISO 15685, 2012. Soil quality — Determination of potential nitrification and inhibition of nitrification — Rapid test by ammonium oxidation
97. Jha P., Ghosh S., Vidyarthi A.S., Singh J., Mukhopadhyay K., Prasad R. Unravelling the microbial community structure and function of coal-bed methane producing formation water of Jharia coal mines using metagenomics approach // *Fuel*. – 2022. – V. 317. – P. 123459.
98. Jiang B., Zhang B., Li L., Zhao Y., Shi Y., Jiang Q., Jia L. Analysis of microbial community structure and diversity in surrounding rock soil of different waste dump sites in fushun western opencast mine // *Chemosphere*. – 2021. – V. 269. – P. 128777. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128777
99. Juliastuti S.R., Baeyens J., Creemers C., Bixio D., Lodewyckx E. The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge // *Journal of hazardous materials*. – 2003. – V. 100. – № 1-3. – P. 271-283. DOI: 10.1016/S0304-3894(03)00116-X
100. Jung M.Y., Park S.J., Min D., Kim J.S., Rijpstra W.I.C., Sinninghe Damsté, J.S., Rhee, S.K., Enrichment and characterization of an autotrophic ammonia-oxidizing

archaeon of mesophilic crenarchaeal group I.1a from an agricultural soil // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77. – № 24. – P. 8635-8647

101. Kadri T., Magdouli S., Rouissi T., Brar S.K. Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes // *Biochemical Engineering Journal*. – 2018. – V. 132. – P. 279-287

102. Kandeler E., Poll C., Frankenberger Jr, W.T., Ali Tabatabai M. Nitrogen cycle enzymes // *Methods of soil enzymology*. – 2011. – V. 9. – P. 211-245. DOI: 10.2136/sssabookser9.c10

103. Kandeler, F., Kampichler, C., Horak, O., Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities // *Biology and fertility of soils*. – 1996. – V. 23. – № 3. – P. 299-306

104. Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies // *PeerJ*. – 2019. – V. 7. – P. e7359

105. Kapoor V., Li X., Elk M., Chandran K., Impellitteri C.A., Santo Domingo, J.W., Impact of heavy metals on transcriptional and physiological activity of nitrifying bacteria // *Environmental science & technology*. – 2015. – V. 49. – № 22. – P. 13454-13462. DOI: 10.1021/acs.est.5b02748

106. Katipoglu-Yazan T., Ubay Cokgor E., Orhon D. Modeling sequential ammonia oxidation kinetics in enriched nitrifying microbial culture // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2015. – V. 90. – № 1. – P. 72-79

107. Khan M. Effect of metals contamination on soil microbial diversity, enzymatic activity, organic matter decomposition and nitrogen mineralization (a review) // *Pakistan Journal of Biological Sciences (Pakistan)*. – 2000.

108. Khan S., Naushad M., Lima E.C., Zhang S., Shaheen S.M., Rinklebe J. Global soil pollution by toxic elements: Current status and future perspectives on the risk assessment and remediation strategies—A review // *Journal of Hazardous Materials*. – 2021. – V. 417. – P. 126039. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126039

109. Khatoon K., Malik A. Screening of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial isolates from oil refinery wastewater and detection of conjugative

plasmids in polycyclic aromatic hydrocarbon tolerant and multi-metal resistant bacteria // *Heliyon*. – 2019. – V. 5. – № 10. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02742

110. Kido T., Hashizume K., Soda K. Purification and properties of nitroalkane oxidase from *Fusarium oxysporum* // *Journal of Bacteriology*. – 1978. – V. 133. – № 1. – P. 53-58. DOI: 10.1128/jb.133.1.53-58.1978

111. Kim R.Y., Yoon J.K., Kim T.S., Yang J.E., Owens G., Kim K.R. Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review // *Environ. Geochem. Health*. – 2015. – V. 37. – P. 1041-1061. DOI: 10.1007/s10653-015-9695-y

112. Klimowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B. Nitrification Potential as Indicator of PAHs Ecotoxicity in Freshly Contaminated Soils. Example of Phenanthrene and Pyrene // *Ecological Chemistry and Engineering. A*. – 2010. – V. 17. – № 8. – P. 943-957

113. Koch H., Lückner S., Albertsen M., Kitzinger K., Herbold C., Spieck E., Daims H. Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira* // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2015. – V. 112. – № 36. – P. 11371-11376

114. Koch H., van Kessel, M.A., Lückner, S., Complete nitrification: insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira* // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2019. – V. 103. – P. 177-189. DOI: 10.1007/s00253-018-9486-3

115. Könneke M., Schubert D.M., Brown P.C., Hügler M., Standfest S., Schwander T., ... Berg I.A. Ammonia-oxidizing archaea use the most energy-efficient aerobic pathway for CO₂ fixation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – № 22. – P. 8239-8244. DOI: 10.1073/pnas.140202811

116. Kooch Y., Noghre N. Nutrient cycling and soil-related processes under different land covers of semi-arid rangeland ecosystems in northern Iran // *Catena*. – 2020. – V. 193. – P. 104621. DOI: 10.1016/j.catena.2020.104621

117. Kostov O., Van Cleemput O. Nitrogen transformations in copper-contaminated soils and effects of lime and compost application on soil resiliency // *Biology and fertility of soils*. – 2001. – V. 33. – № 1. – P. 10-16.

118. Kou B., He Y., Wang Y., Qu C., Tang J., Wu Y., Yu T. The relationships between heavy metals and bacterial communities in a coal gangue site // *Environmental Pollution*. – 2023. – V. 322. – P. 121136.
119. Krechetov P., Chernitsova O., Sharapova A., Terskaya E. Technogenic geochemical evolution of chernozems in the sulfur coal mining areas // *J. Soils Sediments*. – 2019. – V. 19. – P. 3139-3154. DOI: 10.1007/s11368-018-2010-7
120. Kumari S., Maiti S.K. Nitrogen recovery in reclaimed mine soil under different amendment practices in tandem with legume and non-legume revegetation: A review // *Soil Use Manag.* – 2022. – V. 38. – P. 1113-1145. DOI: 10.1111/sum.12787
121. Kuypers M.M.M., Marchant H.K., Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. – V. 16. – № 5. – P. 263-276
122. Lancaster N.A., Bushey J.T., Tobias C.R., Song B., Vadas T.M. Impact of chloride on denitrification potential in roadside wetlands // *Environmental Pollution*. – 2016. – V. 212. – P. 216-223. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.01.068
123. Lang X., Li Q., Ji M., Yan G., Guo S. Isolation and niche characteristics in simultaneous nitrification and denitrification application of an aerobic denitrifier, *Acinetobacter* sp. YS2 // *Bioresource technology*. – 2020. – V. 302. – P. 122799. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.122799
124. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nature methods*. – 2012. – V. 9. – № 4. – P. 357-359
125. Li C., He Z.Y., Hu H.W., He J.Z. Niche specialization of comammox *Nitrospira* in terrestrial ecosystems: Oligotrophic or copiotrophic? // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. – 2023a. – V. 53. – № 2. – P. 161-176. DOI: 10.1080/10643389.2022.2049578
126. Li C., Quan Q., Gan Y., Dong J., Fang J., Wang L., Liu J. Effects of heavy metals on microbial communities in sediments and establishment of bioindicators based on microbial taxa and function for environmental monitoring and management // *Science of the Total Environment*. – 2020. – V. 749. – P. 141555. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141555

127. Li D., Ren Z., Zhou Y., Jiang L., Zheng M., Liu G. Comammox Nitrospira and ammonia-oxidizing archaea are dominant ammonia oxidizers in sediments of an acid mine Lake containing high ammonium concentrations // *Applied and environmental microbiology*. – 2023b. – V. 89. – № 3. – P. e00047-23. DOI: 10.1128/aem.00047-23
128. Li H., Shao H., Li W., Bi R., Bai Z. Improving Soil Enzyme Activities and Related Quality Properties of Reclaimed Soil by Applying Weathered Coal in Opencast-Mining Areas of the Chinese Loess Plateau // *CLEAN–Soil, Air, Water*. – 2012. – V. 40. – № 3. – P. 233-238. DOI: 10.1002/clen.201000579
129. Li J., Zhou X., Yan J., Li H., He J. Effects of regenerating vegetation on soil enzyme activity and microbial structure in reclaimed soils on a surface coal mine site // *Appl. Soil. Ecol.* – 2015. – V. 87. – P. 56-62. DOI: 10.1016/j.apsoil.2014.11.010
130. Li X., Meng D., Li J., Yin H., Liu H., Liu X., ... Yan M. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination // *Environmental Pollution*. – 2017. – V. 231. – P. 908-917. DOI: 10.1016/j.envpol.2017.08.057
131. Li X., Park J.H., Edraki M., Baumgartl T. Understanding the salinity issue of coal mine spoils in the context of salt cycle // *Environ. Geochem. Health*. – 2014. – V. 36. – P. 453-465. DOI: 10.1007/s10653-013-9573-4
132. Li X., Zhu Y.G., Cavagnaro T.R., Chen, M., Sun J., Chen X., Qiao M. Do ammonia-oxidizing archaea respond to soil Cu contamination similarly as ammonia-oxidizing bacteria? // *Plant and soil*. – 2009. – V. 324. – P. 209-217. DOI: 10.1007/s11104-009-9947-7
133. Li Y., Chapman S.J., Nicol G.W., Yao H. Nitrification and nitrifiers in acidic soils // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2018. – V. 116. – P. 290-301. DOI: 10.1016/j.soilbio.2017.10.023
134. Li Y., Liang Y., Zhang H., Liu Y., Zhu J., Xu J., ... Yu F. Variation, distribution, and diversity of canonical ammonia-oxidizing microorganisms and complete-nitrifying bacteria in highly contaminated ecological restoration regions in the Siding mine area // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2021. – V. 217. – P. 112274. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112274

135. Li Z., Zeng Z., Tian D., Wang J., Fu Z., Zhang F., Niu S. Global patterns and controlling factors of soil nitrification rate // *Global Change Biology*. – 2020. – V. 26. – № 7. – P. 4147-4157
136. Liang X., Wang X., Zhang N., Li B. Biogeographical patterns and assembly of bacterial communities in saline soils of Northeast China // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10. – № 9. – P. 1787
137. Liang Z., Zhang W., Yang Y., Ma J., Li S., Wen Z. Soil characteristics and microbial community response in rare earth mining areas in southern Jiangxi Province, China // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2021. – V. 28. – P. 56418-56431.
138. Liu A., Fang D., Wang C., Li M. Young, R.B., Recovery of soil nitrification after long-term zinc exposure and its co-tolerance to Cu in different soils // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2015a. – V. 22. – P. 314-319. DOI: 10.1007/s11356-014-3338-1
139. Liu B., Yao J., Ma B., Chen Z., Zhao C., Zhu X., ... Duran R. Microbial community profiles in soils adjacent to mining and smelting areas: contrasting potentially toxic metals and co-occurrence patterns // *Chemosphere*. – 2021. – V. 282. – P. 130992. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130992
140. Liu B., Yuan L., Shi X., Li Y., Jiang C., Ren B., Sun Q. Variations in microbiota communities with the ranks of coals from three permian mining areas // *Energy & Fuels*. – 2019. – V. 33. – № 6. – P. 5243-5252. DOI: 10.1021/acs.energyfuels.8b04413
141. Liu J., Cao W., Jiang H., Cui J., Shi C., Qiao X., ... Si W. Impact of heavy metal pollution on ammonia oxidizers in soils in the vicinity of a Tailings Dam, Baotou, China // *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. – 2018. – V. 101. – P. 110-116. DOI: 10.1007/s00128-018-2345-1
142. Liu J., Liu G., Zhang J., Yin H., Wang R. Occurrence and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil from the Tiefa coal mine district, Liaoning, China // *Journal of Environmental Monitoring*. – 2012. – V. 14. – № 10. – P. 2634-2642

143. Liu J., Liu W., Zhang Y., Chen C., Wu W., Zhang T.C. Microbial communities in rare earth mining soil after in-situ leaching mining // *Science of the Total Environment*. – 2021. – V. 755. – P. 142521. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142521
144. Liu J., Liu W., Zhang Y., Chen C., Wu W., Zhang T.C. Microbial communities in rare earth mining soil after in-situ leaching mining // *Sci. Total. Environ.* – 2021. – V. 755. – P. 142521. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142521
145. Liu R., Suter H., He J., Hayden H., Chen D. Influence of temperature and moisture on the relative contributions of heterotrophic and autotrophic nitrification to gross nitrification in an acid cropping soil // *Journal of Soils and Sediments*. – 2015b. – V. 15. – P. 2304-2309. DOI: 10.1007/s11368-015-1170-y
146. Liu S., Liu Q., Wu H., Jiang W., Kahaer A., Tang Q., ... Liu, D. Integrative chemical and omics analysis of the ammonia nitrogen removal characteristics and mechanism of a novel oligotrophic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium // *Science of The Total Environment*. – 2022. – V. 852. – P. 158519. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.158519
147. Liu X., Ji J., Zhang X., Chen Z., He L., Wang C. Microbial Remediation of Crude Oil in Saline Conditions by Oil-Degrading Bacterium *Priestia megaterium* FDU301 // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2022. – P. 1-19
148. Liu X., Wu D., Abid A.A., Liu Y., Zhou J., Zhang Q. Determination of Paddy Soil Ammonia Nitrogen Using Rapid Detection Kit Coupled with Microplate Reader // *Toxics*. – 2022. – V. 10. – № 12. – P. 725
149. Liu Y., Liu Y., Zhou H., Li L., Zheng J., Zhang X., ... Pan G. Abundance, composition and activity of denitrifier communities in metal polluted paddy soils // *Scientific reports*. – 2016. – V.6. – P. 19086
150. Liu Y., Liu Y., Zhou H., Li L., Zheng J., Zhang X., ... Pan G., Abundance, composition and activity of denitrifier communities in metal polluted paddy soils // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – P. 19086
151. Liu Y., Shen K., Wu Y., Wang G. Abundance and structure composition of nirK and nosZ genes as well as denitrifying activity in heavy metal-polluted paddy soils // *Geomicrobiology Journal*. – 2018. – V. 35. - №. 2. – P. 100-107.

152. Liu Y., Shen K., Wu Y., Wang G. Abundance and structure composition of nirK and nosZ genes as well as denitrifying activity in heavy metal-polluted paddy soils // Geomicrobiology Journal. – 2018. – V. 35. – № 2. – P. 100-107

153. Liu Y., Xue C., Yu S., Li F. Variations of abundance and community structure of ammonia oxidizers and nitrification activity in two paddy soils polluted by heavy metals // Geomicrobiology journal. – 2019. – V. 36. – № 1. – P. 1-10. DOI: 10.1080/01490451.2018.1471108

154. Loick N., Dixon E.R., Abalos D., Vallejo A., Matthews G.P., McGeough K.L., ... Cardenas L.M. Denitrification as a source of nitric oxide emissions from incubated soil cores from a UK grassland soil // Soil Biology and Biochemistry. – 2016. – V. 95. – P. 1-7. DOI: 10.1016/j.soilbio.2015.12.009

155. Lory S. The prokaryotes: prokaryotic physiology and biochemistry. – Springer Berlin Heidelberg, 2013.

156. Lu C., Hong Y., Liu J., Gao Y., Ma Z., Yang B., Waigi M.G. A PAH-degrading bacterial community enriched with contaminated agricultural soil and its utility for microbial bioremediation // Environmental Pollution. – 2019. – V. 251. – P. 773-782

157. Lu J., Rincon N., Wood D. E., Breitwieser F. P., Pockrandt C., Langmead B., ... Steinegger M. Metagenome analysis using the Kraken software suite // Nature protocols. – 2022. – V. 17. – № 12. – P. 2815-2839

158. Lu L., Chen C., Ke T., Wang M., Sima M., Huang S. Long-term metal pollution shifts microbial functional profiles of nitrification and denitrification in agricultural soils // Science of the Total Environment. – 2022. – V. 830. – P. 154732. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154732

159. Luo Y., Zhang D., Guo Y., Zhang S.H., Chang L.L., Qi Y., Li X.H., Liu J.G., Guo W., Zhao J., Bao Z.H., Comparative insights into influences of co-contamination by rare-earth elements and heavy metals on soil bacterial and fungal communities // J. Soils Sediments. – 2022. – P. 1-17. DOI: 10.1007/s11368-022-03241-9

160. Ma Q., Qu Y.Y., Zhang X.W., Shen W.L., Liu Z.Y., Wang J.W., Zhou J.T., Identification of the microbial community composition and structure of coal-mine wastewater treatment plants // Microbiological research. – 2015. – V. 175. – P. 1-5

161. Ma S., Qiao L., Liu X., Zhang S., Zhang L., Qiu Z., Yu C. Microbial community succession in soils under long-term heavy metal stress from community diversity-structure to KEGG function pathways // *Environmental Research*. – 2022. – V. 214. – P. 113822. DOI: 10.1016/j.envres.2022.113822
162. Magalhães C.M., Machado A., Matos P., Bordalo A.A. Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2011. – V. 77. – № 2. – P. 274-284
163. Maiti S.K., Ahirwal J. Ecological restoration of coal mine degraded lands: topsoil management, pedogenesis, carbon sequestration, and mine pit limnology // In *Phytomanagement of polluted sites*. – Elsevier. – 2019. – P. 83-111. DOI: 10.1016/B978-0-12-813912-7.00003-X
164. Manucharova N.A., Pozdnyakov L.A., Vlasova A.P., Yanovich A.S., Ksenofontova N.A., Kovalenko M.A., Stepanov A.L. Metabolically active prokaryotic complex in grassland and forests' sod-podzol under polycyclic aromatic hydrocarbon influence // *Forests*. – 2021. – V. 12. – P. 1103
165. Markiewicz-Patkowska J., Hursthouse A., Przybyla-Kij H. The interaction of heavy metals with urban soils: sorption behaviour of Cd, Cu, Cr, Pb and Zn with a typical mixed brownfield deposit // *Environment International*. – 2005. – V. 31. – № 4. – P. 513-521
166. Marks B.M., Chambers L., White J.R. Effect of fluctuating salinity on potential denitrification in coastal wetland soil and sediments // *Soil Sci. Soc. Am. J.* – 2016. – V. 80. – P. 516-526. DOI: 10.2136/sssaj2015.07.0265
167. Martikainen P.J. Heterotrophic nitrification – An eternal mystery in the nitrogen cycle // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2022. – V. 168. – P. 108611. DOI: 10.1016/j.soilbio.2022.108611
168. Medić A., Lješević M., Inui H., Beškoski V., Kojić I. Stojanović, K., Karadžić, I., Efficient biodegradation of petroleum n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons by polyextremophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain with multidegradative capacity // *RSC advances*. – 2020. – V. 10. – № 24. – P. 14060-14070

169. Megda M.X.V., Mariano E., Leite J.M., Megda M.M., Trivelin P.C.O., Chloride ion as nitrification inhibitor and its biocidal potential in soils // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2014. – V. 72. – P. 84-87
170. Mendler K., Chen H., Parks D.H., Lobb B., Hug L.A., Doxey A.C. AnnoTree: visualization and exploration of a functionally annotated microbial tree of life // *Nucleic acids research*. – 2019. – V. 47. – № 9. – P. 4442-4448
171. Meng Y., He Z., Liu B., Chen L., Lin P., Luo W. Soil salinity and moisture control the processes of soil nitrification and denitrification in a riparian wetland in an extremely arid regions in northwestern China // *Water*. – 2020. – V. 12. – P. 2815. DOI: 10.3390/w12102815
172. Mentges M.I., Reichert J.M., Rodrigues M.F., Awe G.O., Mentges L.R. Capacity and intensity soil aeration properties affected by granulometry, moisture, and structure in no-tillage soils // *Geoderma*. – 2016. – V. 263. – P. 47-59. DOI: 10.1016/j.geoderma.2015.08.042
173. Mertens J., Broos K., Wakelin S.A., Kowalchuk G.A., Springael D., Smolders E. Bacteria, not archaea, restore nitrification in a zinc-contaminated soil // *The ISME journal*. – 2009. – V. 3. – № 8. – P. 916-923. DOI: 10.1038/ismej.2009.39
174. Mukhopadhyay S., George J., Masto R.E. Changes in polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and soil biological parameters in a revegetated coal mine spoil // *Land Degradation & Development*. – 2017. – V. 28. – № 3. – P. 1047-1055
175. Mukhopadhyay S., Masto R.E., Yadav A., George J., Ram L.C., Shukla S.P. Soil quality index for evaluation of reclaimed coal mine spoil // *Science of the Total Environment*. – 2016. – V. 542. – P. 540-550. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.10.035
176. Murphy C.L., Sheremet A., Dunfield P.F., Spear J.R., Stepanauskas R., Woyke T., ... Youssef N.H. Genomic analysis of the yet-uncultured Binatota reveals broad methylotrophic, alkane-degradation, and pigment production capacities // *Mbio*. – 2021. – V. 12. – № 3
177. Nawaz M.Z., Xu C., Qaria M.A., Haider S.Z., Khalid H.R., Alghamdi H.A., Zhu D. Genomic and biotechnological potential of a novel oil-degrading strain

Enterobacter kobei DH7 isolated from petroleum-contaminated soil // *Chemosphere*. – 2023. – V. 340. – P. 139815

178. Naz M., Dai Z., Hussain S., Tariq M., Danish S., Khan I.U., ... Du D. The soil pH and heavy metals revealed their impact on soil microbial community // *Journal of Environmental Management*. – 2022. – V. 321. – P. 115770. DOI: 10.1016/j.jenvman.2022.115770

179. Nieder R., Benbi D.K. Carbon and nitrogen transformations in soils // *Carbon and nitrogen in the terrestrial environment*. – 2008. – P. 137-159

180. Nikolaeva O., Tikhonov V., Vecherskii M., Kostina N., Fedoseeva E., Astaikina A. Ecotoxicological effects of traffic-related pollutants in roadside soils of Moscow // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2019. – V. 172. – P. 538-546.

181. Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler // *Genome research*. – 2017. – V. 27. – № 5. – P. 824-834

182. Ollivier J., Wanat N., Austruy A., Hitmi A., Joussein E., Welzl G., ... Schloter M. Abundance and diversity of ammonia-oxidizing prokaryotes in the root-rhizosphere complex of *Miscanthus* × *giganteus* grown in heavy metal-contaminated soils // *Microbial ecology*. – 2012. – V. 64. – P. 1038-1046. DOI: 10.1007/s00248-012-0078-y

183. Ouyang Z., Gao L., Yang C. Distribution, sources and influence factors of polycyclic aromatic hydrocarbon at different depths of the soil and sediments of two typical coal mining subsidence areas in Huainan, China // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2018. – V. 163. – P. 255-265

184. Pacwa-Płociniczak M., Byrski A., Chlebek D., Prach M., Płociniczak T. A deeper insight into the phytoremediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons supported by the *Enterobacter ludwigii* ZCR5 strain // *Applied Soil Ecology*. – 2023. – V. 181. – P. 104651

185. Palomo A., Pedersen A.G., Fowler S.J., Dechesne A., Sicheritz-Pontén T., Smets B.F. Comparative genomics sheds light on niche differentiation and the evolutionary history of comammox *Nitrospira* // *The ISME journal*. – 2018. – V. 12. – № 7. – P. 1779-1793. DOI: 10.1038/s41396-018-0083-3

186. Papa S., Bartoli G., Pellegrino A., Fioretto A. Microbial activities and trace element contents in an urban soil // *Environmental monitoring and assessment*. – 2010. – V. 165. – № 1. – P. 193-203.
187. Parks D.H., Chuvochina M., Rinke C., Mussig A.J., Chaumeil P.A., Hugenholtz P. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy // *Nucleic acids research*. – 2022. – V. 50. – № D1. – P. D785-D794
188. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome research*. – 2015. – V. 25. – № 7. – P. 1043-1055
189. Patowary K., Patowary R., Kalita M.C., Deka S. Development of an efficient bacterial consortium for the potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 1092
190. Peng R.H., Xiong A.S., Xue Y., Fu X.Y., Gao F., Zhao W., Yao Q.H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons // *FEMS microbiology reviews*. – 2008. – V. 32. – № 6. – P. 927-955
191. Petersen D.G., Reichenberg F., Dahllöf I. Phototoxicity of pyrene affects benthic algae and bacteria from the Arctic // *Environmental science & technology*. – 2008. – V. 42. – № 4. – P. 1371-1376
192. Philippot L., Hallin S., Schloter M. Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil // *Advances in Agronomy*. – 2007. – P. 249–305. DOI: 10.1016/S0065-2113(07)96003-4
193. Poghosyan L., Koch H., Lavy A., Frank J., van Kessel M.A., Jetten M.S., ... Lüscher S. Metagenomic recovery of two distinct comammox *Nitrospira* from the terrestrial subsurface // *Environmental Microbiology*. – 2019. – V. 21. – № 10. – P. 3627-3637. DOI: 10.1111/1462-2920.14691
194. Premnath N., Mohanrasu K., Rao R.G.R., Dinesh G.H., Prakash G.S., Pugazhendhi A., Arun A. Effect of C/N substrates for enhanced extracellular polymeric substances (EPS) production and Poly Cyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) degradation // *Environmental Pollution*. – 2021. – V. 275. – P. 116035

195. Pukhovski A.V. X-ray fluorescence analysis in the Russian State Agrochemical Service: an overview // *X-Ray Spectrometry: An International Journal*. – 2002. – V. 31. – №. 3. – P. 225-234.
196. Pulikova E.P., Demin K.A., Ivanov F.D., Gorovtsov A.V., Rajput V.D., Tarigholizadeh S., Barakhov A.V., Zamulina IV., Gao YZ., Nevidomskaya DG., Minkina TM., Wong MH. Soil physicochemical and microbial properties affect nitrogen cycling in technogenically transformed coal dump soils // *Applied Soil Ecology*. – 2024. – V. 202. – P. 105562.
197. Pulikova E.P., Gorovtsov A.V., Kuzyakov, Y., Demin, K.A., Minkina, T.M., Rajput, V.D., Heterotrophic nitrification in soils: approaches and mechanisms // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2025. – P. 109706. DOI: 10.1016/j.soilbio.2024.109706
198. Qin G., Niu Z., Yu J., Li Z., Ma J., Xiang P. Soil heavy metal pollution and food safety in China: Effects, sources and removing technology // *Chemosphere*. – 2021. – V. 267. – P. 129205. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129205
199. Qin W., Amin S.A., Lundeen R.A., Heal K.R. Martens-Habbena, W., Turkarslan, S., ... Stahl, D.A., Stress response of a marine ammonia-oxidizing archaeon informs physiological status of environmental populations // *The ISME Journal*. – 2018. – V. 12. – № 2. – P. 508-519. DOI: 10.1038/ismej.2017.186
200. Quadros P.D., Zhalnina K., Davis-Richardson A.G., Drew J.C., Menezes F.B., Camargo F.A.D.O., Triplett E.W. Coal mining practices reduce the microbial biomass, richness and diversity of soil // *Applied Soil Ecology*. – 2016. – V. 98. – P. 195-203. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.10.016
201. Radniecki T.S., Semprini L., Dolan M.E. Expression of merA, amoA and hao in continuously cultured *Nitrosomonas europaea* cells exposed to zinc chloride additions // *Biotechnology and bioengineering*. – 2009. – V. 102. – № 2. – P. 546-553. DOI: 10.1002/bit.22069
202. Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Sethunathan N., Naidu R. Mixtures of environmental pollutants: effects on microorganisms and their activities in soils // Springer New York. – 2011. – P. 63-120. DOI: 10.1007/978-1-4419-8011-3

203. Ramirez M., Obrzydowski J., Ayers M., Virparia S., Wang M., Stefan K., ... Castignetti D. Pyruvic Oxime Nitrification and Copper and Nickel Resistance by a *Cupriavidus pauculus*, an Active Heterotrophic Nitrifier-Denitrifier // *The Scientific World Journal*. – 2014. – V. 2014. – № 1. – P. 901702. DOI: 10.1155/2014/901702
204. Rathsack K. Comparative study of different methods for analyzing denitrifying bacteria in fresh water ecosystems // *Journal of Water Resource and Protection*. – 2014. DOI: 10.4236/jwarp.2014.66059
205. Ribeiro H., de Sousa T., Santos J. P., Sousa A. G., Teixeira C., Monteiro M. R., ... Magalhães C. Potential of dissimilatory nitrate reduction pathways in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation // *Chemosphere*. – 2018. – V. 199. – P. 54-67.
206. Ribeiro J., Da Silva E.F., Li Z., Ward C., Flores D. Petrographic, mineralogical, and geochemical characterization of the Serrinha coal waste pile (Douro Coalfield, Portugal) and the potential environmental impacts on soil, sediments, and surface waters // *Int. J. Coal Geol.* – 2010. – V. 83. – P. 456-466. DOI: 10.1016/j.coal.2010.06.006
207. Rogowska-van der Molen, M.A., Nagornii D., Coolen S., de Graaf R.M., Berben T., van Alen T., ... Welte C.U. Insect gut isolate *Pseudomonas* sp. strain Nvir degrades the toxic plant metabolite nitropropionic acid // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2022. – V. 88. – № 19. – P. e00719-22. DOI: 10.1128/aem.00719-22
208. Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. The prokaryotes: firmicutes and tenericutes // Springer Berlin Heidelberg. – 2014
209. Rusk J.A., Hamon R.E., Stevens D.P., McLaughlin M.J. Adaptation of soil biological nitrification to heavy metals // *Environ. Sci. Technol. Lett.* – 2004. – V. 38. – P. 3092-3097. DOI: 10.1021/es035278g
210. Ruyters S., Mertens J., Springael D., Smolders E. Co-tolerance to zinc and copper of the soil nitrifying community and its relationship with the community structure // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2012. – V. 44. – № 1. – P. 75-80. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.09.017
211. Saggar S., Jha N., Deslippe J., Bolan N.S., Luo J., Giltrap D.L., ... Tillman R.W. Denitrification and N₂O: N₂ production in temperate grasslands: Processes,

measurements, modelling and mitigating negative impacts // *Science of the Total Environment*. – 2013. – V. 465. – P. 173-195

212. Sakoula D., Koch H., Frank J., Jetten M.S., van Kessel M.A., Lücker S. Enrichment and physiological characterization of a novel comammox *Nitrospira* indicates ammonium inhibition of complete nitrification // *The ISME journal*. – 2021. – V. 15. – № 4. – P. 1010-1024. DOI: 10.1038/s41396-020-00827-4

213. Schreiber F., Wunderlin P., Udert K.M., Wells G.F. Nitric oxide and nitrous oxide turnover in natural and engineered microbial communities: biological pathways, chemical reactions, and novel technologies // *Frontiers in microbiology*. – 2012. – V. 3. – P. 372. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00372

214. Séneca J., Pjevac P., Canarini A., Herbold C.W., Zioutis C., Dietrich M., ... Richter A. Composition and activity of nitrifier communities in soil are unresponsive to elevated temperature and CO₂, but strongly affected by drought // *The ISME Journal*. – 2020. – V. 14. – № 12. – P. 3038-3053. DOI: 10.1038/s41396-020-00735-7

215. Shao X., Yang W., Wu M. Seasonal dynamics of soil labile organic carbon and enzyme activities in relation to vegetation types in Hangzhou Bay tidal flat wetland // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – P. e0142677. DOI: 10.1371/journal.pone.0142677

216. Shen T., Stieglmeier M., Dai J., Urich T., Schleper C. Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors // *FEMS microbiology letters*. – 2013. – V. 344. – № 2. – P. 121-129. DOI: 10.1111/1574-6968.12164

217. Sheng X., Chen X., He L. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2008. – V. 62. – № 2. – P. 88-95. DOI: 10.1016/j.ibiod.2007.12.003

218. Shun L. I., Xiaoru Y. A.N.G., Buchner D., Haitao W. A. N. G., Huijuan, X. U., Haderlein, S. B., Yongguan, Z. H. U. Increased copper levels inhibit denitrification in urban soils // *Earth and Environmental Science Transactions of The Royal Society of Edinburgh*. – 2018. – V. 109. – №. 3-4. – P. 421-427.

219. Sieber C.M., Probst A.J., Sharrar A., Thomas B.C., Hess M., Tringe S.G., Banfield J.F. Recovery of genomes from metagenomes via a dereplication, aggregation and scoring strategy // *Nature microbiology*. – 2018. – V. 3. – № 7. – P. 836-843. DOI: 10.1038/s41564-018-0171-1
220. Sleptsov Y. Problem of Slagheaps of Donbass // *E3S Web of Conferences*. – EDP Sciences. – 2020. – V. 217. – P. 04005
221. Smith S.M., Rawat S., Telser J., Hoffman B.M., Stemmler T.L., Rosenzweig, A.C. Crystal structure and characterization of particulate methane monooxygenase from *Methylocystis* species strain M // *Biochemistry*. – 2011. – V. 50. – № 47. – P. 10231-10240. DOI: 10.1021/bi200801z
222. Smulek W., Sydow M., Zabielska-Matejuk J., Kaczorek E. Bacteria involved in biodegradation of creosote PAH–A case study of long-term contaminated industrial area // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2020. – V. 187. – P. 109843.
223. Sobolev D., Begonia M.F. Effects of heavy metal contamination upon soil microbes: lead-induced changes in general and denitrifying microbial communities as evidenced by molecular markers // *Int. J. Environ. Health Res.* – 2008. – V. 5. – P. 450-456. DOI: 10.3390/ijerph5050450
224. Soler-Jofra A., Pérez J., Van Loosdrecht M.C. Hydroxylamine and the nitrogen cycle: a review // *Water Research*. – 2021. – V. 190. – P. 116723. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116723
225. Song Y., Song C., Yang G., Miao Y., Wang J., Guo Y. Changes in labile organic carbon fractions and soil enzyme activities after marshland reclamation and restoration in the Sanjiang Plain in Northeast China // *Environ. Manage.* – 2012. – V. 50. – P. 418-426. DOI: 10.1007/s00267-012-9890-x
226. Spang A., Poehlein A., Offre P., Zumbrägel S., Haider S., Rychlik N., ... Wagner M. The genome of the ammonia-oxidizing *Candidatus Nitrososphaera gargensis*: insights into metabolic versatility and environmental adaptations // *Environmental microbiology*. – 2012. – V. 14. – № 12. – P. 3122-3145. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02893.x

227. Stein L.Y. Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms // *Current opinion in chemical biology*. – 2019. – V. 49. – P. 9-15. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.09.003
228. Subrahmanyam G., Shen J.P., Liu Y.R. Archana, G., He, J.Z., Response of ammonia-oxidizing archaea and bacteria to long-term industrial effluent-polluted soils, Gujarat, Western India // *Environmental monitoring and assessment*. – 2014. – V. 186. – P. 4037-4050. DOI: 10.1007/s10661-014-3678-9
229. Sun D., Tang X., Li J., Liu M., Hou L., Yin G., ... Han P. Chlorate as a comammox Nitrospira specific inhibitor reveals nitrification and N₂O production activity in coastal wetland // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2022. – V. 173. – P. 108782. DOI: 10.1016/j.soilbio.2022.108782
230. Sun S., Sun H., Zhang D., Zhang J., Cai Z., Qin G., Song Y. Response of soil microbes to vegetation restoration in coal mining subsidence areas at Huaibei coal mine, China // *Int. J. Environ. Health Res.* – 2019. – V. 16. – P. 1757. DOI: 10.3390/ijerph16101757
231. Sun X., Zhao J., Zhou X., Bei Q., Xia W., Zhao B., ... Jia Z. Salt tolerance-based niche differentiation of soil ammonia oxidizers // *The ISME Journal*. – 2022. – V. 16. – № 2. – P. 412-422
232. Suszek-Łopatk, B., Maliszewska-Kordybach B., Klimkowicz-Pawlas A., Smreczak B. Influence of temperature on phenanthrene toxicity towards nitrifying bacteria in three soils with different properties // *Environmental pollution*. – 2016. – V. 216. – P. 911-918
233. Szadek P., Pająk M., Michalec K., Wąsik R., Otremba K., Kozłowski M., Pietrzykowski M. The Impact of the Method of Reclamation of the Coal Ash Dump from the “Adamów” Power Plant on the Survival, Viability, and Wood Quality of the Introduced Tree Species // *Forests*. – 2023. – V. 14. – № 4. – P. 848. DOI: 10.3390/f14040848
234. Tang J., Zhang J., Ren, L., Zhou Y., Gao J., Luo L., ... Chen A. Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution //

Journal of environmental management. – 2019. – V. 242. – P. 121-130. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.04.061

235. Tang Q., Xia L., Ti C., Zhou W., Fountain L., Shan J., Yan X. Oxytetracycline, copper, and zinc effects on nitrification processes and microbial activity in two soil types // Food and Energy Security. – 2020. – V. 9. – № 4. – P. e248. DOI: 10.1002/fes3.248

236. Tang Q., Zeng M., Zou W., Jiang W., Kahaer A., Liu S., ... Liu D. A new strategy to simultaneous removal and recovery of nitrogen from wastewater without N₂O emission by heterotrophic nitrogen-assimilating bacterium // Science of The Total Environment. – 2023a. – V. 872. – P. 162211. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.162211

237. Tang X., Li Y., Liu M., Hou L., Han P. Abundance, diversity and physiological preferences of comammox Nitrospira in urban groundwater // Science of The Total Environment. – 2023b. – V. 904. – P. 167333. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.167333

238. Tapadar S.A., Jha D.K. Seasonal and temporal dynamics of physicochemical and biological properties of chronosequence coal mine spoil soils // CLEAN–Soil, Air, Water. – 2016. – V. 44. – № 10. – P. 1405-1413. DOI: 10.1002/clen.201500129

239. Thandar S.M., Ushiki N., Fujitani H., Sekiguchi Y., Tsuneda S. Ecophysiology and comparative genomics of Nitrosomonas mobilis Ms1 isolated from autotrophic nitrifying granules of wastewater treatment bioreactor // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 1869

240. Throbäck I. Exploring denitrifying communities in the environment (Vol. 2006, No. 33).

241. Tourna M., Stieglmeier M., Spang A., Könneke M., Schintlmeister A., Urich T., Schleper P. Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V. 108. – № 20. – P. 8420-8425

242. Tsolova V.T., Hristova M.B., Borrás J.B., Pascual N.R., Banov M.D. Pb, Cu and Zn geochemistry in reclaimed soils (Technosols) of Bulgaria // J. Geochem. Explor. – 2014. – V. 144. – P. 337-344. DOI: 10.1016/j.gexplo.2014.02.019

243. Tsujino S., Masuda R., Shimizu Y., Azuma Y., Kanada Y., Fujiwara T. Phylogenetic diversity, distribution, and gene structure of the pyruvic oxime dioxygenase involved in heterotrophic nitrification // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 2023. – V. 116. – № 10. – P. 1037-1055. DOI: 10.1007/s10482-023-01862-9
244. Tsujino S., Uematsu C., Dohra H., Fujiwara T. Pyruvic oxime dioxygenase from heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* is a nonheme Fe (II)-dependent enzyme homologous to class II aldolase // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 39991. DOI: 10.1038/srep39991
245. Urakawa H., Rajan S., Feeney M.E., Sobecky P.A., Mortazavi B. Ecological response of nitrification to oil spills and its impact on the nitrogen cycle // *Environmental microbiology*. – 2019. – V. 21. – № 1. – P. 18-33
246. Valentine D.L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea // *Nature Reviews Microbiology*. – 2007. – V. 5. – № 4. – P. 316-323. DOI: 10.1038/nrmicro1619
247. Van Kessel M.A., Speth D.R., Albertsen M., Nielsen P.H., Op den Camp, H.J., Kartal B., ... Lücker S. Complete nitrification by a single microorganism // *Nature*. – 2015. – V. 528. – № 7583. – P. 555-559
248. Vazquez-Duhalt R. Environmental impact of used motor oil. *Science of the total environment*. – 1989. – V.79. - №. 1. – P. 1-23.
249. Verbaendert I., De Vos P. Studying denitrification by aerobic endospore-forming bacteria in soil // In *Endospore-forming soil bacteria*. – Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. – 2011. – P. 271-285. DOI: 10.1007/978-3-642-19577-8_14
250. Vikram S., Guerrero L.D., Makhallanyane T.P., Le P.T., Seely M., Cowan D.A. Metagenomic analysis provides insights into functional capacity in a hyperarid desert soil niche community // *Environmental microbiology*. – 2016. – V. 18. – №. 6. – P. 1875-1888. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13088>
251. Wang J., Yang Z., Zhou X., Waigi M.G., Gudda F.O., Odinga E.S., Ling W. Nitrogen addition enhanced the polycyclic aromatic hydrocarbons dissipation through increasing the abundance of related degrading genes in the soils // *Journal of Hazardous Materials*. – 2022. – V. 435. – P. 129034

252. Wang X., Wang S., Jiang Y., Zhou J., Han C., Zhu G. Comammox bacterial abundance, activity, and contribution in agricultural rhizosphere soils // *Science of the Total Environment*. – 2020. – V. 727. – P. 138563. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138563
253. Wang Y., Fan T., Yan J., Lu A., Fang W., Zhao Y., Chen Y., Wang S., Wang X. Soil Microbe and Physicochemical Characteristics in Tensile Fracture Zone Caused by Mining Subsidence // *Pol. J. Environ. Stud.* – 2023. – V. 32. – P. 2361-2372. DOI: 10.15244/pjoes/158775
254. Wang Y., Zeng X., Zhang Y., Zhang N., Xu L., Wu C. Responses of potential ammonia oxidation and ammonia oxidizers community to arsenic stress in seven types of soil // *Journal of Environmental Sciences*. – 2023. – V. 127. – P. 15-29. DOI: 10.1016/j.jes.2022.02.038
255. Wood D.E., Lu J. Langmead, B., Improved metagenomic analysis with Kraken 2 // *Genome biology*. – 2019. – V. 20. – P. 1-13
256. Wrage N., Velthof G.L. ML van Beusichem, O. Oenema // Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide, *Soil Biol. Biochem.* – 2011. – V. 33. – №. 12-13. – P. 1723-1732.
257. Wright, C.L., Lehtovirta-Morley, L.E., Nitrification and beyond: metabolic versatility of ammonia oxidising archaea // *The ISME Journal*. – 2023. – V. 17. – № 9. – P. 1358-1368. DOI: 10.1038/s41396-023-01467-0
258. Wu M., Chen L., Tian Y., Ding Y., Dick W.A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media // *Environmental Pollution*. – 2013. – V. 178. – P. 152-158
259. Wu M.R., Miao L.L., Liu Y., Qian X.X., Hou T.T., Ai G.M., ... Liu S.J. Identification and characterization of a novel hydroxylamine oxidase, DnfA, that catalyzes the oxidation of hydroxylamine to N₂ // *Journal of Biological Chemistry*. – 2022. – V. 298. – № 9. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.102372
260. Wu Y., Zhu Q., Zeng J., Ding, Q., Gong Y., Xing P., Lin X. Effects of pH and polycyclic aromatic hydrocarbon pollution on thaumarchaeotal community in agricultural soils // *Journal of Soils and Sediments*. – 2016. – V. 16. – P. 1960-1969

261. Wu Y.W., Simmons B.A., Singer S.W. MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets // *Bioinformatics*. – 2016. – V. 32. – № 4. – P. 605-607. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv638
262. Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang P., Yu H. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – P. 2885
263. Yakimov M.M., Lunsdorf H., Golyshin P.N. *Thermoleophilum album* and *Thermoleophilum minutum* are culturable representatives of group 2 of the Rubrobacteridae (Actinobacteria) // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2003. – V. 53. – № 2. – P. 377-380. DOI: 10.1099/ijs.0.02425-0
264. Yan J., Quan G., Ding C. Effects of the combined pollution of lead and cadmium on soil urease activity and nitrification // *Procedia Environmental Sciences*. – 2013. – V. 18. – P. 78-83.
265. Yang L., Wang X.H., Cui S., Ren Y.X., Yu J., Chen N., ... Wang R.H. Simultaneous removal of nitrogen and phosphorous by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification of a metal resistant bacterium *Pseudomonas putida* strain NP5 // *Bioresource technology*. – 2019. – V. 285. – P. 121360. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121360
266. Yang X., Li E., Liu F., Xu M. Interactions of PAH-degradation and nitrate-/sulfate-reducing assemblages in anaerobic sediment microbial community // *Journal of Hazardous Materials*. – 2020. – P. 122068. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122068
267. Yin Y., Wang X., Hu Y., Li F. Cheng, H. Soil bacterial community structure in the habitats with different levels of heavy metal pollution at an abandoned polymetallic mine // *Journal of Hazardous Materials*. – 2023. – V. 442. – P. 130063.
268. Yu C., Hou L., Zheng Y., Liu M., Yin G., Gao J. Han, P., Evidence for complete nitrification in enrichment culture of tidal sediments and diversity analysis of clade a comammox *Nitrospira* in natural environments // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2018. – V. 102. – P. 9363-9377

269. Yu Y., Zhao C., Zheng N., Jia H., Yao H. Interactive effects of soil texture and salinity on nitrous oxide emissions following crop residue amendment // *Geoderma*. – 2019. – V. 337. – P. 1146-1154. DOI: 10.1016/j.geoderma.2018.11.012
270. Yuan H., Huang S., Yuan J., You Y., Zhang Y. Characteristics of microbial denitrification under different aeration intensities: Performance, mechanism, and co-occurrence network // *Science of the Total Environment*. – 2021. – V. 754. – P. 141965. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141965
271. Yuan K., Li S., Zhong F. Treatment of coking wastewater in biofilm-based bioaugmentation process: biofilm formation and microbial community analysis // *Journal of Hazardous Materials*. – 2020. – V. 400. – P. 123117
272. Zamulina I.V., Gorovtsov A.V., Minkina T.M., Mandzhieva S.S., Bauer T.V., Burachevskaya M.V. The influence of long-term Zn and Cu contamination in Spolic Technosols on water-soluble organic matter and soil biological activity // *Ecotoxicol Environ. Saf.* – 2021. – V. 208. – P. 111471. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111471
273. Zapata A., Ramirez-Arcos S. A comparative study of McFarland turbidity standards and the Densimat photometer to determine bacterial cell density // *Current microbiology*. – 2015. – V. 70. – P. 907-909. DOI: 10.1007/s00284-015-0801-2
274. Zhalnina K., de Quadros P.D., Camargo F.A., Triplett E.W. Drivers of archaeal ammonia-oxidizing communities in soil // *Frontiers in microbiology*. – 2012. – V. 3. – P. 210. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00210
275. Zhang J., Ma W., Tan H. Cloning, expression and characterization of a gene encoding nitroalkane-oxidizing enzyme from *Streptomyces ansochromogenes* // *European journal of biochemistry*. – 2002. – V. 269. – № 24. – P. 6302-6307. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03350.x
276. Zhang M., Li A., Yao Q., Wu Q., Zhu H. Nitrogen removal characteristics of a versatile heterotrophic nitrifying-aerobic denitrifying bacterium, *Pseudomonas bauzanensis* DN13-1, isolated from deep-sea sediment // *Bioresource Technology*. – 2020. – V. 305. – P. 122626. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122626


277. Zhang M.K., Liu Z.Y., Wang H. Use of single extraction methods to predict bioavailability of heavy metals in polluted soils to rice // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* – 2010. – V. 41. – P. 820-831. DOI: 10.1080/00103621003592341
278. Zhang Y., Cai Z., Zhang J., Müller C. The controlling factors and the role of soil heterotrophic nitrification from a global review // *Applied Soil Ecology.* – 2023. – V. 182. – P. 104698. DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104698
279. Zhang Y., Chen L., Sun R., Dai T., Tian J., Zheng W., Wen D. Population and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in a pollutants' receiving area in Hangzhou Bay // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2016. – V. 100. – P. 6035-6045
280. Zhang Y., Zhao W., Cai Z., Müller C., Zhang J. Heterotrophic nitrification is responsible for large rates of N₂O emission from subtropical acid forest soil in China // *European Journal of Soil Science.* – 2018. – V. 69. – № 4. – P. 646-654. DOI: 10.1111/ejss.12557
281. Zhang Z., Guo H., Sun J., Wang H. Investigation of anaerobic phenanthrene biodegradation by a highly enriched co-culture, PheN9, with nitrate as an electron acceptor // *Journal of hazardous materials.* – 2020. – V. 383. – P. 121191
282. Zhao D., Li F., Wang R., Yang Q., Ni H. Effect of soil sealing on the microbial biomass, N transformation and related enzyme activities at various depths of soils in urban area of Beijing, China // *J. Soils Sediments.* – 2012. – V. 12. – P. 519-530. DOI: 10.1007/s11368-012-0472-6
283. Zhao X., Zhang Y., Chen L., Zhang S., Fu X., Wang L. Continuous-flow membrane bioreactor enhances enrichment and culture of autotrophic nitrifying bacteria by removing extracellular free organic carbon // *Environmental Science and Pollution Research.* – 2023. – V. 30. – № 14. – P. 42378-42389
284. Zheng H., Chen L., Li N., Liu B., Meng N., Wang M., Chen S.B. Toxicity threshold of lead (Pb) to nitrifying microorganisms in soils determined by substrate-induced nitrification assay and prediction model // *Journal of integrative agriculture.* – 2017. – V. 16. – № 8. – P. 1832-1840

285. Zhong X., Chen Z., Ding K., Liu W.S., Baker A.J., Fei Y.H., Qiu R. Heavy metal contamination affects the core microbiome and assembly processes in metal mine soils across Eastern China // *Journal of Hazardous Materials*. – 2023. – V. 443. – P. 130241.
286. Zhou J., Xia F., Liu X., He Y., Xu J., Brookes P.C. Effects of nitrogen fertilizer on the acidification of two typical acid soils in South China // *Journal of soils and sediments*. – 2014. – V.14. - №. 2. – P. 415-422.
287. Zhou M., Liu Z., Wang J., Zhao Y., Hu B. *Sphingomonas* relies on chemotaxis to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons and maintain dominance in coking sites // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10. – № 6. – P. 1109. DOI: 10.3390/microorganisms10061109
288. Zhou N., Yang Z., Zhang J., Zhang Z., Wang H. The negative effects of the excessive nitrite accumulation raised by anaerobic bioaugmentation on bioremediation of PAH-contaminated soil // *Bioresource Technology*. – 2023. – P. 130090
289. Zhou Z., Zheng, Y., Shen J., Zhang L., Liu Y., He J. Responses of activities, abundances and community structures of soil denitrifiers to short-term mercury stress // *Journal of Environmental Sciences*. – 2012. – V. 24. – № 3. – P. 369-375
290. Zhu Z., Yang Y., Fang A., Lou Y., Xie G., Ren N., Xing D. Quorum sensing systems regulate heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by changing the activity of nitrogen-cycling enzymes // *Environmental Science and Ecotechnology*. – 2020. – V. 2. – P. 100026. DOI: 10.1016/j.ese.2020.100026
291. Zou G., Ylinen A., Di Capua F., Papirio S., Lakaniemi A.M., Puhakka J. Impact of heavy metals on denitrification of simulated mining wastewaters // *In Advanced Materials Research*. – Trans Tech Publications Ltd. – 2013. – V. 825. – P. 500-503. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.825.500
292. Zumft W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – V. 61. – №. 4. – P. 533-616.


ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица 9

Морфологическое описание профиля чернозема обыкновенного карбонатного среднегумусированного среднемощного тяжелосуглинистого

Фото профиля	Генетические горизонты	Глубина, см	Описание
	Ad	0-6	сухой, темно-серый, тяжелосуглинистый, комковато-порошистый, рыхлый, тонкопористый, тонкотрещиноватый, присутствуют корни, ходы животных, земляные бусы, переход заметный по плотности
	A	6-54	влажноватый, темно-серый с бурым оттенком, тяжелосуглинистый, порошисто-комковатый, уплотненный, присутствуют копролиты, корни, земляные бусы, переход постепенный по окраске
	AB	54-71	влажноватый, темно-бурый с серым оттенком, тяжелосуглинистый, комковатый, плотный, тонкопористый, тонкотрещиноватый, присутствуют копролиты, корни, земляные бусы, переход заметный по окраске
	B	71-85	влажноватый, темно-бурый с серым оттенком, легкоглинистый, комковато-ореховатый, плотный, тонкопористый, тонкотрещиноватый, встречаются единичные корни, кротовины, червороины, белоглазка, переход заметный по окраске.
	Bca	85-125	влажноватый, темно-бурый с серым оттенком, легкоглинистый, комковато-ореховатый, плотный, тонкопористый, тонкотрещиноватый, встречаются единичные корни, кротовины, червороины, белоглазка, переход заметный по окраске
	Cca	125 - 145	влажноватый, бурый, легкоглинистый, комковато-ореховатый, плотный, тонкопористый, тонкотрещиноватый, присутствуют кротовины, червороины, белоглазка

Морфологическое описание профиля лугово-черноземной почвы

Фото профиля	Генетические горизонты	Глубина, см	Описание
	Ad	0-4	сухой, темно-серый, зернисто-ореховатый, тяжелосуглинистый, уплотненный, тонкопористый, тонкотрещиноватый, корни, ходы животных, земляные бусы, ясный по плотности
	A	4-30	свежий, темно-серый, комковато-зернистый, тяжелосуглинистый, плотный, тонкопористый, тонкотрещиноватый, корни, земляные бусы, копролиты, заметный по окраске и плотности
	B	30-56	свежий, темно-серый с бурым оттенком, столбовидный, тяжелосуглинистый, плотный, тонкопористый, тонкотрещиноватый и трещиноватый, ходы животных, ед. корни, постепенный по плотности и окраске
	BCc a	56-83	свежий, неоднородный бурый с серым оттенком и белыми пятнами CaCO ₃ , призматически-крупноореховатый, тяжелосуглинистый, уплотненный, тонкопористый, тонкотрещиноватый и трещиноватый, ходы животных, ед. корни, скопления CaCO ₃ , заметный по окраске и влажности
	C	73-112	влажный, светло-бурый, бесструктурный, среднесуглинистый, уплотненный

Список анализируемых генов в собранных геномах

Номер KEGG	Обозначение	Название фермента
K10944	<i>pmoA-amoA</i>	Аммоний монооксигеназа, А субъединица (<i>amoA</i>)
K10945	<i>pmoB-amoB</i>	Аммоний монооксигеназа, В субъединица (<i>amoB</i>)
K10946	<i>pmoC-amoC</i>	Аммоний монооксигеназа, С субъединица (<i>amoC</i>)
K10535	<i>hao</i>	Гидроксиламин оксидоредуктаза
-	<i>cysA</i>	Цитохром с554
-	<i>ncuA</i>	Оксидоредуктаза окиси азота, Нитрозоцианин
K00368	<i>nirK</i>	Нитритредуктаза (NO-forming)
-	<i>cytL</i>	Цитохром P460
K00370	<i>nxrA</i>	Нитратредуктаза/нитритоксидоредуктаза, альфа субъединица (<i>narG, narZ, nxrA</i>)
K00371	<i>nxrB</i>	Нитратредуктаза/нитритоксидоредуктаза, бета субъединица (<i>narH, narY, nxrB</i>)
K05601	<i>hcr</i>	Гидроксиламин редуктаза
K05916	<i>hmp</i>	Диоксигеназа окиси азота
K00459	<i>nmo</i>	Нитронат монооксигеназа
K19823	<i>nao</i>	Нитроалкан оксидаза
-	<i>pod</i>	Диоксигеназа пировиноградного оксима
K00370	<i>narG, narZ, nxrA</i>	Нитратредуктаза/нитритоксидоредуктаза, альфа субъединица (<i>narG, narZ, nxrA</i>)
K00371	<i>narH, narY, nxrB</i>	Нитратредуктаза/нитритоксидоредуктаза, бета субъединица (<i>narH, narY, nxrB</i>)
K00374	<i>narI, narV</i>	Нитратредуктаза, гамма субъединица
K02567	<i>narA</i>	Нитратредуктаза
K02568	<i>narB</i>	Нитратредуктаза
K00368	<i>nirK</i>	Нитритредуктаза
K15864	<i>nirS</i>	Нитритредуктаза
K04561	<i>norB</i>	Редуктаза окиси азота
K02305	<i>norC</i>	Редуктаза окиси азота
K12264	<i>norV</i>	Редуктаза окиси азота
K00376	<i>nosZ</i>	Редуктаза закиси азота

Физические, химические и физико-химические свойства в техногенно нарушенных почвах углеотвалов и черноземе
обыкновенном карбонатном

Площадки/ Параметры	Расположение	№	Тип почвы	pH	CaCO ₃ , %	C _{орг} , %	ВОВ, г/кг	C _{орг} ⁷⁰⁰ , %	Сухой остаток, %	Песок (1.0- 0.05 мм), %	Физ. глина (<0.01 мм), %	Ил (<0.001 мм), %
Фоновая почва	ООПТ Персианоская степь	ООПТ	Calcic Chernozem, Чернозем обыкновенный карбонатный	7.68±0.2	0.35±0.0	3.77±0.3	1.55±0.12	17.06±0.1	0.19±0.0	48,0	52,0	30,0
Углеотвал шахты Аютинская	Подножье углеотвала	A1	Epileptic Technosols, Эмбриозем	7,32±0,4	1,97±0,1	3,28±0,3	0,80±0,12	17,42±0,2	0,21±0,0	45,2	54,8	24,0
		A2	Epileptic Technosols, Эмбриозем	7,61±0,1	0,49±0,0	3,25±0,2	0,44±0,02	17,29±0,1	1,63±0,0	56,4	43,6	23,6
		A3	Epileptic Technosols, Эмбриозем	7,32±0,0	0,04±0,0	2,74±0,1	0,55±0,09	24,9±0,2	0,16±0,0	66,4	33,6	14,8
		A4	Epileptic Technosols, Эмбриозем	7,49±0,1	0,00±0,0	4,23±0,0	0,03±0,00	52,0±0,4	1,44±0,0	80	20	7,6
		A5	Epileptic Technosols, Эмбриозем	7,30±0,1	0,00±0,0	3,52±0,3	0,31±0,00	31,62±0,7	2,41±0,0	65,6	34,5	16,8
	Склон углеотвала	A6	Spolic Technosols, Технозем	8,37±0,1	2,51±0,1	1,67±0,0	0,15±0,01	22,77±1,0	0,13±0,0	58,1	51,1	22
		A7	Spolic Technosols, Технозем	8,29±0,2	3,95±0,1	0,27±0,1	0,019±0,03	12,58±0,3	0,08±0,0	41,2	58,8	32,8
		A8	Spolic Technosols, Технозем	8,54±0,5	4,45±0,1	2,28±0,3	0,02±0,04	12,58±0,3	0,1±0,0	41,6	58,4	32,4

Продолжение таблицы 12

		A9	Spolic Technosols, Технозем	8,30±0,0	6,76±0,1	0,64±0,0	0,03±0,00	12,35±0,3	0,09±0,0	42	58	30,4
Подножье углеотвала шахты Майская	M1	Epileptic Technosols, Эмбриозем	7,25±0,6	2,22±0,0	1,38±0,0	0,32±0,00	16,75±1,0	0,22±0,0	50,4	49,6	25,6	
	M2	Epileptic Technosols, Эмбриозем	7,93±0,2	1,31±0,1	1,17±0,1	0,46±0,09	15,00±0,5	0,09±0,0	52,4	47,6	26	
	M3	Epileptic Technosols, Эмбриозем	4,04±0,2	0,05±0,0	3,34±0,1	0,08±0,02	69,03±3,2	1,6±0,0	83,3	16,7	10,2	
	M4	Epileptic Technosols, Эмбриозем	8,80±0,7	0,79±0,1	3,11±0,1	0,30±0,03	22,99±1,9	0,15±0,0	58,1	41,9	22	
	M5	Epileptic Technosols, Эмбриозем	8,33±0,1	2,22±0,1	1,35±0,1	0,34±0,04	16,45±0,23	0,31±0,0	51,2	48,8	34	
	M6	Epileptic Technosols, Эмбриозем	8,45±0,2	1,48±0,0	1,38±0,0	0,35±0,04	24,08±1,1	0,10±0,0	36,8	63,2	30,8	
	M7	Epileptic Technosols, Эмбриозем	8,48±0,3	2,22±0,0	1,92±0,1	0,38±0,00	21,93±0,2	0,11±0,0	49,6	50,4	18,8	

Описательная статистика. Содержание ТМ в техногенно нарушенных почвах
углеотвалов

Валовое содержание, мг/кг	Среднее	Минимум	Максимум	Коэффициент вариации
ТМ	Эмбриоземы А1-А5 углеотвала шахты Аютинская			
Mn	1667,36	645,54	3294,27	62,88
Zn	156,98	71,64	305,33	61,77
Ni	96,27	56,40	161,35	52,75
Pb	44,77	34,73	62,14	23,17
Cu	69,13	36,30	111,81	49,14
ТМ	Техноземы А6-А9 углеотвала шахты Аютинская			
Mn	835,95	703,33	965,16	12,89
Zn	91,33	81,81	104,25	11,98
Ni	58,58	53,14	62,84	6,94
Pb	46,64	34,30	74,06	39,81
Cu	45,78	34,62	60,47	23,80
ТМ	Эмбриоземы М1-М7 углеотвала шахты Майская			
Mn	917,75	685,69	1511,63	29,74
Zn	99,65	71,85	171,97	34,05
Ni	67,41	51,40	107,56	27,18
Pb	44,85	20,69	80,75	47,34
Cu	47,47	37,86	69,41	22,71
Содержание подвижных форм, мг/кг	Среднее	Минимум	Максимум	Коэффициент вариации
Эмбриоземы А1-А5 углеотвала шахты Аютинская				
Mn	285,71	96,36	725,31	90,63
Zn	26,10	6,82	66,82	98,40
Ni	16,24	2,91	35,58	86,34
Pb	9,43	5,59	12,51	27,37
Cu	8,93	1,34	15,40	73,83
Техноземы А6-А9 углеотвала шахты Аютинская				
Mn	40,10	34,03	51,97	20,08
Zn	4,31	2,53	7,09	45,18
Ni	2,21	1,38	3,57	42,86
Pb	8,91	3,96	14,61	49,14
Cu	2,16	1,34	2,67	27,80
Эмбриоземы М1-М7 углеотвала шахты Майская				
Mn	111,49	38,21	208,79	50,61
Zn	7,84	2,19	29,08	126,10
Ni	6,48	1,17	19,50	100,02
Pb	7,97	3,23	19,40	72,95
Cu	2,78	1,12	4,94	49,84

Статистическая разница между активностью нитрификации в лугово-черноземных почвах и техноземах бывшего шламонакопителя. Тест Kruskal–

Wallis

Параметры	Группа 1	Группа 2	p.value
Экспресс-тест – окисление нитрита	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,01
Экспресс-тест – окисление аммония	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,00
Комаммокс	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,03
Содержание нитрита после недели инкубации с нитропропаном	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,00
Содержание нитрата после недели инкубации с нитропропаном	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,00
Содержание нитрата после недели инкубации с оксимом	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,01
Содержание нитрита после недели инкубации с оксимом	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,00
Содержание нитрата после недели инкубации с аммонием	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,48
Содержание нитрита после недели инкубации с аммонием	Хемоземы	Лугово-черноземные почвы	0,43

Влажность лугово-черноземных почв (В) и хемоземов бывшего шламонакопителя (S) (0-20 см) в весенний и летний периоды

Показатели	Влажность, %	
	Весенний период	Летний период
B1	15,42	6,84
B2	13,26	8,16
B3	14,51	9,15
S6	55,85	4,39
S7	53,82	15,83
S8	48,28	7,56
S9	66,11	9,42
S10	54,74	3,69
S10a	38,05	3,69
S11	55,08	5,32
S12	52,82	7,00
S13	47,89	3,65
S14	45,30	8,86
S42	57,16	13,03