

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»
ФАКУЛЬТЕТ ПОЧВОВЕДЕНИЯ

На правах рукописи



КСЕНОФОНТОВА

Наталья Андреевна

**РАЗНООБРАЗИЕ И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ
МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРОКАРИОТНЫХ СООБЩЕСТВ
ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ И ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИМИ
АРОМАТИЧЕСКИМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ**

Специальность 1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Манучарова Наталия Александровна

Москва 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава I. Литературный обзор.....	12
1.1 Нефть. Химический состав. Влияние нефти на почву. Допустимые концентрации нефти.....	12
1.1.2 Химические свойства нефти.....	14
1.1.3 Влияние нефтепродуктов на почву.....	16
1.2 Воздействие нефтепродуктов на биологическую активность почвы..	18
1.2.1 Изменение состояния почвенного микробиоценоза.....	18
1.2.2 Изменение состояния почвенных бионтов под воздействием нефти.....	21
1.2.3 Реакция растений на поступление в почву поллютанта.....	22
1.3 Трансформация нефти и нефтепродуктов в почве.....	24
1.3.1 Основные этапы трансформации углеводородов.....	25
1.3.2 Возможности почвы к самоочищению от продуктов нефти...	26
1.4 Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), их влияние на почву и допустимые концентрации.....	28
1.5 Микроорганизмы-деструкторы углеводородов.....	31
1.6 Функциональные гены, отвечающие за деструкцию углеводородов...	36
1.7 Средства по борьбе с загрязнением нефтью компонентов окружающей среды.....	41
1.7.1 Механические методы.....	41
1.7.2 Физико-химические методы.....	42

1.7.3 Биологические методы.....	44
1.8 Почвенная метогеномика: сущность метода и место в научном знании.....	47
Глава II. Объекты и методы исследования.....	52
2.1 Объекты исследования.....	52
2.2 Методы исследования.....	54
2.2.1 Метод люминесцентной микроскопии (с использованием флуорохромов: акридин оранжевый, Су3).....	54
2.2.2 Определение численности и биомассы метаболически активных представителей прокариот, содержащих функциональный ген алкан-монооксигеназы (метод FISH).....	59
2.2.3 Выделение из почвы тотальной ДНК.....	60
2.2.4 RTPCR 16SpPHK.....	60
2.2.5 RTPCR на функциональные гены.....	62
2.2.6 Секвенирование гена 16SpPHK.....	63
2.2.7 Молекулярно-массовые распределения органического вещества водных и щелочных вытяжек из чернозема до и после обработки нефтью.....	64
2.2.8 Агрохимические приемы ремедиации нефтезагрязненных почв.....	66
2.2.9 Измерение остаточных нефтепродуктов.....	67
Глава III. Результаты и обсуждение.....	69
3.1 Численность и биомасса общей и метаболически активной компоненты прокариот в исследуемых почвенных образцах.....	69

3.2	Филогенетическая структура метаболически активной прокариотной компоненты исследуемых почв.....	74
3.3	Длительное воздействие нефтяных загрязнений на структуру прокариотного комплекса почв.....	86
3.4	Молекулярно-массовые распределения органического вещества водных и щелочных вытяжек из чернозема типичного до и после обработки нефтью.....	89
3.5	Оценка разнообразия и активности прокариотного сообщества загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почвы в условиях разного минерального питания.....	91
3.6	Детекция функциональных генов, связанных с деструкцией углеводов (<i>alkB</i> , <i>xylE</i> , <i>bssA</i>) и самовосстановлением систем (<i>nifH</i>).....	95
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
	ВЫВОДЫ.....	106
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире одними из самых главных загрязнителей и опаснейших угроз для окружающей нас среды являются нефть и полициклические ароматические углеводороды (Микроорганизмы и охрана почв, 1989; Геннадиев и др., 2015; Karlapudi et al., 2018). В связи с активной антропогенной деятельностью человека, данной угрозе подвержены не только те регионы, в которых присутствует промысел нефтедобычи, но и абсолютно любая местность, так как нефть беспрестанно транспортируется по разным городам, хранится в различных местах всего земного шара, зачастую происходят различные аварии, ведущие за собой разливы и протечки, важную роль играют и пожары. Также в результате антропогенной деятельности, происходит и активное поступление полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в окружающую среду, в том числе и в почву, где они накапливаются, оказывая крайне негативное влияние на ее свойства. К сожалению, с каждым годом угроза лишь нарастает, так как в геометрической прогрессии увеличивается частота аварий и нефтяных разливов на территории нашей страны. Самым важным является тот факт, что неимоверное количество нефтепродуктов и ПАУ попадает в окружающую среду из-за работы промышленных предприятий.

Начиная с XX века борьба с загрязнением окружающей среды нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами является одним из основных вызовов, встающим перед человечеством. В обычной жизни используется огромное количество продуктов нефти во всех существующих сферах, но на этом этапе человек столкнулся с закономерностью: чем больше масштабы производства нефти, тем больше масштабы нефтяного загрязнения (Stankevich et al., 2002).

Ущерб, наносимый экологии, несоизмеримо велик. Происходит уменьшение качества почв, что ведет за собой их полное исключение из сельхозоборота (Пиковский и др., 2009). Высокое содержание

нефтепродуктов и полициклических ароматических углеводородов оказывает негативное влияние на плодородие, приводит к массовому отмиранию растительного покрова, снижает видовое разнообразие обитающих в почве микроорганизмов, микромицетов и отрицательно влияет на почвы в целом, ухудшая их водные и физические характеристики.

Преобразования, происходящие с почвенной биотой при загрязнении нефтепродуктами и ПАУ, невероятны: снижается дыхательная активность, замедляются процессы фиксации азота, в почве запасаются метаболиты, являющиеся трудноокисляемыми (Atlas, 1981).

Высокие концентрации углеводородов нефти и ПАУ наносят огромный ущерб сельскохозяйственным угодьям, лесным хозяйствам, а также различным водоемам, проникая в аквиферы (Zaide, 2019). Следствием нефтяных разливов являются глубокие изменения физических, химических и биологических свойств почв (Трофимов, 2002), в том числе изменения численности и состава почвенных микроорганизмов (Звягинцев и др., 2002; Назина и др., 2017).

При нефтяном загрязнении проявляются факторы, необходимые для дальнейшего учета при оценке масштабов негативных последствий попадания нефти в почву: 1) химический состав загрязнителя, оценённый по множествам компонентов, который при этом меняется в различные временные промежутки, определение различных свойственных токсичных веществ в составе; 2) гетерогенность и многофазность почвенной системы; 3) многообразие и изменчивость окружающей среды. В связи с этим появляется острая необходимость в комплексном подходе при прогнозировании и ликвидации негативных эффектов нефтяных разливов (Восстановление..., 1988).

В первую очередь при описании состояния экосистем, подвергшихся нефтяному загрязнению и загрязнению полициклическими ароматическими

углеводородами, стоит обращать внимание на физические и химические характеристики, так как абиотические процессы играют ведущую роль именно в первое время после попадания в почву поллютантов, при этом обязательно нужно брать во внимание показатели биологические, такие как структура прокариотного комплекса, так как это позволяет дать комплексную оценку состояния экологической системы в целом.

В соответствии со многими исследованиями, микробиологические показатели реагируют на поступление углеводов и ПАУ в почву в первую очередь: активизируется деятельность микроорганизмов, способных к деструкции поллютанта, микробиота адаптируется и изменяет функциональную структуру сообщества (Трофимов, 2002; Узких и др., 2009; Mbadinga et al., 2011; Xie et al., 2014; Толпешта и др., 2015). В связи с этим крайне важным в нынешних условиях является поиск и дальнейшая селекция микроорганизмов-нефтедеструкторов из мест высокой концентрации углеводов (Лобакова и др., 2014).

Цель: Оценка биологического разнообразия и экологических функций метаболически активных прокариотных сообществ почв, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ).

В задачи исследования входило:

- Оценка численности и биомассы метаболически активных клеток и структуры метаболически активного прокариотного сообщества почв, загрязненных нефтью и ПАУ.
- Изучение филогенетического разнообразия прокариотной составляющей микробного комплекса исследуемых почв.
- Определение эффективности применения агромелиоративных методов рекультивации загрязненных нефтью торфяных почв с помощью характеристики функциональной и филогенетической структуры прокариотной компоненты микробного комплекса.

- Выявление наличия в загрязненных почвах функциональных генов *bssA*, *alkB*, *xylE* и *nifH*, маркирующих начальный этап деградации углеводов и нитрогеназную активность, соответственно.

Методология и методы исследования. Для характеристики прокариотного комплекса почв, подвергшихся загрязнению углеводородами, были использованы стандартизированные современные и традиционные методы и подходы микробиологии и молекулярной биологии (люминесцентно-микроскопические, выделение ДНК, RTPCR 16Sp-РНК), агрохимические приемы ремедиации нефтезагрязненных почв, измерение остаточных нефтепродуктов. Полученные результаты подвергали статистической обработке.

Для идентификации микроорганизмов применяли метод секвенирования участков гена 16S рНК, исследование бактериальных сообществ *in situ* проводили на базе платформы IlluminaMiSeq.

Научная новизна. Впервые для гумусовых горизонтов зональных типов почв, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами проведена оценка метаболически активного прокариотного сообщества. Установлено уменьшение численности и биомассы метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами. Доля метаболически активных компонент от всех выявляемых клеток прокариот в образцах гумусовых горизонтов рассматриваемых загрязненных зональных почв (чернозем, серая лесная, каштановая, дерново-подзолистая) сокращалась до 30 %, а для образцов исследованного торфа, загрязненного углеводородами, она 10 % от всего выявляемого прокариотного сообщества. Установлено формирование специфического метаболически активного прокариотного комплекса, способного к деструкции нефти и ПАУ, состав которого определяется типом почв, формирующихся в разных климатических условиях. Определены чувствительные и устойчивые к загрязнению формы. На фоне снижения

метаболически активной биомассы в сообществе прокариот, а также сокращения биоразнообразия в загрязненных образцах по сравнению с контролем определено увеличение содержания функциональных генов, отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xylE*), алкан-монооксигеназы (*alkB*) и бензил-сукцинатсинтазы (*bssA*), маркирующих начальный этап деградации углеводов. Внесение в загрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидролитической кислотности) приводит к возрастанию биомассы клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) и значимому уменьшению содержания нефтепродуктов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Определение потенциально возможных метаболически активных устойчивых видов прокариот-разрушителей углеводов и выявление наличия функциональных генов в исследуемых почвах, поможет получить информацию, которая полезна для биоиндикации и биоремедиации почв, загрязненных углеводородами, а также увеличения их хозяйственной значимости и ценности.

Положения, выносимые на защиту:

1. В почвах, загрязненных нефтью и ПАУ, снижается численность и биомасса метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами. Уменьшается филогенетическое разнообразие прокариотной составляющей, происходит смена доминант и формирование специфического прокариотного сообщества. Для исследуемых почв выявлены устойчивые и чувствительные к нефтезагрязнению представители доменов *Bacteria* и *Archaea*;

2. Структура прокариотной компоненты в почвах с поллютантами различается, в зависимости от типа почв, формирующихся в разных климатических зонах. Для образцов почв южных широт доминирующая роль среди деструкторов принадлежит представителям актинобактерий, для почв

центральной и северной широт – протеобактериям. Таким образом, тип почвы и экологические факторы оказывают координирующее влияние на развитие доминантных компонент гидролитического комплекса.

3. Значимым фактором, влияющим на структуру прокариотного комплекса в почвах с поллютантами, является время, прошедшее с момента загрязнения. По прошествии 7 лет после разлива нефти установлено дальнейшее снижение бактериального разнообразия и рост содержания функциональных генов, кодирующих синтез ферментов катехол - 2, 3 – диоксигеназы (*xylE*) и алкан-монооксигеназы (*alkB*), маркирующих деструкцию углеводов.

4. В целях ремедиации нефтезагрязненных торфяных почв рекомендуется использовать минеральные удобрения (NPK) на фоне известкования – это приводит к увеличению биомассы клеток, числа копий функциональных генов (*bssA*, *nifH*), маркирующих деструкцию углеводов и нитрогеназную активность, а также к снижению содержания нефтепродуктов.

Личный вклад автора. Работа является результатом оригинальных исследований. Автор принимал участие в определении направлений исследований, разработке схем экспериментов, получении и обработке данных, обсуждении полученных результатов и подготовке публикаций. Основные экспериментальные результаты получены лично автором. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Степень достоверности результатов. Все полученные результаты являются оригинальными, их достоверность обусловлена большим объемом полученных данных, воспроизводимостью результатов в повторностях, использовании классических и современных подходов и методов, статистической обработке полученных данных. Степень достоверности

подтверждается опубликованными по теме работы статьями в рецензируемых научных журналах.

Апробация работы. Основные теоретические и практические результаты диссертационного исследования были изложены в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus), представлены и обсуждены на VIII Съезде Общества Почвоведов им. В. В. Докучаева (Москва, 2022). Материалы исследования докладывались и обсуждались на заседаниях кафедры биологии почв факультета почвоведения МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты исследования были использованы при выполнении работ по гранту РНФ 21-14-00076 «Разнообразие и биотехнологический потенциал почвенного микробиома в условиях антропогенной и абиогенной нагрузок».

Публикация результатов исследований. По результатам работы были опубликованы 3 печатные работы: из них 3 статьи (объемом 2,33 п.л.) в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причём вклад соискателя был определяющим. Также автором опубликовано 8 печатных работ (объемом 5.3 п.л.) по специальности 1.5.11. Микробиология (биологические науки).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 139 страницах печатного текста, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение, выводы и список литературы. Диссертация включает 17 таблиц и 22 рисунка. Список литературы включает 227 наименований, в том числе 116 – на иностранных языках.

Глава I. Литературный обзор

1.1 Нефть. Химический состав. Влияние нефти на почву.

Допустимые концентрации

Термин «нефть» берет свое начало от персидского слова «нафт», переводящегося как «извергать» (Черникова, 1988). Первооткрывателем нефти считается Дрейк Э. Л. В штате Пенсильвания им была пробурена первая скважина глубиной двадцать один метр. Самая первая скважина в России была пробурена в 1864 году на Кубани (Галкин, 2011), а в 30-е годы двадцатого века в России значительно выросла нефте- и газодобыча, в связи с началом формирования новых баз на юге Российской Федерации. В процессе развития нефтепромысла в работы по обнаружению месторождений вкладывалось все больше средств, например, был проспонсирован поиск месторождений на территории Республики Коми и Ненецкого автономного округа, а также на территориях, прилегающих к бассейнам рек Кама и Печора (Галкин, 2011). Происходило создание новых масштабных баз нефтедобычи, примерно в начале 80-х годов выделились основные регионы по газо- и нефтедобыче, к которым относятся часть Сибири, расположенная между Уральскими горами на западе и руслом Енисея на востоке и нефтегазоносный бассейн между Волгой и Уралом (Мальцева и др., 1998; Габриэлянц, 2003). В процессе развития данного направления появлялись и новые сведения о процессе образования месторождений, так стало известно, что основным фактором, влияющим на возникновение подобного рода месторождений, является связь формирования элементов структуры и характеристик тектоники с элементом геоструктуры поверхности коры земли (Брод, 1957; Алёхин и др., 1998; Ибламинов, 2007; Попов и др., 2013). Обозначается два варианта месторождений: на платформах и на областях складчатости. Само по себе понятие «продукты нефти» может рассматриваться в нескольких значениях, а именно в техническом варианте и аналитическом (Баженова и др., 2012). В техническом значении — это

товарные сырые нефти, прошедшие первичную подготовку на промысле, и продукты переработки нефти, используемые в различных видах хозяйственной деятельности: авиационные и автомобильные бензины, реактивные, тракторные и осветительные керосины, мазуты, растворители, смазочные масла, гудроны, нефтяные битумы и остальные нефтепродукты (парафин, нефтяной кокс, присадки, нефтяные кислоты и т. п.). В понимании нефтепродуктов с аналитической точки зрения к ним относят углеводороды, не имеющие способность к сорбированию Al_2O_3 , но обладающие свойством растворения в гексане.

В настоящее время есть три версии возникновения нефти как таковой. Органическая и неорганическая, а также космическая (Бакиров и др, 1982). Ниже рассмотрим их отличия и упомянем основных сторонников той или иной теории.

1 гипотеза – является наиболее распространенной. Основные сторонники Губкин, Гефер, Энглер, Зелинский. Считали, что нефть – это продукт, возникший из подводных биогенных осадочных отложений.

2 гипотеза – Основные сторонники Бергло, Менделеев, Кудрявцев, Порфирьев. Нефть-неорганического происхождения в связи с близостью ее месторасположений к горным складчатостям и тяготению к большим разломам. Считалось, что вода проникает вглубь Земли и взаимодействует с металлами, образуя при этом нефть.

3 гипотеза-выдвинутая в 1892 году геологом Соколовым Н. А. Он считал, что углеводороды, существовавшие изначально на планете, при охлаждении Земли поглощались магмой, а затем, когда уже образовалась кора Земли, шли наверх по трещинам и загустевали. Подкреплял свою теорию ее автор тем, что обнаруживались нефтепродукты на метеоритах.

На сегодняшний день, учитывая все вышеперечисленные факты, органическая теория происхождения нефти видится наиболее

аргументированной, нежели две другие, но данный вопрос еще открыт для обсуждения.

1.1.2 Химические свойства нефти

Нефть и нефтепродукты являются собирательным названием огромного количества веществ, однако близких по элементному составу. Большую часть состава нефти (от девяноста пяти до девяноста девяти процентов) занимают углерод и водород, менее пяти процентов N, S и O и лишь сотые доли различные микроэлементы. Свойства и тип нефти определяются соотношением углеводородов.

К нынешнему моменту в нефти известно около 450 неорганических и органических компонентов, комбинация которых определяет все ее свойства и является главной характеристикой в определении ее типа (Dargay et al., 2010). Самая главная задача в определении типа нефти – необходимость структурирования всех вариантов и их объединение в несколько групп по сходным характеристикам трансформации, которые способна претерпевать нефть при попадании на земную поверхность, а также по влиянию, оказываемому на биосистему. В процессе расширения знаний о нефти и ее продуктах было выяснено, что концентрация таких химических веществ, как углеводороды метанового ряда, различные соединения S, вещества с замкнутой цепью атомов углерода, высокомолекулярные компоненты нефти и нефтяные смолы, а также различные металлы, H_2O и H_2S , является основой характеристики нефти с точки зрения науки о химическом составе Земли (Пиковский и др., 2009).

Легкая фракция нефти. Наиболее подвижна. К ней принято относить углеводороды циклопарафинового и ароматического ряда, а также простые по строению алканы. Углеводороды с содержанием метанов оказывают «отравляющее» действия на организмы, однако, стоит отметить, что в связи с

их летучестью и растворимостью действие таковых не бывает длительным. Удаляются почти на половину от исходного количества в рамках испарения.

Циклические углеводороды. Углеводороды ароматического ряда с прочным бензольным кольцом, делятся на низкомолекулярные (оказывают сильное токсическое воздействие) и высокомолекулярные, однако они редко присутствуют в нефти.

Высокомолекулярные гетероорганические вещества. Им характерно два состояния вещества: твердое и вязкое. Вязкое состояние (смолы) в качестве нефти являются определяющими – чем их больше, тем лучше вязкость. Отрицательно сказываются на гидрофизической характеристике почв. Основные микроэлементы и большая часть металлов содержится именно в них.

Различные соединения N и S. Содержатся в малых количествах, чаще встречаются в вариантах комбинации Сера с другими элементами, в большинстве случаев представлены сульфидами.

Минеральные вещества. H_2O , разные минеральные соли, изопренаны, производные порфина.

Получается, что в воздействии на почву со стороны биогеохимии, принимают участие неисчислимы количества углеводородных и неуглеводородных компонентов. Дабы определить токсичность нефти, стоит исходить из уровня токсичности ее составляющих, то есть важно учесть воздействие всего комплекса веществ.

Установлено, что если в почве низкий уровень загрязнения нефтепродуктами, то это приводит к усилению процессов трансформации нефтяных компонентов и способности микробного пула сопротивляться отрицательному эквиваленту, что приводит к таким проявлениям, как усиление дыхания, увеличение микробного разнообразия и возрастание биологической и химической активности. В свою очередь, при попадании в

почву больших концентраций углеводородов нефти, происходят обратные процессы, которые ухудшают все характеристики.

К сожалению, в настоящий момент в Российской Федерации существуют нормативы предельно допустимых концентраций лишь для небольшого количества углеводородов ароматического ряда и бензина (0,1–0,5 мг/кг) в пробах почвы.

Стоит отметить, что в РФ установлены ориентировочно допустимые концентрации нефти в почвенных пробах, однако отсутствует единая методическая база, используя которую можно было бы определить качественные характеристики различных земельных категорий (Шагидуллин и др., 2011).

При определении степени загрязнения территории продуктами нефти используется такой показатель, как верхний безопасный уровень концентраций, который зависит от множества факторов (Пиковский и др., 2003). Верхний безопасный уровень концентрации в почвах часто принимают за ориентировочно допустимые концентрации, так как ОДУ загрязнения почвы нефтепродуктами является минимальный уровень концентрации поллютанта, когда почва за год восстанавливается и самоочищается.

При оценке пределов загрязнения почв углеводородами стоит учитывать индивидуальные для каждой почвы характеристики, такие как ее возможности к самоочищению, свойства самой почвы, ее тип, климат и почвообразовательные факторы.

1.1.3 Влияние нефтепродуктов на почву

Под воздействием нефтезагрязнений изменяются почти все характеристики почвы. Помимо накопления в горизонтах почв поллютанта, происходят значительные изменения в ее структуре, претерпевает изменения химический состав почв, корни растений получают меньше влаги,

ухудшается урожайность. Все вышеперечисленные факторы способствуют выведению земель из сельхозоборота.

Нефтепродукты оказывают колоссальное влияние на «обитателей» почв. В случае аварийных разливов в течение 3 дней происходит исчезновение почвенной мезофауны: большая часть видов теряет 99 % от популяции, причем максимальный токсический эффект оказывают именно легкие нефтяные фракции (Халимов и др., 1996). Дополнительно стоит отметить, что и на растения оказывается негативное воздействие путем подавления их способности к фотосинтезу (максимальное подавление при попадании сырой нефти). Если в почву попадает большое количество углеводородов нефти, то у микроорганизмов происходит ингибирование дыхательной интенсивности, но со временем увеличивается численность прокариотной компоненты – данное явление сопровождается возвращением дыхательной интенсивности до нормальных значений.

Можно прийти к выводу, что при загрязнении почвы углеводородами нефти полностью меняется экообстановка, тем самым происходит перемена и в биоценозах. Определить возникающие у педобионтов реакции на проникновение поллютанта достаточно трудно. Однако, исходя из литературных источников, проявляются сходные реакции почв, подвергшихся нефтяному загрязнению. К ним относятся значительное снижение численности представителей мезофауны и микробной компоненты, а также минимизирование разнообразия видов (Глазовская, 1988).

Сам по себе процесс самоочищения почвы от нефтезагрязнения лишь с помощью природной микрофлоры длится минимум от десяти до двадцати пяти лет, это полностью зависит от непосредственно свойств самих нефтепродуктов, а также химических и физических свойств самой почвы (Морозов и др., 2005). Для ускорения восстановления почв применяются методы биологической рекультивации. Максимально положительный эффект

достигается путем внесения в почву биопрепаратов, содержащих микроорганизмы-нефтедеструкторы.

1.2 Воздействие нефтепродуктов на биологическую активность почвы

Состояние сообществ почвенных микроорганизмов (бактерии, микромицеты, водоросли и беспозвоночные) определяет биологическую активность почвы (Maila et al., 2005). При загрязнении почвы нефтепродуктами происходят различные реакции у вышперечисленных групп.

1.2.1 Изменение состояния почвенного микробоценоза

В.С. Гузев и С. В. Левин (2001) для улучшения описания изменений, которые происходят в сообществе почвенной биоты как ответная реакция на загрязнение углеводородами, предложили использовать модель, построенную на основе четырех зон адаптации. При низких уровнях нагрузки происходит увеличение общей биомассы микроорганизмов, при этом их видовое разнообразие и состав остаются неизменными. При среднем уровне нагрузки не происходит значимых перемен в структуре сообщества микробов, но, при этом, сильно меняется соотношение видов в количестве, сменяются доминанты – это называется средним уровнем нагрузки. В ситуациях, когда нагрузка на микробное сообщества оказывается на высоком уровне, происходит практически полная смена первоначального комплекса микроорганизмов и сильно уменьшается их биоразнообразие, если же уровень нагрузки продолжает возрастать, то происходит фактически полное угнетение сообщества почвенных микроорганизмов (Гузев, 2001). Нужно обязательно учитывать и тот факт, что происходящие перемены структуры прокариотного комплекса почв под воздействием поллютанта напрямую зависят от возможностей конкуренции между микроорганизмами и специфичны для каждой отдельно взятой ситуации (Гузев, 2001)

В случаях низких концентраций поллютанта, преимущество у микроорганизмов, у которых крайне высокая плотность самой популяции. При этом, когда уровень загрязнения высок, лидируют виды, способные к быстрому росту, даже если их плотность была мала – она не играет роли. Крайне важна и роль такого фактора, как время. Киреева Н. А. и Водопьянов В. В. выделили пять стадий изменения биомассы при загрязнении углеводородами:

1 стадия – атрофия (стадия отсутствует при минимальном поступлении поллютанта);

2 стадия – адаптация;

3–4 стадии – линейный и экспоненциальный рост;

5 стадия – стабилизация (Киреева и др., 2009).

Можно в дополнение выделить также и 3 этапа сукцессии, которые основываются на изменении численности доминантных видов микробного сообщества. Первый этап характеризуется полной перестройкой микробиоценоза и активизацией бактерий-деструкторов углеводородов. Второй этап: содержание углеводородов падает и подключаются микроорганизмы, которые ранее были подавлены загрязнителем, а на третьем этапе происходит длительное и постепенное восстановление сообщества к практически исходному состоянию, либо с вариативными изменениями, но не сильно отличающимися от состава исходного микробного сообщества (Adam et al., 2002; El-Sheekh et al, 2004; Назаров и др., 2010).

В почвах со свежим нефтяным загрязнением численность микроорганизмов часто довольно высока, там преобладают аммонификаторы. Отмечается, что с ростом количества микроорганизмов, способных к окислению углеводородов, гетеротрофная компонента подавляется, а при больших концентрациях нефтезагрязнения снижается

численность и тех, и других групп (Леднев, 2008). Самыми чувствительными к поступлению углеводов в почву оказываются бактерии-нитрификаторы, но численность микроорганизмов-участников процессов денитрификации, фиксации азота и аммонификации растёт (Puustinen et al., 1994; Jørgensen et al., 2000; Елин, 2002).

Постепенное восстановление почвы происходит по мере деструкции нефтепродуктов микроорганизмами. Структура микробного сообщества с момента попадания нефти в почву постоянно изменяется во времени. По мере использования ресурса в доминанты выходят представители разных филумов. Для восстановления нарушенных систем и приближения их характеристик к контрольным может потребоваться не один десяток лет. Известно, что восстановление первоначального микробиоценоза почв происходит постепенно и напрямую связано с факторов времени и уровнем ремедиации (Леднев, 2008; Назаров и др., 2008).

Были проведены исследования загрязненной нефтью дерново-подзолистой почвы, по результатам которых выяснено, что почвенные микромицеты гораздо более устойчивы к проникновению в почву поллютанта, по сравнению с доменом *Bacteria* (Кирсанов и др., 2010). Почвенные грибы, единожды подвергшиеся нефтезагрязнению, обладают способностью получать энергию из субстрата при повторном загрязнении, однако, стоит отметить, что в случае высокой концентрации нефтепродуктов угнетаются фактически представители микробиоценоза, в том числе и микромицеты. Интересно, что пониженные концентрации нефтепродукта оказывают стимулирующий эффект на рост микобиоты. Наиболее устойчивыми видами являются: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Oospora* и *Trichoderma*, большей частью следующие – *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium moniliforme*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium paxilli*, *Penicillium lanosum*, *Penicillium miczynskii*, *Penicillium restrictum*, *Penicillium simplicissimum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma viride*

(Ahn et al., 2006; Baek et al., 2007; Евдокимова др., 2013; Rosenberg, 2014). Можно сделать вывод, что следствием попадания в почву углеводородов нефти является ингибирование всего микробного состава, а также резкое снижение общей численности микроорганизмов, при этом высокий уровень концентрации нефтепродуктов негативно влияет на все сообщество, а низкий уровень концентраций приводит к сильным изменениям видового разнообразия и его перестройке. С ростом нитрифицирующих бактерий и бактерий, способных разлагать целлюлозу, в почве возрастает количество почвенных микромицетов, использующих углеводороды нефти в виде субстрата, а с течением времени происходит постепенное возвращение микробиоценоза к характеристикам, близким к исходным. К сожалению, нефтезагрязнения все равно оказывают деструктивное влияние на микроорганизмы почв (иногда приводят к полному отмиранию) – это крайне отрицательно влияет на саму почву и на ее свойства (Мязин, 2014).

1.2.2 Изменение состояния почвенных биотопов под воздействием нефти

Одними из характерных свойств беспозвоночных животных, обитающих в почве, является быстрое реагирование на попадание загрязнения и следующая за этим миграция на незагрязненные территории. Также претерпевает изменения их общая численность, соотношение видов и даже половая и возрастная структуры сообщества (Соромотин, 1995; El-Sheekh et al., 2000,2004).

Представители почвенной мезофауны являются крайне чувствительными к загрязнению углеводородами нефти, это дает возможность вычлнять даже незначительное поступление поллютантов. Большое количество ученых занималось исследованием воздействия на мезофауну углеводородов нефти (Бабкина, 2001; Козлов, 2003; Иларионов и др., 2005; Шамаева, 2007; Кузьмин, 2008; Смольникова и др., 2008). Всеми было отмечено, что в первые сутки-двое после поступления углеводородов в

почву массовая гибель педобионтов связана с токсичностью летучих нефтяных соединений, потому что такое характерное для них свойство, как гидрофобность, способно помимо токсического воздействия высушивать слизистые оболочки в тканях (Винник, 2005; Кузьмин, 2008; Смольникова и др., 2008).

1.2.3 Реакция растительности на поступление в почву поллютанта

Растения также подвержены сильному влиянию со стороны продуктов нефти. Поступившие в почву поллютанты способны оказывать токсическое воздействие и приводить к образованию ожогов, что является следствием их возможности к изменению свойств почв, создавая в ней бескислородные условия и увеличивая показатель гидрофобности, из-за которого значительно усложняется способность корневой системы и семян к водопоглощению, за счет образовавшейся на них плёнки (Салангинас и др., 2003, 2004; Полонский и др., 2013).

Нефтепродукты, помимо отравляющего эффекта, способны вызывать аномалии в развитии растений и увеличивать вероятность мутаций различного рода (Петухова и др., 2000; Аниськина и др., 2007; Ikeura et al., 2016). К настоящему моменту времени многие ученые пытались проанализировать данную проблему и найти способы ее решения. Результатами их работ являлось следующее: при совокупности множества факторов (тип нефти, ее концентрация, тип почвы, вид растений, климат) на растение оказывалось не только отрицательное, но, изредка, и положительное влияние нефтезагрязнений. Известно, что достаточно небольшие концентрации углеводов даже слегка стимулируют рост растительности, но с увеличением содержания углеводов проявляется ингибирующее влияние на прорастание семян и их количества, а также происходит смещение фаз их развития. Также нефть обладает способностью растворять эфиры на поверхности листа и вмешиваться в обмен веществ растения путем закупоривания устьиц в результате процесса адгезии. В

некоторых исследованиях показано, что углеводороды нефти приводят к накоплению в растительных клетках 2-хроменонов, обладающих эффектом флюоресценции, не являющихся свойственными растениям в нормальных условиях, из чего можно сделать вывод об активно идущем процессе клеточного разрушения (Григориади, 2010).

Было выявлено несколько фаз фитотоксичности: хроническая (от 3,5 до 6,8 %) и острая (10,4 %) (Зейферт и др., 2012). Также удалось установить максимально устойчивые к подобного рода загрязнениям виды растений, потенциально важные для дальнейшей фитомелиорации почв, загрязненных нефтью (Adam et al., 2002). Среди них как окультуренные виды, так и дикорастущие – кукуруза, подсолнечник, кормовые бобы, соя культурная, рожь многолетняя, овсяница луговая, волоснец песчаный, двукисточник тростниковидный, кострец безостый, бодяк щетинистый (Dominguez-Rosado et al., 2004; Надыкта и др., 2008; Денисова и др., 2011).

Было также изучено и влияние нефтезагрязнений на сообщества растений в естественных условиях, к важнейшим выводам относится то, что глубина проникновения в почву нефти и глубина залегания органов вегетативного размножения растений определяют сохранность надпочвенного покрова (Чижов и др., 1998, 2007; Кулагин и др., 2011). Чижовым Б. Е., Долингером В.А., Захаровым А. И. и Гаркуновым Г. А. были установлены следующие уровни загрязнения нефтепродуктами:

1. Уровень загрязнения 1,5 л/м² – углеводороды нефти проникают на пару сантиметров в лесную подстилку (гибнут лишайники, мхи, кедр сибирский и сосна обыкновенная);
2. Уровень загрязнения 5 л/м² – углеводороды нефти вызывают полное замазучивание подстилки (гибнут черника, брусника);
3. Уровень загрязнения от 10 л/м² до 20 л/м² – углеводороды нефти проникают на глубину до 20 сантиметров (угнетение всего надпочвенного покрова, сильное снижение видового разнообразия);

4. Уровень загрязнения от 50 л/м² до 100 л/м² – максимально деструктивный уровень проникновения углеводородов нефти (отмирают все травянистые растения, мхи). Период восстановления минимум девять лет.

Представляется возможным сделать вывод, что проникновение в почву нефтяного загрязнения сильно снижает представленность видов растений, минимизирует их площадь покрытия, перестраивает видовую структуру и меняет ее соотношение по группам растений (Казиахмедова, 2010; Казанцева и др., 2012).

1.3 Трансформация нефти и нефтепродуктов в почве

На процесс разложения в почве углеводородов нефти оказывает непосредственное влияние комбинация нескольких факторов, таких как химические, а именно фотодиссоциация и биохимическая деструкция, физических, например вымывание и испарение, и биологических (микроорганизмы-деструкторы углеводородов) (Пиковский, 1988; Холоденко и др., 2001; Одинцова, 2003; Кокорина, 2010). На поверхности почвы и в верхних горизонтах более эффективны вымывание, испарение и фотолиз, но такому воздействию большей частью подвергаются легкие фракции. В почвенной толще окисление нефти обычно идет за счет действия микроорганизмов и биохимического разрушения (Галиулин и др., 2011). Так как от углеводородного состава напрямую зависит растворимость продуктов нефти, то более легко растворимыми являются те углеводороды, в которых меньше количество атомов углерода. В аэробной среде окисление разных классов углеводородов происходит по пути встраивания O₂ в молекулу с дальнейшим увеличением энергии разрыва связей (Пиковский, 1988). На данный момент достаточно много известно о способах трансформации ароматических и алифатических углеводородов (Пиковский, 1993; Varabas et al., 2001; Елин, 2002).

1.3.1 Основные этапы трансформации углеводородов

Выявлено, что процесс разложения нефтепродуктов представляется возможным условно поделить на 3 этапа, каждому из которых свойственны определенные изменения в углеводородном составе (Солнцева и др., 1985; Оборин и др., 1988; Макарова, 2000; Одинцова, 2003):

I этап – длится от года до 2 лет, в ходе него происходят такие процессы, как испарение, вымывания, окисление (фотохимическое, химическими веществами, возникшими в почве после гибели микроорганизмов), снижение содержания легких углеводородов. В процессе окисления образуются простые эфиры, кислоты, спирты и ненасыщенные алканы;

II этап – начинается через год. Для него характерна биodeградация циклоалканов, высших алканов. Также, в процессе деятельности микроорганизмов-деструкторов углеводородов, начинают деградировать ароматические углеводороды, в результате чего отмечается рост смолисто-асфальтеновых фракций. Образуются в итоге: оксосоединения, кислоты, сложные эфиры, арены, тиолы;

III этап – примерно через 4 года. Характеризуется высокой концентрацией фракций смолисто-асфальтеновых, при этом происходит снижение количества соединений ароматического ряда.

Исходя из всего вышеперечисленного, можно отметить, что элементный состав нефти претерпевает изменения в сторону снижения карбонизации, при этом увеличивается доля атомов кислорода, серы, образуя соединения не углеводородной структуры (Young et al., 1990).

Идущие процессы происходят не однонаправленно, при этом понижение концентраций разных компонентов неравномерное. Итоговыми продуктами нефтяного метаболизма являются CO_2 , H_2O , различные кислородные соединения, такие как спирты, кислоты, кетоны, они частично

растворятся в воде, а частично войдут в гумус почв, и различные твердые нерастворимые продукты метаболизма (Пиковский, 1988, 1993).

1.3.2 Возможности почвы к самоочищению от продуктов нефти

Процесс самоочищения почвы и его скорость зависят от влияния совокупности многих факторов (концентрация поступивших углеводов, исходные почвенные свойства, климат) (Sutton et al., 2013; AlKaabi et al., 2020). Легкие фракции нефти более других подвержены скорому испарению, окислению в ходе фотохимических процессов и выносом водными потоками, поэтому на начальных этапах отмечается достаточно быстрое снижение концентраций нефтепродуктов в почве, загрязненной нефтью (Фокина и др., 2010; Евдокимова и др., 2014). Дальнейшая скорость процесса самоочищения напрямую зависит от микробиологической активности в почве. Так, при разных концентрациях будет варьироваться степень очищения (Никифорова, 1985; Казанцева и др., 2001):

1. Концентрация 5 г/кг – очистится около 80 % в течение полутора месяцев;
2. Концентрация от 10 до 40 л/м² – очистится от 40 до 51 % за год, за два от 56 до 61 %;
3. Концентрация 500 мг/кг – слой почвы до 60 см при слабом уровне загрязнения очистится через шесть лет, при среднем уровне загрязнения через одиннадцать и при высоком уровне загрязнения через шестнадцать лет.

Однако, важно отметить, что при характерных, например, для России длительных низких температурах, самоочищение почвы в естественных условиях от загрязнений углеводородами нефти значительно осложняется и пролонгируется. Стандартно в данном случае выделяется 3 этапа трансформации нефти:

1 этап – физико-химическое разрушение + микробиологические процессы деструкции (в первую очередь метановых углеводородов). Этап длится от пары месяцев до 1,5 лет;

2 этап – активные процессы микробиологической деструкции. От 3 до 4 лет;


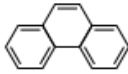
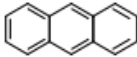
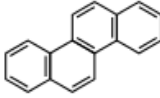
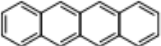
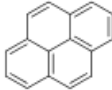
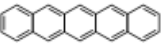

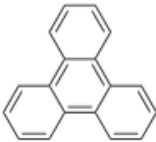

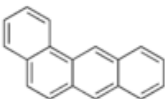
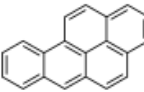
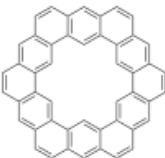

3 этап – остаются лишь максимально устойчивые углеводороды.

Из всего вышесказанного следует, что в основе процесса деструкции углеводородов нефти в почвах лежат процессы биологические, физические и химические, проявляющиеся во времени с разной интенсивностью, а характерной для процесса разложения углеводородов особенностью является разная скорость, с которой преобразовываются составляющие нефти. Можно сделать вывод, что для определения уровня ущерба, нанесенного нефтепродуктами, экологическому состоянию территорий и почвам является важным не только учесть концентрацию нефтепродуктов, но и досконально изучить химические, физические параметры почвы и провести биотестирование. Определение уровня фитотоксичности почвы и анализ общего состояния почвенного микробиома заслуженно считаются одними из важнейших и наиболее точных индикаторов нефтезагрязнения (Казанцева и др., 2001; ГОСТ Р ISO 22030, 2009; Кулагин и др., 2011).

1.4 Полициклические ароматические углеводороды, их влияние на почву и уровень допустимых концентраций

Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются органическими высокомолекулярными соединениями, в основе структуры которых – бензольное кольцо. Основные представители перечислены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные представители ПАУ

Химическое вещество		Химическое вещество	
Нафталин		Фенантрен	
Антрацен		Пирен	
Тетрацен		Коронен	
Пентацен		Овален	
Трифенилен		Бензпирен	
Бензантрацен		Коранулен	
Кекулен			

В связи с присущей им высокой гидрофобностью, следствием которой является низкая растворимость, полиароматические углеводороды способны

легко адсорбироваться на частицах почв (Tang et al., 2005). Известно, что многие представители ПАУ способны оказывать крайне негативное воздействие на среду и обитающие в ней организмы: канцерогенность, мутагенный эффект, иммунотоксичность и т. д. (Qiao et al., 2006). На данный момент известно, что бензо(а)пирен является одним из самых опасных канцерогенов и может приводить к тяжелым последствиям для здоровья человека, так как он имеет свойство накопления в организме и обладает достаточной для проникновения в кровь растворимостью, что может приводить к возникновению онкологических заболеваний и генетическим мутациям (Лебедева, 2007; Белюченко, 2014).

В окружающую среду ПАУ могут поступать различными способами, в том числе и биогенными. Основными считаются: извержения вулканов, лесные и степные пожары, ПАУ могут синтезироваться растениями в период вегетации, содержаться в некоторых грибах, насекомых, а также образовываться в рамках процесса преобразования органического вещества почв (Глушков, 2003; Morillo et al., 2007; Никифорова, Кошелева, 2011; Максимова и др., 2013). Однако ни один из этих источников отдельно и даже их совокупность не сравнится с поступлением ПАУ в окружающую среду в связи с антропогенной деятельностью.

Полициклические ароматические углеводороды, возникшие в ходе антропогенной деятельности, принято делить на пирогенные и петрогенные (Xing-hong et al., 2006).

- Пирогенные – 4 и более бензольных кольца, образуются в процессе сжигания продуктов органического происхождения, таких как уголь, выхлопные газы и т.д. Различны по составу и зависят напрямую от температуры горения: известно, что бензо(а)пирен образуется при высоких температурах;

- Петрогенные – 2–3 бензольных кольца, гомологи нафталина, пирена, хризена.

Также антропогенные источники ПАУ делят на:

- Стационарные – образованные в процессе сжигания топлива (промышленность, электростанции, отопительные системы, теплостанции);
- Мобильные – в основном автомобильные выхлопы, горение бензина и дизеля.

Полициклические ароматические углеводороды попадают в почву из атмосферного воздуха, с осадками, в рамках процесса трансформации органики и имеют свойство накапливаться в ней (Лодыгин и др., 2008; Никифорова, Кошелева, 2011). Степень накопления ПАУ в почвах напрямую связана с присущими ей свойствами. Поступившие в почву ПАУ разрушаются под воздействием идущих в почве химических и биологических процессов, а также могут вымываться с током вод, в основном совместно с теми почвенными частицами, что являются непосредственными носителями загрязнителя (Геннадиев и др., 2004). Данные процессы уменьшения концентраций ПАУ являются абиотическими.

Снижение концентраций ароматических углеводородов в большинстве своем происходит за счет деградиционной деятельности микроорганизмов почв. Многим микроорганизмам присуща способность к разложению, например бенз(а)пирена и многих других представителей ПАУ (Медведева, 2013). Интересным является тот факт, что в некоторых случаях концентрация ПАУ, их состав и свойства могут являться индикаторами процессов деградациии, идущих в почвах, и восстановления, так как обладают повышенной чувствительностью к экологическому состоянию почв (Лодыгин и др., 2008).

Известно, что содержание полициклических ароматических углеводородов в почвах напрямую зависит от удаленности от загрязнителя (Menichini, 1992). Максимальных концентраций ПАУ достигают в непосредственной близости от источника, например в промышленных зонах.

Существующие ПДК для ПАУ напрямую зависят от степени вреда, наносимого живым организмам. Нормативы содержания бенз(а)пирена установлены в РФ для всех сред, в связи с тем, что данный углеводород маркируется первым классом опасности, также существуют нормативы для нафталина, аценафтена, фенантрена, пирена, однако они установлены лишь для атмосферного воздуха места проживания и работы (Крылов и др., 2012). Предельно допустимые концентрации бенз(а)пирена в почвах – 0,02 мг/кг, установлены ГН 2. 1.7.2041-06. Все почвы, в которых содержание бенз(а)пирена превышает ПДК более, чем в 5 раз, подлежат незамедлительной утилизации и относятся к категории чрезвычайно опасных.

1.5 Микроорганизмы-деструкторы углеводов

Микроорганизмы различных групп способны усваивать углеводороды нефти (микровицеты, дрожжи, бактерии), бактерии являются наиболее активными деструкторами (Tumanyan et al., 2013). После первичного кратковременного ингибирования при поступлении загрязнения нефтепродуктами в почву, весь комплекс микроорганизмов реагирует повышением численности и ростом активности, в первую очередь такое поведение свойственно углеводородокисляющим бактериям, чья численность резко возрастает по сравнению с почвами контроля (Беляев, 1994).

Состав и численность микробного сообщества меняется в зависимости от уровня загрязнения и концентрации нефти (таблица 2).

Таблица 2 – Взаимосвязь между уровнем загрязнения почв (при разных концентрациях нефти) и микробиологическими показателями

Концентрация нефти в почве		Уровень загрязнения	Микробиологические показатели
мл/кг	мг/кг		
0-0,7	0-600	Низкий (зона гомеостаза)	Количественные изменения мало отличаются от контроля
0,7-50,0	600-40000	Средний (зона стресса)	Качественные изменения в составе почвенной микробиоты, интенсивные количественные изменения микробиологических процессов в почве
50-300	40000-250000	Высокий (зона резистентности)	Орбитальное развитие резистентных к высоким концентрациям загрязнителя видов микроорганизмов и подавление роста обычных для данной почвы микроорганизмов
Свыше 300	Свыше 250000	Очень высокий (зона репрессии)	Практически полное подавление развития микроорганизмов в почве и ингибирование микробиологических процессов

В зависимости от уровня загрязнения углеводородами и от этапа процесса деструкции начинают формироваться определенные группы микроорганизмов. Среди них выделяются метилтрофные, сульфатредуцирующие, денитрифицирующие и анаэробные бактерии, не метаногенные, также, наряду с ними выделяются и микроорганизмы, способные к окислению нефти.

К родам прокариот, присутствующим в почвах, загрязненных нефтью, и проявляющим способность к использованию углеводороды в рамках процесса жизнедеятельности относятся такие роды, как: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Comamonas*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* и некоторые другие. Часто в нефтезагрязненных почвах присутствует большое количество дрожжей, к примеру: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon* (Bartha et al., 1977; Healy et al., 1979; Bossert et al., 1984; Исмаилов и др., 1988; Kampf et al., 1991; Morgan et al., 1994; Sorkhoh et al., 1995). Сообщества бактерий различались в образцах контроля и загрязненных нефтепродуктами.

Известно, что в почве, подвергшейся нефтяному загрязнению, возрастает количество альфа-протеобактерий и дельта-протеобактерий, планктомицетов, хлорофлекси, ацидобактерий и фирмикутов, но при этом снижается количество гамма-протеобактерий. Вышеперечисленные бактерии, у которых отмечался рост, являются специфичными для почвы, подвергшихся нефтяному загрязнению (Popp et al., 2006; Liu et al., 2009).

Постоянными доминантами загрязненных нефтепродуктами почв являлись бактерии рода *Rhodococcus*, чья основная экофункция заключается в аккумуляции жидких углеводородов нефти, газообразных н-алканов и дальнейшая их трансформация в биомассу. Они устойчивы перед такими неблагоприятными факторами окружающей среды, как низкие температуры, ультрафиолет и длительное отсутствие питательных веществ (Коронелли и др., 1986).

К нефтяному загрязнению оказались наиболее чувствительными автотрофные нитрифицирующие бактерии, когда концентрация нефти в почве растет, то их активность значительно снижается. Даже в объеме 0,5 % ингибируется их деятельность, а если объем нефти в почве увеличить до 5-10 кг/м², то это приведет к их полному уничтожению. Основной причиной является то, что нефть, попадая в почву, снижает в ней содержание кислорода до 1,3 мг/л, а для процессов нитрификации необходимо минимум 2 мг/л (Bliss et al., 1979).

Известно, что численность и структура прокариотного комплекса изменяются в зависимости от почвы, климата, исходных характеристик и свойств, а не только под влиянием нефтезагрязнения. В литературе представлены данные о том, как экологические факторы, в частности процесс почвообразования, оказывают влияние на численность микроорганизмов в рамках очищения почв, загрязненных углеводородами (Глазовская, 1988; Atlas et al., 1992). По результатам данных исследований можно сделать следующие выводы: в почвах, загрязненных нефтью, значительно снижается

активность почвенных ферментов, ингибируются протеазы, дегидрогеназы, гидролазы и нитратредуктазы почв, а показатель активности каталазы часто используют в целях мониторинга, так как она значительно снижается в вариантах с нефтью относительно вариантов контроля. В связи с этим перед биотехнологами встает вопрос не только об обнаружении поллютанта в почве, но и поиск деструкторов нефти или микроорганизмов, которые ускорят процесс поглощения и переработки углеводородов, например, тех, которые сделают это фиксируя молекулярный азот.

«На поверхности земли нефть находится в аэрируемой среде, поэтому процесс окисления является основным механизмом ее разложения. Главный механизм окисления углеводородов в аэробной среде заключается в следующем: кислород внедряется в молекулу, заменяя связи с малой энергией разрыва (С-С, С-Н) связями с большой энергией разрыва (С-О, Н-О)» (Гузев и др., 1986). Окисление углеводородов нефти происходит по следующей схеме (Затучная, 1975):

1. Соединения с атомами кислорода, азота и серы, не оказывающие токсического эффекта на организмы;
2. Арены, циклоалканы, углеводороды ароматического ряда;
3. Высокомолекулярные соединения, низкомолекулярные алканы, незамещенные циклические углеводороды.

К настоящему моменту, при создании природных моделей мало обращали внимание на трансформации соединений в составе нефти. В почвах лишь сложноорганизованные микробные сообщества в основном разлагают многие нефтепродукты (Bertrand et al., 1983; Arino et al., 1998). Основными способами, используемыми микроорганизмами для «объединения» против поступившего в почву нефтяного загрязнения, являются: комменсализм (одна популяция получает пользу, объединяясь с другой, которая не испытывает при этом дефицита, но и не получает выгоды) и кометаболизм (вносится дополнительный субстрат, который хорошо утилизируется). При этом

данные о скорости разложения вариативны у различных авторов – восстановление происходит в одних ситуациях через год, в других растягивается до 12 лет включительно. В процессе деструкции изменялся рН почвы в сторону подкисленного, за счет разнообразных кислот, которые образовывались в ходе разрушения углеводов.

Средой обитания микроорганизмов, способных разлагать углеводороды нефти, является как водная, так и почва. В первом случае их численность колеблется от нескольких колоний до 100 кл/мл (Коронелли, 1996). Однако стоит заметить, что в почвах эта величина значительно выше и даже в почвах, которые не подвергались нефтяному загрязнению, подобные микроорганизмы встречаются довольно часто (Микроорганизмы и охрана почв, 1989). Известно, что в сложных местах обитания микроорганизмы выбирают для себя способ взаимодействия под названием «факультативный симбиоз», при таком виде симбиотических взаимоотношений микроорганизмы совместно способны осуществлять «метаболическую атаку» (выполняется только при факультативном симбиозе, по-отдельности не способны), которая, в свою очередь, дает возможность максимальной деструкции поллютанта, в том числе и углеводов нефти (Бызов и др., 1988). Бытует мнение, что именно за счет этого и разлагаются циклоалканы смешанными культурами, до конечных продуктов, таких как: углекислоты (в дальнейшем могут связываться в карбонаты), вода, спирты, альдегиды, кетоны (частично в составе гумуса почв, а частично вымываются с водой, растворяясь в ней), нерастворимые продукты метаболизма.

Многими бактериями разлагаются алифатические углеводороды с длиной цепи C₁₂-18, они утилизируются в окислительных условиях, так как первый этап деструкции – окисление оксигеназами концевой фермента (Jiao et al, 2016). В большинстве случаев парафиновые углеводороды разлагаются, начиная с окисления метильной группы до спирта, а затем, через альдегид до жирной кислоты. Затем идет бета-окисление жирной кислоты, где с каждым

этапом происходит ее укорачивание на два атома углерода. Однако, для деструкции соединений ароматического ряда микробами должны использоваться более замысловатые механизмы (Серебрякова и др., 1974). К настоящему моменту существует не очень много информации о способности микробов к деструкции циклоалканов, так как они являются менее подвержены микробной атаке, но существует возможность и их полного разложения при комбинировании культур и с использованием тактики кометаболизма (Trudgill et al., 1978).

1.6 Функциональные гены, отвечающие за деструкцию углеводов

В Российской Федерации большая часть месторождений и баз нефтедобычи располагается в зонах болот (торфяные почвы) и на севере тайги. Поэтому в данных регионах чаще всего происходят нефтяные разливы. К сожалению, именно этим почвам характерно медленное самовосстановление в связи с их особенностями, такими как медленная минерализация органики, показатели рН на кислотном уровне, невысокое содержание питательных элементов.

Как известно, свойства почв сильно изменяются под влиянием нефтяного загрязнения, например, на болотистых участках происходит снижение значений окислительно-восстановительного потенциала, что приводит к смене доминант в микробном сообществе. Возрастает число микроорганизмов, которые используют механизм анаэробного дыхания, связанного с деструкцией углеводов (Толпешта и др., 2015), а в средах с ограничением молекулярного кислорода, микроорганизмы приобретают возможность пользоваться в условиях отсутствия кислорода альтернативными соединениями, принимающими электроны в ходе окислительно-восстановительной реакции. У микроорганизмов, которые проявляют устойчивость по отношению к загрязнению нефтепродуктами их среды обитания, от их адаптаций на физиологическом уровне и

существующих окислительно-восстановительных условий, могут быть переменными конечные акцепторы электронов (Madigan et al., 2006).

Торфяные почвы, которые подверглись загрязнению углеводородами нефти, содержат низкие концентрации кислорода, данное явление затрудняет применение методов ремедиации биопрепаратами, содержащими микроорганизмы-аэробы, которые обладают способностью разрушать углеводороды нефти (Lin et al., 2016). Стимулирование роста аборигенных аэробов и анаэробов, которые осуществляют сульфат- и нитратредукцию, является максимально эффективным способом уменьшения влияния нефтезагрязнений на почву. В условиях как лабораторных, так и полевых экспериментов показано, что при ремедиации загрязненных нефтью почв путем добавления NPK совместно с известью, что является стимулятором роста микроорганизмов-анаэробов, таким способом количество углеводородов в почве снижается на 54 % за несколько месяцев (Эркенова и др., 2016).

В стандартной практике процессы, подобные определению скорости дыхания микроорганизмов в условиях отсутствия кислорода выполнялись сложными методами, такими как метод меченых радиоактивных изотопов или выполнение измерений по снижению концентраций использованных субстратов. К сожалению, данный методологический подход является достаточно трудоемким, так как требует сложных дополнительных манипуляций для получения результатов. В связи с этим для понимания места, которое занимают микроорганизмы в разложении нефтепродуктов, крайне важно проводить исследования, в которых прямыми методами оценивают структуру и метаболическую активность *in situ* (Murphy et al., 1998). Поэтому, благодаря достижениям молекулярной биологии, теперь для исследования данных процессов применяются методы секвенса продуктов ПЦР (полимеразной цепной реакции) с обратной транскрипцией, а также

количественная ПЦР (Real-time PCR) для функциональных генов (Akob et al., 2008, 2012).

Для приспособления к изменчивым условиям окружающей среды микроорганизмы осуществляют процессы трансформации из-за наличия в них генов адаптации (Farmer et al, 2003). Чаще всего гены подобного рода встречаются у домена *Bacteria*, однако не все представители способны к такому, но, это нивелируется расположением данных генов непосредственно на небольших молекулах ДНК, обособленных от хромосом, запуская процесс ГПГ (горизонтального переноса генов) между разными по филогении группами (Schneiker et al, 2006). Именно поэтому применение на практике генов, ответственных за адаптацию, в роли маркеров филогении не представляется возможным. Поэтому крайне важно изучать пути, по которым бактериальная клетка может разрушать нефтяные фракции, особенно группу ароматических углеводов, так как она является самой токсичной для живых организмов. При этом вышеупомянутая фракция обладает возможностью включения в метаболизм тех бактерий, которые способны к окислению нефти (Пунтус и др., 2008).

В бескислородных условиях процесс окисления алканов начинается карбоксилированием, в ходе него образуются жирные кислоты или альдегиды (Spormann et al., 2000; Ezeji et al., 2007; Callaghan et al., 2012; Aburto-Medina et al., 2015; Wilkes et al., 2016). На первых стадиях деградации углеводов ароматического ряда и алканов активируется группа метила из-за присоединения к алкильному углероду фумаровой кислоты (Biegert et al., 1996). Вследствие значительного количества реакций ферментации органические вещества попадают в цикл трикарбоновых кислот (рисунок 1). Фумаровая кислота, при присоединении к углеводороду ароматического ряда, образует в качестве промежуточных продуктов нафтил-, алкил- и бензил-сукцинаты. Однако, чтобы вышеупомянутые процессы происходили, необходимо присутствие нужных для этого ферментов. Опероны *assA*, *bssA* и

nmsA, способны представлять собой необходимые для обнаружения процесса деструкции углеводородов маркеры (при микробиологической деструкции углеводородов нефти) (Acosta-Gonzalez et al., 2013).

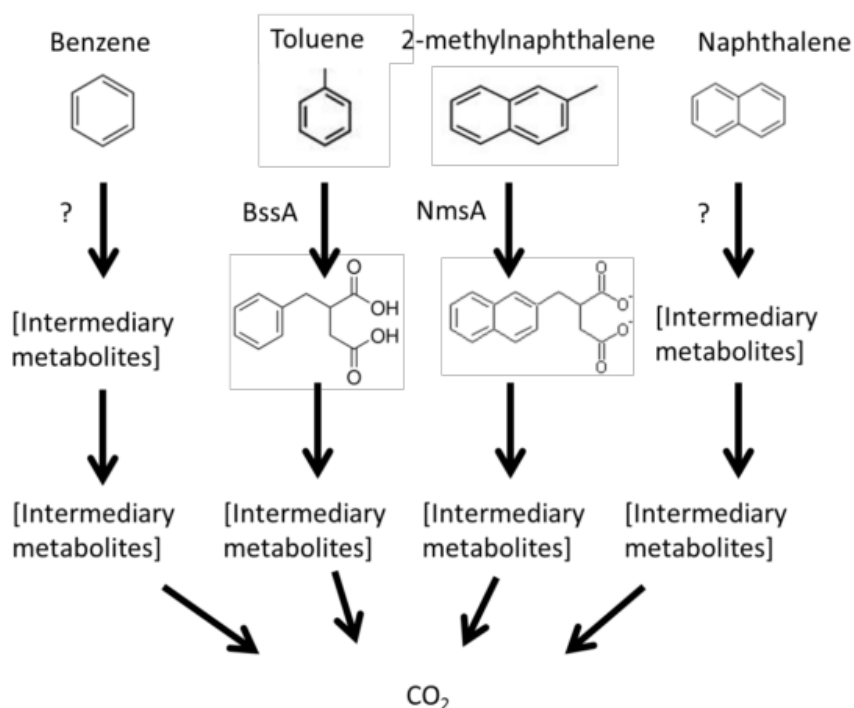


Рисунок 1 – Возможные пути деструкции алканов, моно- и полициклических углеводородов ароматического ряда в анаэробных условиях (Perry, 2014)

Можно сделать вывод, что бензол в условиях отсутствия кислорода, разрушается микробиотой почв с дальнейшим метилированием в толуол по пути гена *bssA* с целью последующего катаболизма, что свидетельствует о том, что данный ген можно использовать в качестве биомаркера, с помощью которого определяется процесс деструкции углеводородов в бескислородных условиях. RTPCR является отличным методом для количественного определения функциональных генов. Определение корреляции активности биодegradации и уровня экспрессии генов является доступным методом

молекулярной биологии для биоремедиационного контроля (Akob et al., 2008; Chin et al., 2008; Pereyra et al., 2010; Akob et al., 2012).

Фермент алкан-монооксигеназа (*alkB*) обладает способностью окисления до спиртов метильных фрагментов цепи углеводородов. По количеству, в котором присутствует ген *alkB*, достаточно трудно проследить взаимосвязь со степенью деградации углеводородов нефти – это связано с тем, что разнообразие данного гена достаточно велико (Whyte et al., 1996; Paisse et al., 2011).

Многие углеводороды в первую очередь расщепляются бактериями до катехола или прокатеховой кислоты. Одним из возможных вариантов подобного расщепления является мета-расщепление (ароматическое кольцо расщепляется между гидроксированными и негидроксированными атомами углерода) (Коршунова, 2014). В подобном расщеплении участвует фермент катехол-2,3-диоксигеназа, который кодируется соответствующими генами: *xylE*, *nahH* (Narayana et al., 1989), и *dmpB* (Bartilson et al., 1989).

Вышеупомянутые гены кодируют семейство экстрадиольных ферментов, к которому относится фермент 1,2-гидроксинафталиндиоксигеназа, являющийся продуктом гена *nahC* из оперона *nah* плазмиды *pNAH7* (Chatterjee et al., 1983). Нафталин – диоксигеназа (*nahAc*) является ферментом, ответственным за превращение нафталина в салицилат. Продукты расщепления которого в дальнейшем вовлекаются в цикл Кребса. Гены *nah* широко изучены в плаزمидях из *Pseudomonas putida*, по нуклеотидным последовательностям гены семейства *nah* сходны с генами семейства *xyl*. Конкретно ген *nahAc* кодирует α – субъединицу нафталин – диоксигеназы.

1.7 Средства по борьбе с загрязнением нефтью компонентов окружающей среды

В почвах, загрязненных нефтью, начинают интенсивно трансформироваться почвенно-геохимические процессы, что приводит к гудронизации, отакыриванию и засолению (Солнцева и др., 1985; Оборин и др., 1988; Солнцева, 1998), поэтому одной из наиболее важных задач, стоящих перед учеными, является изыскание вариантов решения проблем, связанных с нефтезагрязнением. Мероприятия, которые направлены на возвращение урожайности, увеличение сельскохозяйственной значимости земель, подвергшихся загрязнению, называются рекультивацией (Голованов и др., 2009). Основной задачей данных мероприятий является снижение уровня наличия загрязняющих веществ до нормальных значений и возвращение исходных свойств земель (Реймерс, 1990; Шумилова и др., 1999; Бондаренко и др., 2013). В случае использования методики *ex situ* подразумевается перемещение почвы с участка, на котором она отбиралась, в лаборатории или на рабочие площадки – это дает возможность применить наиболее эффективные, но при этом и сложные приемы обработки, но, к сожалению, такие методы подходят лишь для небольших площадок, к тому же это приводит к изменениям в морфологической структуре участков и нарушает течение грунтовых вод. В связи с этим более благоприятным считается использование методов *IN SITU*. Далее будут рассмотрены все возможные методы.

1.7.1 Механические методы

Данный тип очистки подразумевает сбор нефти с помощью специализированных механизмов или вручную. Сначала производится локализация нефти с помощью создания земляного вала (примерно 1 м высотой) бульдозером, а затем в большинстве случаев оборудуют так называемый «котлован-отстойник», усиленный пленкой, непроницаемой для нефти. Впоследствии обустроивается ниже уровня разлива котлован, куда

перекачивают нефть, откуда она отправляется на дальнейшую переработку либо на товарный склад. Механической очисткой убирается 80 % нефти (Булатов и др., 1999). Согласно Сидорову (1983), чаще всего для дальнейшего отделения нефти от загрязнений используют центрифуги. В итоге с помощью данного метода легко осуществляется сбор нефтезагрязненных объектов, но полностью от проблемы загрязнения они не избавляют – очистка и утилизация должна осуществляться дополнительно.

1.7.2 Физико-химические методы

К данному типу методов относятся такие, как диспергирование, гелеобразование и сорбция. Они применяются либо в качестве отдельных методов, либо идут в совокупности с другими методами очистки (к примеру, механическими). Наиболее часто используемыми являются сорбционные методы, где роль сорбента играют природные или синтетические материалы органической либо неорганической этимологии. Этот пул методов весьма перспективен из-за своей простоты, эко безопасности и дальнейшей беспроблемной утилизации продуктов нефти. Множество веществ могут играть роль сорбентов нефти, например, солома, песок, активированный уголь, кокс, многие отходы текстильной промышленности и др. Максимально эффективными являются материалы многоазового использования с открыто пористой структурой. Ими являются сорбенты, в основе которых карбомидный олигомер, вспененный и трансформированный в поропласт, который обладает прекрасными олеофильными свойствами за счет высокоразвитой межфазной поверхности. Всего 1 г подобного вещества может поглотить 60 г нефти, скорость поглощения от пары мин и до нескольких часов. Для утилизации впитанного сорбентом нефтепродукта происходит его отжим. Известно, что сорбент способен впитать в себя до 97% загрязнителя (Цуцаева и др., 1991, А.с. 1749340 РФ, МКИ А-1 Е 01 Н 12/00, 1992).

Достаточно часто используются модифицированные перлит, цеолит и вермикулит, которые рекомендуются для очищения поверхностей вод от нефтезагрязнения.

Углеводороды нефти успешно удерживаются одним из типов пор синтетических полимерных сорбентов, а другой тип пор придает частицам неплохую плавучесть, также обладая способностью удалять значительное количество углеводородов путем впитывания, при этом не впитывая воду. К таким веществам относятся смолы и газонаполненные пластмассы (Пат. 2041172). Собиратели, созданные на основе ПАВ, облегчают удаление нефтепродуктов с поверхности водоемов, концентрируя и сдерживая на минимальных площадях нефтяную пленку методом увеличения ее толщины, а иногда ее собирают путем нанесения (напыления) порошкообразного песка, диаметром 0,01–0,5 мм либо шлаковой пемзы (0,05–0,5 мм диаметром) (Пат. 2041172, Пат. А.с.815019).

Самым выгодным методом физико-химической очистки (также и более распространённым) является обычное сжигание, но данный способ вреден и малоэффективен, оно возможно только если нефть лежит крайне густым слоем на поверхности почвы, к тому же на месте сжигания не восстанавливается плодородность почв и остаются множества токсичных веществ, чаще всего канцерогенных (Гриценко, 1997). Использование же специализированных установок для пиролиза оказалось неоправданно дорого и низкоэффективно, так как для этого требуются обширные подготовительные работы, нарушающие природный ландшафт, а после обработки в очищенной почве остаются полициклические ароматические углеводороды, являющиеся источником канцерогенов (Пиковский и др., 1981)

Многие исследователи, когда речь заходит о восстановлении загрязненных нефтепродуктами экологических систем почв, в своих работах указывают на все недостатки стандартных методов ремедиации почвы, так

как на окружающую среду данные методы и приемы оказывают негативное воздействие (Сорокин и др., 1997; Гуславский и др., 2011). Например, деструкция углеводов снижает темпы при землевании, а непосредственно вывоз почвы, загрязненной нефтью с места разлива требует дальнейшей утилизации, тем самым создавая новые места загрязнений. Известно, что термическое разложение нефтепродуктов только увеличивает время возвращения почв к исходному состоянию после загрязнения, образуются полициклические ароматические углеводороды, которые в свою очередь увеличивают токсичность почв и тормозят обновление всех составляющих экосистемы (Сорокин и др., 1997).

К настоящему моменту не существует научного обоснования рекультивации нефтезагрязненных почв, в связи с чем ликвидация последствий разливов нефти чаще всего проводится устаревшими и зачастую неприемлемыми методами – пиролизом, землеванием песком, переносом в отвалы. Для достижения наилучшего эффекта необходимо четко знать законы трансформации загрязненных экосистем и веществ-загрязнителей, а также прогнозировать их трансформации во времени. Стратегия всегда должна зависеть не от экономической выгоды, а от непосредственно количества загрязнителя, попавшего на почву, от ее зонального и ландшафтного расположения и от всех доступных средств для решения данной проблемы.

1.7.3. Биологические методы

Функциональная активность комплекса микроорганизмов в почвах играет основную роль в разложении нефти и нефтепродуктов, обеспечивая их полную минерализацию до воды и газа, поэтому сам процесс разложения нефти стоит назвать биогеохимическим (Song et al., 1990; Balba et al., 1998; Lifshits et al., 2017; Das et al., 2018; Quintella et al., 2019). Биологическое очищение и восстановление экосистемы после нефтезагрязнения по мнению Пиковского Ю.И. и Исмаилова Н. М. определяется как процесс стадийной

трансформации загрязняющих веществ, сопряженный с восстановлением биоценоза. Вариабельной является длительность различных стадий – она зависит от природно-климатической зоны и условий окружающей среды (Atlas et al., 1987). Исследователями Института экологии и генетики УрО РАН было описано три основных этапа биоочистки нефтезагрязненных земель (Исмаилов и др., 1988):

1 этап – длительность. 1–1,5 года. В нефти происходят большей частью физико-химические превращения. Нефтяные углеводороды распределяются по профилю почвы, испаряются, вымываются, изменяются под действием УФ. По данным микробиологических исследований, почвенная микробиота в это время находится в подавленном состоянии, микроорганизмы пытаются адаптироваться к изменениям условий, но по прошествии 3 месяцев начинают доминировать процессы при том, что на долю непосредственно окисления химическим путем приходится 50 % от всех идущих процессов окисления (Исмаилов и др., 1988).

2 этап – длительностью от 3 до 4 лет. От начального уровня доля остаточной нефти понижается до 8–10 %, возрастает количество углеводородов метанофтенной фракции, а доля нафтеноароматических смол и углеводородов значительно снижается. Это может быть связано с микробиологической деструкцией сложносоставных молекул смолисто-асфальтенового ряда и образованием новых алифатических соединений. По данным исследований отмечается резкий рост численности микроорганизмов. На втором этапе сильно увеличивается количество спорообразующих и неспоровых бактерий и грибов, чьим источником питания являются ароматические и метанофтенные углеводороды, а активность микробиоты стимулирует удлинение цепи алканов (Колесникова и др., 1988; Song et al., 1990; Логинов и др., 2009; Sikkema et al., 2018).

3 этап – отсчитывается с момента исчезновения ациклических углеводородов ряда метана, которые образуются в процессе разрушения

более сложных соединений. Предполагалось, что микроорганизмы, способные к разложению углеводов, обитают только на территориях нефтепромысла, нефтехранилищ или нефтепроводов, но, исходя из современных данных, нефтедеструкторы повсеместно распространены в природе и выделяются практически из любой почвы, речной или морской воды или осадочных пород (Atlas et al., 1987; Колесникова и др., 1988; Song et al., 1990).

Практически все микроорганизмы-нефтедеструкторы – аэробы, т. е. им необходимо наличие кислорода для минерализации углеводов нефти, а само окисление осуществляется ферментами-оксигеназами. Спирты, жирные кислоты, альдегиды – все это промежуточные продукты распада углеводорода, в дальнейшем распадающиеся на CO_2 и H_2O (Atlas et al., 1987). Также микроорганизмами-гетеротрофами усваиваются углеводы, жиры, белки и прочие органические соединения. Определяющими факторами численности микроорганизмов, которые способны разлагать нефтепродукты, являются грунтовые воды, климат и исходные характеристики почвы (Atlas et al., 1987; Колесникова и др., 1988; Song et al., 1990). Грибы, бактерии и водоросли являются важными участниками процесса деструкции нефти (Onuoha et al., 2003; Obire et al., 2009; Al-Jawhari, 2014, 2015; Mohsenzadeh et al., 2016). Например, на рост плесневых грибов нефть в небольших дозах не оказывает особого влияния, при этом большие концентрации углеводов лишь провоцируют увеличение численности таких грибов. «Способность окислять углеводороды нефти обнаружена у многочисленных видов бактерий и грибов, принадлежащих к следующим родам: бактерии – *Acinetobacter*, *Acremonium*, *Arthrobacter*, *Acaligenes*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bacterium*, *Brevibacterium*, *Beijerinckia*, *Burholderia*, *Citrobacter*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Holobacterium*, *Gliocladium*, *Gluconobacter*, *Gordona*, *Klebsiella*, *Leucothrix*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Proteus*, *Pseudomonas*,

Rhodococcus, Streptomyces, Serratia, Spirillum, Sphaerotilus, Xanthomonas; грибы – *Aspergillus, Aureobasidium, Debaryomyces, Candida, Metcshnikova, Penicillium, Trichoderma, Gliocladium, Rhodotorula, Torulopsis, Trichosporon, Cryptococcus, Sporobolomyces* и некоторые другие» (Киреева и др., 1985).

1.8 Почвенная метагеномика: сущность метода и место в научном знании

Наиболее значимым прорывом в микробиологии на рубеже XX–XXI веков стала возможность исследовать микробные сообщества во всем их природном многообразии (Daniel et al., 2005; Singh et al., 2009; Mocali et al., 2010). Этому способствовало мощное развитие технологий, в первую очередь методов высокопроизводительного секвенирования, которые позволили работать с большими объемами генетической информации. И если раньше мы могли только констатировать факт наличия в природных средах так называемых некультивируемых форм микроорганизмов, то с появлением новых инструментов анализа мы можем в полной мере приступить к изучению их биологических свойств.

На первом этапе метагеномные исследования столкнулись с целым рядом проблем, большая часть которых пока носит сугубо методологический характер, в частности разработка стратегии отбора образцов, выбор эффективной методики выделения ДНК, конструирование универсальных праймеров, повышение производительности современных секвенаторов, оптимизация биоинформационных алгоритмов анализа и хранения данных. Данное направление в микробиологии развивается уже более 20 лет, однако до нынешнего момента времени не было предложено однозначного решения для обозначенных выше проблем и на это непосредственно влияет крайне сложная организация самого объекта исследования (He et al., 2013; Nesme et al., 2016; Vestergaard et al., 2017).

Термин "метагеномика" впервые был использован Джо Хэнделсмен, Джоном Кларди, Робертом М. Гудменом. В 1998 году появилась первая публикация по данной теме. На первых порах термин «метагеномика» употреблялся в значении приведения определенной среды к единому организму, считалось, что это будет являться прекрасным объектом для того, чтобы полностью воссоздать функциональные свойства всей системы. Затем, с течением времени, стало понятно, что осуществить подобное невозможно, так как для анализа 1 грамма почвы с целью изучения всех геномов прокариотного сообщества, потребовалось бы секвенирование неисчислимого количества нуклеотидных пар (Vogel et al., 2009). К данному моменту термин приобрел несколько иное значение, теперь метагеномику следует воспринимать, как обозначение любого исследования, в процессе которого требуется секвенирование.

Точно определить значение термина «метагеномика» достаточно сложно. Как правило, под метагеномикой подразумевается переменный набор методов молекулярной биологии, которые используются для сбора информации о генетической структуре микробиома напрямую из окружающей нас среды (Jansson et al., 2018; Suyal et al., 2019; Kaushik et al., 2020). Получаемая в результате совокупная генетическая информация называется метагеномом — «коллективным» геномом микробного сообщества. Предметом изучения метагеномики, таким образом, является пул (т. е. тотальная совокупность) ДНК, которая (в отличие от РНК) несет информацию не только об актуальных биогенных процессах в изучаемой системе, но и обо всем генетическом разнообразии микробного сообщества (Vieites et al., 2010). Если мы определяем метагеном как всю генетическую информацию, присутствующую, например, в 1 грамме почвы, то, согласно различным оценкам, она будет составлять порядка 10^{14} - 10^{16} пар нуклеотидов (Vogel et al., 2009; Trevors et al., 2010; Hirsch et al., 2010). Секвенирование такого объема ДНК представляет собой крайне сложную, скорее даже

невыполнимую задачу. Это приводит нас к неутешительным выводам о том, что анализ полного метагенома почвы на настоящий момент невозможен (Baveye, 2009; Tringe et al., 2009). Очевидно, что требуется более узкое понимание термина «метагеном», описывающее ту часть генетической информации, с которой работает современная метагеномика.

Очевидно, что требуется более узкое понимание термина «метагеном», описывающее ту часть генетической информации, с которой работает современная метагеномика.

Подходящим является определение метагенома как комплексной системы, состоящей по крайней мере из четырех групп носителей генетической информации: ДНК живых активных клеток, ДНК покоящихся форм, ДНК мертвых клеток и внеклеточная ДНК. Эти генетические «резервуары» существуют в динамическом равновесии. Необходимо отметить, что было бы неправильно ограничиваться лишь живыми, функционирующими микроорганизмами. Отдавая должное важности исследований метаболически активных микроорганизмов в почве, нельзя недооценивать значение «неактивной» почвенной ДНК. Почва является наиболее населенной средой обитания на Земле, но в то же время из-за высокой изменчивости экологических условий, свойственной этой среде, большинство микроорганизмов представлены в почве в различных покоящихся формах (так называемый «пул почвенных микроорганизмов»). По аналогии с «пулом микроорганизмов», внеклеточная ДНК, ДНК мертвых микроорганизмов и вирусов может рассматриваться в качестве «пула генов», который может быть использован живыми клетками микроорганизмов в процессах генетической трансформации и трансдукции. Исследования генетической трансформации и других процессов, участвующих в горизонтальном переносе генов, могут пролить свет на особенности межвидовых взаимодействий в микробном сообществе и приспособительные способности почвенных микроорганизмов в изменчивых экологических

условиях (адаптивный потенциал микробного сообщества). Современные методы позволяют нам не только изучать актуальное разнообразие почвенных микроорганизмов, но также оценивать скрытый в почве микробиологический и генетический потенциал, который делает ее интегрированной, непрерывно развивающейся системой. На сегодняшний день мы можем только предполагать механизмы интеграции почвенных микроорганизмов и их ДНК в почвенном метагеноме, так как наши знания о связи микробного сообщества с каждым из источников почвенной ДНК все еще крайне неполны.

Сложности в изучении этих основных источников ДНК в почве тесно связаны с методическими проблемами, возникающими в ходе экстракции нуклеиновых кислот. В отличие от других сред, например, водных местообитаний, выделение общей, а тем более относящейся к разным компонентам, ДНК из почвы встречает ряд трудностей, преимущественно связанных с сильной адсорбцией клеток и ДНК на поверхности твердой фазы почв (Bakken et al., 2006; Nielsen et al., 2006; Saeki et al., 2010). По этой причине с начала 1980-х годов было предложено и испытано множество различных методов экстракции ДНК (Bürgmann et al., 2003, 2004; Martin-Laurent et al., 2001; Robe et al., 2003; Sagova-Mareckova et al., 2008). Основная дилемма в выборе метода экстракции заключается в неспособности «мягких» методов выделить достаточно репрезентативную часть ДНК из почвы и в недостаточной специфичности (вместе с деградацией ДНК) «грубых» методов (Bakken et al., 2006). Таким образом, на данный момент мы все еще не располагаем подходящим методом разделения живых или мертвых клеток и покоящихся форм. Причиной этого отчасти является то, что количество и качество выделяемой ДНК для исследователей становится важнее биологического смысла ее исследования: высокая степень экстракции ДНК сама по себе не лучше, чем низкая, так как самый важный вопрос — что это за ДНК и к чему она относится. Неплохую теоретическую базу для

разрешения этого вопроса создают исследования физических и химических факторов, связанных с устойчивостью рассмотренных источников ДНК в почве. С этой точки зрения достаточно оптимистичной представляется ситуация с изучением внеклеточной ДНК.

Глава II. Объекты и методы исследования

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования выступали прокариотные сообщества почв различных климатических зон (чернозем, каштановая, серая лесная, дерново-подзолистая, торфяная), загрязненных нефтью или полициклическими ароматическими углеводородами (ПАУ). В качестве контроля рассматривались незагрязненные образцы. Некоторые их характеристики представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Исследуемые почвы

Название почвы	Название по WRB	Содержание гумуса, %	pHводн.	Глубина отбора, см	Место отбора
Чернозем типичный среднесуглинистый на лессовидных суглинках	Voronic Chernozems	8	7,5	10	Волгоградская область (модельный эксперимент) Волгоградская область (загрязнение нефтью в течение 7 лет)
Серая лесная (обычная) маломощная среднесуглинистая на покровных суглинках	Haplic Luvisols (Abruptic)	5	6,9	15	Тульская область (модельный эксперимент)
Каштановая среднесуглинистая на лессовидных суглинках	Haplic Arenic Kashtanozem	4,18	7,5	12	Волгоградская область (модельный эксперимент)
Дерново-подзолистая глеевая сверхглубокоосветленная	Umbric Luvisol	2,9	5,3	5-10	Московская область (почва на территории завода, загрязненная ПАУ)
Торфяная олиготрофная	Fluvic Histosol	5,36	4,1	0-10	Сибирь, Ханты-Мансийский район (почва под скважиной)

Исследовались почвы, загрязненные как в природных экосистемах (на месте разлива нефти), так и в модельных опытах. При проведении модельных экспериментов почвенные образцы увлажняли водой до 60% от массы почвы и поддерживали ее в течении всего эксперимента, в опытные образцы нефть добавляли в количестве, превышающем показатели сильнозагрязненных почв (20% от массы почвы). Модельные эксперименты проводили в течение 1 месяца. Ниже представлены некоторые характеристики вносимой нефти (таблицы 4, 5) и содержание ПАУ в образцах (таблица 6).

Таблица 4 – Характеристика нефти

<i>Нефть</i>	<i>Нефтегазоносный бассейн</i>	<i>Месторождение</i>	<i>Глубина отбора, м</i>	<i>Плотность, г/см³</i>	<i>Вязкость (условная и кинематическая) при 200°С, мм²/с</i>
Кубанская	Азово-Кубанский	Кубанская площадь	2800–2832	0,835	1,5 4,9

Таблица 5 – Химические свойства нефти

<i>Класс соединения</i>	<i>Соединение</i>	<i>Формула</i>	<i>Молекулярный вес</i>
Парафины	н-Гексаны	C ₆ H ₁₄	87,186
	2-метилпентан	C ₆ H ₁₄	87,186
	н-гептан	C ₇ H ₁₆	100,205
Нафтены	Циклогексан	C ₆ H ₁₂	84,162
	Метилциклогексан	C ₇ H ₁₄	98,189
Ароматические соединения	Бензол	C ₆ H ₆	78,114
	Толуол	C ₇ H ₈	92,141

Таблица 6 – Содержание ПАУ в исследуемых образцах дерново-подзолистой почвы

<i>Место отбора образца</i>	<i>Фенантрен, нг/г почвы</i>	<i>Хризен, нг/г почвы</i>	<i>Антрацен, нг/г почвы</i>	<i>Бенз(а)пирен, нг/г почвы</i>	<i>Содержание ПАУ в почве, нг/г</i>	<i>Сорг, %</i>
Луг, 0,3 км от завода	19289,5	1937,5	1033,0	514,6	26818,1	4,6
Лес, 0,3 км от завода	9416,9	6344,0	677,1	1518,7	29128,3	10,8
Лес, контроль, 12 км от завода	133,7	40,9	14,5	2,0	443,1	3,3
Пашня, контроль, 12 км от завода	44,1	4,6	0,0	0,1	74,3	2,9

2.2 Методы исследования

2.2.1 Метод люминесцентной микроскопии (с использованием флуорохромов: акридин оранжевый, СуЗ)

С помощью флуорохрома – акридина оранжевого в почве определяется общая численность прокариотных микроорганизмов. Акридин оранжевый (в сухом виде) разводится в воде (1 к 10000), в это время на стекла наносится заранее подготовленная почвенная суспензия, разведенная в соотношении 1 к 100, и предварительно обработанная ультразвуком, фиксируемая в дальнейшем над пламенем спиртовой горелки. Следом производится окраска стекол с полностью обработанной суспензией. Сначала стекла 3 мин лежат в растворе используемого флуорохрома, после этого дважды по 5 мин. В отстоявшейся воде.

Следующим этапом является подсчет микроорганизмов под люминесцентным микроскопом (в данной работе проводился на микроскопе ZEISS Microscope Axioskop 2 plus (Германия) со светофильтром Filterset 09 (λ 450-490 нм)). Для определения в 1 грамме почвы количества клеток используют следующую формулу:

$$N = \frac{4an \cdot 10^{10}}{s};$$

где N – количество клеток в грамме почвы, a – среднее количество клеток в поле зрения микроскопа, 4×10^{10} – площадь фиксируемого препарата, n – показатель разведения (Зенова и др., 2002).

Удельную массу микроорганизмов принимали равной 1 г/см³, а содержание воды в клетках – 80 %. Сухая биомасса одноклеточных бактерий и актиномицетов вычислялась путем умножения общей численности на средние значения массы клетки или участка мицелия. Средняя масса бактериальной клетки принималась равной 2×10^{14} г, масса участка мицелия актиномицетов длиной 1 м при диаметре 0,5 мкм – $3,9 \times 10^8$ г (Манучарова и др., 2020).

Метод FISH (метод *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами) широко используется в современных исследованиях: в медицине, экологии, почвоведении. Его основным преимуществом является возможность учета живых метаболически активных клеток. В отличие от остальных красителей происходит окрашивание молекул рРНК, что позволяет сделать выводы не только о жизнеспособности микроорганизмов, но и исследовать микробное разнообразие *in situ* (Манучарова и др., 2020).

Для выявления и идентификации сообщества прокариот изучаемых почв, были применены зонды, являющиеся специфичными для *Eubacteria* и *Archaea*. На первом этапе подготовленную в соотношении 1:10 почвенную суспензию подвергают обработке ультразвуком, затем с помощью центрифугирования (при 2000 оборотов, 10 минут) происходит разделение

частиц почвы и клеток микроорганизмов, образовавшийся супернатант отделяется от осадка, осадок удаляют. Далее супернатант снова подвергают центрифугированию (10000 оборотов, 5 мин) и образовавшийся осадок заливается стерильной водой до достижения 2 миллилитрового объема.

В качестве фиксатора использовался формальдегид. Предварительно полученный осадок ресуспензировался в смеси этанола и фосфатного буфера (0,5 мл) PBS (NaCl – 8 г, KCl - 0.2 г, Na₂HPO₄ - 1.44 г, NaH₂PO₄ - 0.2 г, H₂O - 1 л, pH 7.0), затем вносилось полтора миллилитра четырехпроцентного раствора формальдегида и инкубируется в течение полутора часов на качалке в условиях комнатной температуры. Материал, прошедший стадию фиксации, собирается центрифугированием (10000 оборотов, 5 мин), дважды промывается фосфатным буфером и ресуспензируется в смеси этанола и фосфатного буфера. Хранение производится до востребования в морозильной камере при температуре равной минус 20 °С.

Для проведения анализа 1 микролитр суспензии наносится на предметное стекло, используемое для гибридизации, с окошками, пространство между которыми покрывается тефлоном. После нанесения на стекло исследуемого препарата его обрабатывают в растворах этанола с постепенным увеличением его концентрации в последовательности 50 % раствор, 80 % раствор и, в конечном счете, 96 % раствор. Для гибридизации используют набор ранее разработанных зондов, которые являются детекторами бактерий и архей. Зонды, меченные красителем Cy 3 были синтезированы компанией Синтол (Москва, Россия). В соответствии с методикой проводится гибридизация препаратов при температурном режиме равном 46 °С. Описание используемых концентраций и условий гибридизации приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Буферы, используемые для гибридизации

	Формамид, мкл	H ₂ O, мкл	5M NaCl, мкл	1M, Tris HCl, мкл	10% SDS, мкл
Bacteria mix	200	600	180	20	1
Archaea	300	500	180	20	1
<i>Alphaproteobacteria</i>	200	600	180	20	1
<i>Betaproteobacteria</i>	350	450	180	20	1
<i>Gamma</i> proteobacteria	350	450	180	20	1
<i>Deltaproteobacteria</i>	200	600	180	20	1
<i>Bacteroidetes</i>	350	450	180	20	1
<i>Planctomycetes</i>	300	500	180	20	1
<i>Actinobacteria</i>	250	550	180	20	1
<i>Firmicutes</i>	350	450	180	20	1
<i>Acidobacteria</i>	100	700	180	20	1
<i>Verrucomicrobia</i>	100	700	180	20	1

Состав буфера, используемого для гибридизации, напрямую зависит от выбранного зонда. Флакон объемом 50 мл с буфером, нанесенным на фильтровальную бумагу, в объеме 850 мкл, герметично закрывают и ставят в термостат, прогретый до 46 градусов на полчаса. Остатки буфера, объемом 150 мкл, ставят на водяную баню при 49 °С. В то же время предметное стекло помещается во флакон с бумагой для фильтрования и в течение 15(20) мин инкубируется в термостате. Затем на стекло наносят буфер, снятый с водяной бани, по 10 мкл на каждое окошко и зонд, после чего возвращают в термостат и оставляют на 60–120 мин.

Как и состав буфера для гибридизации, буфер, используемый для промывки также напрямую зависит от выбранной зоны (таблица 8). Буфер готовится в 50 мл флаконе, доводится до заполнения дистиллятом, затем отправляется в прогретый до 46 градусов термостат. Далее необходимо смыть буфер для гибридизации с предметного стекла, инкубировавшегося до этого в термостате, с помощью выбранного буфера для промывки – во флакон с промывочным буфером вносят предметное стекло и в течение 20 мин инкубируют при 49 градусах на водяной бане, затем споласкивают дистиллятом и сушат на воздухе.

Таблица 8 – Используемые для промывки буферы

	0,5M Na-EDTA pH8 мкл	5M NaCl, мл	1M, Tris HCl, мкл	10% SDS, мкл
Bacteria mix	500	2,15	1	50
Archaea	500	1,02	1	50
<i>Alphaproteobacteria</i>	500	2,15	1	50
<i>Betaproteobacteria</i>	500	0,7	1	50
<i>Gammaproteobacteria</i>	500	0,7	1	50
<i>Deltaproteobacteria</i>	500	2,15	1	50
<i>Bacteroidetes</i>	500	0,7	1	50
<i>Planctomycetes</i>	500	1,02	1	50
<i>Actinobacteria</i>	500	1,49	1	50
<i>Firmicutes</i>	500	0,7	1	50
<i>Acidobacteria</i>	500	4,4	1	50
<i>Verrucomicrobia</i>	500	4,4	1	50

Полученные препараты необходимо хранить в емкостях, без доступа солнечного света, чтобы избежать выцветания красителя. Анализ препаратов проводится на люминесцентном микроскопе. Учет численности целевых

групп определяется с помощью учета клеток, гибридизированных с зондами в тридцати двух полях зрения в каждой ячейке, затем пересчитывается на 1 грамм почвы по формуле:

$$N = \frac{a * 0,28 * 10^{13}}{P}$$

где N – число клеток (длина мицелия, мкм) на 1 г почвы, а – среднее количество бактериальных клеток в 32-х полях зрения, p – поле зрения микроскопа, равное в данном случае 39740,625 (мкм²) (Манучарова и др., 2020).

2.2.2 Определение численности и биомассы метаболически активных представителей прокариот, содержащих функциональный ген алкан-монооксигеназы (метод FISH)

Метод *in situ*-гибридизации с рРНК-специфичными флуоресцентно-мечеными олигонуклеотидными зондами (FISH - fluorescent *in situ* hybridization) был использован для определения экспрессии функционального гена алкан-монооксигеназы (*alkB*), отвечающего за деструкцию н-алканов в исследуемых образцах (Kok et al., 1989; Whyte et al., 1996; Whyte et al., 2002). Праймер был разработан в соответствии с последовательностью генов *alkB* *Pseudomonas* AJ233397. Целевая область усиления составляет 870 базовых пар.

Условия гибридизации, использованные для зондов *alkB*, концентрация формамида в гибридизационном буфере и концентрация NaCl в буфере для промывки приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Примененные в настоящем исследовании рРНК-специфичные олигонуклеотидные зонды

Зонд	Нуклеотидная последовательность зонда (5'-3')	Формаид, % ^а	NaCl, мМ ^б
alkB(F)	Cy3-tgg-ccg-gct-act-ccg-atg-atc-gga-atc-tgg	50	500
alkB(R)	Cy3-cgc-gtg-gtg-atc-cga-gtg-ccg-ctg-aag-gtg		

а - концентрация формамида в гибридизационном буфере

б - концентрация NaCl в буфере для промывки

2.2.3 Выделение из почвы тотальной ДНК

С помощью коммерческого набора FastDNA Soil Isolation Kit (MPBio, США) было произведено выделение тотальной ДНК из почвенных образцов. Выделение проводилось строго по рекомендациям производителя. Почвенный образец брали в объеме 0,5 г и последовательно добавляли в него растворы, в соответствии с регламентом. Полученная очищенная тотальная ДНК соответствует объемам от 50 до 100 мкл и полностью готова для дальнейших манипуляций. Проверка качества проводилась на градиентном гель-электрофорезе, который окрашивался бромистым этидием.

2.2.4 RTPCR 16Sp-РНК

Оценка количества копий генов архей и бактерий в почвенных образцах проводилась с использованием RTPCR на приборе для амплификации CFX96 (Bio-Rad, США).

Реакционную смесь готовили из препарата EvaGreen Supermix компании Bio-Rad (концентрированный буфер с дезоксирибонуклеотидами, полимеразой Sso7d-fusion, MgCl₂, красителем EvaGreen и стабилизаторами). Проводили калибровку зависимости интенсивности флуоресценции от

логарифма концентрации ДНК стандартных растворов, по которой определяли концентрацию ДНК образцов с помощью программного обеспечения CFX Manager. В качестве контроля для бактерий использовали 56 растворы клонированных фрагментов рибосомального оперона *Esherichia coli*, для архей – штамма FG-07 *Halobacterium salinarum*. Были использованы следующие праймеры: Eub338/Eub518 – для бактерий (Lane, 1991; Sei et al., 2003), arc915f/arc1059r – для архей (Yu et al., 2005; Manucharova et al, 2021). Использовали следующие ДНК-специфичные праймеры:

arc915f 5'-AGGAATTGGCGGGGGAGCAC-3';

arc1059r5'-GCCATGCACCCWCCTCT-3';

Eub338f5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3';

Eub518r5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Протокол реакции (температурный профиль) был следующим: 95 °С – 3 мин → (95 °С – 10 с → 50 °С – 10 с → 72 °С – 20 с + детекция флуоресценции) × 49 циклов. Для каждого варианта эксперимента (образца) реакцию проводили в трех повторностях. Обработка результатов измерения выполнена с использованием пакета программы Realtime_PCR.

Концентрация целевых участков гена определялась по формуле:

$$A = \frac{Q}{m} * 10^3$$

где Q – концентрация ДНК в растворе, рассчитанная программой CFX Manager; m – навеска абсолютно-сухой почвы, г; 10^3 – коэффициент пересчета, выведенный с учетом разведений экстракта ДНК, выделенного из почвы (Железова и др., 2015).

2.2.5 RTPCR на функциональные гены

Сконструированные праймеры, используемые в работе, специфичные для генов *bssA*, *nifH*, *alkB*, *xylE* представлены в таблице 10.

Программа амплификации генов *bssA*:

98°C – 1 мин → (98°C – 10 с → 58,9°C – 10 с → 65°C – 1 мин) x 40 + 65°C – 1 мин (Perry, 2014).

Амплификацию генов *nifH* проводили с использованием следующих температурных режимов: 94 °C – 1 мин → (94° C – 30 с → 50 °C – 1 мин → 72 °C – 30 с) x 40 + 72 °C 10 мин (Helmut et.al, 2004; Манучарова и др, 2020).

Таблица 10 – Функциональные гены и праймеры

Функциональный ген	Фермент	Система праймеров	Ссылка
<i>bssA</i>	Бензил-сукцинатсинтаза	BssADegF15'- CTGRTYTWYGMGARAAGAAG- 3'; BssADegR1 5'- AGYACBGCVGTYYGGCCATT-3'; BssADegF2 5'- AATGGVCCRACBGCVGTRCT-3'; BssADegR2 5'- ACSMMGTTTAACTGSACRTG-3'.	Perry, 2014
<i>nifH</i>	нитрогеназа	Forward 5'-GGTTGTGACCCGAAAGCTGA- 3'; Reverse 5'-GCGTACATGGCCATCATCTC- 3'.	Bürgmann H. et al, 2003
<i>alkB</i>	Алкан - монооксигеназа	f TGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGG r CGCGTGGTGATCCGAGTGCCGCTGAAGGTG	Whyte et al., 2002
<i>xylE</i>	Катехол -2, 3 – диоксигеназа	f CCGCCGACCTGATC(A/T)(C/G)CATG r TCAGGTCA(G/T)CACGGTCA(G/T)GA	Hendrickx et al 2006

Данные об амплификации других изучаемых генов представлены ниже (таблица 11). Стандарты были приготовлены с помощью очищения продуктов ПЦР и определения концентрации на флюориметре Qubit 3 (Thermo Fisher Scientific, USA) (Zhelezova et al., 2019; Манучарова и др., 2021).

Таблица 11 – Программы амплификации для проведения ПЦР

Количество циклов амплификации	Температура, °С		Продолжительность шага, мин	
	<i>alkB</i>	<i>xylE</i>	<i>alkB</i>	<i>xylE</i>
1x	94	95	5	5
30x (35x для <i>xylE</i>)	94	94	1	1
	60	61,5	1	1
	72	72	1	2
1x	72	72	3	10

С помощью полученных данных возможно оценить количественный состав микроорганизмов-деструкторов нефти.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы STATISTICA 12.0. Доверительный интервал составляет 0,05.

2.2.6 Секвенирование гена 16SpPHK

Очищенный препарат ДНК использовали в качестве матрицы для реакции ПЦР с использованием пары универсальных праймеров к переменному участку V4 гена 16S рPHK – F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACTACVSGGGTATCTAAT) (Dailey et al., 2010). Исследование выполнялось на секвенаторе Illumina Miseq (8 миллионов прочтений). Полученные ОТЕ идентифицировали с использованием баз данных QIIME и онлайн-ресурсов SILVA (Yilmaz et al.,

2014; Манучарова и др., 2020; <https://www.arb-silva.de/ngs/> и [ezbiocloud \(https://www.ezbiocloud.net/\)](https://www.ezbiocloud.net/).

Для каждого образца было получено не менее полутора тысяч прочтений, которые в дальнейшем загружались в специализированную программу (QIIME), где идет анализ качества пройденного секвенирования и собираются данные в библиотеку полученных последовательностей, а также отбор максимально схожих (не менее 98% похожести) операционных таксономических единиц и избавление от контаминации с дальнейшим разделением на α - и β -разнообразии (Caporaso et al., 2010).

Оценка разнообразия проводится по числу полученных операционных таксономических единиц и по индексу теоретического реального числа операционных таксономических единиц (Chao1):

$$Chao1 = s_{obs} + \frac{a^2}{2b}$$

Где S_{obs} — число обнаруженных ОТЕ, a — число ОТЕ, содержащих 1 сиквенс, b — число ОТЕ, содержащих 2 сиквенса). При расчете индексов разнообразия проводилась нормализация данных по 1303 сиквенсам (минимальное количество сиквенсов на образец) (Чернов и др., 2015).

2.2.7 Молекулярно-массовые распределения органического вещества водных и щелочных вытяжек из чернозема до и после обработки нефтью

Водные и щелочные вытяжки:

Воздушно-сухую почву растирали и просеивали через сито 1 мм. Почву с нефтью разминали, разрушая агрегаты. К почве в центрифужных пробирках добавляли $H_2O_{дист}$ в соотношении почва:раствор 1:5. Встряхивали 20 часов на шейкере (200 об/мин). Смесь центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин, надосадочный раствор отделяли и фильтровали через фильтр 0,45 мкм (Владипор), предварительно промытый $H_2O_{дист}$. К остатку от водной экстракции добавляли 0.1 М NaOH, предварительно продутой N_2 , в

соотношении 1:5. Проводили экстракцию 1 час, затем раствор центрифугировали и фильтровали как описано выше (Воробьева и др, 2011).

Содержание $C_{орг}$ в пробах

Содержание растворенного $C_{орг}$ определяли на анализаторе LiquiTOC (Германия). При необходимости пробы разводили H_2O дист.

Молекулярно-массовые распределения веществ водной и щелочной вытяжек.

Молекулярно-массовые распределения определяли методом гель-фильтрации на геле SephadexG-75 (Sigma, США). Работу проводили на жидкостном хроматографе нормального давления BiologicLP (Bio-Rad, США) с использованием колонки Econo-Column (1.0×50 см, Bio-Rad). Элюентом служил 0.025 М Трис-НСl буфер (рН 8.2) с добавлением 0.05 М NaCl и 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS) для подавления ионных взаимодействий с матрицей геля и межмолекулярных гидрофобных взаимодействий между компонентами пробы, соответственно. Скорость элюирования составляла 0.08 мл/мин. Свободный объем колонки (V_0) находили по голубому декстрану 2000, общий объем (V_t) – по $K_2Cr_2O_7$. Колонку калибровали по полистиролсульфоновым кислотам (Sigma) с массами 6,8; 10; 17 кДа. Пробы водных и щелочных вытяжек разводили 1:1 в 0.05 М Трис-НСl буфере с добавлением 0.1 М NaCl и 0.2 % SDS так, чтобы конечная концентрация буфера соответствовала таковой элюента. В щелочных вытяжках рН проб при необходимости доводили до рН элюирующего буфера (8,2) с помощью микроколичеств 15 % HCl. Объем пробы, наносимой на колонку, составлял 200 мкл. Молекулярные массы середины пика рассчитывали:

1) по формуле Детермана для глобулярных белков (Орлов, 1992):

$$\lg M = 5,627 - 0,752 (V_e/V_0),$$

2) по калибровке по полистиролсульфоновым кислотам

$$\lg M = 5,862 - 1,291 (V_e/V_o),$$

где V_e – объем выхода элюата (определяемый как максимум пика на хроматограмме), V_o – свободный объем колонки.

2.2.8 Агрехимические приемы ремедиации нефтезагрязненных почв

В загрязненную нефтью торфяную почву носили $\text{Ca}(\text{OH})_2$, играющий в данном случае роль мелиоранта, по схеме проводимого опыта (таблица 12). В дальнейшем почвенные образцы инкубировались две недели. Была нейтрализована кислотность по 0,5 Нг и 1 Нг, затем вносились удобрения: N (в форме NH_4NO_3); P (в форме $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$); K (в форме K_2SO_4). В рамках постановки опыта были созданы два уровня минерального питания:

- Средний (0,5 NPK) N – 20 мг/100 г, P – 30 мг/100 г, K – 30 мг/100 г
- Повышенный (1 NPK) N – 40 мг/100 г, P – 50 мг/100 г, K – 50 мг/100 г

Дополнительно в некоторые образцы почвы вносили культуру бактерий, относящуюся по результатам пиросеквенирования к *Pseudomonas*, обладающую способностью расти на среде Эванса, где нефть является единственным источником углерода (Stallwood et al., 2005; Anokhina et al., 2006) и на среде Эшби без источников N (Методы почвенной микробиологии, 1991).

На следующем этапе эксперимента в образцы с внесённым удобрением и бактериальной суспензией массой 20 граммов проводили посев семян многолетних злаковых трав, состоящих из: кострец безостый (*Bromopsis inermis*) – 30 %, тимофеевка луговая (*Phleum pratense*) – 40 %, овсяница луговая (*Festuca pratensis*) – 30 %. Как известно, травянистые растения улучшают физические свойства почв и активизируют почвенные микроорганизмы, в связи с этим фиторемедиация является важным этапом (Арзамазова и др., 2015).

Вегетационные сосуды инкубировали восемь недель при комнатной температуре (таблица 12).

Таблица 12 – Протокол эксперимента

№ варианта	Описание
1	Контроль
2	Контроль нефтезагрязненный (КН)
3	КН + 0,5Нг
4	КН + 0,5Нг + 0,5 NPK
5	КН + 0,5Нг + 1 NPK
6	КН + 0,5Нг + бактерии. (<i>Pseudomonas</i>)
7	КН + 0,5Нг + б. + 0,5 NPK
8	КН + 0,5Нг + б.+ 1 NPK
9	КН + Нг
10	КН + Нг + 0,5 NPK
11	КН + Нг + 1 NPK
12	КН + Нг + бактерии.
13	КН + Нг + б. + 0,5 NPK
14	КН + Нг + б.+ 1 NPK

2.2.9 Измерение остаточных нефтепродуктов

Анализ количества доли продуктов нефти проводился в соответствии с ПНД Ф 16.1:2.2.22 – 98. Образец размещается в колбе объемом 100 см³, затем добавляется тетрахлорметан и ставят на 60 минут встряхиваться.

Выделенный в процессе вышеперечисленных манипуляций экстракт подвергают фильтрации на бумажном фильтре и переносят химическую посуду с крышкой, данные действия повторяется еще несколько раз, каждый

раз с добавлением тетрахлорметана. После всех процедур производится переливание всех суммарно полученных растворов в мерную колбу и измеряется общий объем.

В дальнейшем с использованием приборной базы проводится примерное определение содержания продуктов нефти, при этом стоит внимательно следить, чтобы получаемые показания не превышали допустимых значений. Если же такое происходит, то следует снова произвести разбавление небольшой части анализируемого раствора в тетрахлорметане до достижения необходимых величин.

Следующим этапом проводится хроматография с предварительным увлажнением сорбента раствором тетрахлорметана. Полученный выше раствор вливается медленно в подготовленную емкость. Обязательным пунктом является проверка жидкости на соответствие нужному уровню (необходимо, чтобы он был выше прослойки Al_2O_3). В дальнейшем снова добавляется 5 миллилитров тетрахлорметана, после чего элюируемый раствор отбирается в 25 миллилитровые емкости, при этом нужно обязательно слить верхние 10 миллилитров раствора. Полученный итоговый раствор ставят в прибор и производят измерения, необходимые для получения конечных результатов.

Глава III. Результаты и обсуждение *

3.1. Численность и биомасса общей и метаболически активной компоненты прокариот в исследуемых почвенных образцах

Из литературы известно, что сообщество почвенных микроорганизмов может по-разному реагировать на загрязнение почвы нефтепродуктами, например, после кратковременного ингибирования – повышением общей численности и возрастанием активности. Прежде всего, это относится к углеводородокисляющим бактериям, количество которых резко возрастает по сравнению с численностью в незагрязненных почвах (Лысак и др., 1982; Гузев и др., 1986; Звягинцев и др., 2001; Толпешта и др., 2015).

Анализ общей численности прокариот и пересчет на их биомассу для всех типов исследуемых почв (чернозема, серой лесной, каштановой и торфяной) показал, что в опытных вариантах с внесением нефти оба показателя были ниже, чем в контрольных образцах.

* Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора:

1. Манучарова Н. А., **Ксенофонтова Н.А.**, Каримов Т.Д., Власова А.П., Зенова Г.М., Степанов А.Л. Изменение филогенетической структуры метаболически активного прокариотного комплекса почв под влиянием нефтяного загрязнения //Микробиология. – 2020. – Т. 89. – №. 2. – С. 222-234.
2. Манучарова Н. А., **Ксенофонтова Н.А.**, Белов А.А., Каменский Н.Н., Арзамазова А. В., Зенова Г.М., Кинжаев Р.Р., Трофимов С.Я., Степанов А.Л. Прокариотный компонент нефтезагрязненной торфяной олиготрофной почвы при разном уровне минерального питания //Почвоведение. – 2021. – №. 1. – С. 80-89.
3. Manucharova N. A., Pozdnyakov L.A., Vlasova A.P., Yanovich A.S., **Ksenofontova N.A.**, Kovalenko M.A., Stepanov P.Y., Gennadiev A.N., Golovchenko A.V., Stepanov A.L. Metabolically Active Prokaryotic Complex in Grassland and Forests' Sod-Podzol under Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Influence //Forests. – 2021. – Т. 12. – №. 8. – С. 1103.

Так для чернозема к 21 суткам сукцессии суммарная биомасса прокариот в загрязненных образцах составляла около 600 мкг/г почвы, что в два раза меньше биомассы в контрольных вариантах, при этом биомасса метаболически активных представителей прокариот составляла от 30 до 45 % от суммарной биомассы прокариотного комплекса (рисунок 2).

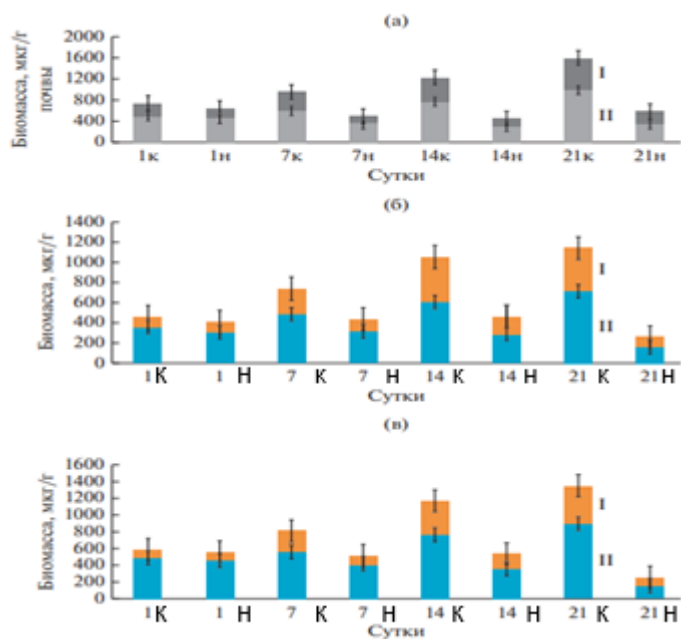


Рисунок 2 – Динамика биомассы прокариот в черноземе (а), серой лесной (б), каштановой (в) в процессе сукцессии, инициированной увлажнением с внесением нефти (н) и в контроле (к): I – биомасса метаболически активных клеток прокариот; II – биомасса клеток, не идентифицированных используемыми зондами (в том числе споры, цисты)

В незагрязненной нефтью торфяной олиготрофной почве биомасса прокариот достигала в среднем 65 мкг/г почвы (рисунок 3, А), а биомасса метаболически активных клеток прокариот не превышала 6,5 мкг/г почвы (рисунок 3, Б), что составило около 10 %. В загрязненной нефтью почве наблюдали уменьшение биомассы прокариот и доли метаболически активных клеток по сравнению с контролем. Значения общей биомассы

находились в диапазоне от 57 до 60 мкг/г почвы (рисунок 3, А), а биомасса метаболически активных клеток в загрязненных образцах не превышала 3,5 мкг/г, что составляет только 5 % от всех выявляемых прокариот (рисунок 3, Б).

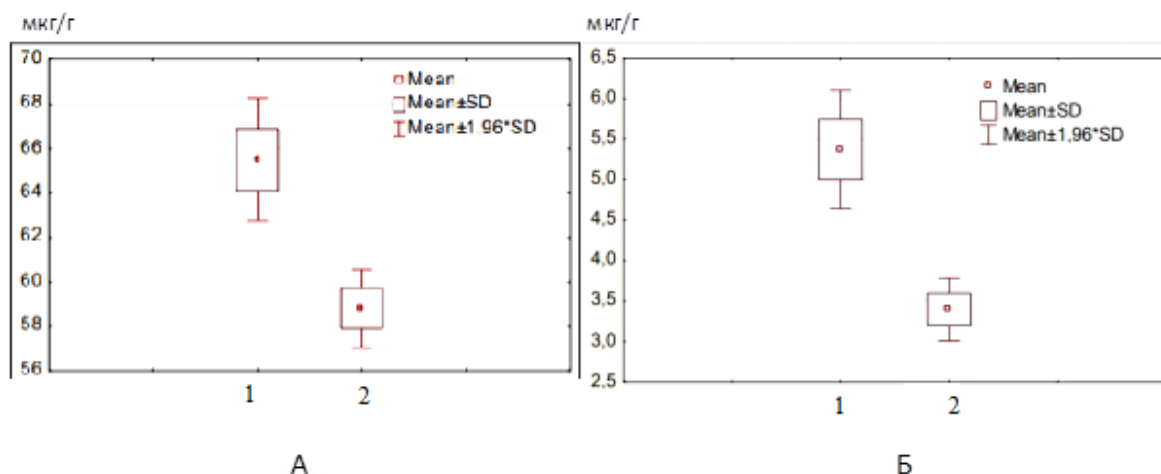


Рисунок 3 – Общая биомасса прокариот (А) и их метаболически активных клеток (Б) в торфяной олиготрофной почве: 1 – контроль (без нефти), 2 – загрязненной нефтью

Общая биомасса прокариот в образцах дерново-подзолистой почвы, загрязнённой ПАУ, снижалась по мере приближения к источнику загрязнения, так в образцах контроля биомасса прокариот достигала 400 мкг/г почвы, ближе к источнику загрязнения – в почве под лугом 260-270 мкг/г почвы, а под лесом – 200-215 мкг/г, то есть уменьшалась почти в половину от показателей контроля (рисунок 4).

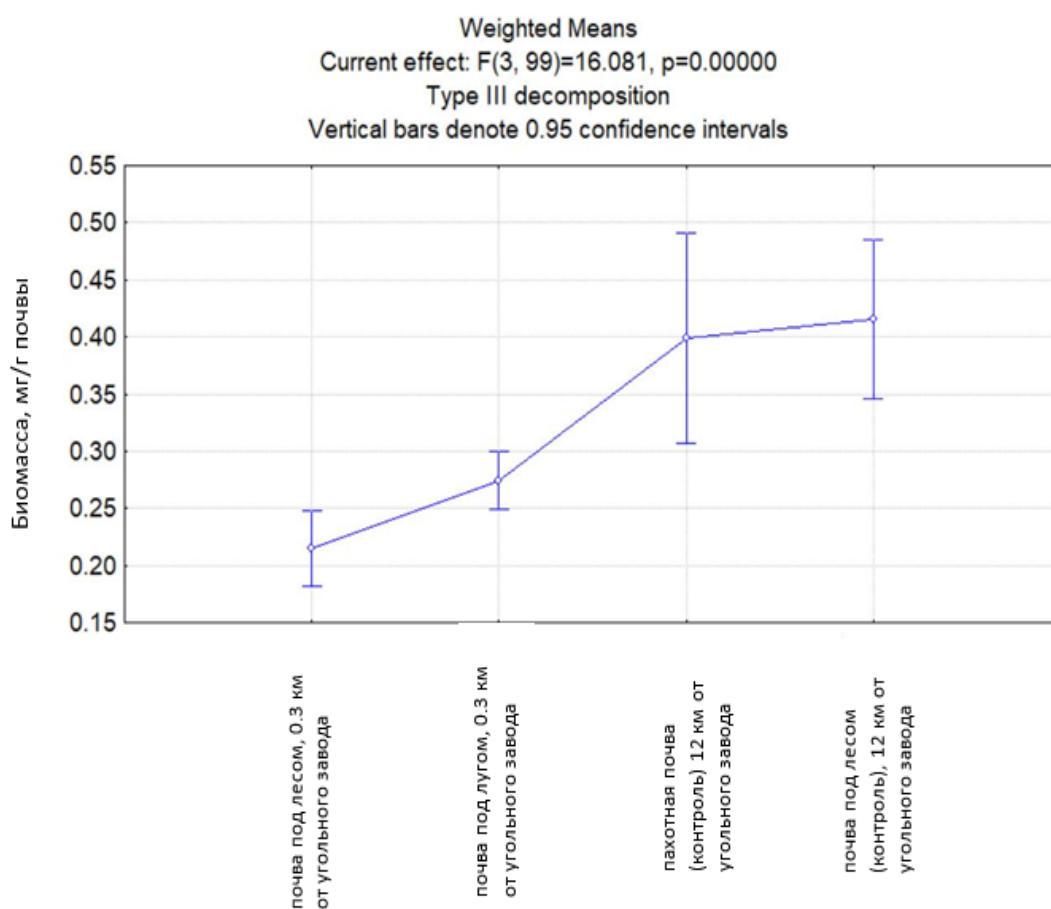


Рисунок 4 – Общая биомасса прокариот (мг/г почвы) в образцах дерново-подзолистой почвы разной степени удаленности от источника загрязнения

Биомасса метаболически активных клеток прокариот в почвах снижалась по мере увеличения концентрации ПАУ (рисунок 5). В частности, значения биомассы составляли 230–240 мкг/г в образцах контроля, при этом не превышали 185 и 135 мкг/г почвы в образцах, которые были отобраны вблизи углеперерабатывающего завода. В почвах под лугом, находящихся в непосредственной близости к источнику загрязнения, показатели биомассы метаболически активного прокариотного комплекса снижались сильнее, чем в почвах под лесом, также располагающихся вблизи от завода. Данное

явление связано с тем, что для почвы под лесом характерна большая толерантность микробного сообщества к поллютантам.

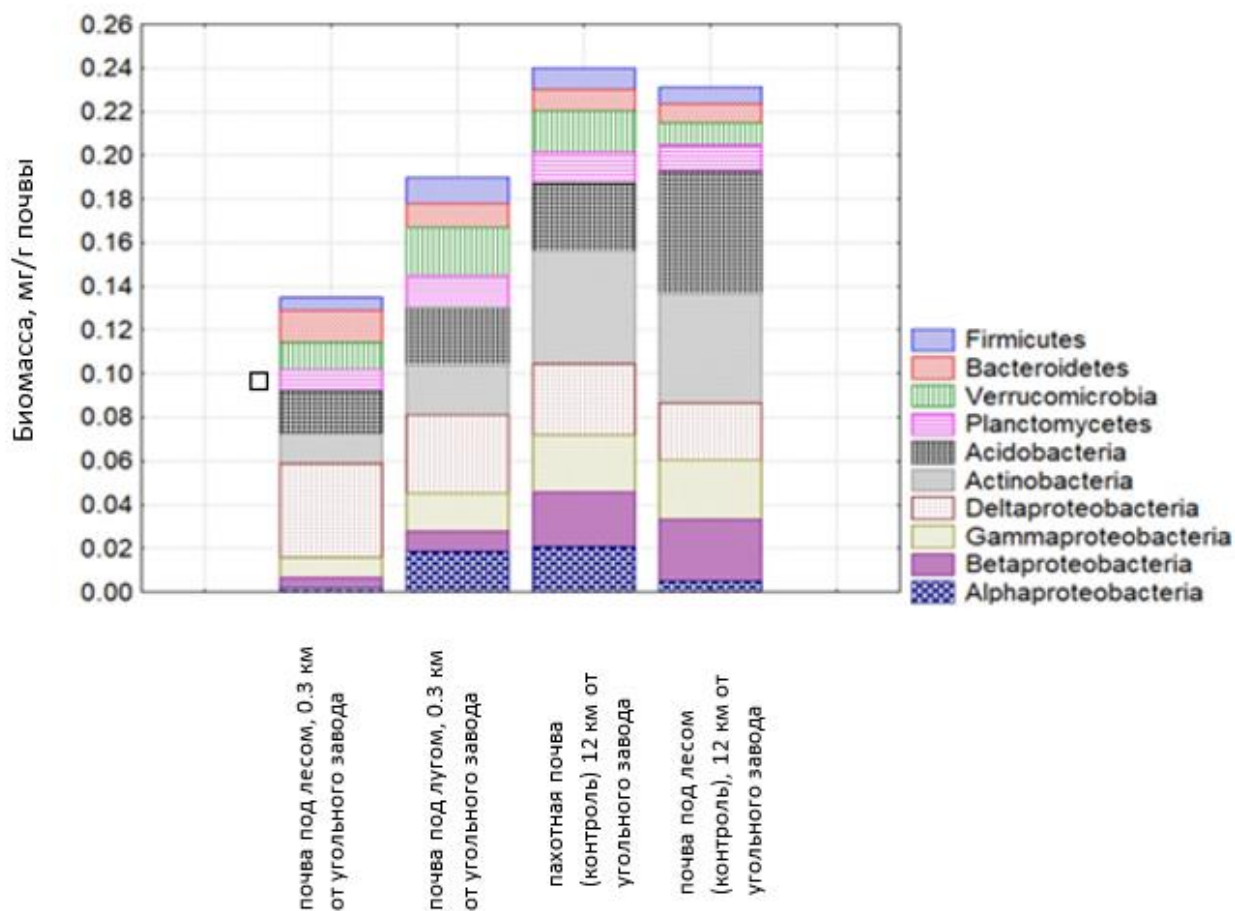


Рисунок 5 – Биомасса и структура метаболически активного комплекса прокариот в образцах дерново-подзолистой почвы разной степени удаленности от источника загрязнения

По результатам метагеномного анализа и FISH во всех исследованных образцах почв преобладали метаболически активные представители домена бактерий (90%), а доля архей составляла около 10% как в опытных, так и в контрольных образцах.

В процессе сукцессии почвенного микробного сообщества происходит перестройка структуры его микробной компоненты, развиваются специализированные группы, участвующие в утилизации углеводов на

разных ее этапах, что приводит к формированию устойчивого сообщества, состоящего из представителей, способных использовать различные углеводороды (УГВ) в процессе жизнедеятельности. С целью расширения выявляемого спектра прокариот-деструкторов УГВ, в том числе за счет некультивируемых форм, были использованы молекулярно-биологические анализы (FISH) и подходы с применением метабаркодинга.

3.2 Филогенетическая структура метаболически активной прокариотной компоненты почв, загрязненных нефтью и ПАУ

В рамках диссертационной работы было проведено секвенирование ДНК, выделенного из образцов различных почв, как контроля, так и загрязненных нефтью. Полученные последовательности распределяли по операционным таксономическим единицам (ОТЕ) с уровнем сходства более 97 %. Полученные ОТЕ идентифицировали с использованием баз данных QIIME, онлайн-ресурса SILVA (Yilmaz et al., 2014; <https://www.arb-silva.de/ngs/>) и Knomics Biota. Статистические подсчеты осуществляли с помощью Microsoft Excel. С помощью программы Silva удалось составить филогенетические карты структуры прокариотной компоненты изучаемых почв, с помощью которых можно сделать выводы по изменению структуры микробного сообщества под влиянием поступления в почву углеводов нефти.

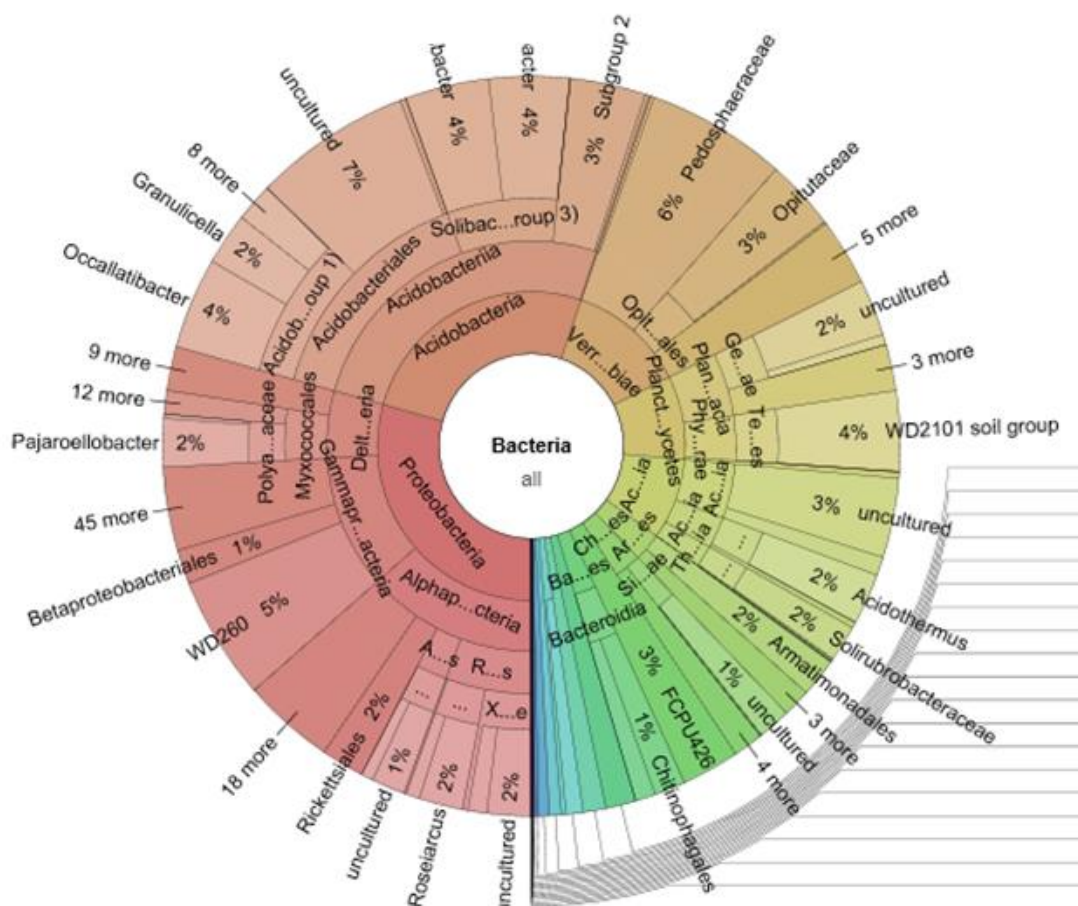


Рисунок 6 – Филогенетическая карта структуры бактериальной компоненты болотной торфяной верховой почвы (контроль)

В незагрязненных нефтью образцах торфа среди домена *Bacteria* закономерно доминировали представители филумов *Proteobacteria* и *Acidobacteria*, занимая по 25 % от всего выявляемого бактериального комплекса (Рисунок 6). Среди протеобактерий выявляли представителей альфа-, гамма- и дельта-протеобактерий. Представители филогенетических групп *Planctomycetes*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* были обнаружены в сообществе в меньших количествах. Представители *Firmicutes* входили в спектр минорных компонентов. Археи встречаются в очень небольшом количестве от общего числа, по сравнению с бактериями (1–2 %).

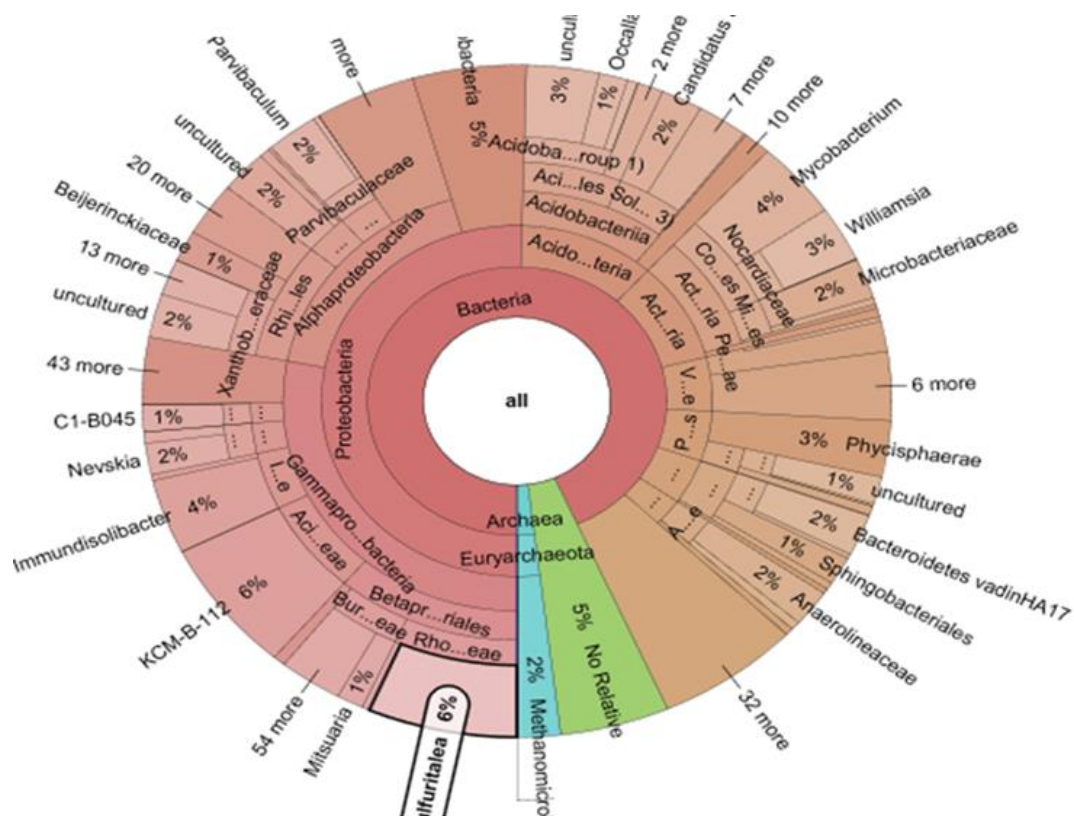


Рисунок 7 – Филогенетическая карта структуры бактериальной компоненты болотной торфяной верховой нарушенной почвы с сильным загрязнением нефтью

В торфе, загрязненном нефтью, происходит смена доминант: 50 % от общего числа занимает *Proteobacteria* (рисунок 7). Интересным является тот факт, что происходит увеличение за счет появления видов, которые не встречались в незагрязненной почве. Стоит заострить внимание на таком виде, как *Sulfuritalea*. Данная бактерия является хемолитоавтотрофным микроорганизмом, который окисляет тиосульфаты, серу и водород. Согласно литературным источникам, ее используют для деградации ароматических соединений, в частности, для анаэробного разложения бензоатов и фенилацетатов (Sperfeld et al., 2019). В бактериальном комплексе загрязненного торфа возрастает доля актинобактерий, причем, если в контрольной почве среди актинобактерий доминировали представители порядка *Frankiales* (род *Acidothermus*), то в опытном варианте начинают

доминировать представители порядков *Micrococcales* и *Corinebacteriales* (представители родов *Micobacterim* и *Williamsia*). В литературе имеются сведения о росте некоторых видов рода *Williamsia* на бензоле (Drzyzga, 2012).

В образце контроля чернозема типичного доминантами являются *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Acidobacteria* (рисунок 8). Выделить одну только доминанту сложно, так как все вышеупомянутые роды занимают примерно равные ниши эквивалентные 25 % от общего состава. Интересно отметить тот факт, что достаточно большой процент (2 %) занимает *Verrucomicrobia*, которая является некультивируемым классическими методами родом, однако молекулярные методы позволяют ее обнаружить. Данное распределение в целом является характерным для структуры прокариотной компоненты черноземов в естественных условиях.

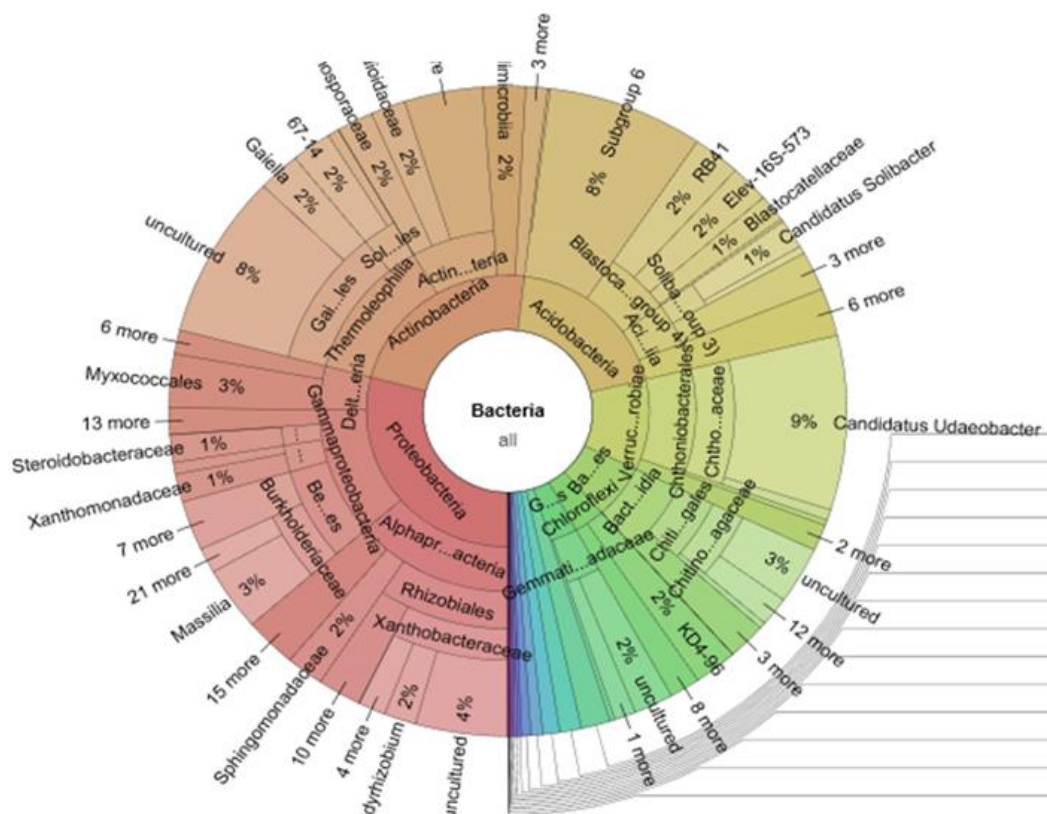


Рисунок 8 – Филогенетическая карта прокариотной компоненты чернозема типичного (контроль)

В черноземе, который подвергся нефтяному загрязнению, ситуация начинает меняться (рисунок 9). Здесь уже гораздо проще выделить доминанты – ею являются представители рода *Actinobacteria*, занимающие до 45 % от общего комплекса, а доля *Proteobacteria* наоборот сильно снижается (до примерно 10 % от общего количества). По результатам метабаркодинга в филуме *Actinobacteria* в опытных образцах обнаруживаются представители как устойчивых, так и чувствительных к нефтезагрязнению родов.

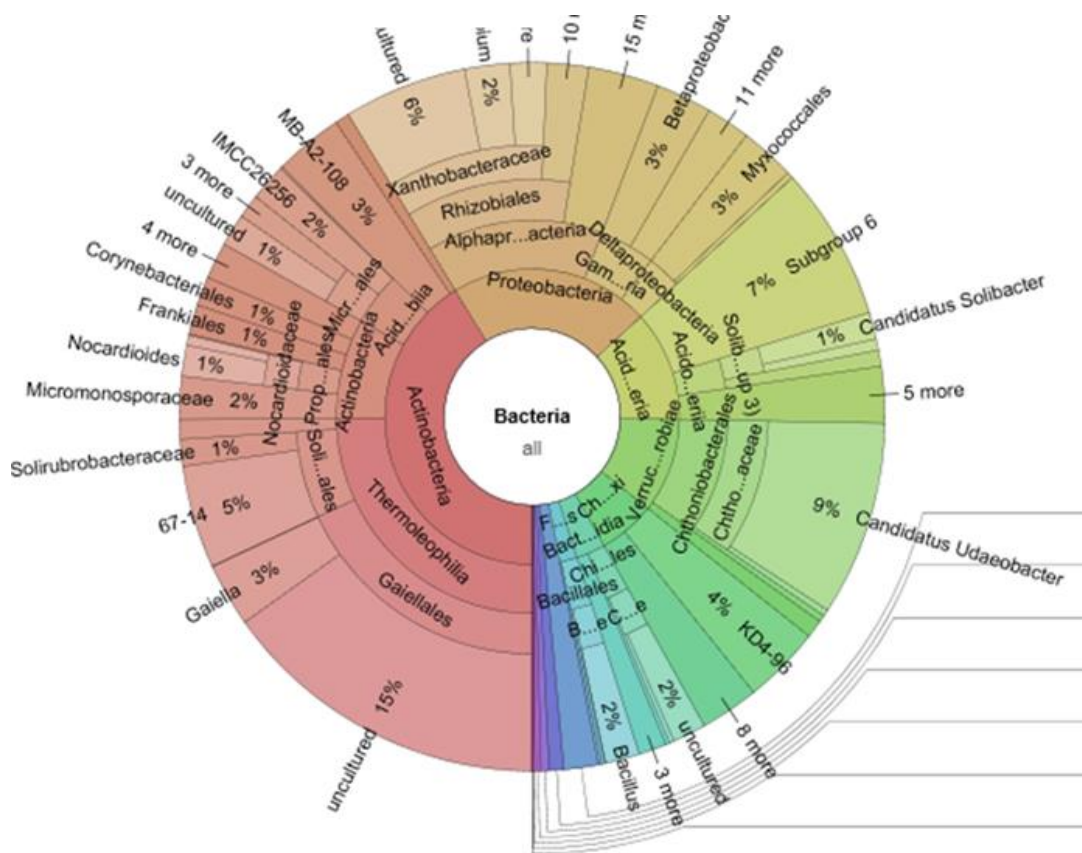


Рисунок 9 – Филогенетическая карта структуры прокариотной компоненты чернозема типичного, загрязненного нефтью

Численность некоторых родов резко сокращается до полного исчезновения при внесении в почву нефти, что приводит к сокращению биоразнообразия сообщества. Примером чувствительных организмов в филуме *Actinobacteria* служат представители семейства *Micromonosporineae*

(*Dactylosporangium*, *Actinoplanes*, *Virgisporangium*). Таким образом, в микробном сообществе чернозема типичного, загрязненного углеводородами, формируется достаточно специфичная группа метаболически активных представителей, обладающих набором функциональных генов, отвечающих за деструкцию таких труднодоступных соединений, к которым относится нефть.

При оценке структуры метаболически активного прокариотного комплекса по показателям численности и биомассы представителей домена *Bacteria* в образцах чернозема типичного выявлено преобладание представителей *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. Значения метаболически активной биомассы представителей этих групп в загрязненном нефтью черноземе, по результатам метода FISH, достигали 280 и 200 мкг/г почвы, соответственно. Схожие закономерности отмечались для образцов каштановой почвы.

Среди актинобактерий в опытных вариантах с нефтью доминировали представители следующих групп: Subclass *Rubrobacteridae* (роды *Gaiella*, *Solirubrobacter*); Subclass *Actinobacteridae* (suborder *Propinobacterineae* (*Nocardiodes*, *Kribella*); *Micromonosporineae* (*Catelliglobospora*, *Micromonospora*); *Corynebacterineae* (*Rhodococcus*); *Pseudonocardineae* (*Pseudonocardia*); *Micrococcinea* (*Cellulomonas*, *Agromyces*); *Streptomycineae* (*Streptomyces*); *Streptosporangineae* (*Thermomonosporaceae*, *Streptosporangium*) (рисунок 9). Отметим, что многие представители родов *Ilumatobacter*, *Aciditerrimonas*, принадлежащих группе актинобактерий, также обнаруженных нами в исследуемых образцах с нефтью, способны расти в анаэробных условиях и обладают термо- и ацидофилией (Itoh et al, 2011).

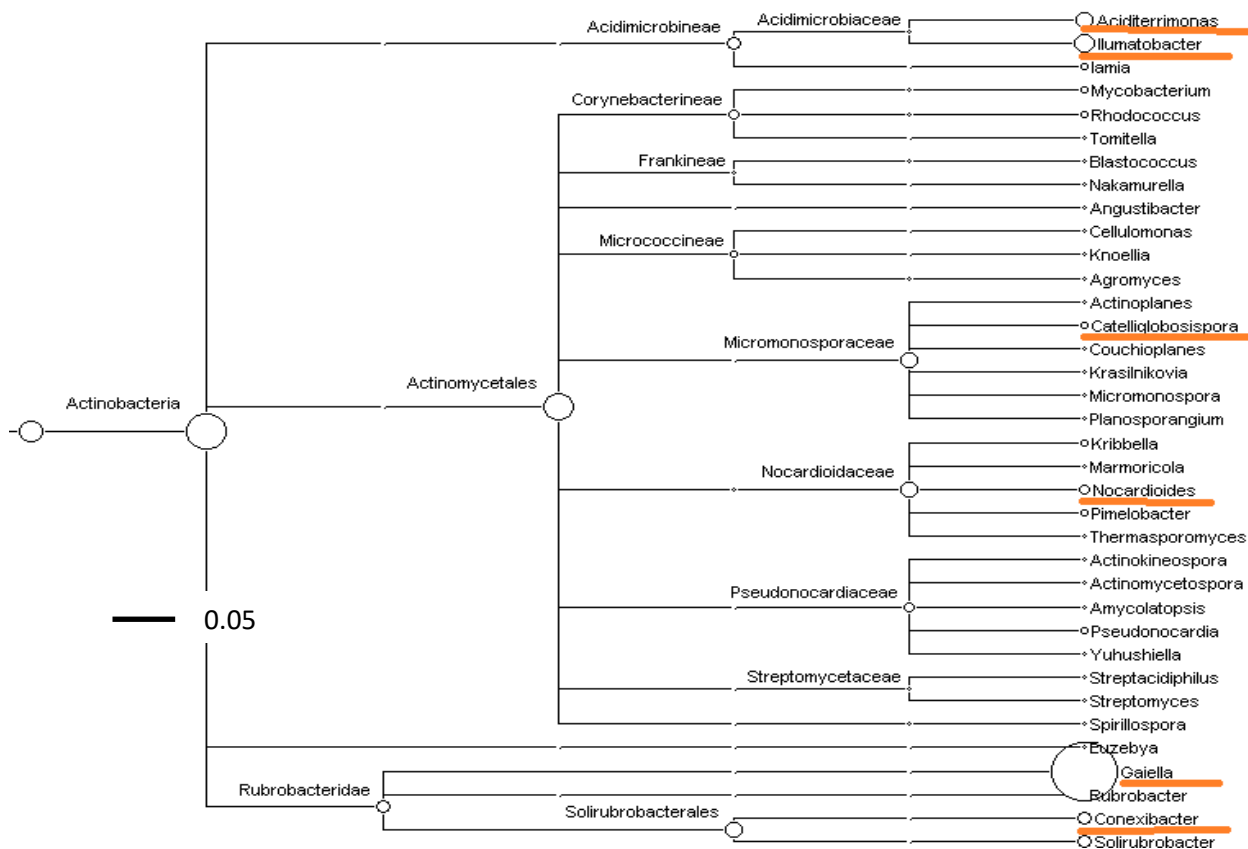


Рисунок 10 – Филогенетическая дендрограмма доминирующих представителей филума *Actinobacteria* в образце чернозема, загрязненном нефтью, основанная на результатах анализа метабаркодинга. Дерево построено с помощью алгоритма neighbor-joining, масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов

По результатам метабаркодинга в филуме *Actinobacteria* в опытных образцах обнаруживаются представители как устойчивых, так и чувствительных к нефтезагрязнению родов (рисунок 10). Численность некоторых родов резко сокращается до полного исчезновения при внесении в почву нефти, что приводит к сокращению биоразнообразия сообщества. Примером чувствительных организмов в филуме *Actinobacteria* служат представители семейства *Micromonosporineae* (*Dactylosporangium*, *Actinoplanes*, *Virgisporangium*).

По результатам метагеномного анализа и FISH во всех исследованных образцах почв преобладали метаболически активные представители домена бактерий (90%), а доля архей составляла около 10% как в опытных, так и в контрольных образцах.

Бактериальный компонент незагрязненной дерново-подзолистой почвы характеризовался преобладанием нескольких филумов: *Proteobacteria*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria* (рисунок 11, А). При этом протеобактерии и ацидобактерии составляли примерно равные доли от общего выявленного бактериального сообщества в почве под лесной растительностью (38 и 32 % соответственно), а в почве под луговой растительностью доля актинобактерий возрастала до 25 %, при этом доля ацидобактерий снижалась до 15%. В почве под лесной растительностью среди протеобактерий доминировали представители гамма-протеобактерий семейства *Xanthomonadaceae* рода *Dyella*; среди ацидобактерий доминировали представители семейства *Acidobacteriaceae* (*Edaphobacter*); среди актинобактерий преобладали представители порядков *Streptosporangiales* и *Corynebacterales*.

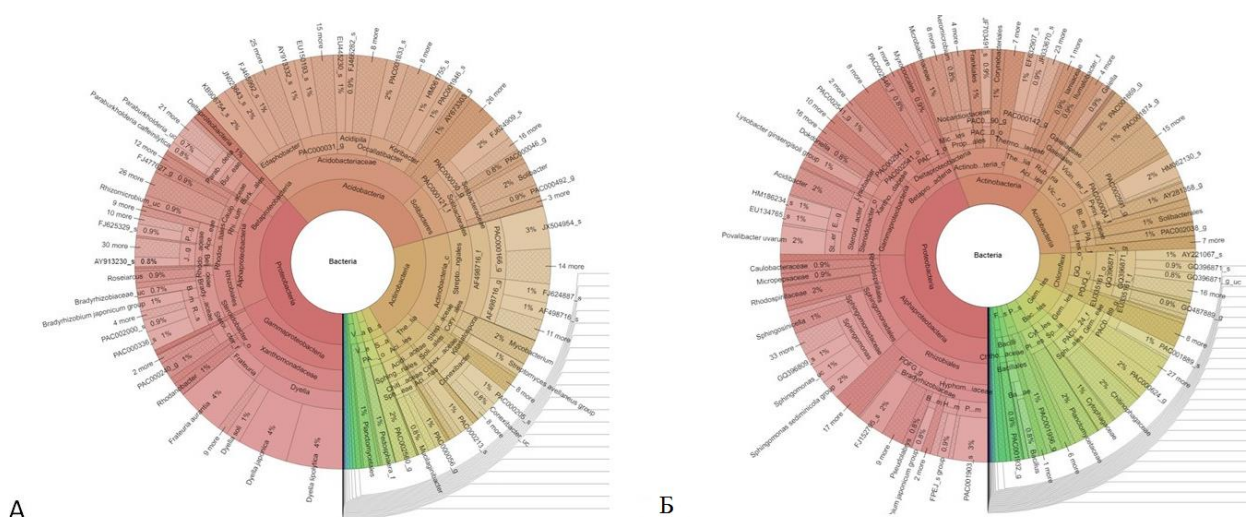


Рисунок 11 – Филогенетическая карта структуры прокариотной компоненты дерново-подзолистой почвы контроля (почва под лесом, 12 км от источника загрязнения) (А) и загрязненной ПАУ (0,3 км от источника загрязнения) (Б)

В образцах, отобранных вблизи источника загрязнения, происходила смена доминант и весь комплекс бактериальной компоненты претерпевал изменения (рисунок 11, Б).

В почве, подвергшейся загрязнению полициклическими ароматическими углеводородами, наблюдалось увеличение биомассы метаболически активных представителей таких филогенетических групп, как *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Chloroflexi*. Доля альфа-протеобактерий увеличилась за счет представителей *Sphingomonas* и *Bradyrhizobiaceae*. Из филума *Bacteroidetes* выявлены представители семейств *Cytophagaceae* и *Chitinophagaceae*. Доля акцидобактерий и актинобактерий уменьшилась. Структура комплекса актинобактерий существенно изменилась. Представители отряда *Streptosporangiales* практически не обнаружены и могут быть отнесены к ПАУ-чувствительным. Увеличилась доля *Micrococcales* (*Arthrobacter*) и *Nocardiodaceae*

(*Nocardioides* и *Aeromicrobium*). Значительно увеличилась доля представителей рода *Gaiella*, принадлежащих к *Rubrobacteria*.

Анализ метаболически активных представителей филогенетических групп домена *Archaea* (метод FISH) исследуемых образцов почв на 20 сутки сукцессии показал, что при добавлении в образцы углеводов нефти изменяется как численность, так и структура комплекса, по сравнению с контрольными образцами (рисунок 12). В то время как численность метаболически активных представителей *Thaumarchaeota* и *Euryarchaeota* во всех опытных образцах снижалась к 20 суткам сукцессии, численность представителей филогенетической группы *Crenarchaeota* немного возрастала или оставалась неизменной в черноземе и доминировала (по биомассе) в образцах каштановой и серой лесной почв.

По результатам секвенирования в загрязненных нефтью образцах среди *Crenarchaeota* доминировали представители родов *Pyrolobus* (представитель термофилов), *Sulfurisphaera* (представитель факультативных анаэробов, термофилов, ацидофилов) и семейство *Thermoproteaceae*. Кроме того, были выявлены последовательности, характерные для представителей филогенетической группы *Thaumarchaeota* рода *Nitrososphaera*. Представители этого рода активно участвуют в процессе нитрификации в цикле азота и способны к окислению аммиака, что может быть стимулом для дальнейших исследований в области биоремедиации загрязненных нефтью систем. В отношении биоразнообразия архейного анаэробного комплекса, развивающегося в высокотемпературных горизонтах нефтяных месторождений, известны представители рода *Thermococcus* (*Euryarchaeota*) (Назина и др., 2006).

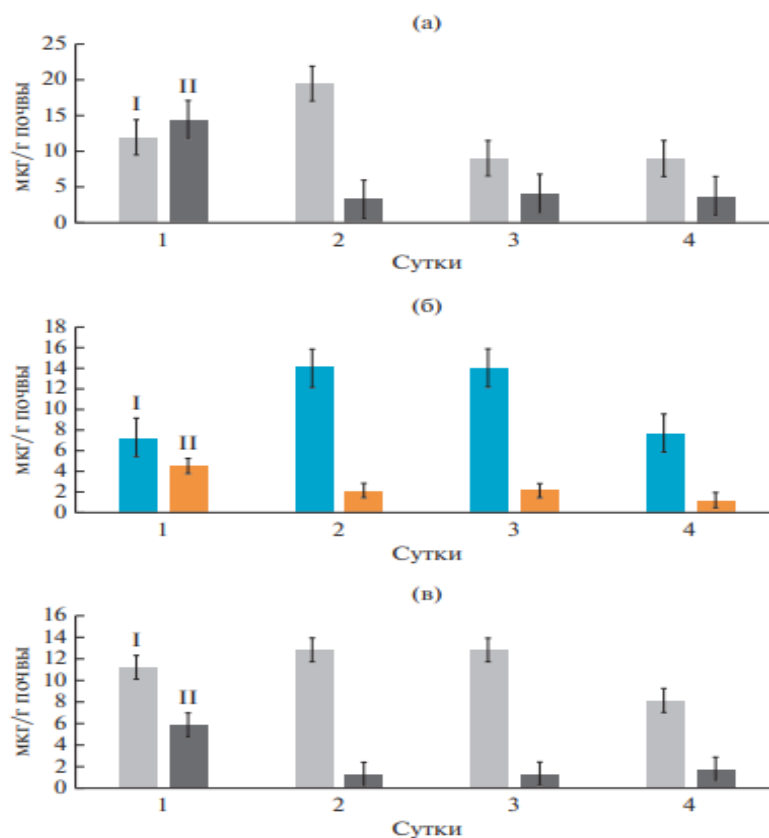


Рисунок 12 – Биомасса метаболически активных представителей разных филогенетических групп домена Archaea (метод FISH) в чернозёме (А), серой лесной (Б) и каштановой (В) почвах на 20 сутки сукцессии, инициированной увлажнением – контролем (I) и увлажнением и внесением нефти (II): 1- *Crenarchaeota*, 2- *Thaumarchaeota*, 3- *Euryarchaeota*, 4- *Unclassified*

В дерново-подзолистой почве происходят изменения в архейной компоненте. Загрязнение ПАУ приводит к увеличению доли *Thaumarchaeae*. Биомасса эвриархеот увеличивалась в 2 раза по сравнению с контролем и достигала 29 мкг/г почвы. Представителей филогенетической группы *Crenarchaeota* можно считать чувствительными к ПАУ - их биомасса уменьшалась в загрязнённых почвах в 3 раза по сравнению с фоновыми образцами и составляла 8 мкг/г почвы (рисунок 13).

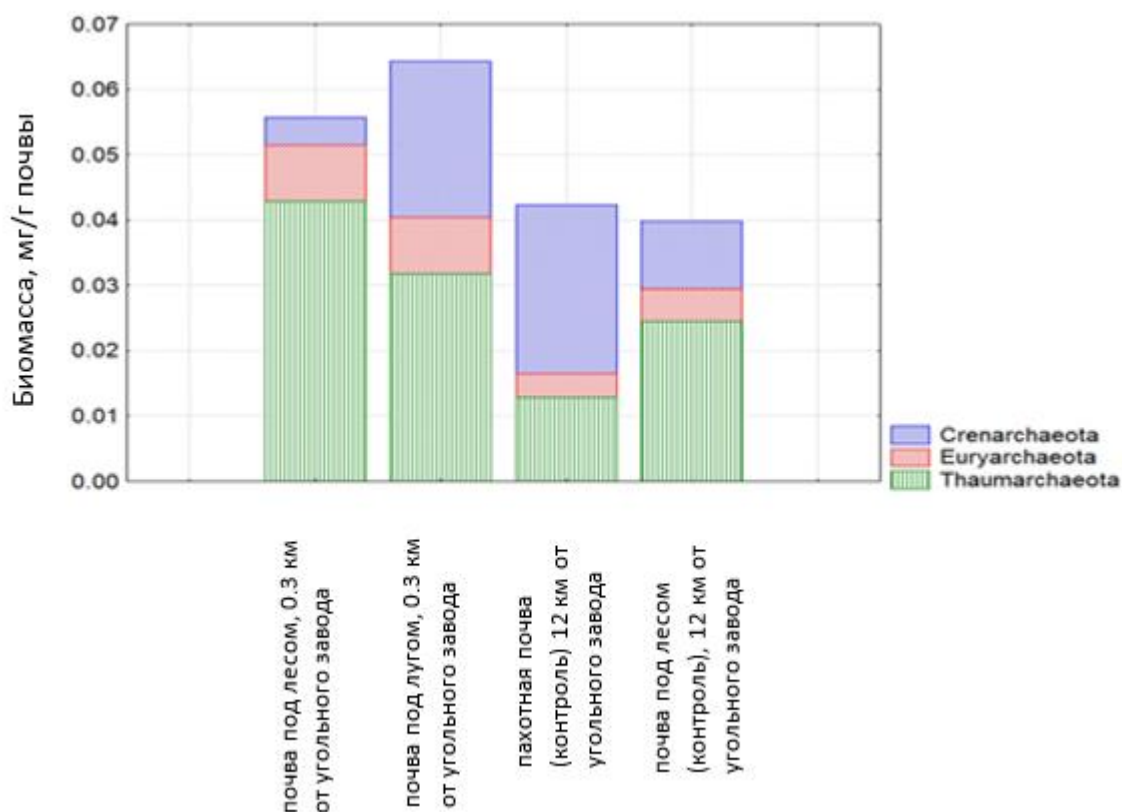


Рисунок 13 - Биомасса и структура метаболически активного сообщества архей в образцах дерново-подзолистой почвы в зависимости от удаленности от источника загрязнения

Можно сделать вывод, что в почвенном прокариотном сообществе при загрязнении углеводородами отмечается снижение разнообразия за счет выхода в доминанты определенных родов – автохтонной микрофлоры, специфичной для определенных условий. Для образцов почв южных широт (чернозем и каштановая почвы) доминирующая роль среди гидролитиков принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт (торфяная почва) – протеобактериям. Таким образом, тип почвы и экологические факторы оказывали координирующее влияние на развитие доминантных компонент гидролитического комплекса.

3.3. Длительное воздействие нефтяных загрязнений на структуру прокариотного комплекса почв

Из литературных источников известно, что важным фактором в изменении микробного комплекса почв под воздействием нефтяных разливов становится время (Adam et al., 2002; El-Sheekh et al, 2004; Назаров и др., 2010; Chang et al., 2010). На первых этапах происходит быстрая активация микроорганизмов-нефтедеструкторов, которые в первую очередь начинают разлагать легкие фракции нефти, при этом происходит ингибирование остальных представителей микробного сообщества. В процессе сукцессии, с течением времени, филогенетическое разнообразие изменяется (рисунок 14).

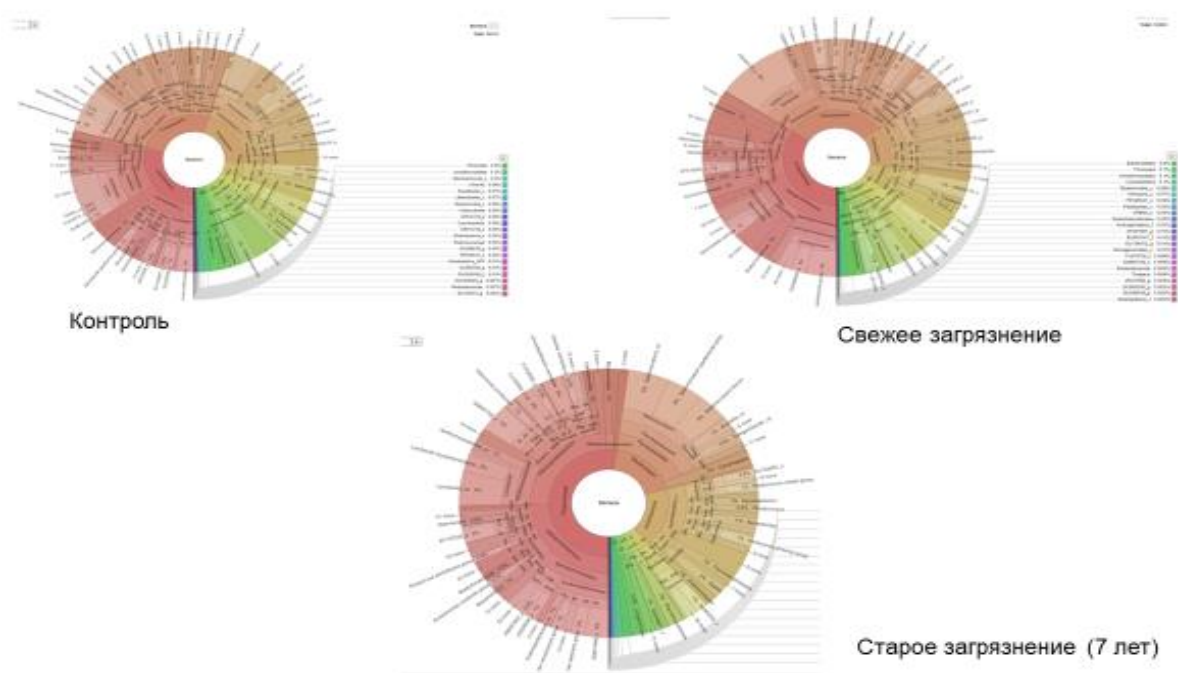


Рисунок 14 – Длительное воздействие нефтезагрязнения на чернозем типичный

По филогенетическим картам можно отметить значительные изменения, которые претерпевает микробное сообщество чернозема

типичного с течением времени. Данные об изменениях филогенетической структуры скомпонованы в таблицу для наглядности (таблица 13).

Таблица 13 – Изменение структуры прокариотного комплекса чернозема при длительном воздействии углеводов

Чернозем	<i>Proteobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	<i>Bacteroidetes</i>
Контроль	<i>Alpha-Sphingomonadales</i> <i>Rhizobiales</i> (<i>Bradyrhizobium</i> , <i>Methobacteraceae</i> , <i>Reyranella</i> , <i>Skermanella</i>) <i>Beta- Burkholderia</i>	<i>Frankiales</i> <i>Propionibacteriales</i> (<i>Nocardiodaceae</i> , <i>Propionibacteriaceae</i>) <i>Micrococcales</i> (<i>Arthrobacter</i>) <i>Rubrobacteria</i> (<i>Gaiella</i> , <i>Rubrobacter</i>)	<i>Vicinamibacter</i> <i>Blastocatellales</i> (<i>Arenimicrobium</i> , <i>Stenotrophobacter</i>)	Не является доминантой
Свежий разлив	<i>Alpha-Sphingomonadeles</i> <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Beta-Burkholderiales</i>	<i>Acidimicrobiales</i> <i>Frankiales</i> (<i>Blastococcus</i>) <i>Corynebacteriales</i> (<i>Mycobacterium</i>) <i>Propionibacteriales</i> (<i>Nocardioides</i>) <i>Streptomyces</i> <i>Pseudomonodaceae</i> <i>Rubrobacteria</i> (<i>Gaiella</i>) <i>Thermoleophilia</i>	<i>Vicinamibacter</i> <i>Blastocatellales</i> (<i>Arenimicrobium</i> , <i>Stenotrophobacter</i>) <i>Solibacteriales</i>	Не является доминантой
Старый разлив (7 лет)	<i>Alpha-Sphingomonadeles</i> (<i>Sphingomonas</i> , <i>Altererythrobacter</i>) <i>Rhizobiales</i> <i>Rhodobacteriales</i> <i>Rhodospirillales</i> <i>Gamma-Xanthomonadaceae</i> (<i>Lysobacter</i>) <i>Oceanospirillales</i> (<i>Alcanivorax</i> , <i>Halomonas</i>) <i>Steroidobacter</i>	<i>Frankiales</i> <i>Corynebacteria</i> (<i>Mycobacterium</i> , <i>Dietzia</i>) <i>Propionibacteriales</i> (<i>Nocardioides</i>) <i>Micrococcales</i> <i>Thermoleophilia</i> <i>Rubrobacteria</i> (<i>Gaiella</i>) <i>Acidimicrobiales</i>	Не является доминантой	<i>Flavobacteriales</i> (<i>Salinimicrobium</i> , <i>Gramella</i> <i>Salisentibacter</i>) <i>Cytophagales</i> <i>Sphingobacteria</i>

*красным выделены устойчивые к нефтезагрязнению представители прокариот

Представляется возможным сделать следующие выводы, основываясь на данных, приведенных в таблице. Основными доминантными филумами, выделяемыми в прокариотном сообществе являлись *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* и *Bacteroidetes*. В незагрязненном типичном черноземе *Bacteroidetes* не являются доминантой, ведущую позицию занимают *Proteobacteria*, представленные большей частью Alpha- (*Sphingomonadales*, *Rhizobiales* (*Bradyrhizobium*, *Methobacteraceae*, *Reyranella*, *Skermanella*)) и Beta- протеобактериями (*Burkholderia*). Также доминантами являются *Actinobacteria*, представленные *Frankiales*, *Propionibacteriales* (*Nocardiodaceae*, *Propionibacteriaceae*), *Micrococcales* (*Arthrobacter*) и *Acidobacteria* (*Vicinamibacter*, *Blastocatellales* (*Arenimicrobium*, *Stenotrophobacter*)). В свежем нефтяном разливе ситуация остается примерно такой же, но меняются представители, например, увеличивается разнообразие *Actinobacteria*: *Acidimicrobiales*, *Frankiales* (*Blastococcus*), *Corynebacteriales* (*Mycobacterium*), *Propionibacteriales* (*Nocardioideis*), *Streptomyces*, *Pseudomonodaceae*, *Rubrobacteria* (*Gaiella*), *Thermoleophilia*. Гораздо интереснее ситуация с черноземом типичным под длительным воздействием загрязнения углеводородами (7 лет). Актинобактерии перестают занимать лидирующие позиции, им на смену приходят *Bacteroidetes*, представленные следующими видами: *Flavobacteriales* (*Salinimicrobium*, *Gramella*, *Salisentibacter*), *Cytophagales*, *Sphingobacteria*. Среди актинобактерий выделяются *Frankiales*, *Corynebacteria* (*Mycobacterium*, *Dietzia*), *Propionibacteriales*, *Micrococcales*, *Thermoleophilia*, *Rubrobacteria*, *Acidimicrobiales*. У *Proteobacteria* бета-перестают быть доминантами, а им на смену приходят гаммапротеобактерии, такие как: *Xanthomonadaceae* (*Lysobacter*), *Oceanospirillales* (*Alcanivorax*, *Halomonas*), *Steroidobacter*.

При длительном воздействии загрязнения углеводородами (7 лет) формируется устойчивое сообщество, сформированное из адаптированных к

определенным условиям компонент. Проявляются устойчивые к нефтезагрязнению формы: среди протеобактерий *Sphingomonadeles* и *Rhizobiales*, а среди актинобактерий *Nocardioideis* и *Gaiella*. Данные представители актинобактерий являются не только устойчивыми по отношению к нефтяным загрязнениям, но и проявляют высокий потенциал к борьбе с фитопатогенами, например, *Nocardia* представляется перспективной для химического изучения с целью обнаружения новых противогрибковых антибиотиков (Демьянкова, Садыкова и др., 2020).

3.4 Молекулярно-массовые распределения органического вещества водных и щелочных вытяжек из чернозема типичного до и после обработки нефтью

В качестве дополнительной характеристики влияния нефтезагрязнения на почву для чернозема типичного также были определены некоторые показатели, такие как водорастворимый углерод и молекулярно массовые распределения. Работа по определению молекулярно-массовых распределений веществ в водных и щелочных вытяжках из почв выполнена на жидкостном хроматографе нормального давления BioLogicLP (BioRad) (<https://istina.msu.ru/equipment/card/374679701/>)

Водорастворимый углерод

Содержание водорастворимого углерода было примерно в 2 раза выше в почве, загрязненной нефтью, по сравнению с исходной почвой (таблица 14). В щелочной вытяжке содержание углерода было примерно на порядок больше, чем в водной вытяжке, однако различия между двумя вариантами почв были не значимыми.

Таблица 14 – Содержание водорастворимого углерода (мг/л) в почве и почве, загрязненной нефтью

Образец	Водная вытяжка	Щелочная вытяжка
Почва	17,1 ± 1,2	256,5 ± 33,0
Почва + нефть	34,7 ± 3,3	226,3 ± 43,5

Молекулярно-массовые распределения

Водные вытяжки из исходной почвы и почвы, загрязненной нефтью, содержали один низкомолекулярный пик, а щелочные вытяжки – два пика, соответствующие высокомолекулярной (ВМФ) и низкомолекулярной (НМФ) фракциям. Молекулярные массы середины пика для веществ экстрактов в вариантах с исходной почвой и почвой, загрязненной нефтью, различались незначительно (таблица 15). При калибровке по глобулярным белкам молекулярные массы водорастворимых веществ составляли 12,1 кДа и 11,4 кДа в вариантах с исходной почвой и почвой с нефтью, а при калибровке по полистиролсульфоновым кислотам массы были существенно ниже - 1,6 и 1,5 кДа соответственно. В щелочных экстрактах из исходной почвы и почвы, загрязненной нефтью, присутствовали вещества с массами около 67-71 кДа (ВМФ) и 13 кДа (НМФ), что соответствовало массам 31-35 кДа (ВМФ) и около 2 кДа (НМФ) при калибровке по полистиролсульфоновым кислотам. Таким образом, установлено, что внесение нефти не оказывало существенного влияния на молекулярно-массовые распределения веществ водных и щелочных вытяжек из почв.

Таблица 15 – Молекулярные массы (Да) середины пика для ОВ водных и щелочных вытяжек

Образец	MW (калибровка по белкам)	MW (калибровка по ПСК)
водная вытяжка		
Почва	12100 ± 70	1600 ± 20
Почва + нефть	11400 ± 200	1500 ± 40
щелочная вытяжка		
Почва	67000 (ВМФ); 12500 (НМФ)	31000 (ВМФ); 1700 (НМФ)
Почва + нефть	71000 (ВМФ); 12700 (НМФ)	35000 (ВМФ); 1800 (НМФ)

3.5 Оценка разнообразия и активности прокариотного сообщества загрязненной нефтью торфяной олиготрофной почвы в условиях разного минерального питания

На следующем этапе исследований была проведена оценка разнообразия и активности прокариотного сообщества торфяной олиготрофной почвы, загрязненной нефтью в условиях разного минерального питания. Внесение минеральных солей (источники питания NPK и известь) в почву, загрязненную нефтью, увеличивало биомассу прокариот (таблица 16). Резкое увеличение биомассы прокариот отмечается в вариантах с внесением повышенной дозы минерального питания (N40P50K50) при низкой (0,5 Нг) гидролитической кислотностью. Она достигает значений 130 мкг/г почвы – эти данные в два раза выше тех, которые отмечены в загрязненной почве без внесения солей (вариант КН, нефтезагрязненный).

Таблица 16 – Убыль нефтепродуктов и суммарная биомасса прокариот

Вариант	Убыль НП, %	Количество клеток в 1 г	Биомасса прокариот, мкг/г почвы
КН	2.2	2.91E+09	58.2 ± 2.2*
КН + 0.5Нг	4.2	2.94E+09	58.7 ± 2.03
КН + 0.5Нг + 0.5NPK	6.3	4.28E+09	85.7 ± 2.8
КН + 0.5Нг + 1NPK	11.7	6.53E+09	130.5 ± 2.1
КН + 0.5Нг + б.	7.3	3.14E+09	62.8 ± 2.1
КН + 0.5Нг + 0.5NPK + б.	7.1	4.28E+09	85.6 ± 2.4
КН + 0.5Нг + 1NPK + б.	11	4.67E+09	93.4 ± 2.0
КН + 1Нг	2.8	3.34E+09	66.9 ± 2.9
КН + 1Нг + 0.5NPK	3.8	4.39E+09	87.8 ± 2.3
КН + 1Нг + 1NPK	4.5	3.08E+09	61.6 ± 2.6
КН + 1Нг + б.	7.2	2.75E+09	55.0 ± 2.5
КН + 1Нг + 0.5NPK + б.	7.8	3.12E+09	62.5 ± 2.1
КН + 1Нг + 1NPK + б.	3.1	3.61E+09	72.2 ± 2.3

* Биомасса прокариот приведена в формате: среднее значение ± доверительный интервал.

Однако дополнительное внесение в почву культур бактерий-деструкторов углеводов при наличии минеральных солей не привело к статистически значимому росту биомассы прокариот в образцах.

Похожие результаты получены молекулярно-биологическими методами, такими как ПЦР in real time и FISH. Количество копий генов бактерий и архей достигало максимальных значений в опытных образцах с повышенным уровнем минерального питания и 0,5Нг (бактерии – 1×10^{11} копий гена/мл, архей – 2×10^8 копий гена/мл) (таблица 17).

Таблица 17 – Количество бактериальной и архейной компоненты по 16S рРНК

Вариант	Число копий гена <i>Bacteria</i> /мл	Число копий гена <i>Archaea</i> /мл
КН	2.44E+10	4.54E+07
КН+0.5 Нг	5.07E+10	4.24E+07
КН+0.5Нг+0.5NPK	6.35E+10	9.61E+07
КН+0.5Нг+1NPK*	1.09E+11	1.34E+08
КН+0.5Нг+б.	4.18E+10	4.64E+07
КН+0.5Нг+0.5NPK+б.	8.27E+10	1.16E+08
КН+0.5Нг+1NPK+б.	9.06E+10	3.64E+07
КН+1Нг	2.38E+10	5.39E+07
КН+1Нг+0.5NPK	5.39E+10	2.16E+07
КН+1Нг+1NPK	3.05E+10	3.51E+07
КН+1Нг+б.	2.78E+10	1.12E+08
КН+1Нг+0.5NPK+б.	6.18E+10	1.90E+08
КН+1Нг+1NPK+б.	6.14E+10	2.05E+07

* Число бактериальных копий гена 16S рРНК в сообществе максимально в вариантах с повышенным уровнем минерального питания и нейтрализованной на половину гидролитической кислотностью (1×10^{11} копий гена/мл).

В вариантах с внесением повышенного уровня NPK и нейтрализованной на половину гидролитической кислотностью также отмечается статистически значимое (более, чем в два раза) увеличение биомассы метаболически активных клеток бактерий и архей, в сравнении с вариантами контроля (КН) (рисунок 15, А, Б).

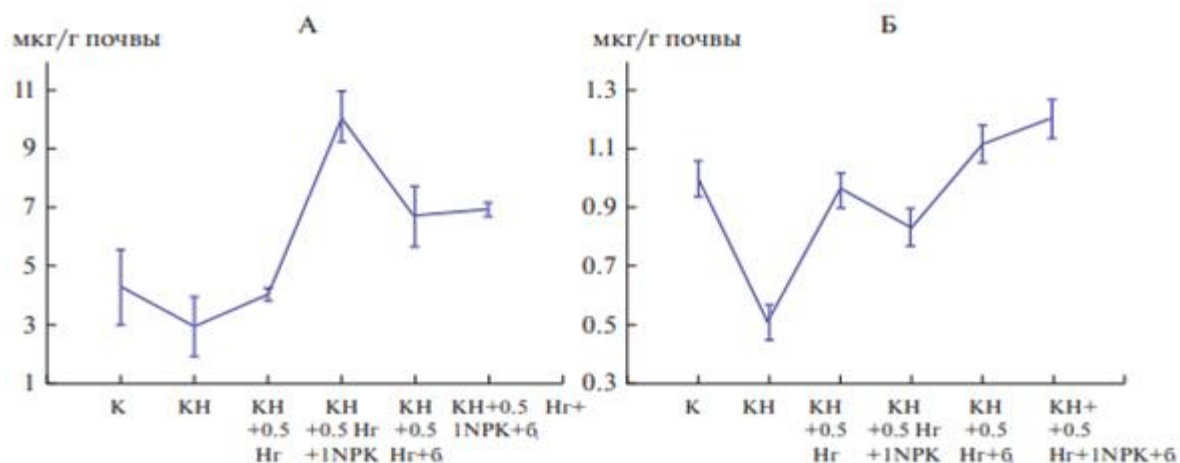


Рисунок 15 – Биомасса метаболически активных клеток *Bacteria* (А) и *Archaea* (Б) в опытных образцах

В загрязненной нефтью торфяной почве, подверженной ремедиации, стоит обратить внимание на вариант с большей дозой минеральных удобрений на фоне неполного известкования, где по результатам метода FISH доминирующей группой в прокариотном комплексе остаются протеобактерии и значительно возрастает доля метаболически активных представителей филума *Actinobacteria* (рисунок 16, А). Биомасса представителей этой группы увеличивается в 2 раза – от 0,5 мкг/г почвы (для варианта с нефтью) до 1,1 мкг/г образца (для почвенного образца с нефтью и удобрением).

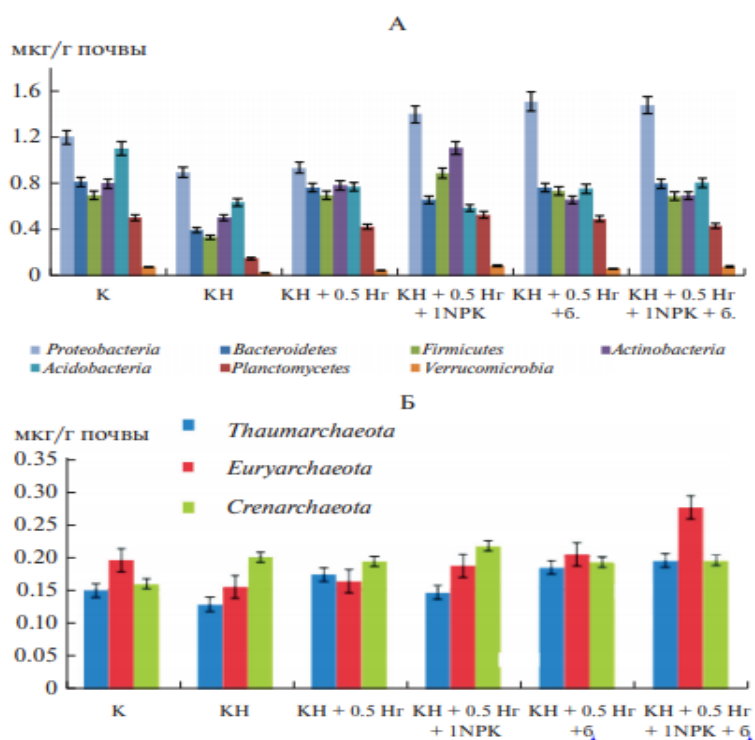


Рисунок 16 – Биомасса метаболически активных представителей различных групп домена *Bacteria* (А) и *Archaea* (Б)

В структуре метаболически активных представителей домена *Archaea* в загрязненных образцах также происходит перестройка комплекса по сравнению с контрольной почвой (рисунок 16, Б). Если в контроле доминирует группа *Euryarchaeota*, то в загрязненной почве – *Crenarchaeota*.

Применение агрохимических средств приводит к восстановлению исходной, схожей с фоновым вариантом структуры.

Таким образом, обнаружено, что внесение в загрязненную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидrolитической кислотности) приводит к возрастанию более чем в два раза биомассы клеток прокариот. Внесение полного минерального удобрения на фоне известкования в загрязненной нефтью почве сопровождается изменением филогенетической структуры и частичным восстановлением метаболически активного прокариотного комплекса.

3.6 Детекция функциональных генов, связанных с деструкцией углеводов (*alkB*, *xylE*, *bssA*) и самовосстановлением систем (*nifH*)

В рамках данной работы были изучены функциональные гены, непосредственно связанные с микроорганизмами-деструкторами углеводов нефти. Помимо изучения филогении прокариотного сообщества почв интересным является обнаружение данного пула генов, так как они отвечают за возможность сообщества к самовосстановлению вследствие нефтяного загрязнения. Оценить наличие функциональных генов можно с помощью RTPCR с использованием специфических праймеров. «Целью таких исследований является корреляция уровней экспрессии генов с показателями *in situ* микроб-опосредованной биогеохимической и биодegradационной активности» (Akob et al., 2008; Chin et al., 2008; Pereyra et al., 2010; Akob et al., 2012).

В образцах чернозема, загрязненного углеводородами нефти, было определено наличие функциональных генов *alkB*, *xylE* кодирующих синтез ферментов алканмонооксигеназы и катехол-диоксигеназы соответственно. Исследования проводили на разные сроки загрязнения поллютантом. В образцах с длительным сроком воздействия углеводов (более 7 лет) отмечалось наибольшее содержание исследуемых генов, в контрольных, незагрязненных вариантах – их наименьшее содержание (рисунки 17, 18). В вариантах свежего нефтяного разлива обнаружено повышенное содержание копий функциональных генов по сравнению с контролем, что может говорить об активной работе метаболически активного микробиологического сообщества, способного к деструкции углеводов.

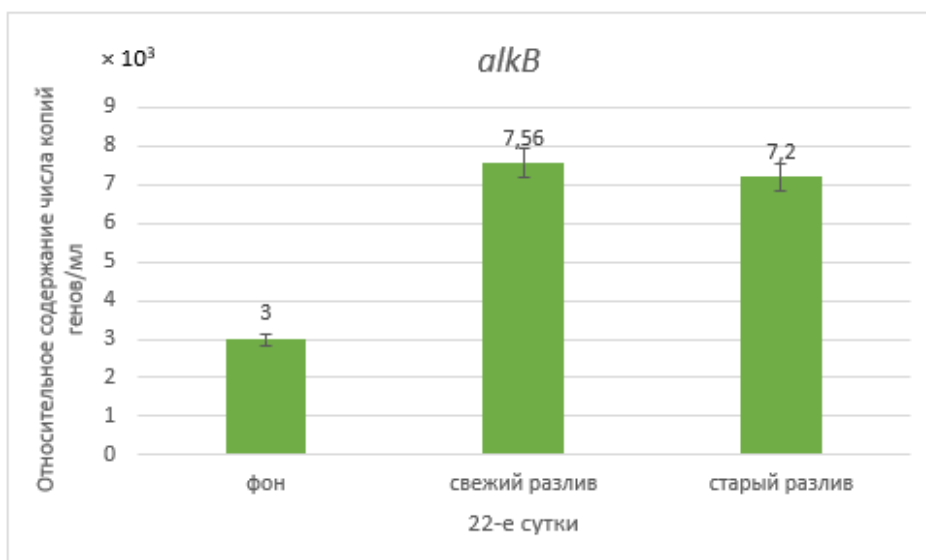


Рисунок 17 - Относительное содержание копий гена *alkB* в почве в ходе сукцессии, инициированной увлажнением

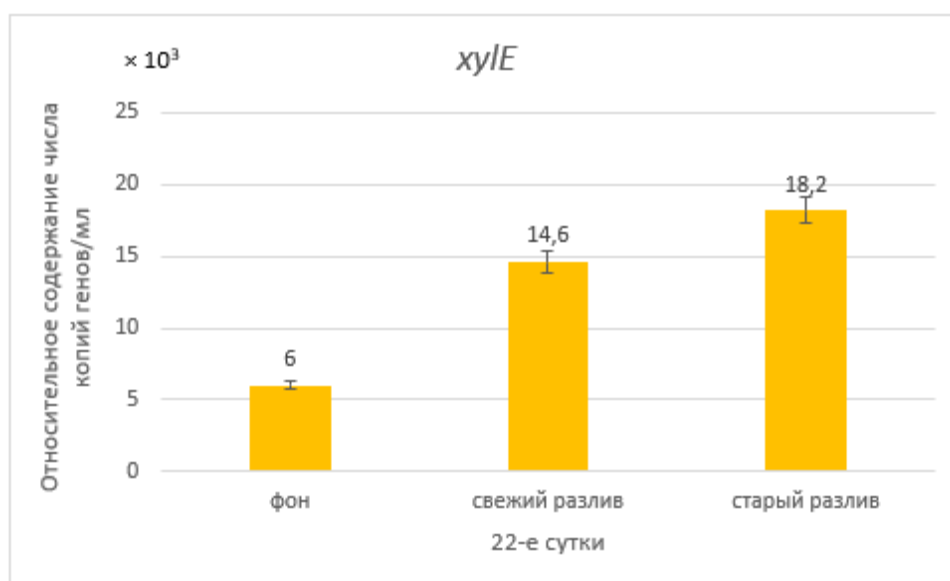


Рисунок 18 - Относительное содержание копий гена *xylE* в почве в ходе сукцессии, инициированной увлажнением

В образцах дерново-подзолистой почвы, загрязненной углеводородами, также определяли содержание числа функциональных генов *alkB*. Была отмечена схожая закономерность: в контрольных вариантах незагрязненной почвы (12 км от завода) наблюдалось пониженное содержание копий по

сравнению с загрязненными территориями (рисунок 19). Причем эта особенность прослеживалась как для дерново-подзолистой почвы под лесом, так и для этой же почвы под лугом.

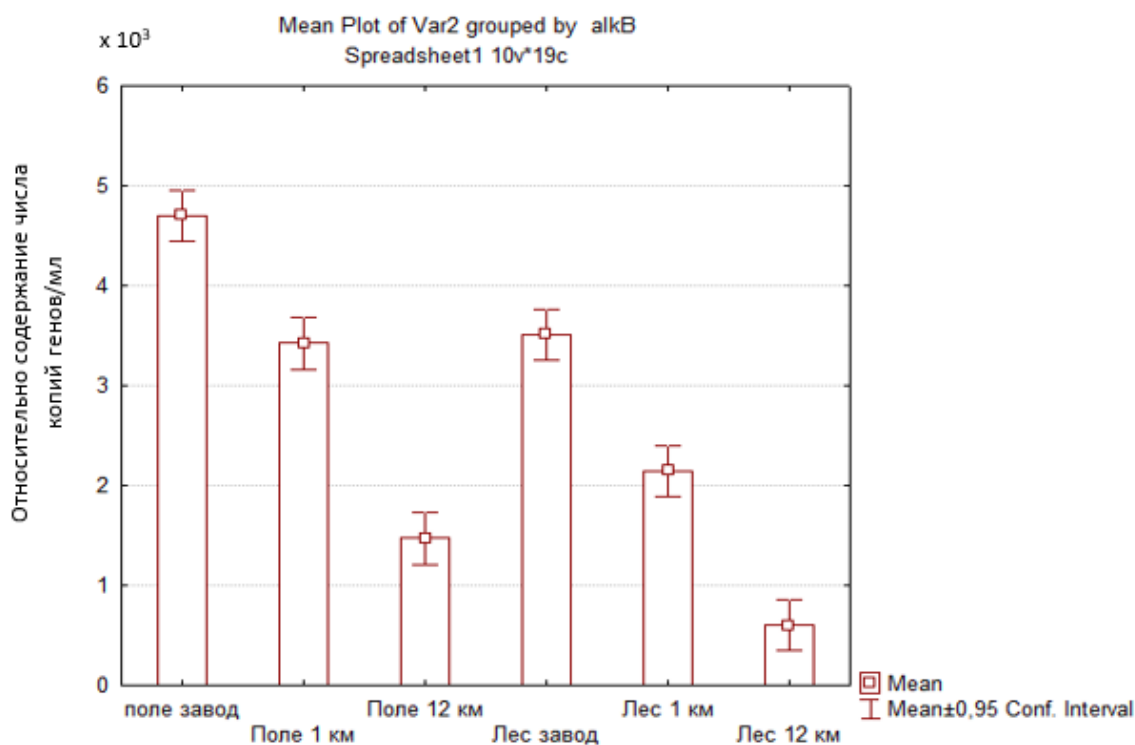


Рисунок 19 - Содержание копий гена *alkB*, кодирующего алкан-монооксигеназу, в исследуемых образцах дерново-подзолистой почвы

Дополнительно был проведен анализ копий функционального гена алкан-монооксигеназы (*alkB*) методом FISH, который показал, что увеличение содержания метаболически активных клеток-носителей гена *alkB* происходило по мере приближения к источнику загрязнения – в 1 километре от завода значения достигали 13-14 мкг/г почвы, при этом подобные клетки содержались во всех изученных образцах, но в почвах контроля их содержание не превышало 7 мкг/г почвы.

Таким образом, во всех исследуемых образцах чернозема и дерново-подзолистой почв определено наличие функциональных генов. В загрязнённых почвах установлен рост копий генов, отвечающих за синтез алкан-монооксигеназы (*alkB*) и катехол-диоксигеназы (*xylE*), в 2–4 раза по сравнению с контролем. На длительных сроках загрязнения наблюдается последствие поллютанта и дальнейшее увеличение численности генов в сравнении со свежим разливом.

Образцы нефтезагрязненного торфа были исследованы на наличие бактериальных генов, указывающих на протекание процессов деградации углеводородов и ремедиации почвенной системы. С точки зрения восстановления нарушенной почвы рассматривали ее способность к самообеспечению азотом. Хорошо известно, что только в результате процесса фиксации молекулярного азота из воздуха бактериальным комплексом возможно микробиологическое снабжение системы азотом. В связи с этим, оценивали наличие в образцах торфа гена *nifH*, ответственного за синтез фермента нитрогеназы. Наличие гена указывает на потенциальную возможность протекания процесса, однако не говорит об интенсивности его протекания в данных условиях.

Во всех рассматриваемых вариантах эксперимента был обнаружен ген *nifH*. Наибольшие значения числа копий генов принадлежали вариантам торфа с полной дозой азотно-фосфорно-калийных удобрений и половинчатой дозой извести и составляло 6×10^7 и 4.8×10^7 копий гена/мл среды, соответственно (рисунок 20).

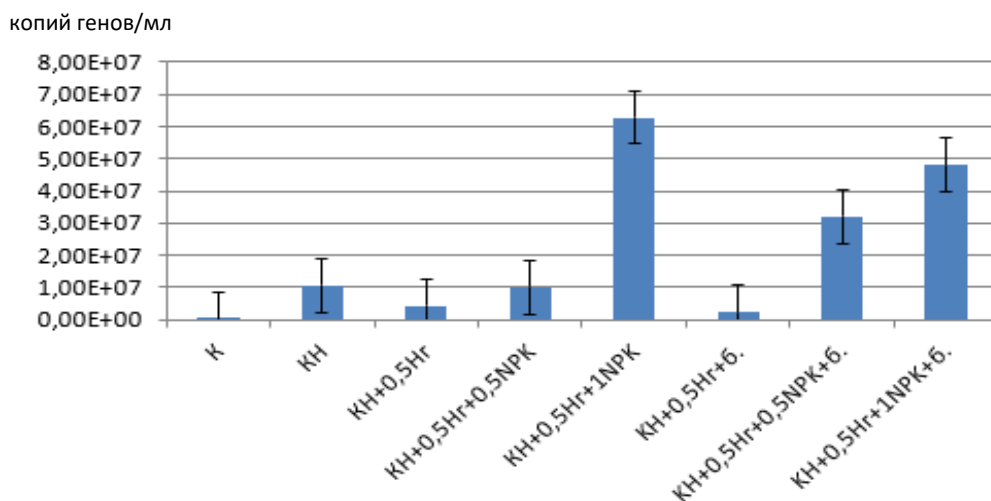


Рисунок 20 - Концентрация генов *nifH* (число копий гена *nifH* /мл среды) в исследуемых образцах

Ген *nifH* в наибольшей концентрации обнаруживается в образцах с максимальной прокариотной численностью и биомассой, маркируя бактерио-азотфиксаторы, чьей ролью является обеспечение системы азотом. Данный этап – один из важнейших этапов ремедиации почв.

В ходе эксперимента в образцах нефтезагрязненного торфа также оценивали наличие генов, отвечающих за начальный этап разрушения циклических углеводов в анаэробных условиях. В частности, при бактериальной деструкции толуола, происходит синтез фермента бензил-сукцинатсинтазы, кодируемой геном *bssA*.

Ген, кодирующий синтез бензил-сукцинатсинтазы, был обнаружен во всех рассматриваемых вариантах опыта. Максимальные значения числа копий генов *bssA* отмечались в варианте с повышенной дозой удобрений и 0,5 гидrolитической кислотности. Следует обратить внимание, что для этого же варианта отмечались наибольшие значения численности метаболически активных клеток (рисунок 21).

копий генов/мл

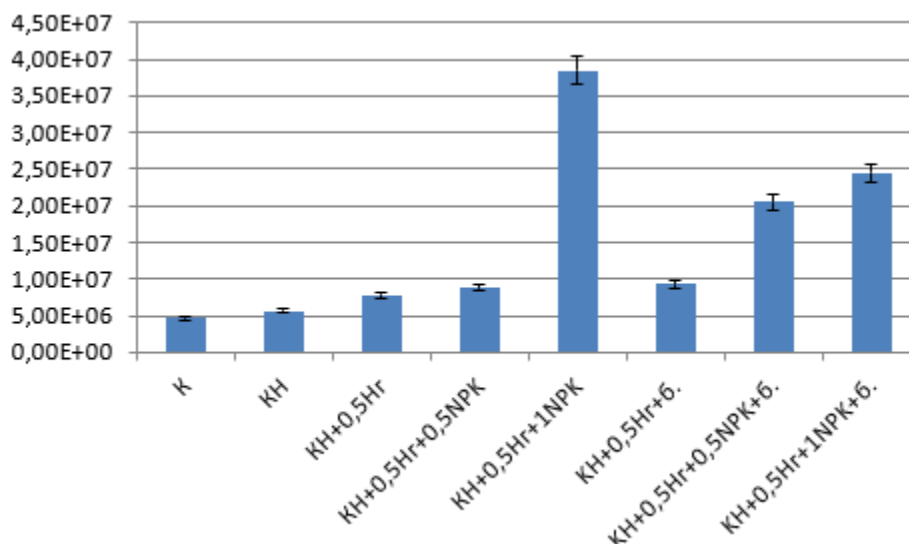


Рисунок 21 - Концентрация генов *bssA* (число копий гена /мл среды) в исследуемых вариантах опыта

Наименьшие значения числа копий (5×10^6 копий гена/мл среды) принадлежали контрольным образцам. По сравнению с контролем, в вариантах с нефтью, несмотря на пониженные значения биомассы клеток в этих вариантах, установлено некоторое увеличение содержания рассматриваемых генов ($3,75 \times 10^7$). Отмеченная закономерность может свидетельствовать о том, что повышенное содержание числа копий гена *bssA* может выступать в качестве показателя индикатора загрязнения.

В начале и по завершении эксперимента в исследуемой торфяной почве определяли содержание нефтепродуктов. На рисунке 18 представлена убыль нефтепродуктов исследуемых образцах. Наименьшее содержание НП и наибольшая их убыль после завершения опыта зафиксирована для варианта с большей дозой минеральных удобрений и неполной дозой мелиоранта (рисунок 22). Таким образом, максимальные значения для числа копий гена *bssA* коррелируют с наибольшей убылью содержания нефтепродуктов в исследуемых вариантах опыта.

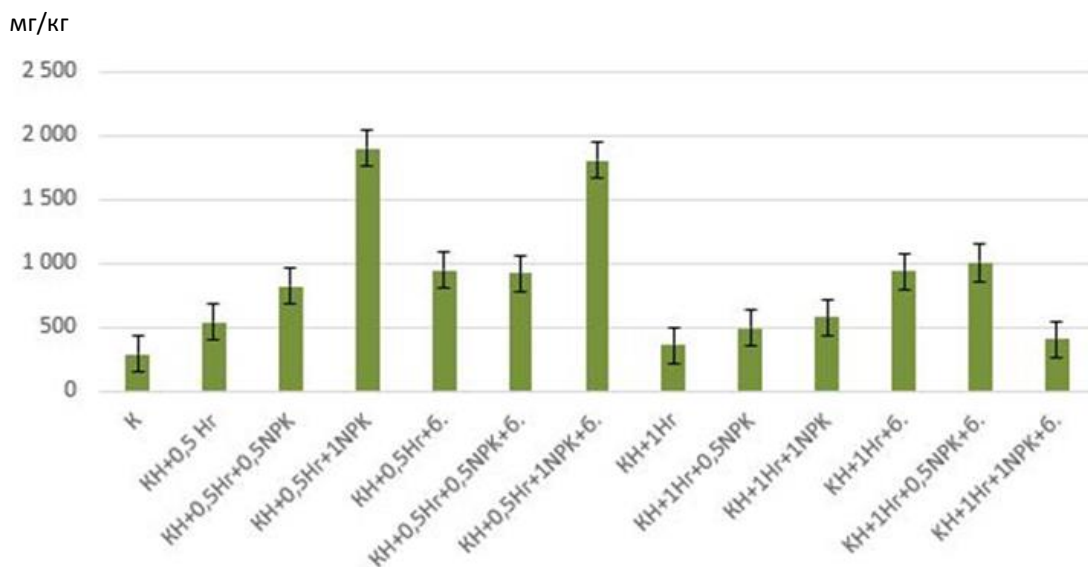


Рисунок 22 - Убыль нефтепродуктов, измеренная после завершения вегетационного опыта, мг/кг почвы

Наибольшие значения числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) для варианта с большей дозой минеральных удобрений на фоне известкования по 0.5 Нг совпадают со значимым уменьшением содержания нефтепродуктов в исследуемых вариантах опыта.

Таким образом, установлено, что внесение в загрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне неполного известкования (0.5 гидrolитической кислотности) приводит к возрастанию более чем в 2 раза биомассы метаболически активных клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) и значимому уменьшению содержания нефтепродуктов. Внесение полного минерального удобрения на фоне известкования в загрязненной нефтью торфяной почве сопровождается изменением филогенетической структуры и частичным восстановлением метаболически активного прокариотного комплекса.

Полученные результаты могут быть полезны при биоиндикации и оценке процесса восстановления загрязненных почвенных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема нефтяного загрязнения окружающей среды углеводородами является одной из важнейших в современном мире. Из-за активной антропогенной деятельности человека огромный массив почв страдает от воздействия сложных углеводородов, меняя при этом свою структуру и свойства.

В литературе имеются сведения, указывающие на формирование биопленок углеводородокисляющими микроорганизмами и переход наиболее эффективных деструкторов в своей биомассе в некультивируемые формы (Shapiro et al., 2021). С помощью методов современной метагеномики были изучены изменения в прокариотном сообществе почв разных типов, происходящие под влиянием нефтяного загрязнения и загрязнения полициклическими ароматическими углеводородами. Были проанализированы как «естественно-загрязненные» почвы, такие как чернозем типичный, каштановая (Волгоградская область), дерново-подзолистая (Московская область), торфяная олиготрофная (Сибирь), так и почвы с внесением нефти в лабораторных условиях в рамках модельного опыта (чернозем, серая-лесная и каштановая). Для каждой из вышеупомянутых почв при загрязнении характерно снижение численности и биомассы метаболически активных представителей прокариотного комплекса по сравнению с незагрязненными системами. Доля метаболически активных компонент от всех выявляемых клеток прокариот в образцах гумусовых горизонтов рассматриваемых загрязненных зональных почв (чернозем, серая лесная, каштановая) сокращалась до 30 %, для образцов исследованного торфа, загрязненного нефтью, она составляла 10 % от всего выявляемого прокариотного сообщества.

В процессе микробной сукцессии снижается микробное разнообразие и происходит смена доминант. Происходят адаптация и кардинальная перестройка структуры функционального сообщества, выражающиеся в

развитии популяций микроорганизмов, перерабатывающих углеводороды и потребляющих значительное количество азота (Звягинцев и др., 2002; Узких и др., 2009). Формируется специфический прокариотный комплекс. Установлены чувствительные и устойчивые к нефтяному загрязнению представители прокариотного комплекса почв. Выявлено, что в доминанты выходит автохтонная микрофлора, специфичная для каждой почвы. Для образцов нефтезагрязненных почв южных широт доминирующая роль принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт – протеобактериям. Таким образом, тип почвы и экологические факторы оказывали координирующее влияние на развитие доминантных компонент гидролитического комплекса. В образцах нефтезагрязненного торфа определяются хемолитоавтотрофы, отвечающие за деградацию ароматических соединений.

Условно представляется возможным поделить процесс разложения нефтепродуктов на 3 этапа, каждому из которых свойственны определенные изменения в углеводородном составе. Ориентировочно через четыре года после попадания углеводородов в почву система характеризуется высокой концентрацией смолисто-асфальтеновых фракций, при этом происходит снижение количества соединений ароматического ряда (Солнцева и др, 1985; Оборин и др., 1988; Макарова, 2000; Одинцова, 2003). В настоящей работе было определено влияние времени, прошедшего с момента попадания в почву углеводородов нефти, на структуру прокариотного сообщества. По прошествии 7 лет после нефтеразлива бактериальное разнообразие продолжает сокращаться. Выявлены устойчивые и чувствительные к нефтезагрязнению представители филумов. К устойчивым среди филума *Actinobacteria* относятся рода *Gaiella* и *Arthrobacter*.

В образцах загрязнённого чернозема и дерново-подзолистой почвы установлен рост копий генов, отвечающих за синтез алкан-монооксигеназы (*alkB*) и катехол-диоксигеназы (*xylE*), в 2–4 раза по сравнению с контролем.

На длительных сроках загрязнения наблюдается последствие поллютанта и дальнейшее увеличение численности генов в сравнении со свежим разливом. Механизм работы гена *xylE* хорошо изучен на плазмиде TOL, выделенной из *Pseudomonas putida*, чаще обнаруживается у грамм- прокариот, однако он также встречается и у грам+ бактерий родов *Arthrobacter* и *Rhodococcus*. (Burlage et al., 1989; Ramos et al., 1997; Hendrickx et al., 2006). Алкан - монооксигеназа (*alkB*) катализирует начальную стадию деструкции алканов, данный фермент окисляет концевые метильные фрагменты углеводородной цепи до спиртов. Однако существует сложность в оценке потенциала биодеструкции алканов, так как разнообразие генов *alkB* велико и может различаться даже в пределах одного вида. В литературе отмечается, что нет четкой корреляции между процессами деградации нефтяных поллютантов и количеством экспрессирующихся генов *alkB* (Whyte et al., 1996; Paisse et al., 2011).

В настоящее время идет активная борьба с нефтезагрязнениями и обсуждаются дальнейшие возможности ремедиации почв с поллютантами. Биостимуляция включает внесение источников азота, фосфора, калия, акцепторов электронов и воды для стимуляции активности автохтонного микробного сообщества, тогда как биоаугментация предполагает внесение экзогенных микроорганизмов для увеличения активности целевой группы. Часто оба метода используются одновременно. Деградация нефти происходит под воздействием почвенных микробных сообществ вследствие “самоочищающей способности” почв (Sutton et al., 2013). В рамках данной работы было выяснено, что внесение в нефтезагрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидролитической кислотности) приводит к возрастанию биомассы клеток прокариот более, чем в 2 раза. Увеличивается число копий функциональных генов *bssA* и *nifH*, которые отвечают за деструкцию углеводородов нефти и восстановление почв. Благодаря внесению удобрений с соблюдением

определенных требований происходит частичное восстановление метаболически активного прокариотного комплекса.

В связи со всем вышесказанным можно прийти к выводу, что ремедиация почв, загрязненных углеводородами, является процессом сложным, в связи со сложностью строения углеводородов, однако, с помощью современных методов молекулярной биологии, открываются новые пути для решения стоящей перед учеными задачи по восстановлению потенциала нефтезагрязненных почв и их дальнейшему введению в сельскохозяйственный оборот.

ВЫВОДЫ

1. В почвах, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами установлено уменьшение численности и биомассы метаболически активных клеток прокариот по сравнению с незагрязненными почвами. Доля метаболически активных компонентов от всех выявляемых клеток прокариот сокращалась до 30 % для образцов гумусовых горизонтов загрязненных зональных почв (чернозем, каштановая, серая лесная, дерново-подзолистая), для образцов исследованного торфа, загрязненного углеводородами, она составляла 10% от всего выявляемого прокариотного сообщества.
2. Установлено снижение микробного разнообразия и смена метаболически активных доминантов доменов *Bacteria* и *Archaea* в почвах, загрязненных нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами, по сравнению с контрольными образцами. Определено формирование специфического комплекса бактерий с доминантами определенных родов автохтонной микрофлоры, различающихся в зависимости от типа почв. Для образцов нефтезагрязненных почв южных широт доминирующая роль принадлежала представителям актинобактерий, для почв центральной и северной широт – протеобактериям.
3. В почвах, загрязнённых нефтью и полициклическими ароматическими углеводородами, на фоне снижения биомассы метаболически активных прокариот по сравнению с контролем наблюдается увеличение содержания функциональных генов, отвечающих за синтез катехол-диоксигеназы (*xyIE*), алкан-монооксигеназы (*alkB*) и бензил-сукцинатсинтазы (*bssA*), маркирующих начальный этап деградации углеводородов.
4. При долгосрочном влиянии поллютанта (7 лет после разлива нефти) в образцах чернозема выявлен рост содержания копий функциональных

генов, кодирующих синтез ферментов катехол -2, 3 – диоксигеназы (*xylE*) и алкан-монооксигеназы (*alkB*) при одновременном снижении бактериального разнообразия.

5. Внесение в загрязненную торфяную почву полного минерального удобрения (N40P50K50) на фоне известкования (1/2 гидrolитической кислотности) приводит к возрастанию более чем в 2 раза биомассы клеток прокариот, числа копий функциональных генов (*bssA* и *nifH*) и значимому уменьшению содержания нефтепродуктов. Внесение полного минерального удобрения на фоне известкования в загрязненную нефтью торфяную почву сопровождается изменением филогенетической структуры и частичным восстановлением метаболически активного прокариотного комплекса.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю Манучаровой Н. А. за помощь в выборе тематики исследований, ценные советы, помощь в подготовке диссертации и поддержку на всех этапах работы. Автор благодарен Арзамазовой А.В. за помощь в проведении агрохимических анализов и опыта с внесением минеральных удобрений и Заварзиной А.Г. за помощь в измерении молекулярно-массовых распределений органического вещества водных и щелочных вытяжек и работу на жидкостном хроматографе нормального давления BioLogicLP (BioRad) (<https://istina.msu.ru/equipment/card/374679701/>). Автор выражает благодарность всему научно-педагогическому составу кафедры биологии почв факультета почвоведения ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» и лаборатории микробиологии почв ФГБНУ ФИЦ «Почвенный институт имени В.В.Докучаева», а именно Семенову М.В., Тхакаховой А.К., Никитину Д.А., Кутовой О.В., Железовой А.Д., Ивановой Е.А. за их ценные советы и неоценимую поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехин, В. Г., Емцев, В. Т., Рогозина, Е. А., Фахрутдинов, А. И. Биологическая активность и микробиологическая рекультивация почв, загрязненных нефтепродуктами //Биологические ресурсы и природопользование: Сборник научных трудов. Нижневартовск. – 1998. – №. 2.
2. Аниськина М. В. Влияние бензина на высокочувствительный растительный тест-объект *Tradescantia* (clon 02) //Актуальные проблемы биологии и экологии. – 2007. – С. 11-15.
3. Арзамазова А. В., Кинжаев Р. Р., Брыковская Н. Н. Особенности минерального питания трав-ремедиантов в зависимости от степени загрязнения почв нефтепродуктами //Агрехимия. – 2015. – №. 11. – С. 71-78.
4. Бабкина В. Л. Влияние нефтезагрязнения почвы на структуру популяций клещей-орibatид //Наука и образование XXI века: сборник тезисов докладов II окружной конференции молодых ученых ХМАО. Ч. – 2001. – Т. 1. – С. 3-5.
5. Баженова, О. К., Бурлин, Ю. К., Соколов, Б. А., Хаин, В. Е. Геология и геохимия нефти и газа. Учебник. – Москва, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова. – 2012. – 432 С.
6. Бакиров А. А., Бородулина М. В. Геология и геохимия нефти и газа: Учебное пособие. – Москва, Недра, - 1982. – 288 С.
7. Белюченко И. С. Сложный компост и детоксикация агроландшафтных систем // Научный журнал КубГАУ -. 2014. - №97. - С.86-96.
8. Бондаренко В. В., Шигапов А. М. Биосферосовместимые технологии защиты окружающей среды от нефтепродуктов //Материалы Всероссийской научно-практической конференции: Современное российское общество: проблемы развития. М. – 2013. – С. 235-242.

9. Брод И. О. Основы геологии нефти и газа. Издание третье //Москва: Гостоптехиздат. – 1957. – С. 426-455.
10. Булатов, В. И., Калюжная, Т. А., Кузубова, Л. И., Лаврик, О. Л. Радиоактивные отходы: экологические проблемы и управление. Правовые, организационные и экономические аспекты //Экология. Серия аналитических обзоров мировой литературы. – 1999. – №. 51. – С. 1-130.
11. Бызов Б. А., Гузев В. С., Звягинцев Д. Г. Особенности пролонгированной катаболической репрессии в почве //Вест. МГУ. Сер. – 1988. – Т. 17.
12. Винник В. В. Влияние влажности субстрата на выживаемость дождевых червей в нефтезагрязненных почвах //XXXIV научно-техническая конференция по результатам работы профессорско-преподавательского состава, аспирантов и студентов СевКавГТУ за. – 2004. – С. 54.
13. Водопьянов В. В. Математические модели и методы анализа восстановления биосистем, подверженных антропогенным воздействиям (на примере восстановления нефтезагрязненных почв) //Уфа.–48 с. – 2008.
14. Воробьева, Л. А., Ладонин, Д. В., Лопухина, О. В., Рудакова, Т. А., Кирюшин, А. В. Химический анализ почв. Вопросы и ответы. М. 2011.–186 с.
15. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. Ред. Глазовская М.А., М.: Наука, 1988. - 254 с.
16. Габриэлянц Г. А. Геология нефтяных и газовых месторождений //М.: Недра. – 2003. – С. 65.

17. Галиулин Р. В., Галиулина Р. А., Башкин В. Н. Диагностика ремедиации почвы, загрязненной углеводородами // Территория Нефтегаз. – 2011. – №. 10. – С. 64-67.
18. Галкин В. И. Г16 Геология нефти и газа: учебно-метод. пособие. – Пермь, Издательство Пермского национального исследовательского политехнического университета. – 2011. – 113 С.
19. Геннадиев А.Н, Чернянский С.С, Ковач Р.Г. Сферические магнитные частицы как микрокомпоненты почв и трассеры массопереноса // Почвоведение.- 2004.- №5.- С. 566-580.
20. Геннадиев, А. Н., Пиковский, Ю. И., Цибарт, А. С., Смирнова, М. А. Углеводороды в почвах: происхождение, состав, поведение (обзор) // Почвоведение. – 2015. – №. 10. – С. 1195-1195.
21. Глушков А.Н. Канцерогенез: основные понятия, источники и классификация канцерогенов // Медицина в Кузбассе.- 2003.- № 2.- С 8-13.
22. Голованов А. И., Зимин Ф. М., Сметанин В. И. Рекультивация нарушенных земель. – Москва, «КолоСС» - 2009. – 325 С.
23. ГОСТ Р ИСО 22030-2009 Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений (Переиздание) от 15 декабря 2009
24. Григориади А. С. Оценка эффективности применения биопрепаратов и фитомелиорантов в биоремедиации нефтезагрязненных почв // Дисс... к. б. н. Уфа. – 2010.
25. Гриценко А. И., Аكوпова Г. С., Максимов В. М. Экология. Нефть и газ. – Москва, «Наука» - 1997. – 598 С.
26. Губкин И. М. Учение о нефти. – Москва, «Наука» - 1975. – 384 С.
27. Гузев В. С., Бызов Б. А. Звягинцев Н. Д., Звягинцев Д. Г. Эффект задержки в регуляции микробного разложения полимеров в почве по

- типу катаболитной репрессии //Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1986. – №. 6. – С. 834.
28. Гузев В. С., Левин С. В. Техногенные изменения сообщества почвенных микроорганизмов //Материалы конференции:«Перспективы развития почвенной биологии». М.: МАКС-Пресс. – 2001. – С. 178-219.
29. Гуславский А. И., Канарская З. А. Перспективные технологии очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов //Вестник Казанского технологического университета. – 2011. – №. 20. – С. 191-199.
30. Демьянкова, М. В., Садыкова, В. С., Глухова, А. А., Бойкова, Ю. В., Малкина, Н. Д., Ефименко, Т. А., Иванкова Т.Д., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Изыскание продуцентов природных противогрибковых антибиотиков, активных в отношении фитопатогенных грибов //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2020. – №. 159. – С. 147-164.
31. Денисова, А. П., Архипова, Н. С., Халилова, А. Ф., Зарипова, С. К., Бреус, В. А., Бреус, И. П. Влияние загрязнения дизельным топливом на устойчивость культур и биологическую активность выщелоченного чернозема //Агрохимия. – 2011. – №. 2. – С. 41-50.
32. Евдокимова Г. А., Корнейкова М. В., Мязин В. А. Оценка динамики выноса газового конденсата из Al-Fe-гумусового подзола и его воздействие на комплексы почвенных грибов //Почвоведение. – 2013. – №. 3. – С. 343-343.
33. Евдокимова, Г. А., Маслобоев, В. А., Губкина, Т. Г., Мязин, В. А., Фокина, Н. В., Украинская, К. В. Биоремедиация загрязненных нефтепродуктами почв в субарктическом регионе // Проблемы безопасности и эффективности освоения георесурсов в современных условиях. – 2014. – С. 146-149.

34. Елин Е. С. Биогеохимическая трансформация нефти-загрязнителя и болотного биогеоценоза при их взаимодействии //Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. – 2002. – Т. 3. – С. 153.
35. Железова, А. Д., Кутовая, О. В., Дмитренко, В. Н., Тхакахова, А. К., Хохлов, С. Ф. Оценка количества ДНК разных групп микроорганизмов в генетических горизонтах темно-серой почвы //Бюллетень Почвенного института им. ВВ Докучаева. – 2015. – №. 78. – С. 87-98.
36. Затучная Б. М. Некоторые результаты моделирования процесса распада нефти в морской среде //Труды гоИН. – 1975. – №. 127. – С. 46-54.
37. Звягинцев Д. Г., Зенова Г. М. Экология актиномицетов. – Москва, «ГЕОС» - 2001. – 256 С.
38. Зейферт Д. В., Гамерова Л. М. Характер зависимости между концентрацией нефти в почве и ее токсичностью //Экологический вестник России. – 2012. – №. 12. – С. 10-13.
39. Зенова, Г. М., Степанов, А. Л., Лихачева, А. А., Манучарова, Н. А. Практикум по биологии почв //М.: Изд-во МГУ. – 2002. – 120 С.
40. Ибламинов Р. Г. Минерагеодинамика нефтегазоносных бассейнов //Вестник Пермского университета. Геология. – 2007. – №. 4. – С. 8-25.
41. Иларионов, С. А., Иларионова, С. Ю., Назаров, А. В., Калачникова, И. Г. Восстановление почвенного биоценоза, подвергнутого нефтяному загрязнению //Письма в международный научный журнал "Альтернативная энергетика и экология". – 2005. – №. 1. – С. 56-59.
42. Исмаилов Н. М., Пиковский Ю. И. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель //Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука. – 1988. – С. 222-236.
43. Казанцева М. Н., Казанцев А. П., Гашев С. Н. Характеристика нефтяного загрязнения территории Мамонтовского месторождения

- нефти //Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. Тюмень. – 2001. – №. 2. – С. 86-90.
44. Казанцева М. Н., Размахнина Г. А. Особенности ответных реакций на слабое нефтяное загрязнение суходольных и заболоченных сосняков южной тайги Западной Сибири //Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. – 2012. – №. 12. – С. 42-48.
45. Казиахмедова И. А. Методы биоиндикации в оценке состояния нефтезагрязненных земель //Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований. – 2009. – Т. 4. – С. 106-108.
46. Киреева Н. А., Ямалетдинова Г. Ф. Фенолоксидазная активность нефтезагрязненных почв //Вестник Башкирского университета. – 2000. – Т. 1. – С. 48-51.
47. Киреева, Н. А., Водопьянов, В. В., Григориади, А. С., Онегова, Т. С. Моделирование процессов биоремедиации нефтезагрязненных почв //Окружающая среда и устойчивое развитие регионов: новые методы и технологии исследований. – 2009. – Т. 3. – С. 40-43.
48. Кирсанов А. Д., Орлова Е. Е., Иванова А. В. Изменение биологической активности дерново-подзолистой почвы при повторном загрязнении нефтью //Антропогенная трансформация природной среды. – 2010. – №. 1. – С. 364-366.
49. Козлов К. С. Дождевые черви (*Lumbricus rubellus*)–биоиндикационный тест почв, загрязненных нефтью //Всероссийская научно-техническая конференция «Наука и образование-2003»: материалы конференции. Ч. – 2003. – Т. 4. – С. 92-94.
50. Кокорина Н. Г. Исследования эффективности испарения нефтепродуктов из загрязненных почв //IX Научно-практическая

- конференция профессорско-преподавательского состава. ВПИ (филиал) ВолгГТУ: сборник материалов.–Волжский. – 2010. – С. 34-35.
51. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) //Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32. – №. 6. – С. 579-585.
52. Коронелли Т. В., Фадеева Н. И. Культивирование туберкулезных и условно-патогенных микобактерий на среде с n-алканами //Проблемы туберкулеза. – 1986. – Т. 9. – С. 44-46.
53. Крылов А.И., Лопушанская Е.М., Александрова А.Г., Конопелько Л.А.. Определение полиароматических углеводов методом газовой хроматографии- масс-спектрометрии с изотопным разбавлением (ГХ/МС/ИР) // Аналитика.- 2012.- №3.- С.6-16.
54. Кузьмин Е. В. Скорость закапывания и выживаемость дождевых червей в условиях нефтяного загрязнения различной интенсивности //Актуальные проблемы экологии Ярославской области: Материалы Четвёртой науч.-практич. конференции. – 2008. – №. 4. – С. 297-301.
55. Кулагин Н. В., Архипова Н. С., Бреус И. П. Оценка фитотоксичности УВ разной химической природы при их прямом контакте с семенами и опосредованно через почву //Филология и культура. – 2011. – №. 26. – С. 70-75.
56. Лебедева Е.А. Охрана воздушного бассейна от вредных технологических и вентиляционных выбросов: Учебное пособие.- Н.Новгород: Нижегород. гос. архит.-строит. ун-т, 2010.- 196 с.
57. Леднев А. В. Изменение свойств дерново-подзолистых суглинистых почв под действием загрязнения продуктами нефтедобычи и приемы их рекультивации //И.: ВГСХА. – 2008.
58. Лобакова, Е. С., Васильева, С. Г., Дольникова, Г. А., Кашеева, П. Б., Дедов, А. Г. Изучение иммобилизации ассоциации бактерий-

- нефтедеструкторов на полимерных материалах различной химической природы //Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2014. – №. 4. – С. 36-42.
59. Логинов, О. Н., Силищев, Н. Н., Бойко, Т. Ф., Галимзянова, Н. Ф., Гоготов, И. Н., Дзержинская, И. С., Киреева, Н. А. Биорекультивация: микробиологические технологии очистки нефтезагрязненных почв и техногенных отходов. – Москва, «Наука» - 2009. – 112 С.
60. Лодыгин Е.Д, Чуков С.Н, Безносилов В.А, Габов Д.Н. Полициклические ароматические углеводороды в почвах Васильевского острова (Санкт-Петербург) // Почвоведение.- 2008.- №12.- С. 1494-1500.
61. Лысак Л. В., Добровольская Т. Г. Бактерии в почвах тундры Западного Таймыра //Почвоведение. – 1982. – №. 9. – С. 74.
62. Максимова, Е. Ю., Цибарт, А. С., Абакумов, Е. В Полициклические ароматические углеводороды в почвах, пройденных верховым и низовым пожаром //Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – Т. 15. – №. 3. – С. 63-68.
63. Мальцева, А. К., Бакиров, Э. А., Ермолкин, В. И., Ларин, В. И., Каламкарлов, Л. В., Рожков, Э. Л. Геология нефти и газа и нефтегазоносные провинции //М.: Госуд. Академия нефти и газа им. ИМ Губкина. – 1998. – 240 С.
64. Манучарова, Н. А., Ксенофонтова, Н. А., Белов, А. А., Каменский, Н. Н., Арзамазова, А. В., Зенова, Г. М., Кинжаев Р.Р., Трофимов С.Я., Степанов А.Л. Прокариотный компонент нефтезагрязненной торфяной олиготрофной почвы при разном уровне минерального питания //Почвоведение. – 2021. – №. 1. – С. 80-89.
65. Манучарова, Н. А., Ксенофонтова, Н. А., Каримов, Т. Д., Власова, А. П., Зенова, Г. М., Степанов, А. Л. Изменение филогенетической

- структуры метаболически активного прокариотного комплекса почв под влиянием нефтяного загрязнения //Микробиология. – 2020. – Т. 89. – №. 2. – С. 222-234.
- 66.Медведева А.В. Микробная деградация полициклических ароматических углеводородов // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская.- 2013.- № 5.
67. Морозов Н. В., Лыкова Е. В. Оптимизация процесса восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами //Современные наукоемкие технологии. – 2005. – №. 11. – С. 50-50.
68. Мстиславская Л. П., Филиппов В. П. Геология, поиски и разведка нефти и газа. – Москва, «ЦентрЛитНефтеГаз» - 2012. – 200 С.
69. Мязин В. А. Разработка способов повышения эффективности биоремедиации почв Кольского Севера при загрязнении нефтепродуктами (в условиях модельного эксперимента) : дис. – Петрозаводск : дис.... канд. биол. наук, 2014.
70. Надыкта В., Негри К. Ремедиация почв, загрязненных углеводородами нефти //Биотехнология и бизнес. – 2008. – Т. 4.
71. Назаров А. В., Иларионов С. А. Изучение причин фитотоксичности нефтезагрязненных почв //Письма в международный научный журнал "Альтернативная энергетика и экология". – 2008. – №. 1. – С. 60-65.
72. Назаров, А. В., Ананьина, Л. Н., Ястребова, О. В., Плотникова, Е. Г. Влияние нефтяного загрязнения на бактерии дерново-подзолистой почвы //Почвоведение. – 2010. – №. 12. – С. 1489-1493.
73. Назина, Т. Н., Соколова, Д. Ш., Бабич, Т. Л., Семёнова, Е. М., Ершов, А. П., Биджиева, С. Х., Борзенков И.А., Полтараус А.Б., Хисаметдинов М.Р., Турова Т.П. Микроорганизмы низкотемпературных месторождений тяжелой нефти (Россия) и возможность их применения

- для вытеснения нефти //Микробиология. – 2017. – Т. 86. – №. 6. – С. 748-761.
74. Назина, Т. Н., Шестакова, Н. М., Григорьян, А. А., Михайлова, Е. М., Турова, Т. П., Полтараус, А. Б., Фен Циньсян, Ни Фантиан, Беляев С.С. Филогенетическое разнообразие и активность анаэробных микроорганизмов высокотемпературных горизонтов нефтяного месторождения Даган (КНР) //Микробиология. – 2006. – Т. 75. – №. 1. – С. 70-81.
75. Никифорова Е. М. Прогнозные ландшафтно-геохимические карты возможности деградации природной среды при добыче и транспортировке нефти //Проблемы антропогенных воздействий на окружающую среду.–М.: Наука. – 1985. – С. 45-51.
76. Никифорова Е.М, Кошелева Н.Е. Полициклические ароматические углеводороды в городских почвах (Москва, Восточный округ) // Почвоведение.- 2011.- №9.- С.1114-1127.
77. Оборин, А. А., Калачникова, И. Г., Масливец, Т. А., Базенкова, Е. И. Самоочищение и рекультивация нефтезагрязненных почв Предуралья и Западной Сибири //Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука. – 1988. – С. 140-158.
78. Одинцова Т. А. Эколого-геохимические аспекты трансформации органического вещества нефтезагрязненных геосистем //Моделирование стратегии и процессов освоения георесурсов – 2003. – С. 241-245.
79. Петухова Г. А., Калашникова И. А. Эколого-генетическая характеристика влияния нефтяного загрязнения на растительные и животные тест-объекты //Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности: сборник тезисов международного экологического конгресса. – 2000. – Т. 2. – С. 334.

80. Пиковский Ю. И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде. – Москва, Изд-во МГУ. - 1993. – 208 С.
81. Пиковский Ю. И. Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах //Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука. – 1988. – С. 7-22.
82. Пиковский Ю. И., Солнцева Н. П. Геохимическая трансформация дерново-подзолистых почв под влиянием потоков нефти //Техногенные потоки вещества в ландшафтах и состояние экосистем. М.: Наука. – 1981. – С. 149.
83. Пиковский, Ю. И., Геннадиев, А. Н., Краснопеева, А. А., Пузанова, Т. А. Углеводородные геохимические поля в почвах района нефтяного промысла //Вестник Московского университета. Серия 5. География. – 2009. – №. 5. – С. 28-34.
84. Плотникова И. Н. Зоны разуплотнения кристаллического фундамента Волго-Уральской антеклизы как потенциальные нефтепоисковые объекты. – канд. Диссертация, Казанский государственный университет, - 2006.
85. Полонский В. И., Полонская Д. Е. Причины разнонаправленного действия нефтезагрязненной почвы на прорастание семян //Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: тезисы докладов международной конференции.–М.: Бином. Лаборатория знаний. – 2013. – С. 168.
86. Попов И. П., Запывалов Н. П. Флюидодинамические модели залежей нефти и газа. – Новосибирск, «Гео» - 2013.- 198 С.
87. Пунтус, И. Ф., Филонов, А. Е., Ахметов, Л. И., Карпов, А. В., Боронин, А. М. Деградация фенантрена бактериями родов *Pseudomonas* и *Burkholderia* в модельных почвенных системах //Микробиология. – 2008. – Т. 77. – №. 1. – С. 11-20.

88. Реймерс Н. Ф. Азбука природы. – Москва, «Знание» - 1980. – 208 С.
89. Салангинас Л. А. Изменение агрохимических и агрофизических характеристик почвы под влиянием нефтяного загрязнения //Биологическая рекультивация нарушенных земель: мат-лы междунар. совещания. Екатеринбург: УрО РАН. – 2003. – С. 278-283.
90. Сидоров А. А. Опыт применения центрифуги при бурении скважин на месторождениях Западной Сибири //Реф. науч.-тех. Сб. ВНИИОЗН. Сер. Бурение. – 1983. – С. 12.
91. Славнина Т. П., Трофимов, С. С., Щербинин, В. И., Реймхе, В. В., Гаджиев, И. М., Гармаш, Г. А., Ильин, В. Б., Изерская Л.А., Кандрашин Е.Р., Кахаткина М.И., Фаткулин Ф.А., Хмелев В.А., Шушуева М.Г. Загрязнение нефтью и нефтепродуктами //Основы использования и охраны почв Западной Сибири. – 1989. – С. 186-206.
92. Словарь по геологии и геохимии нефти и газа / К.А. Черникова // Л.: Недра, - 1988. - 679 с.
93. Солнцева Н. П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. – Москва, Издательство МГУ, - 1998. -376 С.
94. Солнцева, Н. П., Пиковский, Ю. И., Никифорова, Е. М., Оборин, А. А., Калачникова, И. Г., Шилова, И. И., Артемьева, Т. И. Проблемы загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами: геохимия, экология, рекультивация //Докл. симпозиумов VII делегатск. съезда Всес. общества почвоведов, 9-13 сент. – 1985. – Т. 1985. – С. 246.
95. Сорокин Н. А., Урсегов С. О. Защита почвы и воды от разлившейся нефти углеродсодержащими материалами //Нефть и газ. – 1997. – №. 2. – С. 140.
96. Соромотин А. В. Влияние нефтяного загрязнения на почвенных беспозвоночных (мезофауны) в таежных лесах Среднего Приобья //Сибирский экологический журнал. – 1995. – Т. 2. – №. 6. – С. 15-18.

97. Толпешта, И. И., Трофимов, С. Я., Эркенова, М. И., Соколова, Т. А., Степанов, А. Л., Лысак, Л. В., Лобаненков, А. М. Лабораторное моделирование последовательного аэробного и анаэробного разложения нефтепродуктов в загрязненном нефтью верховом торфе //Почвоведение. – 2015. – №. 3. – С. 360-360.
98. Узких О. С., Хомяков Д. М., Донерьян Л. Г. Чувствительность показателей биологического мониторинга различных нефтезагрязненных почв //Экология и промышленность России. – 2009. – №. 4. – С. 11-11.
99. Фокина Н. Н., Нефедова З. А., Немова Н. Н. Липидный состав мидий *Mutilus edulis* L. Белого моря. Влияние некоторых факторов среды обитания. – 2010
100. Халимов Э. М., Левин С. В., Гузев В. С. Экологические и микробиологические аспекты повреждающего действия нефти на свойства почвы //Вестн. МГУ. Сер. – 1996. – Т. 17. – С. 59-64.
101. Холоденко, В. П., Чугунов, В. А., Жиглецова, С. К., Родин, В. Б., Ермоленко, З. М., Фомченков, В. М., Волков, В. Я. Разработка биотехнологических методов ликвидации нефтяных загрязнений окружающей среды //Российский химический журнал. – 2001. – Т. 45. – №. 5-6. – С. 135-141.
102. Цуцаева В. В., Пуговкин М. М., Савушкина М. Ю. Текстильный горошек–эффективный сорбент для ликвидации разливов нефти //Нефтяное хозяйство. – 1991. – №. 8. – С. 33-34.
103. Чернов, Т. И., Тхакахова, А. К., Кутовая, О. В. Оценка различных индексов разнообразия для характеристики почвенного прокариотного сообщества по данным метагеномного анализа //Почвоведение. – 2015. – №. 4. – С. 462-462.

104. Чижов Б. Е., Долингер В. А., Захаров А. И. Особенности нефтяного загрязнения территории Ханты-Мансийского автономного округа //Вестник экологии, лесоведения и ландшафтоведения. – 2008. – №. 8. – С. 15-21.
105. Чижов Б. Е., Захаров А. И., Гаркунов Г. А. Деградационно-восстановительная динамика лесных фитоценозов после нефтяного загрязнения //Леса и лесное хозяйство Западной Сибири. – 1998. – №. 6. – С. 160-172.
106. Шагидуллин, Р. Р., Латыпова, В. З., Иванов, Д. В., Шагидуллина, Р. А., Тарасов, О. Ю., Петров, А. М. Нормирование допустимого остаточного содержания нефти и продуктов ее трансформации в почвах //Георесурсы. – 2011. – №. 5 (41). – С. 2-5.
107. Шамаева А. А. Исследование процессов биоремедиации почв и объектов, загрязненных нефтяными углеводородами //Дисс. автореф. канд. биол. наук. Уфа, БГУ.–2007. – 2007.
108. Шумилова, И. Б., Максимович, Н. Г., Блинов, С. М., Кузнецов, Л. Н. Возможные пути борьбы с последствиями разливов нефтепродуктов //Геология, разработка, бурение и эксплуатация нефтяных месторождений Пермского Прикамья. – 1999. – №. 2. – С. 240-249.
109. Эркенова, М. И., Толпешта, И. И., Трофимов, С. Я., Аптикаев, Р. С., Лазарев, А. С. Изменение содержания нефтепродуктов в загрязненной нефтью торфяной почве верхового болота в условиях полевого эксперимента с использованием извести и удобрений //Почвоведение. – 2016. – №. 11. – С. 1392-1401.
110. А.с. 1606520 СССР, МКИ А1, С 09 К 3/32. Способ сбора пролитого масла / Грибанов Г.А., Геокчаев Т.Е., Дашдиев Р.А. Опубл. 15.11.90. Бюл. №42.217

111. А.с. 815019 СССР, М. КлЗ С 09 К 3/32. Способ очистки поверхности воды от нефти и нефтепродуктов /Макарова Л.Е. Оpubл. 23.08.81. Бюл. №Ц.
112. Aburto-Medina A., Ball A. S. Microorganisms involved in anaerobic benzene degradation //Annals of microbiology. – 2015. – Т. 65. – №. 3. – С. 1201-1213.
113. Acosta-González A., Rosselló-Móra R., Marqués S. Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill //Environmental Microbiology. – 2013. – Т. 15. – №. 1. – С. 77-92.
114. Adam G., Duncan H. Influence of diesel fuel on seed germination //Environmental pollution. – 2002. – Т. 120. – №. 2. – С. 363-370.
115. Ahn, J. H., Kim, M. S., Kim, M. C., Lim, J. S., Lee, G. T., Yun, J. K., Kim T.S., Kim T.S., Ka J.O. Analysis of bacterial diversity and community structure in forest soils contaminated with fuel hydrocarbon //Journal of microbiology and biotechnology. – 2006. – Т. 16. – №. 5. – С. 704-715.
116. Al-Jawhari I. F. H. Ability of some soil fungi in biodegradation of petroleum hydrocarbon //Journal of Applied Environmental Microbiology. – 2014. – Т. 2. – №. 2. – С. 46-52.
117. Akob, D. M., Lee, S. H., Sheth, M., Küsel, K., Watson, D. B., Palumbo, A. V., Kostka J.E., Chin K.-J. Gene expression correlates with process rates quantified for sulfate-and Fe (III)-reducing bacteria in U (VI)-contaminated sediments //Frontiers in microbiology. – 2012. – Т. 3. – С. 280.
118. Akob, D. M., Mills, H. J., Gihring, T. M., Kerkhof, L., Stucki, J. W., Anastácio, A. S., Kostka, J. E. Functional diversity and electron donor dependence of microbial populations capable of U (VI) reduction in

- radionuclide-contaminated subsurface sediments //Applied and environmental microbiology. – 2008. – T. 74. – №. 10. – C. 3159-3170.
119. Al-Jawhari I. F. Ability of some fungi isolated from a sediment of Suq-Al Shuyukh marshes on biodegradation of crude oil //Int J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – T. 4. – №. 1. – C. 19-32.
120. AlKaabi, N., Al-Ghouti, M. A., Jaoua, S., Zouari, N. Potential for native hydrocarbon-degrading bacteria to remediate highly weathered oil-polluted soils in Qatar through self-purification and bioaugmentation in biopiles //Biotechnology Reports. – 2020. – T. 28. – C. e00543.
121. Anokhina, E. V., Go, Y. B., Lee, Y., Vogt, T., Jacobson, A. J. Chiral three-dimensional microporous nickel aspartate with extended Ni– O– Ni bonding //Journal of the American Chemical Society. – 2006. – T. 128. – №. 30. – C. 9957-9962.
122. Arino S., Marchal R., Vandecasteele J. P. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community //Journal of applied microbiology. – 1998. – T. 84. – №. 5. – C. 769-776.
123. Atlas R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective //Microbiological reviews. – 1981. – T. 45. – №. 1. – C. 180-209.
124. Atlas R. M., Bartha R. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation //Advances in microbial ecology. – Springer, Boston, MA, 1992. – C. 287-338.
125. Atlas R. M., Bartha R. Transport and transformations of petroleum: biological processes //Long term environmental effects of offshore oil and

- gas development. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London. – 1987.
– C. 287-341.
126. Baek, K. H., Yoon, B. D., Kim, B. H., Cho, D. H., Lee, I. S., Oh, H. M., Kim, H. S. Monitoring of microbial diversity and activity during bioremediation of crude oil-contaminated soil with different treatments //Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2007. – T. 17. – №. 1. – C. 67-73.
127. Bakken L. R., Frostegård Å. Nucleic acid extraction from soil //Nucleic acids and proteins in soil. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2006. – C. 49-73.
128. Balba M. T., Al-Awadhi N., Al-Daher R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation //Journal of microbiological methods. – 1998. – T. 32. – №. 2. – C. 155-164.
129. Baldwin B. R., Nakatsu C. H., Nies L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR //Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – T. 69. – №. 6. – C. 3350-3358.
130. Barabás, G., Vargha, G., Szabó, I. M., Penyige, A., Damjanovich, S., Szöllösi, J., Szabó, I. n-Alkane uptake and utilisation by Streptomyces strains //Antonie Van Leeuwenhoek. – 2001. – T. 79. – №. 3. – C. 269-276.
131. Bartha R., Atlas R. M. The microbiology of aquatic oil spills //Advances in Applied Microbiology. – 1977. – T. 22. – C. 225-266.
132. Bartilson M., Shingler V. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2, 3-dioxygenase-encoding gene of phenolcatabolizing Pseudomonas CF600 //Gene. – 1989. – T. 85. – №. 1. – C. 233-238.

133. Baveye P. C. To sequence or not to sequence the whole-soil metagenome? //Nature Reviews Microbiology. – 2009. – T. 7. – №. 10. – C. 756-756.
134. Bertrand, J. C., Rambeloarisoa, E., Rontani, J. F., Giusti, G., Mattei, G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture //Biotechnology Letters. – 1983. – T. 5. – №. 8. – C. 567-572.
135. Biegert T., Fuchs G., Heider J. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate //European Journal of Biochemistry. – 1996. – T. 238. – №. 3. – C. 661-668.
136. Bliss, P. J., Barnes P.J. Design basis for carbonaceous oxidation and nitrification in the activated sludge process. – 1979.
137. Bossert, I., Kachel, W. M., Bartha, R. Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil //Applied and Environmental Microbiology. – 1984. – T. 47. – №. 4. – C. 763-767.
138. Bürgmann, H., Widmer, F., Sigler, W. V., Zeyer, J. mRNA extraction and reverse transcription-PCR protocol for detection of *nifH* gene expression by *Azotobacter vinelandii* in soil //Applied and environmental microbiology. – 2003. – T. 69. – №. 4. – C. 1928-1935.
139. Bürgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., Zeyer, J. New molecular screening tools for analysis of free-living diazotrophs in soil //Applied and environmental microbiology. – 2004. – T. 70. – №. 1. – C. 240-247.
140. Callaghan, A. V., Morris, B. E. L., Pereira, I. A. C., McInerney, M. J., Austin, R. N., Groves, J. T., Kukor J.J., Suflita J.M., Young L.Y., Zulstra G.J., Wawik B. The genome sequence of *Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01: a blueprint for anaerobic alkane oxidation //Environmental microbiology. – 2012. – T. 14. – №. 1. – C. 101-113.

141. Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data //Nature methods. – 2010. – T. 7. – №. 5. – C. 335-336.
142. Chang, W., Dyen, M., Spagnuolo, L., Simon, P., Whyte, L., Ghoshal, S. Biodegradation of semi-and non-volatile petroleum hydrocarbons in aged, contaminated soils from a sub-Arctic site: Laboratory pilot-scale experiments at site temperatures //Chemosphere. – 2010. – T. 80. – №. 3. – C. 319-326.
143. Chatterjee D. K., Chakrabarty A. M. Genetic homology between independently isolated chlorobenzoate-degradative plasmids //Journal of Bacteriology. – 1983. – T. 153. – №. 1. – C. 532-534.
144. Chin, K. J., Sharma, M. L., Russell, L. A., O'Neill, K. R., Lovley, D. R. Quantifying expression of a dissimilatory (bi) sulfite reductase gene in petroleum-contaminated marine harbor sediments //Microbial ecology. – 2008. – T. 55. – №. 3. – C. 489-499.
145. Dailey, M. M., Miller, M. C., Bates, P. J., Lane, A. N., Trent, J. O. Resolution and characterization of the structural polymorphism of a single quadruplex-forming sequence //Nucleic acids research. – 2010. – T. 38. – №. 14. – C. 4877-4888.
146. Daniel R. The metagenomics of soil //Nature Reviews Microbiology. – 2005. – T. 3. – №. 6. – C. 470-478.
147. Dargay J. M., Gately D. World oil demand's shift toward faster growing and less price-responsive products and regions //Energy Policy. – 2010. – T. 38. – №. 10. – C. 6261-6277.
148. Das, S., Kuppanan, N., Channashettar, V. A., Lal, B. Remediation of oily sludge-and oil-contaminated soil from petroleum industry: recent

- developments and future prospects //Advances in Soil Microbiology: Recent Trends and Future Prospects. – 2018. – C. 165-177.
149. Dominguez-Rosado E., Pichtel J., Coughlin M. Phytoremediation of soil contaminated with used motor oil: I. Enhanced microbial activities from laboratory and growth chamber studies //Environmental Engineering Science. – 2004. – T. 21. – №. 2. – C. 157-168.
150. Drzyzga O. The strengths and weaknesses of *Gordonia*: a review of an emerging genus with increasing biotechnological potential //Critical reviews in microbiology. – 2012. – T. 38. – №. 4. – C. 300-316.
151. El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., Osman, M. E., Haieder, A. Comparative studies on the green algae *Chlorella homosphaera* and *Chlorella vulgaris* with respect to oil pollution in the river Nile //Water, air, and soil pollution. – 2000. – T. 124. – №. 1. – C. 187-204.
152. El-Sheekh, M., Eladel, H., Battah, M., Abd-Elal, S. M. Effect of different nitrogen sources on growth and biochemical composition of the green microalgae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella kessleri* //Int. Confer. Biol. Sci. – 2004. – T. 3. – C. 419-432.
153. Ezeji U. E., Anyadoh S. O., Ibekwe V. I. Clean up of crude oil-contaminated soil //Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology. – 2007. – T. 1. – №. 2. – C. 54-59.
154. Farmer, P. B., Singh, R., Kaur, B., Sram, R. J., Binkova, B., Kalina, I., Popov T.A., Garte S., Taioli E., Gabelova A., Cebulska-Wasilewska A. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants: effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage //Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2003. – T. 544. – №. 2-3. – C. 397-402.

155. Gallegos M. T., Williams P. A., Ramos J. L. Transcriptional control of the multiple catabolic pathways encoded on the TOL plasmid pWW53 of *Pseudomonas putida* MT53 //Journal of bacteriology. – 1997. – T. 179. – №. 16. – C. 5024-5029.
156. Harayama S., Reikik M. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families //Journal of Biological Chemistry. – 1989. – T. 264. – №. 26. – C. 15328-15333.
157. He, S., Ivanova, N., Kirton, E., Allgaier, M., Bergin, C., Scheffrahn, R. H., Kyrpides N.C., Warnecke F., Tringe S.G., Hugenholtz P. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analysis of hindgut paunch microbiota in wood-and dung-feeding higher termites //PloS one. – 2013. – T. 8. – №. 4. – C. e61126.
158. Healy Jr J. B., Young L. Y. Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane //Applied and Environmental Microbiology. – 1979. – T. 38. – №. 1. – C. 84-89.
159. Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Rüegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber F., Egli T., Mau M., Brennerova M., Brenner V., Pieper D.H., Top E.M., Dejonghe W., Bastiaens L., Springael D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site //Journal of microbiological methods. – 2006. – T. 64. – №. 2. – C. 250-265.
160. Huesemann M. H. Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils: limitations in bioavailability or inherent recalcitrance? //Bioremediation Journal. – 1997. – T. 1. – №. 1. – C. 27-39.

161. Ikeura, H., Kawasaki, Y., Kaimi, E., Nishiwaki, J., Noborio, K., Tamaki, M. Screening of plants for phytoremediation of oil-contaminated soil //International journal of phytoremediation. – 2016. – T. 18. – №. 5. – C. 460-466.
162. Itoh, T., Yamanoi, K., Kudo, T., Ohkuma, M., Takashina, T. *Aciditerrimonas ferrireducens* gen. nov., sp. nov., an iron-reducing thermoacidophilic actinobacterium isolated from a solfataric field //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2011. – T. 61. – №. 6. – C. 1281-1285.
163. Jansson J. K., Hofmockel K. S. The soil microbiome—from metagenomics to metaphenomics //Current opinion in microbiology. – 2018. – T. 43. – C. 162-168.
164. Jiao, S., Liu, Z., Lin, Y., Yang, J., Chen, W., Wei, G. Bacterial communities in oil contaminated soils: Biogeography and co-occurrence patterns //Soil Biology and Biochemistry. – 2016. – T. 98. – C. 64-73.
165. Jørgensen K. S., Puustinen J., Suortti A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles //Environmental pollution. – 2000. – T. 107. – №. 2. – C. 245-254.
166. Kämpfer P., Steiof M., Dott W. Microbiological characterization of a fuel-oil contaminated site including numerical identification of heterotrophic water and soil bacteria //Microbial ecology. – 1991. – T. 21. – №. 1. – C. 227-251.
167. Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., ramu Dirisala, V., Kodali, V. P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review //Petroleum. – 2018. – T. 4. – №. 3. – C. 241-249.

168. Kaushik, P., Sandhu, O. S., Brar, N. S., Kumar, V., Malhi, G. S., Kesh, H., Saini, I. Soil metagenomics: prospects and challenges //Mycorrhizal Fungi-Utilization in Agriculture and Forestry. – 2020.
169. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing //Nucleic acid techniques in bacterial systematics. – 1991. – C. 115-175.
170. Lifshits, S. K., Glyaznetsova, Y. S., Chalaya, O. N., Zueva, I. N. Increase in remediation processes of oil-contaminated soils //Remediation Journal. – 2017. – T. 28. – №. 1. – C. 97-104.
171. Lin, Q., Mendelsohn, I. A., Graham, S. A., Hou, A., Fleeger, J. W., Deis, D. R. Response of salt marshes to oiling from the Deepwater Horizon spill: Implications for plant growth, soil surface-erosion, and shoreline stability //Science of the Total Environment. – 2016. – T. 557. – C. 369-377.
172. Liu, R., Zhang, Y., Ding, R., Li, D., Gao, Y., Yang, M. Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils //Journal of bioscience and bioengineering. – 2009. – T. 108. – №. 5. – C. 400-407.
173. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. Brock biology of microorganisms. – Upper Saddle River, NJ : Pearson Prentice Hall, 2006. – T. 11. – C. 136.
174. Maila M. P., Cloete T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2005. – T. 55. – №. 1. – C. 1-8.
175. Manucharova, N. A., Pozdnyakov, L. A., Vlasova, A. P., Yanovich, A. S., Ksenofontova, N. A., Kovalenko, M. A., Stepanov P.Y., Gennadiev A.N., Golovchenko A.V., Stepanov A.L. Metabolically Active Prokaryotic

- Complex in Grassland and Forests' Sod-Podzol under Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Influence //Forests. – 2021. – T. 12. – №. 8. – C. 1103.
176. Martin-Laurent, F., Philippot, L., Hallet, S., Chaussod, R., Germon, J. C., Soulas, G., Catroux, G. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods //Applied and environmental microbiology. – 2001. – T. 67. – №. 5. – C. 2354-2359.
177. Mbadinga, S. M., Wang, L. Y., Zhou, L., Liu, J. F., Gu, J. D., Mu, B. Z. Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes //International Biodeterioration & Biodegradation. – 2011. – T. 65. – №. 1. – C. 1-13.
178. Menichini E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability // Science of the total environment. - 1992.-V 116.- P 323-327
179. Mocali S., Benedetti A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology //Research in microbiology. – 2010. – T. 161. – №. 6. – C. 497-505.
180. Mohsenzadeh F., Shirkhani Z. Removing of crude oil from polluted areas using the isolated fungi from Tehran oil refinery //Soil and Sediment Contamination: An International Journal. – 2016. – T. 25. – №. 5. – C. 536-551.
181. Morgan P., Watkinson R. J. Biodegradation of components of petroleum //Biochemistry of microbial degradation. – Springer, Dordrecht, 1994. – C. 1-31.
182. Morillo E, Romero A. S, Maqueda C, Madrid L, F. Ajmone-Marsan, H. Grcman, Davidson cC. M, Hursthouse A. S. and Villaverde J. Soil pollution by PAHs in urban soils: a comparison of three European cities

- //Journal of Environmental Monitoring. – 2007. – T. 9. – №. 9. – C. 1001–1008.
183. Murphy D. M., Thomson D. S., Mahoney M. J. In situ measurements of organics, meteoritic material, mercury, and other elements in aerosols at 5 to 19 kilometers //Science. – 1998. – T. 282. – №. 5394. – C. 1664-1669.
184. Nesme, J., Achouak, W., Agathos, S. N., Bailey, M., Baldrian, P., Brunel, D., Simonet, P. Back to the future of soil metagenomics //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 73.
185. Obire O., Putheti R. R. Fungi in bioremediation of oil polluted environments //Sigma Xi Scientific Research Society. – 2009.
186. Onuoha C. I., Arinze A. E., Ataga A. E. Evaluation of growth of some fungi in crude oil polluted environment //Global Journal of Agricultural Sciences. – 2003. – T. 2. – №. 2. – C. 80-81.
187. Paisse, S., Duran, R., Coulon, F., Goñi-Urriza, M. Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? //Applied microbiology and biotechnology. – 2011. – T. 92. – №. 4. – C. 835-844.
188. Pereyra, L. P., Hiibel, S. R., Prieto Riquelme, M. V., Reardon, K. F., Pruden, A. Detection and quantification of functional genes of cellulose-degrading, fermentative, and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea //Applied and environmental microbiology. – 2010. – T. 76. – №. 7. – C. 2192-2202.
189. Perry V. Metabolic activities and diversity of microbial communities associated with anaerobic degradation. Dissertation, Georgia State University– 2014.

190. Pool G. 16 Soil Metagenomics //Modern Soil Microbiology. – 2006. – C. 409.
191. Popp N., Schloemann M., Mau M. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils //Microbiology. – 2006. – T. 152. – №. 11. – C. 3291-3304.
192. Puustinen, J., Jorgensen, K. S., Strandberg, T., Suortti, A. M. Bioremediation of oil contaminated soil from service stations. Evaluation of biological treatment. – 1994.
193. Qiao Min, Wang Chunxia, Shengbiao Huang, Wang Donghong, Zijian Wang. Composition, sources, and potential toxicological significance of PAHs in the surface sediments of the Meiliang Bay, Taihu Lake, China // Environment International.- 2006.- V. 32.- P 28–33.
194. Quintella C. M., Mata A. M. T., Lima L. C. P. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils //Journal of environmental management. – 2019. – T. 241. – C. 156-166.
195. Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T. M., Simonet, P. Extraction of DNA from soil //European Journal of Soil Biology. – 2003. – T. 39. – №. 4. – C. 183-190.
196. Rosenberg E. Hydrocarbon-oxidizing bacteria //The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria. – 2006. – T. 2. – C. 564-577.
197. Saeki K., Kunito T. Adsorptions of DNA molecules by soils and variable-charged soil constituents //Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol. – 2010. – T. 1. – C. 188-195.
198. Saeki K., Kunito T., Sakai M. Effects of pH, ionic strength, and solutes on DNA adsorption by andosols //Biology and fertility of soils. – 2010. – T. 46. – №. 5. – C. 531-535.

199. Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J., Kopecky, J. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics //Applied and environmental microbiology. – 2008. – T. 74. – №. 9. – C. 2902-2907.
200. Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Huesemann, M. H., Moore, K. O., Rhodes, I. A., Rice Jackson, L. M., Vipond T.E., Western M.M., Wisniewski H.L. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment //Environmental Science & Technology. – 1997. – T. 31. – №. 6. – C. 1769-1776.
201. Schneiker, S., Dos Santos, V. A., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova T.N., Denaro R., Ferrer M., Meyer F., Rupp O., Yakimov M.M., Timmis K.N., Weidner S., Kaiser O., Golyshin P.N. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis* //Nature biotechnology. – 2006. – T. 24. – №. 8. – C. 997-1004.
202. Sei, K., Sugimoto, Y., Mori, K., Maki, H., Kohno, T. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes //Environmental Microbiology. – 2003. – T. 5. – №. 6. – C. 517-522.
203. Shapiro, T., Chekanov, K., Alexandrova, A., Dolnikova, G., Ivanova, E., Lobakova, E. Revealing of non-cultivable bacteria associated with the mycelium of fungi in the kerosene-degrading community isolated from the contaminated jet fuel //Journal of Fungi. – 2021. – T. 7. – №. 1. – C. 43.
204. Singh, B. K., Campbell, C. D., Sorenson, S. J., Zhou, J. Soil genomics //Nature Reviews Microbiology. – 2009. – T. 7. – №. 10. – C. 756-756.

205. Song H. G., Wang X., Bartha R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills //Applied and Environmental Microbiology. – 1990. – T. 56. – №. 3. – C. 652-656.
206. Sorkhoh, N. A., Al-Hasan, R. H., Khanafer, M., Radwan, S. S. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil //Journal of Applied Bacteriology. – 1995. – T. 78. – №. 2. – C. 194-199.
207. Sperfeld M., Diekert G., Studenik S. Anaerobic aromatic compound degradation in *Sulfuritalea hydrogenivorans* sk43H //FEMS microbiology ecology. – 2019. – T. 95. – №. 1. – C. 199.
208. Spormann A. M., Widdel F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria //Biodegradation. – 2000. – T. 11. – №. 2. – C. 85-105.
209. Stallwood, B., Shears, J., Williams, P. A., Hughes, K. A. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica //Journal of Applied Microbiology. – 2005. – T. 99. – №. 4. – C. 794-802.
210. Stankevich D. S., Emtsev V. T. The problem of oil-contaminated soil and microbial preparations //Acta agriculturae Serbica. – 2000. – T. 5. – №. 9. – C. 3-9.
211. Sutton, N. B., Maphosa, F., Morillo, J. A., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A. A., Grotenhuis, T., Rijnaarts H. H. M., Smidt, H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure //Applied and environmental microbiology. – 2013. – T. 79. – №. 2. – C. 619-630.

212. Suyal, D. C., Joshi, D., Debbarma, P., Soni, R., Das, B., Goel, R. Soil metagenomics: unculturable microbial diversity and its function //Mycorrhizosphere and pedogenesis. – Springer, Singapore, 2019. – C. 355-362.
213. Trevors J. T., Masson L. DNA technologies: what's next applied to microbiology research? //Antonie van Leeuwenhoek. – 2010. – T. 98. – №. 3. – C. 249-262.
214. Trudgill, P. W., Taylor, D. G. Metabolism of cyclohexane carboxylic acid by *Alcaligenes* strain W1 //Journal of Bacteriology. – 1978. – T. 134. – №. 2. – C. 401-411.
215. Tumanyan A. F., Batovskaya E. K., Tyutyuma N. V. Effect of oil contamination on microbiological processes in soils //Chemistry and Technology of Fuels and Oils. – 2013. – T. 49. – №. 2. – C. 180-186.
216. Vestergaard, G., Schulz, S., Schöler, A., Schloter, M. Making big data smart—how to use metagenomics to understand soil quality //Biology and Fertility of Soils. – 2017. – T. 53. – №. 5. – C. 479-484.
217. Vieites, J. M., Ghazi, A., Beloqui, A., Polaina, J., Andreu, J. M., Golyshina, O. V., Nechitaylo T.Y., Waliczek A., Yakimov M.M., Golyshin P.N., Ferrer, M. Inter-conversion of catalytic abilities in a bifunctional carboxyl/feruloyl-esterase from earthworm gut metagenome //Microbial biotechnology. – 2010. – T. 3. – №. 1. – C. 48-58.
218. Vogel, T. M., Simonet, P., Jansson, J. K., Hirsch, P. R., Tiedje, J. M., Van Elsas, J. D., Philippot, L. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome //Nature Reviews Microbiology. – 2009. – T. 7. – №. 4. – C. 252-252.

219. Whyte, L. G., Smits, T. H. M., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C. W., Van Beilen, J. B. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531 //Applied and environmental microbiology. – 2002. – T. 68. – №. 12. – C. 5933-5942.
220. Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B. T., Rabus, R. Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria //Microbial Physiology. – 2016. – T. 26. – №. 1-3. – C. 138-151.
221. Xia, W., Du, Z., Cui, Q., Dong, H., Wang, F., He, P., Tang, Y. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons //Journal of Hazardous Materials. – 2014. – T. 276. – C. 489-498.
222. Xing-hong LI, Ling-ling MA, Xiu-fen LIU, Shan FU, Cheng Hang-xin, Xiao-bail XU. Polycyclic aromatic hydrocarbon in urban soil from Beijing, China // Journal of environmental science. - 2006.- V 18.- № 5.- P 944-950.
223. Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Glöckner, F. O. The SILVA and “all-species living tree project (LTP)” taxonomic frameworks //Nucleic acids research. – 2014. – T. 42. – №. D1. – C. D643-D648.
224. Young, A. R., Walker, S. L., Kinley, J. S., Plastow, S. R., Averbek, D., Morlière, P., & Dubertret, L. Phototumorigenesis studies of 5-methoxypsoralen in bergamot oil: evaluation and modification of risk of human use in an albino mouse skin model //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1990. – T. 7. – №. 2-4. – C. 231-250.

225. Yu, L., Liu, H. Toward integrating feature selection algorithms for classification and clustering //IEEE Transactions on knowledge and data engineering. – 2005. – T. 17. – №. 4. – C. 491-502.
226. Zaide S. M. Oil pollution control. – Published by Routledge, United Kingdom, 2019. – 242 C.
227. Zhelezova A., Chernov T., Tkhakakhova A., Xenofontova N., Semenov M., Kutovaya O. Prokaryotic community shifts during soil formation on sands in the tundra zone //Plos one. – 2019. – T. 14. – №. 4. – C. e0206777.