



ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯ НА МИКРОБОЦЕНОЗ ПОЧВ, ПРИЛЕГАЮЩИХ К НЕФТЕХРАНИЛИЩУ

© А.С. Журавлева, Н.М. Лабутова, Е.Е. Андронов

ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург

Для цитирования: Журавлева А.С., Лабутова Н.М., Андронов Е.Е. Влияние нефтезагрязнения на микробиоценоз почв, прилегающих к нефтехранилищу // Экологическая генетика. – 2017. – Т. 15. – № 4. – С. 60–68. doi: 10.17816/ecogen15460-68.

Поступила в редакцию: 22.09.2017

Принята к печати: 21.12.2017

✿ Целью работы являлось изучение действия углеводородов на бактериальный и грибной ценозы дерново-подзолистой почвы на территории, примыкающей к нефтехранилищу в поселке Малые Колпаны Ленинградской области. Были использованы методы высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек гена *16S rRNA* для анализа таксономического состава и структуры бактериоценоза и метод прямого микрофотографирования Демкиной – Мирчинк для определения длины грибного мицелия и численности спор. Показано, что таксономические и структурные изменения в бактериальном сообществе привели к доминированию родов, содержащих многочисленные виды-нефтедеструкторы. Установлено, что на исследованной территории основная роль в разложении нефти принадлежит прокариотам, относящимся к родам *Pseudoxanthomonas*, *Methylobacterium* и *Nocardioidea*. Микоценоз проявил к нефтезагрязнению высокую чувствительность и низкую адаптивность.

✿ **Ключевые слова:** нефтезагрязнение; нефтедеструкторы; почвенный бактериоценоз; почвенный микоценоз.

INFLUENCE OF OIL POLLUTION ON THE MICROBIOCENOSIS OF SOILS ADJACENT TO THE OIL STORAGE

© A.S. Zhuravleva, N.M. Labutova, E.E. Andronov

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

For citation: Zhuravleva AS, Labutova NM, Andronov EE. Influence of oil pollution on the microbiocenosis of soils adjacent to the oil storage. *Ecological genetics*. 2017;15(4):60-68. doi: 10.17816/ecogen15460-68.

Received: 22.09.2017

Accepted: 21.12.2017

✿ The aim of the work was an investigation of the effect of hydrocarbons on bacterial and fungal cenoses of sod-podzolic soils on the territory adjacent to the oil storage in the village Malye Kolpany, Leningrad Region. NGS methods were used to analyze the taxonomic composition and structure of the bacteriocenosis and the method of direct microscopy by Demkina-Mirchink to determine the length of the fungal mycelium and the number of spores. Taxonomic and structural changes in the bacterial community led to the dominance of genera containing numerous species-oil destructors. It is established that the main role in the decomposition of oil in the investigated territory belongs to prokaryotes related to the genera *Pseudoxanthomonas*, *Methylobacterium* and *Nocardioidea*. Mycocenosis showed high sensitivity and low adaptability to oil contamination.

✿ **Keywords:** diesel contamination; oil destructors; soil bacteria; soil fungus.

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение объемов добычи и транспортировки нефти во второй половине XX в. и, как следствие, учащение аварийных ситуаций привели к появлению обширных нефтезагрязненных территорий. Особую опасность представляют автозаправочные комплексы с их нефтехранилищами и непосредственно нефтехранилища, которые окружают города с развитой промышленностью. Для таких предприятий характерны микроразливы нефти и нефтепродуктов. И хотя одновременно в окружающую среду попадает небольшое количество поллютантов, эти микроразливы

осуществляются регулярно в течение многих лет [1] и загрязняют среду обитания человека в широких масштабах благодаря подвижности как сырой нефти, так и различных видов топлива.

Для оценки экологических последствий нефтезагрязнений активно изучается почвенная микрофлора, являющаяся чувствительным биоиндикатором изменений окружающей среды. Так как разложение нефти в почве в основном происходит в результате деятельности углеводородоокисляющих микроорганизмов, оценка состояния микробиоценоза необходима для прогнозирования способности почвы к самовосстановлению и разработки способов ее очистки.

Было установлено, что изменения свойств почвы, происходящие под действием нефти и нефтепродуктов, неизбежно влияют на почвенную микрофлору. Специфика изменений микробиоценоза зависит от концентрации, качественного состава углеводов [2–4], климатических факторов и особенностей самой почвы. Различные группы микроорганизмов обладают разной устойчивостью к загрязнению [5]. Показано, что происходит изменение таксономического состава микробиоценоза и соотношения функциональных групп. Низкий уровень загрязнения (0,5–1 %) может оказывать на сообщество стимулирующее воздействие за счет активного размножения углеводородокисляющих микроорганизмов [3].

Для изучения изменений в состоянии почвенной микрофлоры под действием нефти актуальны прямые микробиологические методы, а также молекулярные методы, не связанные с культивированием, в частности метод высокопроизводительного секвенирования ампликонных библиотек гена *16SpPHK*, снимающие ряд ограничений, присущих классическим микробиологическим методам, например идентификации некультивируемых микроорганизмов. Такие методические подходы позволяют детально выявить специфику реакции микробиоценоза на нефтезагрязнение в разных типах почв и прогнозировать процессы самоочищения в конкретных почвенно-климатических условиях.

Целью данной работы являлось изучение действия углеводов на бактериальный и грибной ценозы дерново-подзолистой почвы при разливах нефти вблизи нефтехранилища в Ленинградской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор образцов. Для проведения исследования был выбран участок площадью 800 м², непосредственно примыкающий к воротам нефтехранилища в поселке Малые Колпаны, Ленинградская область.

Рельеф обследованной территории имеет незначительный уклон от ворот к лесу. На участке обнаружены неглубокие ложбины, в которых скапливается нефть, вероятно текущая из-под ворот нефтехранилища. По визуальной оценке, разливы происходили в разное время. Вся территория засыпана слоем песка толщиной 5–10 см.

Образцы грунта отбирали в трех точках:

- 1) на расстоянии 5,1 м перпендикулярно от забора нефтехранилища из свежего нефтяного разлива;
- 2) на расстоянии 10,8 м от первой точки отбора из старого нефтяного разлива;
- 3) контрольный образец — на расстоянии 19,4 м перпендикулярно от забора нефтехранилища.

В каждой точке отбирали средний образец, для чего в разливах в 10 местах взяли пробы грунта с глубины 5–10 см. В контрольной точке 10 проб отобрали с площади, соответствующей размеру нефтяных разливов.

В образцах грунта содержание нефти определяли методом экстракции четыреххлористым углеродом с последующим определением ее количества в процентах от массы почвы на приборе АН-2 [6].

Выделение ДНК из образцов грунта. Для анализа таксономического состава и структуры бактериоценоза методом высокопроизводительного секвенирования после отбора проб образцы грунта были заморожены в камере при температуре –80°. Выделение ДНК проводили с использованием наборов MoBio Power Soil (MoBio, США) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Для выделения брали навеску почвы 0,2 г, а полученную ДНК элюировали в 100 мкл воды.

Для контроля выделения проводили электрофорез экстракта в 1 % агарозе (буфер 0,5 × TAE), для чего в гель вносили 1, 2, 5 и 10 мкл экстракта. Применяли гель, содержащий заранее добавленный бромистый этидий (0,5 мкг/мл) [7].

При конструировании и секвенировании ампликонных библиотек очищенный препарат ДНК (по 10–15 нг) использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР (температурный профиль: 95 °С — 30 с, 50 °С — 30 с, 72 °С — 30 с; всего 30 циклов) с добавлением полимеразы Epcyclo («Евроген», Россия) и универсальных праймеров к вариабельному участку V4 гена *16SpPHK* — F515 (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) и R806 (GGACT-ACVSGGGTATCTAAT) [8]. Секвенирование библиотек осуществляли на приборе GS Junior компании Roshe методом пиросеквенирования. Таксономический анализ библиотек проводили с использованием пакета QIIME [9]. Результатом таксономического анализа была таблица ОТЕ (операционных таксономических единиц), в которой для каждой ОТЕ приведена ее доля в библиотеке.

Для оценки состояния бактериоценоза на основании данных, полученных методом ПЦР, рассчитывали индекс общего разнообразия Шеннона (\bar{H}) по следующей формуле:

$$\bar{H} = -\sum(n/N)\log(n/N),$$

где n — оценка «значимости» каждого рода; N — общая «значимость» родов.

Индекс Шеннона дает характеристику стабильности микробного сообщества. Чем выше этот индекс, тем стабильнее сообщество.

Индекс Симпсона (C) рассчитывался по следующей формуле:

$$C = \sum(n_i/N)^2,$$

где n — число особей каждого вида, N — общее число особей.

Индекс Симпсона показывает концентрацию доминирования и общее видовое богатство сообщества [10].

Оценка состояния грибного ценоза. Определены длины грибного мицелия и численности спор осу-

шестволяли прямым методом Демкиной – Мирчинк [23]. Для этого к 10 г свежего грунта приливали 100 мл 0,1 % пиродифосфата натрия и встряхивали на ротаторе 30 мин. Отбирали 30 мл вытяжки и добавляли к ней 30 мл 9 % лактозы. Предварительно мембранные фильтры «Милипор» с размером пор 0,2 мкм окрашивали 0,1 % спиртовым раствором анилинового синего и помещали на фарфоровую воронку, подсоединенную к водоструйному насосу. Из вытяжки с лактозой отбирали 2 мл, переносили на фильтр и ожидали, пока с его поверхности уйдет вся жидкость. Фильтр с осадком помещали на фильтровальную бумагу, пропитанную спиртовым раствором акридина оранжевого (60 % спирт, соотношение спирт : акридин = 2500 : 1), и выдерживали 15 мин во влажной камере. Фильтры во влажном состоянии просматривали под люминесцентным микроскопом при увеличении $\times 200$ и $\times 400$. Анализировали 20–80 полей зрения на вариант. Для этого делали фотографии полей зрения, на которых измеряли длину грибного мицелия и подсчитывали количество спор.

Частоту встречаемости мицелия рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Частота встречаемости} = (a/A)100\%,$$

где a — количество просмотренных полей зрения; A — количество полей зрения с мицелием.

Статистический анализ. Математическую обработку проводили в SPSS-Statistics и Microsoft Excel. Результаты анализа таксономического состава бактерий обрабатывали с помощью кластерного и факторного анализов, проведенных в среде R (R Core Development Team, 2014; внутренние пакеты ggplot2, ggrepel, dplyr). Длины мицелия в образцах грунта сравнивали по критерию Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика образцов грунта. В лесу, примыкающем к дальней от ворот границе обследованного участка, был сделан почвенный разрез глубиной 1,5 м. Визуальное обследование почвенных горизонтов позволило идентифицировать почву как тяжелосуглинистую дерново-подзолистую.

Непосредственно в точках взятия образцов и по краю участка делали прикопки на глубину 30 см. Было обнару-

жено, что под слоем песка находятся ненарушенные почвенные горизонты. Так как отобранные для исследования образцы представляют собой смесь песка и верхнего почвенного горизонта, представляется целесообразным назвать их грунтом, в котором присутствует почвенная микрофлора дерново-подзолистой почвы.

Также было установлено, что на территории, примыкающей к нефтехранилищу, имеет место латеральный разлив нефти — по почвенному профилю углеводороды не распространялись. Анализ показал, что в точке № 1 содержание нефти составляло 5,8 %, в точке № 2 — 2,2 %, в контроле — следы углеводородов.

Агрохимический анализ показал, что отобранные образцы грунта характеризуются рН, близким к нейтральному, низким содержанием общего азота, нитратов и калия, средним содержанием аммония и высоким содержанием фосфора. Наиболее высокое количество общего азота, его подвижных форм и фосфора отмечено в образцах с 6 % нефти (табл. 1).

Количество углерода и соотношение C : N возрастали в вариантах с нефтью в прямо пропорциональной зависимости от дозы поллютанта.

Влияние нефтезагрязнения на состояние бактериального ценоза. Исследования, проведенные методом высокопроизводительного секвенирования, показали, что нефтезагрязнение влияло на широту разнообразия комплекса почвенных бактерий, таксономический состав и структуру бактериоценозов.

Структура бактериоценоза на уровне филотипов позволила охарактеризовать процессы, происходящие в нефтезагрязненных образцах (рис. 1). Так, в контроле доминировали филотипы *Acidobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* и *Actinobacteria*. Это филотипы, которые почти всегда доминируют как в загрязненных, так и в не загрязненных нефтью почвах [11]. В контроле долевое участие этих филотипов было примерно одинаковым.

В образце с 6 % нефти резко возросла доля *Gammaproteobacteria*. Среди этого филотипа известно большое количество нефтеструктуров, имеющих высокую устойчивость к углеводородам нефти. Доминирование *Gammaproteobacteria* указывает на то, что в разливе проходит начальная стадия разложения нефти [12].

В образце с 2 % нефти сократилась доля *Gammaproteobacteria*, но возросла доля *Actinobacteria*.

Таблица 1

Агрохимическая характеристика образцов Agrochemical characteristics of the samples

Образец	C _{общ} , %	N _{общ} , %	pH _{водн}	N-NH ₄ , мг/кг	N-NO ₃ , мг/кг	P ₂ O ₅ , мг/кг	K ₂ O, мг/кг
Контроль	0,5 ± 0,181	0,016 ± 0,0064	6,5 ± 0,17	27,0 ± 2,25	5,05 ± 0,37	241,0 ± 10,33	6,3 ± 0,21
2 % нефти	1,6 ± 0,152	0,018 ± 0,001	6,1 ± 0,001	25,0 ± 2,86	6,05 ± 0,76	163,0 ± 28,6	3,4 ± 0,27
6 % нефти	3,4 ± 0,22	0,021 ± 0,0017	6,1 ± 0,065	32,0 ± 4,58	10,55 ± 1,25	294,0 ± 21,24	3,4 ± 0,27

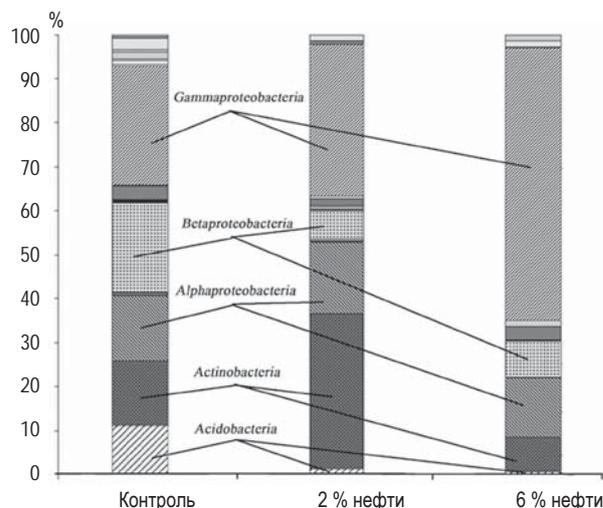


Рис. 1. Таксономическая структура бактериоценоза на уровне филотипов и родов

Fig. 1. Taxonomic structure of bacteriocoenosis at the level of phylotypes and genera

По мнению некоторых исследователей, именно *Actinobacteria* осуществляют анаэробную деградацию циклических и ароматических углеводородов на более поздних стадиях биодegradации нефти [13, 14].

Таким образом, можно предположить, что в исследуемых образцах грунта процесс деградации нефти находился на разных стадиях: в образце с 6 % нефти — на начальной стадии, с 2 % нефти — на поздней стадии.

Анализ изменений в бактериоценозе на уровне рода подтверждает высказанное предположение. Так, максимальное количество родов прокариот (94) обнаружено в образце с 2 % нефти, где процесс деградации поллютанта находится на поздней стадии, когда из грунта уже удалены наиболее токсичные компоненты. В этой ситуации расширение разнообразия связано, с одной стороны, с бактериями-нефтедеструкторами, которые способны использовать углеводороды в качестве источника угле-

рода, а с другой — с гетеротрофной микрофлорой, неспособной к нефтедеструкции, но устойчивой к низкой дозе циклических углеводородов [3, 15].

Напротив, в образце с 6 % нефти разнообразие сужается до 55 родов как по сравнению с контролем, где количество родов составляет 84, так и с бактериоценозом, сформировавшимся при 2 % уровне загрязнения. По-видимому, такой уровень нефтезагрязнения токсичен для почвенных прокариот, включая нефтедеструкторы. Многие исследователи отмечают, что превышение 5 % уровня содержания нефти приводит к ингибированию всей почвенной микрофлоры [3, 16].

Таксономический состав на уровне рода позволил охарактеризовать специфические изменения бактериальной микрофлоры дерново-подзолистой почвы при нефтезагрязнении (табл. 2). Так, в контроле доминировали роды *Arenimonas* и *Novosphingobium*, среди которых

Таблица 2

Доля (%) доминирующих родов бактерий в образцах почвы по данным высокопроизводительного секвенирования библиотек гена *16S rRNA*

Proportion (%) of major bacterial genera in soil samples accordingly to sequencing *16S rRNA* libraries

Филотип	Род	Процент ДНК в пробах		
		6 % нефти	2 % нефти	Контроль
<i>Acidobacteria</i>	<i>Blastocatella</i>	0	< 1	2,1
	<i>Segetibacter</i>	0	2,6	< 1
<i>Actinobacteria</i>	<i>Blastococcus</i>	0	6,3	0
	<i>Conexibacter</i>	0	3,2	1,4
	<i>Mycobacterium</i>	< 1	6,5	4,5
	<i>Nocardioides</i>	< 1	49,2	1,4
	<i>Rhodococcus</i>	0	2,3	0
	<i>Williamsia</i>	0	2,3	0

Окончание табл. 2

Филотип	Род	Процент ДНК в пробах		
		6 % нефти	2 % нефти	Контроль
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Altererythrobacter</i>	< 1	1,4	< 1
	<i>Brevundimonas</i>	< 1	5,4	< 1
	<i>Caulobacter</i>	< 1	1,8	0
	<i>Ferruginibacter</i>	0	0	2,1
	<i>Methylobacterium</i>	12,7	1,6	0
	<i>Novosphingobium</i>	< 1	1	5,6
	<i>Roseomonas</i>	< 1	2,5	0
	<i>Skermanella</i>	0	1,6	0
	<i>Sphingobium</i>	< 1	4,7	0
	<i>Sphingomonas</i>	1,8	3,7	7,5
	<i>Sphingorhabdus</i>	0	1	1,9
	<i>Xanthobacter</i>	< 1	1,4	0
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Ohtaekwangia</i>	0	1,6	0
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Acidovorax</i>	0	0	1,9
	<i>Polaromonas</i>	4,4	1,6	2,6
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Alkanindiges</i>	0	2,3	0
	<i>Arenimonas</i>	0	< 1	9,4
	<i>Arthrobacter</i>	< 1	2,8	3,1
	<i>Aquicella</i>	0	0	1,4
	<i>Pseudomonas</i>	1,2	12,7	< 1
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	61	0	0
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonas</i>	0	0	1,4
<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrospira</i>	0	0	1,4
<i>Sphingobacteria</i>	<i>Dyadobacter</i>	0	2,1	< 1
	<i>Sediminibacterium</i>	1,3	< 1	0

неизвестны или малочисленны виды-нефтедеструкторы, а также роды *Sphingomonas* и *Mycobacterium*, в которых такие виды присутствуют. При рассмотрении доминант нефтезагрязненных образцов обращает на себя внимание тот факт, что наряду с наличием родов *Pseudomonas*, *Nocardioideis*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, виды которых являются активными нефтедеструкторами в разных типах почв [18–20], в грунте преобладали представители рода *Pseudoxanthomonas*. Известно, что виды рода *Pseudoxanthomonas* разлагают в естественных условиях разные сорта нефти, дизельное топливо и другие нефтепродукты [20, 21]. Вероятно, бактерии этого рода оказались наиболее приспособленными к почвенно-климатическим условиям территории, прилегающей к нефтехранилищу.

Дендрограмма, полученная в результате кластерного анализа родов бактерий, показала, что таксономический состав бактериоценоза в образце с 2 % нефти сходен с таковым в контроле (рис. 2, а). Это еще одно свиде-

тельство завершающей стадии процесса самоочищения почвы, в результате которого условия в грунте с 2 % нефти приблизились к условиям в контроле без загрязнения. В образце с 6 % нефти сформировался ценоз, резко отличный по таксономическому составу как от контроля, так и от показателей в грунте с 2 % нефти. На фоне сужения разнообразия такой результат указывает на начальную стадию разложения углеводов. Некоторые исследователи считают, что такая ситуация складывается в бактериоценозе в период с 7-го по 21-й день после загрязнения нефтью почвы [17].

С помощью факторного анализа установлено, что в контроле определяющим фактором были бактерии рода *Arenimonas*. Прокариоты рода *Pseudoxanthomonas* выступали определяющим фактором как в варианте с высоким, так и с низким уровнем нефтезагрязнения. Помимо представителей этого рода в образце с 2 % нефти определяющим фактором были бактерии рода *Nocardioideis*, в образце с 6 % — рода *Methylobacterium* (рис. 2, б).

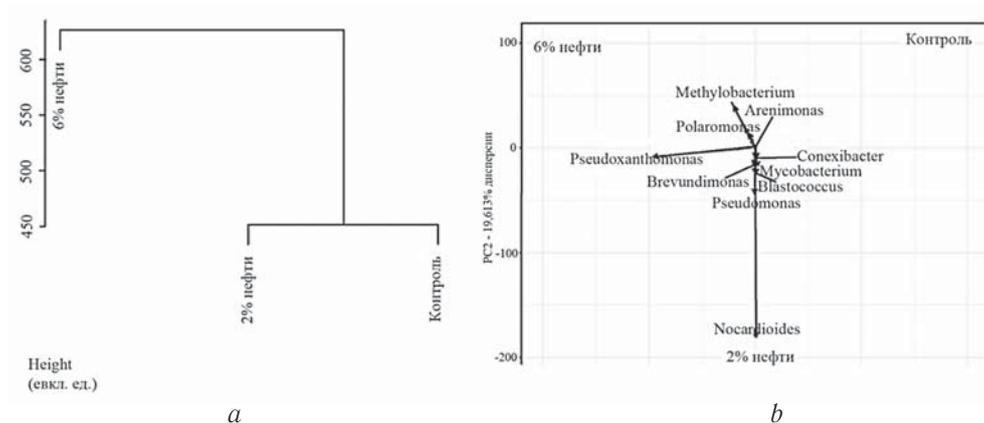


Рис. 2. Кластерный (a) и факторный (b) анализ таксономического состава микробных сообществ почвенных образцов на уровне рода

Fig. 2. Cluster (a) and factor (b) analysis of the taxonomic composition of microbial communities of soil samples at the genus level

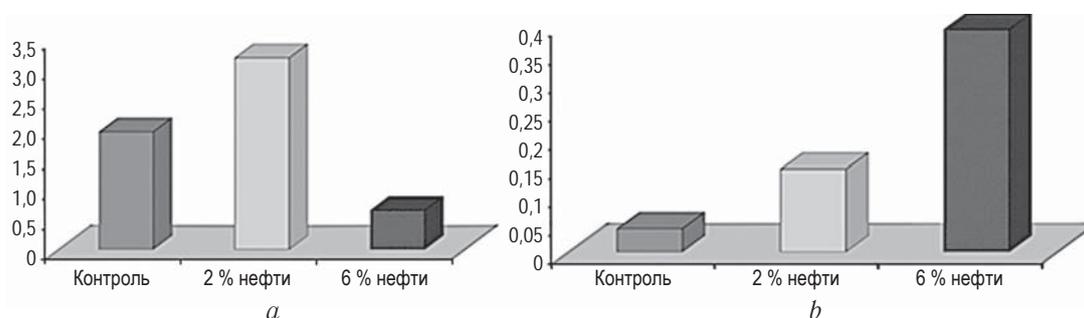


Рис. 3. Изменение индекса общего разнообразия Шеннона (a) и индекса доминирования Симпсона (b) под действием нефти

Fig. 3. Change in the index of Shannon's total diversity (a) and Simpson's dominance index (b) under the influence of oil

Таким образом, можно заключить, что в исследованной дерново-подзолистой почве активно идет процесс разложения нефти. По-видимому, наибольшее значение в процессе самоочищения почвы от углеводородов имеют виды-нефтедеструкторы, относящиеся к родам *Pseudoxanthomonas*, *Methylobacterium* и *Nocardioioides*. На основании полученных результатов следует рекомендовать представителей этих родов для поиска микроорганизмов-нефтедеструкторов с целью создания биопрепаратов для очистки от нефти территорий в Ленинградской области.

Еще одной особенностью реакции бактериальной микрофлоры исследованного грунта на нефтезагрязнение является формирование наиболее сбалансированного и устойчивого ценоза в образце с 2 % нефти (рис. 3, a). По-видимому, это связано с низким содержанием углерода в дерново-подзолистой почве и в особенности в образцах грунта, которые представляют собой смесь песка и почвы (см. табл. 1). В таких условиях углеводороды нефти, из которых уже удалены наиболее токсичные низкомолекулярные компоненты, выступают дополнительным источником углерода и стимулируют развитие почвенной микрофлоры. Формируется устойчивый ценоз, в котором доминируют бактерии-не-

фтедеструкторы и широко представлены гетеротрофные микроорганизмы, не обладающие способностью к разложению углеводородов, но при этом способные перерабатывать продукты промежуточного окисления, которые часто бывают токсичными для нефтедеструкторов [22]. Индекс Симпсона (рис. 3, b) отражает последовательное возрастание степени доминирования отдельных групп бактерий в загрязненных образцах в зависимости от дозы нефти по сравнению с контролем, где, несмотря на присутствие в биоценозе родов, включающих в себя виды-нефтедеструкторы, их доминирование не выражено.

Влияние нефтезагрязнения на состояние грибного ценоза. Микоценоз исследованного грунта оказался более чувствительным к нефти, чем бактериальный. Если в контроле грибной мицелий присутствовал во всех полях зрения (табл. 3), то в образце с 2 % нефти его частота встречаемости снизилась более чем в 4 раза. В еще большей степени этот показатель уменьшился в образце с 6 % нефти.

Определение длины грибного мицелия показало его низкое количество как в контрольных, так и в загрязненных нефтью образцах, что связано с олиготрофными условиями в грунте.

Таблица 3

Влияние нефти на частоту встречаемости грибного мицелия
Influence of oil on the incidence of fungal mycelium

Вариант	Частота встречаемости, %
Контроль	100,0
2 % нефти	24,1
6 % нефти	12,5

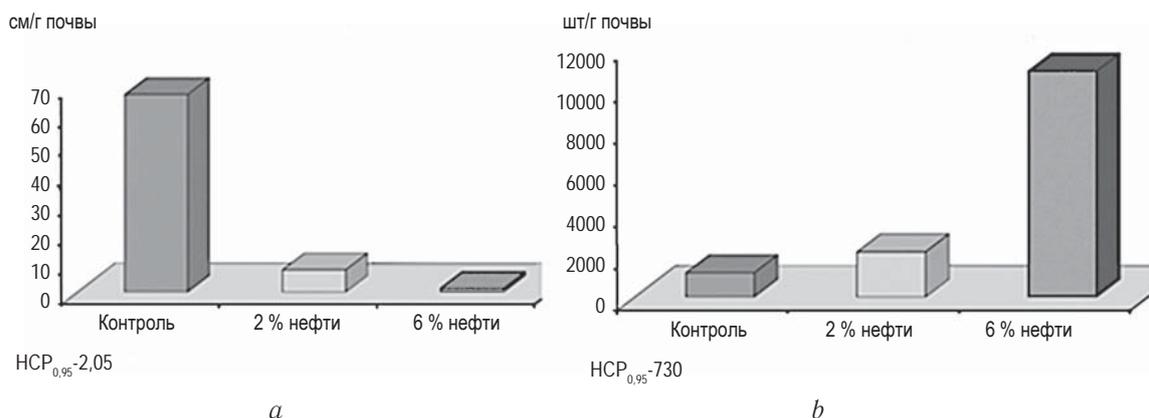


Рис. 4. Длина грибного мицелия (а) и количество грибных спор (b) в образцах, определенные прямым методом
Fig. 4. Length of fungal mycelium (a) and number of fungal spores (b) in samples determined by direct method

При попадании нефти в почву длина грибного мицелия резко снизилась: в свежезагрязненном грунте с содержанием 6 % нефти этот показатель уменьшился в 50 раз по сравнению с контролем (рис. 4, а). На фоне снижения количества мицелия произошло увеличение количества спор почти в 10 раз. Сокращение длины мицелия, сопровождающееся увеличением количества спор, свидетельствует об изменении биоморфологической структуры микоценоза. Характер изменения указывает на крайне неблагоприятные для микромицетов условия в грунте на начальной стадии нефтезагрязнения высокой дозой поллютанта [23].

По мере разложения нефти грибная микрофлора в грунте восстанавливалась, хотя заметно медленнее, чем бактериальная. Так, в образце с 2 % нефти возросло количество мицелия и снизилось количество спор, однако эти показатели были соответственно значительно ниже и выше, чем в контроле. По-видимому, среди микромицетов дерново-подзолистой почвы было мало видов, которые могут существовать в неблагоприятных условиях исследованного грунта и способны к окислению углеводов. Кроме того, гетеротрофные виды, обитавшие в грунте, проявили высокую чувствительность к нефтезагрязнению и с трудом восстанавливались даже при снижении дозы поллютанта и испарении/разложении его наиболее токсичных компонентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наиболее распространенным способом устранения локальных разливов нефти на территориях нефтехранилищ и прилегающих к ним участках является засыпание загрязненной почвы песком. Со временем песок, перемешиваясь с верхним слоем почвы, образует грунт, который заселяют микроорганизмы, типичные для данных почвенно-климатических условий и способные существовать в неблагоприятных условиях грунта. От их таксономического состава, численности и активности деструкторов нефти зависит скорость процесса самоочищения почвы от углеводов.

На основании проделанной работы можно заключить, что в Ленинградской области, где распространены дерново-подзолистые почвы, микробиологическое разложение нефти в грунтах, покрывающих разливы, осуществляют в основном прокариоты, что характерно для большинства нефтезагрязненных почв и субстратов. При этом в грунте формируется бактериоценоз, в котором доминантами выступают бактерии-нефтедеструкторы, относящиеся к родам *Pseudoxanthomonas*, *Methylobacterium* и *Nocardioides*, содержащим многочисленные виды нефтедеструкторов, окисляющих нефть и ее компоненты на разных стадиях разложения. Таксономический состав и высокая устойчивость бактериоценоза свидетельствуют об активном процессе самоочищения грунта, покрывающего разливы нефти. Особенность

территории вблизи нефтехранилища в поселке Малые Колпаны заключается в том, что определяющим фактором в процессе самоочищения выступают виды бактерий-нефтедеструкторов из рода *Pseudoxanthomonas*. По-видимому, представители этого рода наиболее приспособлены к условиям грунта, неблагоприятным для большинства нефтедеструкторов, относящихся к другим родам прокариот. Остается открытым следующий вопрос: будут ли бактерии-нефтедеструкторы из рода *Pseudoxanthomonas*, в силу своих биологических особенностей, доминировать в грунтах, покрывающих разливы нефти в других регионах, или это частный случай, характерный для территории поселка Малые Колпаны?

Участие микоценоза в самоочищении исследованного грунта представляется минимальным. Грибная микрофлора слабо развивалась в олиготрофных условиях смеси песка с почвой и проявила высокую чувствительность к нефтезагрязнению. Биоморфологическая структура микоценоза как в контрольных, так и в загрязненных образцах свидетельствует о низкой адаптивности микромицетов дерново-подзолистой почвы к условиям грунта и возможном выпадении этой группы из числа педобионтов вблизи нефтехранилищ.

Работа поддержана грантом РФФИ 14-26-00094П.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шименкова А.А., Потапов А.Д. Система геоэкологического мониторинга нефтехранилищ автозаправочных станций // ФГБОУ ВПО «МГСУ». — 2014. — № 3. — С. 212–219. [Shimenkova AA, Potapov AD. Geo-environmental monitoring system of the oil storages on petrol stations. *Vestnik MGSU*. 2014;(3):212-219. (In Russ.)]
2. Ильин Н.П., и др. Наблюдение за самоочищением почв от нефти в средней и южной тайге // Добыча полезных ископаемых и геохимия природных экосистем. — М.: Наука, 1982. — С. 245–258. [Il'in NP, et al. Observation of soil self-purification from oil in the middle and southern taiga. In: *Extraction of minerals and geochemistry of natural ecosystems*. Moscow: Nauka; 1982. P. 245-258. (In Russ.)]
3. Куликова И.Ю. Разработка биопрепарата для ликвидации аварийных разливов на море // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. — 2008. — № 5. — С. 59–62. [Kulikova IY. Development of a Biopreparation for the Elimination of Emergency Spills at Sea. *Zashhita okruzhajushhej sredy v neftegazovom komplekse*. 2008;(5):59-62. (In Russ.)]
4. Шамраев А.В., Шорина Т.С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды // Вестник Оренбургского гос. ун-та. — 2009. — № 6. — С. 642–645. [Shamraev AV, Shorina TS. Influence of petroleum and petroleum products to the various components of the environment. *Bulletin of Orenburg State University*. 2009;6(100):642-645. (In Russ.)]
5. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В.Н. Выбор активного микроорганизма — деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. — 1995. — Т. 31. — № 5. — С. 534–539. [Stabnikova EV, Selezneva MV, Reva ON, et al. Vybora aktivnogo mikroorganizma-destruktora uglevodorodov dlya ochistki neftezagryaznennyh pochv. *Prikladnaja Biokhimiya i mikrobiologija*. 1995;31(5):534-539. (In Russ.)]
6. Околелова А.А., Карасева А.С., Куницына И.А. Методы определения и расчета органических поллютантов в нефтезагрязненных почвах // Фундаментальные исследования. — 2011. — № 8–3. — С. 687–689. [Okolelova AA, Karaseva AS, Kunicyna IA. Metody opredeleniya i rascheta organicheskikh pollyutantov v neftezagryaznennyh pochvah. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2011;(8-3):687-689. (In Russ.)]
7. Андронов Е.Е., и др. Научно-методические рекомендации по выделению высокоочищенных препаратов ДНК из объектов окружающей среды. — СПб., 2011. — 23 с. [Andronov EE, et al. Nauchno-metodicheskie rekomendacii po vydeleniju vysokoochishhennyh preparatov DNK iz obektov okruzhajushhej sredy. Saint Petersburg; 2011. 23 p. (In Russ.)]
8. Bates ST, Berg-Lyons JG, Caporaso WA, et al. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME J*. 2010;5(5):908-917. doi: 10.1038/ismej.2010.171.
9. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010;7(5):335-336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
10. Шитиков В.К., Розенберг Г.С. Оценка биоразнообразия: попытка формального обобщения // Количественные методы экологии и гидробиологии (сборник научных трудов, посвященный памяти А.И. Баканова). — Тольятти: СамНЦ РАН, 2005. — С. 91–129. [Shitikov VK, Rozenberg GS. Ocenka bioraznoobraziya: popytka formal'nogo obobshcheniya. In: *Kolichestvennye metody ehkologii i gidrobiologii (sbornik nauchnyh trudov, posvyashchennyj pamyati A.I. Bakanova)*. Tolyatti: SamNC RAN; 2005. P. 91-129. (In Russ.)]
11. Dos Santos HF, et al. Mangrove Bacterial Diversity and the Impact of Oil Contamination Revealed by Pyrosequencing: Bacterial Proxies for Oil Pollution. *PLoS One*. 2011;6(3):e16943. doi: 10.1371/journal.pone.0016943.
12. Rehm K, Hertkorn N, Kettrup AA. Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium sp.* strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth. *Microbiology*. 2001;147(10):2783-2794.
13. Pineda-Flores G, et al. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes

- as a carbon and energy source. *Biodegradation*. 2004;15:145-151.
14. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. — Уфа: Гилем, 2001. — 376 с. [Kireeva AN, Vodop'janov VV, Miftahova AM. Biologicheskaja aktivnost' neftezagrjaznennyh pochv. Moscow: Gilem; 2001. 377 p. (In Russ.)]
15. Гузев В.С., Левин С.В., Селецкий Г.И., и др. Роль почвенной микробиоты в рекультивации нефтезагрязненных почв // Микроорганизмы и охрана почв. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — С. 121–150. [Guzev VS, Levin SV, Seleckij GI, et al. Rol' pochvennoj mikrobioty v rekul'tivacii neftezagrjaznennyh pochv. In: Mikroorganizmy i ohrana pochv. Moscow: Izd-vo MGU; 1989. P. 121-150. (In Russ.)]
16. Brakstad OG, Lødeng AGG. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microb Ecol*. 2005;49(1):94-103. doi: 10.1007/s00248-003-0225-6.
17. Juck D, et al. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol*. 2000;33(3):241-249.
18. Bogan BW, et al. *Alkanin digesillinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:1389-1395.
19. Popp N, Schlomann M, Mau M. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology*. 2006;152:3291-3304.
20. Nopcharoenkul W, Netsakulnee P, Pinyakong O. Diesel oil removal by immobilized *Pseudoxanthomonas* sp. RN402. *Biodegradation*. 2013;24(3):387-397. doi: 10.1007/s10532-012-9596-z.
21. Kumari B, Singh SN, Singh DP. Characterization of two biosurfactant producing strains in crude oil degradation. *Process Biochemistry*. 2013;47(12):2463-2471.
22. Кононова В.В., Самсонова А.С., Семочкина Н.Ф. Сурфактантообразующая микрофлора: свойства и практическое использование // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник научных трудов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», 2007. [Kononova VV, Samsonova AS, Semochkina NF. Surfaktantobrazujushhaja mikroflora: svoystva i prakticheskoe ispol'zovanie. In: Mikrobnye biotehnologii: fundamental'nye iprikladnye aspekty. Sbornik nauchnyh trudov of Institut Mikrobiologii NAN Belarusi; 2007. (In Russ.)]
23. Мирчинк Т.Г. Почвенная микология. — М.: Изд-во МГУ, 1988. — 220 с. [Mirchink TG. Pochvennaya mikologiya. Moscow: Izd-vo MGU; 1988. (In Russ.)]

✿ Информация об авторах

Анна Сергеевна Журавлева — магистр кафедры почвоведения СПбГУ; аспирант ФГБНУ АФИ, инженер. Санкт-Петербург. E-mail: yardgrave@mail.ru.

Наталья Марковна Лабутова — д-р биол. наук, СПбГУ; ФГБНУ ВНИИСХМ. Санкт-Петербург. E-mail: labutovanm@gmail.ru.

Евгений Евгеньевич Андронов — канд. биол. наук, заведующий лабораторией, ФГБНУ ВНИИСХМ; старший научный сотрудник кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ; ведущий научный сотрудник, Почвенный институт им. В.В. Докучаева. Санкт-Петербург, Москва. E-mail: eeandr@gmail.com.

✿ Information about the authors

Anna S. Zhuravleva — Master of Soil Sciences, Saint Petersburg State University; graduate student, engineer, Agrophysical Research Institute. Saint Petersburg, Russia. E-mail: yardgrave@mail.ru.

Natal'ya M. Labutova — Doctor of Biological Sciences, Saint Petersburg State University; All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology. Saint Petersburg, Russia. E-mail: labutovanm@gmail.ru.

Evgeniy E. Andronov — head of laboratory, All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology; senior scientist, Saint Petersburg State University; leading scientist, V. Dokuchaev Soil Science Institute. Saint Petersburg, Moscow, Russia. E-mail: eeandr@gmail.com.