

УДК 631.421.2

doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.393-412

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО И ГРИБНОГО СООБЩЕСТВ ПРИ САМОВОССТАНОВЛЕНИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ

Л.Р. Бикташева, А.А. Савельев, С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая
Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Нефтяное загрязнение является серьезной экологической проблемой, несмотря на способность почв к самовосстановлению. В настоящей работе проведен анализ бактериальных и грибных сообществ шести образцов природных почв, находящихся в стадии самовосстановления после нефтяного разлива, и их незагрязненных аналогов. Содержание углеводов в почвах варьировалось от 3% до 14% с доминированием во всех образцах фракций алифатических и ароматических углеводов (в сумме более 50%). Методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina MiSeq определено, что в незагрязненных почвах преобладали бактерии, относящиеся к типам Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria и Bacteroidetes. Во всех образцах загрязненных почв выраженное доминирование установлено для бактерий типа Actinobacteria (38–66%), в основном за счет резкого увеличения относительного обилия бактерий семейства Nocardiaceae (7–32%), известных своей углеводородоксилирующей активностью. В четырех образцах незагрязненных почв доминировали грибы, относящиеся к типу Ascomycota, в двух – представители типов Ascomycota и Basidiomycota. Структура грибных сообществ загрязненных почв отличалась от незагрязненных, однако различия не имели общих закономерностей. Скорее всего, различающаяся ответная реакция бактериальных и грибных сообществ на нефтяное загрязнение связана с различными метаболическими возможностями в отношении углеводов у бактерий и грибов.

Ключевые слова: нефтезагрязненные почвы, микробное сообщество, углеводородоксилирующие виды

Введение

Сырая нефть представляет собой сложную смесь углеводов и органических соединений. Широко известно, что разливы нефти приводят к серьезному загрязнению почв, образуя углеводородные пленки, которые меняют гидравлические и механические свойства почвы [1, 2].

Согласно данным ряда авторов, эффективность утилизации нефти при ее разливах зависит от таких характеристик, как тип почвы, содержание органического вещества, вид землепользования, pH, содержание микроэлементов и металлов, растительный покров, климатические факторы и др. [3–8]. Впрочем, есть и противоположное мнение, свидетельствующее об отсутствии такой зависимости [9–12].

Нефтяное загрязнение влияет на биотические компоненты экосистемы, в частности на микробные сообщества [13]. Естественная деградация углеводов

в почве в основном происходит за счет деятельности микроорганизмов [14]. Основную роль в деградации нефти в почве играют бактерии, такие как *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium*, *Dietzia*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Flavobacter*, *Alcanivorax*, *Moraxella*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Gardona*, *Burkholderia*, *Sphingobium*, *Flavobacterium*, *Cycloclasticus*, и грибы – *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Neosartorya*, *Saccharomyces*, *Amorphoteca*, *Talaromyces*, *Syncephalastrum*, *Paecilomyces*, *Graphium*, *Cunninghamella*, *Psilocybe* [15, 16]. Высокая активность бактерий связана с наличием у них специфических ферментных систем, осуществляющих деградацию углеводов, например алкан-монооксигеназных, P-450 монооксигеназных (CYP153) и диоксигеназных [17, 18]. Помимо бактерий в деградации углеводов принимают участие почвенные грибы. Так, например, полиароматические углеводороды могут разлагаться как группой лигнолитических, так и не лигнолитических грибов [18, 19]. При этом отмечено, что у грибов нет специфических углеводородокисляющих ферментов, а деградацию углеводов они осуществляют с помощью ферментов, разрушающих лигнин, таких как лигнин-пероксидаза, Mn-пероксидаза, лакказы, либо с помощью цитохром P-450 монооксигеназ (CYP52) [18, 19]. Некоторые авторы указывают на синергетическое действие грибов и бактерий в сообществе, отмечая что, несмотря на то что первоначальная деградация нефти осуществляется бактериями, скорость биодеградации нефти увеличивается в два раза при их совместной деятельности [20].

В настоящее время для оценки состава и структуры сообществ применяют молекулярно-биологические методы, преимущество которых является независимость от использования методов культивирования микроорганизмов, а также возможность исследования влияния углеводов как на отдельные виды и группы, так и на сообщества в целом [19, 21, 22]. Существует ряд работ, описывающих изменения микробного сообщества после длительного загрязнения почв нефтью. Так, Ч.-Ф. Чжоу с соавторами [23] отмечают, что в образцах почв с длительным загрязнением углеводородами повышается обилие представителей бактерий, принадлежащих к типу Actinobacteria (рода *Mycobacterium* и *Micromonospora*) и типу Proteobacteria (рода *Pseudomonas*, *Lysobacter*, *Idiomarina*, *Massilia* и семейству Oxalobacteraceae), а также грибов, принадлежащих типу Ascomycota (порядкам Sordariales and Pleosporales). Показано, что в длительно загрязненных почвах доминируют бактерии типов Proteobacteria and Bacteroidetes, представленные родами *Methylotenera* и *Flavobacterium* соответственно [24]. В работе А. Боровик с соавторами [25] показано, что при загрязнении почвы углеводородами увеличивается численность грибов, однако разнообразие при этом снижается. С. Сюй с соавторами [26] отмечают, что длительное нефтяное загрязнение почв способствовало увеличению обилия некоторых представителей родов *Venturia*, *Alternaria* и *Piloderma* (типы Ascomycota и Basidiomycota), известных углеводородокисляющей способностью.

Настоящее исследование посвящено анализу изменения структурного разнообразия бактериальных и грибных сообществ в почвах в процессе их естественного восстановления и определению особенностей их ответных реакций.

1. Материалы и методы

Экспериментальные образцы. В работе анализировали шесть почвенных образцов (D1, D2, S1, S2, T, C), отобранных на территории со старым нефтяным загрязнением. Территории с таким загрязнением определяли либо на основании опроса местных жителей, либо по визуальным признакам (измененный цвет почвы, наличие нефтяных подтеков в прикопках, ингибированная растительность). Пробы отбирали на площадках 10×10 м методом конверта с глубины 0–10 см, после предварительного удаления растений согласно ГОСТ 17.4.4.02-2017 [27]. Из шести отобранных проб готовили усредненную пробу, массой не менее 1 кг. На расстоянии не менее 300 м от каждой точки отбора нефтезагрязненных почв отбирали незагрязненные образцы, которые использовали в качестве контроля (D1k, D2k, S1k, S2k, Tk, Ck). Координаты точек отбора проб представлены в табл. 1. Образцы для физико-химического анализа хранили при 4 °С, для молекулярно-биологического анализа – при –80 °С.

Табл. 1

Координаты точек отбора проб почвы

Образцы	Широта, С	Долгота, В
D1	55°48'53.00"	49°20'40.41"
D1k	55°48'59.77"	49°20'24.51"
D2	55°53'18.82"	49°02'2.14"
D2k	55°53'25.36"	49°01'48.73"
S1	55°23'37.47"	49°46'56.65"
S1k	55°23'28.59"	49°46'49.22"
S2	55°30'4.36"	49°51'14.29"
S2k	55°30'12.58"	49°51'03.03"
T	56°02'47.27"	49°47'25.07"
Tk	56°02'51.53"	49°47'43.88"
C	55°16'41.39"	50°04'44.44"
Ck	55°17'40.28"	50°06'53.99"

Физико-химические анализы. В отобранных образцах определяли содержание нефтепродуктов гравиметрическим методом [28], а также содержание отдельных фракций – сумму алифатических и ароматических углеводородов, смол и асфальтенов – с помощью адсорбционно-хроматографического метода Маркуссона – Саханова [29].

Анализ структуры микробного сообщества. Тотальная геномная ДНК была выделена с помощью набора FastDNA®SPIN Kit for Soil (Bio101, Qiogene, Германия). Выделенная ДНК анализировалась сразу или хранилась при –20 °С.

Численность бактерий и грибов была проанализирована с помощью метода количественной ПЦР (qPCR). qPCR-анализ проводили с использованием общебактериальных 341F/534R [30] и общегрибных праймеров FQf-FQg [31]. Реакционная смесь включала в себя 0.1 У/мкл полимеразы *SynTaq*, 1-кратный буфер с красителем SYBR Green, 2.5 мМ MgCl₂, по 200 мкМ каждого dNTP, 0.2 мкМ каждого праймера и 1 мкл ДНК. Амплификация осуществлялась на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Munich, Германия) при следующем режиме: 15 мин при 95 °С и 39 циклов, включающих 30 с при 95 °С, 30 с при

55 °C и 30 с при 72 °C. Для количественного определения численности бактерий и грибов были построены калибровочные кривые с использованием в качестве стандарта для бактерий штамма *Pseudomonas fluorescense*, для грибов – *Penicillium chrysogenum*. Все анализы были выполнены в трех повторностях при эффективности 94% и значениях R^2 больше 0.99.

Секвенирование бактериального и грибного сообществ проводили на платформе Illumina (Illumina, США). Подготовка геномной библиотеки была осуществлена согласно протоколу 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol (Illumina MiSeq). Амплификацию V3–V4 региона 16S рРНК проводили с помощью термоциклера DNA Engine Tetrad® 2 cycler (BioRad, Германия) с использованием специфических праймеров:

А (TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGC WGCAG);

В (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGT ATCTAATCC),

амплификацию участка ITS2 проводили с использованием системы праймеров ITS86F-ITS4. Амплификация проводилась в следующем режиме: 95 °C в течение 3 мин, 27 циклов 95 °C (30 с), 55 °C (30 с) и 72 °C (30 с), а также финальную элонгацию при 72 °C (3 мин). Ампликоны были очищены с помощью Agencourt AMPure XP purification kit (Beckman Coulter, США). Второй раунд был проведен с использованием тех же параметров амплификации. Концентрация ампликонов была измерена на приборе Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, США) с использованием Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher, США). Контроль качества полученных ампликонов был проведен на приборе Labchip GX Touch 24 (PerkinElmer). Далее было проведено секвенирование на приборе MiSeq (Illumina, США) согласно инструкции.

Данные секвенирования 16S рРНК были проанализированы с помощью программного обеспечения Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) platform, version 1.6.0 [32]. Выравнивание репрезентативных последовательностей проводили согласно алгоритму PyNAST [33]. Таксономическая структура была определена в сравнении с базой данных Greengenes с использованием программы USEARCH [34]. Операционные таксономические единицы были сгруппированы с порогом сходства 97%. Контроль качества прочтения полученных ITS2 последовательностей был проведен с помощью инструмента cutadapt v2.7, парноконцевые прочтения были объединены с помощью инструмента FLASH v1.2, дубликаты последовательностей и химеры были удалены в соответствии с протоколами RDPTools. Таксономическая классификация проводилась в соответствии с базой данных ITS2 при помощи инструмента RDPTools v2.11 с порогом сходства 97%.

Статистическая обработка результатов. Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. Полученные данные были обработаны с использованием программы Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, США). Для оценки достоверности различий был использован критерий Фишера при $\alpha = 0.05$. Вычисления бета-разнообразия сообществ производили с помощью программного обеспечения R. Для визуализации данных методом многомерного шкалирования были построены NMDS-графики, в основу которых были положены индексы схожести, рассчитанные с помощью коэффициента Брея – Кертиса [35].

Табл. 2

Физико-химические показатели почв

Образцы	Общее содержание нефтепродуктов, %	Групповой состав, %		
		Алифатика и ароматика	Смолы	Асфальтены
D1	14	53	37	10
D1k	менее 0.002	н/о	н/о	н/о
D2	8	53	31	16
D2k	менее 0.002	н/о	н/о	н/о
S1	9	62	25	13
S1k	менее 0.002	н/о	н/о	н/о
S2	3	51	42	7
S2k	менее 0.002	н/о	н/о	н/о
T	5	55	34	11
Tk	менее 0.002	н/о	н/о	н/о
C	10	61	26	13
Ck	менее 0.002	н/о	н/о	н/о

н/о – не определяли.

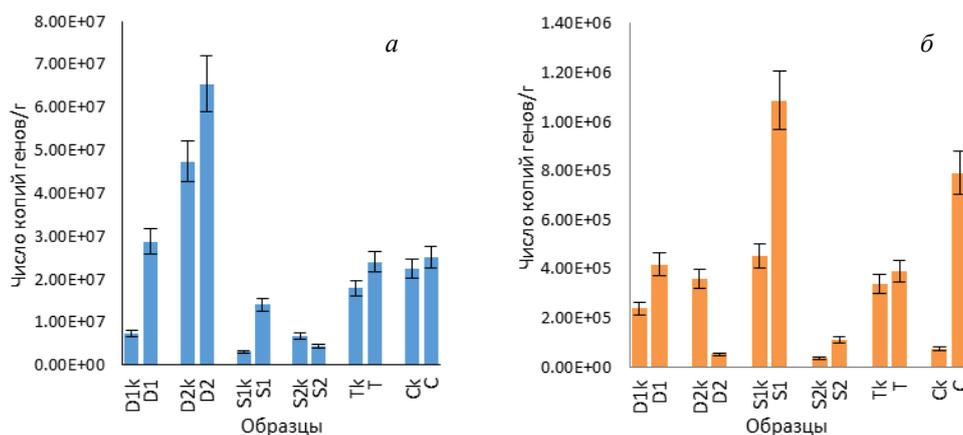


Рис. 1. Численность бактерий (а) и грибов (б). На рисунке представлены средние значения и стандартная ошибка (SE)

2. Результаты и их обсуждения

Анализ содержания нефтяных компонентов в отобранных почвах показал, что максимально загрязненными оказались образцы D1 и C – 14% и 10% соответственно (табл. 2). Далее по уровню содержания нефти следовали образцы S1, D2, T, S2 – 9%, 8%, 5% и 3% соответственно. Более половины нефтяных компонентов (51–63%) во всех образцах были представлены фракцией алифатических и ароматических углеводородов, что свидетельствует о том, что в почве еще присутствовали соединения, которые могли подвергаться микробной деструкции.

Традиционной характеристикой микробного сообщества является численность организмов в почве. Результаты определения численности бактерий и грибов методом количественной ПЦР с использованием общесистемных 341F/534R и общегрибных праймеров FQf/FQr представлены на рис. 1.

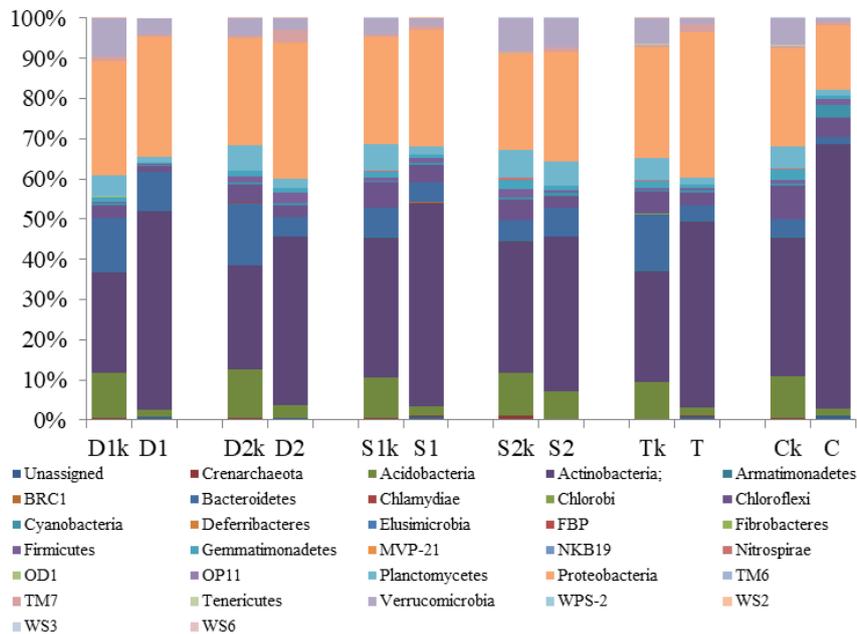


Рис. 2. Структура бактериального сообщества на уровне типов

Как видно из полученных данных, наибольшее количество бактерий обнаружено в образцах почвы D2, причем как в загрязненной, так и в контрольной почве – $4.7 \cdot 10^7$ и $6.5 \cdot 10^7$ копий генов/г соответственно. В остальных образцах незагрязненных почв количество бактерий в среднем составляло $1.1 \cdot 10^7$ копий генов/г. Общая численность бактерий в почвенных образцах с нефтяным загрязнением оказалась выше в 3.8 и 4.5 раз для образцов D1 и S1 по сравнению с контрольными вариантами. Увеличение количества бактерий при загрязнении почвы нефтью подтверждается данными литературы [26, 36]. В остальных образцах их количество было соизмеримо с контрольными вариантами.

При анализе количества микроскопических грибов выявлено, что в образцах контрольных почв их численность составляла для образцов D1k, D2k, S1k и Tk в среднем $3.4 \cdot 10^5$, в образцах S2k и Ck – $5.5 \cdot 10^4$ копий генов/г. В образцах, отобранных на территории, загрязненной нефтью, количество грибов увеличивалось, однако достоверное увеличение обнаружено только для варианта С. В варианте D2 выявлено достоверное снижение численности грибов в 7 раз.

На следующем этапе была определена структура бактериальной части сообществ на основании результатов секвенирования участка гена 16S рРНК. Результаты получены по протоколу Illumina MiSeq. Всего было получено 1453586 пар последовательностей, из них контроль качества прошло 453530 пар последовательностей. Суммарно в образцах была идентифицирована 565 бактериальных ОТЕ, 401 из которых хотя бы единожды были обнаружены в одном из образцов незагрязненных почв, 164 – только в образцах нефтезагрязненных почв. Для незагрязненных образцов характерно совпадение 46% всех ОТЕ, для всех образцов, в нефтезагрязненных образцах наблюдается 40%-ное совпадение ОТЕ, 29% ОТЕ являются общими как для незагрязненных, так и для нефтезагрязненных образцов. Обилие бактерий, сгруппированных на уровне типов, представлено на рис. 2.

Обнаружено, что представители типов Actinobacteria и Proteobacteria доминировали во всех незагрязненных и загрязненных почвах. И если обилие представителей Proteobacteria было примерно одинаковым как в незагрязненных, так и в загрязненных почвах, то для типа Actinobacteria было отмечено существенно большее обилие в загрязненных почвах (38–66%) по сравнению с их обилием в незагрязненных почвах (25–35%). Выявлено, что обилие бактерий, принадлежащих к остальным типам в загрязненных почвах, ниже по сравнению с таковым в контрольных. Так, например, обилие представителей типов Acidobacteria и Bacteroidetes в контрольных почвах варьируется в диапазоне 10–12% и 4–16%, а в загрязненных – 2–7% и 2–10% соответственно. Полученные нами данные находятся в русле современных представлений об обилии бактерий. Так, известно, что представители типов Actinobacteria и Proteobacteria ранее были обнаружены как в незагрязненных, так и в загрязненных нефтью почвах [3]. На таксоны, присутствующие в нефтезагрязненной почве, такие как Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Planctomycetales, указывают и другие авторы [3, 37]. При этом некоторые авторы отмечают, что в чистых почвах обилие представителей этих типов может быть существенно выше (15–25%), чем в нефтезагрязненных (2%) [3].

Более подробно динамику структуры микробного сообщества оценивали, анализируя доминирующие ОТЕ, чье относительное обилие составляло более 2% (табл. 3).

Как видно из полученных данных, отличия в сообществах загрязненных почв от контрольных были одинаковыми для всех почвенных образцов. Так, рост относительного обилия бактерий типа Actinobacteria в основном обеспечивался за счет значительного увеличения обилия представителей рода *Rhodococcus*, в частности бактерий, идентифицированных как *Rhodococcus fascians*. В совокупности относительное обилие представителей семейства Nocardiaceae, в состав которого входят бактерии рода *Rhodococcus*, составило 25%, 18%, 25%, 7%, 28% и 32% для образцов D1, D2, S1, S2, T и C соответственно. Помимо этого, в некоторых образцах отмечено большее по сравнению с контрольными образцами обилие представителей рода *Arthrobacter*, относящегося к типу Actinobacteria, а также представителей родов *Pseudomonas* и *Luteibacte*, относящихся к типу Proteobacteria. Действительно, представители Actinobacteria, в том числе представители семейства Nocardiaceae являются наиболее универсальными и эффективными культивируемыми углеводородокисляющими микроорганизмами [37]. Среди представителей рода *Rhodococcus* обнаружены виды, которые характеризуются способностью утилизировать как алифатические углеводороды, так и нафталин, фенантрен, а также ПАУ, содержащие более 4 колец [26, 38–40], а вид *Rhodococcus fascians* был ранее обнаружен в нефтезагрязненных почвах [41].

Параллельно с определением бактериального сообщества в этих же образцах был произведен анализ грибного сообщества. В ходе секвенирования участков ITS2 региона было получено 151011 пар последовательностей, из которых после отбраковки в анализ было взято 143339 пар. Полученные последовательности были сгруппированы на уровне типов (рис. 3). Всего в образцах была идентифицирована 469 грибная ОТЕ, из которых 350 ОТЕ были обнаружены хотя бы в одном из образцов незагрязненных почв, 12 ОТЕ – только в образцах нефтезагрязненных

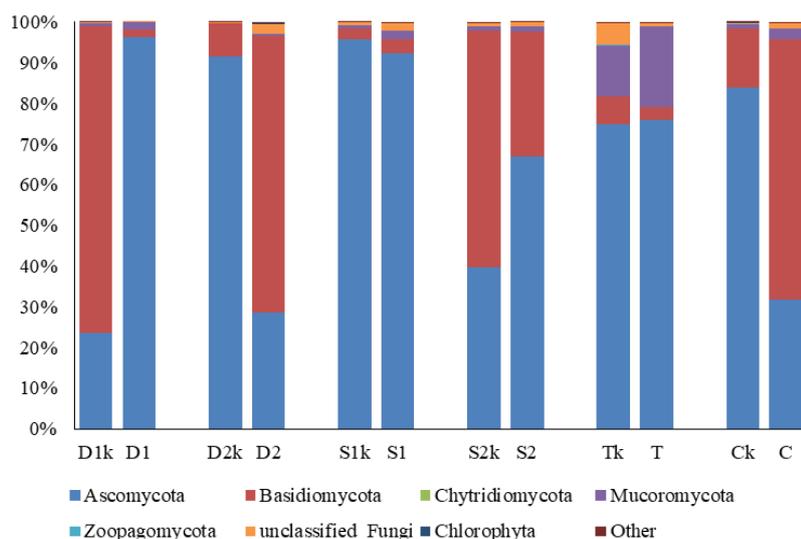


Рис. 3. Структура грибного сообщества на уровне типов

почв. Среди незагрязненных образцов 5% ОТЕ являются общими, для нефтезагрязненных – 6% общими, для всех образцов общими являются 3% ОТЕ.

Установлено, что в четырех контрольных образцах D2k, S1k, Tk и Ck доминировали грибы, относящиеся к типу Ascomycota, в образцах D1k и S2k в качестве доминирующих могут быть отмечены представители двух типов – Ascomycota и Basidiomycota. Три почвенных образца, загрязненных нефтью (S1, T и S2), оказались практически такими же, как контрольные образцы, в образце D1 обнаружено выраженное доминирование грибов типа Ascomycota, в образцах D2 и C – Basidiomycota. Представляется интересным, что в образцах почвы T, как загрязненной, так и контрольной, в качестве субдоминанта обнаружен тип Mucoromycota.

Так же, как и для бактериального сообщества, были выделены доминирующие грибные ОТЕ, имеющие обилие более 2%. Данные представлены в табл. 4.

При анализе сообществ на основе доминирующих ОТЕ установлено, что в образцах D2k, S1k, Ck доминировал вид *Phomopsis quercella*. В образце D1k доминировали вид *Humaria hemisphaerica* и представители родов *Clavulina*, *Tomentella*, в образце S2k доминантными оказались представители родов *Hebeloma* и *Tricholoma*, а также был обнаружен вид *Tarzetta catinu*. В образце T доминировали представители рода *Leohumicola* и вида *Mortierella elongate*. Известно, что эти ОТЕ ранее были обнаружены в почвах [42–45].

Отмечено, что грибные сообщества загрязненных почв отличались от контрольных, однако наблюдаемые изменения не имели каких-либо общих закономерностей. Так, например, обилие грибов *Phomopsis quercella* (тип Ascomycota) оказалось ниже по сравнению с аналогичными контрольными почвами в трех образцах (C, D2, S1), выше – в образце D1 и находилось на том же уровне в образцах T и S2. Или, например, обилие представителей рода *Tomentella* (отряд Thelephorales) было ниже по сравнению с контролем в образцах D1 и S2, выше в образце D2 и соизмеримо с контролем в образцах C, S1, T.

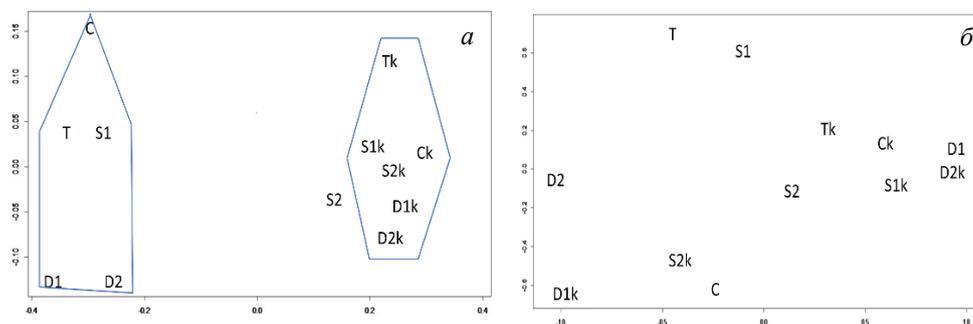


Рис. 4. Оценка бета разнообразия бактериальных (а) и грибных (б) сообществ методом NMDS

В некоторых, но не во всех образцах загрязненных почв выявлено выраженное доминирование ряда ОТЕ, известных своей способностью деградировать углеводороды. Так, установлено, что в образцах S1 и T представители рода *Fusarium* составляют 55% и 54% относительного обилия. Ранее отмечалось, что представители рода *Fusarium* способны утилизировать полиароматические углеводороды с помощью лигнин-разлагающих ферментов [19,48]. Высокое относительное обилие установлено для ОТЕ, принадлежащих к родам *Cenococcium*, *Umbelopsis*, *Mucoromycota*, *Hebeloma*, а также вида *Wilcoxina rehmi*. Ранее было показано, что эти организмы способны разлагать углеводороды [19, 46–48].

Для того чтобы охарактеризовать сходство бактериальных, а также грибных сообществ была проведена оценка их бета разнообразия методом NMDS (рис. 4). В качестве исходных объектов рассматривали каждое сообщество как совокупность всех обнаруженных в его составе ОТЕ.

Согласно полученным результатам, бактериальные сообщества четко объединяются в две группы (рис. 4, а). В состав первой входят образцы загрязненных почв за исключением образца S2. Скорее всего, это связано с тем, что в этом образце, в отличие от остальных, не обнаружено выраженного доминирования представителей рода *Rhodococcus* (табл. 4). Вторую группу составляют сообщества контрольных почв. Такое четкое разделение свидетельствует о том, что сообщества нефтезагрязненных почв более близки между собой и достоверно отличаются от контрольных, которые также близки между собой. При этом необходимо отметить, что контрольные образцы располагаются более близко друг к другу, что свидетельствует об их большем сходстве. Таким образом, можно заключить, что нефтяное загрязнение оказывает влияние на бактериальную составляющую сообществ, причем направление изменений в сообществе является однотипным для всех проанализированных сообществ, несмотря на различия в исходных абиотических характеристиках почв.

Иная картина наблюдается при анализе схожести грибных сообществ. Как видно из данных, представленных на рис. 4, б, все сообщества равномерно распределены на плоскости, что свидетельствует об отсутствии каких-либо закономерностей в ответной реакции грибного сообщества на нефтяное загрязнение. Скорее всего, это связано с тем, что у грибов отсутствуют специализированные ферменты разложения углеводов, а процесс деструкции осуществляется с помощью неспецифических ферментов, таких как лигнин-пероксидаза, Мп-

пероксидаза, лакказы, либо с помощью цитохром Р-450 монооксигеназ (СYP52) [18, 19, 26].

Заключение

Проведен анализ бактериальных и грибных сообществ почв, длительное время загрязненных нефтью, и их незагрязненных аналогов. Установлено, что независимо от исходных абиотических характеристик почв бактериальные сообщества всех шести образцов незагрязненных почв были достаточно похожими, что выражалось в доминировании бактерий типов Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria и Bacteroidetes. В аналогичных загрязненных почвенных образцах сохранялось доминирование бактерий типа Proteobacteria, снижалось обилие бактерий типов Acidobacteria и Bacteroidetes и существенно увеличивалось обилие бактерий типа Actinobacteria. Последнее являлось следствием активного увеличения бактерий семейства Nocardiaceae, в особенности представителей рода *Rhodococcus*, известных своей способностью разлагать как алифатические, так и ароматические и полициклические углеводороды.

В случае грибных сообществ также отмечены различия в структуре сообществ загрязненных и незагрязненных почв, однако, в отличие от бактериальных сообществ, такие изменения не имели общих для всех образцов закономерностей. Вероятнее всего, различающаяся ответная реакция бактериальных и грибных сообществ на нефтяное загрязнение связана с различными метаболическими возможностями в отношении углеводов у бактерий и грибов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-74-20183).

Литература

1. Agbogidi O.M., Eruotor P.G., Akparobi S.O. Effects of crude oil levels on the growth of maize (*Zea mays* L.) // Am. J. Food Technol. – 2007. – V. 2, No 6. – P. 529–535. – doi: 10.3923/ajft.2007.529.535.
2. Marin-Garcia J.A., Tomas J.M. Deconstructing AMO framework: A systematic review // Intang. Cap. – 2016. – V. 12, No 4. – P. 1040–1087. – doi: 10.3926/ic.838.
3. Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Al-Soud W.A., Langenhoff A.A.M., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H.M., Smidt H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – V. 79, No 2. – P. 619–630. – doi: 10.1128/AEM.02747-12.
4. Liu Q., Tang J., Gao K., Gurav R., Giesy J.P. Aerobic degradation of crude oil by microorganisms in soils from four geographic regions of China // Sci. Rep. – 2017. – V. 7, No 1. – Art. 14856, P. 1–12. – doi: 10.1038/s41598-017-14032-5.
5. Fierer N., Jackson R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2006. – V. 103, No 3. – P. 626–631. – doi: 10.1073/pnas.0507535103.
6. Bundy J.G., Paton G.I., Campbell C.D. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination // J. Appl. Microbiol. – 2002. – V. 92, No 2. – P. 276–288. – doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01528.x.

7. Powell S.M., Bowman J.P., Ferguson S.H., Snape I. The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island // *Soil Biol. Biochem.* – 2010. – V. 42, No 11. – P. 2012–2021. – doi: 10.1016/j.soilbio.2010.07.027.
8. Bergsveinson J., Perry B.J., Simpson G.L., Yost C.K., Schutzman R.J., Hall B.D., Cameron A.D.S. Spatial analysis of a hydrocarbon waste-remediating landfarm demonstrates influence of management practices on bacterial and fungal community structure // *Microb. Biotechnol.* – 2019. – V. 12, No 6. – P. 1199–1209. – doi: 10.1111/1751-7915.13397.
9. Nacke H., Will C., Herzog S., Nowka B., Engelhaupt M., Daniel R. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2011. – V. 78, No 1. – P. 188–201. – doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01088.x.
10. Roesch L.F.W., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A.O., Farmerie W.G., Triplett E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity // *ISME J.* – 2007. – V. 1, No 4. – P. 283–290. – doi: 10.1038/ismej.2007.53.
11. Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – V. 69, No 3. – P. 1800–1809. – doi: 10.1128/aem.69.3.1800-1809.2003.
12. Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75, No 15. – P. 5111–5120. – doi: 10.1128/AEM.00335-09.
13. Onwurah I.N.E., Ogugua V.N., Onyike N.B., Ochonogor A.E., Otitoju O.F. Crude oils spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies // *Int. J. Environ. Res.* – 2007. – V. 1, No 4. – P. 307–320. – doi: 10.22059/IJER.2010.142.
14. Singh A., Singh B., Ward O. Potential applications of bioprocess technology in petroleum industry // *Biodegradation.* – 2012. – V. 23, No 6. – P. 865–880. – doi: 10.1007/s10532-012-9577-2.
15. Hassanshahian M., Bayat Z., Cappello S., Smedile F., Yakimov M. Comparison the effects of bioaugmentation versus biostimulation on marine microbial community by PCR-DGGE: A mesocosm scale // *J. Environ. Sci.* – 2016. – V. 43. – P. 136–146. – doi: 10.1016/j.jes.2015.09.013.
16. Ansari N., Hassanshahian M., Ravan H. Study the microbial communities' changes in desert and farmland soil after crude oil pollution // *Int. J. Environ. Res.* – 2018. – V. 12, No 3. – P. 391–398. – doi: 10.1007/s41742-018-0099-6.
17. Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R. A Comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2015. – V. 176, No 3. – P. 670–699. – doi: 10.1007/s12010-015-1603-5.
18. Varjani S.J., Upasani V.N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2017. – V. 120. – P. 71–83. – doi: 10.1016/j.ibiod.2017.02.006.
19. Aydin S., Karaçay H.A., Shahi A., Gökçe S., Ince B., Ince O. Aerobic and anaerobic fungal metabolism and Omics insights for increasing polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation // *Fungal Biol. Rev.* – 2017. – V. 31, No 2. – P. 61–72. – doi: 10.1016/j.fbr.2016.12.001.
20. Fernández-Luqueño F., Valenzuela-Encinas C., Marsch R., Martínez-Suárez C., Vázquez-Núñez E., Dendooven L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil-possibilities and challenges: A review // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2011. – V. 18, No 1. – P. 12–30. – doi: 10.1007/s11356-010-0371-6.

21. *Shahi A., Aydin S., Ince B., Ince O.* Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2016. – V. 125. – P. 153–160. – doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.029.
22. *El Amrani A., Dumas A.S., Wick L.Y., Yergeau E., Berthomé R.* “Omics” insights into PAH degradation toward improved green remediation biotechnologies // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – V. 49, No 19. – P. 11281–11291. – doi: 10.1021/acs.est.5b01740.
23. *Zhou Z.F., Wang M.X., Zuo X.H., Yao Y.H.* Comparative investigation of bacterial, fungal, and archaeal community structures in soils in a typical oilfield in Jiangnan, China // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2017. – V. 72, No 1. – P. 65–77. – doi: 10.1007/s00244-016-0333-1.
24. *Zhong Z., Wang X., Zhang X., Zhang W., Xu Y., Ren C., Han X., Yang G.* Edaphic factors but not plant characteristics mainly alter soil microbial properties along a restoration chronosequence of *Pinus tabulaeformis* stands on Mt. Ziwuling, China // *For. Ecol. Manage.* – 2019. – V. 453. – Art. 117625, P. 1–11. – doi: 10.1016/j.foreco.2019.117625.
25. *Borowik A., Wyszowska J., Oszust K.* Functional diversity of fungal communities in soil contaminated with diesel oil // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. – Art. 1862, P. 1–11. – doi: 10.3389/fmicb.2017.01862.
26. *Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang P., Gao X., Li F., Li H., Yu H.* Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis // *Front. Microbiol.* – 2018. – V. 9. – Art. 2885, P. 1–11. – doi: 10.3389/fmicb.2018.02885.
27. ГОСТ 17.4.4.02-2017 Охрана природы (ССОП). Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа. – М.: Стандартинформ, 2017. – 12 с.
28. Руководство по анализу битумов и рассеянного органического вещества горных пород / Под ред. В.А. Успенского, К.Ф. Родионовой, А.И. Горской, А.П. Шишковой. – Л.: Недра, 1966. – 316 с.
29. *Хуснутдинов И.Ш., Бухаров С.В., Гончарова И.Н.* Определение содержания смолисто-асфальтовых веществ: Метод. указания. – Казань: Казан. гос. технол. ун-т, 2006. – 44 р.
30. *Muzyer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G.* Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, No 3. – P. 695–700. – doi: 10.1128/AEM.59.3.695-700.1993.
31. *Liu C.M., Kachur S., Dwan M.G., Abraham A.G., Aziz M., Hsueh P.R., Huang Y.T., Busch J.D., Lamit L.J., Gehring C.A., Keim P., Price L.B.* FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay // *BMC Microbiol.* – 2012. – V. 12. – Art. 255, P. 1–11. – doi: 10.1186/1471-2180-12-255.
32. *Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nat. Methods.* – 2010. – V. 7, No 5. – P. 335–336. – doi: 10.1038/nmeth.f.303.
33. *Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R.* Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73, No 16. – P. 5261–5267. – doi: 10.1128/AEM.00062-07.
34. *Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26, No 19. – P. 2460–2461. – doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.

35. Faith D.P., Minchin P.R., Belbin L. Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance // *Vegetatio*. – 1987. – V. 69, No 1. – P. 57–68. – doi: 10.1007/BF00038687.
36. Martin-Sanchez P.M., Gorbushina A.A., Toepel J. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture- and qPCR-based approaches // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2018. – V. 126. – P. 216–223. – doi: 10.1016/j.ibiod.2016.04.009.
37. Peng M., Zi X., Wang Q. Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16s rRNA genes // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2015. – V. 12, No 10. – P. 12002–12015. – doi: 10.3390/ijerph121012002.
38. Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation // *Trends Biotechnol.* – 2002. – V. 20, No 6. – P. 243–248. – doi: 10.1016/s0167-7799(02)01943-1.
39. Ghosal D., Ghosh S., Dutta T.K., Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7. – Art. 1369, P. 1–27. – doi: 10.3389/fmicb.2016.01369.
40. Lee E.-H., Cho K.-S. Characterization of cyclohexane and hexane degradation by *Rhodococcus* sp. EC1 // *Chemosphere*. – 2008. – V. 71, No 9. – P. 1738–1744. – doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.12.009.
41. Nam B.H., Park B.J., Yun H.S. Biodegradation of JP-8 by *Rhodococcus fascians* isolated from petroleum contaminated soil // *Korean Chem. Eng. Res.* – 2008. – V. 46, No 4. – P. 819–823. (на кор. яз.)
42. Zhou H., Huang X., Bu K., Wen F., Zhang D., Zhang C. Fungal proliferation and hydrocarbon removal during biostimulation of oily sludge with high total petroleum hydrocarbon // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2019. – V. 26, No 32. – P. 33192–33201. – doi: 10.1007/s11356-019-06432-z.
43. Liang Y., Zhang X., Wang J., Li G. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China // *J. Hazard. Mater.* – 2012. – V. 241–242. – P. 371–378. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.09.055.
44. Summerbell R.C. Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: Influence of site factors on fungal distributions // *Stud. Mycol.* – 2005. – V. 53. – P. 121–145. – doi: 10.3114/sim.53.1.121.
45. Vinale F., Sivasithamparan K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions // *Soil Biol. Biochem.* – 2008. – V. 40, No 1. – P. 1–10. – doi: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
46. Guo G., Tian F., Ding K., Wang L., Liu T., Yang F. Effect of a bacterial consortium on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and bacterial community composition in Chinese soils // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* – 2017. – V. 123. – P. 56–62. – doi: 10.1016/j.ibiod.2017.04.022.
47. Yang Z., Xu X., Dai M., Wang L., Shi X., Guo R. Combination of bioaugmentation and biostimulation for remediation of paddy soil contaminated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid // *J. Hazard. Mater.* – 2018. – V. 353. – P. 490–495. – doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.04.052.
48. Rybczyńska-Tkaczyk K., Kornilłowicz-Kowalska T. Activities of versatile peroxidase in cultures of *Clonostachys rosea* f. *catenulata* and *Clonostachys rosea* f. *rosea* during biotransformation of alkali lignin // *J. AOAC Int.* – 2018. – V. 101, No 5. – P. 1415–1421. – doi: 10.5740/jaoacint.18-0058.

Бикташева Лилия Рамилевна, младший научный сотрудник НИЛ «Биоконтроль»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *biktasheval@mail.ru*

Савельев Анатолий Александрович, доктор биологических наук, профессор кафедры моделирования экологических систем

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *Anatoly.Saveliev.aka.saa@gmail.com*

Селивановская Светлана Юрьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru*

Галицкая Полина Юрьевна, доктор биологических наук, доцент кафедры прикладной экологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *gpolina33@yandex.ru*

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2020, vol. 162, no. 3, pp. 393–412

doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.393-412

Bacterial and Fungal Community Shifts during Self-Restoration of Oil-Polluted Soils

L.R. Biktasheva^{*}, *A.A. Saveliev*^{**}, *S.Y. Selivanovskaya*^{***}, *P.Y. Galitskaya*^{****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia
E-mail: ^{*}*biktasheval@mail.ru*, ^{**}*Anatoly.Saveliev.aka.saa@gmail.com*,
^{***}*svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru*, ^{****}*gpolina33@yandex.ru*

Received May 20, 2020

Abstract

Oil pollution is a serious environmental problem, despite the capacity of soils to self-restoration. In this study, we analyzed the bacterial and fungal communities of six samples of natural soils that are in the process of self-restoration after an oil spill and their uncontaminated analogues. The content of hydrocarbons in the soils varied from 3% to 14%, with the dominance of aliphatic and aromatic hydrocarbon fractions in all samples (more than 50% in total amount). The Illumina MiSeq method revealed that the Actinobacteria, Proteobacteria, Acidobacteria, and Bacteroidetes types of bacteria prevailed in the uncontaminated soils. In the polluted soils, there was a pronounced dominance of bacteria of the Actinobacteria type (38–66%), mainly due to a sharp increase in the relative abundance of bacteria of the Nocardiaceae family (7–32%) known for their hydrocarbon-oxidizing activity. In four samples of uncontaminated soils, the Ascomycota type of fungi dominated; in the two other samples, most fungi belonged to the Ascomycota and Basidiomycota types. The structure of the fungal communities differed between the polluted and uncontaminated soils; however, the analysis of these differences showed no general patterns. The differences observed in the response of the bacterial and fungal communities to oil pollution are most likely to be associated with different metabolic capacities for hydrocarbons in bacteria and fungi.

Keywords: oil-polluted soils, microbial community, hydrocarbon-oxidizing species

Acknowledgments. The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-74-20183).

Figure Captions

- Fig. 1. Abundance of bacteria (a) and fungi (b). Mean values and standard error (SE) are shown.
 Fig. 2. Bacterial community structure at the level of types.
 Fig. 3. Fungal community structure at the level of types.
 Fig. 4. β -diversity of the bacterial (a) and fungal (b) communities analyzed by the NMDS method.

References

1. Agbogidi O.M., Eruotor P.G., Akparobi S.O. Effects of crude oil levels on the growth of maize (*Zea mays* L.). *Am. J. Food Technol.*, 2007, vol. 2, no. 6, pp. 529–535. doi: 10.3923/ajft.2007.529.535.
2. Marin-Garcia J.A., Tomas J.M. Deconstructing AMO framework: A systematic review. *Intangible Cap.*, 2016, vol. 12, no. 4, pp. 1040–1087. doi: 10.3926/ic.838.
3. Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Al-Soud W.A., Langenhoff A.A.M., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H.M., Smidt H. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, vol. 79, no. 2, pp. 619–630. doi: 10.1128/AEM.02747-12.
4. Liu Q., Tang J., Gao K., Gurav R., Giesy J.P. Aerobic degradation of crude oil by microorganisms in soils from four geographic regions of China. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7, no. 1, art. 14856, pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-017-14032-5.
5. Fierer N., Jackson R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, vol. 103, no. 3, pp. 626–631. doi: 10.1073/pnas.0507535103.
6. Bundy J.G., Paton G.I., Campbell C.D. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, vol. 92, no. 2, pp. 276–288. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01528.x.
7. Powell S.M., Bowman J.P., Ferguson S.H., Snape I. The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. *Soil Biol. Biochem.*, 2010, vol. 42, no. 11, pp. 2012–2021. doi: 10.1016/j.soilbio.2010.07.027.
8. Bergsveinson J., Perry B.J., Simpson G.L., Yost C.K., Schutzman R.J., Hall B.D., Cameron A.D.S. Spatial analysis of a hydrocarbon waste-remediating landfarm demonstrates influence of management practices on bacterial and fungal community structure. *Microb. Biotechnol.*, 2019, vol. 12, no. 6, pp. 1199–1209. doi: 10.1111/1751-7915.13397.
9. Nacke H., Will C., Herzog S., Nowka B., Engelhaupt M., Daniel R. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2011, vol. 78, no. 1, pp. 188–201. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01088.x.
10. Roesch L.F.W., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A.O., Farmerie W.G., Triplett E.W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 283–290. doi: 10.1038/ismej.2007.53.
11. Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M., Ball A.S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 3, pp. 1800–1809. doi: 10.1128/aem.69.3.1800-1809.2003.
12. Lauber C.L., Hamady M., Knight R., Fierer N. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, vol. 75, no. 15, pp. 5111–5120. doi: 10.1128/AEM.00335-09.
13. Onwurah I.N.E., Ogunua V.N., Onyike N.B., Ochonogor A.E., Otitoju O.F. Crude oils spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies. *Int. J. Environ. Res.*, 2007, vol. 1, no. 4, pp. 307–320. doi: 10.22059/IJER.2010.142.
14. Singh A., Singh B., Ward O. Potential applications of bioprocess technology in petroleum industry. *Biodegradation*, 2012, vol. 23, no. 6, pp. 865–880. doi: 10.1007/s10532-012-9577-2.
15. Hassanshahian M., Bayat Z., Cappello S., Smedile F., Yakimov M. Comparison the effects of bioaugmentation versus biostimulation on marine microbial community by PCR-DGGE: A mesocosm scale. *J. Environ. Sci.*, 2016, vol. 43, pp. 136–146. doi: 10.1016/j.jes.2015.09.013.
16. Ansari N., Hassanshahian M., Ravan H. Study the microbial communities' changes in desert and farmland soil after crude oil pollution. *Int. J. Environ. Res.*, 2018, vol. 12, no. 3, pp. 391–398. doi: 10.1007/s41742-018-0099-6.

17. Abbasian F., Lockington R., Mallavarapu M., Naidu R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, vol. 176, no. 3, pp. 670–699. doi: 10.1007/s12010-015-1603-5.
18. Varjani S.J., Upasani V.N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2017, vol. 120, pp. 71–83. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.02.006.
19. Aydin S., Karaçay H.A., Shahi A., Gökçe S., Ince B., Ince O. Aerobic and anaerobic fungal metabolism and Omics insights for increasing polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Fungal Biol. Rev.*, 2017, vol. 31, no. 2, pp. 61–72. doi: 10.1016/j.fbr.2016.12.001.
20. Fernández-Luqueño F., Valenzuela-Encinas C., Marsch R., Martínez-Suárez C., Vázquez-Núñez E., Dendooven L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 12–30. doi: 10.1007/s11356-010-0371-6.
21. Shahi A., Aydin S., Ince B., Ince O. Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2016, vol. 125, pp. 153–160. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.029.
22. El Amrani A., Dumas A.S., Wick L.Y., Yergeau E., Berthomé R. “Omics” insights into PAH degradation toward improved green remediation biotechnologies. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, vol. 49, no. 19, pp. 11281–11291. doi: 10.1021/acs.est.5b01740.
23. Zhou Z.F., Wang M.X., Zuo X.H., Yao Y.H. Comparative investigation of bacterial, fungal, and archaeal community structures in soils in a typical oilfield in Jiangnan, China. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2017, vol. 72, no. 1, pp. 65–77. doi: 10.1007/s00244-016-0333-1.
24. Zhong Z., Wang X., Zhang X., Zhang W., Xu Y., Ren C., Han X., Yang G. Edaphic factors but not plant characteristics mainly alter soil microbial properties along a restoration chronosequence of *Pinus tabulaeformis* stands on Mt. Ziwuling, China. *For. Ecol. Manage.*, 2019, vol. 453, art. 117625, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.foreco.2019.117625.
25. Borowik A., Wyszowska J., Oszust K. Functional diversity of fungal communities in soil contaminated with diesel oil. *Front. Microbiol.*, 2017, vol. 8, art. 1862, pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2017.01862.
26. Xu X., Liu W., Tian S., Wang W., Qi Q., Jiang P., Gao X., Li F., Li H., Yu H. Petroleum Hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: A perspective analysis. *Front. Microbiol.*, 2018, vol. 9, art. 2885, pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2018.02885.
27. State Standard 17.4.4.02-2017. Nature conservation (SSNP). Soils. Methods of sample collection and preparation for chemical, bacteriological, helminthological analysis. Moscow, Standartinform, 2017. 12 p. (In Russian)
28. Uspenskii V.A., Rodionova K.F., Gorskaya A.I., Shishkova A.P. (Eds.) *Rukovodstvo po analizu bitumov i rasseyannogo organicheskogo veshchestva gornykh porod* [A Handbook for Analysis of Bitumens and Dispersed Organic Matter in Rocks]. Leningrad, Nedra, 1966. 316 p. (In Russian)
29. Khusnutdinov I.Sh., Bukharov S.V., Goncharova I.N. *Opreделение soderzhaniya smolisto-asfal'tovykh veshchestv* [Measurement of Resin Asphalt Content]. Kazan, Kazan. Gos. Tekhnol. Univ., 2006. 44 p. (In Russian)
30. Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, vol. 59, no. 3, pp. 695–700. doi: 10.1128/AEM.59.3.695-700.1993.
31. Liu C.M., Kachur S., Dwan M.G., Abraham A.G., Aziz M., Hsueh P.R., Huang Y.T., Busch J.D., Lamit L.J., Gehring C.A., Keim P., Price L.B. FungiQuant: A broad-coverage fungal quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol.*, 2012, vol. 12, art. 255, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2180-12-255.
32. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Peña A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 2010, vol. 7, no. 5, pp. 335–336. doi: 10.1038/nmeth.f.303.
33. Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, no. 16, pp. 5261–5267. doi: 10.1128/AEM.00062-07.
34. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, no. 19, pp. 2460–2461. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.

35. Faith D.P., Minchin P.R., Belbin L. Compositional dissimilarity as a robust measure of ecological distance. *Vegetatio*, 1987, vol. 69, no. 1, pp. 57–68. doi: 10.1007/BF00038687.
36. Martin-Sanchez P.M., Gorbushina A.A., Toepel J. Quantification of microbial load in diesel storage tanks using culture- and qPCR-based approaches. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2018, vol. 126, pp. 216–223. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.04.009.
37. Peng M., Zi X., Wang Q. Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16s rRNA genes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2015, vol. 12, no. 10, pp. 12002–12015. doi: 10.3390/ijerph121012002.
38. Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.*, 2002, vol. 20, no. 6, pp. 243–248. doi: 10.1016/s0167-7799(02)01943-1.
39. Ghosal D., Ghosh S., Dutta T.K., Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Front. Microbiol.*, 2016, vol. 7, art. 1369, pp. 1–27. doi: 10.3389/fmicb.2016.01369.
40. Lee E.-H., Cho K.-S. Characterization of cyclohexane and hexane degradation by *Rhodococcus* sp. EC1. *Chemosphere*, 2008, vol. 71, no. 9, pp. 1738–1744. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.12.009.
41. Nam B.H., Park B.J., Yun H.S. Biodegradation of JP-8 by *Rhodococcus fascians* isolated from petroleum contaminated soil. *Korean Chem. Eng. Res.*, 2008, vol. 46, no. 4, pp. 819–823. (In Korean)
42. Zhou H., Huang X., Bu K., Wen F., Zhang D., Zhang C. Fungal proliferation and hydrocarbon removal during biostimulation of oily sludge with high total petroleum hydrocarbon. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2019, vol. 26, no. 32, pp. 33192–33201. doi: 10.1007/s11356-019-06432-z.
43. Liang Y., Zhang X., Wang J., Li G. Spatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China. *J. Hazard. Mater.*, 2012, vols. 241–242, pp. 371–378. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.09.055.
44. Summerbell R.C. Root endophyte and mycorrhizosphere fungi of black spruce, *Picea mariana*, in a boreal forest habitat: Influence of site factors on fungal distributions. *Stud. Mycol.*, 2005, vol. 53, pp. 121–145. doi: 10.3114/sim.53.1.121.
45. Vinale F., Sivasithamparan K., Ghisalberti E.L., Marra R., Woo S.L., Lorito M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.*, 2008, vol. 40, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.07.002.
46. Guo G., Tian F., Ding K., Wang L., Liu T., Yang F. Effect of a bacterial consortium on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and bacterial community composition in Chinese soils. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2017, vol. 123, pp. 56–62. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.04.022.
47. Yang Z., Xu X., Dai M., Wang L., Shi X., Guo R. Combination of bioaugmentation and biostimulation for remediation of paddy soil contaminated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Hazard. Mater.*, 2018, vol. 353, pp. 490–495. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.04.052.
48. Rybczyńska-Tkaczyk K., Kornilowicz-Kowalska T. Activities of versatile peroxidase in cultures of *Clonostachys rosea* f. *catenulata* and *Clonostachys rosea* f. *rosea* during biotransformation of alkali lignin. *J. AOAC Int.*, 2018, vol. 101, no. 5, pp. 1415–1421. doi: 10.5740/jaoacint.18-0058.

Для цитирования: Бикташева Л.Р., Савельев А.А., Селивановская С.Ю., Галицкая П.Ю. Особенности изменения бактериального и грибного сообществ при самовосстановлении почв, загрязненных нефтью // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2020. – Т. 162, кн. 3. – С. 393–412. – doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.393-412.

For citation: Biktasheva L.R., Saveliev A.A., Selivanovskaya S.Y., Galitskaya P.Y. Bacterial and fungal community shifts during self-restoration of oil-polluted soils. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2020, vol. 162, no. 3, pp. 393–412. doi: 10.26907/2542-064X.2020.3.393-412. (In Russian)