

IRSTI: 34.27.21

K.Y. YESSENTAYEVA¹, R.Z. BERZHANOVA¹, T.D. MUKASHEVA¹, A. MIKOLASCH³,
A.K. KUDABAEV²

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²Bioclean, Almaty, Kazakhstan

³University of Greifswald, Institute for Microbiology, Greifswald, Germany

*e-mail: ramza05@mail.ru

THE INFLUENCE OF OIL POLLUTION ON THE DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN THE SOILS OF DOSSOR FIELD

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.14

Abstract

The study of changes in the microbial community structure is essential for understanding ecological processes and the bioremediation of oil-contaminated soils. The research revealed significant differences in the number and taxonomic diversity of cultured microorganisms in soil collected from the Dossor deposit. Soil with a low level of contamination exhibited a higher count and diversity of cultivated microorganisms. The abundance of microorganisms in soils containing 3,990-4,158 mg oil kg⁻¹ was two orders of magnitude higher than in soils with 58,770-61,589 mg oil kg⁻¹. The investigation identified the predominant bacterial phyla as *Proteobacteria* (47.5%), *Firmicutes* (18.0%), *Actinobacteria* (18.9%), *Bacteroidetes* (12.5%), and other phyla (3.31%). Microorganisms from the genera *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Gordonia*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Candida*, and *Aureobasidium* were detected. The microbial diversity of cultivated forms is diminished in soil with elevated levels of contamination. The findings demonstrate that long-term oil contamination significantly impacts the soil, acting as a stressor that alters the structure of the microbial community.

Keywords: soil, oil contamination, bioremediation, hydrocarbon - oxidizing microorganisms, microbial community.

Alterations in the quantity and species diversity of the microbial community are typical characteristics of contaminated soils. Different groups of microorganisms exhibit varied responses to contamination: some may increase in number, others may decrease, while some remain nearly unaffected. Notably, certain taxa capable of degrading hydrocarbons often become prevalent in oil-contaminated soils [1,2].

Bacteria, actinobacteria, and fungi represent the three principal groups of soil microorganisms essential for the ecological processes and biodegradation of hydrocarbons in oil-contaminated soils [3,4]. Native microbial communities play a pivotal role in the degradation of oil contamination. Consequently, characterizing these microbial communities in oil-contaminated soils and evaluating their capacity to degrade oil could offer valuable insights for the bioremediation of contaminated environments.

Long-term soil contamination in oil fields presents a significant environmental challenge, as restoring such soils to their original condition is exceedingly difficult. However, microbial communities adapted to prolonged contamination conditions are likely to emerge in these soils. Literature suggests that these soils accumulate decomposition by-products of petroleum hydrocarbons, including polycyclic aromatic and aliphatic hydrocarbons. This accumulation leads to changes in the biodiversity of microorganisms and soil functions [5,6].

Therefore, this study aimed at assessing the abundance and diversity of the microbial community in soils with prolonged exposure to hydrocarbons. It is proposed that understanding the structural changes in microbial diversity could aid in identifying strains that are effective for bioremediation purposes.

Material and methods of research

This study utilized various soil samples from the Dossor field, classified into heavily and slightly contaminated categories, to examine microbial abundance. The samples were collected from the 0-20 cm depth of the A0A1 horizon. The soil in this area is identified as desert solonchak.

Standard nutrient media described in the manuals were used in this work (Table 1). Determination of the number of microorganisms in soils was carried out using standard methods [7, 8].

Table 1 - Cultivation characteristics

Parameter	Heterotrophic		Yeasts	Microscopic fungi	Spore-forming	Actinobacteria	MIN	HOM
	King	LB	S	MSM	S + LB	Starch-casein	CAA	Evans
Day	3-10		7		5-7			
pH			6.0	7.0		7.0-7.2	7.0-7.2	
Starch						10.0	20.0	
Casein						0.3		
NaCl				0.5		2.0	1.0	
(NH ₄) ₂ SO ₄				0.1				1.0
NaNO ₃				0.2				
MgSO ₄ × 7H ₂ O				0.025		0.05	0.5	0.3
K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O				1.0				
KH ₂ PO ₄				0.4		2.0	0.4	1.0
KNO ₃						2.0	5.5	
ZnSO ₄							0.002	
FeSO ₄ × 7H ₂ O						0.01	0.002	0.02
CaCO ₃						0.02		
CaCl ₂								0.1
Agar-agar						20.0	20.0	
Oil								1%
Ref.	[8]	[10]		[9]	[10]			[11]

Notes: MIN – microorganisms involved in mineralization of inorganic nitrogen; HOM – hydrocarbon-oxidizing microorganisms; LB – Luria Bertani; S – Sabouraud; MSM – mineral salt medium; CAA – casaminoacid medium.

Cell numbers were expressed in the number of colony-forming units (CFU) per 1 g of an air-dry sample [12].

The residual hydrocarbon content in the soil was quantified using a gravimetric method after extracting the hydrocarbons with chloroform [13].

To determine the qualitative composition of the soil microbial community, the colonies of micromycetes and bacteria that had grown were categorized into morphological types. Subsequently, the colony count of each type per dish was recorded. These colonies were then classified based on their cultural characteristics, and criteria were established that were sufficient to ascertain their genus affiliation. Identification was carried out employing classical microbiological techniques, following the isolation of microorganisms in pure culture. This process involved the assessment of morphological features, as well as cultural and physiological properties, utilizing modern identifiers for the respective groups and genera [14–16].

Statistical analysis of the data was conducted using the arithmetic mean (M) and its standard error (m). Mean values were differentiated using the Least Significant Difference (LSD) test, with

the analysis performed on Infostat analytical software designed for Windows. A significance level of 0.05 was applied across all statistical analyses [17].

Results and discussion

The structural and functional diversity of the main ecological and trophic groups of soil microorganisms in the oil-contaminated soils of the Dossor field has been thoroughly investigated. The number of microbiological communities serves as the most objective indicator for characterizing the overall ecological condition of contaminated territories. Quantitative data on the groups of microorganisms involved in the cycles of carbon and nitrogen transformation in hydrocarbon-contaminated soil samples are presented in Table 2. Notably, a high number of heterotrophic bacteria was observed in soil with low oil content, regardless of the nutrient medium used. For example, on King's medium at a depth of 0-10 and 10-20 cm, the counts were $43.2 \pm 2.3 \times 10^6$ and $6.3 \pm 0.89 \times 10^6$ CFU g⁻¹ of soil, respectively. As contamination increased, this index decreased by 100 times. A low level of this group of microorganisms was noted across all samples, irrespective of the soil horizon. For instance, in samples with high contamination levels, the counts were 0.37 ± 0.012 and $0.085 \pm 0.010 \times 10^6$ CFU g⁻¹ of soil, respectively.

Table 2 - Quantity of ecology-trophic microbial groups oil-contaminated soil collected from Dossor field

Ecological-trophic and taxonomic groups	Oil concentration, mg kg ⁻¹			
	3990 ± 8.87	4158 ± 7.31	58770 ± 19.8	61589 ± 23.1
	Depth, cm			
	0-10	10-20	0-10	10-20
Microbial abundance, CFU g ⁻¹ soil				
Heterotrophs (King's)	$43.2 \pm 2.3 \times 10^6$	$6.3 \pm 0.89 \times 10^6$	$0.37 \pm 0.01 \times 10^6$	$0.085 \pm 0.010 \times 10^6$
Heterotrophs (LB)	$53.2 \pm 2.7 \times 10^6$	$8.3 \pm 0.69 \times 10^6$	$0.57 \pm 0.04 \times 10^6$	$0.045 \pm 0.004 \times 10^6$
Heterotrophs (CAA)	$123 \pm 9.3 \times 10^6$	$13.2 \pm 0.27 \times 10^6$	$0.27 \pm 0.05 \times 10^6$	$0.031 \pm 0.005 \times 10^6$
Actinobacteria (CFA)	$6.30 \pm 0.56 \times 10^3$	$0.45 \pm 0.10 \times 10^3$	$0.36 \pm 0.0290 \times 10^3$	$0.023 \pm 0.0012 \times 10^3$
Spore-forming (LB)	$0.52 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.93 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.009 \pm 0.0005 \times 10^3$	$0.002 \pm 0.0001 \times 10^3$
Yeast organisms	$0.72 \pm 0.04 \times 10^3$	$0.65 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.006 \pm 0.0003 \times 10^3$	$0.004 \pm 0.0003 \times 10^3$
Microscopic fungi	$9.20 \pm 0.21 \times 10^3$	$0.80 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.031 \pm 0.0039 \times 10^3$	$0.005 \pm 0.0005 \times 10^3$
Hydrocarbon-oxidizing	$32.7 \pm 2.3 \times 10^3$	$45.2 \pm 5.6 \times 10^3$	$0.32 \pm 0.01 \times 10^3$	$0.027 \pm 0.003 \times 10^3$

In samples with a high level of contamination, low numbers of all groups of microorganisms were recorded compared to soil samples with low levels of contamination. The number of spore-forming bacteria, for instance, significantly differs at different levels of contamination, decreasing by 100 times in samples with contamination above 5%. The population of heterotrophic microorganisms that utilize mineral forms of nitrogen, represented by bacteria and actinobacteria, was predominantly bacterial (Table 2). The number of actinobacteria on starch-casein medium varied according to the level of hydrocarbon contamination. In highly contaminated soil, the count of actinobacteria was an order of magnitude lower compared to soils with less than 1% contamination. At oil concentrations of 58,770-61,589 mg kg⁻¹, micromycetes quantity were two orders of magnitude lower than in soils with 3,990-4,158 mg kg⁻¹ of hydrocarbons. A comparative analysis of yeast populations showed higher numbers in soils with low levels of contamination, ranging from $0.013 \pm 0.003 \times 10^3$ CFU g⁻¹ soil.

Hydrocarbon-oxidizing microorganisms are a critical ecological group, with their response to oil contamination influenced by the duration and quantity of oil exposure. A high count of hydrocarbon-oxidizing microorganisms was observed in all samples with low oil content, up to

$4,158 \pm 7.31 \text{ mg kg}^{-1}$. In contrast, in soil where the oil concentration increased by an order of magnitude ($61,589 \pm 23.1 \text{ mg kg}^{-1}$), the number of these microorganisms was significantly reduced, by one to two orders of magnitude (Table 2).

The main groups of soil microorganisms (bacteria, actinobacteria, and micromycetes) were quantified using conventional culturing methods. Microbial colonies were isolated from various nutrient media, including King's, LB, Sabouraud, MSM, Sabouraud + LB, CAA, and starch-casein. The taxonomic composition of the isolated colonies was determined through microscopy and the assessment of certain physiological and biochemical properties.

The soil of the Dossor field exhibited limited diversity in colony morphotypes across all analysed media, with the highest variety of morphologically distinct colonies observed on CAA medium. Notably, a considerable number of identifiable colonies were found on acidified Sabouraud and Sabouraud + LB media. Conversely, King's and LB media demonstrated minimal colony diversity. In total, 1382 isolates of cultured bacterial forms were identified. The majority of these isolated bacteria were gram-negative, and the variety of bacterial morphotypes was limited, with no more than 35 types observed. Most morphotypes were characterized by mycelial, bacilliform, rounded, oval cells, or short rods, very small in size ($<1.5 \mu\text{m}$). These cells formed rapidly or slowly growing colonies on media, which were either flat and spreading, transparent or translucent, and sometimes brightly coloured in red, pink, yellow, and orange, or colourless, beige, or muddy-white.

An analysis of the total number of isolates derived from various nutrient media revealed that the primary bacterial phyla included *Proteobacteria* 47.46%, *Firmicutes* 17.96%, *Actinobacteria* 18.86%, *Bacteroidetes* 12.46% and 3.31 % other phyla (Figure 1).

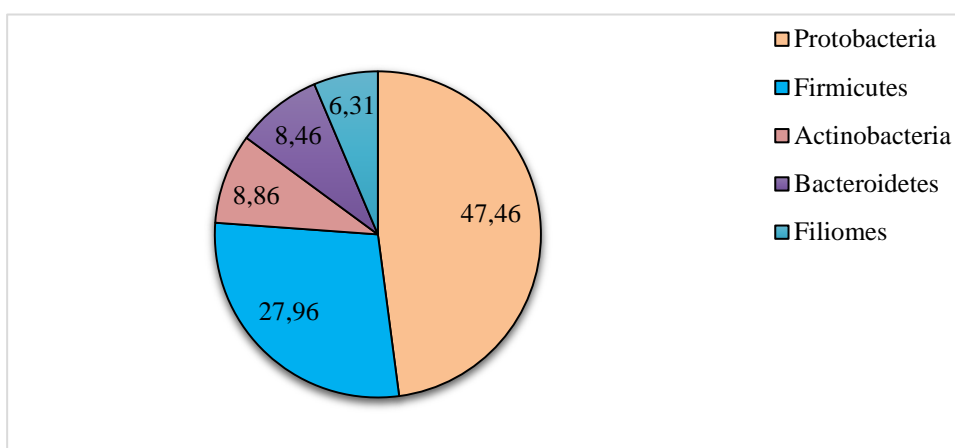


Figure 1 – Main taxonomic microbial groups in oil-contaminated soils collected from Dossor field

Studying microorganisms at the genus level provides a deeper insight into the functional roles of specific genera in oil-contaminated soils. Analysis of the cultured microbial community in soil from the Dossor field reveals a diverse array of bacteria and actinobacteria, though diversity within the micromycetes community remains low. Soil with a high oil content exhibit a reduced diversity of bacteria and actinobacteria, a notable absence of microscopic fungi, and a minimal presence of yeast organisms.

Regardless of the oil contamination level, the most commonly identified bacterial genera across all soil samples include *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Rhodococcus* (Figure 2). In soil with low levels of contamination, the presence of the genera *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Gordonia*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Nocardia* and *Streptomyces* was confirmed. Among yeast organisms, in soils with low levels of contamination, yeasts from the genera *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Candida*, and *Aureobasidium* were detected. Conversely, in soil with high hydrocarbon contamination, a scant presence of yeasts was observed,

with isolates belonging to the genera *Rhodotorula* and *Trichosporon*. Microscopic fungi, identified in soils with low levels of pollution, were categorized into the genera *Penicillium* and *Aspergillus*.

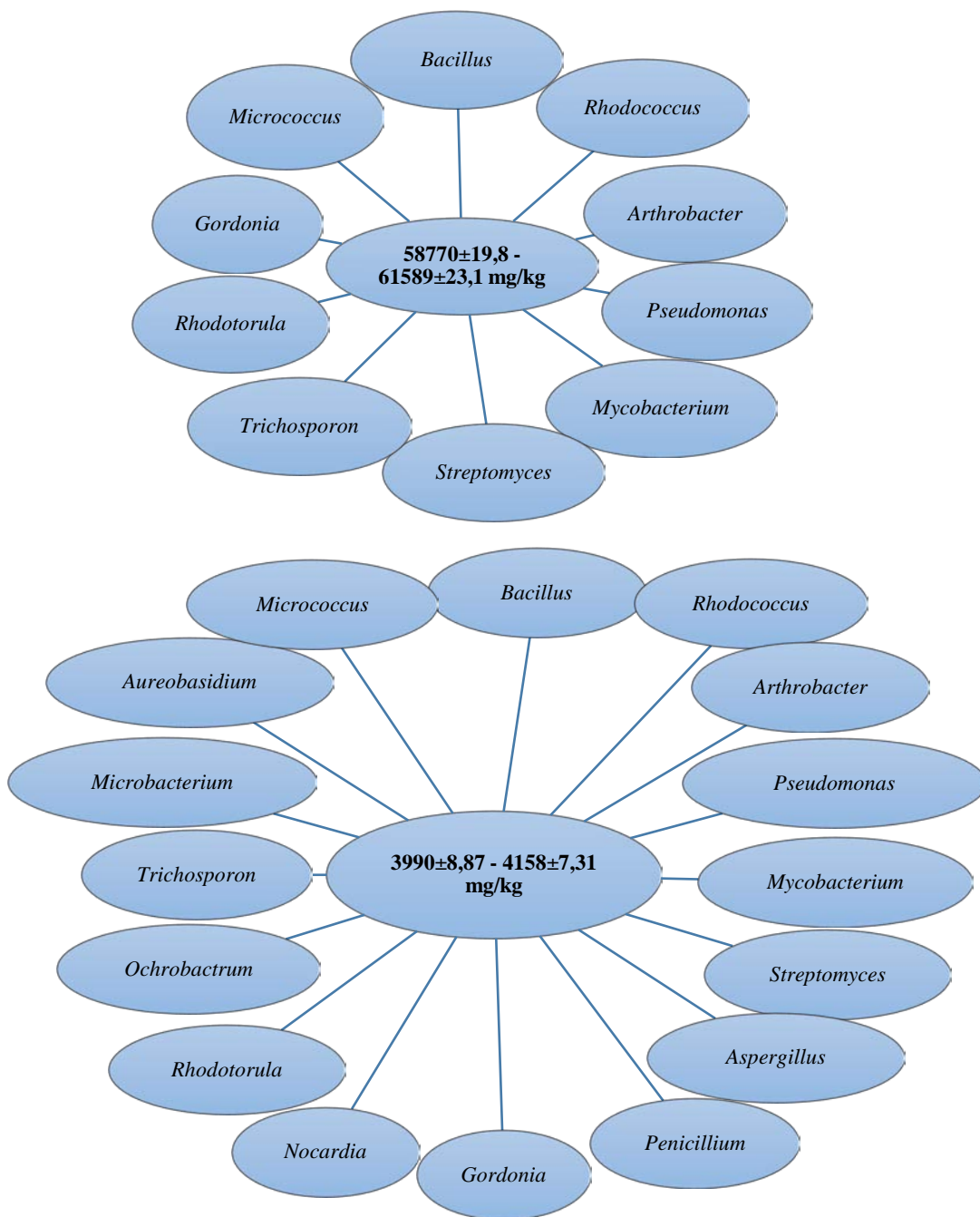


Figure 2 – Diversity of cultivated microorganisms in soil with different levels of hydrocarbon contamination

Conclusions

Dossor is an oil field located in the Makat district of the Atyrau region in Kazakhstan, situated approximately 90 km east of Atyrau city. The development of this field commenced in 1911 and it is currently in a state of conservation. The majority of the area within the field is covered by solonchaks and soils which, according to the literature, are characterized by a relatively low diversity of cultivated forms of microorganisms. In the territory of the field, the hydrocarbon content in the soil ranges from 0.003 to 4.32 mg kg⁻¹ in the spring and slightly decreases in the fall. However, certain areas exhibit hydrocarbon content that is hundreds or thousands of times

higher [18]. In the context of long-term contamination spanning decades, it is hypothesized that a stable microbiota complex capable of sustaining the necessary level of biogenic exchange has developed in the soils.

The variation in the number and ratio of ecological-trophic groups of microorganisms is a sensitive indicator of soil change or contamination [19]. Our findings indicate a marked difference in the number of ecological and trophic groups of microorganisms across the studied soils. In soil with up to 1% hydrocarbon contamination, the count of all groups of cultivated microorganisms was two to three orders of magnitude lower than in soils with a higher hydrocarbon content (over 5%). Oil contamination's impact on soil microbial communities can either stimulate the growth of some species or inhibit others, altering the microbial community structure. This change in composition and diversity depends not only on the concentration and duration of oil exposure but also on the soil type and the pre-exposure state of the microbocenosis [20].

Current study highlighted significant disparities in the bacterial diversity within soils of the Dossor field, which have been contaminated with oil over an extended period. Soils exhibiting low levels of contamination featured a rich diversity of cultivated bacterial forms, encompassing more than 10 different genera, including *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Gordonia*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Nocardia* and *Streptomyces*.

The high lability and dependence of various groups of microscopic fungi on polluting factors, including hydrocarbon content, is known [21, 22]. Exposure to hydrocarbons resulted in a reduction in both the quantity and activity of microscopic fungi. Similar outcomes were observed in the diversity of microscopic fungi in soils from the Dossor field, where no cultured forms of micromycetes were detected in soils with a high hydrocarbon content, except for yeasts belonging to the genera *Rhodotorula* and *Trichosporon*.

In conclusion, our research uncovered substantial variations in the abundance of various ecological-trophic and taxonomic groups of cultivated microorganisms. Soils with lower levels of contamination displayed a greater biodiversity of cultivated forms of bacteria and microscopic fungi. Determining the microbial composition of contaminated soil lays the groundwork for further studies on identifying microbial strains active in bioremediation.

References:

- 1 Ijoma G.N., Tekere M. Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. *J. Environ. Sci. Technol.* 2017; 14(8):1787–1806. (doi:10.1007/s13762-017-1269-3)
- 2 Sutton N.B. et al. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol. American.* 2013; 79(2): 619–630. (doi:10.1128/aem.02747-12)
- 3 Debora de Souza P.S. et al. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International. Biodeterioration & Biodegradation.* 2015; 9:85–89. (doi:10.1016/j.ibiod.2014.09.021)
- 4 Shekhar S.K. et al. Growth Potential Assessment of Actinomycetes Isolated from Petroleum Contaminated Soil. *J. Bioremediation Biodegrad.* 2014; 5(7): 259. (doi:10.4172/2155-6199.1000259)
- 5 Cho C. et al. Recent advances in microbial production of fuels and chemicals using tools and strategies of systems metabolic engineering. *Biotechnol. adv.* 2015; 33(7):1455–1466. (doi:10.1016/j.biotechadv.2014.11.006)
- 6 Ławniczak Ł. et al. Microbial Degradation of Hydrocarbons - Basic Principles for Bioremediation: A Review: 4. *Molecules.* 2020; 25(4):856. (doi:10.3390/molecules25040856)
- 7 Ikuesan F. Evaluation of Crude Oil Biodegradation Potentials of Some Indigenous Soil Microorganisms. *Journal of Scientific Research and Reports.* 2017; 13(5):1–9. (doi:10.9734/jsrr/2017/29151)
- 8 Jahangeer J., Kumar V. An overview on microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR).* 2013; 1(8):34–37. (doi:10.4061/2011/941810)
- 9 Al-Hawash A.B. et al. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnol. Rep.* 2018; 17:104–109. (doi:10.1016/j.btre.2017.12.006)

- 10 Bertani G. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Bacteriol. American Society for Microbiology*. 2004; 186(3):595–600. (doi: 10.1128/JB.186.3.595–600.2004)
- 11 Evans C. The continuous cultivation of microorganisms. Construction of a Chemostat. *Methods Microbiol.* 1970; 2(4):277–327. (doi:10.1016/S0580-9517(08)70227-7)
- 12 Marín C., Roberto G. Functional land-use change effects on soil fungal communities in Chilean temperate rainforests. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2017; 17(4):985–1002. (doi:10.4067/s0718-95162017000400011)
- 13 Luria Yu.Yu. Analytical Chemistry of Industrial Wastewater. Moscow: USSR Chemistry, 1984: 448. (doi.org/10.1002/aehh.19860140513)
- 14 Holt J.G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1994:824.
- 15 Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. The Yeasts: A Taxonomic Study. 5th ed. Elsevier, 2011: 2363.
- 16 Barnett H.L., Hunter B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. Burgess Publishing Company, 1998:254.
- 17 Sheffe G. Dispersion analysis. - Moscow: USSR Chemistry, 1980: 512.
- 18 Saparov A.S. et al. Petrochemical pollution of soils of the territory of the pipeline routes in Atyrau region. *Soil ecology*. 2009; 4:56–62. (<https://journal.soil.kz/jour/article/view/174/166>)
- 19 Zhao D. et al. The influence of different types of urban land use on soil microbial biomass and functional diversity in Beijing, China. *Soil Use Manag.* 2013; 29(2):230–239. (doi:10.1111/sum.12034)
- 20 Liu Q. et al. Aerobic degradation of crude oil by microorganisms in soils from four geographic regions of China. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*. 2017; 7(1):14856. (doi:10.1038/s41598-017-14032-5)
- 21 Jiao S. et al. Bacterial communities in oil contaminated soils: Biogeography and co-occurrence patterns. *Soil Biol. Biochem.* 2016; 98:64–73. (doi:10.1016/j.soilbio.2016.04.005)
- 22 Galitskaya P. et al. Response of bacterial and fungal communities to high petroleum pollution in different soils. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*. 2021; 11(1):164. (doi:10.1038/s41598-020-80631-4)

К.Е. ЕСЕНТАЕВА¹, Р.Ж. БЕРЖАНОВА¹, Т.М. МУКАШЕВА¹, А. МІКОЛАСЧ³,
А.К. КУДАБАЕВ²

¹әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

²Bioclean, Алматы, Қазақстан

³Грайфсвальд Университеті, микробиология институті, Грайфсвальд, Германия

*e-mail: ramza05@mail.ru

ДОССОР КЕН ОРНЫНЫҢ ТОПЫРАҒЫНДАҒЫ МИКРОБТЫҚ ҚАУЫМДАСТЫҚТАРДЫҢ ӘРТҮРЛІЛІГІНЕ МҰНАЙМЕН ЛАСТАНУДЫҢ ӘСЕРІ

Түйін

Мұнаймен ластанған топырақтың экологиялық процестері мен биоремедиациясын түсіну үшін микроб қауымдастығындағы құрылымының өзгеруін зерттеу қажет. Нәтижелер әр түрлі деңгейде ластанған Доссор кен орнындағы топырақ үлгілеріндегі микроорганизм қауымдастығының сандық және таксономиялық алуантүрлілігі маңызды айырмашылықтар көрсетті. Ластану деңгейі төмен үлгілер - микроорганизм саны мен бөлініп алынған микроорганизм алуантүрлілігінің жоғарылығымен сипатталды. Топырақ құрамындағы көмірсутек деңгейі 58770 - 61589 мг/кг үлгілерімен салыстырғанда топырақтағы мұнай құрамы 3990 - 4158 мг/кг үлгілеріндегі микроорганизм саны 2 есе жоғары екендігін көрсетті. Доссор кен орнындағы үлгілерінде негізгі бактериялды филиумдар: *Protobacteria* 47,46 %, *Firmicutes* 17,96%, *Actinobacteria* 18,86%, *Bacteroidetes* 12,46%, и 3,31% – басқа филиумдар. Ластану деңгейі төмен үлгілерде бөлініп алынған микроорганизмдер алуантүрлілігі көбірек. *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Gordonia*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Candida* және *Aureobasidium* микроорганизм түрлері бөлініп алынды. Жоғары

деңгейде ластанған топырақ үлгілерінде микроб қауымдастығы азырақ. Мұнаймен ұзақ уақыт ластану топыраққа айтарлықтай әсер етеді, яғни, микроб қауымдастығының құрылымын өзгертіп, стрестік фактор ретінде ықпал етеді.

Кілттік сөздер: мұнай, топырақ, көмірсутегін тотықтырушы микроорганизмдер, микробтық қауымдастық, Доссор кен орны.

MPHTI: 34.27.21

К.Е. ЕСЕНТАЕВА¹, Р.Ж. БЕРЖАНОВА¹, Т.М. МУКАШЕВА¹, А. МІКОЛАСЧ³,
А.К. КУДАБАЕВ²

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

²Bioclean, Алматы, Казахстан

³Университет Грайфсвальда, Институт микробиологии, Грайфсвальд, Германия

*e-mail: ramza05@mail.ru

ВЛИЯНИЕ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА РАЗНООБРАЗИЕ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В ПОЧВАХ МЕСТОРОЖДЕНИЯ ДОССОР

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.14

Аннотация

Изучение изменения структуры микробного сообщества необходимо для понимания экологических процессов и биоремедиации почв, загрязненных нефтью. Результаты показали существенные различия в численности и таксономическом разнообразии культивируемых форм микроорганизмов в почвенных образцах месторождения Доссор. Образцы почвы с низким уровнем загрязнения характеризовались более высокой численностью и разнообразием форм микроорганизмов. При содержании нефти 3990–4158 мг/кг почвы количество микроорганизмов было на 2 порядка выше, чем в почвах, содержащих углеводороды 58770–61589 мг/кг почвы. Установлено, что основные бактериальные филюмы представлены *Protobacteria* 47,46 %, *Firmicutes* 17,96%, *Actinobacteria* 18,86%, *Bacteroidetes* 12,46%, и 3,31% – другие филюмы. Выделены микроорганизмы родов *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Gordonia*, *Ochrotrichum*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Candida* и *Aureobasidium*. Микробное разнообразие культивируемых форм меньше в образцах с более высоким уровнем загрязнения. Показано, что длительное загрязнение нефтью значительно влияет на почву, действуя как стрессовый фактор, изменяя структуру микробного сообщества.

Ключевые слова: нефть, почва, углеводородокисляющие микроорганизмы, микробное сообщество, месторождение Доссор.

Изменение численности и видового разнообразия микробного сообщества является общей особенностью почв, загрязненных поллютантами. Различные группы микроорганизмов по-разному реагируют на загрязнение, численность одних может возрастать, других – снижаться, третьи – остаются практически неизменными. Различными исследователями отмечено, что нефтяное загрязнение изменяет общую структуру микробного сообщества. Представители некоторых таксонов, разлагающие углеводороды, становятся доминирующими в нефтезагрязненных почвах [1,2].

Бактерии, актинобактерии и грибы - три основные группы почвенных микроорганизмов, которые играют решающую роль в экологических процессах и процессах биоразложения углеводородов в почвах, загрязненных нефтью [3,4]. Сообщества аборигенных микроорганизмов имеют особенно важное значение в деградации нефтяных загрязнений. В связи с этим, характеристика микробных сообществ, обитающих в нефтезагрязненных почвах, и оценка их способности разлагать нефть потенциально может служить руководством для биоремедиации загрязненной среды.

Серьезной экологической проблемой является долгосрочное загрязнение почвы на нефтяных месторождениях и восстановление этих почв до первоначального состояния является приоритетной задачей охраны окружающей среды. Однако, весьма вероятно, в таких почвах формируются микробные сообщества, адаптированные к длительным условиям загрязнения. По литературным данным, в таких почвах накапливаются соединения разложения нефтяных углеводородов, и в том числе полициклические ароматические и алифатические углеводороды. В результате их накопления изменяется биоразнообразие микроорганизмов и функции почвы [5,6].

Целью данного исследования было оценить численность и разнообразие микробного сообщества в почвах с длительным сроком воздействия углеводородов. Предполагаем, что структурные изменения разнообразия микроорганизмов могут служить основой для выбора штаммов, активных в биоремедиации.

Материал и методы исследования

Для изучения численности микроорганизмов были использованы несколько образцов почвы с месторождения Доссор, сильнозагрязненные и слабозагрязненные. Образцы проб отбирали с глубины 0-20 см с горизонтов A₀A₁. Тип почвы - солончак пустынный.

В работе были использованы стандартные питательные среды, описанные в руководствах (таблица 1). Определение численности микроорганизмов в почвах проводили стандартными методами [7, 8].

Таблица 1 – Питательные среды для культивирования микроорганизмов

Параметры	Гетеротрофы		Дрожжи	Микроскопические грибы	Спорообразующие	Актинобактерии	ММНСА	УОМ
	Кинг	Лурия Бертани	С	МСС	С + ЛБ	ККА	КАА	Еванса
Сутки	3-10		7		5-7			
pH			6.0	7.0		7.0-7.2	7.0-7.2	
Крахмал						10.0	20.0	
Казеин						0.3		
NaCl				0.5		2.0	1.0	
(NH ₄) ₂ SO ₄				0.1				1.0
NaNO ₃				0.2				
MgSO ₄ ×7H ₂ O				0.025		0.05	0.5	0.3
K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O				1.0				
KH ₂ PO ₄				0.4		2.0	0.4	1.0
KNO ₃						2.0	5.5	
ZnSO ₄							0.002	
FeSO ₄ ×7H ₂ O						0.01	0.002	0.02
CaCO ₃						0.02		
CaCl ₂								0.1
Агар - агар						20.0	20.0	
Нефть								1%
Ссылки	[8]	[10]		[9]				[11]

Примечание: ММНСА – микроорганизмы, участвующие в минерализации неорганических соединений азота; УОМ – углеводородокисляющие микроорганизмы; ЛБ – Лурия Бертани; С – Сабуро; МСМ – минерально-солевая среда; КАА – крахмал-аммиачная среда.

Численность клеток выражали в количестве колониеобразующих единиц на 1 г воздушно-сухого образца [12].

Остаточное содержание углеводов определяли весовым методом после экстракции углеводов хлороформом [13].

Для определения качественного состава почвенного микробного сообщества отбирали колонии микромицетов и бактерий. Идентификацию микроорганизмов до рода проводили классическими микробиологическими методами. Изучали морфологические и некоторые биохимические характеристики изолятов [14-16].

Статистическую обработку результатов проводили с учётом среднего арифметического (M) и его ошибки (m). Средние значения были разделены с помощью LSD-теста с использованием аналитического программного обеспечения Infostat для Windows. Для всех статистических анализов использовался порог значимости 0,05 [17].

Результаты и обсуждение

Изучено структурно-функциональное разнообразие основных эколого-трофических групп почвенных микроорганизмов в загрязненных нефтью почвах месторождения Доссор. Численность микробиологического сообщества является наиболее объективным показателем, характеризующим общее экологическое состояние загрязнённых территорий. В таблице 2 представлены количественные характеристики групп микроорганизмов, участвующих в циклах превращения углерода и азота в загрязненных углеводородами почвенных образцах. Высокая численность гетеротрофных бактерий отмечена в почвенных образцах с низким содержанием нефти независимо от используемой питательной среды, например, на среде Кинга составила при глубине 0–10 и 10–20 см. $43,2 \pm 2,3 \times 10^6$ и $6,3 \pm 0,89 \times 10^6$ КОЕ/г почвы, соответственно. С увеличением загрязнения этот показатель снижается в 100 раз. Низкий уровень численности данной группы микроорганизмов прослеживался во всех образцах независимо от горизонта почвы. Так, например, в образцах почв с высоким уровнем их численность составила $0,37 \pm 0,012$ и $0,085 \pm 0,0096 \times 10^6$ КОЕ/г почвы, соответственно.

Таблица 2 - Численность эколого-трофических групп микроорганизмов в нефтезагрязненных почвенных образцах месторождения Доссор ($\bar{X} \pm \sigma$)

Эколого-трофические и таксономические группы	Количество нефти, мг/кг			
	3990±8,87	4158±7,31	58770±19,8	61589±23,1
	Глубина, см			
	0-10	10-20	0-10	10-20
Численность микроорганизмов, КОЕ				
Гетеротрофы, на Кинга	$43.2 \pm 2.3 \times 10^6$	$6.3 \pm 0.89 \times 10^6$	$0.37 \pm 0.01 \times 10^6$	$0.085 \pm 0.010 \times 10^6$
Гетеротрофы, на Лурия- Бергани	$53.2 \pm 2.7 \times 10^6$	$8.3 \pm 0.69 \times 10^6$	$0.57 \pm 0.04 \times 10^6$	$0.045 \pm 0.004 \times 10^6$
Гетеротрофы, на КАА	$123 \pm 9.3 \times 10^6$	$13.2 \pm 0.27 \times 10^6$	$0.27 \pm 0.05 \times 10^6$	$0.031 \pm 0.005 \times 10^6$
Актинобактерии, на ККС	$6.30 \pm 0.56 \times 10^3$	$0.45 \pm 0.10 \times 10^3$	$0.36 \pm 0.0290 \times 10^3$	$0.023 \pm 0.0012 \times 10^3$
Спорообразующие, на Лурия- Бертана	$0.52 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.93 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.009 \pm 0.0005 \times 10^3$	$0.002 \pm 0.0001 \times 10^3$
Дрожжевые организмы	$0.72 \pm 0.04 \times 10^3$	$0.65 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.006 \pm 0.0003 \times 10^3$	$0.004 \pm 0.0003 \times 10^3$
Микроскопические грибы	$9.20 \pm 0.21 \times 10^3$	$0.80 \pm 0.02 \times 10^3$	$0.031 \pm 0.0039 \times 10^3$	$0.005 \pm 0.0005 \times 10^3$
Углеводородокисляющие	$32.7 \pm 2.3 \times 10^3$	$45.2 \pm 5.6 \times 10^3$	$0.32 \pm 0.01 \times 10^3$	$0.027 \pm 0.003 \times 10^3$
Примечание. \bar{X} среднее значение; $\pm \sigma$ – среднее квадратичное отклонение.				

В пробах почв с высоким уровнем загрязнения регистрировали низкую численность всех групп микроорганизмов по сравнению с почвенными образцами с низким уровнем. Так, численность спорообразующих бактерий статистически значимо различается при

разном уровне загрязнения. В образцах с загрязнением выше 5 % этот показатель уменьшился в 100 раз. Группа гетеротрофных микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, представлена бактериями и актинобактериями, по количественному соотношению доминировали бактерии (таблица 2). Численность актинобактерий на крахмал-казеиновой среде была различной в зависимости от степени загрязнения углеводородами. В сильнозагрязнённых пробах почвы количество актинобактерий было на порядок ниже по сравнению с образцами почвы с уровнем загрязнения 1% (таблица 2). В образце, содержащей 58770 - 61589 мг/кг почвы нефти количество микромицетов было на 2 порядка меньше, чем в почвах где содержание углеводородов было в пределах 3990 - 4158 мг/кг почвы. При сравнительном анализе численности дрожжей было установлено, что их количество было выше в почвах с низким уровнем загрязнения и находилось в пределах $0,013 \pm 0,0029 \times 10^3$ КОЕ/г почвы.

Углевороодоокисляющие микроорганизмы являются важной экологической группой микроорганизмов, характер воздействия нефтяного загрязнения на численность углевороодоокисляющих микроорганизмов определяется длительностью воздействия и количеством нефти. Так, высокая численность углевороодоокисляющих микроорганизмов отмечена во всех образцах с незначительным содержанием нефти - до $4158 \pm 7,31$ мг/кг. В образцах почв, где концентрация нефти увеличивается на один порядок ($61589 \pm 23,1$ мг/кг), численность углевороодоокисляющих микроорганизмов на один и два порядка ниже (таблица 2).

С использованием традиционных культуральных методов учитывали основные группы почвенных микроорганизмов (бактерий, актинобактерий, микромицетов). Были изолированы колонии микроорганизмов, выращенных на разных питательных средах: Кинга, Лурия-Бертани, Сабуро, минерально-солевой, Сабуро + Лурия-Бертани, крахмало-аммиачной (КАА) и крахмало-казеиновой. Определение таксономического состава изолированных колоний до рода проводили путем их микроскопирования и определением некоторых физиолого-биохимические свойств.

Почвы месторождения Доссор отличались небольшим разнообразием морфотипов колоний на всех анализируемых средах. Наибольшее количество морфологически разнообразных колоний отмечено на среде КАА. На подкисленной Сабуро и Сабуро + Лурия-Бертани встречались много однотипных колоний. На средах Кинга и Лурия-Бертани установлено незначительное разнообразие колоний. Всего выделено 1382 изолята культивируемых форм бактерий. Большинство выделенных бактерий были грамотрицательными. Число морфотипов бактерий было невелико и составляло не более 35 типов. Большинство морфотипов представляли собой мицелиальные, палочковидные, округлые, овальные клетки или короткие палочки, очень мелкие ($<1,5$ мкм), образующие на средах быстрорастущие или медленно растущие, плоские и стелющиеся, прозрачные или полупрозрачные колонии, окрашенные иногда довольно ярко (красного, розового, желтого и оранжевого цветов) или бесцветные, бежевые или мутно-белые.

Исследование общего количества изолятов, выделенных на разных питательных средах показало, что основные бактериальные филюмы представлены *Protobacteria* - 47,46 %, *Firmicutes* - 17,96%, *Actinobacteria* - 18,86%, *Bacteroidetes* - 12,46%, и 3,31% – другие филюмы (рисунок 1).

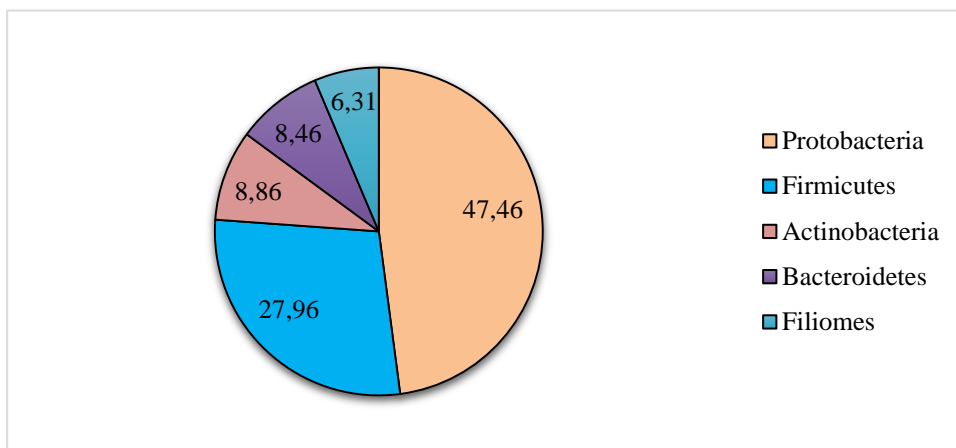
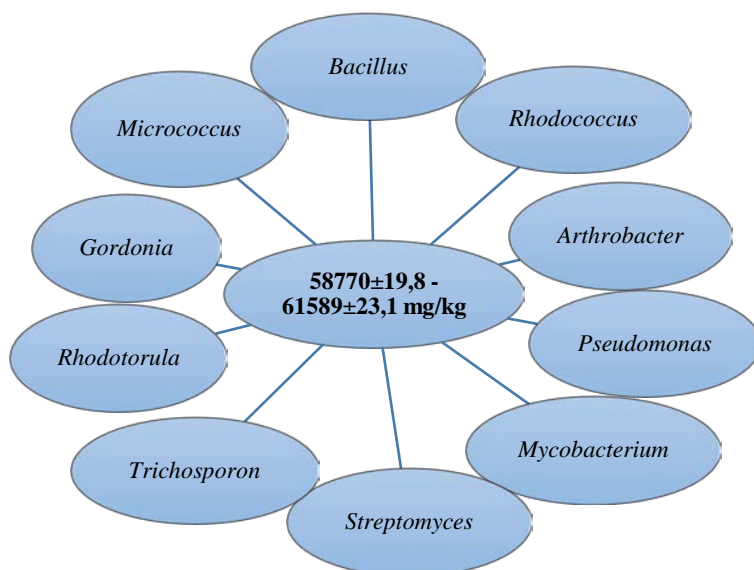


Рисунок 1 – Основные таксономические группы культивируемых форм бактерий нефтезагрязненных почв месторождения Доссор

Изучение более низкого таксономического уровня, рода, позволит шире понять функциональную роль определённых родов микроорганизмов в нефтезагрязненных почвенных образцах. Так, анализ культивируемого микробного сообщества почвенных образцов месторождения Доссор показал, что это микробное сообщество состоит из разнообразия групп бактерий и актинобактерий, низкое разнообразие отмечено у микромицетного сообщества. В почвенных образцах с высоким содержанием нефти установили низкое разнообразие групп бактерий и актинобактерий, наблюдали отсутствие микроскопических грибов и незначительное содержание дрожжевых организмов.

Во всех почвенных образцах, независимо от уровня загрязнённости нефтью, наиболее типичные представители бактерий отнесены к родам *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Rhodococcus* (рисунок 2). В образцах с низким уровнем загрязнения установлено наличие родов *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Gordonia*, *Ochrobactrum*, *Microbacterium*, *Nocardia* и *Streptomyces*. Среди дрожжевых организмов во всех почвенных образцах с низким уровнем загрязнения отмечено присутствие дрожжей родов *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Candida* и *Aureobasidium*. В почвенных образцах с высоким уровнем загрязнения углеводородами установлено незначительное содержание дрожжей, были выделены дрожжи родов *Rhodotorula* и *Trichosporon*.

Микроскопические грибы были обнаружены в почвенных образцах с низким уровнем загрязнения и были отнесены к родам *Penicillium* и *Aspergillus*.



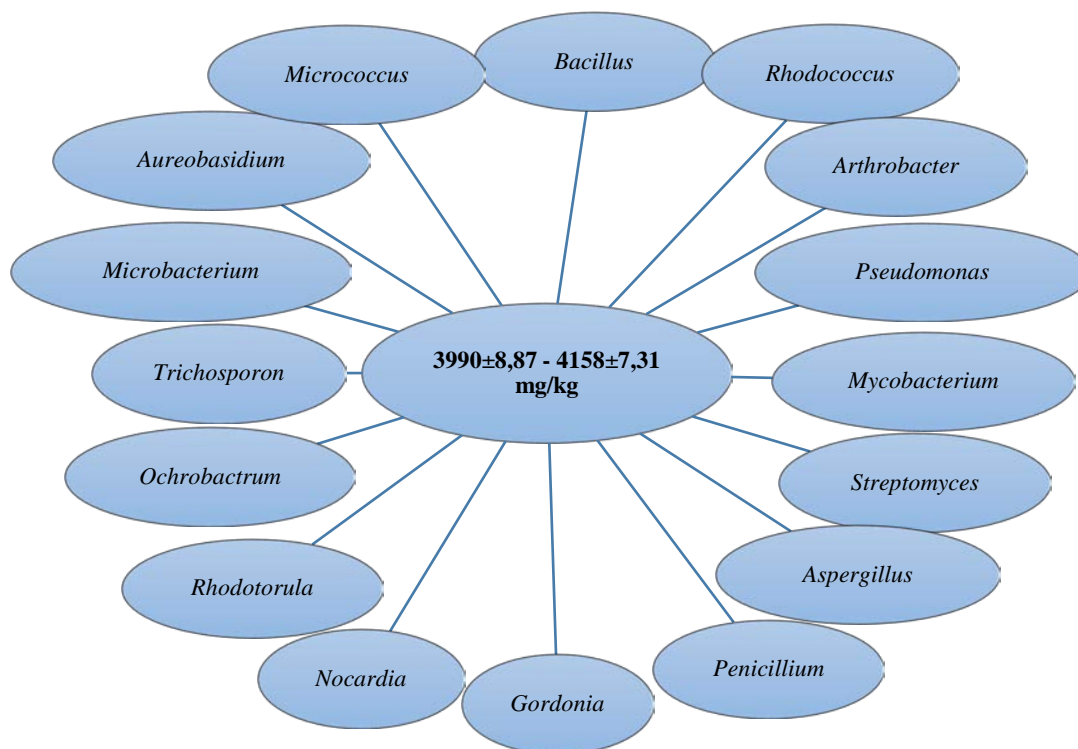


Рисунок 2 - Разнообразие культивируемых микроорганизмов в почве с разным уровнем загрязнения углеводородами

Заключение

Доссор - нефтяное месторождение, расположенное в Макатском районе Атырауской области Казахстана, в 90 км к востоку от города Атырау. Разработка месторождения была начата с 1911 года, сейчас находится в консервации. Большую часть месторождения занимают солончаки и соры, которые по данным литературы характеризуются относительно невысоким разнообразием культивируемых форм микроорганизмов. На территории месторождения содержание углеводов в почве находилось в пределах 0,003–4,32 мг/кг в весенний период и незначительно уменьшалось в осенний период. Однако есть участки, где содержание углеводов в них выше в сотни и тысячи раз [18]. Предполагается, что в условиях длительного (десятки лет) загрязнения в почвах формируется устойчивый комплекс микробиоты, способный поддерживать необходимый уровень биогенного обмена.

Варьирование численности и соотношение эколого-трофических групп микроорганизмов относятся к числу чувствительных параметров, свидетельствующих об изменении или загрязнении почвы [19]. Нами показано достоверное различие в численности эколого-трофических групп микроорганизмов в исследуемых почвенных образцах. В образцах с уровнем загрязнения углеводов до 1 %, численность всех групп культивируемых форм микроорганизмов на 2 или 3 порядка ниже по сравнению с образцами с более высоким содержанием углеводов (более 5 %) в почве.

Воздействие нефти на сообщества почвенных микроорганизмов может стимулировать рост одних видов и подавлять развитие других. В результате попадания нефти изменяется структура микробного сообщества, его состав и степень разнообразия зависят как от концентрации и длительности воздействия, так и от типа почвы и состояния микробиоценоза до начала нефтезагрязнения почвы [20].

Результаты нашего исследования показали существенные различия разнообразия бактерий в почвах месторождения Доссор длительное время загрязнённых нефтью. Так, почвы с низким уровнем загрязнения отличались большим разнообразием бактерий, более

10 разных родов: *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Achromobacter*, *Gordonia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Nocardia* и *Streptomyces*.

Известна высокая лабильность и зависимость различных групп микроскопических грибов от загрязняющих факторов, в том числе от присутствия углеводов [21, 22]. При действии углеводов отмечено снижение численности и активности микроскопических грибов. Такие же результаты получены при изучении разнообразия микроскопических грибов в почвенных образцах месторождения Доссор. В почвах с высоким уровнем содержания углеводов культивируемые формы микромицетов не обнаружены, были изолированы дрожжи родов *Rhodotorula* и *Trichosporon*.

Таким образом, результаты исследования показали: существенные различия в численности разных эколого-трофических и таксономических группы культивируемых форм микроорганизмов; образцы почв с низким уровнем загрязнения характеризовались более высоким биоразнообразием культивируемых форм бактерий и микроскопических грибов; определение микробной структуры в загрязненной почве является основой для дальнейших исследований по выявлению активных штаммов микроорганизмов в биоремедиации.

Литература:

- 1 Ijoma G.N., Tekere M. Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. *J. Environ. Sci. Technol.* 2017; 14(8):1787–1806. (doi:10.1007/s13762-017-1269-3)
- 2 Sutton N.B. et al. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol. American.* 2013; 79(2): 619–630. (doi:10.1128/aem.02747-12)
- 3 Debora de Souza P.S. et al. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International. Biodeterioration & Biodegradation.* 2015; 9:85–89. (doi:10.1016/j.ibiod.2014.09.021)
- 4 Shekhar S.K. et al. Growth Potential Assessment of Actinomycetes Isolated from Petroleum Contaminated Soil. *J. Bioremediation Biodegrad.* 2014; 5(7): 259. (doi:10.4172/2155-6199.1000259)
- 5 Cho C. et al. Recent advances in microbial production of fuels and chemicals using tools and strategies of systems metabolic engineering. *Biotechnol. adv.* 2015; 33(7):1455–1466. (doi:10.1016/j.biotechadv.2014.11.006)
- 6 Ławniczak Ł. et al. Microbial Degradation of Hydrocarbons - Basic Principles for Bioremediation: A Review: 4. *Molecules.* 2020; 25(4):856. (doi:10.3390/molecules25040856)
- 7 Ikuesan F. Evaluation of Crude Oil Biodegradation Potentials of Some Indigenous Soil Microorganisms. *Journal of Scientific Research and Reports.* 2017; 13(5):1–9. (doi:10.9734/jsrr/2017/29151)
- 8 Jahangeer J., Kumar V. An overview on microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants. *International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR).* 2013; 1(8):34–37. (doi:10.4061/2011/941810)
- 9 Al-Hawash A.B. et al. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnol. Rep.* 2018; 17:104–109. (doi:10.1016/j.btre.2017.12.006)
- 10 Bertani G. Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Bacteriol. American Society for Microbiology.* 2004; 186(3):595–600. (doi: 10.1128/JB.186.3.595–600.2004)
- 11 Evans C. The continuous cultivation of microorganisms. Construction of a Chemostat. *Methods Microbiol.* 1970; 2(4):277–327. (doi:10.1016/S0580-9517(08)70227-7)
- 12 Marín C., Roberto G. Functional land-use change effects on soil fungal communities in Chilean temperate rainforests. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition.* 2017; 17(4):985–1002. (doi:10.4067/s0718-95162017000400011)
- 13 Luria Yu. Yu. Analytical Chemistry of Industrial Wastewater. Moscow: USSR Chemistry, 1984: 448. (doi.org/10.1002/ahch.19860140513)
- 14 Holt J.G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* 9th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1994:824.
- 15 Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study.* 5th ed. Elsevier, 2011: 2363.

- 16 Barnett H.L., Hunter B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th ed. Burgess Publishing Company, 1998:254.
- 17 Sheffe G. Dispersion analysis. - Moscow: USSR Chemistry, 1980: 512.
- 18 Saparov A.S. et al. Petrochemical pollution of soils of the territory of the pipeline routes in Atyrau region. *Soil ecology*. 2009; 4:56–62. (<https://journal.soil.kz/jour/article/view/174/166>)
- 19 Zhao D. et al. The influence of different types of urban land use on soil microbial biomass and functional diversity in Beijing, *China*. *Soil Use Manag.* 2013; 29(2):230–239. (doi:10.1111/sum.12034)
- 20 Liu Q. et al. Aerobic degradation of crude oil by microorganisms in soils from four geographic regions of China. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*. 2017; 7(1):14856. (doi:10.1038/s41598-017-14032-5)
- 21 Jiao S. et al. Bacterial communities in oil contaminated soils: Biogeography and co-occurrence patterns. *Soil Biol. Biochem.* 2016; 98:64–73. (doi:10.1016/j.soilbio.2016.04.005)
- 22 Galitskaya P. et al. Response of bacterial and fungal communities to high petroleum pollution in different soils. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*. 2021; 11(1):164. (doi:10.1038/s41598-020-80631-4)