

*На правах рукописи*

**ЖУРАВЛЕВА Анна Сергеевна**

**ТЕРМОФИЛЬНЫЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЕ ПОЧВЕННЫЕ  
БАКТЕРИИ ИЗ КОНТРАСТНЫХ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН**

Специальность: 06.01.03. – агрофизика

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Агрофизический научно-исследовательский институт», в отделе светофизиологии растений и биопродуктивности агроэкосистем, лаборатории экологической микробиологии.

Научный руководитель: Галушко Александр Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий сектором экологической микробиологии отдела светофизиологии растений и биопродуктивности агроэкосистем ФГБНУ АФИ

Официальные оппоненты: Зачиняева Анна Владимировна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»

Ахтемова Гульнар Асановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ).

Ведущая организация: Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 006.001.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Агрофизический научно-исследовательский институт» по адресу: 195220, Санкт-Петербург, Гражданский проспект, д.14. Тел. +7 (812) 534-13-24, факс +7 (812) 534-19-00, e-mail: office@agrophys.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Агрофизического научно-исследовательского института и на сайте <http://www.agrophys.ru>, с авторефератом – на сайте <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.agrophys.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенных печатью, просим направлять по адресу: 195220, Санкт-Петербург, Гражданский пр., д. 14, ФГБНУ АФИ.

Учёный секретарь  
диссертационного совета Д 006.001.01  
доктор биологических наук

\_\_\_\_\_ Елена Всеволодовна Канащ

## **Общая характеристика работы**

**Актуальность исследований.** Влияние антропогенной деятельности на окружающую среду является широко обсуждаемой проблемой последних лет. К ней относятся как локальные изменения среды, такие, как загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами в ходе их добычи, хранения и транспортировки, так и глобальные вопросы биосферного масштаба, в том числе, изменение температурного режима почв в сторону контрастности, затрагивающее человечество в целом. Одним из индикаторов такого изменения можно считать присутствие в почве быстро развивающихся термофильных микроорганизмов, которые ранее считались обитателями горячих источников, вулканических почв и глубинных вод нефтяных месторождений, но все чаще обнаруживаются в поверхностном слое антропогенно измененных почв и грунтов, подвергающихся повышенному нагреву в летние периоды, в том числе, в северных нетермальных зонах. Тем не менее, о распространенности этих микроорганизмов на данный момент имеется слишком мало сведений, чтобы можно было утверждать о системности этой проблемы. В связи с этим исследования, направленные на оценку распространенности и биоразнообразия термофильных почвенных бактерий, окисляющих углеводороды или промежуточные продукты их разложения, в регионах с умеренным и холодным климатом, где отсутствует геотермальная активность, в настоящее время являются весьма актуальными.

**Цель работы.** Целью работы являлось исследование микрофлоры нефтезагрязненных почв и грунтов различных географических зон, в частности – в регионах с контрастным климатом, где отсутствует геотермальная активность, а также поиск, выделение и идентификация культивируемых термофильных аэробных органогетеротрофных бактерий и их апробирование в качестве деструкторов отдельных углеводородов.

### **Основные задачи.**

1. Исследование микрофлоры нефтезагрязненных почв и седиментов нефтезагрязненного озера Апшеронского полуострова, нефтезагрязненных почв и почвогрунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области, Ямало-Ненецкого автономного округа лабораторными культивационными методами, поиск и выделение чистых культур термофильных микроорганизмов-нефтедеструкторов и идентификация штаммов.
2. Выявление у выделенных культур способности разлагать различные углеводородные субстраты при повышенной температуре и проведение сравнительного анализа выделенных штаммов как перспективных участников микробных ассоциаций, наиболее эффективно разлагающих нефтепродукты.
3. Исследование микробиома нефтезагрязненных почвогрунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области с помощью молекулярно-генетических методов и выявление культивируемых термофильных бактерий.
4. Оценка экологического состояния микробных сообществ почвогрунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области в зависимости от уровня загрязнения нефтепродуктами.

**Научная новизна исследования.** Впервые получены данные о структуре и качественном составе микробиоты почвогрунтов участков железной дороги в черте г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области в контексте присутствия в них термофильных бактерий. Впервые обнаружены и исследованы генетически близкородственные штаммы культивируемых термофильных бактерий в различных географических зонах. Получена новая информация о распространении и характеристиках генетически близкородственных термофильных микроорганизмов, ранее считавшихся ассоциированными с термальными зонами, в загрязненных почвах и грунтах нетермальных зон, в частности, Азербайджана, Северо-Западного региона России и Ямало-Ненецкого автономного округа. Впервые выделены термофильные культивируемые нефтеразлагающие штаммы *Aeribacillus* sp., *Geobacillus thermodenitrificans* из нефтезагрязненных почв и седиментов нефтезагрязненного озера нетермальных зон Азербайджана. Впервые выделены термофильные нефтеразлагающие штаммы *Aeribacillus* sp., *Geobacillus thermoglucosidasius* из антропогенно измененных почв и грунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Выделен нефтеразлагающий штамм *Geobacillus* sp. из нефтезагрязненных почв Ямало-Ненецкого автономного округа. Изучена способность выделенных штаммов термофильных бактерий к разложению индивидуальных углеводов.

**Теоретическая значимость работы.** Получена новая информация о распространении и характеристиках филогенетически близкородственных термофильных микроорганизмов (*Aeribacillus* sp., *Geobacillus* sp.), ранее считавшихся ассоциированными с термальными зонами, в загрязненных почвах и грунтах нетермальных зон, в частности, Азербайджана, Северо-Западного региона России и Ямало-Ненецкого автономного округа. Данные проведенных нами анализов позволяют заключить, что виды термофильных бацилл, несмотря на множественные литературные сведения о типичных для них климатических и локальных температурных условиях, также присутствуют в антропогенно измененных почвах и почвогрунтах северных регионов, и не являются единичной находкой. С помощью молекулярно-генетических методов в нефтезагрязненных почвогрунтах железной дороги Санкт-Петербурга выявлены малоизученные культивируемые анаэробные термофильные бактерии, составляющие значительную часть бактериального сообщества и перспективные для выделения и дальнейшего изучения в лабораторных условиях (*Caloribacterium* sp.).

**Практическая значимость работы.** Выделенные термофильные нефтеразлагающие штаммы, способные к утилизации нефти и отдельных углеводов при температуре 60°C, могут использоваться при создании микробных консорциумов с участием термофильных бактерий в целях биоремедиации нефтезагрязненных почв и грунтов, подвергающихся постоянному или периодическому нагреву. Материалы диссертационной работы могут быть использованы в ВУЗах для подготовки лекций и проведения практических занятий.

**Методология работы.** Методология научного исследования была построена на сочетании лабораторно-культивационных и современных молекулярно-генетических методов при работе с микроорганизмами, позволяющем использовать преимущества обоих методических подходов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В верхнем слое антропогенно измененных почв и грунтов в настоящее время обитают термофильные нефтеразлагающие бактерии, считающиеся ассоциированными с южными почвами и экосистемами, подвергающимися естественному нагреву (вулканические почвы, почвы, сопряженные с горячими источниками и местами нефтедобычи).
2. Филогенетически близкородственные штаммы почвенных термофильных бактерий типа *Firmicutes* присутствуют в географических зонах, сильно различающихся по климатическим условиям.
3. Почвенные термофильные бактерии, обнаруживающие близкое родство, но обитающие в разных географических зонах, отличаются по скорости роста и по возможности использовать индивидуальные углеводороды.
4. Из-за температурных условий, складывающихся в нефтезагрязненных песчаных почвогрунтах Санкт-Петербурга и Ленинградской области, микробные сообщества почвогрунтов чувствительны к более низким уровням загрязнения, чем микробные сообщества зональных почв.
5. При увеличении содержания нефтепродуктов в микробных сообществах почвогрунтов возрастает доля термофильных представителей.

**Финансовая поддержка.** Работа проведена при частичной финансовой поддержке грантом РФФИ «Аспирант» № 19-34-90156 и частичной финансовой поддержке грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение с Минобрнауки России № 075-15-2020-805 от 02 октября 2020 г.).

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обеспечена строгим выполнением методических требований к проведению лабораторных исследований, применением стандартизированных методик работы с образцами почв и грунтов и почвенными микроорганизмами, а также стандартизированных химических методов, проведенных в испытательной лаборатории ФГБНУ АФИ с использованием поверенного аналитического оборудования и программно-аппаратных комплексов, выполнением молекулярно-генетических анализов в аккредитованных организациях и корректным использованием методов статистической обработки экспериментальных данных.

Материалы и основные положения диссертации были представлены и обсуждены в виде устных докладов на конференциях и конгрессах: «Экологические проблемы недропользования. Наука и образование» СПбГУ, институт наук о Земле, Санкт-Петербург, 1–5.10.2018; «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем растениеводства к технологиям будущего», ФГБНУ АФИ, Санкт-Петербург, 2–4.10.2019; Всероссийская научная конференция с международным участием «Вклад агрофизики в решение фундаментальных задач сельскохозяйственной науки», Санкт-Петербург, 1–2.10.2020; Международная научно-практическая конференция

молодых ученых и обучающихся «Интеллектуальный потенциал молодых ученых как драйвер развития АПК», Санкт-Петербург, 24–26.3.2021; III международная научная конференция «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего», ФГБНУ АФИ, Санкт-Петербург, 14–15.9.2021; 3-й Российский микробиологический конгресс, Псков, 26.9–1.10.2021.

#### **Личный вклад автора**

Работа выполнена в соответствии с тематическим планом НИР отдела светофизиологии растений и биопродуктивности агроэкосистем ФГБНУ АФИ в рамках государственного задания по программе ФНИ государственных академий наук на 2013-2020 (№ 0667-2019-0013) – X 10.2. Земледелие, п.142. «Фундаментальные основы создания систем земледелия и агротехнологий нового поколения, с целью сохранения и воспроизводства почвенного плодородия, эффективного использования природно-ресурсного потенциала агроландшафтов и производства заданного количества и качества сельскохозяйственной продукции».

Экспериментальная работа выполнялась в лаборатории сектора экологической микробиологии указанного выше отдела ФГБНУ АФИ. Выбор цели и постановка задач исследования осуществлялось совместно с научным руководителем работы Галушко А.С. Выполнение лабораторно-культуривационных экспериментов, подготовка образцов для химических и молекулярно-генетических анализов, статистическая обработка результатов и обобщение данных экспериментальной работы проводились соискателем лично в качестве ответственного исполнителя исследований. Личный вклад в общий объем диссертационного исследования оценивается в 80%, доля участия в научных публикациях – 29 %.

**Соответствие работы паспорту специальности.** Работа соответствует п. 8, 9, 12, 18, 27 паспорта специальности 06.01.03. – агрофизика.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа изложена на 151 странице, состоит из введения, 4 глав, выводов, списка сокращений, списка литературы, включающего 314 источников (из них 189 на иностранном языке), содержит 10 таблиц, 25 рисунков и 3 приложения.

### **Содержание работы**

#### **Глава 1. Почвенная микробиота в условиях нефтезагрязнения**

В литературном обзоре представлены современные данные о влиянии нефтезагрязнения на почвенную микробиоту, включая отдельные группы микроорганизмов, нефтеразлагающих бактерий различных географических зон, о распространении и особенностях термофильных нефтеразлагающих бактерий, включая бактерии, принадлежащие к типу *Firmicutes*, в том числе в контексте глобального изменения климата в сторону повышения контрастности температуры почв и урбанизированных территорий. Несмотря на то, что влияние нефтезагрязнения на микробное сообщество почв изучено весьма подробно, о распространении термофильных бактерий в почвах зон с холодным

и умеренным климатом и их роли в деструкции нефтепродуктов в условиях, не являющихся для этих бактерий типичными, в настоящее время все еще мало сведений, как и о пригодности этих культур в качестве составляющих микробных ассоциаций для ремедиации нефтезагрязненных территорий, поэтому направление исследования является актуальным.

## **Глава 2. Объекты исследования и методика проведения экспериментов**

*Объекты и предметы исследования.* Объектами исследования служили нефтезагрязненные почвы, седименты озер, а также урбанизированные почвы и грунты с территорий свалки и железной дороги. Использовалось 27 проб в 5 пулах, соответствующих различным географическим зонам: Апшеронский полуостров (Азербайджан) (А), г. Кудрово (К), г. Пушкин (Санкт-Петербург, Россия) (Р), г. Луга (Ленинградская область, Россия) (L), Ямало-Ненецкий округ (Россия) (YN). Предметом исследования являлась почвенная микробиота (бактерии и археи), в том числе – термофильные бактерии, способные к разложению нефти и отдельных углеводов.

*Отбор образцов почвогрунта.* Отбор нефтезагрязненных почв и грунтов производился согласно «Методическим рекомендациям по выявлению деградированных и загрязненных земель» (1995). Пробы почв и почвогрунтов Апшеронского полуострова были предоставлены д.б.н. Соромотиным А.В. (Тюменский Государственный Университет, НИИ экологии и рационального использования природных ресурсов). Пробы грунтов г. Пушкин отбирались под руководством к.б.н. ВНИИСХМ Андропова Е.Е. Пробы почв Ямало-Ненецкого округа и пробы грунтов г. Кудрово, Ленинградская область, были предоставлены д-р с.-х. наук, проф. Волковой Е.Н. (ФГБНУ АФИ).

*Лабораторные эксперименты.* Для выявления присутствия термофильных бактерий и получения накопительных культур в усредненных пробах проводили высеивание образцов на модифицированную нами жидкую минеральную питательную среду Ворошиловой-Диановой (далее – ВД) (Ворошилова, Дианова, 1952) с добавлением микроэлементов (Palatinszky et al., 2015) и индивидуальных углеводородных субстратов в качестве единственного источника энергии и углерода для роста микроорганизмов.

Используемые индивидуальные субстраты:

- Ацетат натрия (трехводный) вносили в количестве 1,36 г/л.
- Бензоат натрия вносили в количестве 0,721 г/л.
- Нефть сырую (ГОСТ 9965-62, Черкасский завод химреактивов) вносили в количестве 10 мл/л.
- Гексадекан вносили в количестве 30мл/л.

Подробная методика выявления термофильных бактерий, выделения чистых штаммов микроорганизмов, проверки их чистоты и постановки культивационных и ростовых экспериментов с выделенными штаммами и индивидуальными углеводородными субстратами описана в источниках (Журавлева и др., 2021, Галушко и др., 2021).

*Идентификацию выделенных штаммов* молекулярно-генетическими методами проводили в компании «Евроген» (Москва) на основе анализа последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК с использованием стандартных праймеров – 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Анализ нуклеотидных последовательностей и построение филогенетических деревьев осуществляли с помощью NCBI BLAST и методов Neighbour-Joining и Maximum Likelihood (Tamura, Nei, 1993, Chevenet et al., 2006, Dereeper et al., 2008, 2010), программ MUSCLE, Gblocks, PhyML, TreeDyn, MEGA 10. Длина анализируемых последовательностей составляла 1439–1444 нуклеотидов.

*Определение содержания нефтепродуктов в почвогрунтах* проводили спектрофотометрическим методом в соответствии с МУК 4.1.1956-05 (2005).

*Исследование метагенома образцов почвогрунтов.* Методики выделения и очистки ДНК, конструирования и секвенирования ампликонных библиотек и преобразования данных в таксономические единицы подробно и поэтапно описаны в литературе (Андронов и др., 2009, Malferrati et al., 2002, De Santis et al., 2006, Caporaso et al., 2010, Edgar, 2010).

*Статистическая обработка данных.* Статистическую обработку проводили в программе MS Excel. Определялись средние значения изучаемых показателей, доверительные интервалы. Достоверность различий между вариантами оценивали методами параметрической (t-критерий Стьюдента) статистики. Различия между вариантами считались достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### **Глава 3. Термофильные почвенные бактерии из нефтезагрязненных почв и почвогрунтов различных природно-климатических зон**

#### **3.1. Свойства исследуемых образцов почв и грунтов**

В результате высева почвенных образцов на среду ВД с добавлением в качестве органического субстрата ацетата натрия или нефти и культивирования в термостате при 60°C, накопительные культуры бактерий, показавшие активный рост, были отобраны для дальнейшей работы. Впоследствии из них были выделены чистые штаммы термофильных бактерий, также в этих пробах определяли исходное общее содержание нефтепродуктов (далее – НП). рН в пробах почвогрунтов варьировал от 4,5 до 7,8, при этом наименьшим значением отличалась проба Р3 (г. Пушкин), а наибольшим – К2 (г. Кудрово, территория свалки). Содержание нефтепродуктов в пробах загрязненных почв Азербайджана варьировало от 1,48 до 5,13 массовых %. Содержание НП в почвах и грунтах Санкт-Петербурга и Ленинградской области было довольно низким и варьировало от следовых количеств в фоновом образце Р9 до 2,67 масс % загрязненном образце Р3. Наибольшим содержанием НП закономерно отличались обладающие высокими сорбционными способностями торфяные почвы Ямало-Ненецкого округа – до 25 масс %. Такая концентрация нефти является критичной для многих групп микроорганизмов, в особенности при низких температурах, приводящих к подавлению микробной активности, но, несмотря на это, в одном из образцов (при загрязнении 19,6 масс %) было



обнаружено присутствие культивируемых аэробных органогетеротрофных термофильных бактерий.

### 3.2. Характеристика выделенных штаммов термофильных бактерий

В результате выделения чистых штаммов на твердой питательной среде на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ), их последующей очистки и проверки чистоты, была составлена рабочая коллекция из 18 штаммов термофильных бактерий, выделенных из проб почвогрунтов различных исследуемых географических зон. Между некоторыми из них было отмечено морфологическое сходство по внешнему виду колоний, виду и размеру клеток и форме крепления спор. Все обнаруженные бактерии представляли собой неподвижные спорообразующие палочки, способные образовывать парные соединения (диплобациллы) и цепочки (стрептобациллы). Форма крепления спор – субтерминальная или терминальная. После выделения, термофильные бактериальные штаммы были идентифицированы с помощью молекулярно-генетических методов.

#### 3.2.1. Идентификация выделенных штаммов термофильных бактерий

Идентификация бактериальных штаммов молекулярно-генетическими методами показала, что штаммы A2-1b, L2-1 принадлежат к виду *Geobacillus thermodenitrificans* (рис. 1), при этом выявлена близость обоих штаммов не к типовому штамму вида, а к штамму WJ-9 (Xia, 2012), A3-1 – к штамму DSM 465 вида *Geobacillus stearothermophilus* (Egan et al., 2017), штамма P6-1 – к штамму BGSC95A1 *Geobacillus (Parageobacillus) thermoglucosidasius* (Suzuki et al. 1983, Aliyu et al. 2016), штамма 7-1-2 – к виду *Anoxybacillus* sp. штамма YIM73012 (Khan et al., 2018), штамма YN2 – к штамму WSUCF-022A вида *Geobacillus jurassicus* (Carlson et al., 2018), штаммов A7-1-1, K2-2, K6, L1, L2-2, L2-3, P2-1, P2-2, P4, P6-2, P8-2 – к близкому к геобациллам роду *Aeribacillus*, сравнительно недавно отделенному от *Geobacillus* в отдельный ((Scholz et al., 1987, Miñana-Galbis et al, 2010), и на данный момент насчитывающему два вида (Miñana-Galbis et al, 2010, Finore et al, 2017). Интересно отметить, что генетически близкородственные штаммы *Geobacillus* (A2-1b (Азербайджан) и L2-1 (Луга); A3-1 (Азербайджан) и YN2 (Ямал)) встречаются в нефтезагрязненных почвах и грунтах весьма отдаленных друг от друга регионов, а различные представители рода *Aeribacillus* были обнаружены в 10 пробах грунтов четырех из пяти исследуемых регионов.

Бактерии рода *Geobacillus* считаются «космополитами», широко распространенными на планете (Zeigler, 2014). Однако, чаще всего представителей родов *Geobacillus*, *Aeribacillus* и *Anoxybacillus* находят в подогретых экосистемах, например, в почвах районов с геотермальной активностью и горячих источниках (Pikuta et al, 2000, Banat et al, 2004, Pinzón-Martínez et al, 2010, Dai et al, 2011, Yasawong et al, 2011, Zhang et al, 2013, Cihan et al, 2014, Mnif et al., 2014, Filippidou et al, 2015, Inam et al, 2018, Yamprayoonswat et al, 2019, и др.), имеются также отдельные данные об их обнаружении в антропогенных экосистемах, таких, как свалка и компостный

завод (Carlson et al., 2018). Общий вид клеток и спор некоторых выделенных нами штаммов представлен на рис. 2.

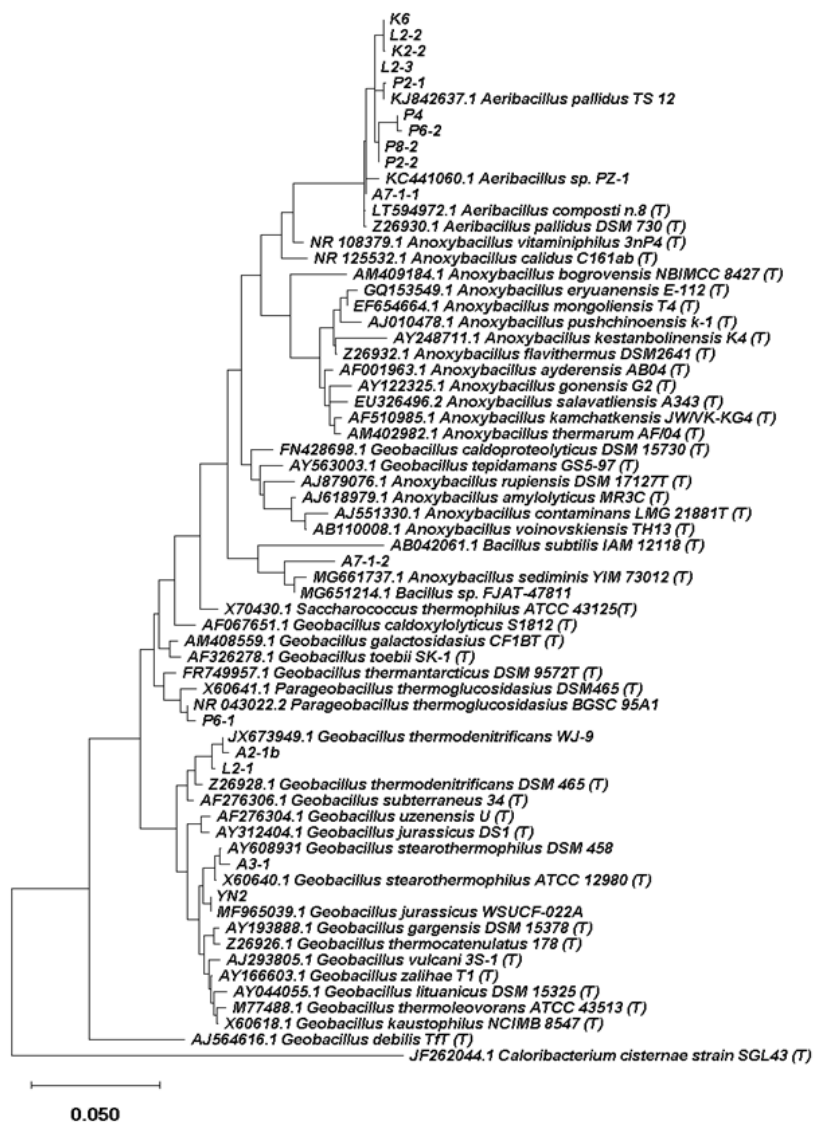


Рис. 1. Филогенетическое древо близкородственных штаммов, полученное путем применения алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний (Tamura, Nei, 1993, Edgar, 2004, Chevenet et al, 2006, 2008, 2010). Длина ветвей соответствует количеству нуклеотидных замен на сайт.

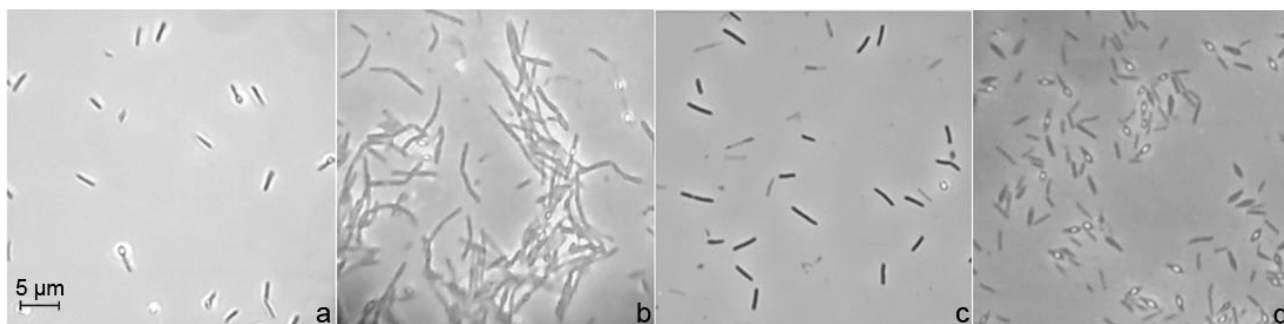


Рис. 2. Общий вид клеток и спор штаммов: а – А7-1-2 (*Anoxybacillus* sp.), б – L2-1 (*Geobacillus thermodenitrificans*), в – P6-1 (*Parageobacillus thermoglucosidasius*), г – L2-3 (*Aeribacillus* sp.). Увеличение 400х.

По литературным данным, на территории России были обнаружены некоторые другие термофильные представители рода *Geobacillus* (Nazina et al., 2004, Rozanov et al., 2014, Bryanskaya et al., 2015), и эти виды также были найдены преимущественно в горячих источниках, тогда как о присутствии их в почве на территории России на настоящий день информации очень мало, имеются лишь отдельные сведения об их обнаружении в антропогенно измененных почвах, таких как сельскохозяйственные почвы после внесения продуктов переработки сточных вод (Ахтемова, 1998) и территории лесозаготовок (Юницына и др., 2019). Сведения о присутствии в почвах регионов Санкт-Петербурга и Ленинградской области термофильных бактерий рода *Aeribacillus* были получены нами впервые. При этом, исходя из данных филогенетического анализа, отмечается разнообразие выделенных штаммов рода *Aeribacillus*, что подтверждено в том числе, несопадениями в скорости роста и способности к использованию различных субстратов. Данные проведенных нами анализов позволяют заключить, что виды термофильных бацилл также присутствуют в антропогенно измененных почвах и почвогрунтах северных регионов, и факт их обнаружения не является случайной находкой.

### 3.2.2. Особенности роста выделенных штаммов бактерий на индивидуальных углеводородных субстратах

При проверке роста выделенных чистых культур термофильных бактерий на отдельных органических субстратах была выявлена их способность к разложению нефти и отдельных углеводородов. Выявлено, что выживание и способность к разложению углеводородов при температуре 60°C для 4 из 18 выделенных культур, предположительно зависит от их включенности в бактериальное сообщество (табл. 1).

Таблица 1

#### Способность штаммов к росту на индивидуальных углеводородных субстратах\*

Наименование штамма	Ацетат Na	Нефть	C16	Бензоат Na
A2-1b ( <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> )	+	+	+	н/о
A3-1 ( <i>Geobacillus stearothermophilus</i> )	+	+	н/о	н/о
A7-1-1 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	Не обнаружена			
A7-1-2 ( <i>Anoxybacillus</i> sp.)	+	+	+	н/о
K2-2 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	+	+	н/о
K6 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	+	+	н/о
L1 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	н/о	н/о	н/о
L2-1 ( <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> )	+	+	+	+
L2-2 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	+	+	+
L2-3 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	+	+	+
P2-1 (н/о)	Не обнаружена			
P2-2 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	+	–	+
P4 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	–	н/о	н/о
P6-1 ( <i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i> )	+	+	+	–
P6-2 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	Не обнаружена			
P8-1 (н/о)	Не обнаружена			
P8-2 ( <i>Aeribacillus</i> sp.)	+	+	–	+
YN2 ( <i>Geobacillus</i> sp.)	+	+	–	н/о

\* Примечание: «+» – наблюдается кратковременный рост штамма на индивидуальном субстрате, при этом OD<sub>570</sub> культуры не превышает 0,35; н/о – не определялось

При этом, данные культуры способны расти индивидуально при температуре 60°C на богатых питательных средах.

Имеются существенные различия во времени, за которое культуры достигают максимальной плотности, как между штаммами бактерий разных видов, так и между штаммами бактерий одного вида, выделенными из проб почв и грунтов различных географических зон.

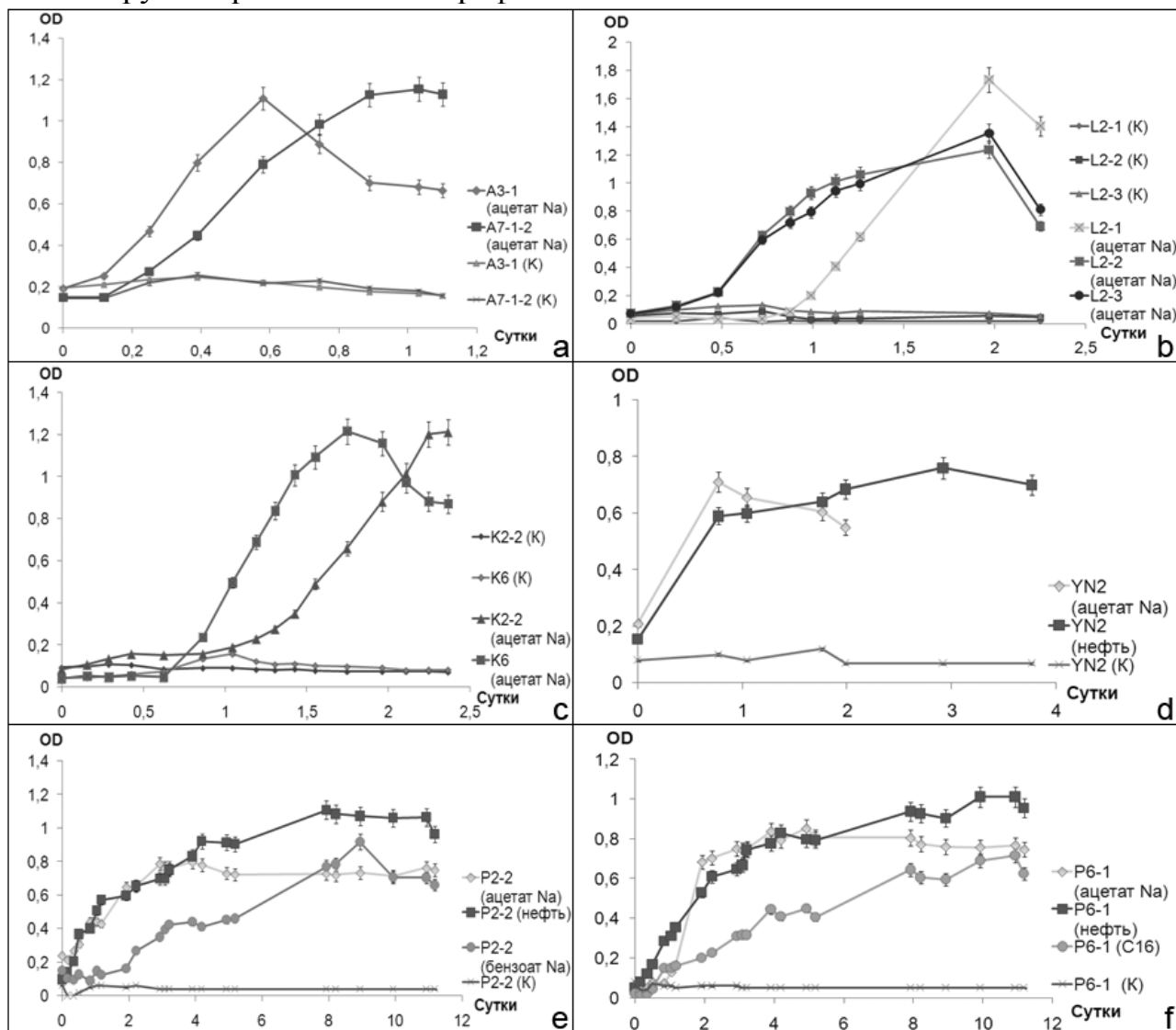


Рис. 3. Графики роста некоторых исследуемых культур на индивидуальных углеводородных субстратах (а – А3-1 (*Geobacillus stearothermophilus*), А7-1-2 (*Anoxybacillus* sp.); б – L2-1 (*Geobacillus thermodenitrificans*), L2-2, L2-3 (*Aeribacillus* sp.); в – K2-2, K6 (*Aeribacillus* sp.); д – YN2 (*Geobacillus* sp.) е – P2-2 (*Aeribacillus* sp.); ф – P6-1 (*Parageobacillus thermoglucosidasius*)); К – контроль (посев на среду ВД без органических субстратов)

Наивысшей скоростью роста на ацетате натрия характеризуются бактериальные культуры А3-1 и А7-1-2 (Азербайджан), а также культура YN2 (Ямал) (рис. 3), достигающие максимальной оптической плотности ( $OD_{570}$  1,11, 1,15 и 0,7) через 0,6, 1,0 и 0,8 суток после посева, соответственно. Максимальная оптическая плотность для культуры L2-1 ( $OD_{570}$  1,7) наблюдается через 0,9 суток начиная с окончания лаг-фазы, а для культур L2-2, L2-3 – через 1,5 суток с окончания лаг-фазы ( $OD_{570}$  1,2, 1,3, соответственно).

Вид кривой роста позволяет предположить, что штаммы L2-2 и L2-3 близкородственны, и это подтверждается их идентификацией молекулярно-генетическими методами. Показано, что культура K2-2 (территория свалки) характеризовалась более плавным изменением кривой роста, чем культура K6 (край свалки), при этом максимальная оптическая плотность ( $OD_{570}$  1,2) наблюдалась через 2,3 суток для культуры K2-2, и 1,7 суток – для культуры K6.

Максимальная оптическая плотность культур ( $OD_{570}$ ) в конце опыта при культивации их на жидкой среде ВД с добавлением нефти составляла 0,7 для культуры K2-2 и 0,31 – для культуры K6, что указывает на способность обеих культур использовать углеводороды нефти в качестве субстрата. Выявлено, что культура YN2 способна использовать углеводороды нефти, при этом максимальная OD на нефти достигается через 2,9 суток. Выявлено, что культура P2-2 (Санкт-Петербург) способна к использованию в термофильных условиях нефти, а также ацетата и бензоата натрия, при этом на нефти и бензоате она достигает существенно более высокой OD. Выявлено, что культура P6-1 способна использовать ацетат натрия, нефть и гексадекан, достигая на нефти наиболее высокой OD.

Таким образом, было отмечено разнообразие характеристик выделенных бактериальных штаммов, в частности – штаммов бактерий рода *Aeribacillus*, обладающих разными скоростью роста, максимальной оптической плотностью при выходе кривой роста на плато и способностью к использованию различных субстратов.

### **3.3. Метагеномный состав сообществ бактерий и архей исследуемых почвогрунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области**

Для исследования микробных сообществ грунтов методом ПЦР были взяты пробы почвогрунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области P1–P9, а также L1, L2 (г. Луга), K2, K6 (г. Кудрово). Структура бактериального ценоза позволила охарактеризовать процессы, происходящие в грунтах при разных уровнях нефтяного загрязнения. Известно, что при концентрации нефтепродуктов в почве до 0,7 мг/кг микробиологические показатели стабильны (Киреева, Водопьянов, 1996). Однако, имеющиеся литературные данные преимущественно касаются микробиома почв, тогда как исследований микробных сообществ антропогенно измененных песчаных грунтов, бедных легкодоступным органическим веществом и характеризующихся низким содержанием азота (Журавлева и др., 2017), в литературе на данный момент имеется недостаточно.

**Изменение сообществ бактерий и архей на уровне типа.** Ранжирование проб по уровню загрязнения позволяет наглядно продемонстрировать изменения сообществ на уровне типа в сравнении с контрольным образцом P9 (табл. 2).

Так, уже при загрязнении 0,29% наблюдается практически полное исчезновение архей типа *Thaumarchaeota*. При низких уровнях загрязнения 0,02–0,55% наблюдается возрастание количества представителей типа *Actinobacteria*, резко снижающегося при загрязнении в 2,67%. В наших

исследованиях ранее было показано, что в нефтезагрязненных почвах Ленинградской области при 2% загрязнении нефтью возросла доля *Actinobacteria*, осуществляющих анаэробную деградацию циклических и ароматических углеводов на более поздних стадиях биodeградации нефти (Журавлева и др., 2017).

При уровнях загрязнения 1,91–2,67% наблюдается выраженное доминирование типа *Proteobacteria*, занимающего, соответственно, 42,76% и 53,20% в сравнении с 23,23% в контрольном образце, что соотносится со многими литературными данными (Popp et al., 2006, Zrafi-Nouira et al., 2009, Head et al., 2006, Dos Santos et al., 2011). Для представителей типа *Verrucomicrobia*, занимающих в контрольном образце 5,38%, критичным оказывается загрязнение нефтепродуктами между 0,55 и 1,91%, а при 2,67% они подавляются полностью, аналогичный уровень загрязнения является критичным для представителей типа *Planctomycetes*.

Таблица 2

**Изменение сообществ бактерий и архей почвогрунтов г. Пушкин при различных уровнях нефтезагрязнения (на уровне типа)**

	Тип	% сиквенсов в образцах почвогрунтов								
		P3	P5	P1	P4	P2	P6	P7	P8	P9
Archaea	<i>Euryarchaeota</i>	–	0,30	–	–	–	–	–	–	–
	<i>Thaumarchaeota</i>	–	–	0,18	0,14	0,00	3,26	2,80	2,56	2,90
Bacteria	<i>Acidobacteria</i>	0,46	0,46	7,48	6,76	8,94	7,46	5,72	4,10	5,83
	<i>Actinobacteria</i>	2,22	10,08	18,48	21,82	17,62	20,60	18,00	13,32	9,73
	<i>Armatimonadetes</i>	–	–	–	–	0,26	–	0,02	–	0,03
	<i>Bacteroidetes</i>	15,66	19,08	6,62	6,38	10,30	6,64	12,04	13,06	14,53
	<i>Caldiserica</i>	0,06	0,24	–	–	–	–	–	–	–
	<i>Chlamydiae</i>	–	–	–	0,02	0,12	0,04	0,14	0,20	0,30
	<i>Chloroflexi</i>	–	0,32	–	0,02	–	0,02	0,04	–	0,05
	<i>Coprothermobacteraeota</i>	–	0,16	–	–	–	–	–	–	–
	<i>Cyanobacteria</i>	–	–	–	0,52	0,04	0,24	0,20	–	0,03
	<i>Firmicutes</i>	20,92	10,32	0,16	0,24	0,58	0,72	0,58	1,00	1,68
	<i>Gemmatimonadetes</i>	–	–	0,22	0,50	0,90	0,84	0,20	0,18	0,15
	<i>Nitrospirae</i>	–	–	0,10	0,12	–	0,58	0,50	0,92	0,75
	<i>Patescibacteria</i>	–	0,16	0,26	–	0,02	0,10	0,20	0,10	0,08
	<i>Planctomycetes</i>	–	0,06	0,76	1,64	1,90	1,52	1,62	1,94	1,98
<i>Proteobacteria</i>	53,20	42,76	37,30	35,42	32,68	29,50	26,56	23,94	23,23	
<i>Spirochaetes</i>	–	0,02	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Verrucomicrobia</i>	–	0,12	4,32	7,34	3,60	4,14	4,72	5,84	5,38	
<b>Содержание НП, масс %</b>		<b>2,67</b>	<b>1,91</b>	<b>0,55</b>	<b>0,35</b>	<b>0,29</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>

При этом, в литературе имеются данные о доминировании представителей типа *Thaumarchaeota* и типов *Actinobacteria* и *Proteobacteria* в почвах разного типа – серых лесных, каштановых, черноземных при загрязнении в 20 массовых % (Manucharova et al., 2020), и о подавлении представителей типа *Planctomycetes* при загрязнении нефтью черноземной почвы, тогда как количество представителей типа *Verrucomicrobia* при загрязнении этого типа почвы, по данным авторов, меняется мало.

Отдельно стоит упомянуть то, что в образце с загрязнением НП 1,91% наблюдается возрастание численности представителей типа *Firmicutes* (в 6 раз в сравнении с контрольным образцом, при снижении численности в образцах с

загрязнением до 55%), становящееся еще более выраженным при уровне загрязнения 2,67% (в 12 раз).

Сообщества бактерий и архей загрязненных грунтов с железной дороги г. Луга и грунтов со свалки г. Кудрово (табл. 3) также характеризуются преобладанием представителей типа *Proteobacteria*, однако в них, кроме этого, высока доля представителей типа *Actinobacteria*, как и в грунтах г. Пушкин с низкими уровнями загрязнения (до 0,55%). Количество представителей архей типа *Thaumarchaeota* снижается в загрязненном нефтью образце L2 при 0,39% содержании нефти в сравнении с фоновым L1, с 2,73% до 0,4 %.

При этом, сообщества образцов почвогрунтов с железной дороги г. Пушкин значительно отличаются от сообществ образцов, взятых со свалки г. Кудрово и с железной дороги г. Луга. Так, при загрязнении 0,39% в почвогрунтах г. Луга и 0,69 и 1,02% в почвогрунтах свалки г. Кудрово присутствуют представители типа *Thaumarchaeota*, в то время как в образцах почвогрунтов г. Пушкин при загрязнении выше 0,15% они обнаружены не были.

Таблица 3

**Изменение сообществ бактерий и архей почвогрунтов г. Луга и г. Кудрово при различных уровнях нефтезагрязнения (на уровне типа)**

	Тип	% сиквенсов в образцах почвогрунтов			
		L2	L1 (фон)	K2	K6
<i>Archaea</i>	<i>Euryarchaeota</i>	–	–	0,40	–
	<i>Thaumarchaeota</i>	0,40	2,73	1,77	1,50
<i>Bacteria</i>	<i>Acidobacteria</i>	5,50	3,40	2,50	4,67
	<i>Actinobacteria</i>	13,40	14,17	16,40	18,57
	<i>Bacteroidetes</i>	4,67	8,33	3,70	6,80
	<i>Chlamydiae</i>	0,47	0,27	–	–
	<i>Chloroflexi</i>	0,03	0,10	2,17	0,43
	<i>Cyanobacteria</i>	–	–	–	0,17
	<i>Firmicutes</i>	0,50	1,93	3,80	1,63
	<i>Gemmatimonadetes</i>	0,10	0,20	0,20	0,07
	<i>Nitrospirae</i>	0,87	1,10	0,43	0,43
	<i>Patescibacteria</i>	0,43	0,03	–	–
	<i>Planctomycetes</i>	3,03	4,67	1,07	2,50
	<i>Proteobacteria</i>	27,03	25,73	24,53	24,10
	<i>Verrucomicrobia</i>	2,27	4,17	0,50	2,27
<b>Содержание НП, масс %</b>		<b>0,39</b>	<b>0,02</b>	<b>0,69</b>	<b>1,02</b>

Таким образом можно сделать вывод, что влияние нефтяного загрязнения на микробные сообщества песчаных насыпных грунтов требует отдельного всестороннего изучения для понимания процессов, происходящих в микробных сообществах зон, непосредственно включенных в среду обитания человека.

**Изменение сообществ бактерий и архей на уровне класса.** На уровне класса, при загрязнении 1,91 и 2,67%, в образцах грунтов г. Пушкин наблюдается доминирование класса *Gamma proteobacteria*, количество представителей которого возрастает в 2,6 и 2,7 раз, соответственно (табл. 4), что согласуется со многими литературными данными (Head et al., 2006, Popp et al., 2006, Zrafi-Nouira et al., 2009, Dos Santos et al., 2011), тогда как количество

представителей класса *Alphaproteobacteria* последовательно возрастает при загрязнении 0,02–0,55%, снижается при 1,91% и снова возрастает при 2,67%.

Таблица 4

**Изменение сообществ бактерий и архей почвогрунтов г. Пушкин при различных уровнях нефтезагрязнения (на уровне класса)**

Тип	Класс	% сиквенсов в образцах почвогрунтов								
		P3	P5	P1	P4	P2	P6	P7	P8	P9
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	–	0,20	–	–	–	–	–	–	–
	<i>Thermoplasmata</i>	–	0,10	–	–	–	–	–	–	–
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrososphaeria</i>	–	–	0,18	0,14	–	3,26	2,80	2,56	2,90
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriia</i>	0,46	0,40	1,16	2,58	2,42	0,88	0,94	0,96	1,33
	<i>Blastocatellia (Subgroup 4)</i>	–	0,04	6,10	4,14	5,78	6,04	4,18	2,60	3,60
	<i>Subgroup 6</i>	–	–	0,02	0,02	–	0,28	0,42	0,52	0,50
	<i>Thermoanaerobaculia</i>	–	–	0,20	–	0,72	0,30	0,18	0,04	0,40
<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	–	0,02	0,48	0,24	0,42	1,76	2,28	2,28	1,70
	<i>Actinobacteria</i>	2,22	9,94	17,22	19,02	15,50	16,46	12,56	8,48	6,08
	<i>Rubrobacteria</i>	–	–	–	–	–	–	0,02	–	–
	<i>Thermoleophilia</i>	–	0,10	0,74	2,14	1,66	2,22	2,56	2,14	1,70
	<i>Unclassified Actinobacteria</i>	–	–	0,04	0,40	–	0,18	0,58	0,44	0,30
<i>Armatimonadetes</i>	<i>Chthonomonadetes</i>	–	–	–	–	0,12	–	–	–	–
	<i>Fimbriimonadia</i>	–	–	–	–	0,12	–	–	–	0,03
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	15,66	19,08	6,62	6,38	10,30	6,64	12,04	13,06	14,53
<i>Caldiserica</i>	<i>Caldisericia</i>	0,06	0,24	–	–	–	–	–	–	–
<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiae</i>	–	–	–	0,02	0,12	0,04	0,14	0,20	0,30
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	–	0,32	–	–	–	–	–	–	0,03
	<i>Chloroflexia</i>	–	–	–	0,02	–	0,02	–	–	–
<i>Coprothermobacteraeota</i>	<i>Coprothermobacteria</i>	–	0,16	–	–	–	–	–	–	–
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	–	–	–	0,52	0,04	0,24	0,20	–	0,03
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	0,34	0,54	0,12	0,16	0,08	0,56	0,42	0,34	1,00
	<i>Clostridia</i>	20,48	9,40	–	0,10	–	0,10	0,18	0,62	0,65
	<i>Erysipelotrichia</i>	–	–	0,04	–	0,46	–	–	–	–
	<i>Negativicutes</i>	0,08	0,34	–	–	0,00	–	–	–	0,03
	<i>Unclassified Firmicutes</i>	0,02	0,08	–	–	–	–	–	–	–
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	–	–	0,22	0,48	0,90	0,84	0,18	0,18	0,15
	<i>Longimicrobia</i>	–	–	–	–	–	–	0,02	–	–
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	–	–	0,10	0,12	–	0,58	0,50	0,92	0,75
<i>Patescibacteria</i>	<i>Saccharimonadia</i>	–	0,16	0,26	–	0,02	0,10	0,20	0,10	0,08
<i>Planctomycetes</i>	<i>Phycisphaerae</i>	–	–	0,26	0,30	0,40	0,18	0,16	0,14	0,10
	<i>Planctomycetacia</i>	–	0,06	0,50	1,32	1,48	1,36	1,48	1,80	1,83
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	11,84	6,04	18,46	20,20	16,00	14,26	13,00	9,32	8,68
	<i>Deltaproteobacteria</i>	0,90	0,90	0,38	0,90	0,94	1,02	1,88	1,68	2,43
	<i>Gammaaproteobacteria</i>	32,50	31,82	14,84	12,94	13,60	13,64	11,60	12,90	12,05
	<i>Unclassified Proteobacteria</i>	7,94	4,00	3,62	1,36	2,10	0,60	0,06	0,10	0,13
<i>Spirochaetes</i>	<i>Spirochaetia</i>	–	0,02	–	–	–	–	–	–	–
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	–	0,12	4,32	7,34	3,60	4,14	4,72	5,84	5,38
<b>Содержание НП, масс %</b>		<b>2,67</b>	<b>1,91</b>	<b>0,55</b>	<b>0,35</b>	<b>0,29</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>

Среди *Gammaaproteobacteria* при уровне загрязнения 2,91% доминируют представители рода *Fulvimonas*, а также неидентифицированные представители класса *Betaproteobacteria* и семейства *Burkholderiaceae*, а среди



*Alphaproteobacteria* – неклассифицированные представители семейства *Acetobacteraceae*. Доминируют при высоких уровнях загрязнения также классы *Clostridia*, доля которых в контрольном образце не превышает 0,65%, а также *Bacteroidia*, составляющие изначально высокую долю и сообщества контрольного незагрязненного образца (14,5%). При этом, при низких уровнях загрязнения доля представителей этого класса снижается. Важно отметить, что класс *Clostridia* в загрязненных образцах грунтов г. Пушкин практически полностью представлен родом термофильных бактерий *Caloribacterium*, в образцах P3 и P5 занимающим 19,5 и 6,78% всего метагенома, соответственно. Этот род был описан в литературе сравнительно недавно (Slobodkina et al., 2012).

Тип *Thaumarchaeota* в исследуемых грунтах представлен классом *Nitrososphaeria*, преимущественно неидентифицированными представителями семейства *Nitrososphaeraceae*, а среди представителей типа *Acidobacteria* доминирует класс *Blastocatellia* (Subgroup 4). И те, и другие, показали чувствительность к нефтяному загрязнению выше 1,91%. Класс *Bacilli*, к которому принадлежат выделенные нами культивируемые термофильные микроорганизмы, занимает малую часть сообществ, в контрольном образце насчитывая 1% и снижаясь во всех загрязненных образцах до 0,02–0,56%. Численность представителей класса *Actinobacteria* возрастает при уровнях загрязнения 0,02–1,91%, но резко снижается при 2,67%, выраженное снижение численности представителей класса *Thermoleophilia* наблюдается, начиная с 0,55%, а при 2,67% они обнаружены не были. Представители класса *Thermoleophilia*, обнаруженные в пробах г. Пушкин принадлежат преимущественно к мезофильным родам с наличием некоторых психрофильных представителей (Suzuki, Whitman, 2012). Возможно, чувствительность представителей этого класса к условиям, создающимся в наиболее загрязненных образцах, связано именно с поверхностным нагревом грунта. Представители класса *Nitrososphaeria*, занимающие в контроле 2,9%, оказываются чувствительными к уровню загрязнения начиная с 0,29%, а *Planctomycetacia* – начиная с 0,55%. Среди класса *Bacteroidia*, при уровне загрязнения 2,91% доминирует род *Proteiniphilum* (грамотрицательные, облигатно анаэробные, протеолитические и хемоорганотрофные бактерии), занимающий 15,36% метагенома и отсутствующий в контрольном образце почвогрунта и в образцах с загрязнением НП менее 1,91%. Состав микробного сообщества образца почвогрунта с загрязнением 2,91% свидетельствует об образовавшихся в грунте анаэробных условиях, способствующих увеличению доли представителей групп и даже отдельных родов бактерий, не нуждающихся в кислороде (*Caloribacterium*, *Proteiniphilum*). При этом, количество разнообразных классов микроорганизмов сокращается в этом образце грунта с 38 в контрольном грунте до 12.

Таким образом, была выявлена чувствительность отдельных классов бактерий даже к низким уровням нефтяного загрязнения, если речь идет о подвергающихся поверхностному нагреву песчаных грунтах и доминирование групп, приспособленных к данным условиям.

Доминирующими классами в образцах почвогрунтов г. Луга и г. Кудрово являются *Gammaproteobacteria* (число представителей этого класса увеличивается в загрязненных образцах по сравнению с фоновыми), *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* (табл. 5). Среди доминирующих гаммапротеобактерий в пробах почвогрунтов г. Луга присутствует множество неклассифицированных представителей этого класса, а также неклассифицированные представители семейства *Burkholderiaceae*, класса *Betaproteobacteria*, и представители рода *Acidibacter* (проба L1), а г. Кудрово – неклассифицированные представители семейства *Burkholderiaceae*, класса *Betaproteobacteria* (проба K2).

Таблица 5

**Изменение сообществ бактерий и архей почвогрунтов г. Луга и г. Кудрово при различных уровнях нефтезагрязнения (на уровне класса)**

Тип	Класс	% сиквенсов в образцах почвогрунтов			
		L2	L1 (фон)	K2	K6
<i>Euryarchaeota</i>	<i>Methanomicrobia</i>	–	–	0,37	–
<i>Thaumarchaeota</i>	<i>Nitrososphaeria</i>	0,40	2,73	1,77	1,50
<i>Acidobacteria</i>	<i>Acidobacteriia</i>	0,60	0,97	0,53	0,87
	<i>Blastocatellia (Subgroup 4)</i>	4,20	0,93	1,47	2,43
	<i>Subgroup 6</i>	0,20	1,10	0,43	0,97
	<i>Thermoanaerobaculia</i>	0,53	0,27	0,07	0,27
	<i>Unclassified Acidobacteria</i>	–	0,10	–	0,17
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	2,13	2,37	5,27
<i>Actinobacteria</i>		10,23	9,57	9,93	10,37
<i>Thermoleophilia</i>		0,90	1,83	0,93	3,17
<i>Unclassified Actinobacteria</i>		0,13	0,43	0,27	1,03
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	4,67	8,33	3,50	6,80
	<i>Ignavibacteria</i>	–	–	0,23	–
<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiae</i>	0,47	0,27	–	–
<i>Chloroflexi</i>	<i>Anaerolineae</i>	–	0,03	2,17	0,43
	<i>Chloroflexia</i>	0,03	0,10	–	–
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Oxyphotobacteria</i>	–	–	–	0,17
<i>Firmicutes;</i>	<i>Bacilli</i>	0,27	1,73	2,10	0,63
	<i>Clostridia</i>	0,23	0,17	1,70	0,90
	<i>Negativicutes</i>	–	–	–	0,03
<i>Gemmatimonadetes</i>	<i>Gemmatimonadetes</i>	0,10	0,20	0,20	0,07
<i>Nitrospirae</i>	<i>Nitrospira</i>	0,87	1,10	0,43	0,43
<i>Patescibacteria</i>	<i>Saccharimonadia</i>	0,43	0,03	–	–
<i>Planctomycetes</i>	<i>Phycisphaerae</i>	0,20	0,20	0,07	0,17
	<i>Planctomycetacia</i>	2,73	4,30	1,00	2,30
	<i>Unclassified Planctomycetes</i>	0,07	0,17	–	0,07
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	10,73	10,63	8,00	10,93
	<i>Deltaproteobacteria</i>	0,37	2,30	0,70	1,53
	<i>Gammaproteobacteria</i>	15,77	12,40	15,47	11,40
	<i>Unclassified Proteobacteria</i>	0,17	0,37	0,40	0,30
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobiae</i>	2,27	4,17	0,50	2,27
<b>Содержание НП, масс %</b>		<b>0,39</b>	<b>0,02</b>	<b>0,69</b>	<b>1,02</b>

В фоновых образцах среди доминант также присутствуют представители класса *Bacteroidia*. Присутствие *Bacteroidia* закономерно для грунтов, загрязненных органическими отходами, в то же время большое количество этих бактерий и представителей других анаэробных классов свидетельствует о

складывающихся в верхнем слое нефтезагрязненных песчаных грунтов анаэробных условиях, даже при низких уровнях загрязнения НП.

В образце К2 также высоко число представителей класса *Acidimicrobia*, преимущественно рода *Iamia* и неклассифицированных представителей семейства *Microtrichaceae*. Класс *Actinobacteria* в образцах почвогрунтов г. Кудрово представлен в основном родом *Nocardioides*. В образце с полотна железной дороги г. Луга среди актинобактерий доминирует род *Mycobacterium*, тогда как в фоновом – сообщество актинобактерий более разнообразно и выравнено, и выраженных доминант не наблюдается.

В целом, в образцах почвогрунтов г. Луга насчитывается 180 родов бактерий в образце L1, и 156 – в образце L2, в образцах почвогрунтов г. Кудрово – 143 рода в образце К2 и 213 родов – в образце К6. Можно говорить, что при нефтезагрязнении 1,02% в образцах почвогрунтов г. Кудрово наблюдается стимуляция микробного сообщества, вызванная присутствием поллютанта. При этом, в образцах почвогрунтов г. Кудрово не наблюдается ярко выраженного доминирования отдельных родов и можно говорить о большей выравненности обоих сообществ в целом, не только в образце с территории свалки, но и в образце с ее края. Однако, условия, складывающиеся в этих грунтах, специфичны и выражено отличаются от условий зональных почв, в том числе нефтезагрязненных, и являются подходящими для развития отдельных групп как аэробных, так и анаэробных микроорганизмов, включая бактерии, способные метаболизировать соединения железа и серы.

### **3.3.1. Экологические характеристики исследуемых сообществ**

Для обобщения полученных результатов и оценки общего состояния микробиомов были рассчитаны экологические индексы (рис. 4, рис. 5). Экологические индексы представляют собой численные показатели, рассчитываемые на основе числа таксонов в сообществе и числа особей (в метагеномике это число сиквенсов) в разных таксонах и применяются для оценки состояния сообществ (Чернов и др., 2015).

Расчет индекса видового богатства Маргалефа в пробах почвогрунтов г. Пушкин показал резкие изменения этого параметра при загрязнении выше 0,29% и выше 1,91%. Видовое богатство при диапазонах загрязнения 0–0,15% и 0,29–0,55% отличается незначительно. При этом, по результатам исследования нефтезагрязненных почвогрунтов на территории нефтехранилища (Журавлева и др., 2017), индекс видового богатства составлял 2,1 и 3,5 – для грунтов с загрязнением НП 6% и 2%, что говорит о том, что по сравнению с ранее исследованными грунтами, в грунтах железной дороги складываются специфические условия, не способствующие выживанию отдельных групп микроорганизмов при невысоком уровне загрязнения 2%.

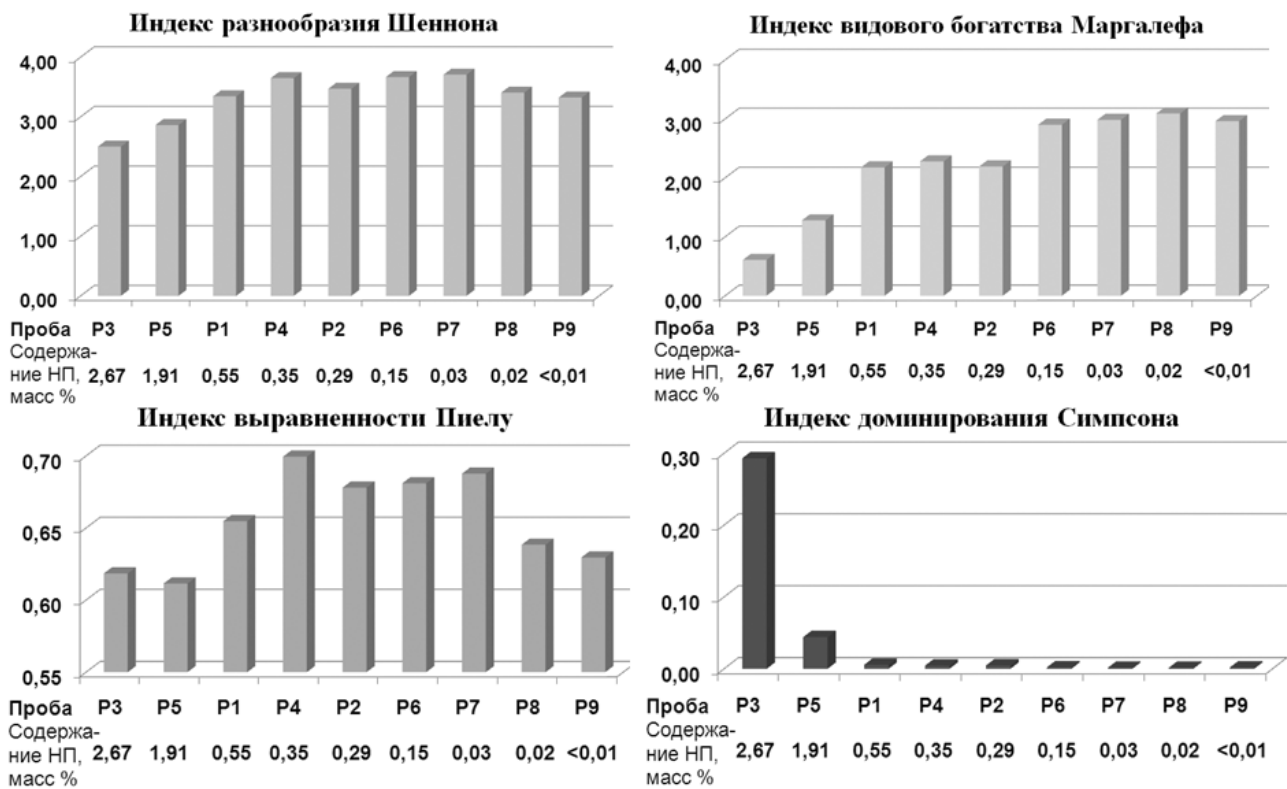


Рис. 4. Экологические индексы микробных сообществ почвогрунтов г. Пушкин

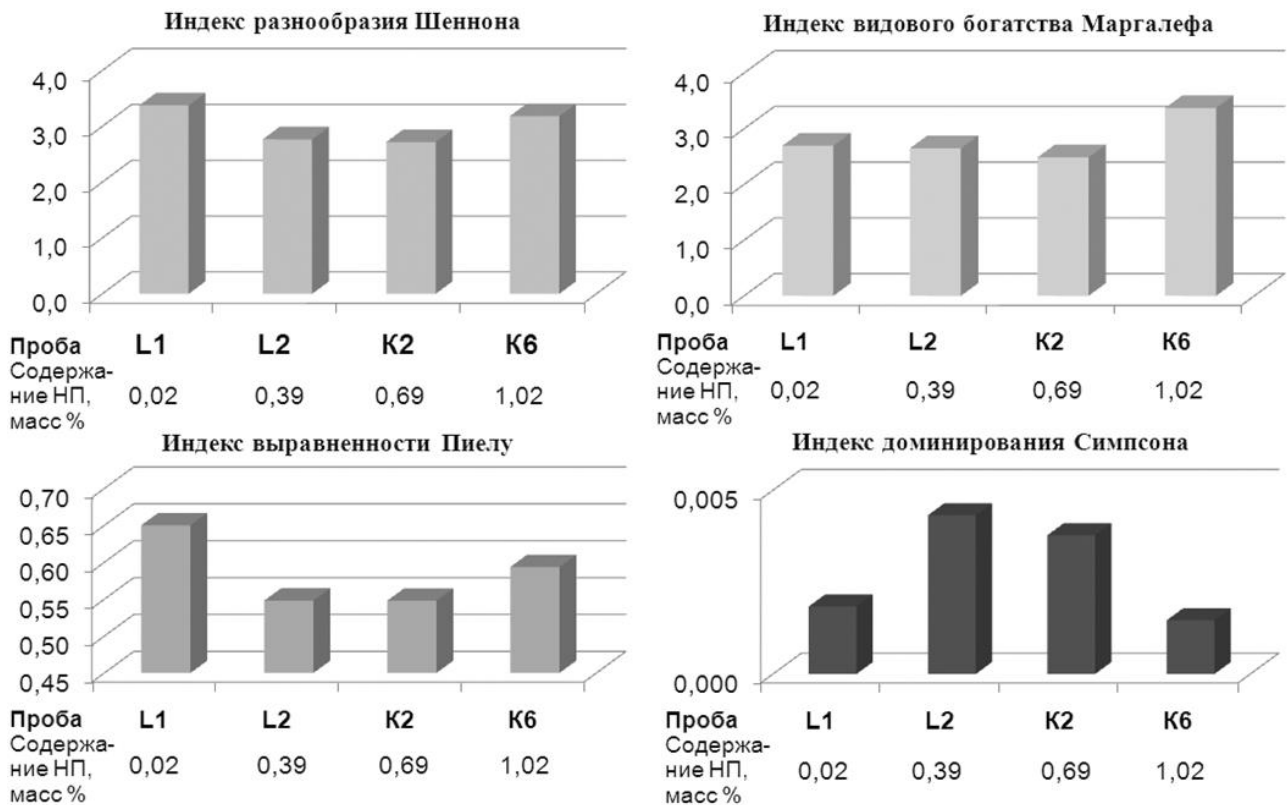


Рис. 5. Экологические индексы микробных сообществ почвогрунтов г. Луга и г. Кудрово

Расчеты индекса разнообразия Шеннона и индекса выравненности Пиелу показали, что наиболее стабильный ценоз сформировался при низких уровнях загрязнения нефтью 0,03–0,35%, по-видимому, за счет развития разнообразных групп микроорганизмов, способных перерабатывать НП либо промежуточные продукты их разложения.

Значение индекса доминирования Симпсона в исследуемых пробах меняется несущественно при загрязнении менее 0,55%, и резко возрастает при уровнях загрязнения НП 1,91%, и в особенности – 2,67%. По предыдущим исследованиям, значение этого индекса для микробных сообществ почвогрунтов при загрязнении в 6% составляло 0,41, а при загрязнении 2% – 0,18, что еще раз подтверждает специфичность микробных сообществ почвогрунтов полотна железной дороги.

В целом, в исследуемых грунтах с загрязнением 1,91% и, в особенности, – с загрязнением 2,67%, все показатели свидетельствуют о негативных изменениях в структуре ценоза бактерий и архей и его общей нестабильности, характеризующихся доминированием отдельных групп и даже родов микроорганизмов, выраженным снижением видового богатства и некоторым снижением выравненности сообществ.

Исследования микробных сообществ железнодорожных почвогрунтов г. Луга показывают, что уровень загрязнения НП 0,39% отражается преимущественно на показателе выравненности сообществ (рис. 5). Анализ микробных сообществ свалки г. Кудрово с помощью экологических индексов показывают, что сообщество бактерий и архей почвогрунтов края свалки с загрязнением 1,02% отличается большим разнообразием, видовым богатством и выравненностью, чем сообщество почвогрунтов с территории свалки с загрязнением 0,69%. При этом, индекс доминирования Симпсона для сообществ почвогрунтов г. Луга и г. Кудрово очень низок и составляет менее 0,005. Это подтверждает, что в исследованных сообществах не наблюдается ярко выраженного доминирования отдельных групп микроорганизмов.

Интересно отметить, что значения этого индекса для проб с железной дороги г. Луга при загрязнении 0,02 и 0,39% коррелируют со значениями, отмеченными для проб с железной дороги г. Пушкин при сходных уровнях загрязнения (0,02 и 0,35%) (рис. 4).

### **3.3.2. Разнообразие родов бактерий, в которых присутствуют термофильные виды, в исследуемых образцах**

На основе метагеномных исследований было выявлено присутствие в образцах исследуемых почвогрунтов родов бактерий, среди представителей которых имеются термофильные виды (табл. 6). Количество родов, в которых имеются термофильные виды, в почвогрунтах железной дороги (пулы Р и L) возрастает с повышением содержания нефтепродуктов в образце.

Выявлено, что приведенные рода составляют собой преимущественно малую часть обнаруженных микроорганизмов. Исключением является абсолютно доминирующий в образце Р3, и являющийся одним из доминант в образце Р5 род термофильных бактерий *Caloribacterium*, не обнаруженный в

остальных образцах, и род *Mycobacterium*, представители которого занимают 2,36–4,62% в образцах P1, P2, P4, P5, P6. Известно, что у микобактерий были обнаружены миколовые кислоты, которые благодаря наличию длинных ароматических цепей, выполняют роль связующего субстрата для таких углеводов, как нефть и нефтепродукты, способствуя их утилизации (Кобзев и др., 2001, Халилова и др., 2014). Ранее микобактерии были обнаружены нами в образцах песчаного грунта с территории нефтехранилища при загрязнении НП 2% (Журавлева и др., 2017), а также в контрольном, без нефтяного загрязнения.

Наиболее распространенными в исследуемых группах образцов почв в совокупности являются рода *Rhodococcus* и *Bacillus*, представители которых были обнаружены практически во всех исследуемых грунтах, кроме P3 (грунт с загрязнением НП 2,67%, pH 4,5 и вероятными анаэробными условиями). Авторы предполагают, что молекулярно-генетические методы не позволили идентифицировать близких к *Bacillus Geo*- и *Aeribacillus* ввиду их высокого внутреннего сходства (более 97%), хотя их наличие в пробах доказано с использованием культивационного подхода.

Таблица 6

**Процент бактериального генома представителей некоторых родов бактерий, в которых присутствуют термофильные виды, в образцах почвогрунтов (на основе метагеномных исследований)**

Род	% сиквенсов в образцах почвогрунтов												
	P3	P5	P1	P4	P2	P6	P7	P8	P9	L1	L2	K2	K6
<i>Actinocorallia</i>	–	–	–	–	–	–	0,02	–	0,05	–	–	–	–
<i>Bacillus</i>	–	0,02	0,02	0,08	0,04	0,38	0,30	0,20	0,33	0,23	0,03	0,70	0,17
<i>Caloribacterium</i>	<b>19,50</b>	<b>6,78</b>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Conexibacter</i>	–	–	0,06	0,14	0,40	0,06	0,04	–	–	–	–	–	–
<i>Mahella</i>	0,60	<b>1,48</b>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Mycobacterium</i>	0,06	<b>3,80</b>	<b>4,62</b>	<b>3,38</b>	<b>3,92</b>	<b>2,36</b>	0,58	0,48	0,20	–	–	–	–
<i>Nitrospira</i>	–	–	0,10	0,12	–	0,58	0,50	0,92	0,75	1,10	0,87	0,43	0,43
<i>Nocardia</i>	–	–	–	–	–	–	0,02	–	–	–	–	–	–
<i>Paenibacillus</i>	–	–	–	0,08	–	–	0,04	0,12	0,15	0,10	–	0,03	0,07
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,96	<b>5,84</b>	–	–	–	0,02	0,32	0,10	–	–	–	–	0,03
<i>Rhodococcus</i>	–	0,16	<b>1,24</b>	0,24	0,22	0,58	0,22	0,20	0,05	0,23	0,20	0,27	0,10
<b>Содержание НП, масс%*</b>	<b>2,67</b>	<b>1,91</b>	<b>0,55</b>	<b>0,35</b>	<b>0,29</b>	<b>0,15</b>	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>0,39</b>	<b>0,02</b>	<b>0,69</b>	<b>1,02</b>

Ранее нами было выявлено, что представители рода *Pseudoxanthomonas* занимали 61% бактериального сообщества песчаного грунта территории нефтехранилища при загрязнении нефтепродуктами 6% (Журавлева и др., 2017), являясь в тех условиях абсолютными доминантами. В исследуемых образцах эти бактерии составляют 5,84% микробного сообщества при уровне загрязнения 1,91%, а при более высоком – 2,67% резко снижаются до 0,96%. Вероятно, это связано с условиями, создавшимися в грунте.

Единственный вид доминирующего в наиболее загрязненных образцах рода *Caloribacterium*, известный на данный момент был выделен в 2012 году из Северо-Ставропольского подземного газового резервуара (Россия). Температурный диапазон для роста – 28–65°C, с оптимумом при 50°C. На

основе исследований, штамм получил название *Caloribacterium cisternae* gen. nov., sp. SGL43T, как типовой представитель нового рода (Slobodkina et al., 2012). При этом, условия в исследуемом нами грунте РЗ, где представители рода *Caloribacterium* занимают 19,5% бактериального генома, не соответствуют выявленным ростовым границам рН (5,5–8,0) для типового штамма *Caloribacterium cisternae* (рН в образце РЗ, где *Caloribacterium* является абсолютным доминантом, равен 4,5). О способности типового штамма разлагать углеводороды нефти сведений не имеется, так что выявленный представитель рода *Caloribacterium* требует дальнейшего пристального изучения.

#### **Глава 4. Изменение микробных сообществ почв в зависимости от антропогенного загрязнения и изменений климата**

Результаты проведенных исследований, а также анализ имеющихся литературных данных свидетельствуют о том, что микробиомы антропогенно измененных почв и грунтов выражено отличаются от таковых в зональных почвах, при этом, территории, занятые урбанизированными почвами, постоянно расширяются с ростом и перераспределением населения. Так, уже по данным 1996 года, большая часть земного населения уже проживала в городах, при этом, ежегодно площади городов расширяются на 476 тыс. га (Роуат et al., 2002). В результате человеческой деятельности и антропогенных загрязнений в зоне обитания человека сформированы специфичные урбанизированные экосистемы (Pickett et al., 2001), и в дальнейшем можно ожидать, что они будут приобретать все большее влияние на экосистему в целом (Васенев и др., 2013, Collins et al., 2000, Pickett et al., 2008). Урбанизированные почвы характеризуются более высокими значениями рН, легким гранулометрическим составом, уплотненностью ввиду рекреационных нагрузок и воздействия техники, повышенным содержанием карбонатов и оксидов железа (Герасимова и др., 2003. Савич и др., 2007). В индустриальных почвах повышено содержание углерода за счет органических поллютантов (Lovett et al., 2000), в то же время наблюдается снижение содержания элементов питания, которые в естественных условиях возвращаются в почву в составе растительных остатков. Снижение поступления элементов питания в индустриальных почвах и грунтах закономерно приводит к изменениям в биогеохимических циклах углерода и азота (Кадулин, Копчик, 2013, Byrne, 2007, Tratalos et al., 2007). Численность микроорганизмов в почвах таких территорий, хотя и может быть достаточно высокой, все же уступает по значениям таковым в почвах ненарушенных экосистем (Казанцев и др., 2007, Медведева и др., 2014).

Температура воздуха в урбанизированных зонах выше за счет тепла, исходящего от асфальта летом, жилых зданий и предприятий зимой. Этот температурный эффект в городах создает “острова тепла” (heat island) (Oke, 1990). Особенно ощутимо превышение фоновых температур в начале ночи, прирост может достигать 2–3°C (Brazel et al., 2000). При этом, в парках температура воздуха и почвы ниже, чем в городских кварталах с высокой долей “запечатанных” почв (Oke, 1990, Hidalgo et al., 2008). В жаркое лето снижение

температуры в озелененных зонах улучшает экологические условия для обитателей почвы. Таким образом, в городах создаются локальные контрастные условия микроклимата (Водяницкий, 2015).

Еще один фактор, способствующий локальной контрастности температур – то, что тепловой режим песчаных почв и грунтов в целом своеобразен и резко меняется: у них сильно нагревается поверхность и прилегающий к ней воздух, что приводит к значительным колебаниям температуры в течение суток. Зональные песчаные и супесчаные почвы называют теплыми из-за того, что они быстро прогреваются, однако они также быстрее охлаждаются, поскольку имеют низкую теплоемкость (Даббаг и др., 2016, Булохов, Финина, 2015). При этом, контрастность температурного режима проявляется и в резком падении температуры почвы с глубиной, тогда как на поверхности песка она может достигать 70°C (Казаков, 2015, Даббаг, 2021). Учитывая, что основная часть почвенных микроорганизмов сосредоточена в верхних слоях почвы, в ходе изменения климата и расширения территорий с контрастным температурным режимом, стоит ожидать, что почвенные микробные сообщества будут претерпевать изменения в сторону увеличения доли приспособленных к этим условиям термофильных и термотолерантных споровых бактерий.

Результаты данной работы показывают, что термофильные споровые бактерии уже сейчас присутствуют, а в отдельных зонах – доминируют в антропогенно измененных почвогрунтах северного региона – Санкт-Петербурга и Ленинградской области, и свидетельствуют о специфичности условий, создающихся в этих грунтах, в контексте почвенной микробиоты. Изучение функционирования почвенных микробных сообществ земной биосферы в условиях меняющегося климата является серьезной перспективой для дальнейших исследований.

#### 4. Выводы

1. В почвах и почвогрунтах различных географических зон (Апшеронский полуостров, Азербайджан, Ленинградская область (г. Луга), Санкт-Петербург (г. Кудрово, г. Пушкин), Ямало-Ненецкий округ) в настоящее время присутствуют термофильные бактерии, способные к разложению нефти и индивидуальных углеводов. Выделено 13 штаммов культивируемых термофильных нефтеразлагающих бактерий типа *Firmicutes*, стабильно растущих при температуре 60°C и способных к разложению нефти и индивидуальных углеводов (ацетат натрия, бензоат натрия, гексадекан), а также 2 перспективных штамма для дальнейшего изучения их способности к нефтедеструкции.
2. Наибольшей скоростью роста и нарастанием биомассы среди выделенных нами термофильных бактериальных штаммов характеризуются штаммы A3-1 (*Geobacillus stearothermophilus*), A7-1-2 (*Anoxybacillus* sp.) (Азербайджан) и YN2 (*Geobacillus jurassicus*) (Ямал) – 0,6–0,8 суток для наиболее быстро разлагаемого субстрата – ацетата натрия. Средней скоростью роста – штаммы L2-1 (*Geobacillus thermodenitrificans*), L2-2, L2-3 (*Aeribacillus* sp.) (г. Луга), K2-2, K6 (*Aeribacillus* sp.) (г. Кудрово) – 1,5–2,5 суток для ацетата натрия. Штаммы P2-2 (*Aeribacillus* sp.), P6-1



- (*Parageobacillus thermoglucosidasius*), P8-2 (*Aeribacillus* sp.) (г.Пушкин) характеризуются медленным ростом (на ацетате натрия – до 5 суток), но длительно сохраняют его стабильность в условиях повышенных температур.
3. Установлено, что несмотря на филогенетическое сходство, наблюдается выраженное влияние среды на жизнедеятельность почвенных термофильных микроорганизмов. Наиболее быстрорастущие термофильные нефтеразлагающие бактерии обнаружены в регионах с контрастным континентальным климатом, средне- и медленно растущие – в регионах умеренного климата.
  4. На основе исследований бактериальных метагеномов нефтезагрязненных грунтов Санкт-Петербурга и Ленинградской области до рода получены данные о составе микробных сообществ почвогрунтов в зависимости от уровня нефтезагрязнения, и доле (численной распространенности) отдельных групп и родов бактерий. Показано, что при уровне загрязнения 2,67% доминируют рода анаэробных бактерий *Caloribacterium* (19,5%), *Proteiniphilum* (15,36%), тогда как в контроле доминирование отдельных групп не выражено (численность представителей отдельных родов не превышает 3,7% от бактериального сообщества).
  5. С повышением уровня загрязнения нефтью и ее производными в микробных сообществах антропогенно измененных почвогрунтов железной дороги происходит увеличение доминирования отдельных групп и родов бактерий и снижение выравненности и разнообразия бактериальных сообществ, судя по индексам Симпсона, Шеннона, Маргалефа и Пиелу. По совокупности экологических показателей наблюдается негативное изменение состояния микробных сообществ, начиная с уровня загрязнения нефтепродуктами 1,91 масс %.
  6. Показано, что при увеличении содержания нефтепродуктов 1,91 масс % и выше в почвогрунтах возрастает доля термофильных представителей микробных сообществ (род *Caloribacterium*), а в диапазоне концентраций нефтепродуктов 0,15–1,91 масс % в микробных сообществах почвогрунтов наблюдается возрастание доли родов бактерий, в которых присутствуют термофильные виды (род *Mycobacterium*), в сравнении с сообществами в контрольном незагрязненном образце почвогрунта и в образцах с загрязнением ниже 0,15 масс %.
  7. С помощью молекулярно-генетических методов в исследуемых почвогрунтах выявлены культивируемые анаэробные термофильные бактерии, составляющие значительную часть бактериального сообщества, перспективные для выделения и дальнейшего изучения в лабораторных условиях (*Caloribacterium* sp.).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК (Scopus, Q4):*

1. Журавлева А.С., Лабутова Н.М., Андронов Е.Е. Влияние нефтезагрязнения на микробоценоз почв, прилегающих к нефтехранилищу // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. № 4. С. 60–68. DOI: 10.17816/ecogen15460-68.
2. Журавлева А.С., Волкова Е.Н., Галушко А.С. Термофильные аэробные органогетеротрофные бактерии антропогенно измененных территорий Санкт-Петербурга и Ленинградской области // Экологическая генетика. 2021. Т. 19. № 1. С. 47–58. DOI: 10.17816/ecogen50901.
3. Галушко А.С., Ибряева С.К., Журавлева А.С., Панова Г.Г., Якоб Я.Х. Умеренно термофильная хемоорганогетеротрофная бактерия из поверхностного слоя антропогенного грунта промышленной зоны г. Аль-Мафрак, Иордания // Экологическая генетика. 2021. Т. 19. №3. С. 209–217. DOI: <https://doi.org/10.17816/ecogen70759>.

*Публикации в прочих научных изданиях (тезисы, краткие сообщения):*

1. Журавлева А.С., Панова Г.Г. Термофильные бактерии-нефтедеструкторы как перспективные агенты ремедиации нефтезагрязненных почв в условиях жаркого климата. В сборнике: Материалы восемнадцатой международной научной конференции. Оргкомитет конференции: Чистяков К.В., Куриленко В.В., Трофимов В.Т., Изосимова О.С., Подлипский И.И., Зеленковский П.С., 2018. С. 178–179.
2. Журавлева А.С., Акимов В.Н., Раттай Т., Панова Г.Г., Галушко А.С. Термофильные аэробные бактерии в почвах Апшеронского полуострова (Азербайджан). В сборнике: Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего. Материалы II Международной научной конференции посвященной памяти академика Е. И. Ермакова. 2019. С. 242–246.
3. Волкова Е.Н., Здоровцева А.Г., Галушко А.С., Журавлева А.С., Панова Г.Г. Поиск термофильных нефтеразрушающих почвенных бактерий на месте несанкционированной свалки на окраине г. Санкт-Петербурга. В сборнике: Зыкинские чтения. Материалы национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Л.Ф. Зыкина. Под редакцией О.С. Ларионовой, И.А. Сазоновой. Саратов, 2020. С. 41–46.
4. Журавлева А.С., Галушко А.С. Термофильные аэробные почвенные бактерии из регионов с контрастным климатом. В сборнике: Интеллектуальный потенциал молодых ученых как драйвер развития АПК. Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и обучающихся. Санкт-Петербург, 2021. С. 19–21.
5. Журавлева А.С., Андронов Е.Е., Галушко А.С. Разнообразие бактериального сообщества нефтезагрязненных почвогрунтов Санкт-Петербурга на основе метагеномных исследований. В сборнике: Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего. Материалы III международной научной конференции. 2021. С. 115–118.
6. Журавлева А.С., Галушко А.С., Андронов Е.Е. Термофильные нефтеразлагающие почвенные бактерии антропогенно загрязненных территорий Санкт-Петербурга и Ленинградской области. 3-й Российский микробиологический конгресс (г. Псков, 26 сен. – 1 окт 2021 г.): материалы конгресса/ ред кол. Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Пименов Н.В.; сост.: Пименов Н.В., Бонч-Осмоловская Е.А., Ильина Н.А., Антал Т.К. Серова О.А., Фролов В.В., Бугеро Н.В. – Псков: Псковский государственный университет, 2021. – 296с. – Режим доступа: <https://lib.pskgu.ru/page/d1f45f6d-f629-4fa1-94fd-6449031c1269>. С. 50.