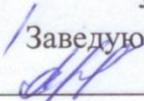


Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
/ Заведующий кафедрой
 Т. Г. Волова

« 19 » июля 2017 г.

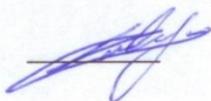
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ
НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Руководитель  профессор, д-р биол. наук С.В. Прудникова

Выпускник



Д.А. Шевчук

Красноярск 2017

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа на тему «МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ» содержит 42 страницы текстового документа, 28 рисунков, 1 таблица, приложение и 45 использованных источников.

Ключевые слова: НЕФТЕПРОДУКТЫ, МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ, УГЛЕВОДОРОД ОКИСЛЯЮЩИЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Актуальностью данной работы является микробиологический контроль почв на территориях, загрязненных нефтепродуктами, чтобы при необходимости проводить дополнительную обработку почвы штаммами углеводородоокисляющих бактерий.

Цель работы: изучение микрофлоры образцов почв с территории АЗС г. Красноярска, загрязненных нефтепродуктами.

Задачи:

1. Определить общую численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве в районе автозаправочных станций г. Красноярска и провести сравнительный анализ с контрольным незагрязненным участком.
2. Оценить разнообразие микроорганизмов в нефтезагрязненных почвах, выделить чистые культуры бактерий.
3. Идентифицировать выделенные чистые культуры бактерий, из почв загрязненных нефтепродуктами.

Была выявлена зависимость показателей численности микроорганизмов в почвенных образцах от расстояния до сливной горловины на автозаправочном комплексе. Также было отмечено негативное влияние углеводородов нефти на рост микроорганизмов почвы и ингибирование роста микромицетов.

Были выделены штаммы микроорганизмов, которые можно рекомендовать для биоремедиации почвы, загрязненной нефтепродуктами, так как они оказались наиболее устойчивы к воздействию углеводородов нефти и могут участвовать в деградации нефтепродуктов.

Содержание	
Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	6
1.1. Характеристика углеводов как компонентов нефти и их воздействие на окружающую среду.....	6
1.2. Влияние нефтяного загрязнения на микробиологические процессы в почве	9
1.3. Углеродокисляющие микроорганизмы	11
1.4. Принципы видовой идентификации микроорганизмов	12
1.5. Биоремедиация нефтезагрязненных почв	14
2. Объекты и методы исследования.....	17
2.1. Объект исследований.....	17
2.2. Характеристика контрольной почвы.....	18
2.3. Методы исследования и идентификации микроорганизмов.....	18
3. Результаты	22
3.1 Влияние нефтепродуктов на микрофлору почвы в образцах с территории автозаправочных станций	22
3.2 Влияние нефтепродуктов на микрофлору почвы при удалении от источника загрязнения	22
3.3 Видовое разнообразие бактерий в нефтезагрязненной почве	22
Выводы.....	23
Список использованных источников.....	24

Введение

В настоящее время к уже известным видам деградации почв (потеря гумуса, физическая деградация, накопление остатков пестицидов и их метаболитов) относят исключительно опасный фактор антропогенного воздействия – загрязнение нефтью и продуктами ее переработки.

Влияние предприятий нефтегазовой отрасли связано с выносом токсичных веществ при добыче, переработке, транспортировке сырья и продуктов переработки, которые могут влиять на почвенные экосистемы как локально, так и при переносе некоторых загрязнителей на значительные расстояния. При этом, длительное антропогенное влияние загрязняющих веществ оказывает неблагоприятное воздействие на формирование почвенных биоценозов, в том числе и микробных. (Пархоменко А. Н. 2011)

Нефтепродукты входят в список приоритетных химических загрязнителей среды и, по мнению ряда авторов, их накопление приводит к угнетению или полному ингибированию роста и развития большинства растений, почвы становится фитотоксичными.

Сейчас почти у каждого второго жителя, крупного города, имеется автомобиль, который требует заправки, и поэтому с каждым днем во всем мире появляется все больше и больше автозаправочных станций, эксплуатация которых усиливает загрязнение почв бензином и дизельным топливом.

Бензин – это смесь лёгких фракций углеводородов (температура кипения от 33 °С до 205 °С), которые окисляются под действием ферментов некоторых видов микроорганизмов и становятся доступным субстратом.

Известно, что бактерии играют решающую роль в самоочищении почвы от загрязнения углеводородами нефти, однако высокие концентрации нефтепродуктов могут ингибировать рост микрофлоры и подавлять процессы самоочищения. Поэтому актуальностью данной работы является микробиологический контроль почв на территориях загрязненных нефтепродуктами, чтобы при необходимости проводить дополнительную обработку почвы штаммами углеводородоокисляющих бактерий.

Целью данной работы являлось изучение микрофлоры образцов почв г. Красноярска, загрязненных нефтепродуктами.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Определить общую численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве в районе автозаправочных станций г.

Красноярска и провести сравнительный анализ с контрольным незагрязненным участком.

2. Оценить разнообразие микроорганизмов в нефтезагрязненных почвах, выделить чистые культуры бактерий.

3. Идентифицировать выделенные чистые культуры бактерий, из почв загрязненных нефтепродуктами.

1. Обзор литературы

1.1. Характеристика углеводородов как компонентов нефти и их воздействие на окружающую среду

Углеводороды – это органические соединения, молекулы которых состоят только из атомов углерода и водорода. Различают алифатические или ациклические углеводороды, в молекулах которых углеродные атомы образуют линейные или разветвленные "открытые" цепи (например, этан, изопрен), и циклические углеводороды, молекулы которых представляют собой циклы (кольца) из трех и более атомов углерода. Последние подразделяют на алициклические соединения (например, циклогексан) и ароматические соединения (например, бензол) Углеводороды имеют важное научное и практическое значение.

Во-первых, представления о строении и свойствах этих веществ служат основой для изучения органических соединений других классов, так как молекулы любых органических веществ содержат углеводородные фрагменты.

Во-вторых, знание свойств углеводородов позволяет понять исключительную ценность этих соединений как исходного сырья для синтеза самых разнообразных органических веществ, широко используемых человеком (Вредные химические вещества..., 1990).

Углеводороды содержатся в земной коре в составе нефти, каменного и бурого углей, природного и попутного газов, сланцев и торфа. К сожалению, запасы этих полезных ископаемых на Земле не безграничны. Однако до настоящего времени они расходуются в качестве топлива (двигатели внутреннего сгорания, тепловые электростанции, котельные) и лишь незначительная часть используется как сырье в химической промышленности. Так, до 85% всей добываемой нефти идет на получение горюче-смазочных материалов и лишь около 15% применяется как химическое сырье. Поэтому важнейшей задачей является поиск и разработка альтернативных источников энергии, которые позволят более рационально использовать углеводородное сырье (Грищенко, 1997). Нефть - это природная горючая маслянистая жидкость, которая распространена в осадочной оболочке Земли и является важнейшим полезным ископаемым. В ее состав входит смесь углеводородов самого разнообразного строения. Их молекулы представляют собой короткие и длинные, нормальные и разветвленные, замкнутые в кольца и много кольчатые цепи атомов углерода.

Путем перегонки из нее получают различные продукты нефти: бензин, реактивное топливо, осветительный керосин, дизельное топливо и мазут (Восстановление...,1988). Основу нефти составляют три группы углеводородов: метановые, нафтеновые и ароматические. Метановые углеводороды (алкановые или алканы) химически наиболее устойчивы, они относятся к предельным углеводородам и имеют формулу C_nH_{2n+2} . Если количество атомов углерода в молекуле колеблется от 1 до 4 (CH_4 - C_4H_{10}), они газообразны, от 5 до 16 (C_5H_{12} - $C_{16}H_{34}$) то это жидкие углеводороды, а если оно выше 16 ($C_{17}H_{36}$ и т.д.) - твердые (например, парафин).

Нафтеновые (циклановые, или алициклические) углеводороды имеют кольчатое строение, поэтому их иногда называют карбоциклическими соединениями. Все связи углерода с водородом здесь также насыщены, поэтому нафтеновые нефти обладают устойчивыми свойствами. К нафтенам относят углеводороды C_nH_{2n} (мононафтены), C_nH_{2n-2} и C_nH_{2n-4} (полинафтены). По сравнению с парафинами, нафтены имеют более высокую плотность, меньшую упругость паров и лучшую растворяющую способность. Ароматические углеводороды, или арены (C_nH_n), наиболее бедны водородом. Молекула имеет вид кольца с ненасыщенными связями углерода. Они так и называются - ненасыщенными, или непредельными углеводородами. Отсюда их неустойчивость в химическом отношении (Гаврилов, 1990).

Ароматические углеводороды нефти составляют от 5 до 55%. Это наиболее токсичные компоненты нефти, и при концентрации всего 1% в воде они убивают водные низшие растения. Нефть, содержащая 38% ароматических углеводородов, значительно угнетает рост и высших растений, а с увеличением ароматичности нефти возрастает их гербицидная активность. Содержание всех групп полициклических ароматических углеводородов при постепенной трансформации нефти в почве постепенно снижается. Ароматические углеводороды трудно поддаются разрушению, обычно медленно окисляясь микроорганизмами.

Кроме углеводородов в составе нефти имеются кислородные, сернистые и немного азотистые соединения. Нефть и газ в земных недрах могут встречаться как вместе, так и отдельно. Нефть включает в себя большую и сложную группу жидких, газообразных и твердых углеводородов, то есть соединения углерода и водорода. А также соединения азота, кислорода и серы. По свойствам нефть немного легче воды и практически в ней не растворяется (Buckley 1976).

Так как нефть – это жидкое природное ископаемое состоящее из большого числа высокомолекулярных углеводородов (УВ), то у нее нет определенной температуры кипения (Шамраев А.В. 2009). Цвет нефти также не определен. Он варьирует от светло-коричневой, почти бесцветной, до темно-бурой, почти черной, а по свойствам плотности - от легкой 0,65-0,70 г/см³, до тяжелой 0,98-1,05 г/см³. Различают легкую (0,65-0,87 г/см³), среднюю (0,871-0,910 г/см³) и тяжелую (0,910-1,05 г/см³) нефть. Теплота сгорания 43,7-46,2 МДж/кг (10400-11000 ккал/кг).

Нефть растворяется в органических растворителях. При обычных условиях в воде практически не растворяется, но может образовывать с ней стойкие эмульсии. Нефть и нефтепродукты относятся к наиболее распространенным поллютантам природной среды, вызывая существенные изменения в химическом составе, свойствах и структуре почвы (Илларионов, 2004).

Нефть является распространенным техногенным загрязнителем, при разливах которой на длительное время нарушается нормальное функционирование почвенной экосистемы, ухудшается почвенное плодородие и резко меняется интенсивность и направленность окислительно-восстановительных процессов. Поступление нефти в почву неоднозначно влияет на активность ферментов, которая может как усиливаться (Алиев, 1977), так и ослабевать в зависимости от дозы и вида загрязнителя и типа почвы, подвергшейся загрязнению.

По результатам исследования С.И. Колесникова с соавторами (2007), загрязнение чернозема нефтью (от 1 до 25% массы почвы) в большинстве случаев снижало активность почвенных ферментов. При относительно незначительном нефтезагрязнении (1%) уровень активности каталазы в почве с течением времени восстанавливался, а при существенном загрязнении (10%) увеличивался. По степени чувствительности к загрязнению почвы нефтью и нефтепродуктами исследованные ферменты указанные авторы предполагают расположить следующим образом: ферриредуктаза > каталаза > уреазы > инвертаза.

По их мнению, при нефтяном загрязнении изменяются окислительно-восстановительные условия в почве в сторону восстановительных, так как нефть и нефтепродукты заполняют поры, обволакивают частицы почвы, тем самым снижают воздухопроницаемость, создают анаэробные условия и уменьшают окислительно-восстановительный потенциал почвы. Более чувствительны к изменению окислительно-восстановительных условий

оксидоредуктазы (ферриредуктаза, каталаза), чем гидролазы (уреаза, инвертаза).

В многолетних полевых и лабораторных исследованиях Н.А. Киреевой с соавторами (2004) изучалось влияние различных концентраций нефти на общую численность почвенных бактерий и микроскопических грибов. Было установлено, что большая часть типов нефти негативно влияет на численность почвенных микроорганизмов при содержании нефтяных углеводородов более 10% массы почвы. Более низкие дозы загрязнителя способствовали росту численности бактерий и грибов вследствие бурного развития углеводородокисляющей микробиоты. Динамика численности микроорганизмов в этом случае не была связана напрямую с токсичностью почвы, а момент достижения исходной численности совпадал с завершением процесса разложения легкодоступных для микроорганизмов нефтяных фракций. В почве всегда содержится некоторое количество неустойчивых, чувствительных к нефтяному загрязнению видов микромицетов.

По мнению данных ученых, под воздействием нефтепродуктов в комплексе почвенных микроскопических грибов может увеличиваться доля условно-патогенных и аллергенных для человека видов, таких, как *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Paecylomyces variotii* и др. Нефтяное загрязнение может также способствовать накоплению в почве микроскопических грибов, вызывающих заболевания растений и выделяющих фитотоксины.

1.2. Влияние нефтяного загрязнения на микробиологические процессы в почве

Процесс естественного фракционирования и разложения нефти начинается с момента ее поступления на поверхность почвы. Выделяют три наиболее общих этапа трансформации нефти в почвах (Исмаилов и др., 1988):

1. физико-химическое и частично микробиологическое разложение алифатических углеводородов;
2. микробиологическое разрушение главным образом низкомолекулярных структур разных классов, новообразование смолистых веществ;
3. трансформация высокомолекулярных соединений; смол, асфальтенов, полициклических углеводородов.

Длительность всего процесса трансформации нефти в разных почвенно-климатических зонах различна: от нескольких месяцев до нескольких десятков лет (Бочарникова, 1990).

Загрязнение нефтью оказывает отрицательное воздействие на химические, физические и биологические свойства почв. Под влиянием нефти и ее компонентов изменяется численность микроорганизмов основных физиологических групп, ухудшаются агрофизические, агрохимические свойства почвы, снижаются активность окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов, обеспеченность почвы подвижными формами азота и фосфора.

На разложение нефти в почве решающим образом влияет функциональная активность комплекса почвенных микроорганизмов, обеспечивающих полную минерализацию нефти и нефтепродуктов до углекислого газа и воды. На первой стадии изменение почвенной биоты характеризуется массовой гибелью мезо- и микрофауны; на второй стадии – «бумом» микробиологической активности специализированных микроорганизмов и последующей постепенной эволюцией биоценоза, коррелирующей с постоянно изменяющейся геохимической ситуацией в почве (Логинов и др., 2000).

В работе Н. А. Киреевой показана токсичность ароматических углеводов для микроорганизмов почвы и их негативное воздействие на ферментативную активность. Наиболее чувствительными к загрязнению ароматическими углеводородами являются нитрифицирующие и целлюлозоразрушающие микроорганизмы, которые могут служить индикаторами загрязнения почв (Киреева, 1995).

Загрязнение нефтью существенно изменяет комплекс почвенных актиномицетов, снижая их численность и обедняя видовой состав. Кроме того, в загрязненной нефтью почве возрастает число фитопатогенных и фитотоксичных видов микроскопических грибов. Развитие фитотоксичных форм грибов может усилить отрицательное воздействие на почву нефтяного загрязнения (Киреева, 1996).

Показано, что загрязнение нефтью приводит к существенному (на два порядка) снижению численности гетеротрофной части микробного комплекса, отмеченного на начальных этапах воздействия нефти. Через три месяца происходит восстановление численности гетеротрофов (Сидоров и др., 1997).

Первоначально, в интервале концентраций нефти соответствующих зоне гомеостаза (до 1 мл/кг), она не оказывает существенного влияния на

почвенную микробиоту, выступает как биологический стимулятор. Более высокие дозы (зона стресса 1-30 мл/кг) приводят к необратимым изменениям микробиологических свойств почвы, а в дальнейшем, к нарушению её водно-воздушного режима. Затем, в зоне резистентности, она становится основным трофическим субстратом для углеводородоокисляющих микроорганизмов, одновременно угнетая жизнедеятельность других гетеротрофных микроорганизмов, растений и животных. Наконец, при ещё больших дозах, в зоне репрессии, нефть выступает как ингибитор биологической активности почвы (Левин и др., 1995).

Изменения микробиологических параметров почвы первыми рассматриваются как значимые экологические нарушения. Они зафиксированы при концентрациях нефти более 1-5 мл/кг в зависимости от типа почвы.

1.3. Углеводородоокисляющие микроорганизмы

Углеводородоокисляющие микроорганизмы широко распространены в природных экосистемах, так как способность к окислению углеводов связана с наличием ферментов группы оксидаз (Готтшалк, 1982; Мурзакова, 1992; Современная микробиология, 2005). Однако основной вклад в процесс микробиологического разрушения углеводов вносят микроорганизмы, способные использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника углерода и энергии. Такие микроорганизмы встречаются, главным образом, среди аэробных форм, они получили название «углеводородоокисляющие микроорганизмы» (Израэль, 1989; Кураков, 2006; Патин, 1997).

Углеводородоокисляющие микроорганизмы являются частью гетеротрофного сообщества и присутствуют как в загрязненных, так и в незагрязненных экосистемах (Барышникова 1994, Зайцева 2010, Милько 1991, Buckley 1976). От других гетеротрофных микроорганизмов они отличаются наличием комплекса ферментов, окисляющих углеводороды и способностью к поглощению гидрофобного субстрата.

Загрязнение биоценоза нефтью и нефтепродуктами вносит дополнительный источник углерода в экосистему, что стимулирует развитие данной группы бактерий (Шамраев 2009), поэтому в хронически загрязненных экосистемах, численность углеводородоокисляющих бактерий всегда выше по сравнению с не загрязненными, однако количественная связь между численностью углеводородоокисляющих бактерий и количеством

углеводородов в среде отсутствует (Ильинский 2000, Кураков 2006, Atlas 1991).

Таксономический состав почвенных углеводородоокисляющих микроорганизмов представлен, в основном, бактериями и грибами. Описано 22 рода бактерий, 19 родов дрожжей и 24 рода микроскопических мицелиальных грибов (Мурзакова 1992, Хомякова 2002, Atlas 1991).

Типичными обитателями почв являются виды родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Beierinckia*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas* и др. (Квасников 1968, Киреева 2000, Сидоров 1997, Сопрунова 2005, Ткебучаева 2004).

Известно, что состав доминирующих родов углеводородоокисляющих бактерий в биоценозах зависит от природы нефтепродукта. Так, Т.В. Коронелли (Коронелли 1996) указывает, что для загрязненных экосистем характерно доминирование видов рода *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Arthrobacter*.

В хронически загрязненных экосистемах безусловным доминантом являются *Rhodococcus*, а остальные виды занимают второстепенное положение (Бердичевская 1984, Belyaev 1993).

1.4. Принципы видовой идентификации микроорганизмов

Определение родовой и видовой принадлежности микроорганизмов основывается на результатах морфологических, физиологических и биохимических тестов. Кроме того, для идентификации некоторых видов микроорганизмов исследуют химический состав и строение клеточной стенки, серологические свойства, чувствительность к фагам и другие особенности клеток. В последние годы благодаря достижениям генетики и молекулярной биологии стало возможным применение новых подходов для идентификации бактерий. Определение возможности генетических скрещиваний, картирование хромосомы микроорганизмов, знание нуклеотидного состава и данные гибридизации нуклеиновых кислот, позволяют судить о филогенетической близости отдельных видов.

Характеристика физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов включает описание способности расти на различных питательных средах и вызывать определенные превращения веществ, входящих в состав этих сред. Чаще всего учитывают природу источника углерода и энергии, форму азотсодержащих соединений, отношение к кислороду, ферментативную активность при выращивании в присутствии

различных субстратов. В настоящее время разработано множество методических подходов к определению того или иного свойства бактерий, различающихся сложностью постановки.

Выявление каталазы проводят на предметном стекле в капле 5 % перекиси водорода. Стерильной бактериологической петлей вносят исследуемую культуру и тщательно перемешивают. При наличии каталазы происходит разложение перекиси водорода с выделением пузырьков кислорода.

Выявление оксидазы также проводят на предметном стекле. Бактериальную культуру снимают с агаризованной среды и вносят в каплю 1% раствора дигидрохлорида тетраметил-п-фенилендиамина. При положительной реакции в течение 1 мин развивается розово-красная окраска, также существуют другие методы определения наличия оксидазы.

Микроорганизмы характеризуются неодинаковой способностью использовать для поддержания своей жизнедеятельности различные источники углерода. Чтобы выяснить возможность развития микроорганизма за счет тех или иных углеродсодержащих веществ, испытываемые культуры высевают на среды, содержащие в качестве единственного источника углерода различные моно-, ди- и полисахариды, многоатомные спирты, органические кислоты, углеводороды. Из углеводов и многоатомных спиртов испытывают, как правило, следующие соединения: глюкозу, фруктозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу, маннозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу, глицерин, маннит и т. п.

Для определения способности микроорганизмов использовать углеводы и спирты применяют агаризованные синтетические или дифференциально-диагностические среды Гисса.

Многие микроорганизмы способны использовать в качестве питательных субстратов различные высокомолекулярные соединения: полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и др. Однако макромолекулы не могут проникать через цитоплазматическую мембрану и не используются микроорганизмами. Первоначально под действием гидролитических ферментов, которые выделяются микроорганизмами, они переходят в низкомолекулярные продукты, которые с помощью специализированных транспортных систем поступают в бактериальные клетки.

Для выявления гидролитической способности микроорганизмов в лабораторной практике используются специальные методы, суть которых заключается в следующем. Микроорганизмы выращивают в питательной

среде, которая содержит макромолекулярное соединение. Если клетки образуют экзоферменты, гидролизующие его, то вокруг колоний, образуется зона продуктов гидролиза.

Определение протеолитической активности заключается в выявлении протеаз, которые катализируют расщепление белков на поли- и олигопептиды. Активность последних определяют, используя в качестве субстратов, желатину, казеин и другие белки.

Большинство гетеротрофных микроорганизмов могут усваивать азот органических соединений (белков, пептонов, и др.). В процессе ферментативного гидролиза белка, выделяются аминокислоты, которые используются клеткой при анаболизме, а также подвергаются расщеплению в результате аэробного окисления или брожения до более простых соединений. В результате этого разложение белков микроорганизмами сопровождается выделением побочных продуктов: аммиака (при дезаминировании аминокислот); сероводорода при использовании серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин), индола при утилизации триптофана. Обнаружение подобных продуктов свидетельствует об использовании вышеперечисленных соединений.

Определение образования индола может быть проведено несколькими способами. Общий принцип заключается в определении одного из промежуточных продуктов разложения триптофана – индола. (Лысак, Желдакова 2002.)

1.5. Биоремедиация нефтезагрязненных почв

В последние годы в связи со значительной интенсификацией добычи нефти и производства нефтепродуктов значительные масштабы приобрел процесс отторжения земель из сельскохозяйственного использования.

Нефть и нефтепродукты являются приоритетными загрязнителями всех компонентов биосферы – почвенного покрова, растительности, поверхностных вод и атмосферного воздуха. Экологические последствия загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами зависят от параметров загрязнения, свойств почвы и характеристик внешней среды (Пиковский, 1993).

Загрязненная почва в результате резкого снижения биологической продуктивности и физико-химических свойств не способна полноценно выполнять свои экологические функции. В настоящее время всё большее значение приобретают методы биоремедиации нефтезагрязнённых земель.

Для биоремедиации используются различные бактериальные препараты, способные разрушать и потреблять загрязнения. Одним из наиболее перспективных направлений совершенствования процессов биоремедиации почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, является использование потенциала не только микробных, но и других природных сообществ разных трофических уровней и, в первую очередь, травянистых растений, которые могли бы не только удалять загрязнители, но и способствовать восстановлению потенциального плодородия почв.

Углеводороды нефти и их производные – природные химические вещества, широко используемые человеком. В связи с достаточно интенсивной добычей и переработкой нефти и нефтепродуктов они являются основными загрязнителями окружающей среды (Другов, Родин, 2000). В промышленно развитых странах загрязнение почвы сырой нефтью и нефтепродуктами является серьезной проблемой (Назаров и др., 2012). Во всем мире ежегодно теряется и попадает в окружающую среду около 45-50 млн. т нефти и нефтепродуктов, в России – 3 млн. т (1,2 % от объема добычи нефти) (Бурлака, 2006; Мещеряков, 2012).

При ремедиации почв, загрязненных нефтью и продуктами ее переработки, используют физические, химические и биологические методы, а также их сочетания.

Физические методы удаления загрязнения (сбор, удаление и захоронение нефти и сильно загрязненной почвы, промывка почвы водой под давлением, землевание, мульчирование слоем почвы, термообработка и др.) не способствуют восстановлению плодородия почв и могут нанести дополнительный ущерб окружающей среде (Подалов, 2010).

Химическая обработка путем экстракции растворителями или окислением изменяет агрохимические характеристики почвы и грунтовых вод. Сжигание загрязненных почв дополнительно вызывает загрязнение атмосферы.

В настоящее время, с повышением внимания к охране окружающей среды, биоремедиация все активнее используется для очистки загрязненных почв. Биологическая очистка обычно обеспечивает преобразование загрязнителя в нетоксичные формы, используя микробиологические процессы и может приводить к полной минерализации углеводородов до диоксида углерода и воды.

Многие технологии биоремедиации нефтезагрязненных почв предлагают проводить интродукцию микроорганизмов, специализирующихся на разложении имеющихся углеводородов, однако в

некоторых случаях интродуцированные микроорганизмы не выдерживают конкуренции с почвенной микробиотой. К тому же, концентрации субстрата в окружающей среде могут быть слишком низкими, чтобы поддерживать рост введенных штаммов или интродуцированные микроорганизмы могут игнорировать целевой загрязнитель, если присутствуют другие субстраты. В некоторых случаях инокуляция микроорганизмов для очистки почвы от углеводов нефти только дополнительно увеличивает стоимость биоремедиации и не дает никакой выгоды.

Поэтому активно разрабатываются технологии биоремедиации, основанные на стимулировании аборигенной микробиоты загрязненной почвы, способной разлагать загрязняющие вещества (Градова, 2007). Данные технологии ремедиации предполагают необходимость создания оптимальных условий для микробного разложения углеводов: создание аэробных условий, обеспечение доступными питательными веществами, определенной влажности почвы, pH, температуры и др. (Atlas 1991). Для улучшения естественной способности почвенных микроорганизмов расщеплять углеводороды нефти, были предложены и проверены многие методы: рыхление, орошение; известкование или гипсование; внесение удобрений, поверхностно-активных веществ, ферментов или ко-субстратов; добавление сорбентов; внесение структурообразователей; фитомелиоративные мероприятия и др. (Подалов, 2010).

Все эти процедуры активируют естественные биологические, химические и физические процессы трансформации и удаления органических загрязнителей, протекающие в почве.

2. Объекты и методы исследования

2.1. Объект исследований

Объектом исследований являлись почвенные микроорганизмы, выделенные с территорий автозаправочных станций, располагающихся на территории города Красноярска и его окрестностях (рис. 1).

Материалом для выделения служили образцы почвы, взятые с площади резервуарного парка (рис. 2) и почва, взятая вблизи сливных колодцев на расстоянии 1, 5 и 10 метров от сливной горловины.

[Изята 1 страница]

В качестве контроля были взяты образцы серой лесной почвы в районе Академгородка (рис. 3).

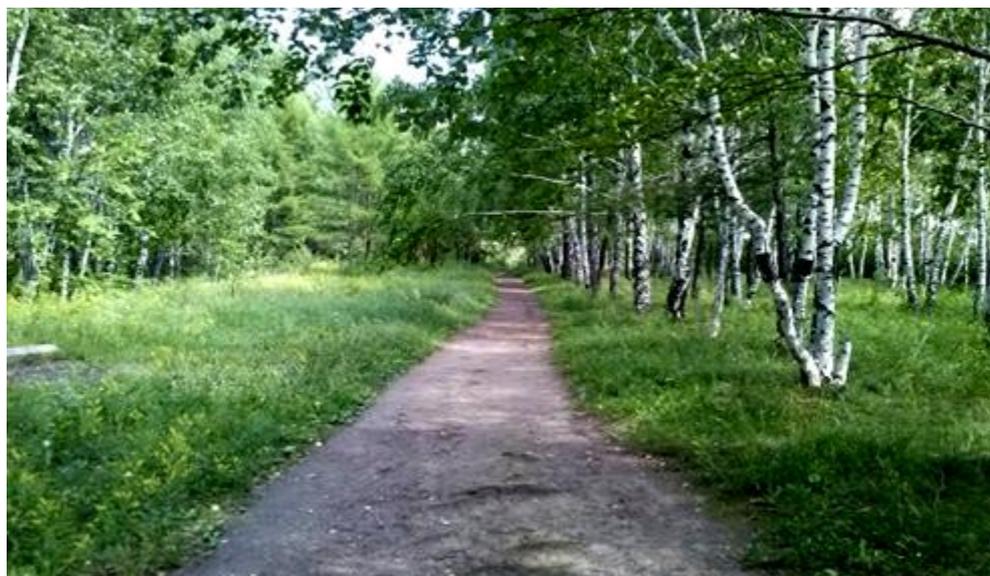


Рисунок 3 – Лес Академгородка г. Красноярск

2.2. Характеристика контрольной почвы

В работе использовали серую лесную почву, собранную в районе Академгородка г. Красноярска. Физические свойства серых лесных почв определяются, механическим составом, характером поглощающего комплекса, содержанием гумуса. От этих показателей зависит структура почв, их водный и воздушный режим, сложение. Результаты исследования почвы до опытов и содержание в ней углерода, карбонатов, суммы обменных оснований, подвижные формы железа и алюминия представлены в таблице 1 (Воробьева и др., 2012.). В целом физические свойства серых лесных почв следует считать в агрономическом отношении вполне удовлетворительными.

Химические свойства серых лесных почв отражают условия их формирования. Описываемые почвы имеют слабокислую реакцию почвенного раствора, не очень высокую насыщенность почв основаниями, пониженное количество илистых частиц в горизонте, малое содержание карбонатов, железа и алюминия.

Таблица 1 – Физико-химический состав исследуемой почвы

Место отбора, глубина	C, %	СО ₂ карбонатов, %	pH водный	pH солевой	∑ обм.ос нов., мг*экв/100 г почвы	Fe ₂ O ₃ , мг/100 г почвы	Al ₂ O ₃ , мг/100 г почвы	Kw,
АК-02, 20 см	0	2,06	6,6	-	11	2,5	0,00	0,97
АК-03, 20 см	0,27	4,09	6,4	-	12	2,35	0,01	0,96
ЛЛ-01, 20 см	0	4,46	6,1	-	13,2	2,7	0,05	0,97

2.3. Методы исследования и идентификации микроорганизмов

В работе использовали общепринятые методы почвенной микробиологии (Нетрусов, 2005). Общую численность микроорганизмов определяли на агаризованных питательных средах: аммонификаторы на рыбо-пептонном агаре (РПА), прототрофов на крахмало-аммиачном агаре (КАА), для выделения микромицетов использовали среду Сабуро, среду

Эшби – для выделения аэробных азотфиксаторов. Высев почвенной суспензии на чашки Петри с агаризованной средой проводили из разведений 4-6 в 3-х повторностях. Инкубировали чашки при температуре 30 °С для учета бактерий и 25 °С для учета грибов. Анализ микрофлоры почвенных образцов проводили на 5-7-е сутки.

Для выделения чистых культур отбирали изолированные колонии микроорганизмов и отсевали их на скошенный питательный агар (рис. 4)

Изучение фенотипических признаков почвенных микроорганизмов проводили стандартными микробиологическими методами.

При идентификации бактериальных изолятов проводили сравнительный анализ их морфологических, культуральных, биохимических свойств. Определяли морфологию вегетативных клеток, спорообразование, подвижность, грампринадлежность, каталазную, оксидазную, амилазную и протеиназную активность, образование кислоты из глюкозы, лактозы, сахарозы, мальтозы и маннита.



Рисунок 4 – изолированные колонии микроорганизмов отсеваемые на скошенный питательный агар

Принадлежность изучаемых культур к группе грамположительных или грамотрицательных бактерий определяли экспресс-методом Грезерсона. Клетки культур помещали бактериологической петлей в каплю 3%-го раствора КОН на предметное стекло, размешивали круговыми движениями и через 5-6 секунд петлю поднимали. Суспензия грамотрицательных бактерий становилась вязкой и тянулась за петлей. Грамположительные бактерии равномерно распределялись в капле щелочи. Реакцию считали отрицательной, если образование слизистых тяжей не наблюдалось в течение 60 секунд.

При изучении физико-химических свойств культур, определяли их способность продуцировать каталазу. С помощью бактериологической петли клетки культур перенесли на предметное стекло. Поместили одну каплю 3%

раствора пероксида водорода на материал на предметном стекле. Положительная реакция проявлялась быстрым появлением пузырьков газа. При отрицательной реакции в течение 20 секунд выделение газа не происходило.

Для выявления амилолитической активности использовали среду следующего состава (г/л): пептон – 10.0; K_2HPO_4 – 5.0; растворимый крахмал – 2.0; агар – 15.0; pH среды 6,8 – 7.0. Среду стерилизовали при температуре 121 °С 30 минут и разлили в стерильные чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом по диаметру чашки. Продолжительность культивирования составила 7 суток, при температуре 30°C. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой поверхности раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливали 3-5 мл раствора Люголя, после чего среда окрашивалась в синий цвет, а зоны гидролиза крахмала приобретали красно-бурую окраску (рис. 5).

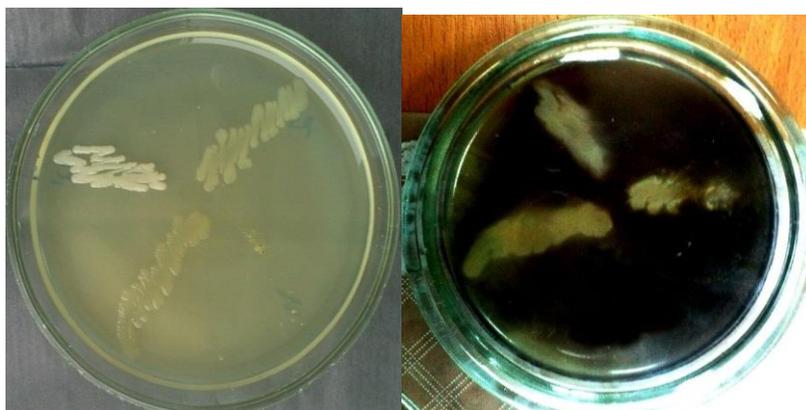


Рисунок 5 – Тест на амилазную активность

Так же изучали протеолитическую активность. Для этого культуры высевали на мясопептонную желатину (МПЖ). К 100 мл мясопептонного бульона (МПБ) добавили 15 г желатины, оставили на 15 минут, чтобы она набухла, затем нагрели на водяной бане до полного растворения желатины и разлили в пробирки по 10 мл. Стерилизовали при температуре 121 °С 15 минут. Посев проводили уколом. Продолжительность культивирования составило 10 суток при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечали визуально.

Оксидазную активность выделенных изолятов бактерий определяли с помощью тест-полосококситест (MIKRO-LA-TEST) (рис. 6).



Рисунок 6 – Оксидазная активность: а – отрицательная;
б – положительная.

Способность исследуемых культур ферментировать углеводы изучали на универсальных средах Гисса. В состав этих сред входят: панкреатический гидролизат кильки, индикатор и различные углеводы (глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, манит). Среду готовили следующим образом – 15 грамм препарата размешивали в 1 литре дистиллированной воды, кипятили до полного растворения. Разлили в стерильные пробирки. Засев проводили уколом, культивировали в течение 3 дней. Визуально отмечали образование газа и кислоты (рис. 7).

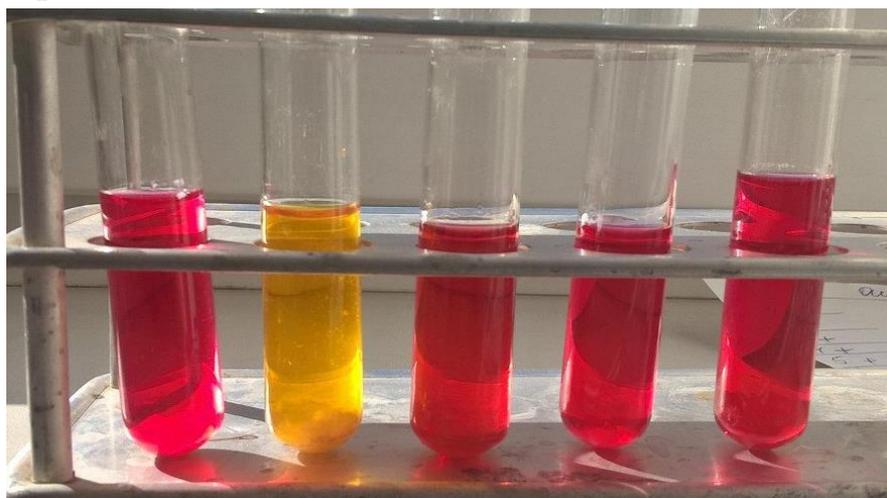


Рисунок 7 – Рост бактерий на среде Гисса с образованием кислоты

3. Результаты

3.1 Влияние нефтепродуктов на микрофлору почвы в образцах с территории автозаправочных станций

Были проведены исследования почвенной микрофлоры в образцах почвы, загрязненных нефтепродуктами, взятых с территории АЗС, в сравнении с незагрязненным контрольным участком – почвой в районе Академгородка.

[Изъято 3 страницы]

В целом, снижение численности микроорганизмов может быть связано с проявлением длительного токсического действия нефтепродуктов на микрофлору.

3.2 Влияние нефтепродуктов на микрофлору почвы при удалении от источника загрязнения

Провели исследования микрофлоры на загрязненных участках почвы, находящихся на разном расстоянии от сливных колодцев – 1 м, 5 м и 10 м. Согласно расчетам количества бактерий загрязненной почвы (рис. 13): численность всех групп бактерий на разных опытных участках различалась. В качестве контроля в данном эксперименте использовали образец почвы, взятый на расстоянии 10 метров от сливного колодца

[Изъята 1 страница]

3.3 Видовое разнообразие бактерий в нефтезагрязненной почве

Из почвы, собранной с площади резервуарного парка и вблизи сливных колодцев на расстоянии 1, 5 и 10 метров от сливной горловины, были получены культуры бактерий на питательной среде.

Через 7 суток были выделены доминирующие бактерии, всего в чистые культуры было выделено 20 штаммов бактерий. Все штаммы были идентифицированы по совокупности морфологических, культуральных и биохимических признаков.

[Изъято 9 страниц]

Выводы

1. Численность всех исследованных групп бактерий в образцах почв АЗС, загрязненных нефтепродуктами, была снижена в 4,5-150 раз в сравнении с контрольным незагрязненным образцом. Наибольшее негативное влияние углеводороды оказали на рост микромицетов.

2. Вблизи сливного колодца (1 м) численность бактерий и грибов уменьшалась по сравнению с контролем. Однако, с удалением от источника загрязнения был отмечен стимулирующий эффект нефтепродуктов на рост бактерий.

3. Из загрязненной нефтепродуктами почвы было выделено 20 штаммов чистых культур бактерий.

4. Доминирующие колонии микроорганизмов принадлежали к следующим родам: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Agromyces*. Представители данных родов обладают потенциально способностью к окислению углеводородов, и выделенные штаммы данных бактерий можно рекомендовать для биоремедиации почв АЗС, загрязненных нефтепродуктами.

Список использованных источников

1. Вредные химические вещества. Углеводороды. Галогенпроизводные углеводородов: Справ. изд. / А.Л. Бандман – Л.: Химия, 1990. – 732 с.
2. Пархоменко, А. Н. Влияние загрязнения нефтепродуктами и серой на микрофлору почв аридной зоны: автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.08 / Пархоменко Анна Николаевна. – Уфа, 2011 – 26 с.
3. Грищенко, А.И. Экология. Нефть и газ. / А.И. Грищенко, Г.С. Акопова, В.М. Максимов. – М.: Наука, 1997. - 598 с.
4. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем: сб. ст. – М.: Наука, 1998. – С. 222-230.
5. Гаврилов, В.П. Черное золото планеты. 2-е изд., перераб. и доп. / В.П. Гаврилов. – М.: Недра, 1990. – 160 с.
6. Иларионов, С.А. Роль микромицетов в фитотоксичности нефтезагрязненных почв / С.А. Иларионов, А.В. Назаров, И.Г. Калачникова // Экология. – 2004. – №5. – С. 341-346.
7. Алиев, С.А. Рекомендации по рекультивации нефтезагрязненных земель / С.А. Алиев, Д.В. Гвозденко, М.П. Бабаев, Д.А. Гаджиев. - Баку: Элм, 1981. - 26 с.
8. Исмаилов, Н.И. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель / Н.И. Исмаилов, Ю.И. Пиковский // В сб. "Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем". - М.: Наука, 1988. - С. 222-236.
9. Бочарникова, Е.Д. Влияние нефтяного загрязнения на свойства серо-бурых почв Апшерона и серых лесных почв Башкирии / Е.Д. Бочарникова. - М.: Наука, 1990. - 160 с.
10. Логинов, О.Н. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений / О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова. – Уфа: Гос. изд. научно-тех. литературы «Реактив», 2000. – 100 с.
11. Киреева, Н.А. Состояние комплекса актиномицетов нефтезагрязненных почв / Н.А. Киреева // Вестник Башкирского университета, 1996. - № 1. - С. 42-45.
12. Киреева, Н.А. Влияние загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами на численность и видовой состав микромицетов / Н.А. Киреева, Н.Ф. Галимзянова // Почвоведение, 1995. - №2. - С. 211-216.

13. Сидоров, Д.Г. Полевой эксперимент по очистке почв от нефтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов / Д.Г. Сидоров, И.А. Борзенков, Р.Р. Ибатулин, Е.И. Милехина, И.Т. Храмов, С.С. Беляев, М.В. Иванов // Прикладная биохимия и микробиология, 1997. - Т.33. - №5. - С. 497-502
14. Левин, С.В. Эколого-микробиологическое нормирование содержания нефти в почве / С.В. Левин, Э.М. Халимов, В.С. Гузев // Токсикологический вестник, 1995. - №1. - С. 11-15.
15. Пиковский, Ю.И. Природные и техногенные потоки углеводородов в окружающей среде / Ю.И. Пиковский. - М.: изд-во МГУ, 1993. – 208 с.
16. Другов, Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов / Ю.С. Другов, А.А. Родин. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. – 270 с.
17. Подавалов, Ю.А. Экология нефтегазового производства. / Ю.А. Подавалов. – М.: Литрес, 2014.
18. Гоголева, О.А. Углеводородокисляющие микроорганизмы природных экосистем / О.А. Гоголева, Н.В. Немцева // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН, 2012. – №. 2.
19. Готтшалк, Г. Метаболизм бактерий: учебное пособие / Г. Готтшалк. - М.: Мир, 1982.
20. Мурзакова, Г.Б. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий: Обзорная информация / Г.Б. Мурзакова, М.Б. Битеева, Г.Н. Морщакова // М.: НИИСЭНТИ, 1992.
21. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах.: Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005.
22. Израэль, Ю.А. Антропогенная экология океана / Ю.А. Израэль, А.В. Цыбань. - Л.: Гидрометеиздат, 1989.
23. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях / А. В. Кураков [и др.]. - М.: Графикон. – 2006. – 408 с.
24. Патин, С.А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа / С.А. Патин. - М.: Изд-во ВНИРО, 1997.
25. Барышникова, Л.М. Глюкозный эффект в регуляции транспорта глюкозы клетками *Rhodococcus minimus*. / Л.М. Барышникова, Н.А. Черемис, Е.Л. Головлев // Микробиология, 1994. – Т. 3. – С. 405- 410
26. Зайцева, Т.А. Микроорганизмы – деструкторы нефти. / Т.А. Зайцева, Л.В. Рудакова, М.М. Комбарова, К.С. Баранова // Научные исследования и инновации, 2010. - Т. 4. - № 4. – С. 59-63.

27. Милько, Е.С. Гетерогенность популяций бактерий и процесс диссоциации (корине- и нокардиоподобные бактерии) / Е.С. Милько, Н.С. Егоров - М.: Изд.-воМГУ, 1991.
28. Buckley, E. N. Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: relationship of hydrocarbon utilization to ambient hydrocarbon concentrations / E.N. Buckley, R.V. Jonas, F.K. Pfaender // *Applied and Environmental Microbiology*, 1976. – Т. 32. – №. 2. – С. 232-237.
29. Шамраев, А.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А. В. Шамраев, Т. С. Шорина // *Вестник Оренбургского государственного университета*, 2009. – №. 6. – С. 642-645.
30. Ильинский, В.В. Гетеротрофный бактериопланктон: экология и роль в процессах естественного очищения среды от нефтяных загрязнений : автореф. дис. ... докт. биол. наук. / Ильинский Владимир Викторович. - М. МГУ, 2000.
31. Atlas, R.M. Microbial hydrocarbon degradation bioremediation of oil spills / R.M. Atlas // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1991. – Т. 52. – №. 2. – С. 149-156.
32. Мурзакова, Г.Б. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий: Обзорная информация / Г.Б. Мурзакова, М.Б. Битеева, Г.Н. Морщакова - М.: НИИСЭНТИ, 1992.
33. Хомякова, Д.В. Углеводородокисляющая микробиота нефтезагрязненных почв района Крайнего Севера: Биоразнообразие восстанавливаемых территорий (под ред. Капелькиной Л.П.) / Д.В. Хомякова, И.В. Ботвинко, А.И. Нетрусов. - СПб: Наука, 2002. – С. 15-30.
34. Квасников, Е.И. Некоторые закономерности распространения микроорганизмов, усваивающих углеводороды, в почвах нефтяных месторождений / Е.И. Квасников, И.П. Кривицкий // *Микробиология*, 1968. - Т. 37. - Вып.2. - С. 321-326.
35. Киреева, Н.А. Фенолоксидазная активность нефтезагрязненных почв / Н.А. Киреева, Г.Ф. Ямалетдинова // *Вестник Башкирского университета*, 2000. - № 1. – С. 48-51.
36. Сидоров, Д.Г. Полевой эксперимент по очистке почв от нефтяного загрязнения с использованием углеводородокисляющих микроорганизмов / Д.Г. Сидоров, И.А. Борзенко, Р.Р. Ибатуллин // *Прикладная биохимия и микробиология*, 1997. – Т. 33. – №. 5. – С. 497-502
37. Сопрунова, О.Б. Циано-бактериальные сообщества в биодеградациии нефтяных углеводородов в почвах / О.Б. Сопрунова // *Электронный журнал "Исследовано в России"*, 2005. – Т. 94. – С. 991-998.

38. Ткебучава, Л.Ф. Углеводородоокисляющие и сульфатредуцирующие бактерии грунтов Можайского водохранилища / Л.Ф. Ткебучава // Водные ресурсы, 2004. – Т. 31. – №. 5. – С. 606-606.
39. Коронелли, Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде / Т. В. Коронелли // Прикладная биохимия и микробиология, 1996. – Т. 32. – №. 6. – С. 579-585.
40. Бердичевская, М. В. Свойства и видовой состав родококков пластовых вод Пермского Прикамья, окисляющих углеводороды / М. В. Бердичевская [и др.] // Журн. микробиол., 1984. – Т. 4. – С. 681-685.
41. Belyaev, S. S. Halotolerant and extremely halophilic oil-oxidizing bacteria in oil fields / S. S. Belyaev [et al.] // Developments in Petroleum Science, 1993. – Т. 39. – С. 79-88.
42. Методы выделения, изучения и культивирования микроорганизмов: учебно - методическое пособие / Т.И.Громовых [и др.]. – Красноярск: 2002.
43. Лысак, В.В. Микробиология. / В.В. Лысак, Р.А. Желдакова. – Минск: Изд-во БГУ, 2002.
44. Ильин, Л.А. Вредные химические вещества. Радиоактивные : Справочное издание вещества / Л.А. Ильин, В.А Филлов;. – Л.: Химия, 1990.
45. Шамраев, А.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А.В. Шамраев, Т.С. Шорина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 6.
46. Воробьева, Л. А. Химический анализ почв / Л.А. Воробьева [и др.] // Вопросы и ответы, 2012.

Приложение А (обязательное)

Таблица 1 - Фенотипические свойства бактерий, выделенных из почвенных образцов

Признаки	DK-1	DK-2	DK-3	DK-4	DK-5	DK-6	DK-7	DK-8	DK-9	DK-10
Каталаза	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Оксидаза	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Амилаза	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Протеаза	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
Образование кислоты из										
Лактозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Мальтозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сахарозы	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
Глюкозы	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
Маннита	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Палочки/Кокки	п	к	к	п	к	п	п	п	к	п
Подвижность	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Спорообразование	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Грампринадлежность	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+

Продолжение приложения А

Признаки	DK-11	DK-12	DK-13	DK-14	DK-15	DK-16	DK-17	DK-18	DK-19	DK-20
Каталаза	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Оксидаза	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
Амилаза	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Протеаза	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Образование кислоты из										
Лактозы	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Мальтозы	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сахарозы	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
Глюкозы	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
Маннита	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Палочки/Кокки	к	к	к	к	п	п	к	к	п	к
Подвижность	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Спорообразование	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Грампринадлежность	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+