

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМІВ АЛКАНОТРОФНИХ НОКАРДІОПОДІБНИХ АКТИНОБАКТЕРІЙ, ЩО ЗАСВОЮЮТЬ МОТОРНІ МАСТИЛА

*Виявлено здатність вуглеводеньокислюючих штамів нокардіоподібних актинобактерій засвоювати вуглеводневі компоненти моторних мастил. Встановлено, що найбільш активними штамми-деструкторами мастил є представники видів *Gordonia rubropertinctus* і *Rhodococcus erythropolis*. Досліджено динаміку росту активних штамів на мінеральних середовищах з мастилами та наведено їх характеристику. Селекціоновані високоактивні штами гордоній перспективні для використання в очищенні забруднених моторними мастилами середовищ та матеріалів.*

Відомо, що нокардіоподібні актинобактерії родів *Gordonia*, *Rhodococcus* і *Dietzia* широко використовуються в біотехнологіях очищення докільця від нафти та нафтопродуктів [1-3]. Вказані мікроорганізми розповсюджені в забруднених нафтою екосистемах і відіграють значну роль у самоочищенні природних середовищ від цихксенобіотиків, що пояснюється метаболічними

особливостями даних бактерій і їх стійкістю до несприятливих умов існування [4-6]. Основною перевагою вуглеводеньокислюючих штамів родів *Gordonia*, *Rhodococcus* і *Dietzia* є те, що вони добре адаптовані до використання відновлених нерозчинних субстратів, у першу чергу, n-алканів C₅-C₂₂, здатні утворювати екологічно нешкідливі біосурфактантні комплекси, стійкі до голодуван-

ня, широкого діапазону кислотності й низьких температур [6, 7].

Значною екологічною проблемою є очищення природного середовища від нафтових мастил, основою яких є багатоконпонентна суміш висококиплячих вуглеводнів. Відпрацьовані мастила забруднюють довкілля сполуками, які згубно впливають на ґрунтову біоту, вищі рослини, а у високих концентраціях призводять до загибелі живих організмів. До складу моторних мастил як різновиду нафтових мастил входять від 10 до 30 % різноманітних стабілізаторів та присадок, що містять високотоксичні речовини (алкілсаліцилати та алкілдітіофосфати металів, похідні фенолу, бензотріазолу та інші сполуки), які утруднюють їхню мікробну утилізацію. Здатність мікроорганізмів проводити деструкцію моторних мастил майже не досліджена [8, 9].

Враховуючи наведене, метою даного дослідження було вивчення здатності штамів алканотрофних нокардіоподібних актинобактерій до утилізації вуглеводневих компонентів моторних мастил та визначення особливостей їх росту на цих субстратах.

Матеріали та методи дослідження

Було використано 161 штам нокардіоподібних актинобактерій, що належать до видів *D. maris* (7 шт.), *G. rubropertinctus* (40 шт.), *R. erythropolis* (52 шт.), *R. fascians* (31 шт.), *R. longus* (13 шт.), *R. opacus* (6 шт.) та *R. ruber* (12 шт.) і підтримуються в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Скринінг штамів, що засвоюють моторні мастила, проводили за оптичною густиною (ОГ) бактеріальної суспензії після росту культур на рідкому мінеральному середовищі Мюнца протягом 5 діб при 26-28 °С в пробірках на качалці (240 об./хв). Як єдине джерело вуглецю та енергії використовували 0,1 % суміші мінерального («Азмол-Супер»), частковосинтетичного («Liquid Moly») та синтетичного («Лукойл-Синтетик») мастил (у співвідношенні 1:1:1). ОГ визначали на ФЭК-56М у кюветі з довжиною оптичного шляху 3 мм при 540 нм. Початкова густина бактеріальної суспензії дорівнювала 0,05 одиниць ОГ. Дослідження динаміки розвитку культур проводили шляхом вимірювання ОГ культуральної рідини та визначення чисельності мікроорганізмів за кількістю колонієутворюючих одиниць (КУО) методом висівання серійних розведень відповідних культур на МПА у процесі їх культивування протягом 7 діб на рідкому середовищі Мюнца, що містило 0,1 % мо-

торних мастил. Проби відбирали через кожні 24 години росту.

Кількість залишкових вуглеводнів у культуральній рідині визначали на аналізаторі нафтопродуктів АН-1 з попередньою екстракцією вуглеводнів чотирихлористим вуглецем за ОСТ 38.01378-85 [10] і гравіметричним методом [11]. Здатність засвоювати індивідуальні вуглеводні (н-алкани C_6-C_{10} , $C_{16}-C_{20}$, C_{23} , C_{24} , суміш $C_{20}-C_{29}$), дизельне паливо, сиру нафту, гас і солідол досліджували на агаризованому середовищі Мюнца, як описано раніше [12]. Стійкість штамів до деяких чинників зовнішнього середовища вивчали за загальноприйнятими методами [13]. Всі досліди повторювали 4-5 разів; у роботі представлені середні результати вимірювань.

Результати дослідження

На основі проведених досліджень нами встановлено, що представники тих видів нокардіоподібних актинобактерій, що вивчаються в роботі, відрізняються одне від одного за здатністю рости на середовищах із сумішшю мінерального, частковосинтетичного та синтетичного моторних мастил (рис. 1). Найбільша кількість штамів, що засвоюють мастила, належить до видів *R. erythropolis* (50 % від досліджених), *G. rubropertinctus* (45 %) та *D. maris* (42 %). Значно менше деструкторів мастил виявлено серед штамів *R. opacus* (17 %) та *R. fascians* (10 %). Жодний із вивчених штамів *R. longus* та *R. ruber* не засвоював мастила як єдине джерело вуглецю й енергії. Отримані нами результати значно розширюють дані [8, 9] про розповсюдження здатності до

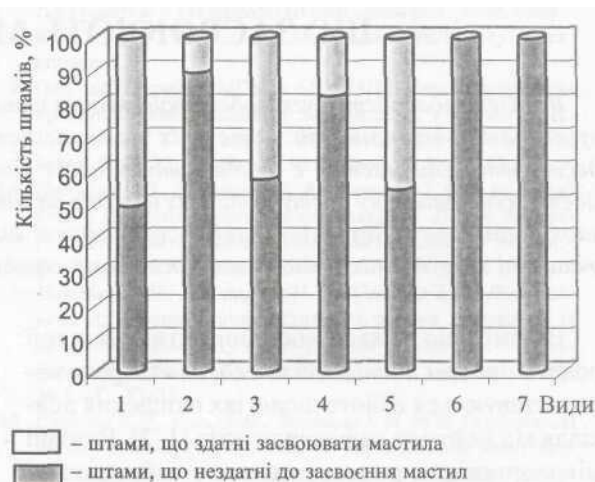


Рис. 1. Здатність штамів нокардіоподібних актинобактерій до засвоєння суміші мінерального, частковосинтетичного та синтетичного моторних мастил: 1—*R. erythropolis*; 2—*R. fascians*; 3—*D. maris*; 4—*R. opacus*; 5—*G. rubropertinctus*; 6—*R. longus*; 7—*R. ruber*

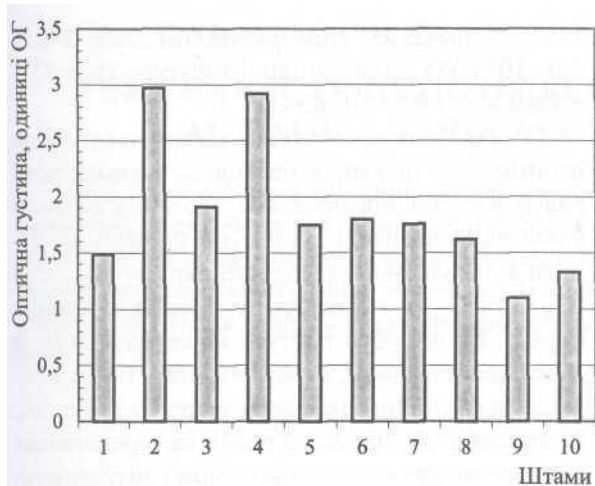


Рис. 2. Засвоєння суміші моторних мастил найбільш активними штамми нокардіоподібних актинобактерій: 1 - *D. maris* IMB 294; 2 - *G. rubroperlinctus* IMB 73; 3 - *G. rubropertinctus* IMB 262; 4 - *G. rubropertinctus* IMB 292; 5 - *G. rubropertinctus* IMB 293; 6 - *R. erythropolis* IMB 131; 7 - *R. erythropolis* IMB 485; 8 - *R. erythropolis* IMB 556; 9 - *R. fascians* IMB 604; 10 - *R. opacus* IMB 9Д

біодеградації нафтових мастил серед нокардіоподібних актинобактерій.

Встановлено, що найбільш активними деструкторами суміші моторних мастил є штами *G. rubropertinctus* IMB 73, IMB 262, IMB 292, IMB 293 та *R. erythropolis* IMB 131, IMB 485 і IMB 556, про що свідчить найвище серед досліджених культур накопичення у них біомаси під час росту на мінеральному середовищі з мастилами (рис. 2). Значення ОД культуральної рідини через 7 днів культивування цих штамів у *G. rubropertinctus* було у межах 1,8-2,9 і у *R. erythropolis* - 1,6-1,8, що значно вище, ніж у найбільш активних штамів *D. maris* (1,5), *R. opacus* (1,3) та *R. fascians* (1,1).

Наведені раніше дані свідчать, що нафтові мастила є багатокомпонентними системами, які відрізняються за вмістом вуглеводнів, різних стабілізаторів та присадок, хімічний склад яких є

Таблиця 1. Склад вуглеводневих компонентів моторних мастил

Тип мастила	Вуглеводні							
	Загальна кількість		n-алкани		Циклічні алкани		Асфальтени	
	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%
Мінеральне марки «Азмол Супер»	930,9	100	651,6	70,0	279,3	30,0	-	-
Частковосинтетичне марки «Liqui Moly»	907,1	100	605,9	66,8	243,1	26,8	58,1	6,4

Примітка: кількість вуглеводнів вказана в 1 мл мастила.

комерційною таємницею підприємств, що їх виготовляють. Із названих речовин найбільш доступною для деструкції мікроорганізмів є вуглеводнева основа мастил, тому важливо було визначити наявність та кількість нафтових вуглеводнів у використаних у наших дослідженнях мінеральному мастилі марки «Азмол Супер» та частковосинтетичному мастилі марки «Liqui Moly». Результати досліджень, наведені в табл. 1, свідчать, що мінеральні мастила, на відміну від напівсинтетичних, містять значно більшу кількість n-алканів, які легко засвоюються мікроорганізмами. Це підтверджують отримані нами раніше дані про значне накопичення біомаси штамми вуглеводеньокислюючих бактерій під час росту саме на мінеральних мастилах.

Ступінь деструкції мастил визначали у штамів, у яких під час росту на цьому субстраті протягом 7 днів оптична густина культуральної рідини перевищувала 1,5 одиниці ОД. У результаті досліджень відібрано два штами, що належать до видів *G. rubropertinctus* IMB 292 та *G. rubropertinctus* IMB 73, які найбільш активно засвоювали вуглеводні компоненти мастил і здійснювали їх деструкцію відповідно на 54,8 і 57,8 % (табл. 2).

Таблиця 2. Деструкція суміші моторних мастил активними штамми

Вид, штам	Залишкова кількість вуглеводнів, мг/л	Ступінь деструкції (7-ма доба), %	Середня швидкість деструкції, мг/доба
<i>Rhodococcus fascians</i> IMB 604	578	35,7	46,0
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB 485	491	45,3	58,4
<i>Gordonia rubropertinctus</i> IMB 293	474	47,3	60,8
<i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB 131	455	49,4	63,6
<i>Gordonia rubropertinctus</i> IMB 262	426	52,6	67,7
<i>Gordonia rubropertinctus</i> IMB 292	406	54,8	70,6
<i>Gordonia rubropertinctus</i> IMB 73	379	57,8	74,4

Примітка: початкова кількість мастил у середовищі становила 900 мг/л.

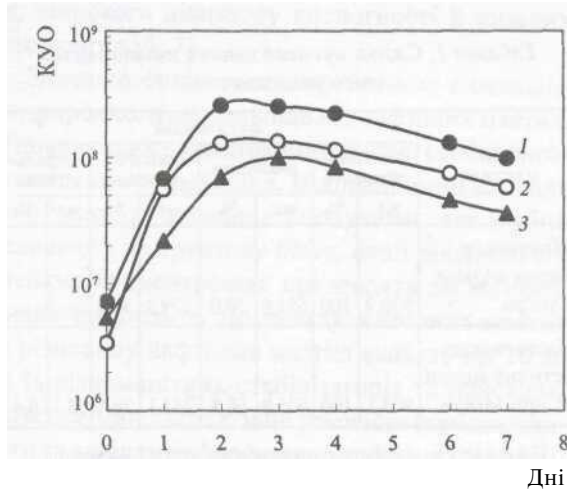


Рис. 3. Динаміка росту штамів *Gordonia rubropertinctus* IMB 73 (2), *Gordonia rubropertinctus* IMB 292 (3) та їх змішаної культури (1) на мінеральному середовищі із моторними мастилами (КУО - кількість колонієутворюючих одиниць)

Вивчення динаміки розвитку вказаних штамів під час росту на суміші мастил показало, що максимальне накопичення біомаси у штаму *G. rubropertinctus* IMB 73 і асоціативної культури штамів *G. rubropertinctus* IMB 73 та *G. rubropertinctus* IMB 292 відбувається на 2-гу добу культивування (рис. 3). Титр клітин у цей час в асоціативної культури досягає значення $2,6 \cdot 10^8$ КУО, а у штаму *G. rubropertinctus* IMB 73 — $1,3 \cdot 10^8$ КУО. Титр клітин штаму *G. rubropertinctus* IMB 292 досягає максимального значення ($1 \cdot 10^8$ КУО) на 3-тю добу культивування. Після 4-ї доби ріст культур значно вповільнюється, і в кінці 7-ї доби титр клітин штаму *G. rubropertinctus* IMB 73 становив

$5,8 \cdot 10^7$ КУО, *G. rubropertinctus* IMB 292 — $3,6 \cdot 10^7$ КУО й асоціативної культури IMB 73 + IMB 292-9, $8 \cdot 10^7$ КУО.

Порівняльне дослідження здатності активних штамів — деструкторів мастил засвоювати різні класи вуглеводнів показало, що вони активно утилізують насичені вуглеводні нормальної будови з довжиною вуглецевого ланцюга C_{10} , C_{16} – C_{20} , C_{23} і C_{24} , а також суміш твердих n-алканів C_{20} – C_{29} . Вони добре ростуть на середовищах із дизельним паливом, сирою нафтою, гасом і солідолом як єдиним джерелом вуглецю та енергії. Вони слабо або майже не росли на середовищах з толуолом, крезолом, нафталіном і антраценом. Вивчені штами гордоній стійкі до дії чинників зовнішнього середовища: вони проявляють життєздатність у широкому діапазоні кислотності (рН 5,0–9,0); при температурі від 10 до 42 °С; витримують нагрівання при 60 °С протягом 20 хв; здатні слабо рости на мінеральних середовищах, які не містять азоту, що надає їм значну перевагу перед іншими мікроорганізмами — деструкторами вуглеводнів нафти.

Таким чином, проведені дослідження показали, що вуглеводеньокислюючі штами нокардіоподібних актинобактерій здатні засвоювати вуглеводневі компоненти різних типів моторних мастил. Селекціоновані активні штами-деструктори належать до виду *G. rubropertinctus*. Вказані бактерії утилізують широкий спектр n-алканів та інші нафтопродукти як єдине джерело вуглецю та енергії і перспективні для використання у біотехнологіях очищення забруднених нафтовими мастилами середовищ і матеріалів.

1. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводородов в окружающей среде (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. - 1996. - Т. 32. - № 6. - С. 579-585.
2. Коронелли Т. В., Комарова Т. И., Ильинский В. В., Кузьмин Ю. И., Курсанов Н. Б., Яненко А. С. Интродукция бактерий рода *Rhodococcus* в тундровую почву, загрязненную нефтью // Там само. - 1997. - Т. 33. - № 2. - С. 198-201.
3. Christoff N., Ivshina I. B., Kuyukina M. S., Philp J. C. Biological treatment of crude oil soil in Russia // Lerner D. N., Walton N. R. G. Contaminated land and groundwater: future directions. (Geological Society). - London: Engineering Geology Special Publications, 1998. - № 14. - P. 45-51.
4. Бердичевская М. М., Козырева Г. И., Елагиных А. В. Численность, видовой состав и оксигенная активность углеводородокисляющего сообщества нефтезагрязненных речных акваторий Урала и Западной Сибири // Микробиология. - 1991. - Т. 60. - № 6. - С. 122-128.
5. Ившина И. Б., Бердичевская М. В., Зверева Л. В., Рыбалка Л. В., Еловицова Е. А. Фенотипическая характеристика алканотрофных родококков из различных экосистем // Микробиология. - 1995. - Т. 64. - № 4. - С. 507-513.
6. Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): Дис.... д-ра биол. наук. - Пермь, 1997. - 98 с.
7. Нестеренко О. А., Квасников Е. И., Ногина Т. М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. - К.: Наук, думка, 1985. - 133 с.
8. Звягинцева И. С., Суровцева Э. Г., Поглазова М. Н., Ивойлов В. С., Беляев С. С. Деградация нефтяных масел нокардиоподобными бактериями // Микробиология. - 2001. - Т. 70. - № 3. - С. 321-328.
9. Звягинцева И. С., Поглазова М. Н., Готова М. Т., Беляев С. С. Влияние солености среды на деструкцию нефтяных масел нокардиоподобными бактериями // Микробиология. - 2001. - Т. 70. - № 6. - С. 759-764.
10. Vazquez-Duhalt R. Environmental impact of used motor oil // Sci. Total Environ. - 1989. - V. 79. - № 1- P. 1-23.
11. ОСТ 38.01378-85. Охрана природы. Гидросфера, определение нефтепродуктов в сточных водах методом инфракрасной спектрофотометрии. - М.: Изд-во стандартов, 1985. - 8 с.
12. Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Ю. Ю. Лурье. - М.: Химия, 1971. - С. 340-341.
13. Нестеренко О. А., Касумова С. А., Квасников Е. И. Ассимиляция углеводородов микроорганизмами рода *Nocardia* и группы «*rhodochrous*» // Микробиол. журн. - 1979. - Т. 41. - № 2. - С. 110-114.
14. Герхардт Ф., Мюррей Р. Т. Е., Костилоу Р. Н. и др. Методы общей бактериологии. - М.: Мир, 1983. - Т. 1. - 536 с.

T. Nagina, L. Homenko, V. Podgorsky

THE CHARACTERISTIC OF ALKANOTROPHIC NOCARDIOFORM ACTINOBACTERIA ASSIMILATED OF MOTOR OILS

*The ability of hydrocarbon-oxidizing strains of nocardioform actinobacteria to utilize of motor oils hydrocarbon components was determined. It was established that the most active of motor oils degrading strains are representatives of the species *Gordonia rubropertinctus* and *Rhodococcus erythropolis*. Kinetics of the active strains growth on mineral medium with motor oils was investigated and their characteristic was resulted. Selected highly active strains *Gordonia* are perspective for use in clearing the polluted by motor oils environments and materials.*