

ЗДАТНІСТЬ ШТАМІВ *RODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* ДО УТИЛІЗАЦІЇ МІНЕРАЛЬНИХ МОТОРНИХ ОЛИВ ТА ЇХ СТІЙКІСТЬ ДО ДЕЯКИХ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ

Біотестування антимікробної дії мінеральних моторних оливо (ММО) на штами R. erythropolis показало, що всі вони зберігали життєздатність при використанні базової основи ММО, проте були чутливими до різних марок ММО, які містять такі токсичні для мікроорганізмів сполуки, як дітіофосфати та феноляти металів. Встановлено мінімальні пригнічуючі концентрації ММО і фенолу для досліджених штамів R. erythropolis та показано їх здатність до утилізації оливо. Досліджено стійкість штамів R. erythropolis до різних значень рН і температури та високої осмолярності середовища.

Однією з важливих екологічних проблем сьогодення є очищення природного середовища від нафтових, зокрема моторних оливо, які належать до найбільш важкоокислювальних продуктів переробки нафти. Сучасні моторні оливи містять основу (базову оливу) та присадки, призначені для підвищення якості оливо та надання певних експлуатаційних характеристик [1]. Основа мінеральних моторних оливо, яку отримують з мазуту, складається із суміші різноманітних вуглеводнів - нормальних, ізопарафінів, нафтопарафінів, нафтоароматичних та ароматичних сполук з боковими ланцюгами. Присадки (диспергувальні, мийні, протиокислювальні, протикорозійні, протизношувальні та ін.), які вводять в оливи так званим пакетом, мають різну функціональну дію і можуть містити такі високотоксичні сполуки, як феноляти, дітіофосфати та алкїлдітіофосфати металів, зокрема цинку, молібдену та барію [1]. Точний хімічний склад присадок та їх кількість в оливах захищено авторськими правами і є комерційною таємницею підприємств, що їх виготовляють.

В останні роки до обов'язкових характеристик моторних оливо віднесено їх здатність до біорозщеплюваності під дією мікроорганізмів [2; 3]. У цьому процесі значну роль можуть відігравати нокардіоподібні актинобактерії, які широко розповсюджені в забруднених нафтою та нафтопродуктами середовищах [4-6]. Зазначені бактерії, в першу чергу представники родів *Rhodococcus*, *Gordonia* і *Dietzia*, часто використовуються в біотехнологіях очищення довкілля від вуглеводнів нафти [7-9]. Значною перевагою цих бактерій порівняно з іншими вуглеводеньокиснювальними мікроорганізмами є те, що завдяки наявності високоліпофільної клітинної стінки вони можуть проводити окиснення вуглеводнів не тільки на межі розподілу фаз вуглеводень - вода, ай безпосередньо в нафтовій плівці, проявляють стійкість до несприятливих умов існування та

здатні синтезувати біосурфактантні комплекси, які збільшують розчинність вуглеводнів у воді й сприяють їх кращому засвоєнню [6, 10]. Попри широке практичне використання та значний рівень дослідження біологічних властивостей нокардіоподібних актинобактерій, зокрема представників виду *R. erythropolis*, засвоєння ними нафтових, особливо моторних, оливо майже не досліджене [11; 12].

Враховуючи зазначене вище, метою цього дослідження було вивчення чутливості до різних концентрацій мінеральних моторних оливо штамів *R. erythropolis*, їх здатності до утилізації цих речовин та стійкості до деяких факторів зовнішнього середовища.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами досліджень було обрано вуглеводеньокиснювальні штами *R. erythropolis* (УКМАс-31, УКМ Ас-43, УКМ Ас-44, У КМ Ас-48, УКМ Ас-50, УКМ Ас-58, УКМ Ас-73 та УКМ Ас-77), які підтримуються в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. У праці використано базову основу ММО та універсальні ММО для бензинових двигунів класу 15W-40 марок «Азмол-Супер», «Navoline Premium», «Esso Uniflo», «Luxoil Super», а також ММО для дизелів класу 15W-40 «Titan Truck SHPD».

Дослідження протимікробної дії оливо і первинну оцінку ступеня чутливості до них штамів *R. erythropolis* проводили методом дифузії в агарі з використанням лунок [13-15]. Чашки Петрі з агаризованим середовищем 53 [16] засівали газонем 0,1 мл суспензії добових культур (титр клітин 10^8 кл./мл), після чого в товщі агару за допомогою свердла робили лунки діаметром 8 мм, які заповнювали відповідною речовиною. У дослідях використовували ММО та їх розчи-

ни в базовій основі в концентраціях 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,01 і 0,005 г/мл, а також водні розчини фенолу, які містили 0,06; 0,05; 0,025; 0,01 і 0,005 г/мл фенолу. Показником чутливості бактерій до зазначених речовин слугував діаметр зони відсутності росту навколо лунок в агарі (враховуючи лунки). Мінімальною пригнічувальною концентрацією (МПК) в умовах цього досліді вважали найменшу концентрацію внесеної в лунку речовини, при якій зони відсутності росту культур становили до 1 мм від краю лунки.

Здатність вказаних штамів до засвоєння різних марок ММО досліджували 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 по 0,5 % ММО або базової основи до них. ОГ визначали на ФЭК-56М у кюветі з довжиною оптичного шляху 5 мм при 540 нм. Початкова густина бактеріальної суспензії становила 0,05 одиниць ОГ. Стійкість штамів до різних значень рН, температури та концентрацій NaCl в середовищі вивчали за загальножививними методами [17]. Усі досліді повторювали 4–5 разів; у праці представлено середні результати вимірювань.

Результати дослідження

Враховуючи те, що до комплексу присадок моторних олиव входять екологічно небезпечні речовини, зокрема токсичні сполуки цинку та фенолу [11], які можуть негативно впливати на життєздатність мікроорганізмів, ми провели визначення чутливості штамів *R. erythropolis* до базової основи та різних марок ММО. Встановлено, що базова основа, яка не містить присадок, не проявляла токсичної дії відносно досліджених штамів - при випробовуванні зазначеної речовини навколо лунок в агарі були відсутні зони затримки росту культур. На відміну від цього, штам *R. erythropolis* були чутливі до всіх марок ММО, причому ступінь їх чутливості коливався залежно від марки оливи і досліджуваного штаму. Оливи «Luxoil Super» та «Азмол-Супер» утворювали найменші за діаметром зони відсутності росту культур, середні значення яких становили 18 та 22 мм відповідно. Більшу чутливість проявляли штам *R. erythropolis* до оливи марок «Navoline Premium», «Titan Truck SHPD» та «Esso Uniflo», при дії яких діаметр зон відсутності росту становив у середньому 23 мм, 24 мм та 25 мм відповідно. На рис. 1 представлено результати біотестування чутливості штаму *R. erythropolis* УКМ Ас-77 до оливи «Luxoil Super», «Navoline Premium» і «Esso Uniflo» та базової основи ММО. Найбільші зони

відсутності росту в цього штаму спостерігалися під дією оливи «Navoline Premium» (d = 21 мм) та «Esso Uniflo» (d = 22 мм), значно менші зони наявні навколо лунок з оливою «Luxoil Super» (d = 16 мм) і були відсутні при використанні базової основи. Подібну тенденцію щодо чутливості до зазначених оливи спостерігали й у інших досліджуваних штамів.

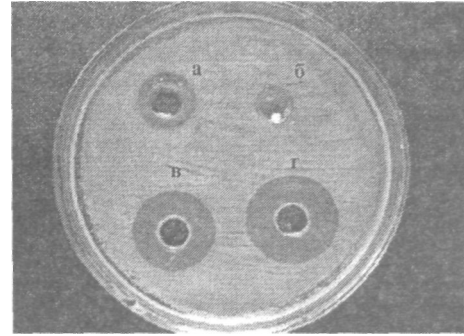


Рис. 1. Чутливість штаму *R. erythropolis* УКМ Ас-77 до оливи марок «Luxoil Super» (а), «Navoline Premium» (в) і «Esso Uniflo» (г) та базової основи мінеральної оливи (б)

При визначенні антимікробної дії різних концентрацій ММО показано, що діаметри зон відсутності росту штамів навколо лунок, у які вносили різні розведення оливи, залежить як від концентрації цих речовин, так і від досліджуваного штаму. Встановлено, що в «Азмол-Супер» для штамів *R. erythropolis* УКМ Ас-44, УКМ Ас-58 та УКМ Ас-77 мінімальна пригнічувальна концентрація досягала значення 0,8 г/мл, а для штамів УКМ Ас-31 та УКМ Ас-43 - 0,4 г/мл (рис. 2). Найчутливішими до дії цієї оливи виявилися штам *R. erythropolis* УКМ Ас-48, УКМ Ас-50 та УКМ Ас-73, МПК яких становила 0,2 г/мл. Штам *R. erythropolis* УКМ Ас-31, УКМ Ас-44 та УКМ Ас-73 проявляли значну стійкість (МПК = 0,8 г/мл) до оливи «Luxoil Super» (рис. 3); менш стійкими до неї були штам

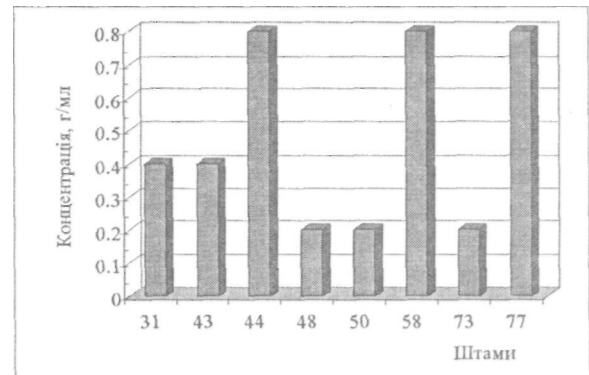


Рис. 2. Мінімальна пригнічувальна концентрація мінеральної моторної оливи марки «Азмол-Супер» для штамів *R. erythropolis*

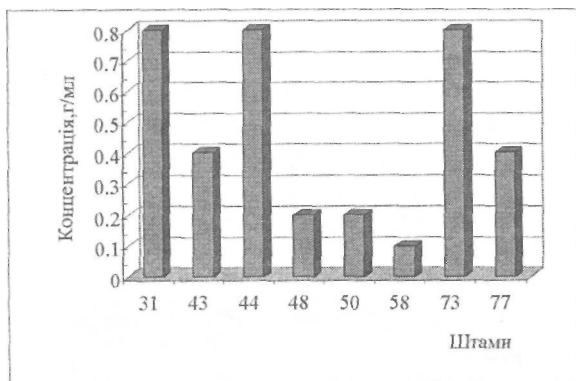


Рис. 3. Мінімальна пригнічувальна концентрація мінеральної моторної оливи марки «Lukoil Super» для штамів *R. erythropolis*

УКМ Ас-43 та УКМ Ас-77 (МПК = 0,4 г/мл), а найчутливішими - штами УКМ Ас-48, УКМ Ас-50 (МПК = 0,2 г/мл) та УКМ Ас-58 (МПК = 0,1 г/мл).

При дослідженні МПК оливи «Navoline Premium» показано, що для штамів *R. erythropolis* УКМ Ас-31, УКМ Ас-44, УКМ Ас-58 та УКМ Ас-73 вона становила 0,4 г/мл, а для УКМ Ас-43 та УКМ Ас-50 - 0,2 г/мл; найбільш чутливими виявилися штами УКМ Ас-48 та УКМ Ас-77, у яких зони відсутності росту культур (до 1 мм від краю лунки) спостерігалися навіть при концентрації цієї оливи 0,1 г/мл (рис. 4). МПК оливи «Titan Truck SHPD» для штамів *R. erythropolis* УКМ Ас-31 та УКМ Ас-44 становила 0,2 г/мл, а для інших досліджуваних штамів - лише 0,1 г/мл (рис. 5). Найвищу токсичність відносно штамів *R. erythropolis* мала олива «Esso Uniflo»: більшість з них (УКМ Ас-31, УКМ Ас-44, УКМ Ас-73 та УКМ Ас-77) були чутливі до концентрації цієї оливи 0,1 г/мл, а штами УКМ Ас-43 та УКМ Ас-50 - до 0,05 г/мл; найбільшу стійкість (МПК = 0,2 г/мл) до цієї оливи виявив штам УКМ Ас-58 і найменшу (МПК = 0,01 г/мл) - штам УКМ Ас-48 (рис. 6).

До речовин, які містяться в оливах і можуть проявляти антимікробну дію, належать сполуки фенолу [1]. Враховуючи це, ми провели дослідження стійкості штамів *R. erythropolis* до різних концентрацій фенолу та визначили МПК цієї речовини для використаних у роботі культур. Показано, що всі без винятку штами були чутливими до концентрації фенолу 0,06 г/мл та стійкими до 0,005 г/мл. Щодо токсичної дії інших концентрацій цього ксенобіотика встановлено, що найчутливішими до нього виявилися штами *R. erythropolis* УКМ Ас-31, УКМ Ас-44 та УКМ Ас-50: зони відсутності росту (до 1 мм від краю лунки) у них реєстрували навіть при концентрації фенолу 0,01 г/мл; більш стійкими (МПК = 0,025 г/мл) були штами УКМ Ас-43, УКМ Ас-48, УКМ Ас-58 та УКМ Ас-73, а най-

більш резистентним (МПК = 0,05 г/мл) - штам УКМ Ас-77 (рис. 7).

Беручи до уваги те, що найменше значення МПК досліджених ММО для представників виду *R. erythropolis* становило 0,01 г/мл, визначення здатності цих штамів до деструкції оливи проводили при їх вмісті у середовищі 0,005 г/мл. Встановлено, що всі штами краще росли на базовій основі ММО, ОГ культуральної рідини була у них переважно більшою, ніж при рості

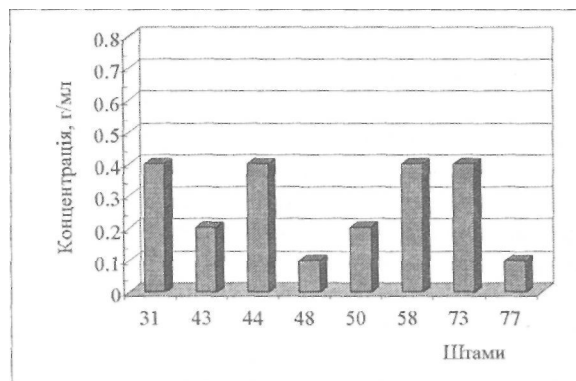


Рис. 4. Мінімальна пригнічувальна концентрація мінеральної моторної оливи марки «Navoline Premium» для штамів *R. erythropolis*

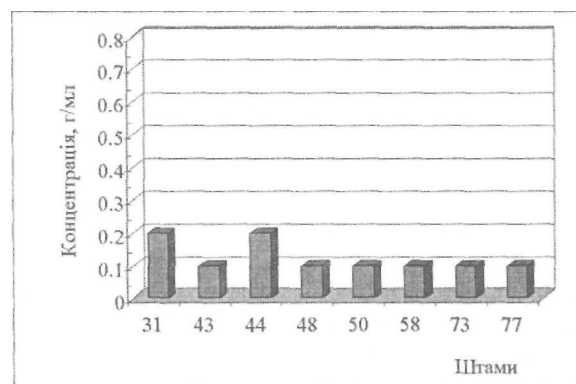


Рис. 5. Мінімальна пригнічувальна концентрація мінеральної моторної оливи марки «Titan Truck SHPD» для штамів *R. erythropolis*

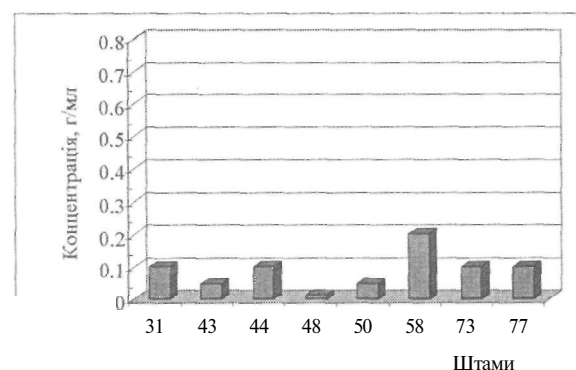


Рис. 6. Мінімальна пригнічувальна концентрація мінеральної моторної оливи марки «Esso Uniflo» для штамів *R. erythropolis*

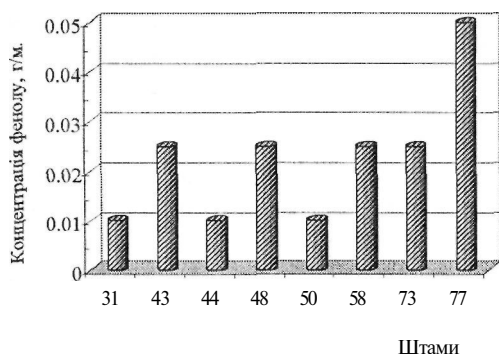


Рис. 7. Мінімальна пригнічувальна концентрація фенолу для штамів *R. erythropolis*

на ММО різних марок і становила 2,2-4,1 одиниць ОГ (рис. 8). Це можна пояснити тим, що на відміну від ММО, базова основа не містить присадок і, відповідно, токсичних для мікроорганізмів сполук. При дослідженні утилізації штамами *R. erythropolis* різних марок олиив показано, що більшість з них краще росла на олиивах «Navoline Premium», «Titan Truck SHPD» і «Lukoil Super» (ОГ культуральної рідини у них становила 1,7-3,7; 2,3-3,6 та 2,0-3,8 відповідно), ніж на олииві «Азмол Супер» (ОГ = 1,1-2,2) та «Esso Uniflo» (ОГ = 1,4-1,8). Найменші показники ОГ (0,66-0,67) при рості на олииві «Esso Uniflo» було зареєстровано у штамів *R. erythropolis* УКМ Ас-48 та УКМ Ас-58.

Отримані дані свідчать про те, що здатність представників виду *R. erythropolis* до засвоєння ММО визначається не тільки маркою олиива, а й індивідуальними особливостями досліджуваних штамів. Найактивнішими деструкторами ММО виявилися штами *R. erythropolis* УКМ Ас-77 (ОГ = 2,2-4,1), УКМ Ас-50 (ОГ = 2,3-4,1) та УКМ Ас-31 (ОГ = 2,0-2,5).

Відомо, що для нейтралізації кислот, які утворюються в процесі експлуатації моторних олиив, у них додають лужні присадки [1], тому важливою характеристикою штамів-деструкторів цих речовин має бути здатність до росту в широкому діапазоні рН середовища. При дослідженні стійкості штамів до різних значень рН встановлено, що оптимальне значення цього показника для більшості штамів *R. erythropolis* становить 7-8 одиниць. Штами *R. erythropolis* УКМ Ас-58 та УКМ Ас-43 проявляли життєздатність у діапазоні рН від 6 до 10, а штам УКМ Ас-44 - від рН 6 до рН 8. Найбільш стійкими до змін кислотності середовища були штами *R. erythropolis* УКМ Ас-48 та УКМ Ас-73, які здатні до росту при значенні рН від 5 до 10.

Враховуючи те, що в природних умовах мікроорганізми часто перебувають під впливом стресових факторів, зокрема таких, як високі й

низькі значення температури та мінералізації середовища, ми вважали за доцільне дослідити чутливість штамів-деструкторів моторних олиив до вказаних параметрів. Встановлено, що всі штами *R. erythropolis* здатні до росту при температурі від 5 до 42 °С та витримують нагрівання при 60 °С протягом 15 хв; більш стійкими до дії високих температур виявилися штами УКМ Ас-48 та УКМ Ас-58: вони зберігали життєздатність навіть після нагрівання 15 хв при 70 °С.

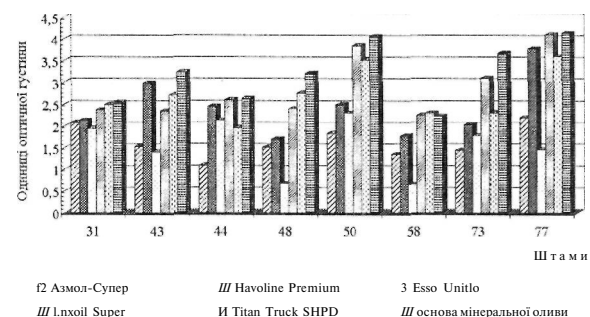


Рис. 8. Ріст штамів *R. erythropolis* на різних марках мінеральних моторних олиив

Виявлено, що всі досліджувані штами росли при вмісті в середовищі 1-5 % NaCl, а також (за винятком УКМ Ас-48 та УКМ Ас-77) - 7 % NaCl (рис. 9). Тільки два штами, а саме *R. erythropolis* УКМ Ас-44 та УКМ Ас-50 виявляли здатність до росту за наявності 10 % NaCl, один з яких (УКМ Ас-50) ріс також і при 15 % NaCl. Слід зазначити, що за даними досліджень [12], для представників виду *R. erythropolis*, які належать до слабогалотолерантних мікроорганізмів, при засвоєнні нафтових мінеральних олиив оптимальні концентрації NaCl в середовищі становлять 0,5-2,0 %. При підвищенні вмісту NaCl до 5 % деструкція олиив була незначною протягом перших 5 діб і різко підвищувалася на 7-му добу культивування. На відміну від цього, досліджені нами штами *R. erythropolis* виявляють значно більшу стійкість до високої мінералізації середовища.

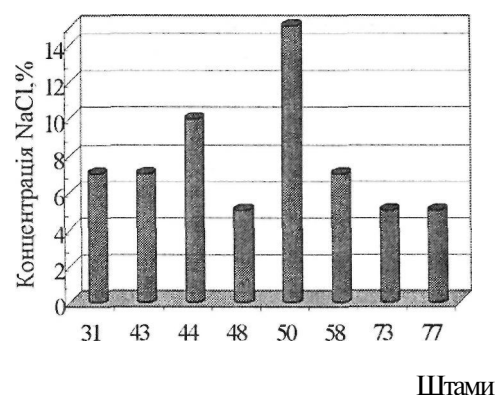


Рис. 9. Ріст штамів *R. erythropolis* при різному вмісті NaCl в середовищі

Отже, нами встановлено, що досліджені марки ММО проявляють різний ступінь токсичності відносно штамів *R. erythropolis*, що необхідно враховувати при визначенні біодеструктивної активності культур та їх використанні в біотехнологіях очищення забруднених моторними оливами середовищ. Вивчені штами *R. erythropolis* стійкі до дії стресових факторів - вони проявляють життєздатність у широкому діапазоні кислотності, температури та осмолярності середо-

вища, що надає їм перевагу порівняно з іншими мікроорганізмами - деструкторами вуглеводнів нафти і визначає високу екологічну значущість цих бактерій.

Автори висловлюють щиру подяку старшому науковому співробітнику Українського науково-дослідного інституту нафтопереробної промисловості «МАСМА» С. С Шамкіній за корисні консультації, надані під час проведення досліджень.

Караулов А. К., Худотій Н. Н. Автомобильные масла. Моторные и трансмиссионные. Ассортимент и применение: Справочник. - К.: Журнал «Радуга», 2000. - 436 с.

ДСТУ 4247:2003. Нафтопродукти. Метод визначення біорозщеплюваності (СЕС L-33-A-93, NEQ). - К.: Держспоживстандарт України, 2004. - 14 с.

Евдокимов А. Ю., Фукс И. Г., Щаблина Т. И., Багдасаров Л. Н. Смазочные материалы и проблемы экологии. - М.: Нефть и газ, 2000. - 496 с.

Бердичевская М. М., Козырева Г. И., Благиных А. В. Численность, видовой состав и оксигеназная активность углеводородоокисляющего сообщества нефтезагрязненных речных акваторий Урала и Западной Сибири // Микробиология. - 1991. - Т. 60. - № 6. - С. 122-128.

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.

Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие): Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени доктора биологических наук. - Пермь, 1997. - 98 с.

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.

Коронелли Т. В., Комарова Т. И., Ильинский В. В., Кузьмин Ю. И., Кирсанов Н. Б., Яненко А. С. Интродукция бактерий рода *Rhodococcus* в тундровую почву, загрязненную нефтью // Прикладная биохимия и микробиология. - 1997. - Т. 33. - № 2. - С. 198-201.

9. Christofi N., Ivshina J. B., Kuyukina M. S., Philp J. C. Biological treatment of crude oil soil in Russia // Lerner D. N., Walton N. R. G. (eds.). Contaminated land and groundwater: future directions. Geological Society. - London: Engineering Geology Special Publications. - 1998. - V. 14. - P. 45-51.

10. Lang S., Philp J. C. Surface-active lipids in rhodococci // Antonie Van Leeuwenhoek. - 1998. - V. 7. - № 1-3. - С. 59-70.

11. Звягинцева И. С., Суrowцева Э. Г., Поглазова М. Н., Ивойлов В. С., Беляев С. С. Деградация нефтяных масел нокардиоподобными бактериями // Микробиология. - 2001. - Т. 70. - № 3. - С. 321-328.

12. Звягинцева И. С., Поглазова М. Н., Готоева М. Т., Беляев С. С. Влияние солености среды на деструкцию нефтяных масел нокардиоподобными бактериями // Микробиология. - 2001. - Т. 70. - № 6. - С. 759-764.

13. Егоров И. С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Высшая школа, 1986. - 447 с.

14. Аржаков В. И., Ермакович М. М., Аржаков П. В. Определение противомикробной активности дезинфицирующих препаратов // Достижения науки и техники АПК. - 2004. - № 2. - С. 39-41.

15. Аржаков В. И., Ермакович М. М., Аржаков П. В. Оценка резистентности микроорганизмов к дезинфицирующим препаратам // Достижения науки и техники АПК. - 2004. - № 11. - С. 40-42.

16. Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH. Catalogue of strains: Fourth Ed., 1989. - 459 p.

17. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. проф. Д. Г. Звягинцева. - М.: Изд-во Московского университета, 1980. - 224 с.

L. Homenko, T. Nogina, V. Podgorskyy

THE ABILITY OF *RODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* STRAINS TO UTILIZE MINERAL ENGINE OIL AND THEIR STABILITY TO SOME STRESSFUL CONDITIONS

The biotesting of antimicrobial action of mineral engine oils (MEO) on Rhodococcus erythropolis strains has shown that they kept of viability at use of the base MEO but were sensitive to different marks of MEO which contains such toxic for microorganisms substances as metals dithiophosphate and phenolate. The minimal inhibitory concentrations of MMO and phenol for investigated R. erythropolis strains has been determined and their oils utilizing ability has been shown. The R. erythropolis strains resistance to different values of pH and temperature as well as high concentration of NaCl in medium has been investigated.