

ПРИРОДНІ ШТАМИ НОКАРДІОПОДІБНИХ АКТИНОБАКТЕРІЙ - ДЕСТРУКТОРИ МОТОРНИХ ОЛИВ

*Встановлено належність до видів *Dietzia maris* та *Rhodococcus fascians* штамів актинобактерій, які ізольовані із забруднених нафтопродуктами ґрунтів. Показано, що досліджені штами були стійкими до базової оливи, яка не містить токсичних речовин, і проявляли різний ступінь чутливості до всіх марок мінеральних моторних олив (ММО) та присадок до них, що містять дітіофосфат цинку. Високий рівень біодеструктивної активності (72–78 %) штамів *D. maris* щодо базової оливи свідчить про перспективність їх використання як тест-культур при дослідженні біорозщеплюваності ММО.*

Останніми роками приділяється дедалі більше уваги проблемі очищення довкілля від змащувальних матеріалів, з яких найбільш екологічно небезпечними є моторні оливи (МО). Забруднення природного середовища МО відбувається в основному при порушенні правил їх транспортування зберігання та застосування (наприклад, під час експлуатації автотранспортних засобів) [1-3]. Негативний вплив МО на живі організми зумовлений тим, що, окрім базової оливи, яка є рідкою сумішшю висококиплячих вуглеводнів, невід'ємною частиною МО є присадки, більшість яких містить токсичні синтетичні хімічні сполуки [1, 4]. Для виготовлення товарних МО до базової оливи додають індивідуальні функціональні присадки (від 7 і більше типів присадок, що складають до 15-25 % загального об'єму оливи), які можуть вводиться кожна окремо або у так званих «пакетах» (концентрований розчин індивідуальних присадок в оливі, що містить до 50 % активних речовин). Постійно зростаюче світове виробництво МО, яке на сьогодні становить більше 40 млн тон на рік, збільшує загрозу потрапляння цих речовин у природне середовище. У зв'язку з цим виникла необхідність встановлення контролю за токсичністю мастильних матеріалів та їхньою здатністю до біодеструкції у природних умовах. Вказані нормативи є обов'язковими при виготовленні всіх торгових марок МО і регламентуються в країнах Євро-союзу міжнародним стандартом СЕС L-33-A-93, а в Україні - Національним стандартом України (ДСТУ 4247:2003) «Нафтопродукти. Метод визначення біорозщеплюваності» [5]. Відповідно до названих нормативних документів, при встановленні здатності МО до біодеструкції як біологічний агент використовується фільтрат комунально-побутових стічних вод міських очисних споруд (МОС). Відомо, що в самоочищенні довкілля від нафтових вуглеводнів значну роль

відіграють нокардіоподібні актинобактерії, які широко розповсюджені в природних біоценозах забруднених нафтою та нафтопродуктами середовищ. З огляду на вищесказане метою цієї роботи було виділення та ідентифікація природних ізолятів вказаних мікроорганізмів, визначення їх чутливості до різних концентрацій МО та здатності до біодеструкції цих речовин.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами досліджень були штами вуглеводеньокиснюючих бактерій, які виділено із забруднених мастильними матеріалами ґрунтів. Із них 5 штамів (ЛМ 1, ЛМ 9, ЛМ 14, ЛМ 15, ЛМ 21) ізольовані з ґрунту, відібраного біля автогаражів, а 2 штами (ПВ 28 та ПВ 63) - з ґрунту біля трамвайних колій. У роботі використано: базову оливу для мінеральних моторних олив (БМО) марки НС 22/130, товарні універсальні мінеральні моторні оливи (ММО) класу 15W-40 марок «Азмол-Супер», «Navoline Premium», «Esso Uniflo», «Luxoil Super», ММО для дизелів класу 15W-40 «Titan Truck SHPD». Досліджено також пакети присадок (ПП) Hitec 9227, Hitec 2854, Infenium 1272, Infenium 2281, Infenium 3354 і Infenium 5265, Hitec 320N та індивідуальні функціональні присадки (ІФП) Hitec 611, С-150 Нафтан, Детерсол-140, Komad-302, Hitec 623, Плексол, Полібутен та Liqui Moly.

Дослідження морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак проводили загальноприйнятими методами [6, 7, 8] і за роботами окремих авторів [9]. Хемотаксономічні ознаки, а саме, наявність мезо-діамінопімелінової кислоти (мезо-ДАПК), тип міколових кислот та моноцукровий склад гідролізатів клітин визначали методами, описаними у Д. Г. Звягінцева [8]. Ідентифікацію культур проводили за визначниками Берджі [10, 11] і монографією О.А.Нестеренко [12].

Біотестування чутливості штамів до різних концентрацій ММО, ПП, ІФП проводили дифузним методом із застосуванням лунок в агарі, як описано нами раніше [13]. При визначенні здатності штамів до деструкції оливо у варіантах дослідів із чистими культурами актинобактерій інокулятом була культуральна рідина 48-годинних культур, вирощених на рідкому мінеральному середовищі Мюнца з 0,1 % гексадекану. У дослідях зі стічною водою відповідно до вимог ДСТУ 4247:2003 як інокулянт використовували фільтрат цієї води (з титром клітин 10^6 КУО/мл), відібраної на другій стадії очистки комунально-побутових стічних вод МОС м. Києва. Культивування проводили на середовищі Мюнца з 0,1 % БМО в колбах на качалці (240 об/хв) упродовж 14 діб за температури 28 °С. Кількість залишкових вуглеводнів у культуральній рідині визначали гравіметричним методом [14]. Усі досліді проводили у 4-5 повторях. Результати обробляти статистично [15].

Результати та їх обговорення

Вивчення здатності штамів до засвоєння оливо показало, що всі вони росли на рідкому мінеральному середовищі Мюнца з 0,1 % БМО як єдиним джерелом вуглецю та енергії. При дослідженні морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних та хемотаксономічних ознак встановлено, що всі штами за своїми властивостями відповідають характеристикам нокардіоподібних актинобактерій із 4 типом клітинної стінки. Всі вони мають цикл розвитку кок-паличка-кок, містять в

клітинних стінках мезо-ДАПК, арабінозу, галактозу і міколові кислоти. Вивчені штами каталазопозитивні, аероби утворюють кислоту з глюкози, фруктози, гліцерину, але не з лактози, мальтози, інозиту і саліцину. Вони ростуть в середовищі з 5 % NaCl, засвоюють натрієві солі піровиноградної, оцтової і фумарової кислот, не утворюють уреазу і фосфатазу. За комплексом досліджених ознак штами ЛМ 1 (УКМ Ас-212), ЛМ9 (УКМ Ас-220), ЛМ 14 (УКМ Ас-222), ЛМ 15 (УКМ Ас-223), ЛМ 21 (УКМ Ас-205) та ПВ 28 (УКМ Ас-586) віднесено до виду *Dietzia maris*, а ПВ 63 (УКМ Ас-242) - до *Rhodococcus fascians*. Основні диференціюючі властивості вказаних штамів наведено в табл.1.

Порівняльне дослідження здатності штамів до утилізації БМО та різних торгових марок ММО при їх вмісті в середовищі 0,1 % показало, що незалежно від таксономічної належності всі штами краще росли на БМО (рис. 1), до складу якої, як відомо, не входять присадки. Значення оптичної густини (ОГ) культуральної рідини після 5 діб росту штамів на вказаній оливі коливалось у межах 1,6-3,9 одиниць ОГ при початковому її значенні 0,05. При засвоєнні ММО марок «Lukoil Super», «Titan Truck SHPD» та «Navoline Premium» ОГ становила 1,2-3,7; 0,9-3,2 та 0,9-2,5 відповідно. Майже однаковий ріст (ОГ = 1,5-1,6) спостерігався у *D. maris* УКМ Ас-205, УКМ Ас-212 та УКМ Ас-586 при рості на оливі «Азмол су пер»; нижчим був показник ОГ (0,9-1,2) на цій оливі в інших досліджених штамів. Найменші значення ОГ, за винятком *D. maris* УКМ Ас-586 (ОГ = 2,0), зафіксовано при рості

Таблиця 1. Основні диференціюючі ознаки досліджених штамів роду *Dietzia* та *Rhodococcus*

Ознаки	D. maris						K. fascians
	УКМ Ас-212	УКМ Ас-220	УКМ Ас-222	УКМ Ас-223	УКМ Ас-205	УКМ Ас-586	УКМ Ас-242
Колір колоній на МПА	рожево-червоний	рожево-червоний	рожево-червоний	рожево-червоний	«	»	жовто-гарячий
Розмір клітин 0,5-2,0 мкм	+	+	+	+	0.	0	-
Розмір клітин 3,0-6,0 мкм	-	-	-	-	-	-	+
Утворення кислоти з:							
галактози	-	-	-	-	-	-	+
арабінози	-	-	-	-	-	-	+
Засвоєння Na солей кислот:							
а-кетоглутарової	-	-	-	-	-	-	+
цис-аконітової	-	-	-	-	-	-	+
γ-аміномасляної	-	-	-	-	-	-	-
Наявність: нітратредуктази	+	+	+	+	+	+	-
Ріст у середовищі з 10% NaCl	-	-	-	-	-	-	+

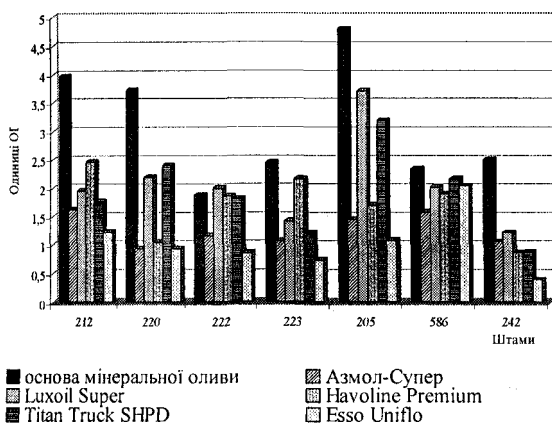


Рис. 1. Значення оптичної густини культуральної рідини штамів *D.maris* та *R.fascians* через 120 годин культивування на різних марках мінеральних моторних олив

штамів на ММО марки «Esso Uniflo» (0,4-1,2 одиниць ОГ).

Отримані дані свідчать про те, що здатність до засвоєння ММО залежить як від марки оливи, так і від індивідуальних особливостей штаму-деструктора цих речовин.

Враховуючи наявність токсичних для мікроорганізмів речовин, зокрема фенолятів та дітіофосфатів металів, у складі присадок ми провели визначення чутливості штамів до високих концентрацій ММО, ПП та ІФП. Нами встановлено, що, на відміну від БМО, яка не виявляла токсичної дії, всі досліджені марки ММО в різній мірі

Таблиця 2. Чутливість штамів *D.maris* та *R.fascians* до різних марок мінеральних моторних олив (діаметр зони відсутності росту, мм)

Штам	Марка оливи				
	Азмол-Супер	Luxoil Super	Havoline Premium	Titan Truck SHPD	Esso Uniflo
<i>D.maris</i> УКМ Ас-212	14,7±0,33	15,3±0,21	18,0±0,45	19,5±0,43	24,0±0,93
<i>D.maris</i> УКМ Ас-220	15,3±0,42	14,0±0,26	19,2±0,40	18,3±0,71	21,8±0,60
<i>D.maris</i> УКМ Ас-222	17,2±0,75	14,0±0,93	22,0±0,26	16,8±0,75	22,3±0,21
<i>D.maris</i> УКМ Ас-223	15,2±0,60	13,0±0,45	15,3±0,33	14,0±0,52	18,0±0,97
<i>D.maris</i> УКМ Ас-205	19,0±0,58	20,2±0,31	20,7±0,61	21,3±0,8	20,2±0,48
<i>D.maris</i> УКМ Ас-586	22,0±0,63	19,0±0,86	23,5±0,50	29,0±0,85	26,0±1,53
<i>R.fascians</i> УКМ Ас-242	23,5±0,67	21,2±0,40	28,0±0,75	25,5±0,22	31,0±0,63

Таблиця 3. Чутливість штамів *D.maris* та *R.fascians* до різних пакетів присадок та індивідуальної протизношувальної присадки Multadit OB (діаметр зони відсутності росту, мм)

Штам	Пакети присадок						Індивідуальна присадка Multadit OB
	Hitec 9227	Hitec 2854	Infenium 1272	Infenium 2281	Infenium 3354	Infenium 5265	
<i>D.maris</i> УКМ Ас-212	41,0±0,63	31,5±0,81	24,5±0,43	25,5±1,06	20,0±0,63	34,5±0,67	39,5±0,43
<i>D.maris</i> УКМ Ас-220	33,0±0,37	33,5±0,85	24,0±0,63	19,3±0,49	29,0±0,45	33,5±0,92	33,6±0,48
<i>D.maris</i> УКМ Ас-222	33,5±0,89	33,5±0,22	27,8±0,31	26,5±0,85	33,8±0,70	30,0±0,42	39,7±0,42
<i>D.maris</i> УКМ Ас-223	32,5±1,28	33,5±1,06	24,0±0,45	24,7±0,71	25,5±0,43	31,2±0,54	37,1±0,34
<i>D.maris</i> УКМ Ас-205	33,0±0,45	29,3±0,33	26,7±0,56	24,5±0,62	23,5±0,76	32,5±1,28	39,2±0,54
<i>D.maris</i> УКМ Ас-586	31,5±0,72	33,2±0,54	27,2±0,65	26,5±0,85	24,5±0,43	34,7±0,42	39,5±0,43
<i>R.fascians</i> УКМ Ас-242	31,0±0,63	35,5±0,34	29,5±0,76	25,2±0,40	31,5±0,85	31,5±0,85	36,3±0,42

інгібували ріст кожного штаму. Встановлено, що найменшу антимікробну дію мали оливи марок «Luxoil Super» та «Азмол-Супер», для яких середнє значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК₀) складало 0,8 г/мл, а діаметри зон відсутності росту (d) становили 13,0-21,0 мм та 14,0-23,0 мм відповідно (табл. 2). Більшу чутливість штами проявляли до оливи «Havoline Premium» (d = 18,0-28,0 мм; МІК₀ - 0,5 г/мл) та «Esso Uniflo» (d = 18,0-31,0 мм; МІК₀ = 0,3 г/мл). Найбільшу токсичну дію на досліджені штами мала олива «Titan Truck SHPD», МІК₀ якої для більшості штамів досягала значень 0,15 г/мл при d = 18,0-29,0 мм.

Дослідження чутливості штамів до ПП показало, що всі вони виявляли стійкість до Hitec 320N, єдиного із використаних у роботі пакетів, що не має дітіофосфату цинку. До всіх інших ПП, у складі яких міститься від 0,8 до 2,1 % дітіофосфату цинку, досліджені штами виявляли різний ступінь чутливості. Найбільшою токсичністю характеризувались ПП марок Hitec 9227, Hitec 2854 та Infenium 5265: середнє значення d для них становило 34,0 мм (табл. 3). Меншу чутливість штами виявляли до ПП марок Infenium 1272, Infenium 2281 та Infenium 3354, під час дії яких d дорівнював 24,0-30,0 мм, 19,0-27,0 мм та 20,0-34,0 мм відповідно.

При визначенні антимікробної дії ІФП на штами *D.maris* та *R.fascians* встановлено, що всі вони були чутливими до протизношувальної

присадки Multadit OB (містить 8 % дітіофосфата цинку), під час дії якої d дорівнював 34,0-40,0 мм, а $MIK_c = 0,001$ г/мл (табл. 3). Всі представники вказаних видів були стійкі до інших досліджених ІФП, а саме: мийно-диспергувальних (Нітес 611, С-150 Нафтан, Детерсол-140), диспергувальної (Komad-302), в'язкісної (Нітес 623), в'язкісно-депресорної (Плексол), депресорної (Полібутен) та антифрикційної (Liqui Moly).

Продовжуючи проведені нами раніше дослідження з визначення стійкості колекційних штамів *R.erythropolis* - деструкторів моторних олиф [13] до дії чинників зовнішнього середовища (високі та низькі значення рН, температури, осмолярності), у цій роботі ми вивчали вплив вказаних параметрів на ріст свіжоізолюваних штамів *D.maris* та *Kfascians*. Отримані результати свідчать про те, що переважна більшість штамів виявляла життєздатність у діапазоні рН від 6 до 10, за виключенням *D.maris* УКМ Ас-222 та УКМ Ас-223, які слабо росли при рН 6, та штаму *Kfascians* УКМ Ас-242, який не ріс при рН 10. Жоден із досліджених штамів не був здатним до росту в умовах високої кислотності середовища (від рН 5 і нижче). Встановлено, що штами *D.maris* ростуть при температурі від 15 °С до 42 °С; на відміну від них *R.fascians* УКМ Ас-242 не здатний до росту при 42 °С. При значно нижчих температурах (5 °С - 10 °С) майже у всіх досліджених штамів (за виключенням *D.maris* УКМ Ас-220) спостерігався слабкий ріст. Штами вказаних видів витримували нагрівання при 60 °С впродовж 15 хв. Більш стійкими до високих температур виявилися *D.maris* УКМ Ас-223 та УКМ Ас-586, які витримували нагрівання 15 хв при 70 °С. Вивчення стійкості штамів до високого вмісту NaCl в середовищі показало, що найвищу галотолерантність проявляв штам *Rfascians* УКМ Ас-242, який ріс у присутності 10% NaCl. Помірна солестійкість (7% NaCl) притаманна *D.maris* УКМ Ас-220, УКМ Ас-205 та УКМ Ас-222. Наявність в середовищі культивування від 1 % до 5 % NaCl не впливала на ріст жодного з досліджених штамів.

З огляду на те, що в процесі біодеструкції мастильних матеріалів, зокрема моторних олиф,

важливу роль відіграють нокардіоподібні актинобактерії, у роботі проведено порівняльне дослідження здатності до руйнування моторних олиф ізольованими нами чистими культурами актинобактерій-деструкторів олиф та, як передбачено в ДСТУ 4247:2003, природним консорціумом мікроорганізмів стічних вод МОС. Нами встановлено, що у всіх варіантах дослідів спостерігався високий рівень біодеструкції оливи. Найвищими показниками (86,0 %) характеризувалися штами *D.maris* УКМ Ас-223 та УКМ Ас-205, дещо менші значення (83,0 %) виявлено у *D.maris* УКМ Ас-586. Деструктивна активність інших штамів *D.maris* коливалася у межах 72 %-78 %. Найнижчий рівень деструкції (47,0 %) БМО виявлено у штаму *R.fascians* УКМ Ас-242. Ступінь біорозщеплюваності оливи під дією консорціуму мікроорганізмів стічних вод досягав 84 %.

Таким чином, нами встановлено, що чисті культури нокардіоподібних актинобактерій, які ізольовані із забруднених нафтопродуктами ґрунтів, практично не відрізняються від мікроорганізмів стічних вод МОС за рівнем біодеструктивної активності щодо олиф. Слід підкреслити, що передбачена в ДСТУ можливість отримання з міських очисних споруд неактивної біологічної субстанції (інокуляту) може негативно позначитися на достовірності і відтворюваності результатів випробувань біодеструкції олиф. Отримані нами дані свідчать про те, що вказані недоліки можуть бути ліквідовані за умови використання у цьому процесі стандартизованої за показниками культуральної рідини тест-культур активних штамів вуглеводеньокиснюючих актинобактерій.

Автори висловлюють щире подяку співробітникам Українського науково-дослідного інституту нафтопереробної промисловості «МАСМА» - кандидату хімічних наук, старшому науковому співробітнику, завідувачу Лабораторії оцінки якості мастил Кобиланському Євгену Васильовичу та старшому науковому співробітнику Микитенку Володимирі Савичу за корисні консультації, надані під час проведення досліджень.

1. Евдокимов А.Ю., Фукс И. Г., Щаблина Т.Н., Багдасаров Л. Н. Смазочные материалы и проблемы экологии. - М: Нефть и газ, 2000. - 496 с.
2. Трофименко Ю. В., Касаткин А. В. Пути снижения негативного воздействия масел на окружающую среду. НТЖ Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе, 2004. - № 12. - С. 18-21.
3. Техника безопасности при транспортировке и хранении смазочных материалов. - http://www.promnafta.ru/oil/index_save_help.htm.
4. Караулов А. К., Худолый Н. И. Автомобильные масла. - Моторные и трансмиссионные. Ассортимент и применение. Справочник. - К.: Журнал «Радуга», 2000. - 436 с.
5. ДСТУ 4247:20003. Нафтопродукти. Метод визначення біорозщеплюваності (СЕС L-33-А-93, NEQ). - К.: Держспоживстандарт України, 2004. - 14 с
6. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. - М.: Медицина, 1972,- 497 с.
7. Герхардт Ф., Мюррей Р. Т. Е., Костилоу Р. Н. и др. Методы общей бактериологии- М.: Мир, 1983. - Т. 1. - 536 с.
8. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. - Изд-во МГУ, 1991. - 376 с.
9. Ногина Т. М., Гвоздяк О. Р., Шкаруба В. В., Куберская С. Л. Фенотипическое исследование и нумерический анализ штаммов коринеподобных бактерий, имеющих вариацию пептидогликана А4γ. Микробиол.журн. - 1991. - Т. 53. -№ 1. - С. 3-7.

10. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Ed. Sneath P., Mair S., Sharpe M. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1986. Vol. 2. - P.964 -1599.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology I Ed. Holt J. Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1989. Vol. 4. - 2648 P.
12. Нестеренко О. А., Квасников Е. И., Ногіна Т. М. Нокардио-подобные и коринеподобные бактерии. - К.: Наукова думка, 1985.-133 с.
13. Хоменко Л. А., Ногіна Т. М., Підгорський В.С. Здатність штамів *Rhodococcus erythropolis* до утилізації мінеральних моторних олів та їх стійкість до деяких стресових факторів // Наукові записки. - К.: Вид. дім «КМ Академія», 2005. - Т. 43: Біологія та екологія- С.38-42.
14. Унифицированные методы анализа вод. I Под ред. Ю. Ю. Лурье. - М.: Химия, 1971. - С. 340-341.
15. Лакін Г. Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа, 1980. - 290 с.

T. Noguina, L. Homenko, V. Podgorsky, S. Shamkina

NATURAL STRAINS NOCARDIOFORM ACTINOBACTERS AS DESTRUCTOR OF MOTOR OIL

Strains of actinobacteria isolated from oil-contaminated soils have been identified as Dietzia maris and Rhodococcus fascians. It has been shown that the given strains were resistant to base oil which did not contain any toxic substances and had different levels of sensitivity to all marks of mineral motor oil (MMO) and additives which contain zinc's ditiophosphat. The marked ability of the strains Dietzia maris to degrade base oil (72-78 %) proves their potential use as test strains in the study of MMO biodégradation.