

# БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ БАКТЕРІЙ РОДУ *RHODOCOCCLUS* ТА ЇХ МЕТАБОЛІТІВ

Т. П. ПИРОГ, М. О. ШУЛЯКОВА, Т. А. ШЕВЧУК, А. П. СОФІЛКАНИЧ

Національний університет харчових технологій, Київ

E-mail: [tapirog@nuft.edu.ua](mailto:tapirog@nuft.edu.ua)

Отримано 12.09.2011

Власні експериментальні результати авторів та дані літератури демонструють великий біотехнологічний потенціал бактерій роду *Rhodococcus* як деструкторів ароматичних, гетероциклічних і аліфатичних ксенобіотичних сполук (нафтаден, ксилол, толуол, етилбензен, індол, нітрофенол, трихлоретилен, вуглеводні нафти тощо), а також як продуцентів практично цінних метаболітів (поверхнево-активні речовини, антибіотики, екзополісахариди, ензими). Поверхнево-активні речовини (ПАР) є вкрай важливими продуктами мікробного синтезу, оскільки мають такі суттєві переваги перед синтетичними аналогами, як біодеградабельність, стійкість у широкому діапазоні температур, рН, а також можуть бути синтезовані з відходів інших виробництв. Розглянуто використання метаболітів родококків у природоохоронних технологіях, медицині, сільському господарстві та участь представників роду *Rhodococcus* у процесах біотрансформації для одержання ароматизаторів (карвон, гераніол), біодизеля, бутираміду, акрилової кислоти тощо.

Підсумовано власні експериментальні дані щодо інтенсифікації синтезу і практичного застосування ПАР *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. Встановлено, що за присутності як клітин, так і позаклітинних метаболітів штаму IMB Ac-5017 з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями ступінь деструкції нафти у воді і ґрунті досягав 80–93% через 30 діб. Показано, що ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 притаманна антимікробна дія щодо низки мікроорганізмів, у тому числі й фітопатогенних бактерій. У разі обробки (1–2 год) препаратами ПАР суспензії досліджуваних тест-культур спостерігали зниження кількості життєздатних клітин на 74–97%.

**Ключові слова:** бактерії роду *Rhodococcus*, деструкція ксенобіотиків, біотрансформація, поверхнево-активні речовини, полісахариди, ензими.

Ринковий інтерес до представників роду *Rhodococcus* зумовлений унікальними особливостями метаболізму цих бактерій, зокрема здатністю до розкладу багатьох ксенобіотиків та їх перетворення на менш токсичні сполуки [1–18]. Можливості використання катаболічного різноманіття родококків у природоохоронних технологіях розглянуто в огляді [16].

Великі геноми родококків, їх універсальні катаболічні шляхи, широка субстратна специфічність метаболічних систем, здатність до споживання та перетворення гідрофобних сполук, стійкість до несприятливих умов, наявність удосконалених інструментів генно-інженерної модифікації роблять їх ідеальними мікроорганізмами для використання у процесах біотрансформації і біодеградації багатьох органічних сполук у промислових масштабах [12].

## Використання представників роду *Rhodococcus* у процесах біодеградації ксенобіотиків

Хімічна, фармацевтична, сільськогосподарська, нафтопереробна та інші галузі сучасного виробництва є постійними постачальниками ксенобіотичних сполук у довкілля, що призводить до накопичення шкідливих речовин у природі. Біоремедіація — це технології використання живих організмів з метою розкладу забруднювальних речовин та перетворення їх на двоокис вуглецю і воду або менш токсичні сполуки. Такі технології зазвичай економічніші, ніж термічні та фізико-хімічні способи детоксикації, зокрема спалювання. Біоремедіація довкілля охоплює два процеси: біоаугментацію (інтродукція мікроорганізмів-деструкторів у забруднені території) та біостимуляцію

(активація природної автохтонної мікрофлори) [19, 20].

**Розкладання ароматичних та гетероциклічних сполук.** Серед представників роду *Rhodococcus* виявлено багато видів і штамів, здатних до деградації таких органічних сполук, як нафтаден, ксилол, толуен, етилбензен, дибензофуран, біфеніл, стирен, катехол, флуорен, індол, нітрофенол та ін. [1, 4, 5, 7–10, 13, 16–18, 21–23].

Так, виділений нещодавно штам *Rhodococcus jialingiae* dj1-6-2 здатен використовувати як єдине джерело вуглецю та азоту карбендазим — речовину, що її широко застосовують як фунгіцид, якому притаманний мутагенний та тератогенний ефект навіть за низьких концентрацій [17]. *R. jialingiae* dj1-6-2 може розкладати до 94% карбендазиму (100 мг/л) упродовж 60 год.

Уперше серед представників роду *Rhodococcus* було виявлено штам, ідентифікований як *Rhodococcus ruber* Chol-4, що використовує як джерело вуглецевого живлення широкий спектр стероїдних сполук, серед яких — холестерол, тестостерон, андростерон та прогестерон [5].

Нафтаден — одна з найпоширеніших ксенобіотичних сполук. Здатність до його катаболізму притаманна грамнегативним бактеріям *Pseudomonas putida* G7 і NCIB9816-4, *Ralstonia* sp. U2 та грампозитивним — *Rhodococcus opacus* R7 і *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 [4]. Останній розкладає нафтаден через саліцилову та гентизинову кислоти. При цьому гени, що кодують ці перетворення, не об'єднані в оперон. Порівняння генів, відповідальних за метаболізм нафтадену, в *R. opacus* R7 та *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 показало високий ступінь гомології, але різну їх організацію.

*Rhodococcus* sp. DK17 як єдине джерело вуглецю та енергії може використовувати *o*-ксилол, бензен, алкібензени, фенол, фталати та інші ароматичні сполуки, при цьому розклад алкілбензенів ініціюється *o*-ксилолдіоксигеназою, що складається з редуктази, ферредоксинової складової та [2Fe-2S]-оксигеназного компонента [9]. Індан — біциклічна органічна сполука, що складається з одного ароматичного та одного циклопентанового кільця. *Rhodococcus* sp. DK17 може рости на рідкому мінеральному середовищі, використовуючи індан як джерело вуглецевого живлення [10]. Структурна подібність індану та *o*-ксилолу дала підстави припустити, що ензими, які каталізують перетворення *o*-ксилолу, задіяні також у метаболізмі індану. Для перевірки

цього припущення мутантний штам *Rhodococcus* sp. DK180, не спроможний катаболізувати *o*-ксилол, вирощували на середовищі з інданом. Відсутність росту штаму DK180 на інданвмісному середовищі підтвердила висунуте авторами припущення. У ході дослідження було також запропоновано шлях розкладу індану *Rhodococcus* sp. DK17, що починається з його ароматичного окиснення до 4,5-індадіолу з наступним розривом ароматичного кільця у метоположенні під дією метилкатехол-2,3-діоксигенази [10]. Також відомо, що змішана культура *Pseudomonas* sp. NBM21 та *Rhodococcus* sp. ВТО62 у разі вирощування у біофільтрі здатна до розкладу суміші *o*-, *m*- та *p*-ксилолу зі швидкістю 180 г/м<sup>3</sup>/год при 20 °С та 100 г/м<sup>3</sup>/год при 10 °С, що значно перевищує зафіксовані раніше значення — 60–78 г/м<sup>3</sup>/год [9].

Фенол та подібні йому ароматичні сполуки є забруднювальними речовинами, що надходять у довкілля переважно з промисловими відходами. *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 здатен використовувати фенол як єдине джерело вуглецю та енергії, одночасно видаляючи формальдегід, що зазвичай також присутній у фенолвмісних стічних водах промислових підприємств [21]. Фенолгідроксилаза, що каталізує перетворення фенолу на катехол у *R. erythropolis* UPV-1, являє собою двокомпонентну флавінзалежну монооксигеназу. Її ензиматична активність пов'язана з двома окремими протеїнами, що кодуються близько розташованими генами *pheA1* та *pheA2*. Ген *pheA1* кодує протеїн з 542 амінокислот (флавінзалежна монооксигеназа), тоді як ген *pheA2* — зі 189 амінокислот (флавінредуктаза). Ці амінокислотні послідовності практично ідентичні послідовностям фенолгідроксилазних компонентів *R. erythropolis* CCM2595 і мають високий ступінь подібності з *Nocardia farcinica* IFM 10152 та *R. jostii* RHA1 [21].

Інтерес до штаму *Rhodococcus* sp. RHA1, виділеного із забрудненого гексахлорциклогексаном ґрунту, зумовлений його здатністю до ефективної деградації поліхлорованих біфенілів (ПХБ) — досить поширеного й особливо стійкого класу забруднювальних речовин [8, 13, 16, 18]. *Rhodococcus* sp. RHA1 є першим представником роду, геном якого було повністю секвеновано. Встановлено, що генетичний матеріал (9,7 Мбіт) штаму RHA1 складається з хромосоми невідомої топології та трьох великих лінійних плазмід: pRHL1 (1,100 kb), pRHL2 (450 kb) і pRHL3 (330 kb). Більшість генів,

відповідальних за деградацію ПХБ, розташовані на двох найбільших плазмідах — pRHL1 та pRHL2 [16, 18]. Третя, найменша плазміда pRHL3 містить близько 300 генів, об'єднаних у три кластери. Один з катаболічних кластерів кодує гени, відповідальні за деградацію лімонену, що було підтверджено ростом штаму RHA1 на середовищах із лімоненом, карвоном або карвеолом як джерелом вуглецю. Окрім того, плазміда pRHL3 також містить ділянку, що кодує стійкість клітини до важких металів, і три гени цитохрому P450 [18]. Серед генів хромосоми *Rhodococcus* sp. RHA1 виявлено кластер генів, що кодує ензими розкладу фенолоцтової кислоти. Цей шлях досить повно досліджено у грампозитивних бактерій, тимчасом як дані щодо особливостей його функціонування у грампозитивних — майже відсутні. На прикладі цього штаму та інших подібних можна зробити висновок, що метаболічна різноманітність бактерій роду *Rhodococcus* пов'язана з наявністю великих лінійних плазмід та функціональних гомологів ензимів [16].

Афлатоксини — надзвичайно токсичні, мутагенні та потенційно канцерогенні вторинні метаболіти (мікотоксини), синтезовані грибами *Aspergillus flavus* і *Aspergillus parasiticus* [1]. Наявність їх у продуктах харчування та зерні створює серйозні економічні та медичні проблеми в усьому світі. Афлатоксини є похідними дифуранокумарину і дещо структурно схожі з вищезгаданими ароматичними ксенобіотиками (зокрема, ПХБ), тому можуть бути розкладені аналогічними шляхами. Встановлено здатність безклітинних екстрактів *R. erythropolis* до ефективною деградації афлатоксину В<sub>1</sub> (АФВ<sub>1</sub>): значне зменшення вмісту АФВ<sub>1</sub> спостерігалось вже через 2 год, а через 72 год реєстрували лише 33,2% від початково-го вмісту токсину.

*Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469 здатен повністю розкласти 12–25 мг/л флуорену упродовж 14 днів та кометаболізувати 50–100 мг/л упродовж 2–5 днів за наявності сахарози як косубстрату [22]. Низька розчинність флуорену — велика проблема у процесі його біорозкладу, що призводить до низької біодоступності цієї сполуки як субстрату. У природі більшість мікроорганізмів, які можуть метаболізувати флуорен, продукують поверхнево-активні речовини для підвищення його біодоступності та кращого проникнення в клітину. Однак для вдосконалення процесу біоконверсії поліциклічних ароматичних вуглеводнів мож-

ливе і застосування синтетичних сурфактантів. У разі *R. rhodochrous* VKM B-2469 внесення Tween 60 у концентрації 1% (об'ємна частка) супроводжувалося інтенсифікацією метаболізму флуорену, зниженням його токсичності та підтримки росту штаму завдяки використанню сурфактанту як додаткового джерела вуглецю [22].

Оксиди сірки, що утворюються в процесі згоряння палива, призводять до кислотних дощів та забруднення повітря. Тому на сучасному етапі нафту піддають процесу гіродесульфуризації з використанням металевих каталізаторів за присутності водню під надзвичайно високою температурою і тиском [11]. У результаті такої обробки можна вилучити різні типи сполук сірки, хоча деякі гетероциклічні сірковмісні сполуки такому видаленню не піддаються. До таких речовин належать дибензотіофен (ДБТ) та його похідні, попередній розклад яких дасть змогу досягти більшого ступеня десульфуризації. Одним з підходів до вирішення цієї проблеми є біодесульфуризація за допомогою ДБТ-десульфуризуючих мікроорганізмів після стадії фізико-хімічної гіродесульфуризації. Із цією метою було ізольовано деякі види мезофільних та термофільних бактерій, здатних метаболізувати дибензотіофен: *Rhodococcus* sp. IGTS8, *R. erythropolis* D-1, *R. erythropolis* H-2, *R. erythropolis* KA2-5-1, *Paenibacillus* sp. A11-2, *Bacillus subtilis* WU-S2B та *Mycobacterium phlei* WU-F1 [3, 11]. Окрім симетричних похідних ДБТ, у дизельному паливі після гіродесульфуризації виявлено й асиметричні сірковмісні органічні сполуки, такі як нафтотіофен, бензотіофен та його похідні. Здатність окиснювати бензотіофен через сульфурспецифічні шляхи притаманна, наприклад, *Gordonia* sp. 213E, *Rhodococcus* sp. T09, *Paenibacillus* sp. A11-2 [3, 11, 16]. Селекціонований штам *Rhodococcus* sp. WU-K2R розкладає 80% нафтотіофену (0,27 мМ) упродовж 5 діб, що дає змогу розглядати цей штам як потенційно можливий біокаталізатор процесів десульфуризації [11].

Новий бактеріальний штам, ідентифікований як *R. aetherivorans* IAR1, синтезує полі-(3-гідроксибутират-3-гідроксивалеріат), використовуючи толуол як єдине джерело енергії [23]. Цей полімер характеризується гнучкістю та міцністю на рівні зі звичайними пластмасами, але його виробництво зазвичай потребує внесення дорогих попередників як вторинного джерела вуглецю. Використання толуолвмісних відходів як сировини для синтезу полімеру сприятиме

подальшому зниженню виробничих витрат поряд з ефективним використанням відходів [23].

Бензотіазоли належать до великої родини синтетичних гетероциклічних сполук і використовуються в різних галузях промисловості, наприклад, у виробництві шин як каталізatori процесів вулканізації, як лікарські засоби для лікування латерального аміотрофічного склерозу та хіміотерапії ракових захворювань, як пестициди (біоциди), а також у виробництві азобарвників [2]. Із промислових стічних вод було виділено штам *R. rhodochrous* OBT18, здатний розкласти похідні бензотіазолу, у тому числі бензотіазол, 2-гідроксибензотіазол, 2-амінобензотіазол (АБТ) і меркаптобензотіазол [2]. Для підвищення ефективності розкладу бензотіазолу запропоновано поєднання фотота/або біодеградації за присутності комплексу FeНТА (нітрилотриацетат), який є фотоіндуктором. За наявності FeНТА, навіть без світла, суттєво збільшувалася швидкість біодеградації АБТ (до 99% за 25 год) [2]. Подальші дослідження показали наявність у *R. rhodochrous* OBT18 асоційованих із клітинами поверхнево-активних гліколіпідів. Синтез ПАР, очевидно, сприяє біотрансформації гідрофобних похідних бензотіазолу.

Серед сполук, що потрапляють у довкілля в результаті антропогенної діяльності, важливе місце посідають лікарські засоби, які також відомі своєю стійкістю до біодеградації [7]. Для посилення біологічного розпаду деяких фармацевтичних препаратів використовують явище кометаболізму, додаючи в середовище легкодоступне джерело вуглецю. Так, внесення глюкози дало змогу вилучити 15% карбамазепіну, 14% сульфаметіозолу або 20% сульфаметоксазолу штамом *R. rhodochrous* ATCC 13808 [7].

**Біодеградація аліфатичних ксенобіотичних речовин.** Забруднення ґрунту й ґрунтової води хлорвмісними розчинниками, особливо трихлоретиленом (ТХЕ) стає важливою екологічною проблемою через токсичність і стійкість до розкладу [15]. За аеробних умов біологічний розпад ТХЕ відбувається переважно в результаті кометаболізму з метаном, аміаком, пропаном, фенолом, толуолом або кумолом як ростовим субстратом. Здатність до окиснення толуолу виявлено в багатьох бактерій, проте його використання як ростового субстрату для кометаболізму ТХЕ стримується високою токсичністю. Тому необхідні альтернативні способи індукції відповідних ензимів у таких бактерій. Попередньо було показано

можливість інтенсифікації біорозкладу поліхлорованих дифенілів кількома видами бактерій за допомогою рослинних ефірних олій [15]. Чотири компоненти ефірних олій (кумол, карвон, лимонен і пінен) перевірено на здатність індукувати деградацію ТХЕ у *R. gordoniae* P3 та *R. erythropolis* BD2. Найбільш ефективним виявився кумол, але використання цієї речовини обмежено через її потенційну токсичність. Такі результати стимулювали пошук нових можливих індукторів серед рослинних ефірних олій (кмину, лимону, лемонграсу, м'яти і сосни). Для досліджень було обрано штам *Rhodococcus* sp. L4, здатний до деградації ТХЕ під час росту на толуолі. За наявності у середовищі олії лимону і лемонграсу клітини штаму за 8 год інкубації здатні до деградації ТХЕ на рівні  $20 \pm 6\%$  і  $27 \pm 8\%$  відповідно, що нижче, ніж у разі використання толуолу як індуктора ( $57 \pm 5\%$ ) [15]. Здатність клітин до деградації ТХЕ збільшилася до  $36 \pm 6\%$  у разі внесення ефірної олії кмину [15].

N-нітрозодиметиламін (НДМА) є сильною канцерогенною речовиною, що потрапляє у довкілля разом із промисловими стічними водами та у питну воду як побічний продукт після дезінфекції хлорамином та іншими дезінфікувальними засобами [6]. У деяких бактерій виявлено монооксигенази із широкою субстратною специфічністю, здатні розкласти НДМА у процесі кометаболізму — пропанотрофи *Rhodococcus* sp. RHA1 і *Rhodococcus ruber* ENV425, а також *Mycobacterium vaccae* JOB5, *Pseudomonas mendocina* KR1 і метанотроф *Methylosinus trichosporium* OV3b [6]. У *R. ruber* ENV425 встановлено специфічний шлях розкладу НДМА, дещо подібний до денітрозуючого шляху у ссавців, який каталізується P-450 ізозимами. Так, кінцевими продуктами такого розкладу є закис азоту, нітрит, нітрат, формальдегід, форміат та метиламін. *R. ruber* ENV425 здатен до зниження концентрації НДМА у середовищі з 8,3 мкг/л до 2 нг/л під час росту на пропані як основному субстраті [6].

У ході інших досліджень проаналізовано здатність нативної мікрофлори із середземноморської піщаної берегової лінії на північному узбережжі Сицилії до біодеградації нафтопродуктів, де реальні аварійні розливи відбулися за 18 місяців до відбору проб [14]. Домінуючими деструкторами вуглеводнів виявились представники родів *Rhodococcus*, *Gordonia* і *Nocardia*. Усі ізоляти були здатні розкласти аліфатичні компоненти забруднювачів і жоден з них не асимілював ароматичні сполуки. Ці конкретні актинобак-

терії-деструктори *n*-алканів є перспективними для відновлення піщаних ґрунтів узбережжя Середземного моря, оскільки використання вже акліматизованих автохтонних мікроорганізмів завжди ефективніше, ніж інтродукованих деструкторів [14].

Встановлено, що *R. erythropolis* DCL14 здатен до деградації вуглеводнів (C<sub>5</sub>–C<sub>16</sub>) в інтервалі температур 15–28 °С за присутності високих концентрацій хлориду натрію (до 2,5%) [24].

Узагальнені дані щодо деструкції токсичних ксенобіотичних сполук бактеріями роду *Rhodococcus* наведено в табл. 1.

### Використання представників роду *Rhodococcus* у процесах біотрансформації

Мікроорганізми можуть брати участь у реакціях трансформації (зміна окремих ділянок у молекулах органічних речовин), перетворюючи ті чи інші сполуки на нові продукти. Умови перебігу цих реакцій м'які, і в багатьох випадках мікробіологічним трансформаціям віддають перевагу перед хімічними. Можливе також використання біологічних процесів у випадках, де прямий хімічний синтез молекул нездійснений або неефективний. На сучасному етапі біотрансформації становлять інтерес у промисловому виробництві з погляду отримання продуктів

з відновної, дешевої органічної рослинної сировини [12, 25].

З ґрунту, де росте хміль, методом накопичувальних культур було виділено штам *R. erythropolis* MLT1, що використовує β-мірцен як єдине джерело вуглецю [25]. Після інкубації бактерій у середовищі з 7,4 мМ β-мірцену визначено основний продукт біотрансформації — гераніол. Цей монотерпеновий спирт широко застосовують у парфумерії, для ароматизації мила та мийних засобів, виробництва інших ароматизованих сполук. Основним способом його промислового отримання є хімічний синтез з β-пінену і лише незначну частину одержують із природної сировини.

Ще один ароматизатор — R(–)-карвон — також можна одержувати біотрансформацією (–)-транс-карвеолу [26]. Ефірні олії, що містять багато карвону, використовують у харчовій промисловості, ароматерапії, вони входять до складу освіжувачів повітря тощо. *R. erythropolis* DCL14 здатен перетворювати (–)-транс-карвеол на R(–)-карвон [87]. Встановлено, що продуктивність утворення карвону в однофазному ферментері об'ємом 3 л становила 31 мг/л·год [26]. Гетерофазне культивування штаму DCL14 за присутності силіконової олії дало змогу підвищити вихід карвону в 2,5 раза [27].

*R. oracus* В-4, ізольований як стійкий до органічних розчинників мікроорганізм, здатен

Таблиця 1. Деструкція ксенобіотиків бактеріями — представниками роду *Rhodococcus*

Штам	Ксенобіотична сполука	Концентрація	Ступінь деструкції	Література
<i>R. jialingiae</i> djl-6-2	Карбендазим	100 мг/л	94% (60 год)	[17]
Змішана культура <i>Pseudomonas</i> sp. NBМ21 та <i>Rhodococcus</i> sp. ВТО62	Суміш <i>o</i> -, <i>m</i> - та <i>n</i> -ксилолу	Біофільтр	180 г/м <sup>3</sup> /год	[9]
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	Суміш поліхлорованих біфенілів	10 мг/мл	80–100% (72 год)	[13]
<i>R. erythropolis</i> DSM 14303	Афлатоксин В <sub>1</sub>	1,75‰	66,8% (72 год)	[1]
<i>R. rhodochrous</i> VKM В-2469	Флуорен	1 мМ	100% (24 год)	[22]
<i>Rhodococcus</i> sp. WU-K2R	Нафтотіофен	0,27 мМ	80% (120 год)	[11]
<i>R. aetherivorans</i> IAR1	Толуол	10 мл/л	100% (48 діб)	[23]
<i>R. rhodochrous</i> OBT18	2-амінобензотіазол	0,5 мМ	99% (25 год)	[2]
<i>R. rhodochrous</i> ATCC 13808	Карбамазепін	9,5‰	15% (28 діб)	[7]
	Сульфаметіозол	43,4‰	14% (12 діб)	
	Сульфаметоксазол	31,6‰	20% (36 діб)	
<i>Rhodococcus</i> sp. L4	Трихлоретилен	80 мМ	36% (8 год)	[15]
<i>R. ruber</i> ENV425	N-нітрозодиметиламін	8,3 мг/л	76% (18 год)	[6]
<i>R. erythropolis</i> DCL14	Мазут	2–32 мл/л	100% (9 міс.)	[24]

використовувати як гідрофільні, так і гідрофобні субстрати [28]. Встановлено, що цей штам може утворювати індиго з індолу та *o*-крезол з толуолу за одночасного споживання глюкози й олеїнової кислоти. Так, за 12 год *R. oracus* В-4 утворював індиго і *o*-крезол (0,217 і 2,12 мг/мл відповідно). Можливість отримання цих речовин за допомогою простих біологічних перетворень є потенційно важливою з практичного погляду, оскільки на сучасному етапі їх одержують складним хімічним синтезом.

Бактерію, що розкладає нікотин, використовуючи його як єдине джерело вуглецю й азоту, було ізольовано та ідентифіковано як *Rhodococcus* sp. Y22 [29]. Нікотин (1,0 г/л) був метаболізований цим штамом упродовж 52 год при 28 °С та рН 7,0. Встановлено, що клітини *Rhodococcus* sp. Y22 здатні розкласти нікотин як із розчинів, так і з тютюнового листа. Це робить *Rhodococcus* sp. Y22 можливим біологічним агентом для розкладу нікотину під час оброблення листа тютюну у процесі промислового виробництва тютюнових виробів [29].

Біодизель, моноалкілефіри довголанцюгових жирних кислот з коротколанцюговими спиртами, синтезовані з триацилгліцеридів (ТАГ), можуть бути одержані з відновлювальних джерел (рослинної біомаси). Бактерії родів *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* здатні накопичувати ТАГ за ліміту азоту [30]. Встановлення можливості синтезу ТАГ за високих концентрацій глюкози є важливою передумовою для одержання цих сполук з целюлозо- та крохмалевмісної сировини. Показано, що в процесі росту *R. oracus* PD630 на мелясі вміст ТАГ у клітинах досягає 52% [31]. Такі дані свідчать, що цей штам можна вирощувати на дешевих джерелах вуглецю, отриманих із сільськогосподарських культур, для виробництва біодизельного палива.

Акрилову кислоту застосовують у виробництві акрилових ефірів (метилакрилат, етилакрилат, бутилакрилат і 2-етилгексилакрилат), використовуваних для одержання промислових покриттів, клеїв, паперу, текстильних виробів, смол, флокулянтів тощо [32]. Поточний промисловий попит на акрилову кислоту задовольняється хімічним синтезом, який базується на каталітичному окисненні пропілену через акролеїн в одну або дві стадії. Біотехнологічні та біокаталітичні процеси є економічнішими і безпечнішими. Із забрудненого нафтою зразку ґрунту було ізольовано штам, ідентифікований як *Rhodococcus ruber* AKSH-84, здатний здійснювати біотрансформацію акрилонітрилу в акрилову кислоту [32]. Порівняно з іншими джерелами вуглецю у разі росту на гліцеролі (10 г/л) спостерігали високу нітрилазну активність, що забезпечувала біоконверсію акрилонітрилу в акрилову кислоту. Молекулярна маса очищеного ензиму становила майже 41 кДа, що близько до молекулярної маси нітрилази *R. rhodochrous* K22 [33]. Нітрилази *R. ruber* AKSH-84 притаманна широка субстратна специфічність і здатність гідролізувати різні нітрили (аліфатичні моно- і динітрили, ароматичні, гетероциклічні) у концентрації 100 мМ. Якщо для інтактних клітин ефективність біоконверсії становила 63% (за концентрації акрилової кислоти 126 мМ) через 120 хв, то за використання очищеної нітрилази — 92% за концентрації акрилової кислоти 183 мМ через 30 хв (рис. 1) [32]. Ці дослідження показують, що біотрансформація акрилонітрилу в акрилову кислоту за допомогою нового штаму *R. ruber* AKSH-84 може бути використана в «зеленому» біосинтезі акрилової кислоти [32].

Найкращий приклад промислового використання нітрилгідратази *R. rhodococcus* J1 — виробництво акриламідів з акрилоні-

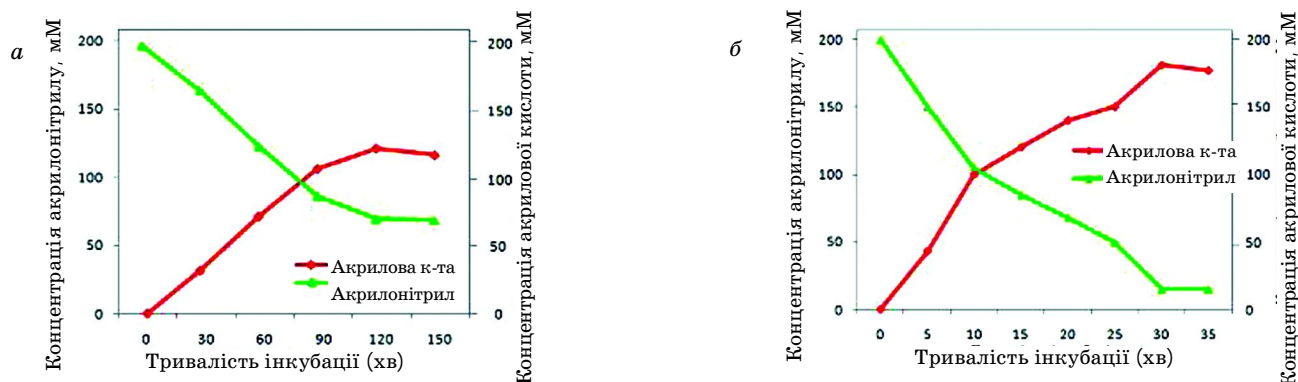


Рис. 1. Біотрансформація акрилонітрилу в акрилову кислоту:

а — інтактними клітинами, б — за допомогою очищеної нітрилази *Rhodococcus ruber* AKSH-84 [32]

рилу, що на цей час сягає 30 тис. т/рік [3]. Високоактивну нітрилгідратазу, виділену зі штаму *R. ruber* gt1, іммобілізували на немодифікованих оксидах алюмінію і вуглецевмісних сорбентах, що супроводжувалося підвищенням у кілька разів її термостабільності [34].

Бутирамід — важлива хімічна речовина, що набула застосування для синтезу гідроксамових кислот і регулювання реологічних характеристик систем під дією електричного поля. Нітрилгідратаза *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 каталізує перетворення бутиронітрилу в бутирамід [35]. Вихід бутирамиду становив 597 г за таких умов: культивування у ферментері об'ємом 1 л упродовж 6 год при температурі 10 °С, концентрація бутиронітрилу 60% (об'ємна частка) [36]. У ході подальшої роботи штаму *R. rhodochrous* PA-34 було піддано дії хімічного мутагену *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину. Отриманий мутантний штаму характеризувався синтезом нітрилгідратази із вдвічі вищою активністю [35]. Такі результати відкривають нові можливості для інтенсифікації процесів біотрансформації, що відбуваються під дією цього ензиму.

Оскільки робота над дослідженням і вивченням шляхів метаболізму, генів і їх послідовностей, структури специфічних ензимів та їхньої дії триває, можливі й інші галузі та напрями використання бактерій роду *Rhodococcus*.

### Практичне використання метаболітів, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*

До метаболітів, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*, що набули практичного застосування у сучасних технологіях, належать поверхнево-активні речовини, екзополісахариди, антибіотики і сполуки з антимікробними властивостями та ензими.

**Антибіотики та антибіотичні сполуки.** З культуральної рідини штаму *Rhodococcus jostii* K01-B0171 на хроматографічних колонках було виділено й очищено два антимікобактеріальні пептиди, названі ларіатин А і ларіатин В [37]. Ці речовини пригнічували ріст *Mycobacterium smegmatis* за концентрації 3,13 і 6,25 мкг/мл відповідно. Крім того, ларіатин А інгібував ріст *Mycobacterium tuberculosis* за концентрації 0,39 мкг/мл [37].

Інший антибіотик, аурацин RE, було ізольовано з культуральної рідини *R. erythropolis* JCM 6824 [38]. За хімічною приро-

дою аурацин RE подібний до аурацину С — антибіотика, синтезованого *Stigmatella aurantiaca* [39]. Однак порівняно з аурацином С, RE притаманна ширша та сильніша антибактеріальна дія на грампозитивні бактерії [38].

*Rhodococcus fascians* — відомий фітопатоген, що вражає як покритонасінні, так і голонасінні рослини [40–43]. У лабораторних умовах культивування цих бактерій синтезу антибіотиків не спостерігали, доки їх не помістили в умови жорсткої конкуренції, вирощуючи спільно зі *Streptomyces padanus* [44]. Синтезовані за таких умов речовини, названі родострептоміцинами, належать до того самого класу аміноглікозидів, що й стрептоміцин. Уже перші ж тести показали, що родострептоміцини ефективно знищують пов'язані з гастритом і виразкою шлунка бактерії *Helicobacter pylori* й не інактивуються в умовах підвищеної кислотності (наприклад, за присутності шлункового соку).

**Екзополісахариди.** Відомо, що бактеріям роду *Rhodococcus* притаманна здатність до синтезу екзополісахаридів (ЕПС) [45–47]. Так, бензентолерантний штаму *Rhodococcus* sp. 33 може утворювати значну кількість позаклітинного полісахариду, який було названо «33 EPS». Він сприяє підвищенню стійкості клітин продуцента до бензину, особливо на початкових етапах взаємодії з токсичною сполукою. Встановлено, що цей ЕПС складається з D-галактози, D-глюкози, D-манози, D-глюкуронової кислоти та пірвіноградної кислоти у молярному співвідношенні 1:1:1:1:1 [46].

*R. rhodochrous* S-2 синтезує позаклітинний полісахарид масою в кілька мільйонів дальтон, що складається з D-глюкози, D-галактози, D-манози, D-глюкуронової кислоти у молярному співвідношенні 1:1:1:1 [47]. У його структурі було також виявлено 0,8% (масова частка) октадеканової та 2,7% (масова частка) гексадеканової кислот. Показано, що за присутності цього ЕПС дикі штами родококків, не здатні засвоювати вуглеводні нафти, набувають такої здатності. Подальші дослідження показали, що додавання ЕПС штаму S-2 до забрудненої нафтою морської води підвищувало деградацію поліароматичних вуглеводнів нафти, супроводжувалося емульгуванням нафти і збільшенням кількості морських бактерій, що розкладають поліароматичні вуглеводні [45].

**Ензими.** Мікробні холестериноксидази каталізують окиснення й ізомеризацію холестеролу. Інтерес до цих ензимів полягає передусім у можливості використання їх

для визначення холестеролу в біологічних зразках, харчових продуктах, а також у біоконверсії багатьох  $\beta$ -гідроксистероїдів у органічні розчинники [48]. *R. erythropolis* ATCC 25544 синтезує асоційовану з клітинами (55%) та позаклітинну (45%) холестеролоксидазу, *Rhodococcus* sp. 501 — позаклітинну холестеролоксидазу за умов росту на середовищі з холестеролом як єдиним джерелом вуглецю [49].

Бактерії роду *Rhodococcus* також синтезують ще один практично цінний ензим — кокаїнестеразу (КокЕ), яку останнім часом розглядають як потенційний терапевтичний агент для лікування передозування та кокаїнової залежності [50, 51]. КокЕ безпосередньо розкладає кокаїн у неактивні продукти, тимчасом як традиційні підходи вимагають блокади кокаїну на безлічі моноамінних транспортерів та іонних каналів. Повноцінності нативної форми КокЕ перешкоджає його інактивація при 37 °С. У ході селективної роботи було отримано мутантний штам, що продукує термостабільну форму цього ензиму Cose-1169K/G173Q [50]. Кінетичні дослідження *in vitro* показують, що період напіврозпаду Cose-1169K/G173Q становить 2,9 доби при 37 °С, що в 340 раз більше, ніж для нативної форми. Отже, головні перешкоди для клінічного застосування КокЕ полягають у його термонестабільності, швидкій деградації циркулюючими протеазами і потенційній імуногенності. Для розв'язання цих проблем було вирішено модифікувати ензим приєднанням поліетиленгліколю (ПЕГ). Отримані дані свідчать, що така модифікація сприяє захисту КокЕ від теплової деградації та дії протеаз. Окрім того, попередні результати *in vivo* доводять, що ПЕГ-форма КокЕ, як і нативна КокЕ, змогла захистити тварин від спричинених кокаїном отруйних ефектів [51].

**Поверхнево-активні речовини.** Представники роду *Rhodococcus* є відомими продуцентами поверхнево-активних та емульгуювальних речовин, яким притаманний значний практичний потенціал.

Перші статті, у яких були описані представники роду *Rhodococcus* як продуценти речовин із поверхнево-активними властивостями, з'явилися у 70–80-х роках ХХ ст. [52–54]. Відтоді було проведено значну теоретичну та практичну роботу з дослідження ПАР-синтезувальної здатності цих бактерій. Так, було визначено, що за хімічною природою синтезовані родококами поверхнево-активні речовини є трегалозоміколатами, встановлено закономірності їх синтезу, ме-

ханізми дії та роль для клітин [55–59]. Бактерії роду *Rhodococcus* розглядають як продуценти практично цінних речовин з емульгуювальними та поверхнево-активними властивостями в узагальнюючих оглядах [55, 57].

Деякі ПАР, синтезовані родококами, є навіть ефективнішими за синтетичні або взагалі не мають синтетичних аналогів [58, 59].

Однак якісний склад ПАР різних видів та штамів відрізняється. Зокрема, у *R. erythropolis* 51T7 ПАР — трегалозотетрафір, що складається із шести компонентів: одного великого та п'яти менших, при цьому гідрофобна складова містить від 9 до 11 атомів вуглецю [60]. ПАР, утворені *R. fascians* A-3, — це рапнорівні гліколіпіди [61]. *R. erythropolis* 3C-9 утворює 2 типи ПАР: вільні жирні кислоти та гліколіпіди [62]. Виявлено щонайменше 12 видів вільних жирних кислот  $C_9$ – $C_{22}$  та 2 види гліколіпідів: гліколіпіди та трегалозоліпіди, які, окрім вуглеводної складової, також відрізняються кількістю ненасичених жирних кислот та довжиною їхніх ланцюгів, що входять до складу ліпідної складової ПАР [62]. *R. ruber* продукує ПАР, основними компонентами яких є вільні жирні кислоти [63]. *R. fascians* DSM 20669 синтезує типові для родококів поверхнево-активні трегалозоліпіди [64].

Водночас у складі ПАР *Rhodococcus* sp. TW53 не було виявлено трегалозоліпідів [65]. У результаті екстракції цього комплексу ПАР сумішшю хлороформ/метанол/вода та подальшого хроматографічного аналізу основну його складову було визначено як ліпопептид, а отже, TW53 є першим відомим представником бактерій роду *Rhodococcus*, що його синтезує. Було запропоновано назву — родофактин. Визначення ліпофільної фракції показало, що ліпопептид містить принаймні шість жирних кислот з довжиною ланцюга  $C_{14}$ – $C_{19}$ , серед яких насичені кислоти становлять 81,44%, а пальмітинова кислота — більшу частину (58,62% від загальної кількості). Гідрофільний фрагмент ліпопептиду складається з п'яти видів амінокислот: Ala-Ile-Asp-Met-Pro. Мінімальне значення поверхневого натягу очищеного родофактину становило 30,7 мН/м [65].

*Rhodococcus wratislaviensis* BN38 синтезує ПАР за присутності лімітуючих концентрацій азоту і лише на гідрофобних субстратах, використовуючи *n*-алкани — від *n*-октану до *n*-гептадекану [66]. Аналіз показав, що за хімічною природою утворені ПАР являють собою 2,3,4,2'-трегалозотетра-

ефір, в якому вуглецеві атоми у положеннях 2, 3 і 4 етерифіковані залишками октанової кислоти, а молекулярна маса становить 876 г/моль. Виявлено також слідові кількості іншого 2,3,4,2'-тетраефіру трегалози з молекулярною масою 849 г/моль. Поверхневий натяг води поступово знижувався зі збільшенням концентрації ПАР від 72 мН/м до 24,4 мН/м і за концентрації від 5 мг/л ККМ залишався постійним [66].

Субстрат, використовуваний продуцентом як джерело вуглецю, певною мірою впливає на структуру і властивості ПАР. Зокрема, ріст *R. erythropolis* АТСС 4277 на гліцеролі призводить до вивільнення в культуральну рідину речовин з поверхнево-активними властивостями, зазвичай зв'язаними з клітинною стінкою [67].

*Rhodococcus* sp. ТА6 було виділено із забрудненого нафтою іранського ґрунту [68]. Штам синтезує позаклітинний комплекс поверхнево-активних речовин із моногліцеридів, дигліцеридів, гліколіпідів та міколової кислоти. Подальші дослідження показали, що ПАР, утворені ТА6, виявляють емульгвальну специфічність щодо довгоголанцієвих вуглеводнів, здатні утворювати стабільні емульсії з різних вуглеводнів — від пентану до легкого моторного мастила [68].

У наших попередніх дослідженнях із забруднених нафтою зразків ґрунту і води було виділено штам нафтоокиснювальних бактерій, ідентифікований як *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 [69]. Штам зареєстровано в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за номером ІМВ Ас-5017.

Встановлено здатність штаму *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезувати метаболіти з поверхнево-активними і емульгвальними властивостями під час росту на гідрофільних (глюкоза, етанол) та гідрофобних (рідкі парафіни, гексадекан) субстратах [70–72]. Порівняно з відомими продуцентами ПАР штам має такі переваги: синтезує ПАР на середовищі з низьким вмістом солей (3 г/л), не потребує факторів росту, характеризується високим виходом ПАР від субстрату (до 70%).

Показано, що *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР, які за хімічною природою є комплексом гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів зі сполуками полісахаридно-протеїнової природи [70, 71]. Гліколіпіди представлені трегалозомоно- і диміколатами, фосфоліпіди — фосфатидилгліцеролом, фосфатидилетаноламіном, дифосфатидилгліцеролом, нейтральні ліпіди — цетиловим спиртом,

пальмітиною кислотою, метиловим ефіром *n*-пентадеканової кислоти, тригліцеридами, міколовими кислотами та ін.

Встановлено можливість інтенсифікації синтезу ПАР оптимізацією умов культивування продуцентів як у колбах, так і в лабораторному ферментері [70–73], внесенням у середовище з етанолом чи гексадеканом  $C_4$ -дикарбонових кислот (попередників глюконеогенезу) і цитрату (регулятора синтезу ліпідів) [74–77], модифікацією середовища на основі дослідження особливостей метаболізму гексадекану в штаму ІМВ Ас-5017 (зниження в середовищі культивування вмісту інгібіторів і підвищення активаторів ключових ферментів біосинтезу ПАР) [78].

Так, визначення оптимальних умов культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на етанолі (концентрація субстрату 2%, концентрація  $KNO_3$  — 1,5 г/л, тривалість культивування — 168 год) дало змогу утричі підвищити синтез ПАР [70]. Максимальний синтез ПАР під час культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на гексадекані в колбах на качалці спостерігався за таких умов: концентрація гексадекану 2%, співвідношення С/Н = 49:1, джерело азоту  $NaNO_3$ , наявність у середовищі іонів заліза, коефіцієнт масообміну 0,14 г  $O_2$ /л год, тривалість культивування 168 год [71].

Встановлено, що катіони калію є інгібіторами алкангідроксилази і НАДФ<sup>+</sup>-залежної альдегіддегідрогенази, а катіони натрію — активаторами цих ферментів у штаму ІМВ Ас-5017 [78]. Зниження в середовищі культивування концентрації катіонів калію до 1 мМ, підвищення вмісту катіонів натрію до 35 мМ, внесення 36 мкмоль/л іонів заліза (II), необхідного для функціонування алкангідроксилази, супроводжувалося збільшенням активності ферментів метаболізму *n*-гексадекану, а також підвищенням у 4 рази кількості синтезованих ПАР [78].

Необхідним етапом розроблення технології мікробного синтезу є масштабування процесу на ферментаційному обладнанні. Культивування продуцента у ферментері дає змогу також дослідити вплив на біосинтез таких важливих параметрів, як аерація, швидкість перемішування, режим внесення субстрату, рН та ін., що суттєво підвищує ефективність технології.

Незважаючи на велику кількість публікацій, присвячених дослідженням мікробних ПАР [55, 57, 79–82], відомості про масштабування технологій їх біосинтезу чи особливості утворення цих продуктів мікробного синтезу у процесі культивування

мікроорганізмів-продуцентів у лабораторних біореакторах нечисленні [55, 67, 83–86]. Перші такі повідомлення з'явилися наприкінці 70-х — у середині 80-х років ХХ ст. і стосувалися масштабування процесів біосинтезу поверхнево-активних трегалозоліпідів [52] і рамноліпідів [87, 88]. Пізніше відомості про культивування у біореакторах бактерій роду *Rhodococcus* — продуцентів ПАР було підсумовано в огляді [55]. Проте зазначимо, що дотепер у літературі є дуже мало даних про біосинтез ПАР родококами у біореакторах. Можливо, однією з причин цього є той факт, що ПАР-синтезувальна здатність представників роду *Rhodococcus* дещо нижча, ніж продуцентів інших поверхнево-активних гліколіпідів (рамно-, софоро-, манозоеритритоліпідів). Окрім того, неоліком родококів як продуцентів ПАР є повільний ріст і, як наслідок, висока тривалість процесу біосинтезу цільового продукту. Так, під час культивування *R. erythropolis* ATCC 4277 упродовж 51 год у ферментері об'ємом 1,5 л на середовищі з гліцеролом (15 г/л) кількість синтезованих ПАР становила лише 1,7 г/л [67]. У разі використання як джерела вуглецю *n*-алканів (20 г/л) кількість ПАР, утворюваних *R. erythropolis* DSM 43215 у біореакторі (50 л) на 36-ту–38-му год росту, досягала 2 г/л [52], а під час культивування цього самого штаму у ферментері об'ємом 20 л упродовж 160 год на середовищі, що містило 100 г/л *n*-алканів, — 32 г/л [55]. Штам *R. erythropolis* SD-74 через 240 год вирощування у біореакторі об'ємом 5 л синтезував з 80 г/л *n*-гексадекану до 40 г/л ПАР [55]. У більшості випадків високої концентрації ПАР було досягнуто під час синтезу цих сполук іммобілізованими клітинами бактерій роду *Rhodococcus* чи клітинами, які перебували у стані спокою.

Нещодавно з'явилося повідомлення про штам *Rhodococcus* sp. Moj-3449, який харак-

теризувався високою швидкістю росту (до 0,2 год<sup>-1</sup>) на середовищах з 180 г/л алканів чи сирової нафти [89]. Проте в цій роботі відсутня інформація про здатність штаму Moj-3449 до синтезу ПАР.

Наші дослідження щодо утворення ПАР у процесі періодичного культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у ферментері АК-210 на середовищі з *n*-гексадеканом показали, що максимальні показники синтезу ПАР (концентрація позаклітинних ПАР 7,2 г/л, індекс емульгування культуральної рідини 50%, вихід ПАР від субстрату 50%) спостерігалися за концентрації розчиненого кисню 60–70% від насичення повітрям, рН 8,0, поетапної подачі субстрату порціями по 0,3–0,4% кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4% (об'ємна частка) та використанні 10% инокуляту, вирощеного до середини експоненційної фази на середовищі з 1,0% *n*-гексадекану [73]. Реалізація процесу біосинтезу ПАР на ферментаційному обладнанні дала змогу підвищити у 2 рази кількість синтезованих ПАР і скоротити у 3,5 раза тривалість культивування продуцента порівняно з вирощуванням у колбах на качалці [73].

У табл. 2 наведено порівняльні показники синтезу ПАР штаммом ІМВ Ас-5017 та іншими представниками роду *Rhodococcus* під час культивування в біореакторах на середовищах з *n*-алканами. Як свідчать наведені дані, селекціонований нами штам *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 не поступається, а за деякими показниками перевищує відомі продуценти. Так, у процесі вирощування штаму ІМВ Ас-5017 у біореакторі (у встановлених оптимальних умовах) синтезуються переважно позаклітинні ПАР, тимчасом як для інших родококів у літературі (табл. 2) наводиться концентрація сумарних поверхнево-активних речовин (як асоційованих із клітинами, так і позаклітинних).

Таблиця 2. Порівняльні показники синтезу ПАР під час культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 та інших представників роду *Rhodococcus* у біореакторах

Штам, література	Джерело вуглецю, концентрація, г/л	Біомаса, г/л	ПАР			Тривалість процесу, год
			г/л	вихід, % (від субстрату)	г / г біомаси	
DSM 43215 [52]	C <sub>12</sub> –C <sub>18</sub> – <i>n</i> -алкани; 20,0	19,0	2,0	10	0,11	38
DSM 43215 [55]	C <sub>10</sub> – <i>n</i> -алкани; 100,0	8,0	32,0	32	4,0	160
SD-74 [55]	<i>n</i> -гексадекан; 80,0	12,0	40,0	50	3,3	240
ІМВ Ас-5017 [73]	<i>n</i> -гексадекан; 14,4	1,7	7,2	50	4,2	48

Подальші наші дослідження показали можливість інтенсифікації синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за наявності у середовищі з етанолом цитрату (регулятор синтезу ліпідів) і фумарату (попередник глюконеогенезу) [74, 75, 77]. Збільшення на 40–100% показників синтезу ПАР за умови внесення цитрату (0,1%) і фумарату (0,2%) на початку стаціонарної фази росту продуцента зумовлено активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення в 1,4–1,5 і 3,4–3,6 рази активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази, відповідно, а також зниження в 1,5–1,6 рази активності ізоцитратдегідрогенази [74, 75].

Підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за умови внесення у середовище з *n*-гексадеканом фумарату і цитрату спричинено інтенсифікацією синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів, про що свідчило збільшення у 3–5 раз активності фосфоенолпіруватсинтетази і трегалозофосфатсинтази порівняно з вирощуванням штаму на *n*-гексадекані [78].

**Практичне використання ПАР родококів.** У класичних методах мікробної інтенсифікації нафтовидобутку мікроорганізми синтезують полімери і поверхнево-активні речовини, які знижують поверхневий натяг між фазами нафта–грунт, що сприяє вилученню нафти [90]. Такі мікроорганізми мають бути стійкими до суворих екологічних умов нафтородовищ, у тому числі й до високої температури, тиску, солоності й низької аерації [90]. Тому перспективнішим є застосування у процесах нафтовидобутку мікробних ПАР замість живих мікроорганізмів [68].

ПАР бактерій роду *Rhodococcus* можна ефективно використовувати у природоохоронних технологіях, зокрема, для очищення ґрунту та води від нафти [3, 20, 56, 58, 59]. Доведено, що внесення ПАР родококів у ґрунт призводить не тільки до підвищення ступеня біодеградації нафти, а й до суттєвого збільшення популяцій бактерій, які беруть участь в окисненні сирої нафти. Під дією поверхнево-активних речовин бактерій роду *Rhodococcus* також починається розкладання ароматичних та аліфатичних вуглеводнів і на 20–25% прискорюється процес біологічного очищення [20].

У наших дослідженнях [69] показано можливість очищення води, забрудненої нафтою (100–200 мг/л), іммобілізованими на керамзиті клітинами *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017. Ступінь очищення води від нафти за швидкості подачі води 0,68 л/хв, аерації

0,1 л/л за хв та періодичному додаванні 0,01% діамонійфосфату становив 99,5–99,8%. Встановлено, що за присутності у накопичувальній культурі нафтоокиснювальних бактерій штаму *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017 і екзогенних ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27, ефективність розкладання сирої нафти (2%) досягала 93–94% [91]. Ступінь деструкції нафти (2,6 г/л) у воді за присутності суспензії клітин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 становила 92% через 50 діб [92].

Наступні наші дослідження показали перспективність використання ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у природоохоронних біотехнологіях для очищення довкілля від нафти. Так, через 30 діб (рис. 2) ступінь деградації нафти (2,6 г/л) у воді за присутності 5% (об'ємна частка) препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини або її супернатанта становив 80–93%.

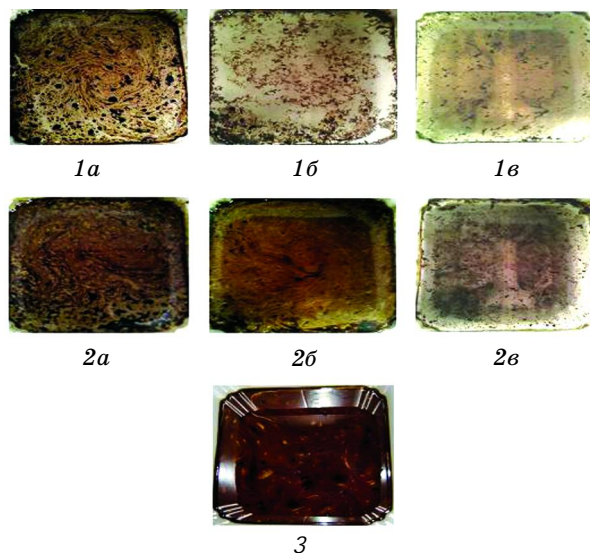


Рис. 2. Деструкція нафти різними препаратами поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017:

1 — нативна культуральна рідина;  
2 — супернатант культуральної рідини;  
3 — контроль (без обробки).

Тривалість експозиції: а — 1 доба, б — 12 діб, в — 30 діб

Інтенсифікація деструкції нафти зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікрофлори під впливом поверхнево-активних речовин.

Через 30 діб ступінь деградації нафти (21,4 г/кг ґрунту) за присутності препаратів ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (100–300 мл/кг ґрунту) у вигляді постферментаційної культуральної рідини становив

46–86% (табл. 3). За присутності ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 у вигляді нативної культуральної рідини (30 мл) відмивання піску від нафти (0,1 мл нафти/1 г піску) становив 100%.

ПАР *Rhodococcus* sp. ТА6 [68], виявилися стабільними за високої солоності (10% NaCl), підвищених температур (стабільність властивостей навіть після автоклавування при 120 °С упродовж 15 хв) і в широкому діапазоні рН (4,0–10,0). Препарати ПАР у вигляді культуральної рідини здатні видаляти до 70% нафти із забрудненого піску. Ці дані вказують на потенційну цінність ПАР ТА6 для інтенсифікації процесів нафтовидобутку, особливо у родовищах з екстремальними умовами [68].

Таблиця 3. Вплив препаратів ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на ефективність очищення ґрунту від нафти

Препарати ПАР	Концентрація препаратів ПАР, мл/кг ґрунту	Концентрація залишкової нафти в пробі, г	Ступінь деструкції нафти, %
Культуральна рідина	100	7,0±0,012	67,3±2,3
	200	5,7±0,023	73,4±2,7
	300	2,9±0,019	86,4±2,0
Супернатант	100	11,6±0,026	45,8±2,1
	200	10,4±0,015	51,4±2,2
	300	9,3±0,021	56,5±2,7
Контроль	0	21,4±0,015	0

Синтезовані родококами трегалозоліпіди розглядають і як терапевтичні агенти [93, 94]. Гліколіпідний комплекс, синтезований *Rhodococcus ruber*, нетоксичний і не спричиняє відчутного ефекту на проліферативну активність лейкоцитів периферичної крові [94]. У фракції моноцитів ПАР активізує утворення ІЛ-1бета і фактора некрозу пухлин-альфа, не впливаючи на утворення ІЛ-6. У мононуклеарній фракції гліколіпід не впливав на продукцію цих цитокінів. Ці результати вказують на перспективи подальших досліджень імуномодуючої та антипухлинної дії препарату ПАР. Гліколіпідний комплекс *Rhodococcus ruber* IEGM 231 стимулює синтез ІЛ-12, ІЛ-18 та активних форм кисню клітинами вродженого імунітету [93]. При цьому ПАР неістотно впливав на утворення ІЛ-10 моноцитами та мононуклеарними клітинами

Перші повідомлення про антивірусні властивості мікробних ПАР родококів з'явилися ще наприкінці 80-х років ХХ ст.

[53, 54]. Так, ПАР *R. erythropolis* виявляли антивірусну дію щодо простого вірусу герпесу 1 (HSV-1) та вірусу грипу.

Наші дослідження [95–97] показали, що, що препарати ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (0,61–2,1 мг/мл) у вигляді супернатанта культуральної рідини виявляють антимікробну дію щодо ряду мікроорганізмів (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3). Не виявлено інгібуючого впливу препаратів ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на клітини *S. cerevisiae* ОБ-3 і *Escherichia coli* ІЕМ-1 та антифунгальної дії ПАР щодо *Aspergillus niger* Р-3 і *Fusarium culmorum* Т-7.

Виживання мікробних клітин залежало від концентрації ПАР у препаратах, тривалості експозиції, а також фізіологічного стану тест-культур. Через 2 год оброблення досліджуваними препаратами ПАР спостерігали загибель 97% клітин *B. subtilis* БТ-2, 85% — *C. tropicalis* ПБТ-5 і 74% — *C. albicans* Д-6 [95].

У наших подальших експериментах було встановлено, що ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 посилюють антимікробну дію олії чайного дерева на певні мікроорганізми (*C. albicans*, *A. niger*, *S. aureus*) завдяки власним як антимікробним, так і емульгувальним властивостям [96, 97]. Показано, що за одночасного внесення у суспензію досліджуваних тест-культур (10<sup>4</sup>–10<sup>5</sup> клітин/мл) емульсії на основі олії чайного дерева (12,5 мкл/мл) і ПАР (0,43 мг/мл) кількість живих клітин через 15 хв експозиції була на 0,7–66% нижчою, ніж у разі оброблення суспензії мікроорганізмів препаратами олії без поверхнево-активних речовин.

Зазначимо, що поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 виявляли антимікробну дію щодо ряду фітопатогенних бактерій — *Pseudomonas syringae* 8511, *Pseudomonas corrugata* 9070, *Pectobacterium carotovorum* 8289, *Xantomonas vesicatoria* 7790 (рис. 3). Експерименти показали, що зі збільшенням тривалості експозиції з 1 до 2 год виживання *X. vesicatoria* 7790 і *P. syringae* 8511 за присутності препаратів ПАР штаму ІМВ Ас-5017 (0,8 мг/мл) становило всього 11–12%.

Наведені дані дають змогу розглядати ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 як перспективні для використання не тільки у медицині, а й у сільському господарстві для пригнічення фітопатогенних бактерій.

Ринковий інтерес до бактерій роду *Rhodococcus* зумовлений їхніми широкими метаболічними можливостями і здатністю до синтезу низки практично цінних мета-

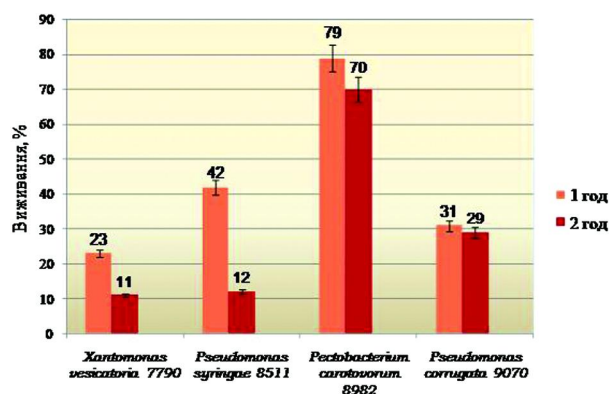


Рис. 3. Антимікробна дія ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на деякі фітопатогенні бактерії

болітів: поверхнево-активних та емульгуювальних речовин, флокулянтів, полімерів, антибіотиків, ензимів тощо.

Дані літератури свідчать про величезний потенціал цих бактерій як деструкторів ароматичних, гетероциклічних та аліфатичних

## ЛІТЕРАТУРА

1. Alberts J. F., Engelbrecht Y., Steyn P. S. et al. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures // Int. J. Food Microbiol. — 2006. — V. 109, N 1–2. — P. 121–126.
2. Chora C., Charmantray F., Besse-Hoggan P. et al. 2-Aminobenzothiazole degradation by free and Ca-alginate immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* // Chemosphere. — 2009. — V. 75, N 1. — P. 121–128.
3. De Carvalho C. C., da Fonseca M. M. The remarkable *Rhodococcus erythropolis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2005. — V. 67, N 6. — P. 715–726.
4. Di Gennaro P., Terreni P., Masi G. et al. Identification and characterization of genes involved in naphthalene degradation in *Rhodococcus opacus* R7 // Ibid. — 2010. — V. 87, N 1. — P. 297–308.
5. Fernandez de Las Heras L., Garcia Fernandez E., Maria Navarro Llorens J. et al. Morphological, physiological, and molecular characterization of a newly isolated steroid-degrading actinomycete, identified as *Rhodococcus ruber* strain Chol-4 // Curr. Microbiol. — 2009. — V. 59, N 5. — P. 548–553.
6. Fournier D., Hawari J., Halasz A. et al. Aerobic biodegradation of N-nitrosodimethylamine by the propanotroph *Rhodococcus ruber* ENV425 // Appl. Environ. Microbiol. — 2009. — V. 75, N 15. — P. 5088–5093.
7. Gauthier H., Yargeau V., Cooper D. G. Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism // Sci. Total. Environ. — 2010. — V. 408, N 7. — P. 1701–1706.

ксенобіотиків — нафталену, ксилолу, толуену, флуорену, ізопрену, індолу, фенолу, вуглеводнів нафти тощо.

Економічно привабливими також є представники роду *Rhodococcus*, здатні здійснювати біотрансформації — процеси біологічного перетворення сполук, що становлять інтерес у промисловому виробництві продуктів з відновлювальної дешевої рослинної сировини. Так, перспективними є штами родококків, використовувані для одержання ароматизаторів карвону та гераніолу, а також нікотинредуючі штами. Застосовуючи біоконверсію різноманітних субстратів представниками цього роду, можна істотно здешевити та полегшити отримання біодизеля, бутираміду, акрилової кислоти.

Метаболіти бактерій роду *Rhodococcus* можуть бути ефективними у природоохоронних технологіях (ПАР, полісахариди), медицині (ензими, антибіотики, ПАР), промисловості (ензими, ПАР) тощо.

8. Goncalves E. R., Hara H., Miyazawa D. et al. W. Transcriptomic assessment of isozymes in the biphenyl pathway of *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — V. 72, N 9. — P. 6183–6193.
9. Kim D., Choi K. Y., Yoo M. et al. Benzylic and aryl hydroxylations of m-xylene by o-xylene dioxygenase from *Rhodococcus* sp. strain DK17 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 86, N 6. — P. 1841–1847.
10. Kim D., Lee C. H., Choi J. N. et al. Aromatic hydroxylation of indan by o-xylene-degrading *Rhodococcus* sp. strain DK17 // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — V. 76, N 1. — P. 375–377.
11. Kirimura K., Furuya T., Sato R. et al. Biodesulfurization of naphthothiophene and benzothiophene through selective cleavage of carbon-sulfur bonds by *Rhodococcus* sp. strain WU-K2R // Ibid. — 2002. — V. 68, N 8. — P. 3867–3872.
12. Martinkova L., Uhnakova B., Patek M. et al. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus* // Environ. Int. — 2009. — V. 35, N 1. — P. 162–177.
13. Navarro-Llorens J. M., Patrauchan M. A., Stewart G. R. et al. Phenylacetate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: a central pathway for degradation of aromatic compounds // J. Bacteriol. — 2005. — V. 187, N 13. — P. 4497–4504.
14. Quatrini P., Scaglione G., De Pasquale C. et al. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline // J. Appl. Microbiol. — 2008. — V. 104, N 1. — P. 251–259.
15. Suttinun O., Muller R., Luepromchai E. Trichloroethylene cometabolic degradation by *Rhodococcus* sp. L4 induced with plant essen-

- tial oils // Biodegradation. — 2009. — V. 20, N 2. — P. 281–291.
16. Van der Geize R., Dijkhuizen L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications // Curr. Opin. Microbiol. — 2004. — V. 7, N 3. — P. 255–261.
  17. Wang Z., Wang Y., Gong F. et al. Biodegradation of carbendazim by a novel actinobacterium *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2 // Chemosphere. — 2010. — V. 81, N 5. — P. 639–644.
  18. Warren R., Hsiao W. W., Kudo H. et al. Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated- biphenyl-degrading *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // J. Bacteriol. — 2004. — V. 186, N 22. — P. 7783–7795.
  19. Robles-Gonzalez I. V., Fava F., Poggi-Varaldo H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments // Microb. Cell Fact. — 2008. — V. 7:5. doi: 10.1186/1475-2859-7-5.
  20. Seo J.-S., Keum Y.-S., Li Q. X. Bacterial degradation of aromatic compounds // Int. J. Environ. Res. Public Health. — 2009. — V. 6, N 1. — P. 278–309.
  21. Saa L., Jaureguibeitia A., Largo E. et al. Cloning, purification and characterization of two components of phenol hydroxylase from *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 86, N 1. — P. 201–211.
  22. Kolomytseva M. P., Randazzo D., Baskunov B. P. et al. Role of surfactants in optimizing fluorene assimilation and intermediate formation by *Rhodococcus rhodochrous* VKM B-2469 // Bioresour. Technol. — 2009. — V. 100, N 2. — P. 839–844.
  23. Hori K., Kobayashi A., Ikeda H., Unno H. *Rhodococcus aetherivorans* IAR1, a new bacterial strain synthesizing poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from toluene // J. Biosci. Bioeng. — 2009. — V. 107, N 2. — P. 145–150.
  24. De Carvalho C. C., da Fonseca M. M. Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14 // FEMS Microbiol. Ecol. — 2005. — V. 51, N 3. — P. 389–399.
  25. Thompson M. L., Marriott R., Dowle A., Grogan G. Biotransformation of  $\beta$ -myrcene to geraniol by a strain of *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 85, N 3. — P. 721–730.
  26. Morrish J. L., Daugulis A. J. Inhibitory effects of substrate and product on the carvone biotransformation activity of *Rhodococcus erythropolis* // Biotechnol. Lett. — 2008. — V. 30, N 7. — P. 1245–1250.
  27. Morrish J. L., Brennan E. T., Dry H. C., Daugulis A. J. Enhanced bioproduction of carvone in a two-liquid-phase partitioning bioreactor with a highly hydrophobic biocatalyst // Biotechnol. Bioeng. — 2008. — V. 101, N 4. — P. 768–775.
  28. Honda K., Yamashita S., Nakagawa H. et al. Stabilization of water-in-oil emulsion by *Rhodococcus opacus* B-4 and its application to biotransformation // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 78, N 5. — P. 767–773.
  29. Gong X. W., Yang J. K., Duan Y. Q. et al. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing // Res. Microbiol. — 2009. — V. 160, N 3. — P. 200–204.
  30. Kurosawa K., Boccazzi P., de Almeida N. M., Sinskey A. J. High-cell-density batch fermentation of *Rhodococcus opacus* PD630 using a high glucose concentration for triacylglycerol production // J. Biotechnol. — 2010. — V. 147, N 3–4. — P. 212–218.
  31. Voss I., Steinbuchel A. High cell density cultivation of *Rhodococcus opacus* for lipid production at a pilot-plant scale // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2001. — V. 55, N 5. — P. 547–555.
  32. Kamal A., Kumar M. S., Kumar C. G., Shaik T. Bioconversion of acrylonitrile to acrylic acid by *Rhodococcus ruber* strain AKSH-84 // J. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — V. 21, N 1. — P. 37–42.
  33. Kobayashi M., Yanaka N., Nagasawa T., Yamada H. Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue // Biochemistry. — 1992. — V. 31, N 37. — P. 9000–9007.
  34. Максимова Ю. Г., Демаков В. А., Максимов А. Ю. и др. Каталитические свойства нитрилгидратазы, иммобилизованной на оксидах алюминия и углеродсодержащих адсорбентах // Прикл. биохим. микробиол. — 2010. — Т. 46, № 4. — С. 416–421.
  35. Pratush A., Seth A., Bhalla T. C. Generation of mutant of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 through chemical mutagenesis for hyperproduction of nitrile hydratase // Acta Microbiol. Immunol. Hung. — 2010. — V. 57, N 2. — P. 135–146.
  36. Raj J., Seth A., Prasad S., Bhalla T. C. Bioconversion of butyronitrile to butyramide using whole cells of *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 74, N 3. — P. 535–539.
  37. Iwatsuki M., Uchida R., Takakusagi Y. et al. Lariatins, novel anti-mycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171 // J. Antibiot. (Tokyo). — 2007. — V. 60, N 6. — P. 357–363.
  38. Kitagawa W., Tamura T. A quinoline antibiotic from *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824 // Ibid. — 2008. — V. 61, N 11. — P. 680–682.
  39. Kunze B., Hofle G., Reichenbach H. The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties // Ibid. — 1987. — V. 40, N 3. — P. 258–265.
  40. Cornelis K., Maes T., Jaziri M. et al. Virulence genes of the phytopathogen *Rhodococcus fascians* show specific spatial and temporal expression patterns during plant infection // Mol. Plant Microbe Interact. — 2002. — V. 15, N 4. — P. 398–403.
  41. De O'Manes C. L., Beeckman T., Ritsema T. et al. Phenotypic alterations in *Arabidopsis thaliana* plants caused by *Rhodococcus fascians* infection // J. Plant Res. — 2004. — V. 117, N 2. — P. 139–145.
  42. Depuydt S., De Veylder L., Holsters M., Vereecke D. Eternal youth, the fate of developing *Arabidopsis* leaves upon *Rhodococcus fascians* infection // Plant Physiol. — 2009. — V. 149, N 3. — P. 1387–1398.

43. Forizs L., Lestrade S., Mol A. et al. Metabolic shift in the phytopathogen *Rhodococcus fascians* in response to cell-free extract of infected tobacco plant tissues // *Curr. Microbiol.* — 2009. — V. 58, N 5. — P. 483–487.
44. Kurosawa K., Ghiviriga I., Sambandan T. G. et al. Rhodostreptomycins, antibiotics biosynthesized following horizontal gene transfer from *Streptomyces padanus* to *Rhodococcus fascians* // *J. Am. Chem. Soc.* — 2008. — V. 130, N 4. — P. 1126–1127.
45. Iwabuchi N., Sunairi M., Urai M. et al. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2002. — V. 68, N 5. — P. 2337–2343.
46. Urai M., Aizawa T., Anzai H. et al. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzene tolerant bacterium, *Rhodococcus* sp. 33 // *Carbohydr. Res.* — 2006. — V. 341, N 5. — P. 616–623.
47. Urai M., Anzai H., Ogihara J. et al. Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by *Rhodococcus rhodochrous* strain S-2 // *Ibid.* — 2006. — V. 341, N 6. — P. 766–775.
48. Sojo M. M., Bru R. R., Garcia-Carmona F. F. *Rhodococcus erythropolis* ATCC 25544 as a suitable source of cholesterol oxidase: cell-linked and extracellular enzyme synthesis, purification and concentration // *BMC Biotechnology.* — 2002. — V. 2:3. (<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/3>).
49. Lashkarian H., Raheb J., Shahzamani K. et al. Extracellular cholesterol oxidase from *Rhodococcus* sp.: isolation and molecular characterization // *Iran Biomed. J.* — 2010. — V. 14, N 1–2. — P. 49–57.
50. Brim R. L., Nance M. R., Youngstrom D. W. et al. A thermally stable form of bacterial cocaine esterase: a potential therapeutic agent for treatment of cocaine abuse // *Mol. Pharmacol.* — 2010. — V. 77, N 4. — P. 593–600.
51. Park J. B., Kwon Y. M., Lee T. Y. et al. PEGylation of bacterial cocaine esterase for protection against protease digestion and immunogenicity // *J. Control Release.* — 2010. — V. 142, N 2. — P. 174–179.
52. Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // *J. Gen. Microbiol.* — 1979. — V. 115, N 2. — P. 491–503.
53. Uchida Y., Misawa S., Nakahara T., Tabuchi T. Factors affecting the production of succinoyl trehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on n-alkanes // *Agric. Biol. Chem.* — 1989. — V. 53, N 3. — P. 765–769.
54. Uchida Y., Tsuchiya R., Chino M. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes // *Ibid.* — 1989. — V. 53, N 3. — P. 757–763.
55. Lang S., Philp J. C. Surface-active lipids in rhodococci // *Antonie Van Leeuwenhoek.* — 1998. — V. 74, N 1. — P. 59–70.
56. Ron E. Z., Rosenberg E. Biosurfactants and oil bioremediation // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2002. — V. 13, N 3. — P. 249–252.
57. Rosenberg E., Ron E. Z. High and low molecular mass microbial surfactants // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — V. 52, N 2. — P. 154–162.
58. Banat I. M., Makkar R. S., Cameotra S. S. Potential applications of microbial surfactants // *Ibid.* — 2000. — V. 53, N 5. — P. 495–508.
59. Desai J. D., Banat J. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential // *Microbiol. Mol. Rev.* — 1997. — V. 61, N 1. — P. 47–67.
60. Marques A. M., Pinazo A., Farfan M. et al. The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 // *Chem. Phys. Lipids.* — 2009. — V. 158, N 2. — P. 110–117.
61. Gesheva V., Stackebrandt E., Vasileva-Tonkova E. Biosurfactant production by halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica // *Curr. Microbiol.* — 2010. — V. 61, N 2. — P. 112–117.
62. Peng F., Liu Z., Wang L., Shao Z. An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants // *J. Appl. Microbiol.* — 2007. — V. 102, N 6. — P. 1603–1611.
63. Philp J. C., Kuyukina M. S., Ivshina I. B. et al. Alkanotrophic *Rhodococcus ruber* as a biosurfactant producer // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — V. 59, N 2–3. — P. 318–324.
64. Yakimov M. M., Giuliano L., Bruni V. et al. Characterization of antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers // *New Microbiol.* — 1999. — V. 22, N 3. — P. 249–256.
65. Peng F., Wang Y., Sun F. et al. A novel lipopeptide produced by a pacific ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53 // *J. Appl. Microbiol.* — 2008. — V. 105, N 3. — P. 698–705.
66. Tuleva B., Christova N., Cohen R. et al. Production and structural elucidation of trehalose tetraesters (biosurfactants) from a novel alkanotrophic *Rhodococcus wratislaviensis* strain // *Ibid.* — 2008. — V. 104, N 6. — P. 1703–1710.
67. Ciapina E. M., Melo W. C., Santa Anna L. M. et al. Biosurfactant production by *Rhodococcus erythropolis* grown on glycerol as sole carbon source // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2006. — V. 131, N 1–3. — P. 880–886.
68. Shavandi M., Mohebbi G., Haddadi A. et al. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6 // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* — 2011. — V. 82, N 2. — P. 477–482.
69. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Грегирчак Н. Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // *Прикл. биохим. микробиол.* — 2005. — Т. 41, № 1. — С. 58–63.
70. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Волошина И. Н., Карпенко Е. И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофоб-

- ных субстратах // Там же. — 2004. — Т. 40, №5. — С. 544–550.
71. Пирог Т. П., Волошина И. Н., Игнатенко С. В., Вильданова-Марцишин Р. И. Некоторые закономерности синтеза поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Биотехнология. — 2005. — № 6. — С. 27–36.
  72. Пирог Т. П., Игнатенко С. В., Тарасенко Д. О. Вплив якості посівного матеріалу на синтез поверхнево-активних речовин штамом *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 4. — С. 9–17.
  73. Пирог Т. П., Игнатенко С. В. Масштабирование процесса биосинтеза поверхностно-активных веществ *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гексадекане // Прикл. биохим. микробиол. — 2011. — Т. 47, № 4. — С. 436–442.
  74. Пирог Т. П., Корж Ю. В., Шевчук Т. А., Тарасенко Д. О. Роль екзогенних попередників в утворенні поверхнево-активних речовин під час культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі // Мікробіол. журн. — 2008. — Т. 70, № 6. — С. 11–18.
  75. Пирог Т. П., Корж Ю. В., Шевчук Т. А., Тарасенко Д. А. Особенности C<sub>2</sub>-метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. — 2008. — Т. 77, № 6. — С. 749–757.
  76. Пирог Т. П., Игнатенко С. В. Мікробні поверхнево-активні речовини: проблеми промислового виробництва // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 29–38.
  77. Пирог Т. П., Тарасенко Д. А. Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. — 2008. — № 3. — С. 48–55.
  78. Пирог Т. П., Шевчук Т. А., Клименко Ю. А. Интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ при культивировании *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на гексадекане // Прикл. биохим. микробиол. — 2010. — Т. 46, № 6. — С. 651–658.
  79. Kuyukina M. S., Ivchina I. B., Philp J. C. et al. Recovery of *Rhodococcus erythropolis* biosurfactants using methyl-tertiary butyl ether (MTBE) extraction // J. Microbiol. Methods. — 2001. — V. 46, N 2. — P. 149–156.
  80. Mukherjee S., Das P., Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. // Trends in Biotechnology. — 2006. — V. 24, N 11. — P. 509–515.
  81. Singh A., Van Hamme J. D., Ward O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Applications aspects // Biotechnol. Adv. — 2007. — V. 25, N 1. — P. 99–121.
  82. Rodrigues L., Banat I. M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine // J. Antimicrob. Chemother. — 2006. — V. 57, N 4. — P. 609–618.
  83. Adamczak M., Bednarski W. Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica* // Biotechnol. Lett. — 2000. — V. 22, N 1. — P. 313–316.
  84. Rau U., Nguyen L. A., Roeper H. et al. Downstream processing of mannosylerythritol lipids produced by *Pseudozyma aphidis* // Eur. J. Lipid. Sci. Technol. — 2005. — V. 107, N 2. — P. 373–380.
  85. Chen S. Y., Wei Y. H., Chang J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2 // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — V. 76, N 1. — P. 67–74.
  86. Barros F. F. C., Ponezi A. N., Pastore G. M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2008. — V. 35, N 9. — P. 1071–1078.
  87. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source // Appl. Environ. Microbiol. — 1984. — V. 48, N 2. — P. 302–305.
  88. Reiling H. E., Thanel-Wyss U., Guerra-Santos L. H. et al. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* // Ibid. — 1986. — V. 51, N 5. — P. 985–989.
  89. Binazadeh M., Karimi L. A., Li Z. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449 // Enzyme Microb. Technol. — 2009. — V. 45, N 1. — P. 195–202.
  90. Youssef N., Simpson D. R., Duncan K. E. et al. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — V. 73, № 4. — P. 1239–1247.
  91. Карпенко Е. В., Вильданова-Марцишин Р. И., Щеглова Н. С. и др. Перспектива использования бактерий рода *Rhodococcus* и микробных поверхностно-активных веществ для деградации нефтяных загрязнений // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 175–179.
  92. Морозова А. П. Дослідження здатності поверхнево-активних речовин *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 до активації деструкції нафти у воді // Харчова промисловість. — 2008. — № 7. — С. 36–39.
  93. Chereshnev V. A., Gein S. V., Baeva T. A. et al. Modulation of cytokine secretion and oxidative metabolism of innate immune effectors by *Rhodococcus* biosurfactant // Bull. Exp. Biol. Med. — 2010. — V. 149, N 6. — P. 734–738.
  94. Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Gein S. V. et al. In vitro immunomodulating activity of biosurfactant glycolipid complex from *Rhodococcus ruber* // Ibid. — 2007. — V. 144, N 3. — P. 326–330.
  95. Пирог Т. П., Конон А. Д., Софілканіч А. П., Скочко А. Б. Антимікробна дія поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Мікробіол. журн. — 2011. — Т. 73, № 3. — С. 14–20.
  96. Пирог Т. П., Конон А. Д., Скочко А. Б. Використання микробних поверхнево-активних речовин у біології та медицині // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 2. — С. 24–38.
  97. Конон А. Д., Пирог Т. П. Поверхнево-активні речовини *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, їх вплив на антимікробні властивості ефірної олії чайного дерева // Харчова та переробна промисловість. — 2010. — №3 (367). — С. 25–27.

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS* И ИХ МЕТАБОЛИТОВ

Т. П. Пирог  
М. А. Шулякова  
Т. А. Шевчук  
А. П. Софилканич

Национальный университет  
пищевых технологий, Киев

E-mail: [tapirog@nuft.edu.ua](mailto:tapirog@nuft.edu.ua)

Собственные экспериментальные результаты авторов и данные литературы демонстрируют большой биотехнологический потенциал бактерий рода *Rhodococcus* как деструкторов ароматических, гетероциклических и алифатических ксенобиотических соединений (нафтаден, ксилон, толуол, этилбензен, индол, нитрофенол, трихлорэтилен, углеводороды нефти и др.), а также как продуцентов практически ценных метаболитов (поверхностно-активные вещества, антибиотики, экзополисахариды, энзимы). Поверхностно-активные вещества (ПАВ) являются чрезвычайно важными продуктами микробного синтеза, поскольку имеют такие существенные преимущества перед синтетическими аналогами, как биodeградебельность, устойчивость в широком диапазоне температур, рН, а также могут быть синтезированы из отходов других производств. Рассматривается использование метаболитов родококков в природоохранных технологиях, медицине, сельском хозяйстве, а также участие представителей рода *Rhodococcus* в процессах биотрансформации для получения ароматизаторов (карвон, гераниол), биодизеля, бутираида, акриловой кислоты и др.

Обобщены собственные экспериментальные данные по интенсификации синтеза и практическому применению ПАВ *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017. Установлено, что в присутствии как клеток, так и внеклеточных метаболитов штамма ИМВ Ас-5017 с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами степень деструкции нефти в воде и почве достигала 80–93% на 30-е сутки. Показано, что ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 характеризуются антимикробным действием по отношению к ряду микроорганизмов, в том числе и фитопатогенным бактериям. При обработке (1–2 ч) препаратами ПАВ суспензии исследуемых тест-культур наблюдали снижение количества жизнеспособных клеток на 74–97%.

**Ключевые слова:** бактерии рода *Rhodococcus*, деструкция ксенобиотиков, биотрансформация, поверхностно-активные вещества, полисахариды, энзимы.

## BIOTECHNOLOGICAL POTENCIAL OF BACTERIA OF *RHODOCOCCUS* STRAIN AND THEIR METABOLITES

T. P. Pirog  
M. O. Shulyakova  
T. A. Shevchuk  
A. P. Sofylkanich

National University of Food Technologies, Kyiv

E-mail: [tapirog@nuft.edu.ua](mailto:tapirog@nuft.edu.ua)

The literature and own experimental data, concerning biotechnological potential of bacteria of *Rhodococcus* strain as destructors of aromatic, heterocyclic and aliphatic xenobiotic compounds (naphtalet, xylol, toluene, ethylbenzene, indole, nitrophenolium, trichloroethylene, hydrocarbons of oil, etc.), and also as producers of valuable metabolites (surfactants, antibiotics, exopolysaccharides, enzymes) are given. Surface-active substances (surfactants) are essential products of microbial synthesis, as these have significant advantages over synthetic analogs as biodegradability, stability over a wide range of temperature, pH, and can be produced from the wastes of other industries. The use of *Rhodococcus* metabolites in environmental protection technologies, medicine, agriculture, and also participation of *Rhodococcus* strain in biotransformation processes for production of flou-ver (carvon, geraniol), biodiesel, butiramide, acrylic acid, etc. is discussed.

The own experimental data concerning the intensification of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 surfactant synthesis and practical application are summarized. It was determined that the oil destruction degree in water and soil reached 80–93% on the 30<sup>th</sup> day in the presence of cells of strain IMV Ac-5017, as well as exocellular metabolites with surface-active and emulsifying properties. It was shown that surfactant of *R. erythropolis* IMV Ac-5017 inherent the antimicrobial activity against the number of microorganisms, including phytopathogenic bacteria. The reduction of quantity of living cells by 74–97% was observed after treatment (1–2 h) of suspension of test-cultures with surfactant preparations.

**Key words:** bacteria of *Rhodococcus* strain, destruction of xenobiotics, biotransformation, surfactants, polysaccharides, enzymes.