

Т.П. ПИРОГ, І.О. ГУТИНСЬКА,
А.П. СОФІЛКАНИЧ, А.Д. КОНОН

МІКРОБНІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ У ПРИРОДООХОРОННИХ ТЕХНОЛОГІЯХ



ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	3
РОЗДІЛ 1. БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>RHODOCOCCLUS</i> ТА ЇХ МЕТАБОЛІТІВ	5
1.1. Використання представників роду <i>Rhodococcus</i> для біодеградації ксенобіотиків	5
1.2. Використання представників роду <i>Rhodococcus</i> у процесах біотрансформації	12
1.3. Практичне використання метаболітів, синтезованих бактеріями роду <i>Rhodococcus</i>	17
РОЗДІЛ 2. БАКТЕРІЇ РОДУ <i>NOCARDIA</i> ЯК ОБ'ЄКТИ БІОТЕХНОЛОГІЇ	32
2.1. Використання представників роду <i>Nocardia</i> для деградації нафтових забруднень	32
2.2. Біосинтез практично-цінних метаболітів	37
2.3. Біосинтез поверхнево-активних речовин	43
РОЗДІЛ 3. БІОСИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ПРОМИСЛОВИХ ВІДХОДАХ	51
3.1. Нафтовмісні відходи як субстрати для синтезу поверхнево-активних речовин	52
3.2. Використання олійовмісних субстратів для синтезу мікробних поверхнево-активних речовин	54
3.3. Трансформація відходів молочної та цукрової промисловості у поверхнево-активні речовини мікробного походження	68
3.4. Утворення мікробних поверхнево-активних речовин на лігноцелюлозних відходах	75
3.5. Синтез поверхнево-активних речовин мікробного походження на крохмалевмісній сировині	78
РОЗДІЛ 4. АЛЬТЕРНАТИВНІ ДЖЕРЕЛА ВУГЛЕЦЮ ДЛЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS</i> IMB AC-5017, <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB B-7241 І <i>NOCARDIA VACCINII</i> IMB B-7405	81
4.1. Синтез поверхнево-активних речовин за умов росту <i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 на промислових відходах	81
4.2. Інтенсифікація біосинтезу поверхнево-активних речовин <i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 на олійовмісних субстратах	87
4.2.1. Синтез поверхнево-активних речовин залежно від способу підготовки інокуляту	87
4.2.2. Вплив глюкози на синтез поверхнево-активних речовин	89
4.2.3. Утворення поверхнево-активних речовин <i>R. erythropolis</i> IMB	90

Ас-5017 за присутності меляси	
4.2.4. Вплив екзогенного <i>n</i> -гексадекану на синтез поверхнево-активних речовин	92
4.3. Промислові відходи як субстрати для синтезу поверхнево-активних речовин <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 і <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	94
РОЗДІЛ 5. ТЕХНОЛОГІЇ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ НА ОСНОВІ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА БІОДИЗЕЛЮ	100
5.1. Загальна характеристика технології отримання біодизелю	100
5.2. Одно-, двоатомні спирти та поліюли	103
5.3. Органічні кислоти	112
5.4. Інші продукти мікробного синтезу	116
РОЗДІЛ 6. ТЕХНІЧНИЙ ГЛІЦЕРИН ЯК СУБСТРАТ ДЛЯ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS</i> IMB Ас-5017, <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB B-7241 І <i>NOCARDIA VACCINII</i> IMB B-7405	131
6.1. Синтез поверхнево-активних речовин <i>R. erythropolis</i> IMB Ас-5017, <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 і <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405 на відходах виробництва біодизелю	132
6.2. Шляхи підвищення біоконверсії технічного гліцерину в поверхнево-активні речовини <i>R. erythropolis</i> IMB Ас-5017, <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 і <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	142
РОЗДІЛ 7. УЧАСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ У РОЗКЛАДАННІ АРОМАТИЧНИХ СПОЛУК	151
7.1. Деструкційна здатність мікроорганізмів	152
7.1.1. Фактори, що впливають на асиміляцію ароматичних субстратів мікроорганізмами	156
7.1.2. Шляхи інтенсифікації розкладу ароматичних сполук мікроорганізмами	159
7.2. Особливості практичного використання мікроорганізмів для очищення довкілля від ксенобіотиків ароматичної природи	166
7.3. Асиміляція ароматичних сполук <i>Rhodococcus erythropolis</i> IMB Ас-5017, <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> IMB B-7241 і <i>Nocardia vaccinii</i> IMB B-7405	170
7.3.1. Умови культивування штамів IMB B-7241, IMB B-7405 та IMB Ас-5017 на ароматичних сполуках	170
7.3.2. Особливості росту <i>R. erythropolis</i> IMB Ас-5017 на субстратах ароматичної природи	173
7.3.3. Ріст <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405 та <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 на ароматичних сполуках	173
7.3.4. Синтез поверхнево-активних речовин штамми IMB B-7405, IMB B-7241 та IMB Ас-5017 за умов росту на ароматичних	182

сполуках	
7.3.5. Вплив якості інокуляту на здатність штамів IMB B-7405 та IMB B-7241 асимілювати ароматичні сполуки	187
7.3.6. Ріст <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241 та <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405 у послідовних пересівах на середовища з субстратами ароматичної природи	189
РОЗДІЛ 8. МІКРОБНІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНІ РЕЧОВИНИ У БІОРЕМЕДІАЦІЇ ДОВКІЛЛЯ	194
8.1. Механізми деструкції нафти	195
8.2. Очищення води і ґрунту від нафти та інших вуглеводнів	196
8.3. Вилучення токсичних металів	200
8.4. Деструкція комплексних забруднень	206
8.5. Фіторемедіація	207
8.6. Обмеження та перспективи використання мікробних поверхнево-активних речовин	207
РОЗДІЛ 9. ВИКОРИСТАННЯ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS</i> IMB Ac-5017, <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> IMB B-7241 і <i>NOCARDIA VACCINII</i> IMB B-7405 ДЛЯ ДЕСТРУКЦІЇ НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ	216
9.1. Біодеградабельність поверхнево-активних речовин <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241, <i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 і <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	216
9.2. Очищення води від нафти за присутності клітин <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405	223
9.3. Вплив поверхнево-активних речовин <i>A. calcoaceticus</i> IMB B-7241, <i>R. erythropolis</i> IMB Ac-5017 і <i>N. vaccinii</i> IMB B-7405 на деструкцію нафтових забруднень	229
9.3.1. Вплив препаратів поверхнево-активних речовин на ефективність мікробної деструкції нафти у воді	234
9.3.2. Деструкція нафти в ґрунті після обробки препаратами поверхнево-активними речовинами	238
9.3.3. Деструкція комплексних з важкими металами нафтових забруднень у воді за присутності препаратів поверхнево-активних речовин	240
9.3.4. Вплив препаратів поверхнево-активних речовин на ефективність мікробної деструкції нафти у ґрунті за присутності металів	243
9.3.5. Механізми підвищення деструкції нафти за присутності препаратів поверхнево-активних речовин та катіонів міді	245

	356
9.3.6. Порівняльна характеристика поверхнево-активних речовин <i>A. calcoaceticus</i> ІМВ В-7241, <i>R. erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 і <i>N. vaccinii</i> ІМВ В-7405 з комерційним препаратом «Деворойл»	248
9.3.7. Нафтовідмиваючі властивості поверхнево-активних речовин штамів ІМВ В-7241, ІМВ Ас-5017 та ІМВ В-7405	249
ДОДАТОК А. ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ВИТРАТ НА ОДЕРЖАННЯ ПРЕПАРАТІВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>ACINETOBACTER CALCOACETICUS</i> ІМВ В-7241 І «ДЕВОРОЙЛ» ДЛЯ ЛІКВІДАЦІЇ НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ	252
ДОДАТОК Б. ОЦІНКА ПРОГНОЗОВАНОЇ ЕКОНОМІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ ПРИРОДООХОРОННИХ ЗАХОДІВ ПРИ ОЧИЩЕННІ ЗАБРУДНЕНОГО НАФТОЮ ҐРУНТУ	262
ЗАКЛЮЧЕННЯ	270
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	277
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ	352
ЗМІСТ	353

РОЗДІЛ 1

БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ БАКТЕРІЙ РОДУ *RHODOCOCCLUS* ТА ЇХ МЕТАБОЛІТІВ

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 біотрансформацій і біодеградації багатьох органічних сполук у промислових масштабах [12].

1.1. Використання представників роду *Rhodococcus* для 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 забруднюючих речовин та їх перетворення на двоокис вуглецю і воду або менш токсичні сполуки. Такі технології зазвичай економічніші, ніж термічні та фізико-хімічні способи детоксикації, такі як 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 та штамів, здатних до

деградації таких органічних сполук, як нафтален, ксилол, толуен, етилбензен, дибензофуран, біфеніл, стирен, катехол, флуорен, індол, нітрофенол та ін. [1, 4, 5, 7–10, 13, 16–18, 21–23].

Так, нещодавно виділений штам *Rhodococcus jialingiae* djl-6-2 здатний використовувати як єдине джерело вуглецю та азоту карбендазим – речовину, що широко використовується як фунгіцид і якій притаманний мутагенний та тератогенний ефект навіть за низьких концентрацій [17]. *R. jialingiae* djl-6-2 здатний розкласти до 94 % карбендазиму (100 мг/л) упродовж 60 год.

Вперше 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 холестерин, тестостерон, андростерон та прогестерон [5].

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

Rhodococcus sp. DK17 може рости на *o*-кислоті та здатний використовувати бензен, алкілбензени, фенол, фталати та інші ароматичні сполуки як єдине джерело вуглецю та енергії, при цьому розклад алкілбензенів ініціюється *o*-кислотдіоксигеназою, що складається з редуктази, фередоксинової складової та [2Fe-2S]-оксигеназного компоненту [9]. Індан – біциклічна органічна сполука, що складається з одного ароматичного та одного циклопентанового кільця. *Rhodococcus* sp. DK17 здатний до росту на рідкому мінеральному середовищі, використовуючи індан як джерело вуглецевого живлення [10]. Структурна подібність індану та *o*-кислоту дала змогу припустити, що ферменти, які каталізують перетворення *o*-кислоту, задіяні також у метаболізмі індану. Для

перевірки цього припущення мутантний штам *Rhodococcus* sp. DK180, не здатний 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 мета-положенні під дією метилкатехол-2,3-діоксигенази [10]. Також відомо, що змішана культура *Pseudomonas* sp. NBM21 та *Rhodococcus* sp. BTO62 при вирощуванні у біофільтрі здатна до розкладу суміші *o*-, *m*- та *p*-ксилолу зі швидкістю 180 г/м³/год при 20 °C та 100 г/м³/год при 10 °C, що значно вище описаних раніше – 60–78 г/м³/год [9].

Фенол та подібні йому ароматичні сполуки є забруднюючими речовинами, що надходять у довкілля переважно з промисловими відходами. *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 здатний 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 ферментативна активність пов'язана з двома окремими білками, що кодуються близько розташованими генами *pheA1* та *pheA2*. Ген *pheA1* кодує білок з 542 амінокислот (флавінзалежна монооксигеназа), тоді як ген *pheA2* – з 189 амінокислот (флавінредуктаза). Ці амінокислотні послідовності практично ідентичні послідовностям фенолгідроксилазних компонентів *R. erythropolis* CCM2595 та 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, полягає у його здатності до ефективної деградації поліхлорованих біфенілів (ПХБ) – широко розповсюдженого і особливо стійкого класу забруднюючих 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) та 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 з лімоненом, карвоном або карвеолом як джерелом вуглецю. Окрім того, плазміда pRHL3 також містить ділянку, що кодує стійкість клітини до важких металів, та три гени цитохрому P450 [18]. Серед генів хромосоми *Rhodococcus* sp. RHA1 виявлено кластер генів, що кодує ферменти розкладу фенілоцтової кислоти. Цей шлях досить широко досліджений у грамнегативних бактерій, у той час 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 ферментів [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 B₁ (АФВ₁): значне зменшення вмісту АФВ₁ спостерігалось вже через 2 год, а через 72 год реєстрували лише 33,2% від початкового вмісту токсину.

Rhodococcus rhodochrous VKM B-2469 здатний повністю розкласти 12–25 мг/л флуорену упродовж 14 днів та кометаболізувати 50–100 мг/л упродовж 2–5 днів за наявності сахарози як ко-субстрату [22]. Низька розчинність флуорену – велика проблема у процесі його біорозкладу, що призводить до низької

біодоступності його як субстрату. У природі більшість мікроорганізмів, здатних метаболізувати флуорен, продукують поверхнево-активні речовини для підвищення його біодоступності та кращого проникнення у клітину. Однак для вдосконалення процесу біоконверсії поліциклічних ароматичних вуглеводнів можливе і застосування синтетичних сурфактантів. У разі *R. rhodochrous* VKM B-2469 внесення Tween 60 у концентрації 1% (об'ємна частка) супроводжувалося інтенсифікацією метаболізму флуорену, зниження 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 гідродесульфуризації 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 все одно 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 для вирішення цієї проблеми є біодесульфуризація за допомогою ДБТ-десульфуризуючих мікроорганізмів після стадії фізико-хімічної гідродесульфуризації. З 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 гідродесульфуризації виявлені 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 *Rhodococcus 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 вимагає внесення дорогих попередників як вторинного джерела вуглецю. Використання толуолвмісних відходів як сировини для синтезу полімеру приведе до подальшого зниження виробничих витрат наряду із ефективним використанням відходів [23].

Бензотіазоли належать до обширної родини синтетичних гетероциклічних сполук і використовуються в різних галузях промисловості, наприклад, у виробництві шин як каталізатори процесів вулканізації, як лікарські засоби для лікування латерального аміотрофічного склерозу і хіміотерапії ракових захворювань, як пестициди (біоциди), а також у виробництві азобарвників [2]. З 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 фото- та/або біодеградації за присутності комплексу FeНТА (нітрілотриацетат), 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 з клітинами поверхнево-активних гліколіпідів. Синтез ПАВ, очевидно, сприяє біотрансформації гідрофобних похідних бензотіазолу.

Серед сполук, що потрапляють у довкілля в результаті антропогенної діяльності, важливе місце займають лікарські засоби, які також відомі своєю стійкістю до біодеградації [7]. Для посилення біологічного розпаду деяких фармацевтичних препаратів використовується явище кометаболізму, коли у середовище додають 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, головним чином, відбувається в результаті кометаболізму з метаном, аміаком, пропаном, фенолом, толуолом або кумолом як ростовим субстратом. Здатність до окиснення толуолу виявлена у багатьох бактерій, проте його використання як ростового субстрату для кометаболізму ТХЕ стримується високою токсичністю. Тому необхідні альтернативні способи індукції відповідних ферментів 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) перевірені на здатність індукувати деградацію ТХЕ у *R. gordoniae* P3 та *R. erythropolis* BD2. Найефективнішим виявився кумол, проте використання цієї речовини обмежене 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 за 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 хлораміном на іншими дезінфікуючими засобами [6]. У деяких бактерій виявлено монооксигеназами з широкою субстратною специфічністю, здатні розкладати НДМА у процесі кометаболізму – пропанотрофи *Rhodococcus* sp. RHA1 і *Rhodococcus ruber* ENV425, а також

Mycobacterium vaccae JOB5, *Pseudomonas mendocina* KR1 і метанотроф *Methylosinus trichosporium* OB3b [6]. У *R. ruber* ENV425 виявлено специфічний шлях розкладу НДМА, дещо подібний до денітрозуючого шляху у ссавців, який каталізується Р-450 ізозимами. Так, кінцевими продуктами такого розкладу є закис азоту, нітрит, нітрат, формальдегід, форміат та метиламін. *R. ruber* ENV425 здатний 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 з 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*. Всі ізоляти були здатні розкласти аліфатичні компоненти забрудників і жоден з них не асимілював ароматичні сполуки. Ці конкретні актинобактерії-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 здатний до деградації вуглеводнів (C_5 – C_{16}) в інтервалі температур 15–28 °С за присутності високих концентрацій хлориду натрію (до 2,5 %) [24].

Узагальнені дані по деструкції токсичних ксенобіотичних сполук бактеріями роду *Rhodococcus* наведено у табл. 1.1.

1.2. Використання представників роду *Rhodococcus* у процесах біотрансформації

Мікроорганізми здатні здійснювати реакції трансформації (зміна окремих ділянок у молекулах органічних речовин), перетворюючи ті або інші сполуки на нові продукти. Умови протікання цих реакцій м'які, і в багатьох випадках мікробіологічним трансформаціям віддають перевагу перед хімічними. Можливе також використання біологічних процесів у випадках, де прямий хімічний

Таблиця 1.1

**Деструкція ксенобіотиків бактеріями – представниками роду
*Rhodococcus***

Штам	Ксенобіотична сполука	Концен-трація	Ступінь деструкції	Література
<i>R. jialingiae</i> djl-6-2	Карбендазим	100 мг/л	94 % (60 год)	[17]
Змішана культура <i>Pseudomonas</i> sp. NBM21 та <i>Rhodococcus</i> sp. BTO62	Суміш <i>o</i> -, <i>m</i> - та <i>p</i> -ксилолу	Біофільтр	180 г/м ³ /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 ₁	1,75 ‰	66,8 % (72 год)	[1]
<i>R. rhodochrous</i> VKM B-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]

синтез молекул нездійснений або неефективний. На сучасному етапі біотрансформації представляють інтерес у промисловому виробництві з точки

зору отримання продуктів з відновлюваної 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. Зазначимо, що цей монотерпеновий спирт широко використовується у парфумерії, для ароматизації мила та мийних засобів, виробництва інших ароматизованих сполук, а основним способом його промислового отримання є хімічний синтез з β -пінену і лише незначна частина одержується з природної сировини.

Ще один ароматизатор – R(–)-карвон – також можна отримувати шляхом біотрансформації (–)-транс-карвеолу [26]. Ефірні олії, що містять багато карвону, використовуються у харчовій промисловості, ароматерапії та входять до складу освіжувачів повітря. *R. erythropolis* DCL14 здатний перетворювати (–)-транс-карвеол на R(–)-карвон [87]. Встановлено, що продуктивність утворення карвону у 3 л однофазному ферментері становила 31 мг/л·год [26]. Гетерофазне культивування штаму DCL14 за присутності силіконової олії дало змогу підвищити вихід карвону у 2,5 рази [27].

R. oracius B-4, ізольований як стійкий до органічних розчинників мікроорганізм, здатний використовувати як гідрофільні, так і гідрофобні субстрати [28]. Встановлено здатність цього штаму до утворення індиго з індолу та о-крезолу з толуолу за одночасного споживання глюкози та олеїнової кислоти. За 12 год *R. oracius* B-4 утворював індиго і о-крезол (0,217 і 2,12 мг/мл відповідно). Можливість отримання цих речовин за допомогою простих біологічних перетворень є потенційно важливим з практичної точки зору, оскільки на сучасному етапі вони отримуються складним хімічним синтезом.

Бактерія, що розкладає нікотин, використовуючи його як єдине джерело вуглецю й азоту, була ізольована й ідентифікована як *Rhodococcus* sp. Y22 [29]. Нікотин (1,0 г/л) був метаболізований даним штамом упродовж 52 год при 28 °C та pH 7,0. Встановлено, що клітини *Rhodococcus* sp. Y22 здатні розкласти

нікотин як з розчинів, так і з тютюнового листа. Це робить *Rhodococcus* sp. Y22 можливим біологічним агентом для розкладу нікотину під час обробки 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 у процесі росту *R. opacus* PD630 на мелясі вміст ТАГ у клітинах досягає 52 % [31]. Такі дані свідчать, що цей штам можна вирощувати на дешевих джерелах вуглецю, отриманих з сільськогосподарських культур, для виробництва біодизельного палива.

Акрилова кислота застосовується 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 і 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, за умов росту на гліцерині (10 г/л) спостерігали високу нітрилазну активність, що забезпечувала біоконверсію акрилонітрилу в акрилову кислоту. Молекулярна маса очищеного ферменту становила близько 41 кДа, що близько до молекулярної маси нітрилази *R. rhodochrous* K22 [33]. Нітрилазі *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. 1.1) [32]. Ці дослідження показують, що біотрансформація акрилонітрилу в акрилову кислоту за допомогою нового штаму *R. ruber* AKSH-84 може бути використана у «зеленому» біосинтезі акрилової кислоти [32].

Найкращий приклад промислового використання нітрilгiдратази *R. rhodococcus* J1 – виробництво акриламiду з акрилонiтрилу, що на даний час сягає 30 тис. т/рiк [3]. Високоактивну нiтрilгiдратазу, видiлену зi штаму *R. ruber* gt1, iмобiлiзували на немодифiкованих оксидах алюмiнiю i вуглецьвмiсних сорбентах, що супроводжувалося пiдвищенням у кiлька разiв її термостабiльностi [34].

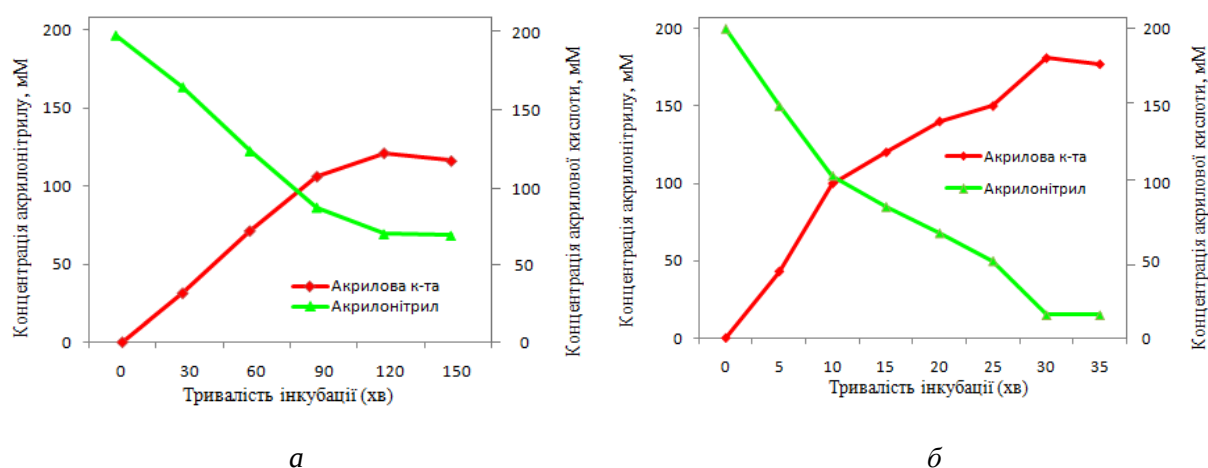


Рис. 1.1. Біотрансформація акрилонітрилу у акрилову кислоту: а – інтактними клітинами, б – за допомогою очищеної нітрилази *Rhodococcus ruber* AKSH-84 [32]

Бутирамід – важлива хімічна речовина, що використовується для синтезу гідроксамінових кислот і регулювання реологічних характеристик систем під дією електричного поля. Нітрilгiдратаза *Rhodococcus rhodochrous* PA-34 каталiзує перетворення бутиронiтрилу у бутирамiд [35]. Вихiд бутирамiду становив 597 г за таких умов: культивування в 1 л ферментерi упродовж 6 год при температурi 10 °C, концентрацiя бутиронiтрилу 60 % (об'ємна частка) [36]. У ходi

подальшої роботи штам *R. rhodochrous* PA-34 було піддано дії хімічного мутагену *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину. Отриманий мутантний штам характеризувався синтезом нітрилгідратази із вдвічі вищою активністю [35]. Такі результати відкривають нові можливості для інтенсифікації процесів біотрансформації, що відбуваються під дією цього ферменту.

Оскільки робота над дослідженням і вивченням шляхів метаболізму, генів та їх послідовностей, структури специфічних ферментів та їхньої дії продовжуються, можливі інші галузі та напрямки використання бактерій роду *Rhodococcus*.

1.3. Практичне використання метаболітів, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*

До метаболітів, синтезованих бактеріями роду *Rhodococcus*, що знайшли практичне використання у сучасних технологіях, належать поверхнево-активні речовини, екзополісахариди, антибіотики і сполуки з антимікробними властивостями та ферменти.

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

Інший антибіотик, аурацин RE, був ізольований з культуральної рідини *R. erythropolis* JCM 6824 [38]. За хімічною природою аурацин RE подібний до аурацину С – антибіотика, синтезованого *Stigmatella aurantiaca* [39]. Проте 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 з *Streptomyces padanus* [44]. Синтезовані за таких умов речовини, названі родострептоміцинами, належать до того ж класу аміноглікозидів, що й стрептоміцин. Уже перші ж тести показали, що родострептоміцини ефективно знищують пов'язані з гастритом і виразкою шлунка бактерії *Helicobacter pylori* і 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, бензен-толерантний штам *Rhodococcus* sp. 33 здатний 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 даний ЕПС складається з D-галактози, D-глюкози, D-манози, D-глюкуронової кислоти та піровиноградної 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]. В 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 родококів, 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].

Ферменти. Мікробні холестериноксидази каталізують окиснення й ізомеризацію холестерину. Інтерес до цих ферментів головним чином полягає в можливості їх використання для визначення холестерину в біологічних зразках, харчових продуктах, а також у біоконверсії багатьох 3 β -гідроксистероїдів у органічні розчинники [48]. *R. erythropolis* ATCC 25544 синтезує асоційовану з клітинами (55 %) та позаклітинну (45 %) холестериноксидазу, *Rhodococcus* sp.

501 – позаклітинну холестериноксидазу за умов росту на середовищі з холестерином як єдиним джерелом вуглецю [49].

Бактерії роду *Rhodococcus* також синтезують ще один практично цінний фермент – кокаїнестеразу (КокЕ), що останнім часом розглядається як потенційний терапевтичний агент для лікування передозування та кокаїнової залежності [50, 51]. КокЕ безпосередньо розкладає кокаїн у неактивні продукти, тоді як традиційні підходи вимагають блокади кокаїну на безлічі моноамінних транспортерів та йонних каналів. Повноцінності нативної форми КокЕ перешкоджає його інактивація при 37 °С. У ході селективної роботи було отримано мутантний штам, що продукує термостабільну форму цього ферменту Cose-l169K/G173Q [50]. Кінетичні дослідження *in vitro* показують, що період напіврозпаду Cose-l169K/G173Q становить 2,9 діб при 37 °С, що в 340 раз більше, ніж для нативної форми. Отже, головні перешкоди клінічному застосуванню КокЕ полягають у його термонестабільності, швидкій деградації циркулюючими протеазами і потенційній іммуногенності. Для подолання цих проблем було вирішено модифікувати фермент приєднанням поліетиленгліколю (ПЕГ). Отримані дані свідчать, що така модифікація приводить до захисту КокЕ від теплової деградації та дії протеаз. Крім того, попередні результати *in vivo* доводять, що ПЕГ-форма КокЕ, як і нативна КокЕ змогли захистити тварин від спричинених кокаїном отруйних ефектів [51].

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

Перші статті, в яких було описано представників роду *Rhodococcus* як продуцентів речовин із поверхнево-активними властивостями, з'явилися у 70–80-х роках ХХ ст. [52–54]. З того часу 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 трегалозоміколами, встановлено закономірності їх синтезу, механізми дії та роль для клітин [55–59]. Бактерії роду *Rhodococcus*

розглядаються як продуценти практично цінних речовин з емульгувальними та поверхнево-активними властивостями в узагальнюючих оглядах [55, 57].

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

Проте якісний склад ПАР різних видів і штамів різниться. Зокрема, у *R. erythropolis* 51T7 ПАР – трегалозотетраефір, що складається з шести компонентів: одного великого та п'яти менших, при цьому гідрофобна складова містить від 9 до 11 атомів вуглецю [60]. ПАР, утворювані *R. fascians* A-3, являють собою рамновмісні гліколіпіди [61]. *R. erythropolis* 3C-9 утворює два типи ПАР: вільні жирні кислоти та гліколіпіди [62]. Причому виявлено щонайменше 12 видів вільних жирних кислот C_9 – C_{22} та два типи гліколіпідів: гліколіпіди та трегалозоліпіди, які, окрім вуглеводної складової, також відрізняються кількістю ненасичених жирних кислот та довжиною їх 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].

У той же час 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 складає більшість (58,62 % від загальної суми). 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 утворювані ПАР являють собою 2,3,4,2'-трегалозотетраєфір, 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'-тетраєфіру 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 гліцерині супроводжується вивільненням у культуральну рідину речовин з поверхнево-активними властивостями, зазвичай зв'язаних 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, проявляють емульгувальну специфічність щодо довгоголанцюгових алканів, 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 у 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 емульгувальними 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 із низьким вмістом солей (3 г/л),

не потребує факторів росту, характеризується високим виходом ПАР від субстрату (до 70 %).

Встановлено, що *R. erythropolis* IMB Ас-5017 синтезує як вільні, так і асоційовані з клітинами ПАР, які за хімічною природою являють собою комплекс гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів із сполуками полісахаридно-білкової природи [70, 71]. Гліколіпіди представлені трегалозомоно- і диміколатами, фосфоліпіди - фосфатидилгліцерином, фосфатидилетаноламіном, дифосфатидилгліцерином, нейтральні ліпіди – цетиловим спиртом, пальмітиновою 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 лабораторному ферментаторі [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 у штаму IMB Ас-5017 (зниження у середовищі культивування вмісту інгібіторів і підвищення активаторів ключових ферментів біосинтезу ПАР) [78].

Так, визначення оптимальних умов культивування *R. erythropolis* IMB Ас-5017 на етанолі (концентрація субстрату 2 %, концентрація KNO_3 – 1,5 г/л, тривалість культивування – 168 год) дало змогу у три рази підвищити синтез ПАР [70]. Максимальний синтез ПАР під час культивування *R. erythropolis* IMB Ас-5017 на гексадекані в колбах на качалці спостерігався за таких умов: концентрація гексадекану 2 %, співвідношення $C/N = 49:1$, 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 $НАДФ^+$ -залежної альдегіддегідрогенази, а катіони натрію – активаторами цих ферментів у штаму IMB Ас-5017 [78]. Зниження у 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 розробки 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 небагаточисельні [55, 67, 83–86]. Перші такі повідомлення з'явилися у кінці 70-х – 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 були підсумовані в огляді [55]. Проте зазначимо, що до теперішнього часу у літературі є лише поодинокі дані 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-манозоеритритолліпідів). Крім того, недоліком родокококів 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 гліцерином (15 г/л) кількість синтезованих ПАР становила всього-навсього 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 36–38 год росту, досягала 2 г/л [52], а під час культивування цього ж штаму у 20 л ферментері 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 висока концентрація ПАР була досягнута під час синтезу цих сполук іммобілізованими клітинами бактерій роду *Rhodococcus* чи клітинами, які перебували у стані спокою.

Зазначимо, що нещодавно з'явилося повідомлення про штам *Rhodococcus* sp. Moj-3449, який характеризувався високою швидкістю росту (до 0,2 год⁻¹) на середовищах з 180 г/л алканів чи сирової нафти [89]. Проте у даній роботі немає інформації про здатність штаму Moj-3449 до синтезу ПАР.

Наші дослідження 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, дробної подачі субстрату порціями по 0,3–0,4 % кожні 5–6 год до кінцевої концентрації 2,4 % (об'ємна частка) та використанні 10 % інокуляту, 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 рази тривалість культивування продуцента порівняно з вирощуванням у колбах на качалці [73].

У табл. 1.2 наведено порівняльні показники синтезу ПАР штамом ІМВ Ас-5017 та іншими представниками роду *Rhodococcus* під час культивування в біореакторах на середовищах з *n*-алканами. Як засвідчують наведені дані, селекціонований нами штам *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 не поступається, а за деякими показниками перевершує відомі продуценти. Так, у процесі вирощування штаму ІМВ Ас-5017 в біореакторі (у встановлених оптимальних умовах) синтезуються переважно позаклітинні ПАР, у той час як для інших родококів у літературі (див. табл. 1.2) наводиться концентрація сумарних поверхнево-активних речовин (як асоційованих з клітинами, так і позаклітинних).

Таблиця 1.2

Порівняльні показники синтезу ПАР під час культивування *R. erythropolis* IMB Ac-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 ₁₂ –C ₁₈ – <i>n</i> -алкани; 20,0	19,0	2,0	10	0,11	38
DSM 43215 [55]	C ₁₀ – <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
IMB Ac-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 зумовлене активацією глюконеогенетичної гілки обміну і посиленням синтезу ліпідів, про що свідчило підвищення у 1,4–1,5 і 3,4–3,6 разів активності ізоцитратліази і фосфоенолпіруватсинтетази, відповідно, а також зниження у 1,5–1,6 разів активності ізоцитратдегідрогенази [74, 75].

Підвищення синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 за внесення у середовище з *n*-гексадеканом фумарату і цитрату зумовлено інтенсифікацією синтезу поверхнево-активних трегалозоміколатів, про що засвідчило 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 повинні бути стійкими до суворих екологічних умов нафтородовищ, у тому числі й до високої температури, тиску, солоності і 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 приводить не тільки до підвищення ступеня біодеградації нафти, а й до суттєвого збільшення популяцій бактерій, які беруть участь у її окисненні. 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 *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і екзогенних ПАР, синтезованих *Pseudomonas* sp. PS-27, ефективність розкладання сирової нафти (2 %) досягала 93–94% [91]. Ступінь деструкції нафти (2,6 г/л) у воді за присутності суспензії клітин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 становив 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 ступінь деградації нафти (2,6 г/л) у воді за присутності 5 % (об'ємна частка) препаратів ПАР у вигляді постферментаційної культуральної рідини або її супернатанту становив 80–93%. Інтенсифікація деструкції нафти зумовлена активацією природної нафтоокиснювальної мікробіоти 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. 1.3). 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) становило 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 з забрудненого піску. Ці дані вказують на потенційну цінність ПАР ТА6 для інтенсифікації процесів нафтовидобутку, особливо у родовищах з екстремальними умовами [68].

Таблиця 1.3

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 родококками трегалозоліпіди розглядаються і як терапевтичні агенти [93, 94]. Гліколіпідний комплекс, синтезований *R. ruber* нетоксичний і не спричиняє відчутного ефекту на проліферативну активність лейкоцитів периферичної крові [94]. У фракції моноцитів ПАР активізує утворення ІЛ-1β та фактора некрозу пухлин-α, не впливаючи на утворення ІЛ-6. У мононуклеарній фракції гліколіпід не вплив на продукцію цих цитокінів. Такі результати вказують на перспективи подальших досліджень імуномодулюючої та протипухлинної дії препарату ПАР. Гліколіпідний комплекс *R. ruber* IEGM 231 стимулює синтез ІЛ-12, ІЛ-18 та активних форм кисню клітинами вродженого імунітету [93]. При цьому ПАР незначно впливав на утворення ІЛ-10 моноцитами та мононуклеарними клітинами.

Перші повідомлення про антивірусні властивості мікробних ПАР родококів з'явилися ще у кінці 80-х років ХХ ст. [53, 54]. Так, ПАР *R. erythropolis* проявляли антивірусну дію щодо простого вірусу Герпесу 1 (HSV-1) та вірусу грипу.

Наші дослідження [95–97] показали, що препарати ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (0,61–2,1 мг/мл) вигляді супернатанту культуральної рідини проявляють

антимікробну дію щодо ряду мікроорганізмів (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3). Не виявлено інгібуючого впливу препаратів ПАР *R. erythropolis* ЕК-1 на клітини *S. cerevisiae* ОБ-3 і *E. coli* ІЕМ-1 і 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 обробки 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*, *Staphylococcus aureus*) завдяки власним як антимікробним, так і емульгувальним властивостям [96, 97]. Показано, що за одночасного внесення у суспензію досліджуваних тест-культур (10^4 – 10^5 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 обробки суспензії мікроорганізмів препаратами олії без поверхнево-активних речовин.

Зазначимо, що поверхнево-активні речовини *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 проявляли антимікробну дію щодо ряду фітопатогенних бактерій – *Pseudomonas syringae* 8511, *Pseudomonas corrugata* 9070, *Pectobacterium carotovorum* 8289, *Xantomonas vesicatoria* 7790) (рис. 1.2). Експерименти показали, що із 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.

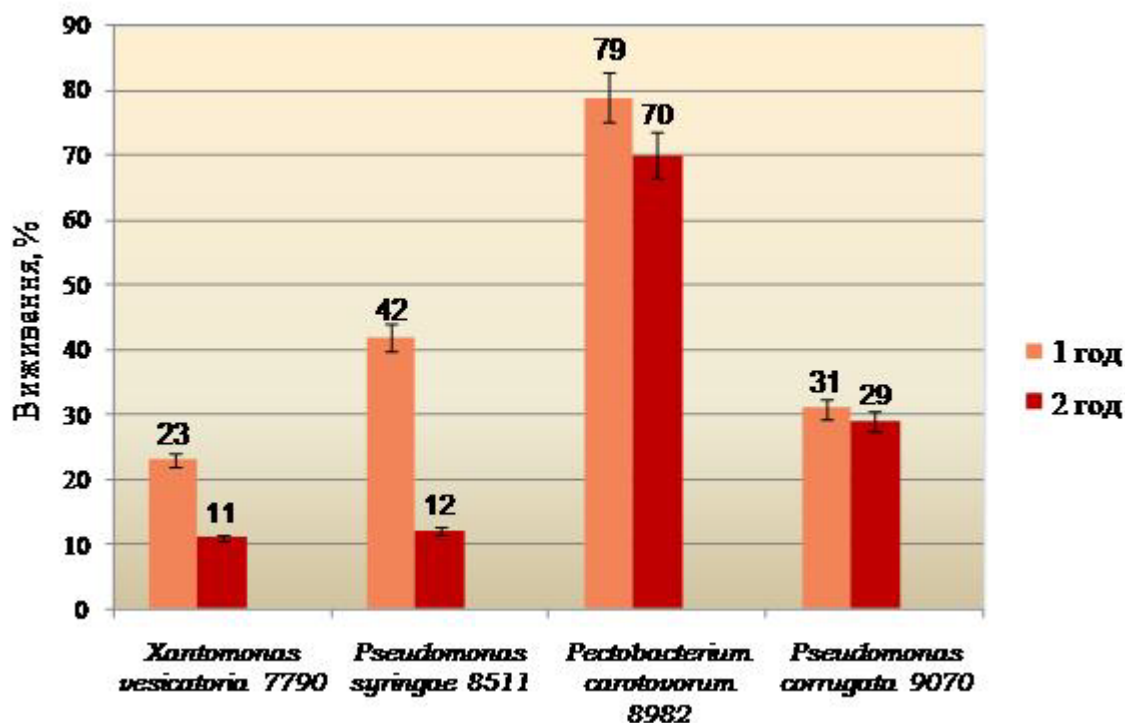


Рис. 1.2. Антимікробна дія ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на деякі фітопатогенні бактерії

* * *

Ринковий інтерес до бактерій роду *Rhodococcus* зумовлений їх широкими метаболічними можливостями і здатністю до синтезу ряду практично цінних метаболітів: поверхнево-активних та емульгувальних речовин, флокулянтів, полімерів, антибіотиків, ферментів тощо.

Літературні дані засвідчують величезний потенціал цих бактерій як деструкторів ароматичних, гетероциклічних та аліфатичних ксенобіотиків – нафталену, ксилолу, толуену, флуорену, ізопрену, індолу, фенолу, вуглеводнів нафти тощо.

Комерційно привабливими також є представники роду *Rhodococcus*, здатні здійснювати біотрансформації – процеси біологічного перетворення сполук, що представляють інтерес у промисловому виробництві продуктів з відновлювальної дешевої рослинної сировини. Так, перспективними є штами родококів, використовувані для одержання ароматизаторів карвону та гераніолу, а також нікотинредукуючі штами. Використання біоконверсії різноманітних субстратів

представниками цього роду може значно здешевити та полегшити отримання біодизелю, бутирамідів, акрилової кислоти.

Метаболіти бактерій роду *Rhodococcus* є перспективними для використання у природоохоронних технологіях (поверхнево-активні речовини, полісахариди), медицині (ферменти, антибіотики, ПАР), промисловості (ферменти, ПАР) тощо.