

**МОРФОЛОГО - КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ  
ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ  
ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЗАГРЯЗНЁННЫХ УЧАСТКОВ УЗБЕКИСТАНА**

<sup>1</sup>Алимова Б.Х., <sup>2</sup>Пулатова О.М., <sup>3</sup>Камбаралиева М.И., <sup>4</sup>Хасанова Л.Ю., <sup>5</sup>Шарипов  
М.Р., <sup>6</sup>Холиков А.Ф., <sup>7</sup>Махсумханов А.А., <sup>8</sup>Давранов К.Д.

<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, г.Ташкент,

Узбекистан, E-mail: [balimova@list.ru](mailto:balimova@list.ru)

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8370166>

**Аннотация.** Из экологически загрязнённых участков Узбекистана выделено в чистую культуру 11 штаммов бактерий, относящихся к роду *Rhodococcus*. На основании изучения морфолого-культуральных, физиолого-биохимических и генетических характеристик выделенные 3 штамма отнесены к виду *Rhodococcus ruber*, 2 штамма *Rhodococcus pyridinovorans*, 1 штамм к *Rhodococcus rhodochrous* и 2 штамма *Rhodococcus erythropolis*. Анализ плазмидного профиля показал, что штаммы *Rhodococcus ruber*-8/4/1 и *Rhodococcus sp.*-2/5 имеют плазмиды размерами 1,5 Кбр и мегаплазмиды размером приблизительно 40 и 35 Кбр, а у штамма *Rhodococcus sp.*- 8/2/1 обнаружена мегаплазида размером более 35 Кбр, которая обладала высокой нитрилгидратазной активностью – фермент участвующий в биоконверсии нитрилов. Однако, при исследовании плазмидного профиля у штамма *Rhodococcus ruber*-3/4/3 плазмидная ДНК не обнаружена. По результатам наших исследований, штаммы бактерии вида *Rhodococcus rhodochrous* по сравнению с другими видами родококков, менее чувствительны к антибиотикам различных групп. Установлено, что штамм *Rhodococcus ruber*-3/4/3 является продуцентом амидазы. Практически все штаммы проявили высокую биосурфактантную активность. Выделенные штаммы являются перспективными объектами для разработки новых микробных биотехнологий.

**Ключевые слова:** *Rhodococcus*, выделение, морфология, физиология, идентификация, ферментативная активность, биосинтез, культивирование, плазида, биосурфактант, биотехнология.

**Abstract.** 11 strains of bacteria belonging to the genus *Rhodococcus* have been isolated as a pure culture from ecologically polluted areas of Uzbekistan. Based on the study of morphological, cultural, physiological, biochemical and genetic characteristics, 3 strains were identified as *Rhodococcus ruber*, 2 strains of *Rhodococcus pyridivorans*, 1 strain of *Rhodococcus rhodochrous*, and 2 strains of *Rhodococcus erythropolis*. Analysis of the plasmid profile showed that strains of *Rhodococcus ruber*-8/4/1 and *Rhodococcus sp.*- 2/5 have plasmids of 1.5 Kbp in size and megaplasmids of approximately 40 and 35 Kbp, a megaplasmid is found in *Rhodococcus sp.*- 8/2/1 larger than 35 Kbp, which had a high nitrile hydratase activity - an enzyme involved in the bioconversion of nitriles. However, when using the above methods, plasmid DNA was not detected in the *Rhodococcus ruber*-3/4/3 strain. According to the results of our studies, strains of *Rhodococcus rhodochrous* species are less sensitive to antibiotics of various groups compared to other types of rhodococci. It was established that the *Rhodococcus ruber*-3/4/3 strain is an amidase producer, while *Rhodococcus ruber*-8/4/1 possessed cobalt-dependent nitrile hydratase. Almost all strains showed high biosurfactant activity. The isolated strains are promising objects for their application in microbial biotechnology.

**Keywords:** *Rhodococcus*, isolation, morphology, physiology, identification, enzymatic activity, biosynthesis, cultivation, plasmid, biosurfactant, biotechnology.

В последнее десятилетие углеводородокисляющие актинобактерии представители родов *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* являются объектами фундаментальных исследований в области биохимии, физиологии и генетики микроорганизмов, а также прикладных разработок в области микробной биотехнологии. Это вызвано широкими метаболическими возможностями этих родов микроорганизмов [1, 2]. Бактерии рода *Rhodococcus*, занимают доминирующее положение в этой группе углеводородокисляющих микроорганизмов. Способность их метаболизировать сложные органические высоко токсичные и устойчивые поллютанты, хлорированные алифатические и ароматические углеводороды, N- и S -гетероциклические соединения и синтетические полимеры (полиэтилен), сделали их одними из перспективных родов микроорганизмов, нашедших широкое применение в биоремедиации, биотрансформации и биокатализе. Бактерии рода *Rhodococcus* способны также синтезировать ценные органические соединения (каротиноиды, жирные кислоты, биофлокулянты, сидерофоры), а также гликолипиды, биосинтез которых связывают со способностью их противостоять различным стрессовым условиям окружающей среды [3-6].

Родококки были выделены из различных источников, таких как почва, грунтовые воды, морские отложения, внутренние органы насекомых, больных и здоровых животных и из растений [7-9]. Подавляющее большинство этой группы бактерий считается непатогенными, однако некоторые виды проявляют патогенные свойства, среди которых известны возбудители инфекционных заболеваний человека, животных и растений. Первый случай родококковой инфекции был описан в 1986 г. в крови больного СПИДом [10]. *Rhodococcus equi* вызывает легочный инфекционный синдром, являясь основной причиной пневмонии у жеребят. Филогенетический анализ показал, что *Rhodococcus equi* имеет высокую степень сходства основного генома (консервативный набор генов) с непатогенными видами родококков из окружающей среды. Существуют гены, участвующие в биосинтезе белков, метаболизме, транспорте и передаче сигналов, которые могут быть связаны как с адаптацией, так и с вирулентностью [11]. В присутствии двух видов родококков *Rhodococcus fascians* и *Rhodococcus corynebacterioides* у растений наблюдалось заболевание «Синдром фисташкового куста». Описывается, что персистенция клеток *Rhodococcus fascians* в тканях инфицированных растений и проявление вирулентных свойств обусловлены присутствием в клетках линейной плазмиды rFiD188 [12].

Для идентификации бактерий рода *Rhodococcus* обычно используются традиционные фенотипические тесты, составляющие основу описания таксонов, от вида и подвида до рода и семейства. Классические фенотипические характеристики включают морфологические, физиологические и биохимические особенности. Морфология *Rhodococcus* включает как клеточные, так и колониальные признаки. Физиологические и биохимические характеристики включают данные о росте штаммов при различных значениях pH, температуры, влиянии различных концентраций NaCl. Одними из важных биологических признаков бактерий рода *Rhodococcus*, которые широко используется как дополнительные дифференцирующие

признаки их видовой принадлежности, это чувствительность штаммов к антибиотикам, жирнокислотный состав клеточной стенки штаммов, а также ферментативная активность [7].

Цель данного исследования – изучение **морфолого-культуральных и физиолого-биохимических свойств бактерий рода *Rhodococcus***, и определение их видовой принадлежности.

#### **Материалы и методы исследования**

Для выделения бактерий рода *Rhodococcus* были использованы образцы загрязнённых нефтепродуктами, акрилонитрилом, акриламидом и акриловой кислотой почв, ила, сточные воды Бухарского НПЗ, нефтегазовые скважины Кашкадарьинской области, загрязненные участки АО «Navoiyazot».

Штаммы выделяли методом накопительной культуры и прямого посева [13]. В случае прямого посева навески почвы 10 г суспендировали в 100 мл стерильного фосфатного буфера, отстаивали при температуре 25-27 °С в течении 1 часа, затем надосадочную жидкость в количестве 100 мкл наносили на поверхность агаризованной среды питательный агар (Himedia, Индия) и растирали шпателем. В случае с использованием в качестве образцов ила или стоков образцы не разводили в фосфатном буфере, посев производили напрямую в питательный агар.

Для выращивания накопительных культур 10 г или 10 мл образца вносили в питательные среды: Триптон-соевый бульон (Himedia, Индия), среда Таусона с 2% н-гексадеканом состав среды (г/л):  $K_2HPO_4$  – 8.71; 5M  $NH_4Cl$  – 1 мл; 0,1 M  $Na_2SO_4$  – 1 мл; 62 mM  $MgCl_2$  – 1 мл; 1 mM,  $CaCl_2$  – 1 мл; 0,005 mM  $(NH_4)_6Mo_7O_2$  – 1 мл; микроэлементы (состав в 1% растворе HCl, г/л: ZnO – 0,41;  $FeCl_2$  -2,9;  $MnCl_2$  – 1,28;  $CuCl_2$  – 0.13;  $CoCl_2$  – 0.26;  $H_3BO_3$  – 0.06). pH=7.0-7.3; среду стерилизовали в течение 20 мин при 121 °С. Образцы выращивали в конических колбах Эрленмейера объёмом 250 мл, содержащие 100 мл питательной среды, на шейкере-инкубаторе с круговым вращением (120 об/мин) при 28-30 °С. Образцы инкубировали в течение 7 дней, периодически отбирая пробы с последующим посевом их на чашки.

Для селекции штаммов бактерий продуцентов биосурфактантов в качестве источника углерода использовали нефть или н-гексадекан.

Для селекции штаммов бактерий продуцентов нитрилгидратаз и амидаз использовали акриламид, акрилонитрил и ацетонитрил.

Для получения чистой культуры отбирали морфологически отличающиеся колонии и проверяли их однородность двукратным пересевом на питательный агар. Чистота культур контролировалась посевом на агаризованную среду питательный агар. Морфологию и жизненный цикл штаммов изучали в течении 6, 12, 18, 48, 72 часов культивирования, на питательном агаре и жидкой питательной среде ПС с использованием световой микроскопии.

Идентификация штаммов проводили на основании культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристиках согласно определителю Берджи, и по работам И.Б. Ившиной [7, 14].

Для подтверждения принадлежности выделенных штаммов к одному виду проведён протеомный анализ клеток бактерий методом MALDI-TOF MS.

Для выделения геномной ДНК использовали стандартный фенол-хлороформный метод и анализировали на 0,8% агарозном геле, используя GelDoc™ XR+Imager с программным обеспечением Bio-Rad Laboratories, США. Для определения размера выделенной ДНК и ПЦР продуктов на агарозном геле использованы ДНК маркеры размерами 0.5-12.0 Кbp. ПЦР амплификацию гена 16S рPHK штамма проводили с использованием master-mix PLATINUM HS PCR 2X (Invitrogen, США) и универсальных праймеров: 27F\_5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' и U1492R\_5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' на приборе C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, США). ПЦР продукт анализировали в 1.0% агарозном геле и выделяли из геля с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QiaGen, США). Генетическую идентификацию проводили по методу Сенгера [15]. Секвенирование гена 16S рPHK штамма проводили на приборе SeqStudio Genetic Analyzer с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fischer Scientific, США).

Для выделения плазмидной ДНК из клеток штаммов использованы классические методы MiniPrep [16], фенол-хлороформный метод и набор для выделения плазмидной ДНК QiaGene. Плазмидную ДНК анализировали на 0,5-0,8% агарозном геле используя GelDoc™ XR+ Imager с программным обеспечением Bio-Rad Laboratories, США. Для определения молекулярных размеров, выделенных плазмид на агарозном геле, использованы ДНК маркеры размером 0,5-12,0 Кbp и 35 Кbp.

Определение чувствительности штаммов к антибиотикам проводили методом стандартных индикаторных дисков [13]. Использовались бумажные диски производства HiMedia, пропитанные стандартными растворами испытуемых антибиотиков: Gentamicin (10 мкг), Amikacin (30 мкг); Erythromycin (15 мкг), Azitromycin (15 мкг); Lincomycin (15 мкг); Ampicillin (10мкг), Oxacillin (1 мкг); Rifampicin (5 мкг), Chloramphenicol (30мкг), Tetracycline (30 мкг); Cefazolin (30 мкг); Vancomycin (5мкг); Ciprofloxacin (5 мкг), Офлоксацин (5 мкг); Co-Trimoxazole (25 мкг). Диски накладывали стерильно на поверхность засеянной питательной среды (по 4-5 дисков на одну чашку). Засеянные чашки инкубировались при 28 °С. Результаты учитывались на третьи сутки путем измерения (в миллиметрах) диаметра зоны ингибирования бактериального роста вокруг соответствующего диска.

Суммарные клеточные липиды, экстрагировали по традиционному методу Кейтс [16]. Метилловые эфиры жирных кислот растворяли в гексане и анализировали на газожидкостном хроматографе *Agilent Technologies* 6890 N с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой длиной 30 м с внутренним диаметром 0.32 мм с нанесенной фазой HP-5, при температуре от 150 до 270 °С. Газ-носитель – гелий.

Выделенные чистые культуры бактерий поддерживали на среде питательный агар и агаризованной среде Мюнца с 2% гексадеканом.

#### **Результаты и их обсуждение**

Из загрязнённых нефтепродуктами, акрилонитрилом, акриламидом и акриловой кислотой образцов почв, ила и сточных вод Бухарского НПЗ, с нефтегазовых скважин Кашкадарьинской области и также АО «Navoiyazot» (г. Навои, Узбекистан), было выделено в чистую культуру 11 штаммов бактерий, относящихся к роду *Rhodococcus* (таблица 1).

Отличительная особенность исследуемых штаммов от других родов бактерий – трёхстадийный морфогенетический цикл развития (кокки – палочковидные, нитевидные или ветвящиеся клетки – кокки). На питательном агаре при температуре 28 °С и pH 7,0 образуют колонии мягкой консистенции без воздушного мицелия с бежево-розовым, тёмно-розовым, оранжево-красным недифундирующим пигментом. Все исследуемые штаммы грамположительные, аэробы, неподвижны, некислоустойчивые, неспорообразующие, все выделенные в чистую культуру штаммы отнесены к роду *Rhodococcus*.

Таблица 1

**Бактерии рода *Rhodococcus* выделенные из загрязненных водных и почвенных экосистем Узбекистана**

№ п/п	Номер штамма	Источник выделения
1	<i>Rhodococcus</i> sp.-2/5	Промывная вода получения акриламида-мономера (без содержания аммиачной воды) ОА «Navoiyazot»
2	<i>Rhodococcus</i> sp.-8/2/1	Почвенный образец с дренажной емкости сточных вод получения нитрила акриловой кислоты АО «Navoiyazot»
3	<i>Rhodococcus</i> sp. HA	Проба промышленных сточных вод Бухарского НПЗ.
4	<i>Rhodococcus</i> sp. 343	Проба с эйрлифта активного ила АО «Navoiyazot»
5	<i>Rhodococcus</i> sp. HN4	Почва из автосервиса по замену моторного масла
6	<i>Rhodococcus</i> sp. 8/4/1	Почвенный образец с дренажной емкости сточных вод получения нитрила акриловой кислоты АО «Navoiyazot»
7	<i>Rhodococcus</i> sp. 2/3/6	Проба промышленных сточных вод Бухарского НПЗ.
8	<i>Rhodococcus</i> sp. HN5	Стоки машинного масла
9	<i>Rhodococcus</i> sp. 07	ГМЗ-3 Проба №16
10	<i>Rhodococcus</i> sp. 09	ГМЗ-3 Проба № 30
11	<i>Rhodococcus</i> sp. HN6	Стоки машинного масла

Для определения видовой принадлежности штаммов были изучены морфологические особенности выделенных культур. Показано, что штаммы, относящиеся к виду *Rhodococcus ruber* на среде питательный агар формируют оранжево-красные, круглые, матовые, выпуклые колонии, среднего размера по краям древовидные сухие отростки (рис. 1А). Отличительная особенность для *Rhodococcus ruber* наиболее выражена мицелиальная стадия развития клеток. В начальной стадии роста прорастание и ветвление исходных кокковидных и коротких палочковидных клеток начинается с формирования одной-трех ростовых трубок. Кокк прорастает в короткие палочки, а затем в мицелий. Клетки в молодой культуре нитевидные или ветвящиеся. В морфоцикле *Rhodococcus ruber* обнаруживается четыре формы клеток прорастающая, ветвистая, палочковидная, кокки. К 72 часам культивирования наблюдается обильный мицелий, который фрагментируется на укороченные неравномерные палочковидные и кокковидные элементы. В возрасте 4-5 сут



наблюдается заметное преобладание кокковидных (0.5–0.8 мкм) клеток, после удаления колоний с агаровой пластинки и последующего просмотра места их расположения обнаруживается врастание клеток *Rhodococcus ruber* в агар.

Штаммы *Rhodococcus rhodochrous* на среде питательный агар формируют розовато-красные со слабым желтоватым оттенком, выпуклые, с влажным блеском, гладкие, маслянистые, с ровным краем колонии диаметром до 3,0 – 6.0 мм (рис. 1B). Структура колоний однородная. При эмульгировании образуют равномерную суспензию в воде. При микрокопировании наблюдаются кокки крупного размера, булавовидные или гантелевидные. Слабо ветвящиеся клетки, палочки нитевидные и кокки. К 24 часам культивирования наблюдается прорастание коковидных форм в короткие и длинные палочковидные клетки. В морфоцикле *Rhodococcus rodochrous* обнаруживаются формы клеток прорастающая, ветвистая, длинные палочковидные клетки. К 48 -72 часам разрастаясь формируют мицелий. К 96 часам сформированный мицелий распадается на длинные палочковидный клетки и кокки

Штаммы *Rhodococcus erythropolis* на среде питательный агар формируют колонии кремового цвета, среднего размера, с влажным блеском, не выделяющие пигмент в среду, поверхность колоний гладкая, профиль колоний выпуклый, по краю колонии ровные (рис. 1C), структура однородная равномерно суспендируются в воде. В процессе роста колонии увеличивались в размерах (на 5-7 день инкубации до 3-8 мм в диаметре), цвет колоний становился более интенсивным. При микрокопировании в результате фрагментации распадающегося мицелия обнаружены мелкие короткие палочки и кокки. Слабо ветвящиеся клетки, палочки нитевидные и кокки. К 24 часам роста колонии штамма состояли из палочек неправильной формы увеличенные в размерах, наблюдается прорастание кокков в палочки. К 48 часам культивирования обнаруживается, формы клеток прорастающая, палочковидная, наблюдается скопление клеток в виде мицелия, происходит деление укороченных фрагментов бинарным способом. К 72 часам наблюдается следующее поколение кокков и коротких палочек путем фрагментации длинных палочек, в процессе бинарного деления. В возрасте 4-5 суток наблюдается заметное преобладание кокковидных клеток.

Клетки штамма *Rhodococcus pyridinovorans* представляли собой палочки и разветвленные нити на ранней стадии роста, затем фрагментируются на короткие палочки или кокки, тем самым завершая рост цикл по мере старения культуры. Цвет колоний светло-оранжевый, непрозрачные, края колоний неровные слегка приподнятые (Рис. 1D).

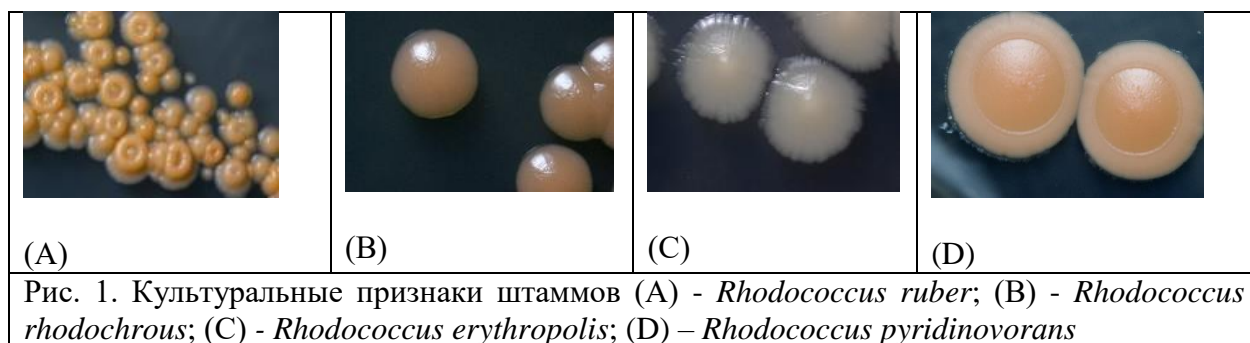


Рис. 1. Культуральные признаки штаммов (A) - *Rhodococcus ruber*; (B) - *Rhodococcus rhodochrous*; (C) - *Rhodococcus erythropolis*; (D) – *Rhodococcus pyridinovorans*

Физиолого-биохимические свойства штаммов представлены в таблице 2. Установлено, что все штаммы, не образуют кислоту на арабинозе, галактозе и рамнозе,

кислотообразование обнаружено на глицерине и манните. В отличие от *Rhodococcus ruber* штаммы *Rhodococcus rhodochrous* и *Rhodococcus pyridinovorans* не образуют кислоты из сахарозы. Штаммы способны восстанавливать нитраты в нитриты. Наиболее выраженной тирозиназной активностью обладали штаммы, относящиеся к виду *Rhodococcus ruber*, штаммы вида *Rhodococcus erythropolis* тирозиназную активность проявляли слабо. Уреазная активность обнаружена для штамма вида *Rhodococcus erythropolis*, тогда как для штаммов других видов родококков уреазная активность не обнаружена. Штамм *Rhodococcus ruber* 3/4/3 продуцент амидазы, тогда как *Rhodococcus ruber* 8/4/1 обладал кобальтзависимой нитрилгидратазой. Кобальтзависимой нитрилгидратазной активностью обладали все штаммы, относящиеся к виду *Rhodococcus rhodochrous* и *Rhodococcus pyridinovorans*.

Таблица 2

**Физиолого-биохимические признаки бактерий рода *Rhodococcus***

Признак	<i>Rhodococcus ruber</i> (3)	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (3)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (3)	<i>Rhodococcus pyridinovorans</i> (2)
Колонии оранжево красные	+	-	-	-
Колонии розовато красные	-	+	-	+
Колонии палево телесные	-	-	+	-
Слабо ветвящиеся клетки, палочки нитевидные и кокки	-	+	+	+
Сильно ветвящиеся клетки с развитым первичным мицелием и кокки	+	-	-	-
Разложение тирозина	+	+	-	+
Наличие уреазы	-	-	+	-
Наличие амидазы	+	+	-	+
Наличие нитрилгидратазы	-	+	-	+
Оксигеназная активность	+	+	+	+
Образование кислоты:				
арабиноза	-	-	-	-
глюкоза	+	+	+	+
галактоза	-	-	-	-
рамноза	-	-	-	-
сахароза	+	-	+	-
лактоза	-	+	+	-
мальтоза	-	+	+	-
маннит	+	+	+	+
глицерин	+	+	+	+



Рис. 2. Физиолого-биохимические признаки бактерий рода *Rhodococcus*. (A) – образование кислоты, (B) – разложение тирозина, (C) – наличие уреазной активности, (D) – реакция на нитраты с реактивом Грисса.

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с время пролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) является одной из последних систем идентификации микроорганизмов, доступных для лабораторий [17]. Несмотря на то, что система является «фенотипической», она, в некотором смысле, устраняет пробел в достоверности результатов испытаний, полученных с помощью биохимических систем фенотипирования и идентификационных систем генотипирования. Так, для подтверждения принадлежности выделенных штаммов к одному виду проведён анализ клеток бактерий методом MALDI-TOF MS. Результаты исследований MALDI-TOF MS показали, что из 11 штаммов бактерий, относящихся к роду *Rhodococcus*, 3 штамма были отнесены к виду *Rhodococcus ruber*, 2 штамма *Rhodococcus pyridinovorans*, 3 штамма к *Rhodococcus rhodochrous* и 3 штамма *Rhodococcus erythropolis*.

Для подтверждения принадлежности выделенных штаммов к определенному виду также была проведена полимеразная цепная реакция фрагментов их генов, кодирующих 16S рРНК с использованием системы универсальных праймеров. Последовательность фрагментов генов 16S рРНК была определена только для 2 штаммов. Показано, что выделенные штаммы относятся к виду *Rhodococcus ruber* 8/4/1 и *Rhodococcus ruber* 3/4/3.

Как дополнительный дифференцирующий признак оценки возможности определения видовой принадлежности бактерий рода *Rhodococcus* многими исследователями изучается чувствительность штаммов к антибиотикам различного биологического происхождения, а также жирнокислотный состав клеточной стенки [3, 7]. В наших исследованиях, выделенные в чистые культуры штаммы бактерий рода *Rhodococcus* проявили высокую чувствительность к большинству испытанных антибиотиков, так зона задержки роста более 25 мм наблюдалась для штаммов *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus pyridinovorans*. Все штаммы проявили устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда. Устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда также показана в работах Anuradha Ghosh и др. При определении видовой принадлежности штамма *Rhodococcus imtechensis* авторами установлено, что клетки штамма *RKJ300* проявили устойчивость к цефалоспоринолу (30 мкг) и ампициллину (10 мкг) [18]. В работах Ившиной И.Б. и Куюкиной М.С. также показана высокая чувствительность штаммов бактерий рода *Rhodococcus* по данному признаку к большинству испытанных антибиотических веществ. Авторами установлена чувствительность штаммов как к ампициллину, так и карбенициллину (диаметр зоны 45 мм), тогда как к оксациллину и метициллину соответствующие диаметры зон составляли (1-20 и 0-9 мм) [19]. По результатам наших исследований, штаммы бактерии вида *Rhodococcus rhodochrous* по сравнению с другими видами родококков, менее



чувствительны к антибиотикам различных групп. Наблюдается различие в видовой принадлежности штаммов по отношению к Co-Trimoxazole, так, штаммы *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus pyridinovorans*, *Rhodococcus rhodochrous* проявили устойчивость по отношению к данному антибиотику, тогда как для штамма *Rhodococcus ruber* зона подавления роста которого составила 16-18 мм. Таким образом, следует отметить, что чувствительность к антибиотикам для бактерий рода *Rhodococcus* может служить дополнительным критерием при определении видовой принадлежности бактерий рода *Rhodococcus*, и иметь информативную ценность в таксономических исследованиях данного рода.

Таксономическая специфичность состава жирных кислот (ЖК) бактериальных клеток долгое время подвергалась сомнению ввиду того, что состав жирных кислот в значительной мере зависит от возраста культуры, условий ее выращивания - состава среды, pH, температурного режима. Однако при строгом соблюдении общих требований к выращиванию культур, высокой стандартизации условий культивирования микроорганизмов и стандартизации исследуемого материала качественный состав групп ЖК достаточно постоянен. Спектр ЖК бактерий отдельных видов может быть настолько характерным, что определение его не составляет сомнений в видовой принадлежности культур. Однако нередко представители разных видов одного и того же рода или даже разных родов имеют сходные ЖК профили. Анализ клеточных ЖК бактерий рода *Rhodococcus* показал, что независимо от их видовой принадлежности качественный состав их одинаков. Для всех штаммов характерно повышенное содержание пальмитиновой (C16:0), пальмитолеиновая (16:1n9), олеиновой (18:1n9) и линолевых (18:2n6) кислот, с содержанием 10-метил-октадекановой 10MeC18:0 (туберкулостеариновая кислота). Однако были выявлены некоторые различия в количественном соотношении индивидуальных кислот. Так по процентному содержанию туберкулостеариновой кислоты *Rhodococcus ruber* отличается от *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus pyridinovorans*, так для *Rhodococcus ruber* составляет менее 3%, тогда как для *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous* более 9%. Особенностью штаммов *Rhodococcus erythropolis* – повышенное содержание туберкулостеариновой кислот, для штамма культур *Rhodococcus ruber* (миристиновой) (C14:0) кислоты.

Важную роль в адаптации родококков к изменяющимся условиям окружающей среды играют плазмиды [3, 19]. В наших исследованиях для выделения плазмидной ДНК штаммов *Rhodococcus* были использованы классические методы и набор QiaGene для выделения плазмидной ДНК. Показано, для выделения плазмидной ДНК, наиболее оптимальным является использование классических методов выделения ДНК, поскольку при использовании набора QiaGene плазмиды не обнаружены. Анализ плазмидного профиля показал, что штаммы *Rhodococcus ruber-8/4/1* и *Rhodococcus sp.- 2/5* имеют плазмиды размерами 1,5 Kbp и мегаплазмиды размером приблизительно 40 и 35 Kbp, у штамма *Rhodococcus sp. - 8/2/1* обнаруживается мегаплазида размером более 35 Kbp, которая обладала высокой нитрилгидратазной активностью – фермент участвующий в биоконверсии нитрилов. Однако, при использовании выше указанных методов у штамма *Rhodococcus ruber-3/4/3* плазмидная ДНК не обнаружена. Наши данные согласуются с исследованиями, проведенными Гольшевой А.А. и др. [20], в исследованиях которых в качестве объекта было изучено 114 штаммов *Rhodococcus ruber*. У исследованных штаммов плазмиды также не обнаружены. При проведении биоинформативного анализа установлено, что наиболее распространенные кодирующие последовательности, обуславливающие устойчивость 114 штаммов *Rhodococcus ruber* являются белки катионной системы эффлюкса CzcD, редуктазы Hg<sup>2+</sup>, белки устойчивости к ТМ ModC, CopC, CopD, а также белки сборки цитохром-С-оксидаз. Штамм проявил высокую биосурфактантную, амидазную активность, но не обладал нитрилгидратазной активностью. По-видимому, проявленная ферментативная активность штаммов не связана со спектром плазмидных ДНК, влияние плазмидной ДНК на метаболическую активность *Rhodococcus* и их устойчивость к токсичным загрязнителям необходимо изучать в контексте с другими каталитическими свойствами этих бактерий.

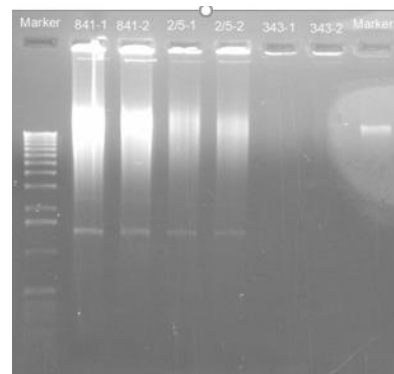


Рис. 3. Плазмидный спектр бактерий рода *Rhodococcus*

Таким образом, в результате проведенных исследований из экологически загрязнённых участков Узбекистана выделено в чистую культуру 11 штаммов бактерий, относящихся к роду *Rhodococcus*. На основании изучения морфолого - культуральных и физиолого-биохимических, генетических характеристик выделенные 3 штамма отнесены к виду *Rhodococcus ruber*, 2 штамма *Rhodococcus pyridinovorans*, 1 штамма к *Rhodococcus rhodochrous* и 2 штамма *Rhodococcus erythropolis*. Последовательность фрагментов генов 16S рРНК была определена только для 2 штаммов. Показано, что выделенные 2 штамма относятся к виду *Rhodococcus ruber-8/4/1* и *Rhodococcus ruber- 3/4/3*. Анализ плазмидного профиля показал, что штаммы *Rhodococcus ruber-8/4/1* и *Rhodococcus sp.- 2/5* имеют плазмиды размерами 1,5 Kbp и мегаплазмиды размером приблизительно 40 и 35 Kbp, у штамма *Rhodococcus sp.- 8/2/1* обнаруживается мегаплазида размером более 35 Kbp. Однако, при использовании выше указанных методов у штамма *Rhodococcus ruber-3/4/3* плазмидная ДНК не обнаружена. Кобальтзависимой нитрилгидратазной активностью обладали все штаммы, относящиеся к виду *Rhodococcus rhodochrous* и *Rhodococcus pyridinovorans*. По результатам наших исследований, штаммы бактерии вида *Rhodococcus rhodochrous* по сравнению с другими

видами родококков, менее чувствительны к антибиотикам различных групп. Наблюдается различие в видовой принадлежности штаммов по отношению к Co-Trimoxazole, так, штаммы *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus pyridinovorans*, *Rhodococcus rhodochrous* проявили устойчивость по отношению к данному антибиотику, тогда как для штамма *Rhodococcus ruber* зона подавления роста которого составила 16-18 мм. Установлено, что штамм *Rhodococcus ruber*-3/4/3 является продуцентом амидазы, тогда как *Rhodococcus ruber*-8/4/1 обладал кобальтзависимой нитрилгидратазой. Практически все штаммы проявили высокую биосурафактантную активность. Выделенные штаммы являются перспективными объектами для применения их в микробной биотехнологии.

## REFERENCES

1. Kim, D., Choi, K. Y., Yoo, M., Zylstra, G. J., & Kim, E. (2018). Biotechnological Potential of *Rhodococcus* Biodegradative Pathways. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(7), 1037–1051. <https://doi.org/10.4014/jmb.1712.12017>
2. Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nesvera, J., & Kren, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment international*, 35(1), 162–177. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
3. Cappelletti, M., Presentato, A., Piacenza, E., Firrincieli, A., Turner, R. J., & Zannoni, D. (2020). Biotechnology of *Rhodococcus* for the production of valuable compounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(20), 8567–8594. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10861-z>
4. Ciavarelli, R., Cappelletti, M., Fedi, S., Pinelli, D., & Frascari, D. (2012). Chloroform aerobic cometabolism by butane-growing *Rhodococcus aetherovorans* BCP1 in continuous-flow biofilm reactors. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(5), 667–681. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0647-3>
5. Krivoruchko, Anastasiia, Maria Kuyukina, and Irena Ivshina. (2019). "Advanced *Rhodococcus* Biocatalysts for Environmental Biotechnologies" *Catalysts* 9(3), 236. <https://doi.org/10.3390/catal9030236>
6. Song Jiao, Fulong Li , Hui min Yu & Zhongyao Shen (2020) Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase. *Appl Microbiol Biotechnol* 104, 1001–1012. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10284-5>
7. Ившина И.Б., Кеворков Н.Н., Коблова И.В. Нестеренко Е.И., Квасников Е.И. Идентификация бактерий рода *Rhodococcus* методом иммунодиффузии. *Микробиология*Т.51. В.4. С.636-641. 1982.
8. Ward, A. L., Reddyvari, P., Borisova, R., Shilabin, A. G., & Lampson, B. C. (2018). An inhibitory compound produced by a soil isolate of *Rhodococcus* has strong activity against the veterinary pathogen *R. equi*. *PLoS one*, 13(12), e0209275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209275>
9. Kis, Á. E., Laczi, K., Zsíros, S., Kós, P., Tengölics, R., Bounedjoum, N., Kovács, T., Rákhely, G., & Perei, K. (2017). Characterization of the *Rhodococcus* sp. MK1 strain and its pilot application for bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 64(4), 463-482. <https://doi.org/10.1556/030.64.2017.037>
10. Samies, J. H., Hathaway, B. N., Echols, R. M., Veazey, J. M., Jr, & Pilon, V. A. (1986). Lung abscess due to *Corynebacterium equi*. Report of the first case in a patient with

- acquired immune deficiency syndrome. *The American journal of medicine*, 80(4), 685–688. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90825-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90825-9)
11. Stewart, A., Sowden, D., Caffery, M., Bint, M., & Broom, J. (2019). *Rhodococcus equi* infection: A diverse spectrum of disease. *IDCases*, 15, e00487. <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00487>
  12. Vereecke, D., Burssens, S., Simón-Mateo, C., Inzé, D., Van Montagu, M., Goethals, K., & Jaziri, M. (2000). The *Rhodococcus fascians* - plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta*, 210(2), 241–251. <https://doi.org/10.1007/PL00008131>
  13. Егоров Н.С. Практикум микробиологии. Издательство Московского Университета 1976 год.
  14. Определитель бактерий Берджи. Издательство Мир, год 1997.
  15. Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  16. Кейтс М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. С.– 322
  17. Кряжевских Н. А., Лойко Н. Г., Демкина Е. В., Мулюкин А. Л., Лебедев А. Т., Гапонов А. М., Тутельян А. В, Николаев Ю. А., Эль\_Региста Г. И. Оценка применимости масс-спектрометрического метода МАЛДИ для диагностики внутрипопуляционных диссоциантов бактерий. *Микробиология*, 2015, том 84, № 3, с. 291–310. doi: 10.7868/S002636561503012X
  18. Ghosh, A., Paul, D., Prakash, D., Mayilraj, S., & Jain, R. K. (2006). *Rhodococcus imtechensis sp. nov.*, a nitrophenol-degrading actinomycete. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 8), 1965–1969.
  19. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V. *Microbial Resources: From Functional Existence in Nature to Industrial Applications*. / Ed. I. Kurtböke. Amsterdam: Elsevier, 2017. P. 121–148.
  20. Гольщева А. А., Литвиненко Л. В., Ившина И. Б. Использование адаптационного потенциала устойчивости актинобактерий рода *Rhodococcus* к хлориду ртути в зависимости от условий культивирования Тезисы докладов Второй Всероссийской научной конференции с международным участием Иркутск, Байкал, 28 февраля – 6 марта 2022 г.