

Univerzitet u Beogradu

HEMIJSKI FAKULTET



Milena G. RIKALOVIĆ

**ISPITIVANJE RAMNOLIPIDA DOBIJENIH
POMOĆU SOJEVA *Pseudomonas aeruginosa*
IZOLOVANIH IZ SREDINA ZAGAĐENIH NAFTOM I
NAFTNIM DERIVATIMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ



Милена Г. Рикаловић

**Испитивање рамнолипида добијених
помоћу сојева *Pseudomonas aeruginosa*
изолованих из средина загађених нафтом и
нафтним дериватима**

Докторска дисертација

Београд, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY



Milena G. Rikalović

**STUDY OF RHAMNOLIPID BIOSURFACTANT
FROM STRAINS OF *Pseudomonas aeruginosa*
ORIGINATED FROM ENVIRONMENTS
CONTAMINATED WITH PETROLEUM AND
PETROLEUM DERIVATIVES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor:

Dr Miroslav M. Vrvić, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Ljuba MANDIĆ, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Ivanka KARADŽIĆ, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane

Datum promocije

**ISPITIVANJE RAMNOLIPIDA DOBIJENIH POMOĆU SOJEVA
Pseudomonas aeruginosa IZOLOVANIH IZ SREDINA
ZAGAĐENIH NAFTOM I NAFTNIM DERIVATIMA**

I Z V O D

Cilj ove studije je bio da se ispita proizvodnja ramnolipida dobijenih pomoću pet sojeva *Pseudomonas aeruginosa*, izolovanih iz sredina bogatih ugljovodonicima (zemljišta zagađenog naftom i naftnim derivatima i industrijskog otpada - mineralnog ulja za sečenje metala). Prvi deo istraživanja je bila optimizacija proizvodnje ramnolipida pomoću soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380, producenta nekoliko mikrobioloških metabolita koji imaju potencijal za industrijsku primenu. Podloge sa različitim sastavom (izvor ugljenika i azota) su testirane kako bi se poboljšala produkciju ramnolipida. Phosphate-limited proteose peptone-ammonium salt (PPAS) podloga sa suncokretovim uljem, kao izvorom ugljenika, i amonijum hloridom i peptonom, kao izvorom azota, značajno je povećala proizvodnju ramnolipida od 0,15 na osnovnoj PPAS (C/N odnos 4,0), na 3,00 g/l, na optimizovanoj PPAS podlozi (C/N odnos 7,7). U nastavku je primenjena statistička analiza Response Surface Methodology za testiranje efekata tri faktora: temperature, koncentracije izvora ugljenika i azota (v/v) u optimizovanoj PPAS podlozi, na proizvodnju ramnolipida. Utvrđeno je da ekološki izolati *P. aeruginosa* imaju značajan potencijal za poboljšavanje produkcije ramnolipida na različitim tipovima supstrata, uključujući ekonomične, obnovljive izvore kao što su suncokretovo ulje iz friteze i otpadne frakcije tokom rafinisanja suncokretovog ulja. MS analize su pokazale da su izolovani ramnolipidni biosurfaktanti smeše mono-ramno-mono-lipidnih, mono-ramno-di-lipidnih- i di-ramno-di-lipidnih jedinjenja. "High througout skrining" ramnolipidnih smeša dobijenih pomoću različitih sojeva *P. aeruginosa* (NCAIM (P) B 001380, D1, D2, D3, 67) i referentnog kliničkog soja ATCC 27853 na optimizovanoj podlozi urađen je pomoću MALDI-TOF analize. Razlike između ramnolipidnih profila koje su specifične za soj su ukazale na mogućnost da se definiše ramnolipid "fingerprint" analiziranih izolata *P. aeruginosa*. Detaljna komparativna analiza ramnolipida je urađena kako bi se video efekat uslova kultivacije na soj-specifični "fingerprint" ramnolipida. Ramnolipidi su praćeni pomoću HPLC-ESI MS, što je omogućilo brzu i pouzdanu identifikacije i kvantifikaciju prisutnih struktura. Najveća koncentracija ukupnih ramnolipida od 3,33 g/l dobijena je

za soj *P. aeruginosa* 67, koji je izolovan iz zemljišta zagađenog naftom i sojeve D1 (1,73 g/l) i D2 (1,70 g/l), iz prirodnog mikrobnog konzorcijumima poreklom iz zemljišta zagađenog mazutom, gajenih na suncokretovom ulju, kao izvoru ugljenika. Odnos ukupnih di-/mono-ramnolipida su bili u rasponu od 0,90 do 5,39 za različite izvore ugljenika i od 1,12 do 4,17 za različite produkcijske sojeve. Za sve profile ramnolipidnih smeša tipični su bili: lanci hidroksi-masnih kiselina dužina C₈-C₁₂, najzastupljenije strukture su bile Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ i nizak sadržaj hidroksi-alkanoiloksi karboksilnih kiselina. Takođe, koncentracije glavnih ramnolipidnih struktura su se neznatno razlikovale u zavisnosti od soja i uslova rasta, dok su razlike u sporednim strukturama bile izraženije. Statistički značajno povećanje vrednosti CMC je primećeno sa snižavanjem odnosa ukupnih mono-/di-ramnolipida, što je pokazalo da mono-ramnolipidi počinju da formiraju micidele pri nižoj koncentraciji od di-ramnolipida. Izolovane ramnolipidne smeše su pokazale antimikrobnu aktivnost na Gram-pozitivne bakterije, dok su Gram-negativni bakterijski sojevi i gljive imale ili nisku osetljivost ili su bili neosetljivi. Dodatno, u ovoj studiji je ispitivana tolerancija *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 00138 na teške metale (Cd, Cu i Hg), praćeno usvajanje kadmijuma i efekat kadmijuma na proteinsku ekspresiju.

Ključne reči: Pseudomonas aeruginosa, ekološki izolati, ramnolipidi, obnovljivi izvori ugljenika, komparativna analiza, površinska aktivnost, masena spektrometrija, biosorpcija teških metala

Naučna oblast BIOHEMIJA; Uža naučna oblast MIKROBILOŠKA HEMIJA i BIOTEHNOLOGIJA; UDK broj 577

**STUDY OF RHAMNOLIPID BIOSURFACTANT FROM STRAINS
OF *Pseudomonas aeruginosa* ORIGINATED FROM
ENVIRONMENTS CONTAMINATED WITH PETROLEUM AND
PETROLEUM DERIVATIVES**

ABSTRACT

The aim of present study was to investigate the production of rhamnolipid biosurfactant produced by five strains of *Pseudomonas aeruginosa* originated from hydrocarbon rich environments (soil polluted with petroleum and petroleum derivatives and industrial waste - mineral metal cutting oil). The first part of the study was optimization of production of rhamnolipids by strain *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380, a producer of several microbial metabolites with potential industrial application. With regard to carbon and nitrogen source several media were tested to enhance production of rhamnolipids. Phosphate-limited proteose peptone-ammonium salt (PPAS) medium supplemented with sunflower oil as a source of carbon and mineral ammonium chloride and peptone as a nitrogen source greatly improved rhamnolipid production, from 0.15 on basic PPAS (C/N ratio 4.0), to 3.00 g/l, on optimized PPAS medium (C/N ratio 7.7). Further, the effect of three factors: temperature, concentration of carbon and nitrogen source in optimized PPAS medium on rhamnolipid production was analyzed by Response Surface Methodology. It was found that the environmental isolates of *P. aeruginosa* had a significant potential for improved production of rhamnolipids on different types of substrates, including cheap, renewable sources like sunflower oil from deep fryer and sunflower oil mill effluent. MS analysis indicated that rhamnolipid preparations were mixtures of mono-rhamno-mono-lipidic, mono-rhamno-di-lipidic- and di-rhamno-di-lipidic congeners. High throughput screening of rhamnolipid mixtures produced by different environmental *P. aeruginosa* strains (NCAIM (P) B 001380, D1, D2, D3, 67) and referent clinical strain ATCC 27853 on optimized medium was performed by MALDI-TOF analysis. Observed differences between rhamnolipid profiles indicated a possibility to define rhamnolipid fingerprint of analyzed *P. aeruginosa* strains. Detailed comparative analysis of rhamnolipids from environmental isolates of *P. aeruginosa* was undertaken to evaluate strain specific rhamnolipid fingerprints obtained on different growth

conditions. Rhamnolipids were monitored by HPLC-ESI mass spectrometry, which allowed fast and reliable identification and quantification of present congeners. The highest concentration of total rhamnolipids of 3.33 g/l was obtained by the strain *P. aeruginosa* 67, recovered from petroleum contaminated soil, and strains D1 (1.73 g/l) and D2 (1.70 g/l), recovered from natural microbial consortia originated from mazut contaminated soil, grown on sunflower oil as a carbon source. Di- to mono-rhamnolipids ratios were in range of 0.90 to 5.39 for different media composition and from 1.12 to 4.17 for different producing strains. Rhamnolipid profiles of purified mixtures of all tested strains are similar with chain length from C₈-C₁₂, pronounced abundance of Rha-C₁₀-C₁₀ and Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ congeners, and a low content of hydroxyalkanoyloxy-alkanoic acid. Concentrations of major congeners of rhamnolipids were found to slightly vary, depending on strain and growth conditions, while variations in minor congeners were more pronounced. Statistically significant increase of CMC values was observed with lowering the ratio of total mono- to di-rhamnolipids ratio indicating that mono-rhamnolipids start to form micelles at lower concentration than di-rhamnolipids. Rhamnolipid mixtures showed antimicrobial activity on Gram-positive strains, while Gram-negative bacterial strains and fungi had low sensitivity or were insensitive. Additionally, the tolerance of *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 00138 to heavy metals (Cd, Cu and Hg) was determined, uptake of cadmium was monitored and Cd effect on protein profile expression was analyzed.

Key words: Pseudomonas aeruginosa, environmental strain, rhamnolipids, renewable carbon source, comparative analysis, surface activity, mass spectrometry, biosorption of heavy metals

Science topic BIOCHEMISTRY; Topic field MICROBIAL CHEMISTRY and BIOTECHNOLOGY; UDC number 577

Mojim bakama i dedama,

Milosavi i Maksimu,

Dari i Ljubiši.

Ova doktorska disertacija je urađena u laboratoriji Katedre za hemiju u medicini, Medicinskog fakulteta i Grupe za mikrobiološku hemiju, Katedre za biohemiju, Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Dr Miroslavu M. Vrvicu, redovnom profesoru, koji je bio moj mentor želim da se zahvalim na podršci i sugestijama koje su mi uvek bile korisne. Ovom doktorskim studijom su neposredno rukovodile dr Ivanka Karadžić, redovni profesor i dr Gordana Gojgić-Cvijović, viši naučni saradnik. Profesorki Ivanki Karadžić želim da se zahvalim na idejama i savetima koji su mi pomogli da razumem suštinu naučnog rada i savladam probleme na koje sam nailazila. Dr Gordani Gojgić-Cvijović veliko hvala na podršci i sugestijama u pisanju radova i doktorske disertacije i pomoći tokom eksperimenata, koje su mi omogućile da poboljšam svoj rad.

Prof. dr Ljubi Mandić želim da se zahvalim na korisnim savetima tokom pisanja teze.

Svim kolegama iz laboratorija 418 i 435 na Hemijskom fakultetu i laboratorije 32 na Medicinskom fakultetu, u Beogradu, hvala na korisnim savetima i pomoći koju su mi pružili tokom eksperimentalnog rada.

Hvala kolegi mr Srđanu Miletiću na pomoći oko tehničke obrade teksta i tabela.

Hvala mojim drugaricama i budućim dr Mariji Vidović i Jovani Stefanović-Kojić na podršci tokom naših doktorskih studija.

*Hvala dr N. Fujiwara sa Instituta za Tehnološka Istraživanja (TRI), Osaka, Japan, na donaciji soja *P. aeruginosa* san ai.*

Veliko hvala profesoru dr Eriku Dénzilu i doktorantu Ahmad Mohammad Abdel-Mawgoudu sa INRS-Instituta Armand-Frappier, Laval, Kvabek Kanada, na HPLC-MS analizama.

Za MALDI-TOF analize zahvalnost dugujem dr Marijani Petković i doktorantkinji Tini Kamčevoj sa Instituta Vinča u Beogradu.

Za MS-ESI analize zahvalnost dugujem mr Milki Jadranin sa Centra za hemiju, instituta IHTM, u Beogradu.

Hvala dr Dejanu Bezbradici sa Tehnološkog fakulteta u Beogradu na pomoći oko RSM dizajna.

Hvala dipl. fiziko hemičaru Branislavu Potkonjaku sa Tehnološkog fakulteta u Beogradu za AAS analize.

Mojim roditeljima i sestri hvala na ljubavi i ogromnoj podršci koja mi je omogućila da se bavim naukom.

Miodragu hvala što me voli i razume i kao čoveka i kao naučnika.

Mojim dragim ljudima hvala što veruju u mene.

Beograd, 2013.

Autor

AKRONIMI I SKRAĆENICE

AAS - Atomska apsorpciona spektroskopija
ACP - Acil-noseći protein
AHL - Acilhomoserin lakton
AI - Autoinducer
APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API - Autoindukujući peptid
ATR - Attenuated Total Reflectance
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
BSA - Bovine serum albumin
CBB - Coomassie Brilliant Blue
Ce - enzimski aktivnost
Cexp - Koncentracija egzopolisaharida
CID - Collision-Induced Dissociation
CMC - Critical Micelle Concentration
CoA - Koenzim A
Cp - Koncentracija proteina
CTAB - Tetraethylammonium-bromide
Crl - Koncentracija ramnolipida
CDF - Cation Diffusion Facilitator
DHB - Dihidroksibenzoeva kiselina
DTPA - Diethylenetriamine-penta-acetic acid
FID - Flame Ionization Detection
FT - Fourier Transformation
EDTA - Ethylene-diamine-tetraacetic acid
ELS - Evaporative Light Scattering
ER - Endoplazmatični retikulum
ESI - Electrospray Ionisation
GC - Gasna hromatografija
GTCR - Receptor kuplovan sa G proteinom
HAA - β -D-(β -D-hidroksi-alkanoiloksi)-karboksilna kiselina ili β -D-(β -D-hydroxyalkanoyloxy)-alkanoic acid
HHQ-D4 - 4-hydroxy-2-heptylquinoline
HPLC - Tečna hromatografija visokih performansi
IR - Infracrvena spektroskopija
LB - Lurie-Bertani
LPS - lipopolisaharidi
MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
MIK - Minimalna inhibitorna koncentracija
MRM - Multiple Reaction Monitoring

MS – Masena spektrometrija
MS-MS - Tandem masena spektrometrija
MSM - Mineralni slani medijum, mineral salt medium
MSR - Molar sulubilisation ratio
MT – Metalotienoini
NAPL – Non-Aqueous Phase Liquids
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
*p*NPP - *p*-nitrofenil-palmitata
NTA - Nitrilotriacetic acid
OD - Optical Density
OOME - Olive Oil Mill Effluent
PAH – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PAI - *Pseudomonas* autoinducer
PHA - Poli-β-hidroksialkanoat
PHB - Poli-hidroksibutirat
PQS - *Pseudomonas* hinolni signal
PPGAS – Phosphate-limited proteose peptone-glucose-ammonium salt
PPAS - Phosphate-limited proteose peptone-ammonium salt
QS - *Quorum sensing*
QQ - *Quorum quenching*
RL - Ramnolipid, ramnolipidi
RL1 - Mono-ramno-di-lipidna struktura
RL2 - Mono-ramno-mono-lipidna struktura
RL3 - Di-ramno-di-lipidna struktura
RL4 - Di-ramno-di-lipidna struktura
RSM - Response Surface Methodology
Rt - Retenciono vreme
SDS – Natrijum dodecil sulfat
SAM - S-adenozin metionin
SOME - Sunflower Oil Mill Effluent
TEMED - Tetrametiletildiamid
TF - Transkripcioni faktor
TFA – Trifluor sirćetna kiselina
TLC - Tankoslojna hromatografija
TMS – Trimetilsili derivat

SADRŽAJ

	<i>Strana</i>
Uvod	1
1. Pregled literature	5
1.1. Mikrobni surfaktanti – ramnolipidi	6
1.1.1. Mikrobni surfaktanti	6
1.1.2. Ramnolipidi	8
1.1.2.1. Struktura ramnolipida	8
1.1.2.2. Diverzitet hemijskih struktura ramnolipida	9
1.1.2.3. Producenti ramnolipida	11
1.2. Rod <i>Pseudomonas</i>	13
1.2.1. Karakteristike	13
1.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.2.2.1. Karakteristike	16
1.2.2.2. Ekološki izolati <i>P. aeruginosa</i>	16
1.2.2.3. Ekstracelularni proizvodi <i>P. aeruginosa</i>	18
1.3. Biosinteza ramnolipida i genetička osnova diverziteta ramnolipidnih smeša	21

1.3.1. Biosinteza ramnolipida	21
1.3.2. Genetička osnova diverziteta ramnolipidnih smeša	26
1.4. Mehanizmi međucelijske komunikacije, regulacija biosinteze i fiziološka uloga ramnolipida	28
1.4.1. Quorum sensing, QS	28
1.4.2. Regulacija biosinteze ramnolipida QS sistemima kod <i>P. aeruginosa</i>	29
1.4.3. Quorum quenching (QQ)	33
1.4.4. Fiziološka uloga ramnolipida	35
1.4.4.1. Olakšavanje usvajanja i biodegradacija teško rastvornih supstrata	36
1.4.4.2. Ramnolipidi kao imunomodulatori i faktori virulencije	36
1.4.4.3. Antimikrobna aktivnost ramnolipida	37
1.4.4.4. Ramnolipidi u površinskoj pokretljivosti i formiranju biofilma	38
1.5. Industrijska proizvodnja ramnolipida	40
1.5.1. Nutritivni faktori koji utiču na produkciju ramnolipida - izvori ugljenika i azota	41
1.5.2. Produkcija ramolipida iz obnovljivih izvora - ekonomske alternative koje obećavaju	42
1.5.3. Primeri produkcije ramnolipida pomoću sojeva <i>P. aeruginosa</i>	43
1.6. Metode za karakterizaciju ramnolipidnih smeša	45
1.6.1. Hidrofilno-lipofilni balans	45
1.6.2. Analitičke metode	46
1.6.2.1. Kolorimetrijske metode	46
1.6.2.2. Hemolitički test	46

1.6.2.3. Test kolapsa kapi i površinska aktivnost	47
1.6.2.4. Spektrofotometrija - Orcinolni test	47
1.6.2.5. Analitička i preparativana tankoslojna hromatografija (TLC)	48
1.6.2.6. Gasna hromatografija (GC)	49
1.6.2.7. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) kuplovana sa masenom spektrometrijom	49
1.6.2.8. MALDI-TOF	51
1.6.2.9. Infracrvena spektroskopija (IR)	51
1.7. Bioremedijacija - primena ramnolipida dobijenih pomoću <i>P. aeruginosa</i> značajna za ekosisteme	52
1.7.1. Primena ramnolipida u bioremedijaciji	53
1.7.1.1. Biodegradacija organskih jedinjenja	53
1.7.1.2. Biodregradacija organskih jedinjenja u sredinama ko-kontaminiranim metalima i organskim jedinjenjima	56
1.7.1.3. Ramnolipidi kao agensi za ispiranje	57
1.7.1.3.1. Ramnolipidi kao agensi za ispiranje organskih jedinjenja	57
1.7.1.3.2. Ramnolipidi kao agensi za ispiranje metala	58
1.7.1.4. Biološka kontrola	61
1.8. Principi biosorpcija teških metala - kadmijum i njegov efekat na biosintezu ramnolipida	61
1.8.1. Principi usvajanja teških metala pomiću mirkoorganizama	62
1.8.2. Kadmijum	64
1.8.2.1. Kadmijum – toksični efekti	64
1.8.2.2. Efekat kadmijuma na produkciju i biosintezu ramnolipida	66
1.8.3. Komparativni proteomiks kao način za praćenje bioremedijacije	68

2. Materijal i metode	70
2.1. Mikroorganizmi	71
2.1.1. Sojevi <i>P. aeruginosa</i>	71
2.1.2. Taksonomska karakterizacija sojeva <i>P. aeruginosa</i>	71
2.1.3. Filogenetska analiza	71
2.2. Uslovi kultivacije/gajenja mikroorganizama i selekcija podloge	72
2.2.1. Sterilizacija podloga i opreme za rad sa mikroorganizmima	72
2.2.2. Uslovi kultivacije	72
2.2.3. Selekcija osnovne podloge	72
2.2.4. Selekcija optimalnih izvora ugljenika i azota	73
2.2.5. Određivanje sadržaja ugljenika i azota u podlozi	74
2.3. Optimizacija produkcije ramnolipida korišćenjem RSM (Response surface methodology) modela	74
2.4. Određivanje parametara dinamike fermentacije	74
2.4.1. Određivanje pH	74
2.4.2. Praćenje rasta mikrobne populacije	74
2.4.3. Frakcionisanje biomase i fermentacione tečnosti	75
2.4.4. Određivanje koncentracije proteina	75
2.4.5. Određivanje enzimske aktivnosti lipaze	75
2.4.6. Određivanje koncentracije egzopolisaharida	76

<i>2.4.7. Određivanje koncentracije ramnolipida</i>	76
<i>2.5. Izolovanje i karakterizacija ramnolipidniog biosurfaktanta</i>	77
<i>2.5.1. Izolovanje ramnolipida</i>	77
<i>2.5.2. Prečišćavanje ramnolipida</i>	77
<i>2.5.3. Hromatografija na tankom sloju (TLC)</i>	77
<i>2.5.4. Određivanje površinske aktivnosti i kritične micelarne koncentracije</i>	78
<i>2.5.5. Statističko određivanje korelacija između CMC vrednosti i odnosa ukupnih i pojedinih struktura mono- i di-ramnolipida</i>	78
<i>2.5.6. Antimikrobna aktivnost ramnolipida</i>	78
<i>2.6. Strukturna analiza i kvantitativno određivanje ramnolipida</i>	79
<i>2.6.1. Infracrvena spektroskopija - FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) analiza</i>	79
<i>2.6.2. Masena spektrometrija</i>	79
<i>2.6.2.1. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry)</i>	79
<i>2.6.2.2. HPLC-MS-MS (High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry)</i>	80
<i>2.7. Tolerancija na teške metale</i>	81
<i>2.7.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za živu, bakar i kadmijum</i>	82
<i>2.7.2. Određivanje sadržaja metala u biomasi i fermentacionoj tečnosti</i>	82

2.7.2.1. Mineralizacija	82
2.7.2.2. Praćenje dinamike usvajanja kadmijuma	83
2.7.3. <i>Praćenje proteinskih profila</i>	83
3. Rezultati i diskusija	86
3.1. Taksonomska karakterizacija ekoloških izolata <i>P. aeruginosa</i>	87
3.1.1. <i>Biohemijska karakterizacija</i>	87
3.1.2. <i>Molekularna karakterizacija</i>	90
3.1.3. <i>Produkcija površinski aktivnih supstanci pomoću ekoloških izolata <i>P. aeruginosa</i></i>	92
3.2. Selekcija tipa podloge i optimizacija produkcije ramnolipida pomoću soja <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380	93
3.2.1. <i>Selekcija osnovne podloge</i>	93
3.2.2. <i>Određivanje optimalnih izvora ugljenika i azota</i>	94
3.2.2.1. Uticaj izvora ugljenika na produkciju ramnolipida	94
3.2.2.2. Uticaj izvora azota na produkciju ramnolipida	95
3.2.3. <i>Dinamika fermentacije na optimalnoj podlozi</i>	96
3.2.3.1. Dinamika fermentacija <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380 na optimalnoj podlozi	96
3.2.3.2. Poređenje dinamika fermentacije <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380 na optimizovanoj PPAS i LB podlozi	98
3.2.4. <i>RSM optimizacija</i>	100
3.2.5. <i>Poređenje parametara dinamike fermentacije sojeva <i>P. aeruginosa</i> na optimizovanoj PPAS podlozi</i>	102

3.3. Strukturna karakterizacija i prečišćavanje ramnolipida iz <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380	104
3.3.1. Karakterizacija ramnolipida IR analizom	104
3.3.2. Karakterizacija mono- i di-ramnolipida tandem masenom spektrometrijom	105
3.4. Produkcionni profili ramnolipida ekoloških izolata dobijeni pomoću MALDI-TOF analize	106
3.4.1. MALDI-TOF poređenje profila ukupnog ekstrakta i frakcije prečišćenih ramnolipida dobijenih pomoću <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380	107
3.4.2. Produkcija ramnolipida pomoću ekoloških izolata i komercijalnog soja <i>P. aeruginosa</i>	110
3.5. Kvantitativna LC-ESI-MS analiza ramnolipida iz ekoloških izolata <i>P. aeruginosa</i>	114
3.5.1. Produkcionni profil ramnolipida iz <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380 koji je gajen na PPAS podlozi sa različitim izvorima ugljenika	114
3.5.2. Poređenje eksperimentalnih rezultata u ovoj studiji sa publikovanim studijama o produkciji ramnolipida na različitim izvorima ugljenika	119
3.5.3. Produkcionni profil RL iz različitih ekoloških izolata <i>P. aeruginosa</i> gajenih na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika	122
3.5.4. Poređenje eksperimentalnih rezultata i studija o ramnolipidima dobijenih pomoću ekoloških izolata <i>P. aeruginosa</i> izolovanih iz sredina bogatih ugljovodonicima	126
3.5.4.1. Sastav ramnolipidnih smeša	127
3.5.4.2. Glavne ramnolipidne strukture i odnos di- i mono-ramnolipidnih struktura	129
3.5.4.3. Ramnolipidni profil i vreme kultivacije	130

3.6. Karakterizacija ramnolipida iz različitih sojeva <i>P. aeruginosa</i> sa specifičnim poreklom	131
3.6.1. Hidrofobno-lipofilni balans (HLB)	131
3.6.2. Krična micelarna koncentracija (CMC)	132
3.6.3. Antimikrobna aktivnost	137
3.7. Ispitivanje potencijala soja <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380 za primenu u procesima bioremedijacije teških metala	138
3.7.1. Ispitivanje otpornosti na različite teške metale	138
3.7.2. Usvajanje kadmijuma	139
3.7.2.1. Dinamika usvajanja kadmijuma	139
3.7.2.2. Elektroforetski profil intra- i ekstracelularnih proteina	141
Zaključci	143
Literatura	150
Prilog	172
Biografija	xix

UVOD

Izolovanje i karakterizacija mikroorganizama iz specifičnih okruženja (industrijskog otpada, zemljišta zagađenog naftom i naftnim derivatima), njihovih metabolita i primena u bioremedijaciji, predmet su istraživanja Grupe za mikrobiološku hemiju, koju čine istraživači sa Hemijskog fakulteta, Centra za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju i Instituta za hemiju u medicini, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Surfaktanti koji se danas koriste, uglavnom su dobijeni hemijskom sintezom i zbog svoje toksičnosti i nemogućnosti za razgradnju nisu ekološki pogodni za primenu. Usled toga se nameće potreba za pronalaženjem alternativnih, ekološki kompatibilnih jedinjenja, biološkog porekla koja su označena kao biosurfaktanti. Zbog svojih posebnih karakteristika kao što su biorazgradivost, niska toksičnost i ekološka proizvodnja, koje ih čine kompatibilnim za industrijsku, kao i primenu u procesima bioremedijacije, biosurfaktanti su sve više predmet interesovanja šire naučne zajednice. Glavni problem u proizvodnji biosurfaktanata su troškovi, ali se taj nedostatak prevazilazi primenom obnovljivih supstrata (melasa, surutka, frakcije iz rafinerija jestivih ulja, otpad destilerija, agroindustrijski otpad...) u procesu fermentacije, čime ne samo da se omogućava ekonomična proizvodnja, već se rešava i problem industrijskog otpada.

Ramnlipidi su, nesumnjivo, najintenzivnije proučavani surfaktanti mikrobnog porekla. Veliki broj studija o ramnlipidima koje obuhvataju produkciju, izolovanje i fizičko-hemijsku karakterizaciju ukazao je na mogućnost primene ovih jedinjenja kao agenasa za bioremedijaciju organskih jedinjenja i teških metala.

Osnovni producenti ramnlipida, sojevi vrste *Pseudomonas aeruginosa*, prirodno su prisutni u zagađenim sredinama, pa su s tim u vezi, sastavni deo mnogih strategija za bioremedijaciju sredina kontaminiranih ugljovodonicima i/ili teškim metalima. Metaboličke karakteristike i sposobnost adaptacije sojeva *P. aeruginosa* da rastu i proizvode ramnlipide ne samo na ekonomičnim

izvorima, već i prilikom kultivacije na raznim organskim jedinjenjima koja su zagađivači (nerazgradivi ugljovodonici), favorizuje ih u odnosu na ostale producente ramnolipida i biosurfaktanata uopšte.

Uporedo sa istraživanjima o povećanju produkcije ramnolipida i potragom za sojevima koji su efikasni proizvođači ramnolipda, došlo je i do intenzivnog razvoja analitičkih "large scale" metoda za karakterizaciju ramnolipidnih smeša, baziranih pre svega, na masenoj spektrometriji, kao i efikasnih metoda za molekularnu i biohemijsku karakterizaciju i selekciju sojeva producenata.

Ova studija je usmerena na ispitivanje ramnolipida dobijenih pomoću različitih sojeva *P. aeruginosa* izolovanih iz specifičnih okruženja. Neposredni ciljevi ovog rada su:

1. Molekularna i biohemijska karakterizacija sojeva *P. aeruginosa* izolovanih iz sredina zagađenih naftom i naftnim derivatima (sojevi D1, D2, D3, 67) i industrijskog otpada - mineralnog ulja za sečenje metala (soj NCAIM (P) B 001380);
2. Izbor podloge za produkciju ramnolipida testiranjem različitih izvora ugljenika i azota u laboratorijskim uslovima i primenom Response Surface Method dizajna;
3. Izolovanje, prečišćavanje i strukturna karakterizacija ramnolipida primenom spektroskopskih metoda;
4. "High throughput screening" ramnolipidnih smeša pomoću MALDI-TOF MS;

5. Komparativna analiza ramnolipidnih profila soja *P. aeruginosa* NCAM (P) B 001380 dobijenih na različitim izvorima ugljenika pomoću HPLC-MS-MS;
6. Komparativna analiza ramnolipidnih profila sojeva *P. aeruginosa* NCAM (P) B 001380 D1, D2, D3 i 67 gajenih u identičnim uslovima pomoću HPLC-MS-MS;
7. Karakterizacija izolovanih ramnolipida (površinska aktivnost, CMC, antimikrobna aktivnost);
8. Ispitivanje otpornosti soja *P. aeruginosa* NCAM (P) B 001380 na kadmijum, živu i bakar.

1. PREGLED LITERATURE

1.1. Mikrobni surfaktanti –ramnolipidi

1.2. Rod Pseudomonas

1.3. Biosinteza ramnolipida i genetička osnova diverziteta ramnolipidnih smeša

1.4. Mehanizmi međucelijske komunikacije, regulacija biosinteze i fiziološka uloga ramnolipida

1.5. Industrijska proizvodnja ramnolipida

1.6. Metode za karakterizaciju ramnolipidnih smeša

1.7. Bioremedijacija – primena ramnolipida dobijenih pomoću sojeva P. aeruginosa važna za ekosisteme

1.8. Principi usvajanja teških metala - kadmijum i njegov efekat na biosintezu ramnolipida

1.1. Mikrobni surfaktanti - ramnolipidi

1.1.1. Mikrobni surfaktanti

Surfaktanti su amfipatična jedinjenja, koja zbog toga što sadrže i hidrofilne i hidrofobne delove, imaju sposobnost da se akumuliraju između faza kao što su ulje/voda ili vazduh/voda i na taj način redukuju površinski napon, formiraju emulziju, povećavaju rastvorljivost, pokretljivost i dostupnost hidrofobnih ili nerastvornih organskih jedinjenja i time olakšavaju njihovu degradaciju. Surfaktanti mogu biti sintetskog ili prirodnog - mikrobnog porekla. Biosurfaktanti su definisani kao grupa strukturno različitih molekula koje proizvode mikroorganizmi (Nitschke and Costa 2007; Van Hamme *et al* 2006).

Prvobitne podele mikrobni surfaktanata su bile zasnovane na hemijskoj strukturi ili poreklu. Kao treća, predložena je podela prema molekularnoj masi: na molekule male molekulske mase (glikolipidi, lipoproteini i fosfolipidi) i strukture velike molekulske mase (polimeri, vezikule i cele ćelije), (Rosenberg and Ron 1999). U tabeli 1.1. su dati primeri biosurfaktanata i njihovi producenti.

Najveći broj biosurfaktana su anjoni ili neutralni molekuli, pri čemu je hidrofobna komponenta dugolančana masna kiselina ili njen derivat, a hidrofilna komponenta šećer, aminokiselina ili ciklični peptid. Biosurfaktante proizvode uglavnom bakterije (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter* sp...), a mali broj sintetišu neke vrste kvasaca (*Candida utilis*, *C. antartica*, *C. bombicola*...), (Pacwa-Płociniczak *et al* 2011; Van Hamme *et al* 2006).

Tabela 1.1. Klasifikacija biosurfaktanata (Pacwa-Płociniczak *et al* 2011)

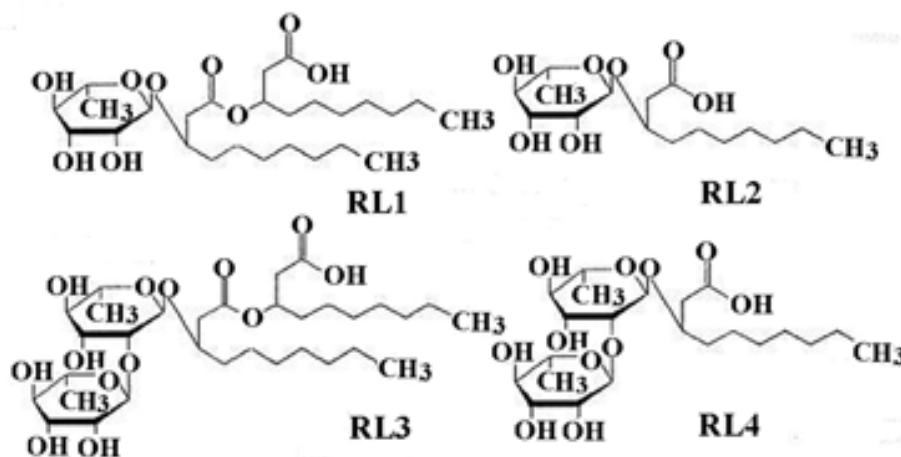
Biosurfaktant		Mikoorganizam
Grupa	Klasa	
Glikolipidi	Ramnolipidi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
	Trehalolipidi	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.
	Soforolipidi	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Torulopsis apicola</i>
Masne kiseline, fosfolipidi i neutralni lipidi	Korinomikolna kiselina	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Spikulisporna kiselina	<i>Penicillium spiculisporum</i>
	Fosfatidil- etanolamin	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopeptidi	Surfaktin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Lichenysin Bacillus</i>
	Lihenizin	
Biosurfaktanti polimeri	Emulzan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
	Alazan	<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA-53
	Biodisperzan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2
	Lipozan Manoprotein	<i>Candida lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Za razliku od sintetskih surfaktanata, surfaktanti nastali mikrobnom biosintezom su lako razgradivi i posebno pogodni za upotrebu u bioremedijaciji. Postoji malo dostupnih podataka o toksičnosti biosurfaktanata. Oni se uglavnom smatraju nisko toksičnim ili netoksičnim proizvodima zbog čega su pogodni za upotrebu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Površinska aktivnost biosurfaktanata je stabilna u širem opsegu uslova sredine kao što su temperatura, pH, pritisak i koncentracija soli, a kako efikasni industrijski procesi često zahtevaju primenu ekstremnih uslova, pogodni su za komercijalnu upotrebu (Muthusamy *et al* 2008).

1.1.2. Ramnolipidi

1.1.2.1. Struktura ramnolipida

Ramnolipidi (RL) su glikolipidi koji pripadaju klasi biosurfaktanata male molekulske mase (Van Hamme *et al* 2006). RL su glikozidi sastavljeni od ostataka ramnoze i lipidne komponente (slika 1.1.). Varijacije u lipidnoj komponenti doprinose biodiverzitetu ramnolipida (Abdel-Mawgoud *et al* 2010). Neki od autora su podelili RL u četiri različite homologe grupe: RL1 - mono-ramno-di-lipidne, RL2 - mono-ramno-mono-lipidne, RL3 - di-ramno-di-lipidne i RL4 - di-ramno-mono-lipidne strukture. RL1 i RL3 se nazivaju još i osnovni (česti), dok se RL2 i RL4, zbog toga što se smatra da se sintetišu zavisno od kultivacionih uslova, nazivaju atipičnim (retkim) ramnolipidima (Tahzibi *et al* 2004).



Slika 1.1. Struktura ramnolipida: RL1 (mono-ramno-di-lipidna), RL2 (mono-ramno-mono-lipidna), RL3 (di-ramno-di-lipidna), RL4 (di-ramno-mono-lipidna), (Tahzibi *et al* 2004).

1.1.2.2. Diverzitet hemijskih struktura ramnolipida

Otkriće ramnolipida povezuje se sa 1946. godinom kada su Bergström i saradnici (Bergström *et al* 1946a; Bergström *et al* 1946b) objavili prvi rad u kome opisiju masni glikolipid, dobijen pomoću tada *P. pyocyaneus* (danas *P. aeruginosa*) koji je gajen na glukozi, nazvan "piolipik" kiselina, u čijoj su strukturi prisutni L-ramnoza i β -hidroksidekanska kiselina (Hauser *et al* 1954; Jarvis and Johnson 1949). Jarvis i Johnson su dalje analizirali strukturu izolovanog RL iz *P. aeruginosa* i pokazali da se sastoji iz dve β -hidroksidekanske kiseline povezane preko glikozidne veze sa dve ramnoze (Jarvis and Johnson 1949). Dve masne kiseline su međusobno povezane estarskom vezom, dok je masna kiselina sa saharidnom jedinicom povezana β -glikozidnom vezom. Edwards i Hazashi su pomoću perjodatne oksidacije i metilacije utvrdili da je veza između dve ramnoze α -1,2-glikozidna (Edwards and Hayashi 1965). Na osnovu svih navedenih istraživanja oni su RL hemijski opisali kao 2-O- α -1,2-L-ramnopiranozil- α -L-ramnopiranozil- β -hidroksidekanoil- β -hidroksidekanoat (di-RL). Ovo je bilo prvo otkriće glikolipida koji je sadržao vezu između šećera i hidroksi masne kiseline (Shaw 1970). U periodu između 1970. i 2000. godine otkriven je i izolovan niz novih ramnolipidnih struktura dobijenih pomoću sojeva *P. aeruginosa* koji su gajeni na različitim izvorima (*n*-parafinu, glicerolu, *n*-alkanima, glukozi...). Izolovani RL su obuhvatali sve tipove homologa (RL1, RL2, RL3, RL4), a njihov broj je rastao sa napretkom analitičkih tehnika (Abdel-Mawgoud *et al* 2010). Takođe, neki istraživači su se bavili i sastavom ramnolipidne smeše, pa su tako Arino i saradnici 1996. godine objavili u radu sastav smeše ramnolipida dobijene pomoću *P. aeruginosa* "batch" fermentacijom: 67% di-ramno-di-lipida, 22% mono-ramno-di-lipida, 9 % di-ramno-mono-lipida i manje od 3% mono-ramno-mono-lipida (Arino *et al* 1996). Do kraja 2010. godine detektovano je i okarakterisano oko 60 različitih RL struktura (Abdel-Mawgoud *et al* 2010), (tabela 1.2.).

Tabela 1.2. Pregled identifikovanih ramnolipidnih jedinjenja i homologa sa njihovim simbolom, molekulskom formulom i molekulskom masom (Abdel-Mawgoud *et al* 2010)

Broj	Simbol	Molekulska formula	Molekulska masa
Mono-ramno-mono-lipidna struktura			
1	Rha-C _{8:2}	C ₁₄ H ₂₂ O ₇	302,32
2	Rha-C ₈	C ₁₄ H ₂₆ O ₇	306,35
3	Rha-C ₁₀	C ₁₆ H ₃₀ O ₇	334,41
4	Rha-C _{12:2}	C ₁₄ H ₃₀ O ₇	358,43
5	Rha-C ₁₂	C ₁₈ H ₃₄ O ₇	362,46
6	Rha-C _{14:2}	C ₂₀ H ₃₄ O ₇	386,48
Mono-ramno-di-lipidna struktura			
7	Rha-C ₈ -C ₈	C ₂₂ H ₄₀ O ₉	448,55
8	Rha-C ₈ -C _{10:1}	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	474,58
9	Rha-C _{10:1} -C ₈	C ₂₄ H ₄₂ O ₉	474,58
10	Rha-C ₈ -C ₁₀	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	476,60
11	Rha-C ₁₀ -C ₈	C ₂₄ H ₄₄ O ₉	476,60
12	Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	C ₂₆ H ₄₆ O ₉	520,64
13	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	504,65
14	Rha-C ₈ -C ₁₂	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	504,65
15	Rha-C ₁₂ -C ₈	C ₂₆ H ₄₈ O ₉	504,65
16	Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	530,69
17	Rha-C _{12:1} -C ₁₀	C ₂₈ H ₅₀ O ₉	530,69
18	Rha-C ₁₀ -C ₁₂	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	532,71
19	Rha-C ₁₂ -C ₁₀	C ₂₈ H ₅₂ O ₉	532,71
20	Rha-C ₁₀ -C _{14:1}	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	558,74
21	Rha-C ₁₂ -C _{12:1}	C ₃₀ H ₅₄ O ₉	558,74
22	Rha-C ₁₀ -C ₁₄	C ₃₀ H ₅₆ O ₉	560,76
23	Rha-C ₁₂ -C ₁₂	C ₃₀ H ₅₆ O ₉	560,76
24	Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₂ H ₆₀ O ₉	588,81
25	Rha-C ₁₄ -C ₁₄	C ₃₄ H ₆₄ O ₉	616,87
26	Rha-C ₁₄ -C ₁₆	C ₃₆ H ₆₈ O ₉	644,92
27	Rha-C ₁₆ -C ₁₆	C ₃₈ H ₇₂ O ₉	672,97
28	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	C ₂₇ H ₅₀ O ₉	518,68
29	decenoil-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₀	656,89
Di-ramno-mono-lipidna struktura			
30	Rha-Rha-C ₈	C ₂₀ H ₃₆ O ₁₁	452,49
31	Rha-Rha-C ₁₀	C ₂₂ H ₄₀ O ₁₁	480,55
32	Rha-Rha-C _{12:1}	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₁	506,68
33	Rha-Rha-C ₁₂	C ₂₄ H ₄₄ O ₁₁	508,60
34	Rha-Rha-C ₁₄	C ₂₆ H ₄₈ O ₁₁	536,65

Nastavak tabele na strani 11.

Di-ramno-di-lipidna struktura			
35	Rha-Rha-C ₈ -C ₈	C ₂₈ H ₅₀ O ₁₃	594,69
36	Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	622,74
37	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈	C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	622,74
38	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{10:1}	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₃	648,78
39	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	650,79
40	Rha-Rha-C ₈ -C _{12:1}	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₃	648,78
41	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₈	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₃	648,78
42	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	676,83
43	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀	C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	676,83
44	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	678,84
45	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀	C ₃₄ H ₆₂ O ₁₃	678,84
46	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{14:1}	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704,89
47	Rha-Rha-C ₁₂ -C _{12:1}	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704,89
48	Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₂	C ₃₆ H ₆₄ O ₁₃	704,89
49	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	C ₃₆ H ₆₆ O ₁₃	706,90
50	Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₄	C ₃₈ H ₇₀ O ₁₃	734,95
51	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₂	C ₃₈ H ₇₀ O ₁₃	734,95
52	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄	C ₄₀ H ₇₄ O ₁₃	763,00
53	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₆	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₃	791,06
54	Rha-Rha-C ₁₆ -C ₁₄	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₃	791,06
55	Rha-Rha-C ₁₆ -C ₁₆	C ₄₄ H ₈₂ O ₁₃	819,11
56	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄ -C ₁₄	C ₅₄ H ₁₀₀ O ₁₅	989,36
57	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃	C ₃₃ H ₆₀ O ₁₃	664,82
58	decenoil-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₄	803,03

1.1.2.3. Producenti ramnolipida

Pseudomonas spp. su dugo poznate kao glavni producenti ramnolipida, pri čemu se *P. aeruginosa* smatraju primarnim producentima. Ipak, mnogi izolati ostalih bakterijskih vrsta, različite udaljenosti u taksonomskoj klasifikaciji su uočeni kao producenti ramnolipida (Abdel-Mawgoud *et al* 2010). Pre svega, mnoge druge vrste *Pseudomonas* koje nisu *P. aeruginosa* prijavljene su kao RL producenti (Gunther *et al* 2005, 2006). Neke pripadaju istoj taksonomskoj klasi kao *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) i redu (*Pseudomonadales*), ali nisu deo *Pseudomonadaceae* porodice. Primer su dva izolata *Acinetobacter calcoaceticus* (red *Pseudomonadales*, porodica *Moraxellaceae*) koji su otkriveni kao producenti ramnolipida (Rooney *et al* 2009). Mnogi drugi primeri, ipak su dalje od roda *Pseudomonas* u taksonomskoj klasi, i pripadaju različitim redovima, ali i dalje

istoj klasi (*Gammaproteobacteria*); na primer *Pseudoxanthomonas* sp. (red *Xanthomonadales*, porodica: *Xanthomonadaceae*), (Nayak *et al* 2009) kao i *Enterobacter* sp. i *Pantoea* sp. (red *Enterobacteriales*; porodica *Enterobacteriaceae*), (Rooney *et al* 2009; Vasileva-Tonkova and Gesheva 2007). Osim pomenutih, u radovima su objavljene RL-produkujuće bakterije koje ne pripadaju klasi *Gammaproteobacteria*. Najdominantnije su razne *Burkholderia* spp. (klasa *Betaproteobacteria*), (Andrä *et al* 2006; Dubeau *et al* 2009; Pajarron *et al* 1993), *Myxococcus* sp. (klasa *Deltaproteobacteria*), (Ohlendorf *et al* 2008). Interesantno, neki bakterijski izolati, koji pripadaju drugom filumu nego *Pseudomonas*, su prijavljeni kao producenti RL: *Renibacterium salmoninarum* (Christova *et al* 2004), *Cellulomonas cellulans* (Arno *et al* 1998), *Nocardioides* sp. (svi pripadaju filumu *Actinobacteria*), (Vasileva-Tonkova and Gesheva 2005) ako i *Tetragenococcus koreensis* (filum *Firmicutes*), (Lee *et al* 2005).

Iako su objavljene kao RL producenti, mnoge bakterijske vrste koje nisu *P. aeruginosa* nisu konačno identifikovane (preko sekvenciranja 16S RNA gena), a njihova produkcija RL nije potvrđena korišćenjem visoko preciznih analitičkih metoda (kao što je HPLC-MS). Važno je pomenuti, u kontekstu pronalaženja nepatogenih producenata za komercijalne potrebe, da je među pomenutim mikroorganizmima patogenost retka, ali i da ako se radi o novootkrivenim sojevima informacije o patogenosti često nisu sigurne i zahtevaju dodatne analize. Novi izolati se nalaze i u okviru i van klase *Gammaproteobacteria*, što ukazuje na potrebu za širokim spektrom "skrining" programa za producente ramnolipida, koji bi obuhvatali različite redove *Gammaproteobacteria*, ali i ostalih klasa (Abdel-Mawgoud *et al* 2010). Neki autori još uvek smatraju da će većina novih RL produkujućih sojeva pripadati klasi *Gammaproteobacteria* (Rooney *et al* 2009). Pronalaženje novih producenata je značajno sa biotehnološkog aspekta i može dovesti do otkrića sojeva koji su nepatogeni u poređenju sa sojevima *P. aeruginosa* i samim tim su bolji kandidati za industrijski sigurnu produkciju ramnolipida (Abdel-Mawgoud *et al* 2010).

1.2. Rod *Pseudomonas*

1.2.1. Karakteristike

Rod *Pseudomonas* obuhvata verovatno najraznovrsniju i ekološki najznačajniju grupu bakterija na planeti. Sojevi ovog roda su prisutni u svim najvažnijim prirodnim staništima (zemljištu, slatkoj i slanoj vodi), a takođe i u formi asocijacije sa biljkama i životinjama, što ukazuje na izuzetan stepen fiziološke i genetičke adaptacije (Spiers *et al* 2000). Raznovrsnost u okviru roda nije usmerena samo na fiziološki aspekt. Od posebnog značaja je da je i fenotipska raznovrsnost, uočljiva na genetskom nivou, i dokaz je raznovrsne arhitekture genoma (i hromozoma i dodatnih genetičkih elemenata). "Fingerprint" analize su pokazale da kod roda *Pseudomonas* postoji značajan stepen polimorfizma restrikcionih fragmenata između sojeva iste vrste, ali i između sojeva koji su usko fenotipski povezani, kao i raznolikost u dužini genoma. Važno je napomenuti da se diverzitet, generalno, pa i kod roda *Pseudomonas*, održava kroz interakciju ekoloških (ekološka dostupnost, kompeticija, energija) i genetičkih faktora (mutacije, rekombinacije, veličina genoma, fiziološka fleksibilnost i modularnost), (Spiers *et al* 2000).

Dokazi o fiziološkom diverzitetu roda *Pseudomonas* dolaze iz istraživanja Stanier, Doudoroff i njihovih saradnika sa univerziteta Berkeley. Ovi naučnici su proučavali izuzetan kapacitet sojeva *Pseudomonas* da razlažu širok opseg supstrata uključujući aromatična jedinjenja, halogene derivate i kompleksne organske ostatke (Spiers *et al* 2000). Nakon ove studije nastala je potreba za jasnim taksonomskim okvirima, pa su Palleroni, Stainer i Doudoroff započeli najveću studiju o raznovrsnosti roda *Pseudomonas*. Rad, koji je objavljen 1966. godine u tadašnjem *Journal of General Microbiology* bio je dugačak 112 strana i opisao je karakteristike 267 sojeva na gajenih na 146 organskih jedinjenja, uz dodatak velikog broja testova (Stanier *et al* 1966). Od publikacije, članak je citiran oko 1000 puta. Uspeh rada proizilazi iz činjenice da je rad bio zasnovan na

dobrom razumevanju raznovrsnosti fiziologije roda *Pseudomonas* (Spiers *et al* 2000).

Od ovog rada do danas mnogi drugi istraživači su doprineli razvoju logične taksonomske mreže koja bi rešila raznovrsnost roda *Pseudomonas*. Analiza DNA i razvoj prema opisu monofiletskih grupa doveo je do toga da veliki broj vrsta bude pomeren u druge rodove, ali grupacija koju su identifikovali Stainer i saradnici (Stanier *et al* 1966) ostala je velika i "pravi" *Pseudomonasi* (*Pseudomonas sensu stricto*) su se pokazali kao još raznovrsniji od prvog publikovanja (Spiers *et al* 2000).

Rod *Pseudomonas* uz još četiri roda (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Azorhizophilus* i *Cellvibrio*) pripada porodici bakterija *Pseudomonadaceae*. Zajedničko za sve članove porodice je da su: aerobni (mada postoji mogućnost da umesto kiseonika nitrat bude akceptor elektrona kada se radi o anaerobnom rastu), imaju hemoorganotrofni metabolizam, odsustvo fotosinteze, ne formiraju spore, imaju kapacitet da rastu na velikom broju različitih organskih supstrata. Takođe, vrste koje pripadaju ovom rodu su katalaza pozitivne, a oksidaza pozitivne ili negativne (Moore *et al* 2006).

Pseudomonas uključuje 156 vrsta koje su priznate u nomenklaturi, iako je 48 vrsta u međuvremenu reklasifikovano i sada se smatraju bazonimima ili sinonimima ("basonyms or synonyms") vrsta koje su smeštene u drugi rod (Moor 2006). Takođe, više od 1300 16S rRNA/rDNA sekvenci sojeva koji pripadaju vrstama roda *Pseudomonas* su dostupne u javnim bazama podataka (Moor 2006).

Veličina genoma *Pseudomonas* varira od 3±7 Mbp (za *P. stutzeri*) do 7±1 Mbp (za *P. aeruginosa*), a detektovano je približno 5500 putativnih gena. Genomi vrsta *Pseudomonas* spadaju među najveće bakterijske genome koji su sekvencirani do danas, a sadržaj G:C parova koji je 58-69%, takođe je među najvišim (Moor 2006). Dodatno, studije na multiplim izolatima iste vrste pokazale su značajan polimorfizam u veličini genoma, koji se za *P. stutzeri* kreće od 3±7 do 4±7 Mbp, a za *P. aeruginosa* od 5±2 do 7±1Mbp (Spiers *et al* 2000). Interesantno je da

se ovako velika raznolikost ne reflektuje na nivou DNA sekvenci, kao što bi se moglo očekivati. Na primer, analiza sekvenci "housekeeping" (konstitutivnih) lokusa iz 19 ekoloških i kliničkih izolata *P. aeruginosa* je pokazala nizak diverzitet sekvenci (Kiewitz and Tummler 2000; Spangenberg *et al* 1998).

Dok su neke vrste roda *Pseudomonas* (kao što je *P. aeruginosa*) homogene taksonomske jedinice koje se lako i jednostavno identifikuju, druge vrste uključuju složene podele kao što su *P. fluorescens* i *P. putida* biovarijeteti, *P. syringae* i *P. marginalis* patovarijeteti ili *P. stutzeri* genom-varijeteti (Moore 2006).

Vrste roda *Pseudomonas* su Gram-negativne, prave ili blago zakrivljene štapićaste ćelije (maksimalne dužine 4 μm), koje se javljaju ili u parovima ili kao kratki lanci. Mnoge *Pseudomonas* vrste proizvode granule polihidroksibutirata (PHB) pogotovo kada rastu u uslovima ograničene koncentracije azota. Uz par izuzetaka sojeve roda *Pseudomonas* karakteriše pokretljivost. Tipična osobina fluorescentnih *Pseudomonas* vrsta je produkcija pigmenata koji fluoresciraju na kratkim talasnim dužinama UV oblasti (254 nm), posebno ukoliko su gajene u uslovima sa smanjenom dostupnošću gvožđe (II) jona. Neki od ovih pigmenata i njihovi derivati se ponašaju kao siderofore u sistemu za usvajanje gvožđa (Mayer *et al* 2002). Pigmenti koje proizvode različite vrste ovog roda *Pseudomonas* mogu biti korišćene za razlikovanje kao i u dijagnostičke svrhe. Pioverdin (žuto-zelena fluorescencija) je najvažniji tip siderofore kod ovih vrsta. Ostali pigmenti koje proizvode su piocijanin (*P. aeruginosa*, plav), piorubin (*P. aeruginosa*, crveni), oksihlorofin (*P. aureofaciens*, narandžast) i hlorofin (*P. chlororaphis*, zeleni). Kulturama *Pseudomonas* za rast najčešće odgovara neutralno pH i mezofilni opseg temperatura (28–37 °C), (Moore *et al* 2006).

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.2.1. Karakteristike

P. aeruginosa, kao i svi sojevi roda *Pseudomonas*, metabolički su raznovrsni i sposobni da koriste preko 80 organskih supstrata kao izvor ugljenika. *P. aeruginosa* koristi Entner-Doudoroff putanju umesto glikolize da oksiduju šećere, kao što su: fruktoza, galaktoza, glukoza i ksiloza. Sojevi su oksidaza pozitivni su i mogu da rastu na temperaturama i do 42 °C (Palleroni *et al* 1984.). Zahvaljujući raznovrsnim metaboličkim putanjama sojevi mogu da se prilagode, prežive i opstanu u širokom opsegu uslova sredine (temperatura, visoke koncentracije soli, prisustvo nekih antiseptika i velikog broja antibiotika). Takođe, veliki broj mehanizama patogenosti omogućava *P. aeruginosa* da inficira eukariotske organizme, od amebe do čoveka (Yahr and Parsek 2006).

Morfologija kolonije, pigmentacija i pokretljivost različitih sojeva *P. aeruginosa* se mogu značajno razlikovati. Uobičajeno je da je kolonija velika, glatka sa izdignutom sredinom, tako da liči na isprženo jaje. Razlike koje se javljaju među kolonijama nastaju kao posledica formiranja biofilma koji sledi nakon izlaganja antibioticima, stresnim uslovima sredine ili prilikom infekcije (Yahr and Parsek 2006).

1.2.2.2 Ekološki izolati *P. aeruginosa*

Biohemijsko razlaganje opasnih jedinjenja do stabilnih krajnjih produkata pomoću bakterija i gljiva koje su ili već prisutne (prirodni deo) u sistemu ili su dodate u sistem se primenjuje kao efikasna i ekološki pogodna strategija u bioremedijaciji. Mikroorganizmi otporni na organska jedinjenja ili metale su od velikog značaja za tehnologiju životne okoline. Posebno mikroorganizmim koji su izolovani iz zagađenih sredina, gde su prirodnom

selekcijom prepoznati kao način za rešavanje problema vezanih za detoksifikaciju i razlaganje kontaminacije i čišćenje zagađenje okoline (Syandarayana 2012).

Sposobnost da metabolišu hemijske zagađivače čini vrste roda *Pseudomonas* pogodnim za upotrebu u procesima bioremedijacije kao što su uklanjanje teških metala i toksičnih organskih jedinjenja. Sojevi *Pseudomonas* imaju dodatnu prednost, jer imaju sposobnost da produkuju hidrolitičke enzime i biosurfaktante (ramnolipide) i da podnose visok sadržaj ugljovodonika i njihovih derivata, a ovakvi mikrobi su retki u prirodi. Mikroorganizmi izolovani iz zagađenih sistema se označavaju terminom ekološki izolati ("environmental"), za razliku od kliničkih ("clinical") i tipskih ("type cultures") koji pripadaju kolekcijama kultura.

Klinički i ekološki izolati *P. aeruginosa* formiraju koherentnu taksonomsku grupu sa razlikama vezanim za korišćenje ugljovodonika kao jedinim izvorom ugljenika (Foght *et al* 1996). Sekvenciranje 16rRNA i API (analytical profile index) testovi su uobičajena strategija za karakterizaciju novih izolata *P. aeruginosa* (Aparna *et al* 2012; Górna *et al* 2011; Nie *et al* 2010). Taksonomska karakterizacija različitih izolata *P. aeruginosa* pokazala je visok % sličnosti sekvenci između različitih sojeva (bez obzira na njihovo poreklo), a biohemijska karakterizacija je dala slične rezultate za kliničke i ekološke sojeve (Aparna *et al* 2012; Nie *et al* 2010).

U periodu od 1990. do 2012. godine, po Google Scholar-u, broj objavljenih studija vezanih za biosurfaktante iz ekoloških izolata *P. aeruginosa* značajno je porastao (4628) u odnosu na biosurfaktane iz kliničkih sojeva (1707). Takođe, broj publikacija o primeni ramnolipida, u istom periodu, u biomedicini (835) i bioremedijaciji (2023) ukazuje da je bioremedijacija češće predmet istraživanja. Razlog za intenzivno istraživanje RL u bioremedijaciji je značajan progres u analitičkim i metodama za selekciju, koji je dao mogućnost za brže izolovanje producenata ramnolipida iz različitih kontaminiranih sredina kao što su zemljište, voda i industrijski otpad.

1.2.2.3. Ekstracelularni proizvodi *P. aeruginosa*

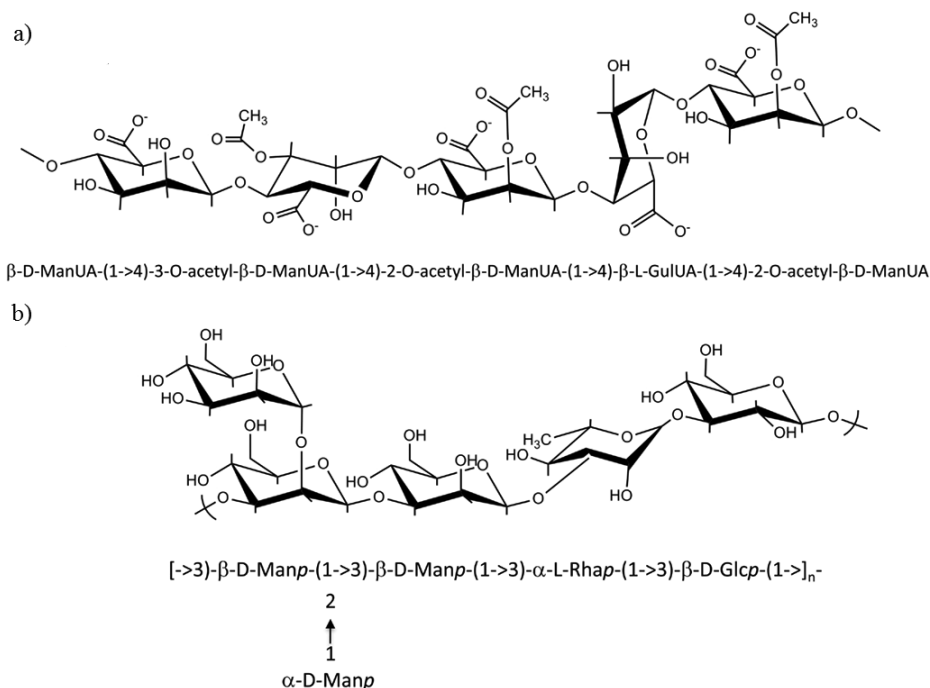
P. aeruginosa proizvodi brojne ekstracelularne proizvode među kojima su: proteini (enzimi: lipaza, fosfolipaza, alkalna fosfataza, proteaze), egzotoksin A i površinski aktivna jedinjenja (egzopolisaharid i ramnolipidi), koja učestvuju u procesu kolonizacije površina, a neka su važna i kao faktori virulencije i patogenosti (Yahr and Parsek 2006).

Lipaze (triacilglicerol-acilhidrolaze, EC 3.1.1.3) su hidrolitički enzimi koji katalizuju hidrolizu različitih acil-glicerola na kontaktu lipida i vode (Kim *et al* 2001). Od bakterijskih ekstracelularnih lipaza, lipaze koje proizvode vrste roda *Pseudomonas* su intenzivno proučavane zbog njihovog potencijala za industrijsku primenu. Prvobitno, lipaze koje proizvode rod *Pseudomonas* bile su klasifikovane u tri grupe prema homologiji sekvenci aminokiselina. Nova podela lipaza potekom iz roda *Pseudomonas* je šest subporodica u okviru porodice I bakterijskih lipaza, zbog toga što su međuvremenu izolovane lipaze iz drugih rodova, a takođe neke vrste roda *Pseudomonas* su reklasifikovane kao *Burkholderia* spp. Subporodica I.1 obuhvata lipaze iz *P. aeruginosa* i *P. fragi*, a subporodica I.2 obuhvata lipaze iz *Burkholderia cepacia* i *B. glumae*. U kristalnoj strukturi lipaza iz *B. glumae*, *B. cepacia* i *P. aeruginosa* dobro je sačuvano kalcijum-vezujuće mesto i katalitička trijada. Ovim lipazama je potreban poseban protein za uvijanje i sekreciju (Kim *et al* 2001).

Proteaze, enzimi koji katalizuju hidrolizu peptidne veze, su zbog raznovrsnih funkcija našle primenu u biotehnološkim procesima. Različiti sojevi *P. aeruginosa* mogu proizvoditi najmanje četiri različite proteaze: 1) elastazu (Las B) ili pseudoelastazu, 2) stafililizin ili LasA endopeptidazu, 3) alkalnu proteazu, 4) proteazu IV ili lizin proteazu. Najčešće su elastaza i alkalna proteaza (Gupta *et al* 2008).

P. aeruginosa proizvodi dvije različite fosfolipaze, hemolitičku (PlcH) i nehemolitičku (PlcN), pri čemu su obe regulisane na transkripcionom nivou preko neorganskog fosfata (Yahr and Parsek 2006). PlcH i PlcN su 40% identične i dele slične supstrate, fosfatidilholine, prisutne u membranama eukariota i surfaktantu u plućima. PlcH takođe hidrolizuje sfingomijelin, dok PlcN pokazuje specifičnost za fosfatidilserin (Yahr and Parsek 2006).

P. aeruginosa, osim ramnolipida, sintetisuje i različite ekstracelularne polisaharide (alginat i egzopolisaharide Pel i Psl), (Franklin *et al* 2011). Proizvodnja ovih metabolita predstavlja odgovor i adaptaciju *P. aeruginosa* na izmenjene uslove sredine. Alginat proizvode samo neki *P. aeruginosa* sojevi, dok najveći broj ekoloških izolata i kliničkih sojeva proizvode ili Psl ili Pel. Svako od ovih jedinjenja ima drugačiju fiziološku funkciju za ćeliju i matriks biofilma. Ekstracelularni polisaharidi se razlikuju po hemijskoj strukturi i biosintetskom putu. Alginat i Psl imaju različitu hemijsku strukturu, koja je poznata, Pel još uvek nije okarakterisan, ali se pretpostavlja da je to polisaharid bogat glukozom, čija se struktura razlikuje od celuloze (Franklin *et al* 2011). Po hemijskom sastavu alginat je kiseli polisaharid velike molekulske mase koji se sastoji od neponavljajućih podjedinica O-acetilovane D-manuronske kiseline i C5' epimera L-glukuronske kiseline (slika 1.2. a). Kod mukoidnih sojeva sekretuje se u podlogu i nije kovalentno povezan sa ćelijskom površinom. Polisaharid Psl se sastoji od ponavljajućih pentamera D-manoze, L-ramnoze i D-glukoze (slika 1.2. b). Psl formira matriks koji se povezuje sa biofilmom i pretpostavlja se da učestvuje u "cell to cell" i "cell to surface" interakcijama tokom formiranja biofilma (Franklin *et al* 2011).



Slika 1.2. Ekstracelularni polisaharidi koje proizvodi *P. aeruginosa*: a) alginat i b) egzopolisaharid Psl (Franklin *et al* 2011).

Od svih egzopolisaharida koje proizvodi *P. aeruginosa* alginat je najviše proučavan. Alginat sadrži veliku količinu O-acetilovanih pozicija, pa samim tim ima veliki kapacitet za vodu i vezivanje metala, a manuronat i glukuronat doprinose anjonskim karakteristikama egzopolisaharida (Sabra and Zeng 2009). Generalno, produkcija alginata *in vitro* je povećana pod ograničenjem nutrijenta, ili izlaganjem natrijum kloridu, etanolu i kiseoniku ili sušenju.

Do danas, mikrobnim ekstracelularnim polisaharidima su uglavnom proučavani kao jedinjenja koja su uključena u formiranje biofilma ili invaziju patogenih mikroorganizama, dok je manje pažnje bilo posvećenom značaju ovih polimera u procesima bioremedijacije. Ipak, kao metaboliti ekoloških izolata, pogotovo *P. aeruginosa* i njihova aplikacija u poslednjoj deceniji privlače sve više pažnje, što pokazuje povećan broj studija u ovoj oblasti (Dimitrijević *et al* 2011; Sannta Ana *et al* 2002; Sarachat *et al* 2010).

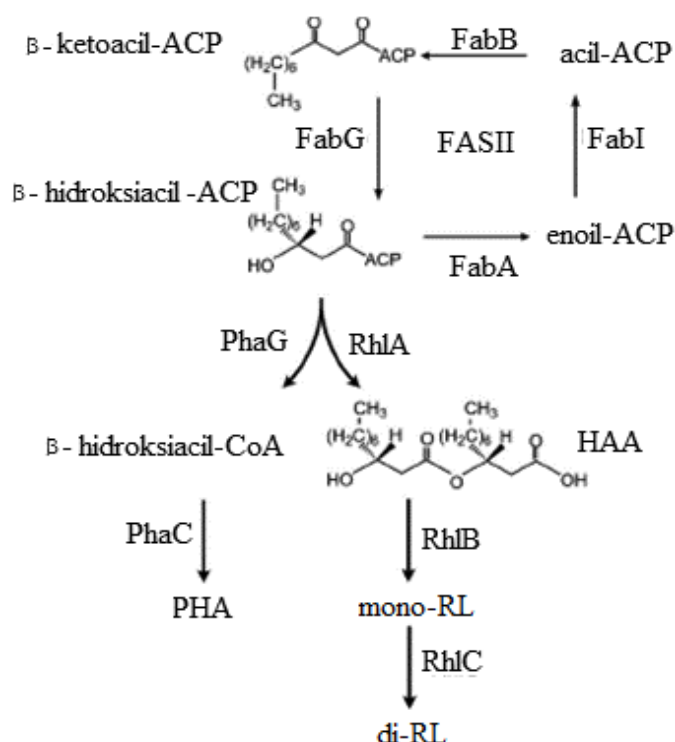
1.3. Biosinteza ramnolipida i genetička osnova diverziteta ramnolipidnih smeša

1.3.1. Biosinteza ramnolipida

Na genetičkom nivou, biosinteza ramnolipida se odvija kroz tri sekvencijalna koraka (Soberon-Chavez *et al* 2005): (1) RhlA enzim (kodiran *rhlA* genom) učestvuje u sintezi dimera masne kiseline (β -D-(β -D-hidroksi-alakanoiloksi)-karboksilna kiselina, HAA) koji nastaje od 3-hidroksi masne kiseline kao prekursora (Déziel *et al* 2003; Lépine *et al* 2002; Zhu and Rock 2008); (2) membranski vezana RhlB ramnozil-transferaza (kodirana *rhlB* genom) koja koristi dTDP-L-ramnozu i HAA molekul kao prekursore produkujući mono-RL (Ochsner *et al* 1994); (3) nastali mono-RL postaju supstrati zajedno sa dTDP-L-ramnozom za RhlC ramnozil-transferazu (kodirana *rhlC* genom) koja produkuje di-RL (Rahim *et al* 2001).

Na osnovu mutanata koji su defektni u sintezi mono- i di-ramnolipida zaključeno je da je nekoliko gena esencijalno za njihovu biosintezu (Zhu and Rock 2008). Prvi identifikovani geni bili su u okviru *rhlAB* operona, pri čemu su oba gena esencijalna za formiranje RL (Ochsner *et al* 1994). Prvobitna ideja tog eksperimenta je bila da ekspresija *rhlAB* gena daje kompleks ramnozil-transferaza I, koji je u formi RhlAB heterodimera (Ochsner *et al* 1994). Detaljnija analiza je otkrila da, iako oba mutanta nisu produkovala ramnolipid, *rhlA* mutant je produkovao HAA, što je ukazalo da je ovaj enzim potreban za sintezu HAA dela molekula i da je RhlB ramnozil-transferaza (Déziel *et al* 2003). Gen *rhlC* kodira RhlC koja je odgovorna za drugu ramnozil-grupu, čime se dobijaju di-ramnolipidi, što je zaključeno posmatranjem "knockout" mutanata koji su proizvodili samo mono-RL (Rahim *et al* 2001). RhlA je imala sličnost u sekvenci sa transacilazama, kao što je PhaG, koja učestvuje u biosintezi poli- β -hidroksialkanoata (PHA), pa je pretpostavljeno da je RhlA transacilaza koja katalizuje transfer hidroksidekanoil vrsta sa acil-nosećeg proteina (ACP) na koenzim A (CoA), (Déziel *et al* 2003). Ova shema ukazuje na hidroksidekanoil-

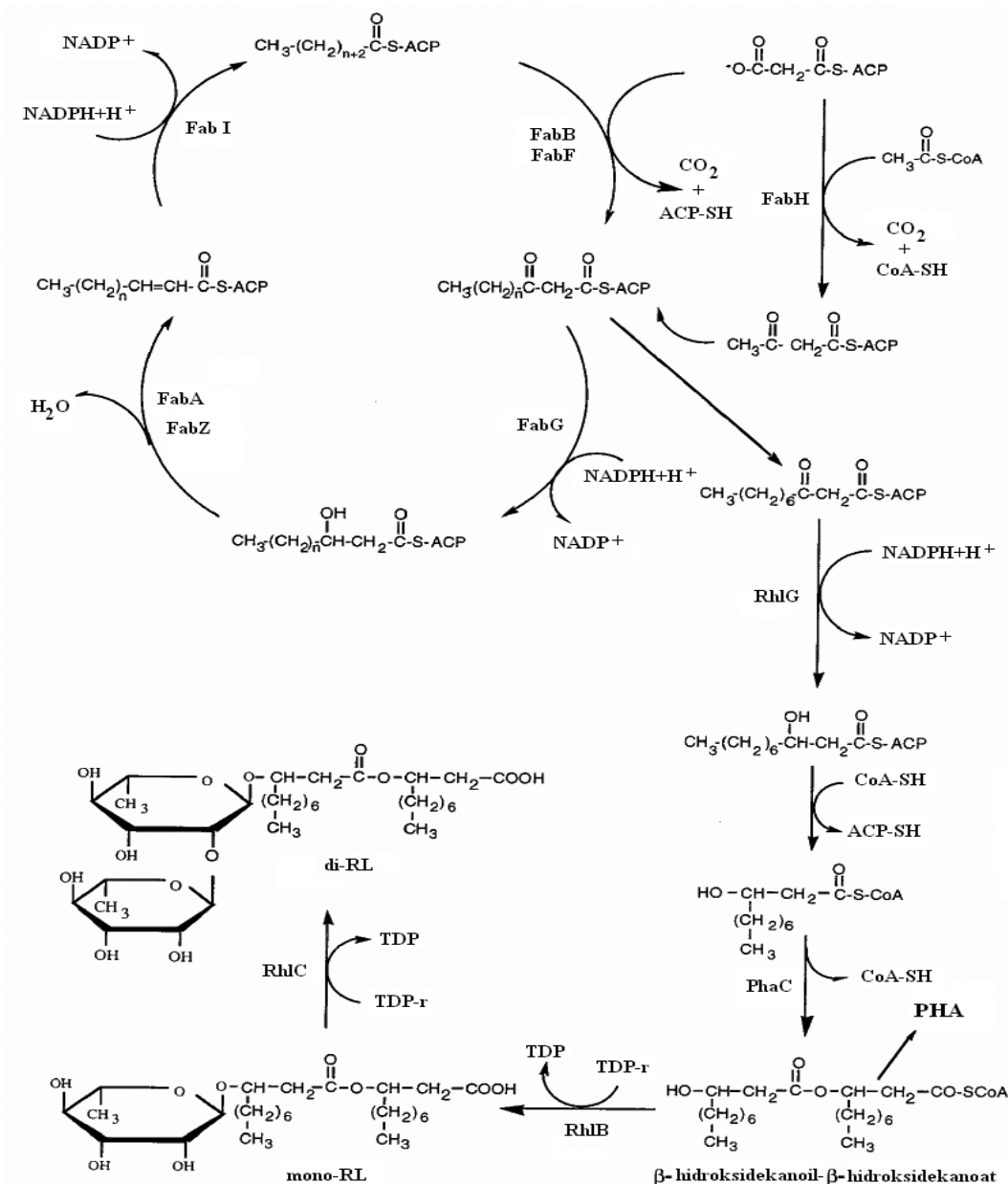
CoA kao intermedijer u sintezi RL i PHA što znači da je acil-transferaza neophodna za formiranje HAA. Identifikacija *rhlG* gena kao esencijalnog za produkciju ramnolipida i sličnost njegovog produkta sa FabG tipom II sintaze masne kiseline (FASII) doveo je do ideje da ovaj protein deluje “uzvodno” od RhlA smanjujući β -keto-acil-ACP intermedijer (Campos-Garcia *et al* 1998; Nitschke *et al* 2005; Soberon-Chavez *et al* 2005). Ipak, *in vitro* analize i kristalna struktura RhlG nisu konzistentni sa ulogom ovog enzima u biosintetskoj putanji masnih kiselina (Miller *et al* 2006). Iako je RhlA očigledno neophodni korak u



Slika 1.3. Predložena biosintetska putanja ramnolipida: RhlA je odgovorna za prevođenje β -hidroksidekanoil-ACP intermedijera iz FASII ciklusa i direktnu kompeticiju sa FabA i FabI za njihove intermedijere. RhlA je jedini protein potreban za konvertovanje dva molekula β -hidroksiacil-ACP u HAA. Količina formiranih HAA je vođena kompeticijom između RhlA i FabA/FabI, a zatim RhlB i RhlC produkuju mono- i di- ramnolipide, respektivno, dodajući ramnozil grupe. PhaG je transacilaza koja konvertuje β -hidroksiacil-ACP u odgovarajući CoA tioestar koji polimerizacijom pomoću PhaC formira PHA (Zhu and Rock 2008).

formiranju lipidne komponente ramnolipida, tačna uloga *rhlA* gena je i dalje nepoznata. Stehiometrija β -hidroksi kiselina u strukturi HAA se poklapa sa

intermedijerima u biosintezi masnih kiselina, što je suprotno intermedijerima u β -oksidaciji masnih kiselina i ukazuje da izvor masnih kiselina može biti izvor za HAA, što su potvrdili Zhu i Rock (Zhu and Rock 2008), (slika 1.3.).

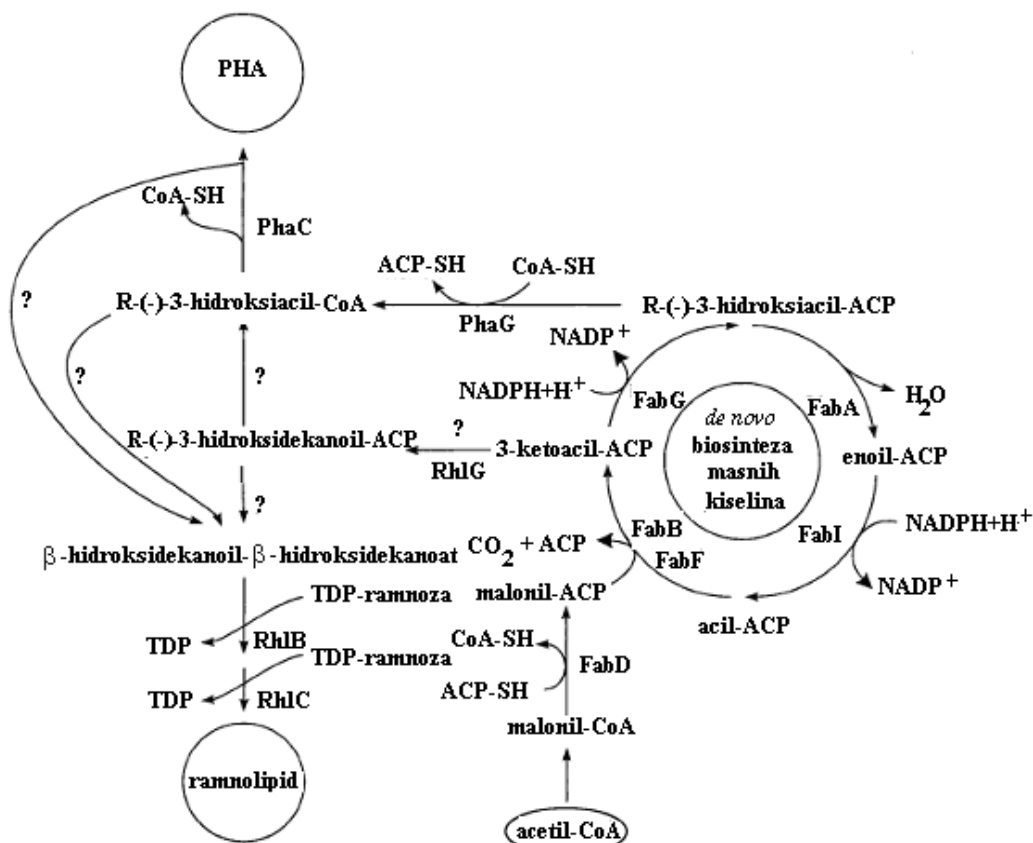


Slika 1.4. Shema biosinteze masnih kiselina koja pokazuje ulogu RhlG proteina u biosintezi PHA i ramnolipida. Početak ciklusa sinteze masnih kiselina, katalizovan pomoću FabH, zahteva acetil-CoA i malonil-CoA koji formiraju aceto-acetil-CoA. Naredni ciklusi su inicirani kondenzovanjem malonil-ACP i acil-ACP, koje je katalizovano pomoću FabB i FabF. U drugom koraku, nastali β -keto estar se redukuje do β -hidroksi-ACP, pomoću FabG. Treći korak ciklusa je katalizovan pomoću FabA ili FabZ. Četvrti, finalni korak, ciklusa je konverzija trans-2-enoil-ACP u acil-ACP, katalizovana pomoću FabI (Campos-Garcia *et al* 1998).

Hidrofobna komponenta ramnolipida, alifatični ugljovodonični lanac, HAA, nastaje u reakciji esterifikacije dva molekula 3-hidroksidekanske kiseline. Istraživanja su pokazala da je sinteza bočnog lanca povezana sa *de novo* sintezom masnih kiselina (Campos-Garcia *et al* 1998), (slika 1.4.). Ispitivanja na mutantima *P. aeruginosa* koji nisu proizveli ramnolipid pokazala su da je za sintezu ramnolipida potreban *rhlG* gen koji kodira protein neophodan za sintezu hidrofobnog dela ramnolipida. RhlG protein je NADPH zavisan acil-noseći protein (ACP) reduktaza koja je bitna za sintezu 3-hidroksi masne kiseline ramnolipida i slična je enzimima koji učestvuju u sintezi PHA (Campos-Garcia *et al* 1998).

Rehm i saradnici su identifikovali i okarakterisali genski lokus (*phaG*) kod soja *P. putida* KT2440 važan za sintezu polihidroksialkanolne kiseline (PHA), koja se skladišti u obliku granula kod mnogih bakterija uključujući i *P. aeruginosa*. Rehm i saradnici su u svojoj studiji pokazali da je *phaG* genski lokus nije generalno esencijalan za PHA sintezu, ali je neophodan za PHA sintezu i akumulaciju iz glukonata i drugih prostih izvora ugljenika, koji se katabolišu preko acetil-CoA kod *P. putida* KT2440 pre nego što krene sinteza PHA (Rehm *et al* 1998). *De novo* sinteza masnih kiselina koja dovodi do produkcije PHA se odvija preko sinteze 3-hidroksi masnih kiselina koje se zatim spajaju formirajući polimere sa srednjom dužinom lanca kao što je poli-3-hidroksidekanoat. Ovaj put je sličan sintezi masne komponente ramnolipida koji može uključivati polimerizaciju dva molekula 3-hidroksidekanske i formiranje 3-hidroksidekanoil-3-hidroksidekanoat. Kako *P. aeruginosa* ima sposobnost da sintetiše i PHA i ramnolipide, koji i jedni i drugi sadrže lipide iz ciklusa biosinteze masnih kiselina, Rehm i saradnici su istraživali biosintezu PHA i RL kod različitih mutanata *P. aeruginosa* (Rehm *et al* 2001). Svi izogeni mutanti *P. aeruginosa* *fabA*, *fabB*, *fabI*, *rhlG* i *phaG* su pokazali smanjenu akumulaciju PHA i ramnolipida. Kod *phaG* (koji kodira transacilazu) mutanta produkcija ramnolipida je bila samo malo slabija. Ekspresija *phaG* kod *P. putida* i ekspresija

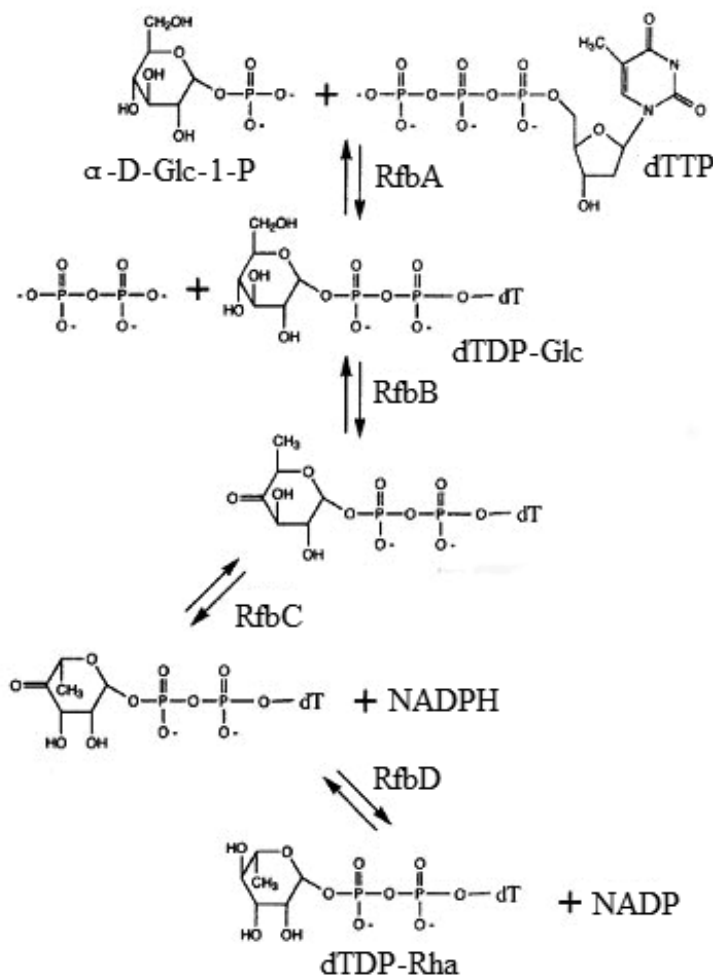
β -ketoacil reduktaze (*rhlG* gen) kod *P. aeruginosa* mutanata pokazala je da PhaG katalizuje usmeravanje intermedijera iz ciklusa masnih kiselina ka biosintezi PHA, dok RhlG katalizuje njihovo usmeravanje ka biosintezi ramnolipida, iz čega sledi da su ove dve biosintetke putanje kompetitivne (slika 1.5.).



Slika 1.5. Moguća putanja za biosintezu PHA (sa lancima hidroksi masnih kiselina srednje dužine) i ramnolipida i njihov odnos preko *de novo* biosinteze masnih kiselina. Znaci pitanja označavaju metaboličke putanje koje još uvek nisu poznate u potpunosti (Rehm *et al* 2001).

dTDP-ramnoza, hidrofилna komponenta ramnolipida, nastaje od dTDP-glukoze u tri koraka. Enzimi koji katalizuju odgovarajuće reakcije su dTDP-D-glikozo-4,6-dehidrataza (RfbB protein), dTDP-6-deoksi-D-xylo-4-heksulozo-3,5 epimeraza (RfbC protein) i NADPH: dTDP-6-deoksi-l-lyxo-4-ksilulozo 4 reduktaza (RfbD protein). Ramnoza nije karakteristična samo za ramnolipide,

jer je komponenta i lipopolisaharida pronađenog u polisaharidnom O-antigenu spoljašnje membrane *P. aeruginosa*. TDP-ramnoza je oblik u kome se šećerna komponenta dodaje i u ovom slučaju (Ma *et al* 1997), (slika 1.6.).



Slika 1.6. Biosinteza dTDP-ramnoze kod Gram-negativnih bakterija. Objašnjenje u tekstu (Ma *et al* 1997).

1.3.2. Genetička osnova diverziteta ramnolipidnih smeša

Prirodno produkovani ramnolipidni biosurfaktanti se uvek javljaju kao smeša raznih RL formi, što je uočeno kod različitih sojeva *P. aeruginosa* (Abalos *et al* 2001; Abdel-Mawgoud *et al* 2009; Benincasa *et al* 2004; Haba *et al* 2003a; Mata-Sandoval *et al* 1999) i *P. chlororaphis* (Gunther *et al* 2005, 2006), kao i kod

različitih *Burkholderia* spp. kao što su *B. glumae* (Pajarron *et al* 1993), *B. plantarii* (Andrä *et al* 2006), *B. thailandensis* i *B. pseudomallei* (Dubeau *et al* 2009). Varijacije u prirodi i distribucija različitih RL struktura identifikovanih u raznim RL smešama mogle bi biti pripisane kako različitim uslovima kultivacije tako i soj specifičnim varijacijama (Déziel *et al* 1999, 2000; Dubeau *et al* 2009). Ove smeše pokazuju fizičko-hemijska svojstva koje su zajedno verovatno drugačije od pojedinačnih RL formi.

Kod *P. aeruginosa* bikodirajući *rhlA* operon kodira prva dva enzima dok se gen za RhlC nalazi na drugom mestu u genomu. Dok *P. aeruginosa* proizvodi smeše mono- i di-ramnolipida, *P. chlororaphis* proizvodi samo mono-RL. Predloženo je da ovoj vrsti nedostaje homolog *rhlC* gena koji kodira drugu ramnozil-transferazu odgovornu za sintezu di-RL (Gunther *et al* 2005). Geni odgovorni za RL sintezu kod *B. thailandensis* i *B. pseudomallei* su skoro objavljeni (Dubeau *et al* 2009). Kod *B. thailandensis* i *B. pseudomallei* dva paraloga *rhl* klastera gena nose homologe *rhlA*, *rhlB*, *rhlC*. Za razliku od *P. aeruginosa* sva tri gena su grupisana zajedno u istom klasteru. Korišćenjem *rhlA1*, *rhlA* i *RhlA1RhlA2* mutanta pokazano je da oba genska klastera paraloga doprinose ukupnoj RL produkciji *B. thailandensis* (Dubeau *et al* 2009). Dok je do tada bilo pokazano da vrste roda *Burkholderia* proizvode samo di-ramnolipide, Dubeau i saradnici su pokazali koprodukciju mono- i di-ramnolipida, pri čemu je koncentracija mono-RL bila niža. Odnos di-RL prema mono-RL kod *B. thailandensis* bio je 13:1, dok je kod *P. aeruginosa* bio 4:1 (Dubeau *et al* 2009). Hipoteza je bila da je kako *P. aeruginosa* ima *rhlA* i *rhlB* na jednom, a *rhlC* na drugom operonu ovaj rezultat posledica različitog nivoa i trenutka ekspresije prve i druge ramnozil-transferaze (*RhlB* i *RhlC*, redom) što deklupuje obe aktivnosti. Sa druge strane, kod *Burkholderia* vrsta koekspresija *rhlB* i *rhlC* bi mogla da stimuliše produkciju svih enzima ove biosintetske putanje u identičnom stehiometrijskom odnosu. Drugim rečima, *RhlC* će biti produkovan u isto vreme i u jednakoj količini kao *RhlB* i time efikasno dodavati drugu

ramnozila-grupu najvećem procentu sintetisanih mono-ramnolipida (Abdel-Mawgoud *et al* 2010).

1.4. Mehanizmi međucelijske komunikacije, regulacija biosinteze i fiziološka uloga ramnolipida

1.4.1. Quorum sensing, QS

Quorum sensing (QS) je mehanizam koji bakterije primenjuju u međucelijskoj „cell-to-cell“ komunikaciji korišćenjem difuzibilnih signalnih molekula, a zasniva se na kontroli kritične gustine ćelijske populacije (Williams *et al* 2007). Kada se broj ćelija poveća dolazi do produkcije raznih signalnih molekula (obuhvaćeni terminom “quorumones”) koji diktiraju ponašanje bakterijske populacije (Kleerebezem *et al* 1997; Williams and Camara 2009). QS signalni molekuli, kontrolišu različite fiziološke procese, pri čemu su neki od njih povezani i pod kontrolom su višestrukih QS sistema (Dusane *et al* 2010).

Signalni molekuli su pronađeni i kod Gram-pozitivnih i kod Gram-negativnih bakterije, pri čemu postoje značajne razlike između ove dve grupe. Kod Gram-pozitivnih bakterija, QS je povezan sa brojnim lineranim i posttranslaciono modifikovanim peptidima kao signalnim molekulima, ako što su peptidni laktoni i peptidni tiolaktone koji se nalaze kod *B. subtilis*, *Enterococcus* spp. i *Staphylococcus aureus* (Dusane *et al* 2010). Kod Gram-negativnih bakterija, QS regulacija je pod kontrolom molekula autoinducera (AI). Ovi molekuli biohemijski pripadaju klasi acilhomoserin laktona (AHL), koji su lipofilne prirode. Homoserin laktoni nastaju iz S-adenozil-metionina, koji je supstrat za AHL sintezu i sadrži hidrofilni homoserin lakton kao glavu i bočni acil lanac kao hidrofobni deo koji varira zavisno od vrste. Bočni acil lanac može imati od 4 do 18 C atoma. Alteracije u strukturi bočnog lanca omogućavaju specifičnost QS signala i olakšavaju komunikaciju između bakterija (Dusane *et al* 2010). Osim AI molekula koji su iz klase AHL, postoje i druga ne-AHL jedinjenja kao što su indoli, PQS, male RNA i sekundarni

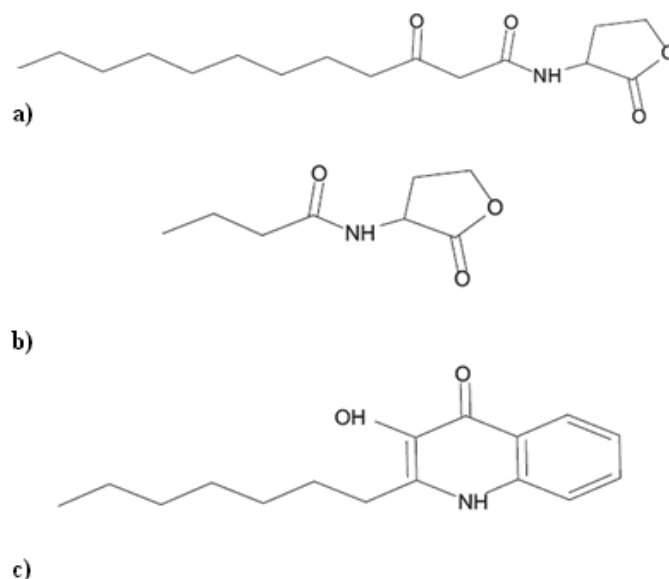
prenosioci signala koji su uključeni u QS indukciju. Indoli se proizvode i ponašaju kao ekstraćelijski signali u indukciji kvoruma kod *E. coli* (Wang *et al* 2005). Drugi molekul je heptil-hidrohinon koji se naziva *Pseudomonas* hinolni signal (PQS) koji se nalazi isključivo kod vrsta roda *Pseudomonas* spp. i deo je QS hijerarhije. PQS je veza između *las* i *rhl* QS sistema (McKnight *et al* 2000) i sličan je AHL-ovima u smislu veličine i lipofilne prirode. Najveći broj gena koji pripadaju ovim sistemima je opisan ranije, ali mehanizam dejstva još uvek nije poznat (Déziel *et al* 2004; Diggle *et al* 2003; Gallagher *et al* 2002). Molekuli AI difunduju kroz ćelijsku membranu i deluju unutar ćelije. Male, nekodirajuće RNA takođe imaju funkciju QS sistema tako što direktno ili indirektno utiču na gensku ekspresiju preko posttranskripcionih mehanizama (Masse *et al* 2003; Wienholds and Plasterk 2005). QS sistemi upravljaju setom mikrobnih procesa, uključujući biosintezu antibiotika, pokretljivost, transfer plazmida, formiranje biofilma, patogenezu, produkciju biosurfaktamata, enzima i sekundarnih metabolita (Camara *et al* 2002; Fuqua and Greenberg 2002; Lazdunski *et al* 2004; Miller and Bassler 2004; Pappas *et al* 2004; Whitehead *et al* 2001). Kod *P. aeruginosa* primer QS sistema su regulacija produkcije nekih egzoprodukata (egzopolisaharida, ramnolipida i lipaze), otpornost na antibiotike, formiranje biofilma i pokretljivost.

1.4.2. Regulacija biosinteze ramnolipida QS sistemima kod *P. aeruginosa*

P. aeruginosa ima dva međusobno povezana QS sistema, nazvana *las* i *rhl* (Dusane *et al* 2010) koji regulišu različite procese kao što su ekspresija ramnolipida, produkcija enzima i piocijanina i zadržavanje arhitekture biofilma (Davies *et al* 1998; de Kievit and Iglewsky 2000; Rumbaugh *et al* 2000; Smith and Iglewsky 2003).

Produkcija ramnolipida je vođena trima QS molekulima (slika 1.7.): *Pseudomonas* autoinducer 1 (PAI-1, N-(3-okso-C12 HSL), *Pseudomonas*

autoinducer 2 (PAI2, N-butiril homoserin lakton ili C4 HSL) i već pominjani PQS (2-heptil-3-hidroksi-4-hinolin), (Pearson *et al* 1994, Pesci *et al* 1999).



Slika 1.7. QS molekuli kod *P. aeruginosa* PAO1: a) PAI 1, b) PAI2 i c) PQS (Dusane *et al* 2010).

Na početku ovog poglavlja je navedeno da je produkcija ramnolipida pod kontrolom dva QS sistema *las* i *rhl*. U *P. aeruginosa* *las* operon se sastoji od dva transkripciona aktivatorna proteina, LasR i LasI, koji upravljaju sintezom PAI-1 autoinducera. Indukcija *lasB* gena koji kodira enzim elastazu potrebna je za ekspresiju LasR i PAI-1 autoinducera (Dusane *et al* 2010). Produkcija ramnolipida regulisana je *rhl* sistemom (Johnson and Boese-Marazzo 1980). Sinteza ramnolipida se odvija pod koordinisanim vodstvom *rhlAB* gena koji kodira ramnozil-transferaze 1 i 2 (Ochsner *et al* 1995). QS *rhl* sistem se sastoji od transkripcionih aktivatorskih proteina RhIR i RhII koji regulišu sintezu PAI-2 (Pearson *et al* 1995). Transkripcioni aktivator RhIR aktivira transkripciju *rhlAB* (ramnozil-transferaza 1) operona i *rhlC* gena (ramnozil-transferaza 2), (Ochsner *et al* 1994; Rahim *et al* 2001). Geni koji učestvuju u produkciji ramnolipida su prikazani u tabeli 1.3. Sa porastom broja ćelija u populaciji dolazi do indukcije *las* QS sistema čijom aktivnošću dolazi do povećane koncentracije PAI-1

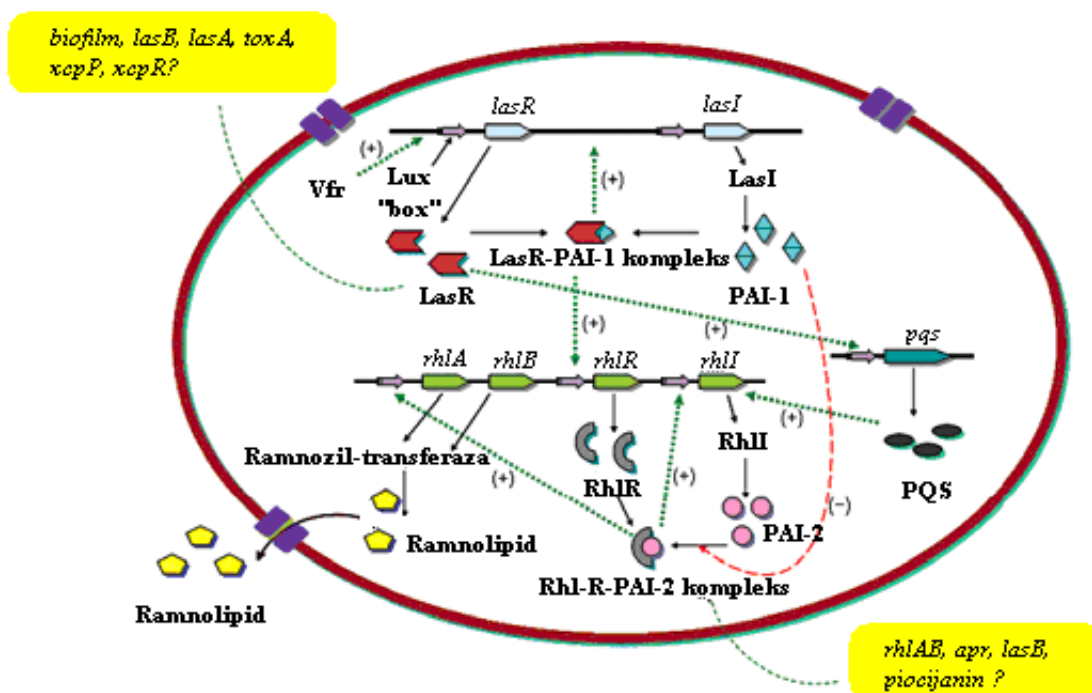
autoinducera. Zatim se PAI-1 vezuje za transkripciono aktivatorsko mesto na LasR i nastaje LasR-PAI-1 kompleks. Ovaj kompleks indukuje gene kontrolisane las QS sistemom, uključujući i negative regulatorne gene (*rasL* i *rhlR*) i *pqsH*, neophodne za PQS produkciju (Ochsner *et al* 1994; Pearson *et al* 1995; Mashburn and Whiteley 2005). Aktivnost ovih signala zavisi od njihove sposobnosti da difunduju u vodenom rastvoru.

Tabela 1.3. Geni za sintezu RL u QS sistemima kod *P. aeruginosa* (Dusane *et al* 2010)

QS sistem	Geni koji učestvuju	Enzimi koji su eksprimirani
<i>las</i> sistem	<i>lasI</i>	Sinteza autoinducera, LasI sintaza
	<i>lasR</i>	Transkripcioni regulator, LasR sintaza
	<i>lasA</i>	LasA protein prekursor
	<i>lasB</i>	Elastaza LasB
<i>rhl</i> sistem	<i>rhlI</i>	Protein koji sintetiše autoinducer, RhlI sintaza
	<i>rhlR</i>	Transkripcioni regulator, RhlR sintaza
	<i>rhlAB</i>	Ramnozil-transferaza 1
	<i>rhlC</i>	Ramnozil-transferaza 2
	<i>rhlG</i>	β-ketoacil reduktaza
<i>pqs</i> sistem	<i>pqsA</i>	koenzimA ligaza
	<i>pqsB</i>	Homologa β-keto acil protein prenosilac sintaza
	<i>pqsC</i>	Homologa β-keto acil prenosilac sintaza (protein koji nosi 3-oksoacil-[acil-protein prenosilac])
	<i>pqsD</i>	3-oksoacil-[acil- protein prenosilac] sintaza III
	<i>pqsE</i>	Protein koji odgovara na hinolin signal
	<i>pqsH</i>	Moguća FAD zavisna monooksigenaza
	<i>pqsL</i>	Moguća FAD zavisna monooksigenaza

P. aeruginosa proizvodi ramnolipid koji povećava rastvorljivost PQS u vodenim rastvorima. Ipak, za razliku od ostalih QS sistema, PQS se transportuje primarno kroz spoljne membranske vezikule, što je formacija u kojoj je PQS indukovano. PQS se ponaša kao veza i između *las* i *rhl* QS sistema (Mashburn-Warren *et al* 2008, 2009). Korišćenjem mutanata koji su defektni u sintezi PQS, ćelije *P. aeruginosa* su proizvodile manje ramnolipida nego nativni sojevi (Diggle *et al* 2003). PQS ili direktno ili indirektno indukuje *rhlI* gen koji diktira produkciju PAI-2 QS molekula koji vezuje ili aktivira RhlR (McKnight *et al* 2000). Operon *rhlAB* koji kodira enzime odgovorne za sintezu ramnolipida, je

kontrolisan na transkripcionom i translacionom nivou preko RhlR i PAI-2. RhlR-PAI-2 kompleks indukuje gene kontrolisane *rhl* QS sistemom za produkciju ramnolipida. QS *las* sistem kontrolise ekspresiju transkripcionog aktivatora RhlR (slika 1.8.). Osim pomenutih gena, *rhlG* je uključen u sintezu β -hidroksi masne kiseline u ramnolipidu (Campos-Garcia *et al* 1998). Očigledno je da postoji QS hijerarhija kod *P. aeruginosa* u okviru *las* i *rhl* sistema.



Slika 1.8. Shematski prikaz *las* i *rhl* gena i QS signalnih molekula kod *P. aeruginosa* za produkciju ramnolipida. QS sistem *las* produkuje LasR aktivator i LasI (produkcija PAI-1). Geni *rhlA* i *rhlB*, udruženi u operon, klasterovani su sa *rhlR* i *rhlI*. Ovi geni *rhlABRI* diriguju sintezu ramnozil-transferaze i transkripcione aktivatore, RhlR i RhlI (produkcija PAI-2), koji su odgovorni za produkciju ramnolipida. Vfr indukuje *lasR* i koncentracija PAI-1 raste i veže se za LasR. Autoinducer PAI-1, kodiran sa *lasI*, veže se za LasR i formira LasR-PAI-1 kompleks koji reguliše transkripciju *rhlR*. Gen *rhlR* produkuje RhlR protein koji se veže za PAI-2 i formirani kompleks interaguje sa *rhlA* i započinje transkripciju *rhlAB* gena odgovornih za produkciju ramnolipida. Sa (+) su označeni transkripcioni aktivatori, a sa (-) transkripciona represija određenih gena (Dusane *et al* 2010).

Važno je napomenuti da je ekspresija *rhlAB* operona i produkcija ramnolipida osim QS signalima, regulisana i faktorima okoline i nutrijentima (Abdel-Mawgoud *et al* 2011), što ukazuje na složenost biosinteze ramnolipida. Na primer, transkripcija *rhlAB* i produkcija ramnolipida je inverzno proporcionalna koncentraciji gvožđa. Objašnjenje je dobro poznata veza između dostupnosti gvožđa i QS kod *P. aeruginosa*, a to je da je ekspresija *lasIR* i *rhlIR* pojačana u gvožđe ograničenim ili represovanim uslovima. Takođe, produkcija RL je inhibirana u prisustvu NH_4^+ , glutamine, asparagina i arginina kao izvora azota, dok je promovisana u prisustvu NO_3^- , glutamata i aspartata. Povišen nivo C/N i C/P podstiču produkciju ramnolipida, dok divalentni katjoni inhibiraju produkciju biosurfaktanta (Chayabutra *et al* 2001; Soberón-Chávez *et al* 2005).

1.4.3. Quorum quenching (QQ)

Interakcije između prokariota ili prokariota i eukariota su uopšte prisutne u ekosistemima. Ako uzmemo u obzir da različite bakterijske vrste koriste QS sistem za koordinisanje biološke aktivnosti mikrobne zajednice da bi pojačale svoje kompetitivne prednosti, logično je da će kompetitori razvijati određene sisteme i mehanizme (*Quorum quenching*, QQ) koje mogu da naruše QS sisteme drugih mikroorganizama kako bi stekli prednost (Dong and Zhang 2005). Proučavanje QQ mehanizama i njihove fiziološke uloge u ekosistemima je važno za mogućnost primene u kontroli i prevenciji bakterijskih infekcija (Dong *et al* 2007).

U teoriji, svaki mehanizam koji može efikasno da interferira sa bilo kojim ključnim korakom u QS može biti potencijalni QQ mehanizam (tabela 1.4.). U poslednjih par godina identifikovano je nekoliko grupa potentnih QQ malih molekula i enzima, od kojih su neki biogenog porekla, a neki sintetički, kao što su: halogenovani furanoni (iz *Delisea pulchra*) i njegovi sintetički derivati, sintetički AHL i API (autoindukujući peptid, detektovan kao deo QS signala

kod *S. aureus*) analozi koji se takmiče sa odgovarajućim QS signalima, QQ enzimi (AHL-laktonaza, AHL-acilaza i paraoksonaze PON) koji učestvuju u degradaciji AHL signala (Dong *et al* 2007).

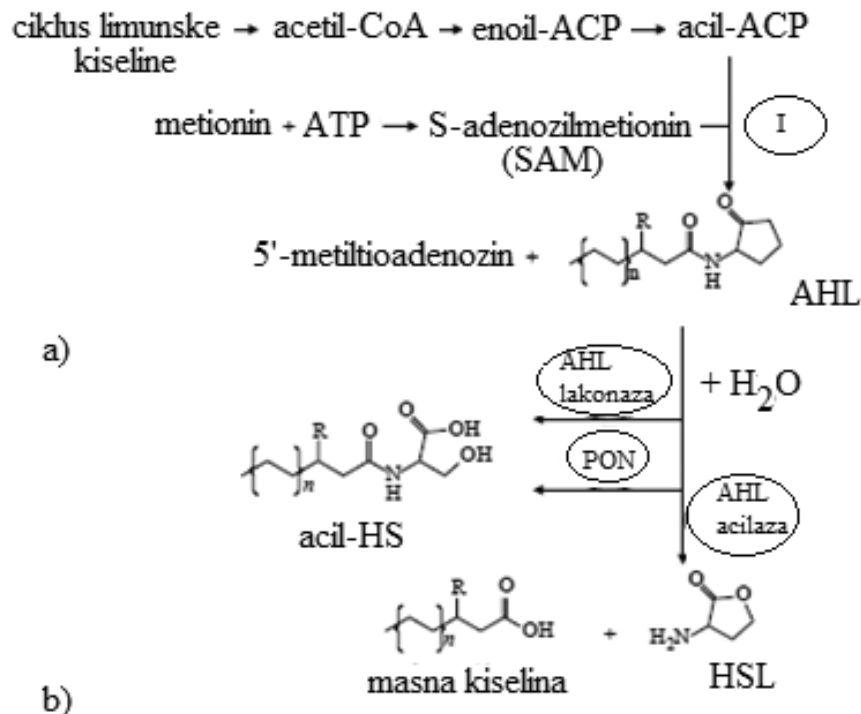
Tabela 1.4. Opšti koraci i ključne komponente AHL tipa QS sistema (Dong *et al* 2007)

QQ proces	Uloga	Ključna komponenta	Moguća QQ strategija
Mala gustina populacije	Osnovna uloga u generisanju signala	Proteini i enzimi koji učestvuju u biosintezi acil lanca i S-adenozin metionina (SAM); LuxR-tip (I) protein	Inhibitor biosinteze masnih kiselina, inhibitor SAM biosinteze i I protein inhibitor
	Akumulacija signala	Proteini koji učestvuju u efluku signala dugog lanca	Enzimi AHL degradacije; inhibitori efluka signala
Visoka gustina populacije	Prijem signala	LuxR tip (R) transkripcioni faktor, influks za dugi lanac AHL signal	R protein inhibitor, inhibitori influka
	Autoindukcija i aktivacija QS	R i I proteini koji učestvuju u pojačanju AHL produkcije; QS transkripcioni faktori	Enzimi AHL degradacije; inhibitori I i R enzima
	Razgradnja signala	Enzimi AHL degradacije i njihovi regulatorni mehanizmi	Hemijski indukovana ranija ekspresija enzima AHL degradacija

Mali molekuli koji inhibiraju proces QS signalizaciju mogu biti podeljeni u dve grupe prema strukturi i funkciji. Prva grupa su molekuli koji su strukturno slični QS signalima kao što su halogenovani furanoni i sintetički molekuli (Hentzer *et al* 2003). Druga grupa su mali molekuli koji se ponašaju kao enzimski inhibitori kao što su triklosan koji inhibira enoil-ACP reduktazu (Hoang and Schweizer 1999) i klosantel koji inhibira senzor histidin-kinaze u dvokomponentnim sistemima signalizacije (Stephenson *et al* 2000), (slika 1.9.).

Do sada su poznati sledeći enzimi u sistemima QQ: AHL-acilaza, AHL-laktonaza i paraoksonaza. AHL-acilaza i AHL-laktonaza su detektovane i kod eukariota i kod prokariota, dok je aktivnost paraoksinaze uočena samo kod eukariota. AHL-laktonaza i paraoksonaza katalizuju hidrolizu homoserin laktona, dok je AHL-acilaza hidrolizuje amidnu vezu dajući odgovarajuću

masnu kiselinu i homoserin lakton (slika 1.9.). Kod *P. aeruginosa* je uočena aktivnost AHL-acilaze (Dong *et al* 2007).



Slika 1.9. Sinteza i degradacija AHL tipa signala a) I-protein katalizuje biosintezu AHL signala korišćenjem acil-ACP i SAM, b) AHL degradacija preko AHL-laktonaze, AHL-acilaze i PON enzima (Dong *et al* 2007).

1.4.4. Fiziološka uloga ramnolipida

Uprkos tome što su do sada urađene mnoge studije i istraživanja o ramnolipidima, tačna fiziološka uloga ovih molekula još uvek nije precizno definisana. Mnoge od funkcija proizilaze od dobro poznatih fizičko-hemijskih svojstava ramnolipida kao što su površinska aktivnost, sposobnost kvašenja, osobine detergenta i ostale karakteristike povezane sa amfipatičnom prirodom. Dosadašnje studije su pokazale da su ramnolipidi multifunkcionalni mikrobnji proizvodi, a moguće uloge u fiziološkim procesima su: pojačavanje usvajanja i biodegradacija slabo rastvornih supstrata, imunoregulatori i virulentni faktori,

bakterijska pokretljivost, formiranje i očuvanje arhitekture biofilma i antimikrobna aktivnost (Abdel-Mawgoud *et al* 2010).

1.4.4.1. Olakšavanje usvajanja i biodegradacija teško rastvornih supstrata

Mnoge bakterije prilikom razlaganja hidrofobnih supstrata proizvode biosurfaktante koji olakšavaju usvajanje i asimilaciju ugljovodonika (Hommel 1994). Primer su linearni alkani koji su nerastvorni u vodi, čija rastvorljivost opada sa povećanjem ugljovodoničnog niza, ali su veoma dobar izvor ugljenika za *P. aeruginosa*. Sa par izuzetaka, *n*-alkana veoma male molekulske mase, rastvorljivosti ovih molekula su veoma niske (2×10^{-10} M za heksadekan). Ove karakteristike *n*-alkana otežavaju usvajanje i stoga nije jasno kako ovi hidrofobni molekuli omogućavaju ćelijski rast. Za srednje i dugolančane *n*-alkane, verovatno je da bakterije dolaze do njih ili surfaktanat-olakšanim procesima (emulzifikacija ili solubilizacija) ili direktnim "pridržavanjem" ugljovodoničnih kapi (surfaktant-posredovani procesi koji povećavaju hidrofobnost površine ćelije), (Abdel-Mawgoud *et al* 2010). Ramnolipidi su najviše proučavani zbog svoje sposobnosti da posreduju u asimilaciji hidrofobnih supstrata u tečnim kulturama, posebno ugljovodonika *n*-alkana (Beal and Betts 2000; Koch *et al* 1991; Noordman and Janssen 2002; Shreve *et al* 1995). Interesantno je da ramnolipidi omogućavaju i biodegradaciju slabo rastvornih molekula, tako što čine da površina ćelije postane hidrofobnija (Al-Tahhan *et al* 2000; Shreve *et al* 1995; Zhang and Miller 1994).

1.4.4.2. Ramnolipidi kao imunomodulatori i faktori virulencije

Ramnolipidi nisu smatrani značajnim kao patogeni elementi kod *P. aeruginosa*, zbog toga što nemaju profil tipičnih ili tradicionalnih faktora virulencije. Nove publikacije dokazuju da RL ipak imaju virulentne osobine. Prečišćeni ramnolipidi deluju direktno na imune ćelije. Među mnogim egzoproduktima koje oslobađa *P. aeruginosa*, a utiču na cirkulaciju neutrofila, za RL je pokazano da, osim što indukuju direktnu hemolitičku aktivnost

neutrofila, ovi biosurfaktanti: povećavajući oksidativno sagorevanje kod monocita, imaju citolitični efekat na makrofage (pogotovo di-RL), a u nižim koncentracijama inhibiraju njihov fagocitni odgovor, izazivaju oslobađanje histamina iz mastocita, stimulišu sintezu i oslobađanje inflamatorinih medijatora serotonina, raznih faktora iz trombocita, interleukina 8 i 6, indukuju lizu polimorfonukleranih leukocita, inhibiraju cilijarnu funkciju u bronhijalnom epitelijumu itd., (Abdel-Mawgoud *et al* 2010).

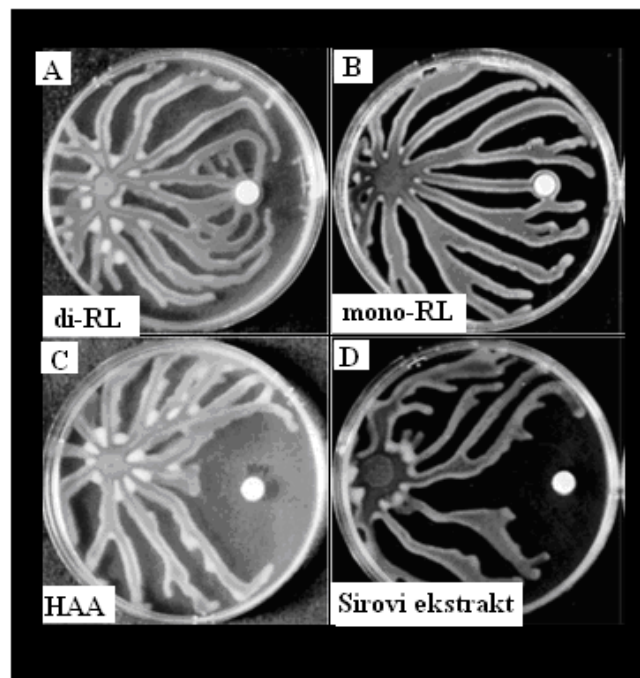
1.4.4.3. Antimikrobna aktivnost ramnolipida

Širok opseg antimikrobnog dejstva ramnolipida uočen je rano, kada se pokazalo da su aktivni protiv različitih bakterija, uključujući i Gram-negativne i Gram-pozitivne vrste (Abdel-Mawgoud *et al* 2010). Mogući mehanizam dejstva ramnolipida mogao bi biti interkalacija u biološke membrane i destrukcija njene permeabilnosti (Sotirova *et al* 2008). Istraživanja antimikrobne aktivnosti smeše ramnolipida koja su produkovala tri različita soja *P. aeruginosa* koja su rasla na različitim tipovima otpada biljnih ulja (Abalos *et al* 2001; Benincasa *et al* 2004; Haba *et al* 2003b) pokazala su da različite kombinacije ramnolipida pokazuju antimikrobnu aktivnost na skoro sve ispitane Gram-pozitivne vrste, uključujući *Staphylococcus*, *Mycobacterium* i *Bacillus* i značajnu aktivnost na neke vrste Gram-negativnih bakterija, pri čemu su *Serratia marcescens*, *Enterobacter aerogenes* i *Klebsiella pneumoniae* posebno osetljive. Takođe, otkrivena je visoka inhibitorna aktivnost protiv raznih fungalnih vrsta, kao što su filamentozne vrste (*Chaetomium globosum*, *Aureobasidium pullulans* i *Gliocladium virens*) i fitopatogenih (*Botrytis cinerea* i *Rhizoctonia solanii*), dok značajnog efekta na kvasce nije bilo (Abalos *et al* 2001; Benincasa *et al* 2004; Haba *et al* 2003b). Ramnolipidi su pokazali visoku zoosporicidnu aktivnost, preko lize zoospora, protiv raznih fitopatogena: *Pythium*, *Phytophthora* i *Plasmopara* vrsta (Stanghellini and Miller 1997). Takođe, publikovana je i antiviralna, algicidalna, mikoplazmicidalna i aktivnost ramnolipida protiv ameba (Cosson *et al* 2002; Wang *et al* 2005).

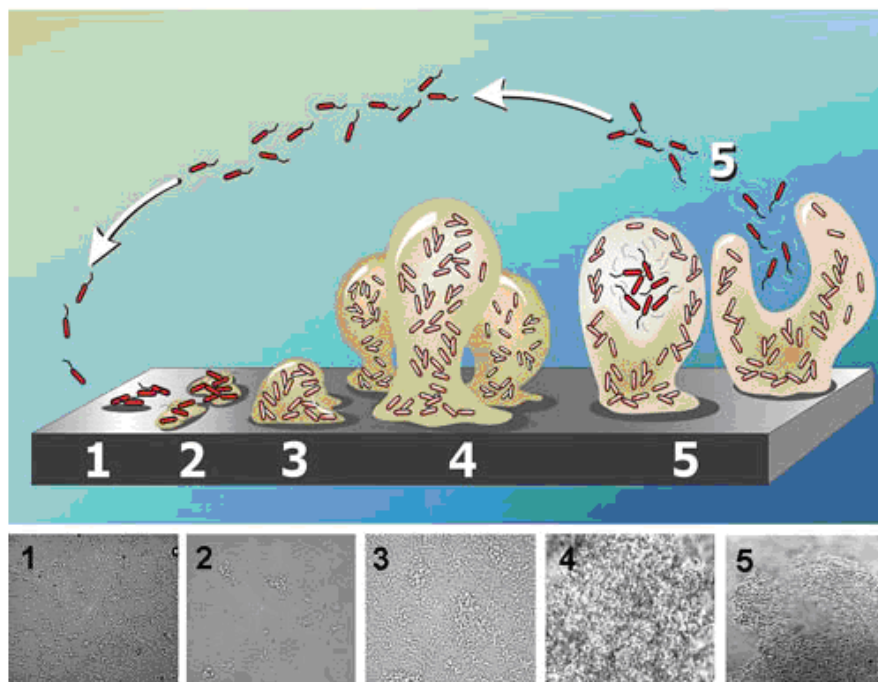
1.4.4.4. Ramnolipidi u površinskoj pokretljivosti i formiranju biofilma

Rojenje ("Swarming") je vrsta brze i koordinisane translokacije bakterijske populacije preko površine, koja često dovodi do formiranja cvetolike, dendrične kolonije (Fraser and Hughes 1999; Verstraeten *et al* 2008). Ključni trenutak za ovaj vid kretanja je produkcija kvasećih agenasa oko kolonije koji redukuju površinsku aktivnost. Kod *P. aeruginosa* (Matsuyama and Nakagawa 1996) ovaj vid pokretljivosti je objašnjen pre desetak godina (Déziel *et al* 2001; Köhler *et al* 2000) kada je pokazano da je potrebna flagela i produkcija kvasećih agenasa kao što su HAA i ramnolipidi (Caiazza *et al* 2005; Déziel *et al* 2003; Köhler *et al* 2000). Tremblay i saradnici (2007) su zaključili da HAA i ramnolipidi imaju ulogu u modulaciji kretanja, tako što mono-ramnolipidi deluju kao kvaseći agensi, di-ramnolipid kao hemotaktički atraktanti, dok HAA suprotno njima, smanjuju pokrete rojenja (slika 1.10. a).

Biofilm predstavlja populaciju mikroorganizama (jedne ili više vrsta) koja je zakačena za površinu (Hall-Stoodley *et al* 2004), a njegovo formiranje prolazi kroz nekoliko faza (Monroe 2007), (slika 1.10. b). Istraživanja na mutantima sa izmenjenim kretanjem su pokazala da su oni defektni u sazrevanju biofilma (Yeung *et al* 2009). Takođe, pokazano je da mutanti koji imaju pojačano kretanje rojenjem nisu sposobni da formiraju biofilm, prvenstveno zbog toga što ćelije nisu efikasno pričvršćene na supstrat (Caiazza *et al* 2007). Sve pomenuto ukazuje da je ovaj vid kretanja važan i da je kritičan korak u formiranju biofilma. Moguće objašnjenje bi moglo biti da su i ramnolipidi uključeni u ovaj proces, jer egzogeni RL indukuju oslobađanje lipopolisaharida i tako pojačavaju hidrofobnost površine ćelije koja favorizuje primarnu adheziju (Al-Tahhan *et al* 2000; Zhang and Miller 1994). Produkcija ramnolipida je mogući način regulacije hidrofobnosti ćelijske površine i modifikaciju adhezivnih interakcija (Boles *et al* 2005; Déziel *et al* 2003). Ramnolipidi ubrzavaju migraciju bakterija koje su asosovane sa površinom u biofilmu i tako omogućava formiranje inicijalne mikrokolonije i diferencijaciju



a)



b)

Slika 1.10. a) Rojenje *P. aeruginosa* na hranljivom agru uz dodatak: (A) di-RL, (B) mono-RL, (C) HAA, (D) sirovi ekstrakt kao kontrola (Tremblay *et al* 2007); b) faze u formiranju biofilma: 1. inicijalno pričvršćivanje, 2. ireverzibilno pričvršćivanje, 3. maturacija I, 4. maturacija II, 5. disperzija. Svaki stadijum nastanka je u paru sa elektronskom mikrofijom *P. aeruginosa* (Monroe 2007).

strukture biofilma (Pamp and Tolker-Nielsen 2007). Tačnije, kritična uloga ramnolipida izgleda da je posredovanje između “cell to cell” i “cell to surface” interakcija, tako što deluje na odvajanje i disperziju *P. aeruginosa* ćelija sa biofilma, pogotovo sa centra mikrokolonije (Boles *et al* 2005; Schooling 2004) i na taj način zadržavaju kanale unutar biofilma otvorenim tokom kasnijih faza razvoja (Davey *et al* 2003). Takođe, pokazano je egzogeno dodat RL narušava strukturu biofilma *Salmonella typhimurium* i *Bordetella bronchiseptica* (Irie *et al* 2005; Mireles *et al* 2001).

1.5. Industrijska proizvodnja ramnolipida

Prednosti ramnolipida, kao biosurfaktanata, u odnosu na sintetske surfaktante su: niska toksičnost, veća biodegradabilnost, bolja kompatibilnost sa životnom okolinom, bolje penušanje, veća selektivnost i specifičnost pri ekstremni uslovima (pH, temperatura, pritisak, salinitet) kao i mogućnost produkcije iz obnovljivih sirovina (Maneerat 2005). Ipak, “large-scale” produkcija biosurfaktanata često je problematična zbog niskih prinosa i visokih troškova izolovanja i prečišćavanja. Neki od pristupa da se ovi problemi prevaziđu su korišćenje jeftinih sirovina, optimizovani i efikasni bioprocesi kao i hiperprodukcija pomoću mutiranih i rekombinantnih sojeva (Muthusamy *et al* 2008). Osim toga, važno je poznavanje metoda za selekciju sojeva i praćenje produkcije biosurfaktanata. Osim laboratorijskih eksperimenata, kao savremeni pristup optimizovanja biotehnoloških procesa primenjuje se eksperimentalni dizajn (Response Surface Methodology, RSM), (Rodrigues *et al* 2006). Uprkos problemima vezanim za dobijanje, karakteristike biosurfaktanata prate trend zelene hemije i čine osnovu modernih industrijskih procesa. Stvaranje ekološkog društva koje će biti u ravnoteži sa životnom okolinom je najveći izazov za nauku i savremeni svet u 21. veku.

Strategije za fermentaciju koje se primenjuju za proizvodnju ramnolipida obuhvataju “batch”, “fed-batch”, kontinulane i integrisane mikrobn/enzimske

procesu. Prijavljeni biotehnološki procesi za produkciju ramnolipida su: “(fed-) batch” kultivacija pod uslovima koji ograničavaju rast, “batch” kultivacija u uslovima kada ćelije miruju (“resting cells”), polu-kontinualna produkcija sa imobilizovanim ćelijama (isključivanje bilo kakvog izvora azota), kontinualna kultivacija i produkcija sa slobodnim ćelijama i fermentacija u čvrstom stanju (“solid state fermentation”), (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).

1.5.1. Nutritivni faktori koji utiču na produkciju ramnolipida - izvori ugljenika i azota

Ramnolipidi su sekundarni metaboliti, pa se stoga njihova produkcija poklapa sa ulaskom bakterijske populacije u stacionarnu fazu (Soberon-Chavez *et al* 2005). Zbog toga su, za indukciju sinteze ramnolipida u biotehnološkom procesu, potrebni odgovarajući uslovi u smislu nutrijenata, pa se u tu svrhu ograničavaju azot, fosfor i multivalentni joni (Mg, Ca, K, Na i soli “trace” elementi u podlozi) u kombinaciji sa viškom izvora ugljenika (Abdel-Mawgoud *et al* 2011; Chayabutra *et al* 2001; Soberón-Chávez *et al* 2005).

Produkcija ramnolipida moguća je iz mnogih izvora ugljenika koji podržavaju bakterijski rast, pri čemu biljna ulja (sojino, kukuruzno, maslinovo, suncokretovo i ulje uljane repice) daju najveću produktivnost. Do sada su prijavljeni brojni produkcionni procesi koji koriste širok spektar prirodnih i petrohemijskih izvora ugljenika (biljan ulja, ugljeni hidrati, glicerol, ugljovodonici), (Abdel-Mawgoud *et al* 2011; Chayabutra *et al* 2001; Soberón-Chávez *et al* 2005). Sa druge strane, ako je reč o izvoru azota nitrat se smatra najboljim za produkcije ramnolipida (Desai and Bant 1997). Takođe, osim izbora izvora ugljenika i azota, odnos C/N ima veliki uticaj na ukupnu produkciju ramnolipida (Santa Anna *et al* 2002; Soberón-Chávez *et al* 2005).

1.5.2. *Produkcija ramolipida iz obnovljivih izvora - ekonomske alternative koje obećavaju*

Skoro svi surfaktanti koji se trenutno koriste su derivati nafte. Ipak, interes za mikrobne surfaktante se stalno povećava uzimajući u obzir njihovu ravnopravnost, ekološku prirodu, mogućnost dobivanja pomoću fermentacije i njihovu potencijalnu primenu u zaštiti životne okoline, sekundarnoj eksploataciji nafte, medicini, farmaceutskoj, prehrambenoj i agroindustriji (Desai and Bant 1997).

Proizvodna ekonomija je najvažnije "usko grlo" vezano za produkciju biosurfaktanata, što je slučaj i sa većinom ostalih biotehnoloških procesa. Često količina i tip sirovina mogu značajno da doprinesu troškovima proizvodnje, a procenjuje se da one čine 10-30% ukupnih proizvodnih troškova u većini biotehnoloških procesa. Da bi se prevazišao ovaj problem i mikrobni surfaktanti postali konkurencija sintetskim, potrebno je koristiti jeftine sirovine i efikasne mikrobne proizvođače (Maneerat 2005). Jedna od mogućnosti koja se intenzivno ispituje je korišćenje jeftinih sirovina iz poljoprivredne industrije kao supstrata za produkciju mikrobnih surfaktanata, čime se u isto vreme rešava i problem odlaganja otpada (Muthusamy *et al* 2008).

Sirove materije ili otpad kao što je "soap stock", tečnost nakon otečnjavanja kukuruza ("corn steep liquor"), melasa i nerafinisana biljna ulja su obećavajući izvori ugljenika. S druge strane, to nije slučaj za izvore azota. Elementarni, neorganski izvori poput amonijaka, nitrata ili uree su generalno jeftinije od složenih izvora kao što ekstrakt kvasca, kolač od sojinog ulja ("soyabean meal") ili kazein, sa izuzetkom za tečnost nakon otečnjavanja kukuruza, koja ulazi u sastav mnogi podloga u industrijskoj proizvodnji i odličan je izvor organskog azota (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).

Korišćenje različitih otpadnih materija kao supstrata za proizvodnju ramolipida je već prijavljeno (OOME - Olive Oil Mill Effluent, ulje nakon

prženja, "soap stock", slobodne masne kiseline i otpad destilerija), (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).

1.5.3. Primeri produkcije ramnolipida pomoću sojeva *P. aeruginosa*

U tabela 1.5. su prikazani primeri produkcije ramnolipida. Tabela pokazuje da su glukoza, glicerol i biljna ulja u kombinaciji sa mineralnim izvorom azota česti supstrati za produkciju (Robert *et al* 1989; Sannta Ana *et al* 2002; Rashedi *et al* 2006). Osim pomenutih, u literaturi se navodi i niz drugih izvora ugljenika u kombinaciji sa neorganskim, organskim ili kombinovanim izvorima azota. Tako su Dubey i Juwarkar (2001) su gajili *P. aeruginosa* BS2 u suruci tokom 48h sa prinosom od 0,92 g/l. Patel i Desai (1997) su koristili melasu i tečnost nakon otečnjavanja kukuruza kao primarni izvor ugljnika i azota za produkciju ramnolipida *P. aeruginosa* GS3 i postigli prinos od 0,25 g/l. Mercade i saradnici (1993) su pokazali da *Pseudomonas sp.* JAMM može da redukuje površinsku aktivnost u podlozi sa OOME (Olive Oil Mill Effluent, 100 g/l) i NaNO₃ (2,5 g/l), dajući prinos od 14 g ramnolipida po kg OOME nakon 150 h gajenja. Haba i saradnici (2000) su koristili maslinovo i suncokretovo ulje nakon prženja za produkciju biosurfaktanata pomoću 36 izolovanih sojeva. Najveći broj ispitanih sojeva *P. aeruginosa* je pokazao zadovoljavajući rast na oba izvora. Jedan od ispitivanih sojeva dao je finalni prinos od 2,7 g/l. Rahman i saradnici (2002) su ispitivali produkciju ramnolipida pomoću dva soja *P. aeruginosa* GS9-119 i DS10-129 korišćenjem jeftinih izvora ugljenika i mineralnog izvora azota. Najveći prinos je dao soj DS10-129 na sojinom ulju kao izvoru ugljenika od 4,31 g/l, a solidna podukcija od 2,98 i 1,77 g/l postignuta je korišćenjem suncokretovog ulja i glicerola, redom. Benincasa i saradnici (2002) su ispitivali soj *P. aeruginosa* LBI, koji je izolovan iz zemljišta kontaminiranog naftom, a koji je produkovao ramnolipide "batch" fermentacijom u mineralnoj podlozi sa rastvorom sapuna (soap stok) kao izvorom ugljenika. Maksimalna produkcija biosurfaktanta je bila 12 g/l. U studiji Coste i saradnika (2006) ispitivana je produkcija ramnolipida pomoću soja *P. aeruginosa* LBI na različitim

biljnim uljima poreklom iz Brazila, kao izvorom ugljenika, dok je kao izvor azota korišćena kombinacija mineralnog i organskog izvora (natrijum nitrat i ekstrakt kvasca). Najbolji prinosi ramnolipida su dobijeni za ulje brazilskog lešnika i ulje "passon fruit", 9,9 g/l i 9,2 g/l, redom. Iz tabele se vidi da prinosi ramnolipidnog surfaktanta variraju, što zavisi od produkcionig soja i fermentacionih uslova. Takođe, važno je napomenuti su svi sojevi, prikazani u tabeli 1.5. nativni, pa se dobijena osnovna produkcija ramnolipida može povećati nekim od genetičkih manipulacija.

Tabela 1.5. Produkcija ramnolipida iz različitih izvora ugljenika i azota

Produkcioni soj	Izvori ugljenika i azota	Prinos ramnolipida, g/l	Reference
<i>P. aeruginosa</i> MM1011	glukoza, NaNO ₃	1,20	Tahzibi <i>et al</i> 2004
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	glukoza, NaNO ₃ , ekstrakt kvasca	7,65	Robert <i>et al</i> 1989
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	maslinovo ulje, NaNO ₃ , ekstrakt kvasca	7,65	Robert <i>et al</i> 1989
<i>Pseudomonas</i> sp. JAMM	OOME, NaNO ₃	1,40	Mercade <i>et al</i> 1993
<i>P. aeruginosa</i> GS3	Melasa i tečnost nakon otečnjavanja kukuruza	0,25	Patel and Desai 1997
<i>Pseudomonas</i> 47T2 NCBI 40044	Suncokretovo ulje nakon prženja, NaNO ₃	2,70	Haba <i>et al</i> 2000
<i>P. aeruginosa</i> LBI	"Soap stock", NaNO ₃	12,00	Benincasa <i>et al</i> 2002
<i>P. aeruginosa</i> DS10-129	Sojino ulje, mineralane soli	4,31	Rahman <i>et al</i> 2002
<i>P. aeruginosa</i> PA1	Glicerol, NaNO ₃	3,16	Santa Anna <i>et al</i> 2002
<i>P. aeruginosa</i> AT10	Ostaci sojinog ulja, mineralne soli	16,50	Haba <i>et al</i> 2003a
<i>P. aeruginosa</i> BS2	Otpad destilerije, surutka	0,92	Dubey and Juwarker 2001
<i>P. aeruginosa</i> LBI	Ulje brazilskog lešnika, NaNO ₃ , ekstrakt kvasca	9,90	Costa <i>et al</i> 2006
<i>P. aeruginosa</i> HR	Glicerol, NaNO ₃	4,20	Rashedi <i>et al</i> 2006
<i>P. aeruginosa</i> NY3	Glukoza, pepton, NH ₄ Cl	0,27	Nie <i>et al</i> 2010
<i>Pseudomonas</i> sp. 2B	Melasa, pepton, NH ₄ Cl	4,97	Aparna <i>et al</i> 2012

Literaturni podaci pokazuju da je produkcija ramnolipida moguća iz prostih izvora ugljenika (glicerol i glukoza), u kombinaciji sa mineralnim izvorom azota ili kombinovanim izvorom azota ili kompleksnih izvora ili industrijskog otpada kao izvorom ugljenika (surutka, melasa, tečnost nakon otečnjavanja kukuruza, maslinovo i suncokertovo ulje, ulje nakon prženja...) sa mineralnim, organskim ili kombinovanim izvorom azota.

Produkcija ramnolipida primenom obnovljivih izvora ugljenika kao što su nus-produkti industrije i agroindustrijski otpad daje mogućnost da se ostvari ekonomična proizvodnja i smanje troškovi procesa.

1.6. Metode za karakterizaciju ramnolipidnih smeša

1.6.1. Hidrofilno-lipofilni balans

Jedan od načina da se predvide potencijalne osobine biosurfaktanta može biti određivanje vrednost hidrofobno-lipofilnog-balansa (HLB), (Müller *et al* 2012). Vrednost HLB varira između 0 i 20, a po Griffin-u HLB se izračunava na osnovu jednačine:

$$\text{HLB} = 20 * (\text{MW}_{\text{HP}}/\text{MW}_{\text{SA}}),$$

gde je MW_{HP} molekulska masa hidrofobnog dela molekula, a MW_{SA} molekulska masa celog površinski aktivnog jedinjenja (Griffin 1954). Vrednost HLB omogućava predviđanje osobina molekula koji ima karakteristike surfaktanta. U tabeli 1.6. su sumirane karakteristike jedinjenja na osnovu HLB vrednosti. Važno je napomenuti da, iako struktura i HLB vrednost dozvoljavaju određivanje osobina surfkatanata, za pouzdane rezultate je potrebna detaljna karakterizacija pomoću različitih analitičkih metoda (Müller *et al* 2012).

Tabela 1.6. HLB vrednosti po Griffin-u (1954) i respektivno predviđene osobine surfaktanta (Müller *et al* 2012)

HLB vrednost	Predviđene osobine
0-3	Anti-penušajući agensi
4-6	W/O emulzeri *
7-9	Kvaseći agensi
8-18	O/W emulzeri**
13-15	Tipični detergenti
10-18	Rastvarači ili hidrotopi

*"Voda u ulju" (Water in Oil) emulzeri; ** "Ulje u vodi" (Oil in Water) emulzeri

1.6.2. Analitičke metode

Kao biotehnološki proizvod koji obećava, ramolipidi su najproučavaniji biosurfaktanti. Godinama se radi na razvoju i usavršavanju metoda i tehnika za izolovanje sojeva producenata i analizu raznovrsnih ramnolipidnih homologa i formi (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).

1.6.2.1. Kolorimetrijske metode

Najčešće korišćeni kvalitativni metod za "skrining" produkujućih bakterijskih sojeva je cetiltrimetilamonijum-bromid (CTAB) metilensko plavo agar test. U ovoj metodi ramnolipidni anjon formira nerastvorni kompleks sa katjonskom CTAB soli, koji se detektuje pomoću metilen plavog, prisutnom u agaru. RL produkujući sojevi se uočavaju kao kolonije uokvirene plavim prstenom što omogućava brzu identifikacija prisustva ramnolipida (Abdel-Mawgoud *et al* 2011; Pinzon and Ju 2009).

1.6.2.2. Hemolitički test

Drugi direktni način detekcije RL je zasnovan na njegovim hemolitičkim svojstvima (Abdel-Mawgoud *et al* 2011). Ova metoda se zasniva na lizi suspenzije eritrocita u koju se dodaje RL. Nakon određenog vremena eritrociti

se odvajaju centrifugiranjem i meri se oslobođeni Hb u rastvoru na 540 nm (Johnson and Boese-Marrazzo 1980). Kako, međutim, bakterija ima i druge hemolitičke faktore kao što su proteaze, ovo je manje pouzdan metod i može dati lažno pozitivne rezultate i manje je pouzdan od testa koji je baziran na tenzioaktivnim svojstvima ramnolipida.

1.6.2.3. Test kolapsa kapi i površinska aktivnost

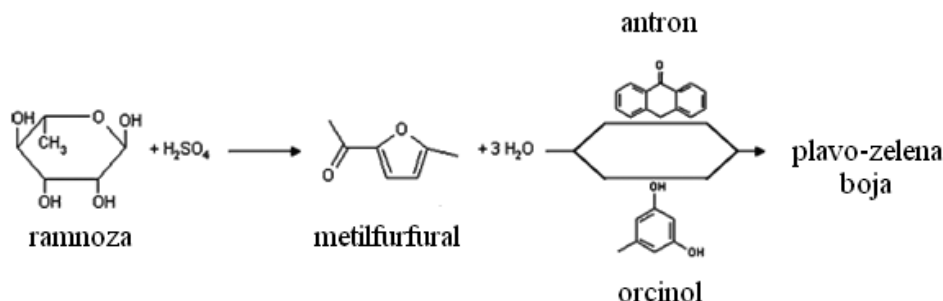
Test kolapsa kapi je osetljiva metoda za brzo skeniranje produkcije RL u raznim izolatima. Test je jednostavan i sastoji se od nanošenja kapi supernatanta bakterijske kulture na polistirensku ploču na kojoj je bunarić prekriven uljem. Kap će se raširiti preko ulja jedino ukoliko je prisutan surfaktant (Jain *et al* 1991). Sličan pristup je test širenja kapi kada se kap supernatanta stavlja na vrh kontakta vode i ulja (Morikawa *et al* 2000).

Precizniji pristup, zasnovan na površinskoj aktivnosti RL, je direktno merenje površinske aktivnosti u fermentacionoj tečnosti kada se određuje kritična micelarna koncentracija (Critical Micelle Concentration, CMC), koja je specifičana za svaki surfaktant. Mane ove metode su što traje duže, pa nije pogodana za brze "skrininge". Takođe, ostale prisutne tenzioaktivne vrste mogu da utiču na dobijene vrednosti.

1.6.2.4. Spektrofotometrija - Orcinolni test

Najčešće korišćeni metod za kvantifikaciju ramnolipida je orcinolni test. Za test se koristi ramnolipidni ekstrakt, izolovanim iz fermentacione tečnosti. Ovaj test se radi u prisustvu sumporne kiseline, a zasniva se na reakciji hidrolize ramnolipida, pri čemu nastali metilfurfural (ramnoza) reaguje sa orcinolom dajući plavo-zelenu boju čiji se intenzitet meri na 421nm (Chandrasekaran and BeMiller 1980; Koch *et al* 1991). Alternativni test se može raditi sa antronom, kada se apsorbancija meri na 625 nm (Hodge *et al* 1962), (slika 1.11.). Problem kod spektrofotometrijske kvantifikacije ramnolipida je što su ova jedinjenja kompleksne smeše raznih struktura, a takođe i same podloge

moгу sadržati interferirajuće komponente, pa se ove metode koriste obično samo za praćenje dinamike produkcije ramnolipida (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).



Slika 1.11. Reakciona shema orcinol/antron testa (Heyd *et al* 2008).

1.6.2.5. Analitička i preparativana tankoslojna hromatografija (TLC)

Ramnolipidi mogu biti prečišćeni prostom ekstrakcijom, koja se zasniva na kiseloj precipitaciji (pomoću HCl), koja je praćena ekstrakcijom smešom organskih rastvarača hloroforma i metanola (2:1). Ramnolipidi dobijeni na ovaj način moraju biti dalje prečišćeni u cilju razdvajanja komponenti smeše. Jedan od načina je TLC. Sa polarne stacionarne faze (slika gel) RL se eluiraju sa relativno polarnom mobilnom fazom, kao što je smesa hloroform: metanol: 20% sirćetna kiselina (65: 15: 2), (Koch *et al* 1991). Ovaj pristup omogućava separaciju mono- od polarnijih di-ramnolipida. Alternativni, reverzni TLC ima za stacionarnu fazu hidrofobni C8 matriks koji se eluira sa metanol:voda:trifluor sirćetna kiselina (90:10:0.25), (de Koster *et al* 1994). U ovom pristupu se forme RL odvajaju po dužini alkil lanaca masne komponente. Razdvojene faze se mogu detektovati orcinolnim testom, koji se koristi za šećernu komponentu ili sa testom specifičnim za masne kiseline (Mechaly *et al* 1997) na TLC-u. Takođe, moguće su denzitometrijske analize, ali one nisu dovoljno osetljive (Matsufuji *et al* 1997). Alternativa je direktna analiza RL eluiranih sa TLC ploča, masenom spektrometrijom (MS), (de Koster *et al* 1994). Iako je ova metoda dobra za

strukturne informacije, nije pogodna za kvantifikaciju (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).

1.6.2.6. Gasna hromatografija (GC)

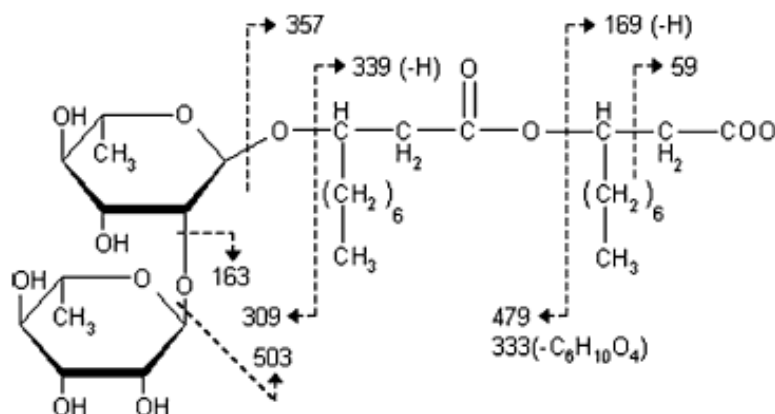
Zbog relativno velikih molekulskih masa (300 – 1000 Da), ramnolipidi ne mogu biti direktno analizirani gasnom hromatografijom (Abdel-Mawgoud *et al* 2011). Zbog toga se pre analize ramnolipidi hidrolizuju pomoću kiselina ili jakih baza, kiselina komponenta se zatim modifikuje u metil estre (Van Dyke *et al* 1993) i opcionalno hidroksilna grupa dalje transformiše u trimetilsilil (TMS) etar. Ramnoza može biti analizirana kao TMS derivat (Arino *et al* 1996). Različite 3-hidroksi masne kiseline mogu biti identifikovane i kvantifikovane korišćenjem FID (flame ionization detection) ili MS-om. Glavni nedostatak sa GC analizama je nemogućnost uočavanja veze između masnih kiselina kao i između šećerne i masne komponente (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).

1.6.2.7. Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) kuplovana sa masenom spektrometrijom

HPLC je veoma pogodna za analizu RL smeša. Analiza se izvodi korišćenjem C8 i C18 reverzno-faznih kolona sa voda-acetonitrilnim gradijentom. Kako, međutim, RL apsorbuju UV veoma kratke talasne dužine, njihova detekcija je veoma problematična. Iz tog razloga, RL se derivatizuju para-bromacetofenonom dajući odgovarajuće para-bromfenilacil estre, koji se mogu detektovati na 265 nm (Schenk *et al* 1995). Alternativno može se koristiti ELS (Evaporative Light Scattering detector), koji brzo uparava rastvarač i prati difrakciju snopa svetlost analitom (Noordman *et al* 2000). Za oba slučaja nedostatak je standard da se identifikuju brojne ramnolipidne forme u smeši. Ovi nedostaci se mogu prevazići korišćenjem MS detektora (Abdel-Mawgoud *et al* 2011).

Direktno kuplovanje reverzno-fazne HPL hromatografije sa masenim spektrometrom omogućava karakterizaciju date RL forme prema retencionom

vremenu (R_t) zajedno sa njegovim MS profilom. Za jonizaciju RL se obično koriste ESI (Electrospray Ionization) i ponekad APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), (Benincasa *et al* 2004; Déziel *et al* 1999, 2000; Haba *et al* 2003a; Monteiro *et al* 2007). U negativnom ESI molekulska masa pseudomolekularnog jona $[M-H]^-$ ramnolipida se može direktno dobiti. U cilju efikasnije jonizacije u gradijentnu smešu se dodaje amonijum acetat (Déziel *et al* 1999, 2000).



Slika 1.12. Potencijalna mesta za frakcionisanje Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ pomoću masene spektometrije (Heyd *et al* 2008).

Fragmentacija pseudomolekularnog jona korišćenjem MS-MS analize roditeljskog jona daje detaljne strukturne informacije (slika 1.12.). Ovakav pristup omogućava razlikovanje izomera (na primer Rha-C₈-C₁₀ i Rha-C₁₀-C₈) koji hromatografski ne mogu biti razdvojeni (Déziel *et al* 1999). Mogućnost predikcije eluiranog jedinjenja na datom R_t omogućava kvantifikaciju jedinjenja čak i kada nemamo čist standard (Déziel *et al* 1999). U okviru iste grupe RL, faktor molarog odgovora je veoma sličan, pa je zbog toga moguća kvantifikacija svih članova takve grupe, ukoliko je prečišćen samo jedan član. Kvantifikacija prisutnih formi se izvodi integracijom intenziteta pikova koji se pojavljuju u određenom R_t na hromatogramu odgovarajućih pseudomolekularnih jona. Drugi pristup može biti MS-MS eksperiment u kome se pseudomolekularno jon fragmentiše, nakon čega se prate njegovi fragmenti.

Ovaj analitički pristup je označen kao MRM (Multiple Reaction Monitoring) i omogućava povećanje "signal-noise" odnosa u analizi što daje veću osjetljivost (Abdel-Mawgoud *et al* 2011). Da bi se uradila kvantifikacija ramnolipida, dodaje se interni standard, kao što je 16-hidroksiheptadekanska kiselina, da bi se kompenzovala razlike u efikasnosti jonizacije od uzorka do uzorka (Dézziel *et al* 2000).

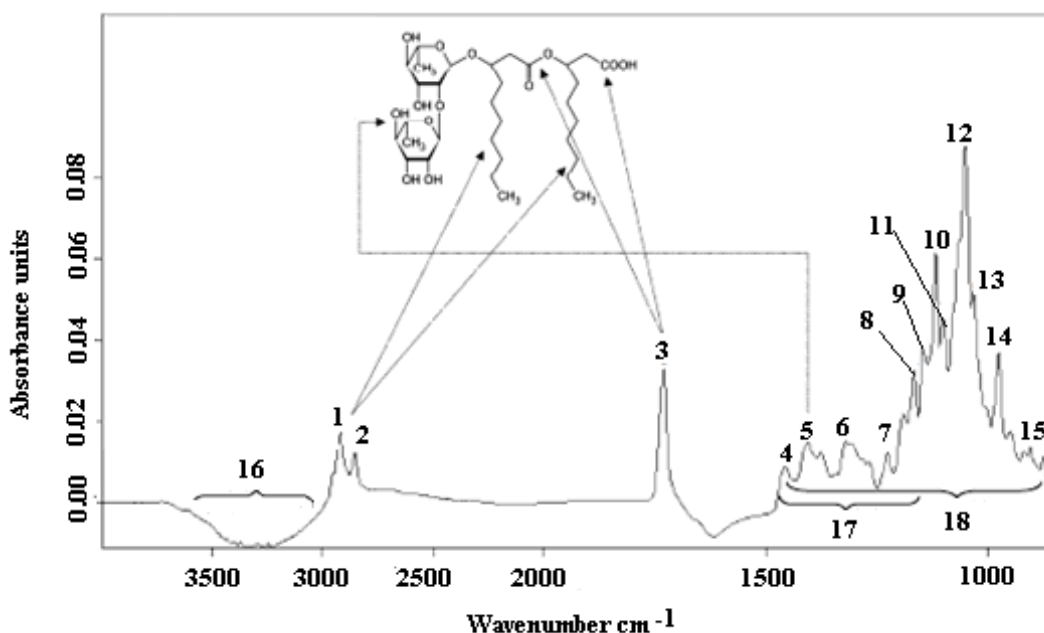
1.6.2.8. MALDI-TOF

MALDI-TOF MS pristup je razvijen za "high-throughput skrining" smeša ramnolipida. Mono-ramnolipid i di-ramnolipidi se razlikuju po karakteristikama adukata molekulskih jona, $[M+Na]^+$, $[M-H+2Na]^+$ i $[M+K]^+$. Takođe, uočeni su deuterisani $[M+Na-4_1H+4_2H]^+$ i $[M+Na-6_1H+6_2H]^+$ joni za mono- i di- ramnolipide, redom, što omogućava brzu identifikaciju ovih molekula. MALDI-TOF može biti kombinovan sa GS, HPLC ili 1D i 2D NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroskopijom, kada omogućava brzu detekciju različitih ramnolipida i ima potencijal za korišćenje u selektivnoj identifikacije novih mikrobnih surfaktanata. Nedostatak MALDI-TOF i pomenutih kombinacija je što nema mogućnost razlikovanja strukturnih i pozicionih izomera (na primer Rha-C₈-C₁₀ i Rha-C₁₀-C₈ ili Rha-C₁₀-C₁₄ i Rha-C₁₄-C₁₀ i Rha-C₁₂-C₁₂) i kvantifikacije prisutnih formi (Price *et al* 2009).

1.6.2.9. Infracrvena spektroskopija (IR)

Klasični metod u strukturnim analizama je IR spektroskopija (Abdel-Mawgoud *et al* 2011). Zračenje molekula IR svetlošću indukuje oscilacije hemijskih veza na karakterističnim frekvencama, kada dolazi do apsorpcije energije. Dobijena transmisija zračenja se meri u frekvencionom spektru od 400 do 4000 cm⁻¹. "Fingerprint" oblast od 400 do 1500 pokazuje deformacije veza koje su karakteristične za svaki molekul i omogućava identifikaciju iz spektralnih tabela. Osim FTIR transmisionih spektara danas se koriste sve više

FTIR atenuirana totalna refleksijska spektroskopija (ATR), (Heyd *et al* 2008), (slika 1.13.)



Slika 1.13. TR-FTIR spektar vodenog rastvora ramnolipida Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ sa označenim karakterističnim grupama i oblastima apsorpcije: 1 - C-H istezanje asim. (aciklično); 2 - C-H istezanje sim. (aciklično); 3 - C-O istezanje; 4, 7, 15 - C-H deformacija; 5 - C-H/O-H deformacija; 6 - O-H deformacija u ravni; 8, 10, 11, 12, 13 - C-O istezanje, 9 - C-C sudaranje; 14 - CH₃ sudaranje; 16 - H₂O vodonične veze; 17 - C-H i O-H deformacije ugljenih hidrata (1480 - 1200 cm⁻¹); 18 - "Fingerprint", (Leitermann *et al* 2008).

1.7. Bioremedijacija - primena ramnolipida dobijenih pomoću *P. aeruginosa* značajna za ekosisteme

Bioremedijacija obuhvata širok spektar pristupa zagađenoj sredini od jednostavnog praćenja stanja do tretiranja zagađenog mesta (Maier and Soberon-Chávez 2000). Prirodno ublažavanje ("natural attenuation") kontaminacije je unutrašnja karakteristika sistema da sam smanji zagađenost, kada je potrebno samo praćenje stanja sredine. Ubrzano ublažavanje kontaminacije ("accelerated attenuation") podrazumeva dodatak nutrijenata,

elektron akceptora ili agenasa koji pojačavaju stepen remedijacije (Maier and Soberon-Chávez 2000). Mnogi surfaktanti, a pogotovo ramnolipidi, su pokazali potencijal za primenu u procesima bioremedijacije kao što su: biodegradacija organskih jedinjenja, biodegradacija sredina ko-kontaminirama metalima i organskim jedinjenjima, kao ispirajući agensi organskih jedinjenja ili metala, agensi za biološku kontrolu (Maier and Soberon-Chávez 2000). Takođe *P. aeruginosa* kao producenti biosurfaktanata, našli su primenu u bioremedijaciji kao što su sekundarna i tercijarne eksploatacije nafte (oil recovery), deemulzifikaciji naftnih emulzija i biosorpcija teških metala (Singh *et al* 2007, 2010).

1.7.1. Primena ramnolipida u bioremedijaciji

1.7.1.1. Biodegradacija organskih jedinjenja

Stepen biodegradacije kontaminacije (u ovom slučaju različitih organskih jedinjenja) prisutne u zemljištu zavisi od njene biodostupnosti mikroorganizmima, koja je pod uticajem faktora kao što su desorpcija, difuzija i nerastvorljivost (Singh *et al* 2007), što postavlja pitanje usvajanja hidrofobnih organskih jedinjenja. Predloženi načini ulaska hidrofobnih molekula u ćeliju za srednje ili dugolančane *n*-alkane je da bakterija dolazi do njih ili pomoću surfaktant-olakšanih procesa (emulzifikacije ili solubilizacije) ili direktno preko interakcije sa kapima ugljovodonika (surfaktantima-posredovano povećanje hidrofobnosti površine ćelije), (Abdel-Mawgoud *et al* 2010). U ovim smislu ramnolipidi su intenzivno proučavani zbog njihove sposobnosti da posreduju u asimilaciji hidrofobnih supstrata, kao što su ugljovodonici, u tečnim kulturama (Beal and Betts 2000; Koch *et al* 1991; Noordman and Janssen 2002) i da pojačavaju biodegradaciju slabo rastvornih molekula tako što dovode do izmena na površini ćelije (Al-Tahhan *et al* 2000; Shreve *et al* 1995; Zhang and Miller 1994).

U studiji koju su uradili Cameotra i Singh (2008) praćena je bioremedijacija uljanog mulja korišćenjem autogenog biosurfaktanta koga je produkovao *Pseudomonas* sp. konzorcijum izolovan iz zemljišta zagađenog

uljanim muljem. Biosurfaktant koji je produkovan je identifikovan kao smeša 11 RL struktura, a rezultati koji su postignuti su bili da je 91% ugljovodoničnog sadržaja u zemljištu uklonjeno u toku pet nedelja. Studija je potvrdila da sirovi biosurfaktant ima potencijal za primenu u bioremedijaciji ugljovodonika.

U studiji koju su sproveli Noordman i Jansen (2002) praćena je razgradnja haksadekana sa i bez prisustava spolja dodatog biosurfaktanta pomoću pet izolata koji su proizveli biosurfaktante (među kojima je bio i soj *P. aeruginosa* UG2). Između ostalog pokazano je da je degradacija heksadekana pomoću *P. aeruginosa* UG2 bila stimulirano samo u slučaju da je korišćen biosurfaktant koji proizvodi taj mikroorganizam, što je ukazalo da način usvajanja heksadekana različit od ostalih mikroorganizama.

Efikasnost biosurfaktanta u bioremedijaciji zemljišta zagađenog naftom potvrdili su Das i Mukherjee (2007), korišćenjem tri soja koja su proizveli biosurfaktanta: *Bacillus subtilis* DM-04, *P. aeruginosa* M i *P. aeruginosa* NM (svi sojevi su izolovani iz zemljišta kontaminiranih naftom).

Smatra se da biodegradacije pomoću ramnolipida može imati dva mehanizma. Prvi je da ramnolipidi, zbog svojih fizičko-hemijskih svojstava, povećavaju rastvorljivost ugljovodonika i samim tim i njihovu biodostupnost (Sherve *et al* 1995). Drugi mehanizam bi mogao biti preko interakcije sa ćelijom, čime njena površina postaje hidrofobnija i na taj način lakše interaguje sa hidrofobnim supstratima (Sherve *et al* 1995, Zhang and Miller 1994). Proučavanjem mehanizma interakcije ramnolipida i površine ćelija *P. aeruginosa* uočeno je da ramnolipidi dovode do toga da ćelije gube lipopolisahardini (LPS) deo zida, koji je važna hidrofilna komponenta, zbog čega površina ćelije postaje hidrofobnija (Al-Tahhan *et al* 2000). Dalja istraživanja su pokazala da je drugi mehanizam važniji za procese *in situ* bioremedijacije, iz razloga što su velike količine ramnolipida potrebne za povećanje hidrofilnosti ugljovodonika, dok su male količine potrebne da se naruši struktura površine ćelije (Maslin and Maier 2000). Ovo je važno zbog toga što ramnolipidi mogu biti izvor ugljenika za bakteriju, pa bi dodatak velike količine biosurfaktanta mogao dovesti do

supresije degradacije. Takođe, usled dodatka velike količine ramnolipida moglo bi doći do velike pokretljivosti ugljovodonika i samim tim i do širenja kontaminacije (Maier and Soberon-Cháves 2000).

Jedna od novijih studija razmatra tri mehanizma interakcije između mikroorganizma i ugljovodonika (Franezetti *et al* 2010): pristup ugljovodonicima rastvorljivim u vodi, direktni kontakt ćelije sa velikim uljanim kapima i kontakt sa pseudorastvorljivim ili emulgovanim uljima. Dodatno, studija o mehanizmu usvajanja *n*-alkana od strane *P. aeruginosa* ukazuje na bitnu ulogu ramnolipida u procesima internalizacije ugljovodnika u ćeliju radi postupne degradacije (Cameotra and Signh 2009). Ipak, iako se mnogo istraživača bavi ulogom biosurfaktanata u degradaciji jedinjenja koja su nerastvorna u vodi, mnogi aspekti tih procesa još uvek ostaju nerazjašnjeni (Das and Chandran 2011).

Veliki broj studija je potvrdio da ramnolipidi imaju efekat na biodegradaciju ugljovodonika, bilo da se govori o alifatičnim ili aromatičnim strukturama (Miller 1995a). Dodatno je pokazano da dodatak ramnolipida čistim kulturama pojačava razlaganje heksadekana, oktadekana, *n*-parafina i fenatantrena (Shreve *at al* 1995; Zhang and Miller 1994, 1995), kao i da ramnolipidi pojačavaju razlaganje u zemljištu u sistemima koji sadrže heksadekan, tetradekan, pristan i kreozot kao i smeše ugljovodonika (Jain *et al* 1992). Takođe, u literaturi se navodi da dodati ramnolipidi mogu i inhibirati procese degradacije. Bilo da se radi o pojačavanju ili inhibiranju degradacije, smatra se da efekat zavisi od karakteristika roda čija kultura se primenjuje (Zhang and Miller 1994). Ipak, treba naglasiti da efekat dodatka biosurfaktanta varira od soja do soja, a kao potencijali razlog inhibicije biodegradacije se navodi da sami ramnolipidi mogu biti favorizovani kao izvor ugljenika (Maslin and Maier 2000).

1.7.1.2. Biodregradacija organskih jedinjenja u sredinama ko-kontaminiranim metalima i organskim jedinjenjima

Utvrđeno je da je oko 37% sredina koje su kontaminirane organskim jedinjenjima dodatno kontaminirano i metalima (Kovalick 1991). Prisustvo toksičnih metala kao što su olovo, kadmijum, arsen može dovesti do inhibiranja procesa degradacije organskih jedinjenja (Baath 1989). Ramnolipidi su pokazali da mogu pojačati degradaciju organskih jedinjenja u takvim ko-kontaminiranim sistemima (Maier and Soberon-Cháves 2000). Jedna od prednosti u slučaju ko-kontaminiranih sistema je to što miroorganizmi koji produkuju biosurfaktante *in situ*, koriste organska jedinjenja kao supstrat za njihovu produkciju. Na taj način dolazi do razlaganja kontaminacije, a sa druge do snižavanja troškova biotehnološkog postupka.

Ramnolipidi su pokazali da mogu pojačati degradaciju organskih jedinjenja u sistemima koji su ko-kontaminirani metalima i organskim jedinjenjima, što je pokazano u studijama sa čistim kulturama sa kadmijumom i naftalenom (Sandrin *et al* 2000) i na primeru dva kontaminirana zemljišta u kome su bili prisutni kadmijum i fentantren (Maslin and Maier 2000). U testovima sa kontaminiranim zemljištem biodegradacija je trajala 8-12 dana, a dodavanje ramnolipida u nekoliko porcija omogućilo je da stepen biodegradacije fenantrena bude praktično identičan kao u zemljištu u kome nije bio prisutan kadmijum. Takođe, studija o simultanoj redukciji Cr (IV) i degradaciju fenola u *in vitro* uslovima pomoću *P. aeruginosa*, pokazala se kao dobar način za redukciju toksičnosti metala i degradaciju organskih jedinjenja u mineralnoj tečnoj podlozi (Song *et al* 2009)

1.7.1.3. Ramnolipidi kao agensi za ispiranje

1.7.1.3.1. Ramnolipidi kao agensi za ispiranje organskih jedinjenja

Ramnolipidi su proučavani kao aditivi za ispiranje i spiranje zemljišta. U nekim slučajevima kada je proces bioremedijacije spor ili nepotpun potrebno je *ex situ* pranje zemljišta ili *in situ* ispiranje zemljišta, procesi poznati kao “pump and treat” (Maier and Soberon-Cháves 2000). Ovo se odnosi na dva tipa organskih jedinjenja NAPL (nonaqueous phase liquids, tj nevodene tečne faze), ako što su nafta i hlorovani rastvarači i PAH (poliaromatični ugljovodonici, tj. organska jedinjenja u čvrstoj fazi), (Maier and Soberon-Cháves 2000). U oba slučaja uklanjanje samo vodom je nemoguće zbog slabe rastvorljivosti NAPL i PAH jedinjenja. Iz tog razloga se krenulo sa istraživanjima vezanim za aditive, kao što su surfaktanti, koji bi povećali rastvorljivost. U odnosu na sintetske surfaktante, koji su prvo istraživani, biosurfaktanti su se, zbog biodegradabilnosti i netoksičnosti, pokazali kao pogodniji za primenu u ekološkom smislu.

Za NAPL jedinjenja, dodatak surfaktant može povećati spiranje ili mobilizaciju NAPL, koje ima za rezultat da smanjenje interfacijlane tenzije između rastvora surfaktanta i NAPL jedinjenja ili povećanje rastvorljivosti NAPL jedinjenja. Iz tog razloga je bitno da surfaktant koji se dodaje ima dobar kapacitet za solubilizaciju koji se izražava kroz molarni solubilizacioni odnos (MSR, molar solubilisation ratio) i/ili da može da redukuje interfacijalnu tenziju (Maier and Soberon-Cháves 2000). U studijama u kojima su poređeni ramnolipidi i sintetski surfaktant, ramnolipidi su pokazali 20 puta veći kapacitet za solubilizaciju heksadekana (grupa jedinjenja NAPL) u odnosu na alkil-sulfonate (Thangamani and Sherve 1994), kao i efikasnije uklanjanje heksadekana iz zemljišta (20%) u odnosu na Tween 80 (6%), (Bai *et al* 1997). Slični, obećavajući rezultati su dobijeni u studijama sa ramnolipidima i PAH jedinjenjima. Tako je pokazano da je MSR za ramnolipid-oktadekan bio 10 puta veći nego za Triton X 114-oktadekan (Miller *et al* 1995a) i 5 puta veći u odnosu

na MRS Corexit 0600–oktadekan (Thai and Maier 1992). U eksperimentima vezanim za uklanjanje smeša ugljovodonika iz zemljišta ramnolipidi su se pokazali kao efikasniji u odnosu na Tween 60 i Triton X-100, za sve ugljovodonike (Scheibenbogen *et al* 1994). Smeša je sadržala piren, fenantren, naftalen, heksadekan, oktadekan, prestan, undekan i pentadekan. Takođe, ramnolipidi su se pokazali kao pogodni za uklanjanje fenantrena, pirena i polihlorovanih bifenila i različitih PAH jednjenja iz zemljišta (Maier and Soberon-Cháves 2000).

1.7.1.3.2. Ramnolipidi kao agensi za ispiranje metala

Kao što je već napomenuto u odeljku 1.7.1.2. sredina može biti kontaminirana samo metalima ili kombinacijom metala i organskih jedinjenja, a u oba slučaja često je potrebno ukloniti toksične metale iz kontaminiranog mesta. Različiti agensi su pokazali sposobnost da kompleksiraju metale, pri čemu je osim kompleksiranja metala bitno da agens bude i ekološki kompatibilan (Maier and Soberon-Cháves 2000, Miller 1995b). Efikasnost kompleksiranja se izražava pomoću konstante stabilnosti kompleksa metal-ligand. U tabeli 1.8. su prikazane konstante stabilnosti za neka prirodna i sintetska jedinjenja koja su predložena za primenu remedijacije metala. Jedinjenja kao što su DTPA (dietilentriamin-penta sirćetna kiselina), EDTA (etilen-diamin-tetrasirćetna kiselina) i NTA (nitrilotrisirćetna kiselina) su pokazala kao veoma efikasna u kompleksiranju metala, na što ukazuju visoke konstante stabilnosti, ali je njihova primena disuktabilna, jer su pokazali toksične osobine (Maier and Soberon-Cháves 2000). Naime, NTA i DTPA se smatraju kancerogenima, a EDTA i DPTA su pokazali toksični efekat u simislu heliranja mangana, cinka i gvožđa koji su prisutni u živim sistemima. Takođe, jedan od problema je i nepotpuna degradabilnost pomenutih sintetskih agenasa za kompleksiranje. Sa druge strane, ramnolipidi, za koje je ranije testovima potvrđena netoksičnost (Maslin and Maier 2000), a su pokazali bolju sposobnost

kompleksiranja metala od jedinjenja prirodnog porekla (tabela 1.7.). Ramnolipid su pokazali veći afinitet prema raznim metalim kao što su: kadmijum, bakar, lantanijum, olovo i cink (Ochoa Loza *et al* 2001). Njihova primena za uklanjanje kadmijuma i lantanijuma je pokazana u eksperimentima sa "bench scale" kolonom (Torrens *et al* 1998), kao i uklanjanje cinka i bakra iz zemljišta koje je sadržalo oko 13% masnog sadržaja (Mulligan *et al* 1999). Takođe ramnolipid su se pokazali kao pogodni za kompleksiranje nikla i kadmijuma iz kontaminiranog zemljišta sa efikasnošću od 80-100% (Nielson *et al* 2003).

Tabela 1.7. Konstante stabilnosti različitih organskih liganada sa kadmijumom i olovom (Maier and Soberon-Chávez 2000)

Organski ligand	Prirodno ili sintetsko jedinjenje	Konstanta stabilnosti	
		Kadmijum	Olovo
DTPA	Sintetsko	19,00	18,66
EDTA	Sintetsko	16,36	17,88
NTA	Sintetsko	9,78	11,34
Ramnolipid	Prirodno	6,89	8,58
Oksalna kiselina	Prirodno	2,75	4,00
Limunska kiselina	Prirodno	2,73	4,08
SDS	Sintetsko	1,95	Nije određena
Sirćetna kiselina	Prirodno	1,56	2,15

Prema Milleru biosurfaktanti mogu pojačati desorpciju teških metala iz zemljišta na dva načina: 1. Kompleksiranje metala prisutanog u rastvoru u slobodnoj formi, što dovodi do snižavanja fazne aktivnosti rastvora metala, promovišući desorpciju po Le Chatelier-ovom principu i 2. Direktni kontakt biosurfaktanta i vezanog teškog metala na kontaktu čvrste i tečne faze u uslovima redukovane interfacijalnog napona, što dozvoljava biosurfaktantu da se akumulira u čvrstoj fazi, (Miller 1995b). Efekti primenjenog biosurfaktanta zavisi od mnogo faktora (sastav zemljišta, pH, kapacitet za izmenu katjona, veličina čestica, dužina izlaganja zagađenju i vrsta zagađenja, geološke karakteristike...), (Mulligan *et al* 2001a).

Juwaker i saradnici (2007) su u svojoj studiji na koloni proučavali sposobnost ramnolipida iz ekološkog soja *P. aeruginosa* BS2, da uklanja Cd i Pb iz kontaminiranog zemljišta. Soj primenjen u ovim eksperimentima je di-RL

produkujući soj. Rezultati su pokazali da di-RL uklanjanju ne samo slobodnu frakciju Cd i Pb već i vezane metale, za razliku od ispiranja tekućom vodom koje je uklanjalo samo mobilnu frakciju. Ispranje kontaminiranog zemljišta tekućom vodom je pokazalo da je približno 2,7 % kadmijuma i 9,8 % olova u kontaminiranom zemljištu u slobodnoj ili slabo vezanoj formi, dok je ispiranje ramnolipima uklonilo 92 % kadmijuma i 88 % olova nakon 36 h ispiranja. Ovo ukazuje da di-RL selektivno mobilizuje metale po redu $Cd > Pb$. Mikrobnja populacija prisutna u kontaminiranom zemljištu je bila u porastu nakon uklanjanja metal pomoću biosurfaktanta, što je pokazalo da biosurfaktant snižava toksičnost metala za mikrofloru zemljišta. Značaj ove studije je što je pokazala sa tehnologija zasnovana na biosurfaktantima može biti efikasan i nedestruktivan metod za bioremedijaciju zemljišta kontaminiranog kadmijumom i olovom.

Wang i Mulligan (2004) su se bavili proučavanjem primene principa sa penom ramnolipda ("rhamnolipid foam") za uklanjanje kadmijuma i nikla iz zemljišta. Rezultati su pokazali da korišćenje ove metode ima značajan efekat na mobilnost biosurfaktanta prilikom prolaska kroz poroznu podlogu i čini kontakt sa metalom uniformnijim i efikasnijim. Primena ovog pristupa je povećala efikasnost i omogućila uklanjanje 73,2% kadmijuma i 68,1% nikla, dok je sa običnim ramnolipidnim rastvorom uklonjeno 61,7% kadmijuma i 51% nikla.

U studiji Mulligana i saradnika (2001b) sa "batch washing" eksperimentima sa ramnolipidom iz *P. aeruginosa*, surfaktinom iz *B. subtilis* i soforolipidom iz *Torulopsis bombicola* urađeno je ispitivanje uklanjanja metala iz sedimenata koji su sadržali 110 mg/kg bakra i 3300 mg/kg cinka. Jedno ispiranje sa 0,5% ramnolipidom je uklonilo 65% Cu i 18% Zn, 4% soforolipida je uklonilo 25% Cu i 60% Zn. Surfaktin je bio manje efikasan i uklonio je 15% bakra i 6% cinka. Autori su predložili da se uklanjanje metala biosurfaktantima dešava kroz sorpciju surfaktanta na površinu zemljišta i kompleksiranje metala, što dovodi do oslobađanja metala iz čvrste faze zemljišta u rastvor i asocijaciju

sa micelama surfaktanta. Ramnolipid i surfaktin su uklonili organski vezan bakar, a soforolipid cink u formi karbonata i oksida. Dobijeni rezultati su pokazali da su biosurfaktanti primenljivi za ukaljanje teskih metala iz sedimenata, pri čemu su ramnolipidi imali najbolje rezultate za ukaljanje bakra.

1.7.1.4. Biološka kontrola

Ranije je pomenuta antimikrobna aktivnost ramnolipida može biti korisna u procesima bioremedijacije kada je potrebna biološka kontrola. Ramnolipid su se više puta pokazali kao visoko-efikasni prema tri predstavnika zooporogenih biljnih patogena: *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici* i *Plasmopara lactucae-radicis*. Prečšćeni mono- i di-ramnolioipidi (u koncentracionom opsegu 5-30 mg/l) izazivaju otežanu pokretljivost i lizu zoospora ovih patogena za manje od jednog minuta, a efikasnost je potvrđena u simuliranom hidrofoničnom recirkulišućem sistemu (Maier and Soberon-Cháves 2000).

1.8. Principi biosorpcija teških metala - kadmijum i njegov efekat na biosintezu ramnolipida

Zagađenje životne okoline toksičnim, teškim metalima se širi paralelno sa razvojem industrije (Nriagu 1990). Toksično dejstvo metala može se podeliti u tri grupe: blokiranje esencijalnih bioloških funkcionalnih grupa, zamena metalnih jona u biomolekulima i modifikovanje aktivnih konformacija u biomolekulima (Florence 1989). Toksični efekat najviše zavisi od dostupnosti, zastupljenosti i forme u kojoj se metal nalazi, odnosno da li ih organizmi mogu lako asimilovati (Pëtanen 2001). Živa, kadmijum i bakar spadaju u najčešće korišćene teške metale, pa su i česti zagađivači životne okoline.

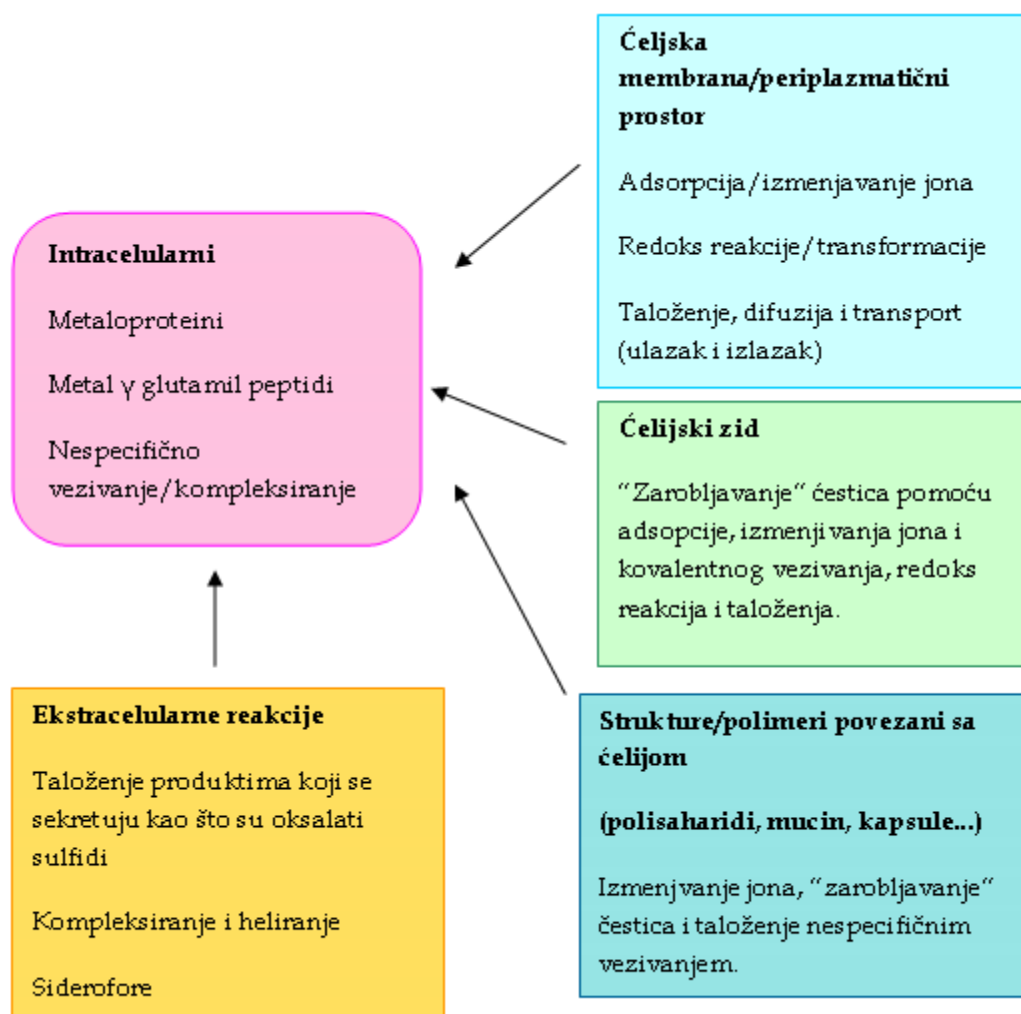
Bioremedijacija sredine kontaminirane teškim metalima privlači značajnu pažnju poslednjih godina ne samo zbog svoje inovativnosti već i zbog

potencijalne primene u industriji (Singh *et al* 2010). Fiziko-hemijske metode koje obično koriste hemijske adsorbense za uklanjanje teških metala iz industrijskog otpada imaju nedostatke koji uključuju i ekonomske i ekološke aspekte (Eccles 1999). Nasuprot njima, vijabilna ili mrtva biomasa bakterija, gljiva, algi i biljaka je sposobna da uklanja ili modifikuje teške metale prisutne u svojoj okolini, što nudi ekonomičnu alterantivu za tehnike sorpcije (Gupta *et al* 2000). Zbog toga je razumevanje mehanizama usvajanja metala pomoću mikroorganizama od presudnog značaja za optimalne rezultate u ovoj oblasti.

1.8.1. Principi usvajanja teških metala pomoću mikroorganizama

Mehanizmi povezani sa uklanjanjem metala pomoću mikroorganizama su kompleksniji nego oni koji su povezani sa hemijskom adsorpcijom i podeljeni su u tri grupe: (1) biosorpcija metanih jona na površini ćelija, (2) intracelularno usvajanje metalnih jona i (3) hemijska transformacija metalnih jona pomoću mikroba (Pardo *et al* 2003, Hassan *et al* 2010), (slika 1.14.). Mrtva biomasa mikroorganizama je uključena u mehanizme uklanjanja metalnih jona pomoću adsorpcije i jonoizmenjivanja (Tarangini 2009). Kapacitet bilo kog biosorbenta je uslovljen karakteristikama biomase, fizičko-hemijskim osobinama metala i osobinama mikrookoline kao što su: pH, temperatura i interakcije sa ostalim prisutnim jonima (Hassan *et al* 2010; Tarangini 2009). Biosorpcija je, u principu, pasivna biosorpcija metala pomoću biomase. Mehanizmi sorpcije površinom ćelije su nezavisni od metabolizma, zasnovani na fiziko-hemijskim karakteristikama između funkcionalnih grupa na ćelijskom zidu. Kako je proces nezavisan od ćelijskog metabolizma, vezivanje metala je veoma brzo, do pet minuta (Gabr *et al* 2008; Kadukova and Vircikova 2005). Bioakumulacija je intracelularna akumulacija metala živim ćelijama. Ponekad se za bioakumulaciju koristi termin i aktivna biosorpcija, nasuprot pasivne biosorpcije, a može biti inhibirana metaboličkim inhibitorima kao što je niska temperatura i nedostatak izvora energije. Biosorpcija je brz proces nezavisan od

prisustva specifičnih nutrijenata dok je bioakumulacija spor proces zavisian od nutrijenata (Gabr *et al* 2008; Kadukova and Vircikova 2005). Razne mikrobnne vrste, pri čemu se često pominju vrste roda *Pseudomonas*, pokazale su se kao rezistentne (Teitzeil and Parsek 2003) i relativno efikasni u bioakumulaciji različitih teških metala (Hussein *et al* 2005; Singh *et al* 2010).



Slika 1.14. Shema bioremedijacionih mehanizama pomoću mikroorganizama: ekstracelularne i intracelularne interakcije mikroba i metala preko funkcionalnih grupa biomolekula različitim tipovima veza i reakcija (adsorpcija, kovalentno vezivanje, redoks reakcije, jonoizmenjivači, precipitacija, difuzija, kompleksiranje, helacije), (Hassan *et al* 2010; Tarangini 2009).

1.8.2. Kadmijum

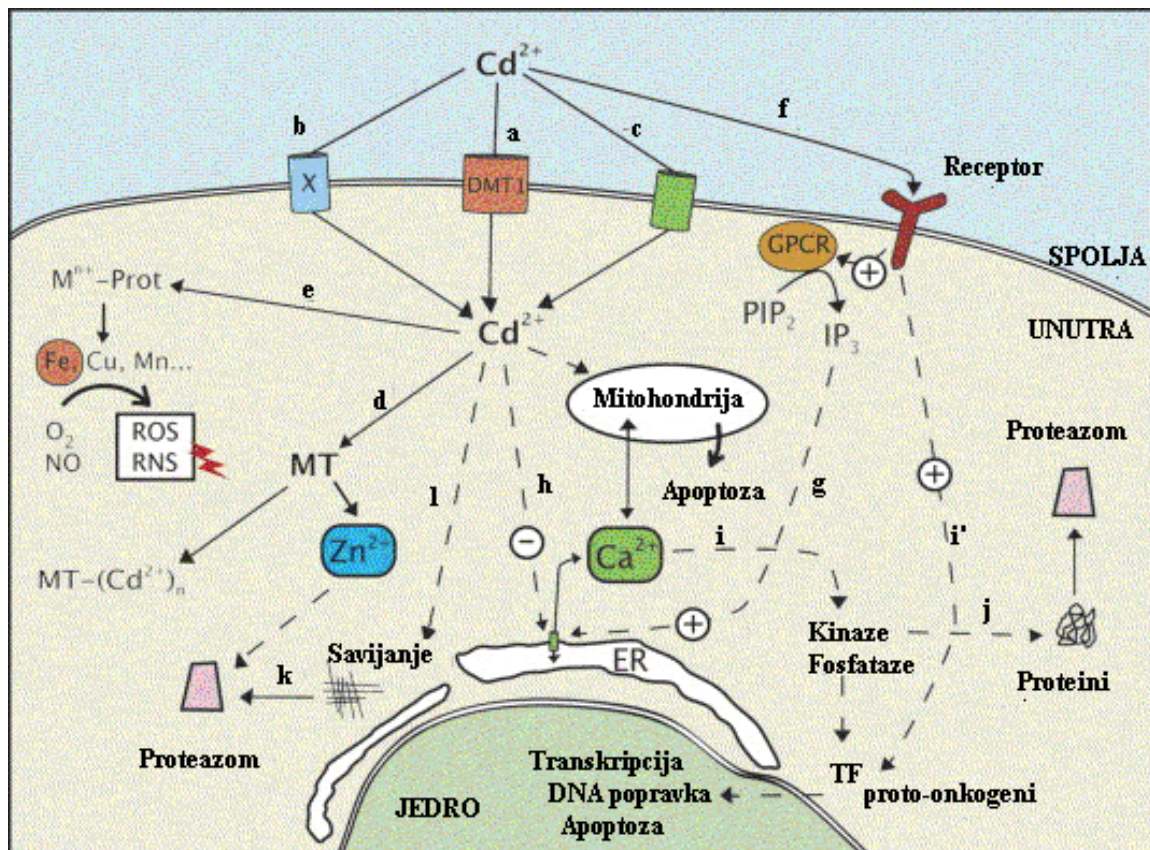
Kadmijum nije najzastupljeniji metal sa geološkog aspekta, ali njegova koncentracije u nekim stenama može biti izrazito visoka. Prisustvo kadmijuma je često vezano sa mineralima cinka, ređe olova i bakra, pa je ovaj metal često nusprodukt obrade njihovih ruda. Kako se nalaze u istoj koloni (2B) periodnog sistema, logično je da će imati i slične osobine (Martelli *et al* 2006).

Kadmijum je zbog svojih fiziko-hemijskih osobina našao široku primenu u industriji: zaštita čelika od korozije u aeronautici, poboljšavanje termalnih i mehaničkih osobina legura, kontrola nuklearne fisije, kao deo baterija, kadmijumovi halogenidi imaju primenu u elektronici, slikanju, emajliranju itd (Martelli *et al* 2006).

Manufaktura i izlaganje jedinjenjima koja sadrže kadmijum je najčešći uzrok štetnih efekata kadmijuma, ali i zagađenje u vazduhu, kontakt kadmijuma iz minerala i zemljišta sa hranom. Može se zaključiti da je izlaganje i unošenje kadmijumu moguće inhalacijom i ingestijom, pri čemu su pušači su posebno izloženi kadmijumu inhalacijom (Martelli *et al* 2006).

1.8.2.1. Kadmijum – toksični efekti

Kadmijum je visoko toksičan i potencijalno kancerogen u malim količinama (Prozialeck *et al* 2000; Sourabh *et al* 2010). Pretpostavlja se da joni Cd^{2+} mogu da zamene dvovalente jone Zn i Fe u proteinima, što dovodi do njihove inaktivacije i oslobađanja slobodnih jona gvožđa koje može generisati reaktivne hidrosil radikale. Smatra se da je glavni efekat kadmijuma indukcija oksidativnog stresa (Halliwell *et al* 1984), posebno lipidna peroksidacija, zbog čega je svrstan u humane kancerogene i jedan je od dobro poznatih teških metala čiji se toksični efekat intenzivno proučava. Na slici 1.15. su sumirani načini ulaska kadmijuma u animalnu ćeliju kao i njegove putanje, sa efektima na ćelijski metabolizam (Martelli *et al* 2006).



Slika 1.15. Shematski prikaz putanje kadmijuma kroz animalnu ćeliju. Putanja kadmijuma je označena isprekidanim linijama, a punim linijama su označeni efekti na ćeliju i njene strukture. Mala slova abecede označavaju: a - absorpcija kadmijuma preko proton-metal kotransportera, b- ulazak kadmijuma preko transportera za druge metale, c - transmembranski transport kadmijuma kroz kanale za kalcijum, d - interakcija kadmijuma sa ligandima visokog afiniteta prema metalima u citosolu, e - interakcija kadmijum sa Zn metaloproteinima, f - kadmijum alterira intercelularnu koncentraciju kalcijuma preko GPCR, g - signalna transdukcija pokrenuta interakcijom kadmijuma sa GPCR, koja ima efekat na koncentraciju kadmijuma u ćeliji, h -efekat kadmijuma prisutnog u citosolu na koncentraciju kalcijuma u ćeliji preko ER, i - efekat kadmijuma na transkripcione faktore, i'- efekat kadmijuma na proto onkogene, DNA popravke i apoptozu preko redoks izmena, j, k - uticaj kadmijuma na protinske modifikacije, l- toksični efekat kadmijuma preko narušavanja pojedinačne ili ukupne homeostaze kalcijuma, cinka i gvožđa; pokretanje stresnog odgovora koji ima uticaj na proteazom. X- nosač; ER-endoplazmatični retikulum; TF-transkripcioni faktor; GPCR-receptor kuplovan sa G proteinom; PIP₂- fosfatidilinozitol-(4,5)-biosfosfat; MT-metalotienoini (Martelli *et al* 2006).

Uprkos toksičnim efektima, mnogi mikroorganizmi su razvili otpornost na teške metale i mehanizme detoksifikacije koji uključuju isparavanje, precipitaciju, ekskluziju, intacelularno uklanjanje, membranske pumpe (Silver 1998). Bioremedijacija zasnovana na mikroorganizmima se zasniva upravo na ovim mehanizmima. Mikrobna otpornost na kadmijum je zasnovana na mehanizmima efluksa koji su zavisni od energije (Nies 2003; Silver 1996). Tri glavne grupe su odgovorne za eflus kadmijuma: CBA-tip hemisomotskih antiporetera, P-tip ATP-aza i ubrzivači difuzije katjona (CDF). CBA tip antiporetera je proteinski kompleks koji može da prođe kroz ceo ćelijski zid Gram-negativnih bakterija, a P-tip ATP-aza su pojedinačni sistemi koji se nalaze u citoplazmatičnoj membrani. *P. putida* je saprofitna bakterija koja ne samo da može da degraduje veliki broj biogenih i ksenobiotičkih polutana već je i tolerantna na jone teških metala i primer je jedne od vrsta roda *Pseudomonas* otporne na prisustvo teških metala (Tripathi *et al* 2005).

1.8.2.2. Efekat kadmijuma na produkciju i biosintezu ramnolipida

Još jedna od osobina ramnolipidnog biosurfaktanta koja se pominje u literaturi je i sposobnost mono- i di-ramnolipida da kompleksiraju metale (Nielson *et al* 2010). Ranije studije su pokazale da je su konstante formiranja kompleksa mono-ramnolipida sa bakrom i kadmijumom veće od organskih kiselina, mada mehanizmi kompleksiranja nisu u potpunosti poznati (Neilson *et al* 2003; Ochoa-Loza *et al* 2001). Mogućnost formiranja kompleksa između ramnolipida i metala, koji su zagađivači, je dovela do porasta broja istraživanja koja su usmerena na potencijalnu primenu ramnolipida kao ekološki pogodnog agensa za ispiranje zemljišta kontaminiranog metalima (Asci *et al* 2008; Miller 1995b; Mulligan and Wang 2006; Neilson *et al* 2003). Ipak, nijedna studija nije ispitala efekat kompleksiranja na biosintezu ramnolipida. Dok je otpornost *P. aeruginosa* na prisustvo teških metala regulisana intraćelijski mehanizmima koji uključuju energiju (Nies *et al* 2003), bilo bi važno ispitati da li produkcija ramnolipida ove bakterije može biti zavisna od prisustva teškog metala. Ranija

istraživanja sa *P. putida* su pokazala "quadriple-knockout" mutanti kojima su nedostajala sva četiri kanala za transport metala su mogli da podnesu 100 puta veće koncentracije Cd^{2+} nego *Escherichia coli* (Leedjäv *et al* 2008), što je pokazalo da je potrebno istražiti alternativne mehanizme otpornosti na dvovalentne teške metale.

Kao što je već rečeno, produkcija ramnolipida je pod uticajem uslova okoline, a neka od ranijih istraživanja su pokazala da prisustvo gvožđa kao dvovalentnog katjona inhibira produkciju ramnolipida, dok je u uslovima limitiranja metala pojačana ekspresija *rhlI* sistema (Déziel *et al* 2003; Duan and Surette 2007). Takođe, bitno je napomenuti da uslovi okoline, osim što utiču na produkciju ramnolipida, imaju efekat i na QS globalnu regulatornu mrežu koja kontroliše gensku ekspresiju odgovornu za biosintezu RL (Soberón-Chávez *et al* 2005; Duan and Surette 2007). Istraživanja sa gvožđem su pokazala regulatornu vezu između produkcije ramnolipida i koncentracije metala.

Jedno od retkih istraživanja efekta kadmijuma na biosintezu ramnolipida je studija koju su objavili Nielson i saradnici (2010), koji su ispitivali da li prisustvo Cd^{2+} utiče na sintezu ramnolipida ekološkog izolata *P. aeruginosa* IGB83. Oni su prilikom gajenja kulture u prisustvu 0; 0,45 i 0,89 mM Cd^{2+} pratili ekspresiju *rhlB/rhlC* gena (koji kodiraju dve ramnozil-transferaze odgovorne za finalnu fazu biosinteze ramnolipida), prinos ramnolipida i odnos mono- i di-ramnolipidne frakcije. Rezultati su pokazali da na sredini stacionarne faze (nakon 53 h rasta) kadmijum indukuje pojačanju *rhlB* ekspresiju. Dodatno je primećena kontinualna produkcija ramolipida u kasnoj stacionarnoj fazi (nakon 96 h rasta) kultura kod kojih je dodat kadmijum, za razliku od kontrolnih kultura koje su gajene bez prisustva kadmijuma, kod kojih je produkcija ramnolipida u sredini stacionarne faze bila gotova. Najznačajnije zapažanje je bilo povećanje odnosa di- i mono-ramnolipidne frakcije je bilo kod kultura koje su gajene u prisustvu kadmijuma. Prethodni rezultati su pokazali da je konstanta kompleksiranja za di-ramnolipide i Cd nekoliko puta veća nego za mono-ramanolipide i Cd, pa ovo favorizovanje produkcije di-ramnolipida u

prisustvu Cd^{2+} povećava njegovu dostupnost i toksičnost kako za samu ćeliju tako i za okolinu (Nielson *et al* 2010).

1.8.3. Komparativni proteomiks kao način za praćenje bioremedijacije

Odgovor na različite uslove stresa koji su prisutni u okolini, uključujući i teške metale, karakteriše indukcija velikog broja proteina. Analize proteoma, ukupnog seta proteina koje eksprimira jedan organizam, ćelija ili organela, je veoma složeno i pod stalnim uticajem različitih stimulansa. Sa druge strane, razumevanje uslova rasta koji diriguju ekspresijom proteoma u specifičnim uslovima, od presudnog je značaja za razvoj uspešnih strategija u bioremedijaciji (Zhao *et al* 2008). U vezi sa tim, analiza različitih preteinskih ekspresija kao odgovor na izalagnje mikroorganizama teškim metalima i/ili organskim zagađivačima kao izvorima ugljenika (ugljovodonici, nafta i njeni derivati, otpad ulja...) moglo bi dati fundamentalna objašnjenja za razumevanje odgovora na stres i strategije za kontrolu produkcije metabolita koji su bitni za zaštitu životne okoline. Proteomiks sa bioinformatikom ima ključnu ulogu u proučavanju strukture i funkcije proteina. Proteomiks platforme koje bi omogućile profilisanje velikog broja proteina kroz veliki set kompleksnih uzoraka bi mogle da budu način za proučavanje mehanizama odgovornih za izaganje različitim zagađivačima, a u isto vreme bi dale mogućnost za praćenje diferencijalne ekspresije proteina/enzima koji bi služili kao jedinstveni biomarkeri okoline/sistema. Diferencijani proteomiks, ne samo da bi pomogao u razumevanju dinamike sinteze određenih proteina, već bi ubrzao inženjering novih proteina koji bi mogli da imaju kompleksnije biotehnoške primene u budućnosti. Generalno, primena proteomiksa u bioremedijaciji bi omogućila uvid u kompoziciju proteina u mikrobnim ćelijama i pristup za razumevanje molekularnih mehanizama bioremedijacije ili analizu ćelijskog odgovora na stimulus iz okoline, kao što je odgovor na stres, indukcija i ekspresija

regulatornih proteina/enzima u odgovoru na organske zagađivače ili teške metale.

Uprkos dobrom potencijalu za primenu u zaštiti životne okoline, molekularna baza vezana za otpornost *Pseudomonas* korišćenjem "large scale" proteomiksa još uvek nije usmerena i objašnjena. Skorašnje publikacije o komparativnoj analizi *P. putida* ukazuju da je suština molekularnog odgovora na stres izazvan prisustvom hroma u sedam uzvodno regulisanih ("upregulated") proteina koji pripadaju šest različitih metaboličkih funkcionalnih kategorija koje uključuju transkripciju, transport neorganskih jona i njihov metabolizam kao i transport i metabolizam amino kiselina (Thompson *et al* 2010). Diferencijalni proteomiks u studiji koja se bavila odgovorom ćelija na Cd i Cu kod *P. putida* KT244, ukazao je na usvajanje metala pomoću vezujućih proteina i efluks pumpi, uz dodatne mehanizme zaštite od oksidativnog stresa (Miller *et al* 2009). Proteomiks studija o soju *P. aeruginosa* otpornom na hrom ukazuje na uzvodnu regulaciju biosinteze enzima odgovornih za produkciju egzopolisaharida (Kilic *et al* 2010). Diferencijalna ekspresija proteina u uslovima stresa kadmijumom psihrotolerantnog soja *P. putida* 710A i alkalofilnog *P. monteilli* 97AN korišćenjem samo *in-silico* pristupa, je pokazalo da su to enzimi uključeni u posredovanje metaboličkih putanja koje su bitne za obezbeđivanje energetske potrebe ćelije prilikom izlaganja kadmijumu (Jain *et al* 2010).

2.MATERIJAL I METODE

2.1. Mikroorganizmi

2.2. Uslovi kultivacije/gajenja mikroorganizama i selekcija podloge

2.3. Optimizacija produkcije ramnolipida korišćenjem statističkog modela odzivnih površina, RSM (Response surface methodology) modela

2.4. Određivanje parametara dinamike fermentacije

2.5. Izolovanje i karakterizacija ramnolipidniog biosurfaktanta

2.6. Strukturna analiza i kvantitativno određivanje ramnolipida

2.7. Tolerancija na teške metale

2.1. Mikroorganizmi

2.1.1. Sojevi *P. aeruginosa*

P. aeruginosa NCAIM (P) B 001380, prvobitan naziv *P. aeruginosa* san ai, izolovan je iz mineralnog ulja za sečenje metala (Karadzic *et al* 2004). Soj označen kao *P. aeruginosa* 67 izolovan je iz halde konstruisane u Pančevu (u krugu rafinerije nafte u Pančevu), Srbija (Jovancicevic *et al* 2008), dok su sojevi *P. aeruginosa* D1, D2 i D3 izolovani iz bioremedijacione halde sa mazutom u Dobanovacima, Srbija (Beskoski 2011; Beskoski *et al* 2011). Soj *P. aeruginosa* ATCC 27853 je komercijalni referentni soj.

2.1.2. Taksonomska karakterizacija sojeva *P. aeruginosa*

Taksonomska identifikacija sojeva rađena je biohemijskim API testovima i molekulskom karakterizacijom. Za dodatne biohemijske testove korišćen je APIZYM 25200 test. Obradu rezultata urađena pomoću je apiweb™ software verzija 1.2.1 (www.biomerieux.com).

2.1.3. Filogenetska analiza

Za izolovanje genomskih DNA sojeva *P. aeruginosa* korišćen je DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). 16S rRNK sekvence sojeva *P. aeruginosa* su određene uz korišćenje MacroGen servisa (www.microgen.ouhsc.edu) korišćenjem 518F i 800R prajmera. Za taksonomsku analizu korišćen je Genbank Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Filogenetska analiza je urađena pomoću Distance based cluster algorithm, Phylogenetic inference package (<http://www.genebee.msu.su>; <http://bioweb2.pasteur.fr>).

2.2. Uslovi kultivacije/gajenja mikroorganizama i selekcija podloge

2.2.1. Sterilizacija podloga i opreme za rad sa mikroorganizmima

Sve podloge za gajenje i potrebna oprema za rad sa mikroorganizmima sterilisani su u autoklavu u trajanju od 20 minuta, na 121°C i pritisku od 101,3 kPa.

2.2.2. Uslovi kultivacije

Sojevi *P. aeruginosa* su aktivirani presejavanjem na kosom hranljivom agru (Torlak, Srbija) na 30 °C, 24 h.

Kao podloga za predfermentaciju je upotrebljena tečna Kay-ova mineralna podloga (sastav, g/L: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 3; K_2HPO_4 , 2; glukoza, 0,2; FeSO_4 , 0,5; MgSO_4 , 1; finalno pH 6,5), (Gunther *et al* 2005), koja je inokulisana mikroorganizmom sa čvrste podloge (jedna eza). Mikroorganizmi su gajeni u 100 ml tečne podloge, u Erlenmajerovim bocama zapremine 500 ml, na 30°C, u toku 20 sati, pri 250 obrtaja/min na horizontalnoj mućkalici Lab-Term Kühner (Švajcarska).

2.2.3. Selekcija osnovne podloge

Eksperimenti čiji je cilj bio izbor podloge za produkciju ramnolipida izvedeni su u tri koraka: 1. selekcija osnovne podloge (u smislu mineralnog, organskog ili kombinovanog izvora azota); 2. selekcija izvora ugljenika i azota; 3. finalna optimizacija odnosa ugljenika i azota pomoću RSM metodologije.

Kao moguće osnovne, ispitivane su tri podloge za fermentaciju: LB (Lurie-Bertani), MSM (mineralni slani medijum, mineral salt medium) i PPAS (proteosa pepton amonijum so sa smanjenom količinom fosfata, phosphate-limited proteose peptone-ammonium salt) kao modifikacije PPGAS (phosphate-limited peptone-glucose-ammonium salt) podloge (Gunther *et al* 2005). Aktivna kultura *P. aeruginosa* sa Kay-ove podloge je dispergovana (1% posev) u

Erlenmjerove boce, zapremine 500 ml koji su sadržali 100 ml jednu od tri navedene tečne podloge.

Sastav LB podloge (g/l): NaCl, 5; ekstrakt kvasca (Torlak, Srbija), 5; pepton I (Torlak, Srbija), 10 (Karadzic *et al* 2004). Sastav MSM (g/l): NH₄NO₃, 4; KH₂PO₄, 4,08; Na₂HPO₄, 5,68; CaCl₂, 7,77x10⁻⁴; MgSO₄x7H₂O, 0,2; Na-EDTA, 1,49x10⁻³, FeSO₄x7H₂O, 5,56x10⁻⁴ (Wu *et al* 2008). Sastav PPAS (g/l): NH₄Cl, 1,07; KCl, 1,49; Tris-HCl, 14,54; MgSO₄, 0,20; pepton I, 10 (Grunther *et al* 2005). U sve tri ispitivane podloge finalno pH je bilo 7, a kao izvor ugljenika je dodato maslinovo ulje (0,7%) (Carapelli, Italija), (Tahzibi *et al* 2004). Fermentacija je rađena na 30 °C u trajanju od 96 sati.

2.2.4. Selekcija optimalnih izvora ugljenika i azota

Uticaj različitih izvora ugljenika i azota je ispitivan na PPAS podlozi, kao osnovnoj podlozi određenoj u prethodnom koraku. Uticaj izvora ugljenika je ispitivan za (2%, w/w): glukozu, suncokretovo ulje (Vital, Srbija), maslinovo ulje, ulje za sečenje metala, kerozin, suncokretovo ulje nakon prženja, etanol, glicerol, otpadne frakcije iz rafinerije suncokretovog ulja (Plima M, Srbija). Dve ispitivane otpadne frakcije iz procesa prerade suncokretovog ulja (sunflower oil mill effluent, SOME) su bile: uljana emulzija (ostatak nakon deguminacije, sastavljen od vode, ulja i fosfatida) označena kao SOME 1 i frakcija masnih kiselina nakon neutralizacije i saponifikacije (sastavljena od neutralnih ulja, masnih kiselina i voskova), označena kao SOME 2. Za određivanje optimalnog izvora azota, pepton I iz PPAS podloge (sa 2% maslinovim uljem kao izvorom ugljenika) je zamenjen sa (1% w/w): surutkom u prahu (Veselinović, Srbija), mesnim ekstraktom (Torlak, Srbija), ekstraktom kvasca, sojinim brašnom (Soja Vita, Srbija) i triptonom (Torlak, Srbija).

2.2.5. Određivanje sadržaja ugljenika i azota u podlozi

Ukupni sadržaj ugljenika i azota u izvorima ugljenika (suncokretovo ulje) i azota (pepton I) je određen pomoću Vario EL III CHNS/O Elemental Analyzer (Nemačka).

2.3. Optimizacija produkcije ramnolipida korišćenjem RSM (Response surface methodology) modela

RSM analize za finalnu optimizaciju izvora ugljenika i azota urađene su korišćenjem softvera Design Expert Softer (Version 8.0.5), na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika i peptonom I kao izvorom azota. Plan, primenjen u ovoj studiji, obuhvatao je 17 eksperimenata urađenih po Box-Behnken dizajnu (Wei *et al* 2008). Uticaj koncentracije izvora ugljenika, izvora azota i temperature je ispitan u sledećim opsezima: koncentracija suncokretovog ulja 1-6%; koncentracija peptona I 0,5-4% i temperatura 20-40 °C. Veličina praćena kao odgovor je koncentracija ramnolipida, izražena kao g/l, koja je određivana četvrtog dana fermentacije.

2.4. Određivanje parametara dinamike fermentacije

2.4.1. Određivanje pH

Promene pH vrednosti u tečnoj podlozi tokom fermentacije praćene su na pH-metru tipa HANNA instrument (HI 9017 Microprocessor, Singapur) na sobnoj temperaturi.

2.4.2. Praćenje rasta mikrobne populacije

Rast bakterija je praćen promenom apsorbance (optical density, OD) u fermentacionoj tečnosti na 580 nm na spektrofotometru Gilford 250 (Oberlin,

Ohajo, SAD), korišćenjem sterilne podloge kao kontrole (Heyd *et al* 2008). Za vrednosti apsorbance preko 1 uzorci su razblaživani fiziološkim rastvorom.

2.4.3. Frakcionisanje biomase i fermentacione tečnosti

Nakon završene fermentacije, biomasa i fermentaciona tečnost su odvajane centrifugiranjem na 10000 rpm u toku 20 minuta (Sorvall, Velika Britanija, rotor SS-1, ili minicentrifuga Denver Instruments, SAD). Dobijeni supernatant je korišćen za određivanje ostalih parametara fermentacije.

2.4.4. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina (C_p) je određivana Bradford-ovom metodom (Bradford, 1976). Uzorak je pripreman tako što je u epruvetu sipano 200 μ l uzorka i 1ml Bradford-ovog reagensa. Dobijeni rastvor je vorteksovan i nakon 10 minuta inkubacije merena je apsorbance na 595 nm. Kao slepa proba korišćen je rastvor koji se sastojao od 200 μ l vode i 1 ml reagensa. Koncentracija proteina je određivana na osnovu jednačine standardne prave, koja je dobijena je pomoću rastvora goveđeg seruma albumina (BSA) koncentracije od 0 do 0,1 mg/ml.

2.4.5. Određivanje enzimske aktivnosti lipaze

Enzimska aktivnost lipaze (C_e lipaze) u fermentacionoj tečnosti merena je spektrofotometrijski pomoću hidrolize *p*-nitrofenil-palmitata (*p*NPP, Sigma Aldrich, USA), koncentracije 0,79 mmol *p*NPP/ml (Karadzic *et al* 2004). Reakciona smeša sastojala se od 900 μ l rastvora *p*NPP i 100 μ l fermentacione tečnosti. Rastvor *p*NPP je pripreman na sledeći način: 30 mg *p*NPP suspendovanih u 10 ml *iso*-propanola, a zatim je dodavano u 90 ml 0,05 M fosfatnog pufera (pH 8) sa 207 mg Na-deoksiholata i 100 mg gumirabike. Smeša je inkubirana na 30 °C i absorbance je merena na 410 nm u toku prvih 3 minuta reakcije. Jedna jedinica enzimske aktivnosti (1U) se definiše kao ona

količina enzima koja, pod određenim uslovima, oslobađa 1 μmol *p*-NPP u minuti.

2.4.6. *Određivanje koncentracije egzopolisaharida*

Koncentracija egzopolisaharida (C_{exp}) je određivana spektrofotometrijski pomoću metode fenol-sumporna kiselina (Masuko *et al* 2005). Uzorak je pripreman tako što je u epruvetu sipano 100 μl supernatanta, 900 μl destilovane vode, 50 μl 80 % fenolnog rastvora i 2,5 ml koncentrovane sumporne kiseline. Uzorci su vorteksovani i apsorbancija je merena nakon 10 minuta na 490 nm. Sadržaj egzopolisaharida je određivan na osnovu jednačine standardne prave. Jednačina standardne prave dobijena je na osnovu merenja apsorbance rastvora skroba koncentracije od 0 do 100 mg/ml.

2.4.7. *Određivanje koncentracije ramnolipida*

Koncentracije ramnolipida (C_{rl}) određivana je spektrofotometrijski korišćenjem orcinolnog testa (Chandrasekaran and BeMiller 1980). U 0,25 ml fermentacione tečnosti dodato je 0,25 ml 500 mM glicinskog pufera (pH 2). Smeša je promućkana i centrifugirana 10 minuta na 10000 rpm na minicentrifugi. Supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u 0,5 ml smeše hloroform/metanol (2:1) snažnim mućkanjem u trajanju od 5 minuta (Heyd *et al* 2008). Suspenzija je centrifugirana 5 minuta na 10000 rpm na minicentrifugi i 0,25 ml supernatanta je prebačeno u Ependorf kivetu i upareno do spuva, na 80 °C. Talog je nakon uparavanja rastvoren u odgovarajućoj količini vode. Orcinolni reagens (0,19% orcinol u 53%, v/v, sumpornoj kiselinu) je pripreman neposredno pre upotrebe. Reakciona smeša se sastojala od 150 μl uzorka i 1350 μl reagensa, koji je dobro promućkan, a zatim zagrevan 30 minuta na 80 °C, ostavljen 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je merena apsorbancija na 421 nm. Koncentracija ramnolipida je određivana pomoću jednačine prave dobijene korišćenjem rastvora ramnoze kao standarda, uzimajući u obzir da 1 μg ramnoze odgovara 2,5 μg ramnolipida (Wang *et al* 2007).

2.5. Izolovanje i karakterizacija ramnolipidniog biosurfaktanta

2.5.1. Izolovanje ramnolipida

Ramnolipidni biosurfaktant je izolovan iz fermentacione tečnosti nakon odvajanja biomase centrifugiranjem. Grubo izolovanje ramnolipida urađeno je je kiselim precipitacijom pomoću 1M hlorovodonične kiseline (finalno pH 2), (Heyd *et al* 2008). Talog je sakupljan centrifugiranjem na 5000 rpm u trajanju od 10 minuta na centrifugi Sorvall, a ramnolipidi su ekstrahovani iz taloga smešom organskih rastvarača (hloroform i metanol u odnosu 2:1), (Heyd *et al* 2008). Bistri supernatant, dobijen centrifugiranjem na 5000 rpm u trajanju od 10 minuta na centrifugi Janetzki T32c (Nemačka), uparen je do suva i korišćen za dalje analize.

2.5.2. Prečišćavanje ramnolipida

Dalje prečišćavanje ramnolipidne smeše urađeno pomoću normalno-fazne hromatografije na koloni silika gela (Kieselgel 100, 70-230 mesh ASTM, Merck), (Heyd *et al* 2008). Prva faza elucije je bilo ispiranje kolone hlороformom koje je uklonilo neutralne lipide i neke pigmente. Mono- i di-ramnolipidne frakcije bile su eluirane pomoću gradijentne elucije: mono-ramnolipidna frakcija pomoću smeše hlороform:metanol u odnosu 50:3 i 50:5 za eventualno preostale mono-ramnolipidne strukture, a di-ramnolipidna frakcija pomoću iste smeše rastvarača u odnosu 50:50. Sakupljene frakcije (3 ml) su analizirane pomoću tankoslojne hromatografije (TLC) i na osnovu sličnosti profila na TLC-u su spajane.

2.5.3. Hromatografija na tankom sloju (TLC)

TLC je rađen na TLC alumijumskim pločama silika gel 60 F₂₅₄ (Merck). Smeša rastvarača je bila CH₃Cl: CH₃OH: 20% CH₃COOH u odnosu 65:15:2

(Hayd *et al* 2008). Ramnolipidi su detektovani orcinolnim testom sa sumpornom kiselinom (0,2% orcinol u 70% sumpornoj kiselinu, v/v).

2.5.4. Određivanje površinske aktivnosti i kritične micelarne koncentracije

Površinska aktivnost i kritična micelarna koncentracija (CMC) je određena korišćenjem tenziometra koji radi po metodi de Nouy prstena (Górna *et al* 2011). Površinska aktivnost je izmerena za fermentacione tečnosti sojeva *P. aeruginosa* nakon 96h rasta. CMC je određena za izolovanu smešu ramnolipida iz različitih sojeva, koja je rastvorena u destilovanoj vodi u koncentracionom opsegu od 200 do 5 mg/l (Haba *et al* 2003b). Merenja su rađena u tetraplikatu na sobnoj temperaturi, a destilovana voda je korišćena za kalibraciju instrumenta.

Paraleleno sa eksperimentalnim određivanjem površinske aktivnosti urađeno je i *in silico* predviđanje površinskih aktivnosti pomoću programa ACD/Chem Sketch version 12.01 (www.acdlabs.com).

2.5.5. Statističko određivanje korelacija između CMC vrednosti i odnosa ukupnih i pojedinih struktura mono- i di-ramnolipida

Statistička analiza je urađena pomoću SPSS (Statistical Package for Social Science) version 11.5. Person-ova korelacija je korišćena za utvrđivanje korelacija između CMC vrednosti i odnosa: ukupnih mono-/di-RL i glavnih RL struktura Rha-C₁₀-C₁₀/Rha-Rha-C₁₀-C₁₀. Nivo na kome je određivan značaj je bio 0,05.

2.5.6. Antimikrobna aktivnost ramnolipida

Antimikrobna aktivnost je određena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), koja je definisana kao najniža koncentracija antimikrobnog agensa koja je potrebna da se zaustavi vidljivi rast mikroorganizma nakon inkubacije (Haba *et al* 2003b). Antimikrobna aktivnost na Gram-pozitivne sojeve *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and sporogeni

Bacillus subtilis ATCC 6633, Gram-negativne sojeve *Escherichia coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* (strains D1, D2, D3, 67, NCAIM (P) B 001380 and ATCC 27853), gljive *Candida albicans* ATCC 24433 i *Aspergillus niger* je ispitivana pomoću agar dilucionog metoda (Turnidge and Bell 2005). Početne koncentracije ramnolipidnih ekstrakata su pripremane u metanolu. Razblaženja su pravljena u intervalu od 60 do 0,25 mg/ml. Kulture u stacionarnoj fazi su suspendovane u sterilnom fiziološkom rastvoru i zahvatiom pomoću eze, sa približno 10^4 - 10^5 cfu ml⁻¹, su nanete po površini Petri šolja sa Miler-Hinton agarom (Torlak, Srbija) za bakterije i Sabouraud agarom (Torlak, Srbija) za gljive. MIK je određivan nakon 24 h na 30°C za bakterije i nakon 48h na 28°C za gljive.

2.6. Strukturna analiza i kvantitativno određivanje ramnolipida

2.6.1. Infracrvena spektroskopija - FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) analiza

IR spektri su snimani pomoću Perkin-Elmer 31725 X FTIR spektrometra korišćenjem KBr tablete.

2.6.2. Masena spektrometrija

2.6.2.1. MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry)

Sirovi hloroformski ekstrakt ramnolipida je resuspendovan u rastvoru hloroform/metanol (50/5, v/v) do finalne koncentracije oko 2 mg/ml. Male zapremine rastvora uzorka (0,5 µL) su prebačene na MALDI target matricu i sušene pod umerenom strujom toplog vazduha. Iste zapremine matriks rastvora su nanete odmah nakon sušenja. Kao matriks je korišćena rastvor 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina (2,5-DHB), koncentracije 0,5 M u metanolu

sa 0,1% trifluorsirćetne kiseline (TFA). Male količina TFA je dodavana da bi pojačala odnos signala prema šumu lipidnog spektra (Schiller *et al* 2004). Pri korišćenju pomenute koncentracije TFA nije primećena degradacija uzorka.

MALDI-TOF MS spektri su snimani na Voyager Biospectrometry DE Pro Workstation (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA). Sistem je koristio 20 Hz pulsni azotni laser sa emisijom na 337 nm. Spektri su dobijeni pod odloženim ekstrakcionim uslovima u reflektor modu. Svi spektri predstavljaju prosek od 400 pojedinačnih laserskih snimaka. Intenzitet lasera je bio dovoljno nizak da ne dovede do degradacije ramnolipida i da se dobije dobar odnos signala i šumova analita.

7.6.2.2. HPLC-MS-MS (High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry)

LC/MS analize su uz modifikacije urađene prema Dénziel *et al* 1999 i Dubeau *et al* 2009. Uzorci su pripremani rastvaranjem suvih RL ekstrakta u 1 ml metanola i razblaživanjem 200 puta u smesi destilovana voda: acetonitril (30:70) koja je sadržala 5 mg/l hidroksi-2-heptilhinolin (4-hydroxy-2-heptylquinoline, HHQ-D4), obeležen deuterijumom, kao interni standard. Analize su rađene na HPLC Waters 2795, Alliance HT sistemu sa C₈ reverzno faznom kolonom (Eclipse XDB-C8, veličina čestica 5 µm, dimenzije kolone 4.6 x 150 mm, Agilent, SAD). Detektor je bio triple tandem kvadripol maseni spektrometar (qMS/MS, Quattro Premier XE, Micromass) sa elektrosprej jonizacijom (ESI; UPLC-ESI-qMS/MS). Svi ramnolipidi su detektovali i kvantifikovani u negativnom modu generisanjem [M-H]⁻ pseudomolekularnih jona. Dobijeni podaci su obrađeni pomoću softvera MassLynx™ koristeći QuanLynx™ funkcije (version 4.1, Waters).

Razdvajanje ramnolipida pomoću HPLC je urađeno injektovanjem uzorka zapremine od 20 µL, pri protoku mobilne faze mobilna faza od 0,4 ml/min sa gradijentom voda (C): acetonitril (D), oba sa 2 mM amonijum acetatom, pH 8. Gradijent je podešen po sledećem profilu protoka: 0 min, 30% C

+ 70% D; 1 min, 25% C + 75% D; 10 min, 100% D; 16 min, 100% D; 17 min, 30% C + 70% D; 20 min, 30% C + 70% D. Maseni spektrometar je bio u negativnom ESI modu sa kapilarnim naponom od 3,0 kV, naponom na izlazu od 20 V, izvornom i temperaturom rastvaranja od 120 i 150 °C, redom, protokom izlaznog i rastvarajućeg gasa (N₂) od 15 i 100 l/h, redom. Praćen je opseg masa od 130 to 800 Da. Kvantifikacija je urađena poređenjem integracionih podataka površina pikova pseudomolekularnih jona [M-H]⁻ različitih ramnolipidnih homologa sa onima koji potiču od internog standarda, korišćenjem faktora odgovora koji su prethodno određeni kalibracijom sa čistim mono-ramnolipidom i čistim di-ramnolipdom. CID (Collision-Induced Dissociation) za fragmentaciju roditeljskog jona je rađen pomoću argona kao kolizionog gasa pri pritisku od $3,28 \times 10^{-3}$ mBar, što je odgovaralo protoku od 0,35 ml/min. Opseg masa koje su praćene je bio od 100 do 530 Da za mono-RL i od 100 do 650 Da za di-RL. Energija kolizije je bila podešena na 20 eV za oba molekula.

2.7. Tolerancija na teške metale

2.7.1. Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za živu, bakar i kadmijum

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije teških metala urađeno je pomoću metode razblaženja u tečnoj podlozi (Thompson *et al* 2010). Aktivna kultura stara 24 h, suspendovana je u sterilnom fiziološkom rastvoru, tako da absorbanca na 550 nm merena na koloirimetru Selecta (Španija) bude oko 0,8. Zapremina od 50 µl suspenzije kulture prebačena je u sterilne epruvete sa 2 ml sterilne LB podloge koja je sadržala različite koncentracije ispitivanih metala. Izvori metala su bili hloridi žive, kadmijuma i bakra. Opseg koncentracija metala je bio od 0,5 do 10 mM (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0). Za pripremu serije razblaženja ispitivanih metala je korišćen polazni 0,2 M rastvor u LB podlozi. Polazni rastvor metala je sterilisan hladnom sterilizacijom pomoću

Nalgene syringe filtera (veličina pora 0,2 μm , prečnik filtera 25 mm, Nemačka). Određivanje je izvedeno uz tri kontrole: LB sa dodatim metalom, LB sa kulturom i sama LB podloga. Sve koncentracije metala urađene su u triplikatu. Svi uzorci su inkubirani na 30 °C u trajanju od 24 h, a optička gustina je merena kolorimetrijski na 550 nm. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) metala je definisana kao najniža koncentracija metala koja je potrebna da zaustavi vidljivi rast mikroorganizma nakon inkubacije.

2.7.2. Određivanje sadržaja metala u biomasi i fermentacionoj tečnosti

2.7.2.1. Mineralizacija

Uzorci za kvantitativnu analizu teških metala su pripremljeni mineralizacijom (Kumpulainen 1988). Mineralizacija je rađena na sistemu Tekator.

Odmerna je odgovarajuća količina uzorka (fermentaciona tečnost ili biomasa) i pažljivo kvantitativno prenet u kivetu za razlaganje. Zatim je dodato 20 ml koncentrovane azotne kiseline, promućkano i ostavljeno 1 sat. Nakon toga su kivete zagrevane na tekatoru (podeok 2) dok nije prestalo da peni, kada se temperatura povećavala (podeok 3). Po prestanku izdvajanja mrkih para azotovih oksida, kiveta je ohlađena i ukoliko rastvor nije bio bistar dodavano se još 10 ml HNO_3 (65%, v/v) i ponavljan postupak. Nakon toga u prohlađeni rastvor je dodato 2-5 ml H_2O_2 (30%, v/v), kap po kap niz zidove kivete, a zatim je rastvor ostavljan da ključa sve dok su se izdvajali mehurići kiseonika, tj. dok se nije razložio višak peroksida. Ukoliko je razloženi uzorak sadržao talog, bilo je potrebno da se profiltrira. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi rastvor je prenet u normalni sud od 10 ml, koji je zatim dopunjen da crte destilovanom vodom. Na isti način (bez uzorka) pripremana je i kontrolna proba sa 3,5 ml H_2O_2 .

2.7.2.2. Praćenje dinamike usvajanja kadmijuma

Dinamika usvajanja kadmijuma i njegove raspodele u biomasi i fermentacionoj tečnosti u toku 5 dana fermentacije, određena je iz mineralizovanih uzoraka pomoću atomske apsorpcione spektroskopije (AAS) na instrumentu Perkin Elmer 403. Početna koncentracija kadmijuma u podlozi je bila 100 mg/l. Talasne dužina za Cd je merena na 228,8 nm (Ilic *et al* 2008; Radetic *et al* 2007).

2.7.3. Praćenje proteinskih profila

Praćenje proteinskog profila mikrobne biomase u uslovima gajenja sa i bez prisustva metala rađeno je pomoću SDS (natrijum-dodecilsulfat) elektroforeze. Korišćena je aparature Mighty Small™ SE (Dual Gel Caster) Hoefer (San Francisko, SAD).

Priprema proteina iz biomase za elektroforezu: 1 g biomase sa 2 ml pufera Tris-HCl (pH 7,4) je homogenizovano u mehaničkom homogenizeru pomoću 15 zaveslaja. Homogenat je centrifugiran na 12000 rpm u trajanju od 10 min na minicentrifugi. U supernatantu su metodom po Bradford-u određeni proteini. Ukoliko je koncentracija proteina bila niska, koncentrovanje je urađeno ultrafiltracijom pomoću celuloznih Milipor Amikon centrifugal filter devices YM-10 sa cut-om od 30 kDa.

Rastvori za elektroforezu:

- 1.) 4xRunning gel pufer (1,5 M Tris HCl pH 8,8): 36,3 g Tris dodati 150 ml ddH₂O, pH do 8,8 sa HCl, ddH₂O do 200 ml
- 2.) 4xStacking gel pufer (0,5M Tris HCl, pH 6,8): 3,0 g Tris dodati 40 ml ddH₂O, pH do 6,8 sa HCl, ddH₂O do 50 ml
- 3.) 10% SDS: 10g SDS, ddH₂O do 100 ml
- 4.) 10% amonijum-persulfat: 0,1g amonijum persulfata, ddH₂O do 1,0 ml

- 5.) Running gel Overlay (0,375 M Tris HCl, 0,1% SDS pH 8,8): 25 ml running gel pufera 1,0 ml 1% SDS, ddH₂O do 100ml
- 6.) 2 x Pufer za tretiranje (0,125 M Tris HCl, 4% SDS, 20%v/v glicerol, 0,2M ditiotereitol, 0,02% brom fenol plavo, pH 6,8): 2,5ml 4xstacking gel pufer, 4,0 ml 10% SDS, 2,0 ml glicerola, 0,3 g ditiotereitol, ddH₂O do 10 ml
- 7.) Pufer za elektroforezu (0,025M Tris-HCl, 0,192 M glicerol, 0,1% SDS, pH 8,3): 30,28g Tris, 144,13 g glicina, 10g SDS, ddH₂O do 10 l
- 8.) Zasićen rastvor *n*-butanola u vodi: 50 ml *n*-butanola i 5 ml ddH₂O promućkati, koristiti gornji sloj za nadsojavanje. Čuvati na sobnoj temperaturi.
- 9.) Standardi proteina: proteinski markeri Fermetas: 116,0 kDa β-galaktozidaza, 66,2 kDa goveđi serumski albumin, 45,0 kDa ovalbumin, 35,0 kDa lakt 83 dehidrogenaza, 25,0 kDa Rease Bsp98I, 18,4 kDa β-laktoglobulin, 14,4 kDa lizozim
- 10.) Tetrametiletildiamid (TEMED)
- 11.) Monomer rastvor (30,8%, 2,7% C_{bis}): 60 g akrilamid i 1.6 g bisakrilamida, ddH₂O do 200 ml
- 12.) Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% metanol, 10% sirćetna kiselina)
- 13.) Rastvor boje (0,1% CBB , 50% metanol, 10% sirćetna kiselina)
- 14.) Rastvor za obezbojavanje (5% metanol, 7% sirćetna kiselina)

Tabela 2.1. Priprema running i stacking gela za praćenje proteinskih profila

Rastvor	Running gel finalne koncentracije 10% (zapremina 10ml)	Stacking gel rastvor (debljina gela 0,75 mm)
Rastvor monomera	3,3 ml	0,88 ml
4X Stacking gel pufer	2,5 ml	1,66 ml
10% SDS	0,1 ml	66,00 μl
ddH ₂ O	4,0 ml	4,06 ml
10% amonijum persulfat	50,0μl	33,40 μl
TEMED*	3,3 μl	3,40 μl

*Dodat nakon dezaeracije.

U tabeli 2.1. je prikazana priprema gela 10% za elektroforezu. Nakon dezaeracije running gel je sipan između ploča i zatim nadslojen rastvorom zasićenim rastvorom *n*-butanola u vodi. Kada je polimerizacija donjeg gela završena sipao se dezaerisani rastvor stacking gela. Zatim se u rastvor stavljao češalj. Kada polimerizacija gornjeg gela bila završen češalj je uklonjen, a u isprane bunariće su naneti uzorci.

Priprema uzoraka za elektroforezu: jednake zapremine uzorka i 2X pufera za tretiranje su sipanje u ependorf tubu i ostavljene na ključalom vodenom kupatilu 90 sekundi.

U bunariće je nanošeno 20 μ l uzorka, radna voltaža je bila 80 V dok uzorci nisu ušli u gel za razdvajanje, a zatim 150 V sve do kraja elektroforeze. Gel je nakon završetka elektroforeze ispiran sa ddH₂O (1 min), a zatim fiksiran (20 min) i bojen (24h).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. *Taskonomska karakterizacija ekoloških izolata P. aeruginosa*

3.2. *Selekcija tipa podloge i optimizacija produkcije ramnolipida pomoću soja P. aeruginosa NCAIM (P) B 001380*

3.3. *Strukturna karakterizacija i prečišćavanje ramnolipida iz P. aeruginosa NCAIM (P) B 001380*

3.4. *Produkcioni profili ramnolipida ekoloških izolata dobijeni pomoću MALDI-TOF analize*

3.5. *Kvantitativna LC-ESI-MS analiza ramnolipida iz ekoloških izolata P. aeruginosa*

3.6. *Karakterizacija ramnolipida iz različitih sojeva P. aeruginosa sa specifičnim poreklom*

3.7. *Ispitivanje potencijala soja P. aeruginosa NCAIM (P) B 001380 za primenu u procesima bioremedijacije teških metala*

Sojevi *P. aeruginosa* korišćeni u ovom radu su izolovani iz specifičnih okruženja: NCAIM iz mineralnog ulja za sečenje metala, sojevi konzorcijum D1, D2 i D3 iz zemljišta zagađenog mazutom i soj 67 iz zemljišta zagađenog naftom. Kako su bakterijski sojevi dobijeni/izdvojeni iz prirodnih okruženja u kojima su bili izloženi visokom sadržaju ugljovodonika ili njihovih derivata, označeni su kao ekološki izolati. Termin ekološki izolat preuzet je kao direktan prevod sa engleskog jezika, a odnosi se na sojeve bakterija koji su izolovani iz specifičnog okruženja (iz sredine u kojoj postoji kontaminacija ili iz industrijskog otpada). Dosadašnja istraživanja metabolita *P. aeruginosa* su uglavnom obavljena na kliničkim sojevima, iako se u poslednjih par godina sve češće objavljuju i studije sa ekološkim izolatima. Iz tog razloga je kao referentni korišćen klinički soj *P. aeruginosa* ATCC 27853. Ovaj soj je prethodno opisan kao prototip u različitim eksperimentima, uključujući i studije o ramnolipidima (Clarke *et al* 2010).

3.1. Taksonomska karakterizacija ekoloških izolata *P. aeruginosa*

3.1.1. Biohemijska karakterizacija

Rezultati biohemijske karakterizacije ekoloških izolata *P. aeruginosa* bazirane na testu 20 API NE su prikazani u tabeli 3.1. Rezultati dodatnog biohemijskog testa API ZYM prikazani su u tabeli 3.2. i na slici 3.1.

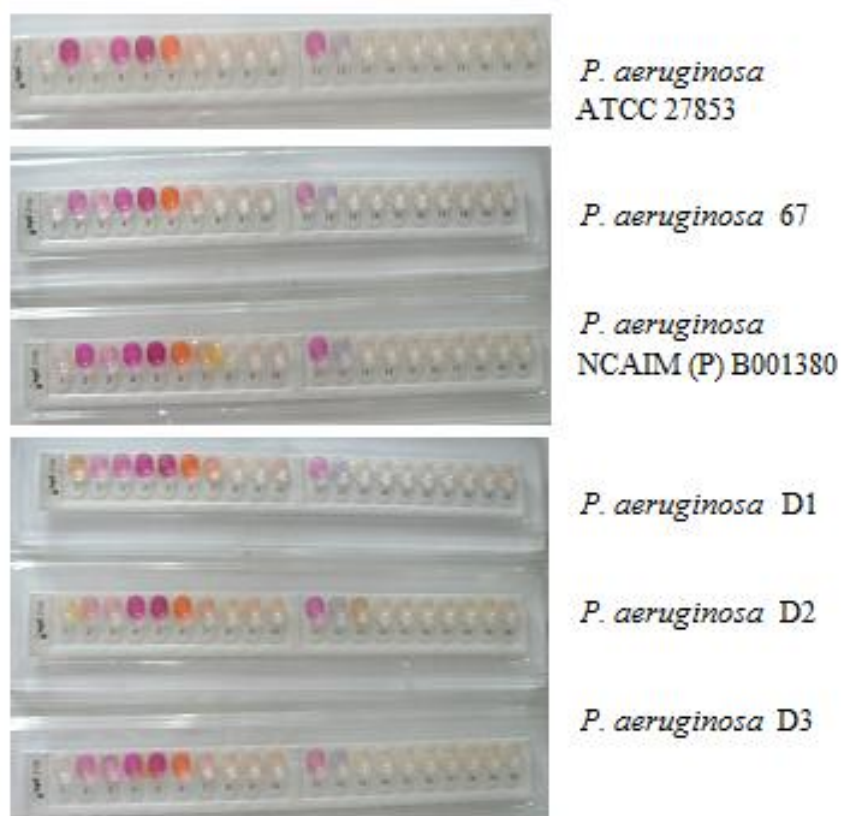
U tabeli 3.1. se vidi da su svi ispitivani izolati imali identičan identifikacioni profil, a posmatranjem pojedinačnih testova uočava se da je soj D3 imao pozitivan odgovor na usvajanje N-acetil glukozamina kao i referentni soj ATCC 27853. Na osnovu API identifikacije može se zaključiti da svi ispitivani sojevi pripadaju *P. aeruginosa*. Taksonomska karakterizacija soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 je urađena u ranijim studijama (Karazić *et al* 2004).

Tabela 3.1. API identifikacija *P. aeruginosa* sojeva D1, D2, D3 i 67 pomoću testa 20 API NE

API identifikacija		Soj				
Oznaka	TEST	ATCC 27853	67	D1	D2	D3
NO3	Nitrat do gasovitog azota	+	+	+	+	+
TRP	Produkcija indola	-	-	-	-	-
GLU	Razlaganje glukoze fermentacijom	-	-	-	-	-
ADH	Arg dihidrolaza	+	+	+	+	+
URE	Ureza	-	+	+	+	+
ESC	Eskulin hidrolaza	-	-	-	-	-
GEL	Degradacija želatina	+	+	+	+	+
PNPG	β -galaktozidaza	-	-	-	-	-
GLU	Usvajanje glukoze	+	+	+	+	+
ARA	Usvajanje arabinoze	-	-	-	-	-
MNE	Usvajanje manoze	-	-	-	-	-
MAN	Usvajanje manitola	+	+	+	+	+
NAG	Usvajanje N-acetilglukozamina	+	-	-	-	+
MAL	Usvajanje maltoze	-	-	-	-	-
GNT	Usvajanje glukonata	+	+	+	+	+
CAP	Usvajanje kaprata	+	+	+	+	+
ADI	Usvajanje adipata	+	+	+	+	+
MLT	Usvajanje malata	+	+	+	+	+
CIT	Usvajanje citrata	+	+	+	+	+
PAC	Usvajanje fenilacetata	-	-	-	-	-
OX	Citohrom-oksidaza	+	+	+	+	+
API 20 NE	Identifikacioni profil	1 154	1 354	1 354	1 354	1 354
		575	475	475	475	575

Tabela 3.2. API identifikacija *P. aeruginosa* sojeva NCAIM (P) B 001380, D1, D2, D3, 67, ATCC 27853 pomoću testa API ZYM 25 200

Test		Soj					
Enzimski esej	Supstrat	ATCC 27853	67	D1	D2	D3	NCAIM (P)B001380
Alkalna fosfataza	2-naftil fosfat	+	+	+	+	+	+
Esteraza (C4)	2-naftil butirat	+	+	+	+	+	+
Esteraza lipaza (C8)	2-naftil kaprilat	+	+	+	+	+	+
Lipaza (C14)	2-naftil miristat	+	+	+	+	+	+
Leucin arilamidaza	L-leucil-2-naftilamid	+	+	+	+	+	+
Valin arilamidaza	L-valil-2-naftilamid	+	+	+	+	+	+
Cistin arilamidaza	L-cistil-2-naftilamid	-	-	-	-	-	-
Tripsin	N-benzoil-DL-arginin-2-naftilamid	-	-	-	-	-	-
α -himotripsin	N-glutaril-fenilalanin-2-naftilamid	-	-	-	-	-	-
Kisela fosfataza	2-naftil fosfat	+	+	+	+	+	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaza	Naftol-AS-BI-fosfat	-	-	-	-	-	-
α -galaktozidaza	6-Br-2-naftil- α D-galaktopiranozid	-	-	-	-	-	-
β -galaktozidaza	2-naftil- β D-galaktopiranozid	-	-	-	-	-	-
β -glukuronidaza	Naftol-AS-BI- β D-glukuronid	-	-	-	-	-	-
α -glukozidaza	1-naftil-N-acetil- α D-glukozaminid	-	-	-	-	-	-
β -glikozidaza	6-Br-2-naftil- β D-glukopiranozid	-	-	-	-	-	-
N-acetil- β -glikozamidaza	1-naftil-N-acetil- β D-glukozaminid	-	-	-	-	-	-
α -manozidaza	6-Br-2-naftil- α D-manopiranozid	-	-	-	-	-	-
α -fukozidaza	2-naftil- α L-fukopiranozid	-	-	-	-	-	-



Slika 3.1. Rezultati testa API ZYM 25 200 za identifikaciju *P. aeruginosa* sojeva NCAIM (P) B 001380, D1, D2, D3, 67 i ATCC 27853.

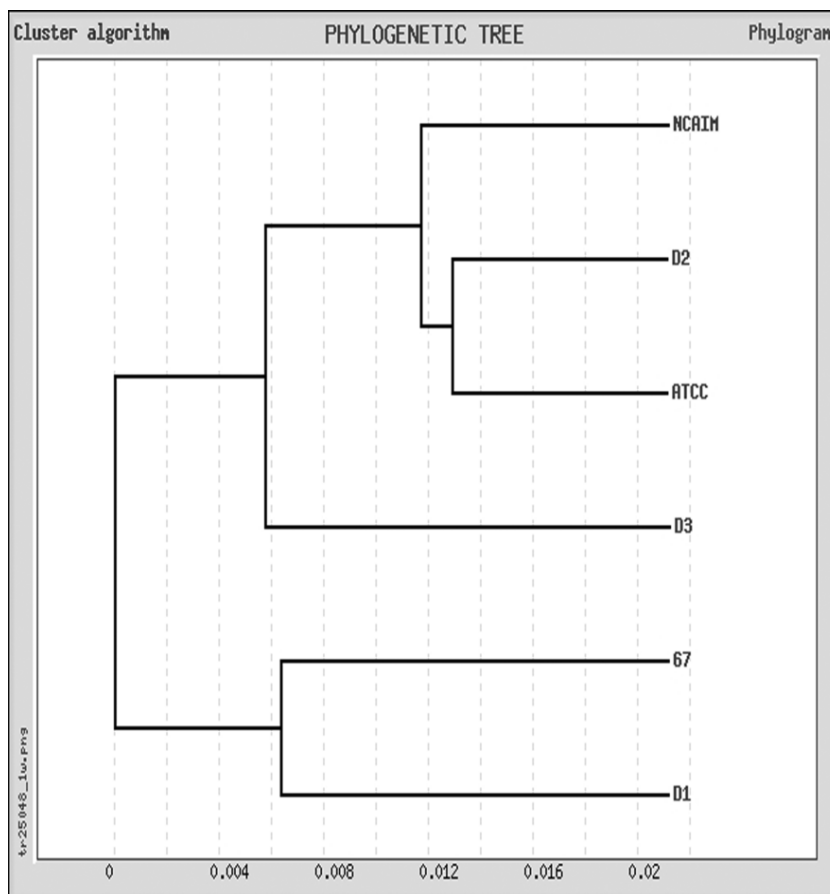
Na dodatnom biohemijskom testu API ZIM svi sojevi su dali identičan profil (tabela 3.2. i slika 3.1.). Kako je *P. aeruginosa* ATCC 27853 u specifikaciji testa naveden kao kontrola, može se zaključiti da svi ispitivani sojevi pripadaju *P. aeruginosa*.

3.1.2. Molekularna karakterizacija

Sekvence 16S rRNK izolovanih sojeva su deponovane u NCBI GenBank pod sledećim pristupnim (accession) brojevima: JN995661 (soj 67), JN995662 (soj D1), JN995663 (soj D2), JN995664 (soj D3) i JQ012798 (soj NCAIM (P) B 001380), (sekvence 16S rRNK su date u Prilogu).

U cilju razumevanja filogenetske bliskosti sojeva konstruisano je filogenetsko drvo. Filogram je pokazao da analizirani sojevi *P. aeruginosa*

formiraju dve grupe, jednu čine sojevi 67 i D1, a drugu sojevi ATCC 27853, NCAIM (P) B001380, D2 i D3. Interesantno je da sojevi konzorcijuma (D1, D2, D3) iako imaju identično poreklo pokazuju filogenetsku udaljenost: soj D1 je u grupi sa sojem 67, soj D3 u okviru druge grupe odvojen kao samostalna grana, dok D2 je najbliži sa kliničkim sojem ATCC 27853 (slika 3.2.)



Slika 3.2. Filogram za sojeve *P. aeruginosa* NCAIM (P) B001380, D1, D2, D3, 67 i ATCC 27853 dobijen pomoću klaster algoritma zasnovanog na distancama (PHYLIP program, distance based Neighbor-Joining and UPGMA methods).

Biohemijska i molekularna karakterizacija izolovanih sojeva *P. aeruginosa* potvrdila je da svi sojevi pripadaju vrstama *P. aeruginosa* iz grupe I, koja je nazvana "pravi Pseudomonasi" ili "*Pseudomonas sensu stricto*" (Moor et al 2006). Takođe, pokazalo se da između sojeva postoje određene filogenetske korelacije.

3.1.3. Produkcija površinski aktivnih supstanci pomoću ekoloških izolata *P. aeruginosa*

Sposobnost za produkciju biosurfaktanata kod izolata *P. aeruginosa* i referentnog soja ATCC 27853 praćena je određivanjem koeficijenta površinske aktivnosti u fermentacionim tečnostima kako bi se utvrdio potencijal sojeva da produkuju površinski aktivna jedinjenja u količini dovoljnoj za dalje istraživanje biosurfaktana u cilju njihove komercijalne upotrebe. U tabeli 3.3. je data površinska aktivnost fermentacionih tečnosti ekoloških izolata *P. aeruginosa* i referentnog kliničkog soja ATCC 27853.

Tabela 3.3. Površinska aktivnost fermentacionih tečnosti ekoloških izolata i referentnog soja nakon 96 h rasta na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika i peptonom I, kao izvorom azota

Soj	Površinska aktivnost fermentacione tečnosti, mN/m
<i>P. aeruginosa</i> D1	39,9±0,9
<i>P. aeruginosa</i> D2	39,1±0,9
<i>P. aeruginosa</i> D3	36,3±0,9
<i>P. aeruginosa</i> 67	38,1±1,1
<i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380	38,9±1,1
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	37,3±1,1

Fermentacione tečnosti sojeva pokazale su površinske aktivnosti u opsegu od 36,3 do 39,9 mN/m (tabela 3.3.). Različite vrednosti koeficijenta površinske aktivnosti bi mogle da ukazuju na fenotipske varijacije između samih izolata, kao i između njih i kliničkog, referentnog soja, koje su u vezi sa produkcijom (Górna *et al* 2011) i sastavom biosurfaktanta (Dubeau *et al* 2009). Dobijene vrednosti za površinsku aktivnost su u skladu sa publikovanim podacima (Górna *et al* 2011; Nie *et al* 2010).

3.2. Selekcija tipa podloge i optimizacija produkcije ramnolipida pomoću soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380

Soj *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380, prvobitno označen kao san ai i izolovan iz mineralnog ulja za sečenje metala, izabran je za selekciju podloge i optimizaciju produkcije ramnolipida, zbog toga što je prethodnim istraživanjima okarakterisan kao producent nekoliko metabolita koji su pokazali potencijal za industrijsku primenu (Karadzic *et al* 2004,2006; Dimitrijevic *et al* 2011).

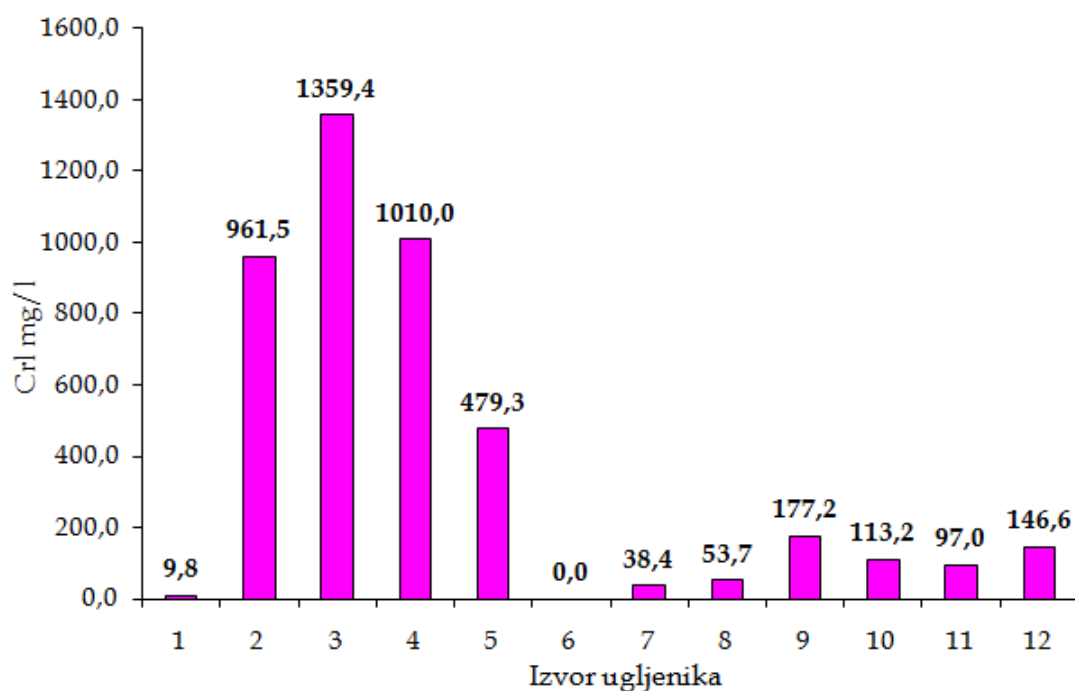
3.2.1. Selekcija osnovne podloge

Sojevi roda *Pseudomonas* proizvode ramnolipide kao sekundarne metabolite, a produkcija, između ostalog, zavisi i od sastava podloge, posebno od izvora ugljenika i azota, kao i od ukupnog C/N odnosa (Abouseoud *et al* 2008; Rashedi *et al* 2006; Santa Anna *et al* 2002; Soberón-Chávez *et al* 2005). Podloge LB, MSM i PPAS su ispitivane u cilju pronalaženja najbolje osnovne podloge koja bi dalje bila optimizovana (izvori ugljenika i azota) za produkciju ramnolipida pomoću soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380. U svim podlogama izvor ugljenika je bilo maslinovo ulje, koje se u literaturi pokazalo kao najbolji supstrat za produkciju ramnolipida (Soberón-Chávez *et al* 2005). Produkcija ramnolipida na LB, MSM i PPAS podlozi je bila 15,5; 10,7 i 1010,4 mg/l, redom, pa je PPAS izabrana kao najbolja osnovna podloga za produkciju ramnolipida. Dobijeni rezultat je bio u skladu sa publikovanim podacima (Gunther *et al* 2005).

3.2.2. Određivanje optimalnih izvora ugljenika i azota

3.2.2.1. Uticaj izvora ugljenika na produkciju ramnolipida

Na slici 3.3. su prikazani rezultati dobijeni ispitivanjem različitih izvora ugljenika (suncokretovog ulja, maslinovog ulja, ulja za sečenje metala, kombinacije ulja za sečenje metala i glukoze, kerozina, iskorišćenog suncokretovog ulja nakon prženja, etanola, glukoze, glicerola, kombinacije glukoze i suncokretovog ulja i otpadnih frakcija iz rafinerije suncokretovo ulja (SOME 1 i SOME 2) na PPAS podlozi. Histogram pokazuje najveći prinos ramnolipida na suncokretovom (1,35 g/l) i maslinovom ulju (1,01 g/l). Takođe,



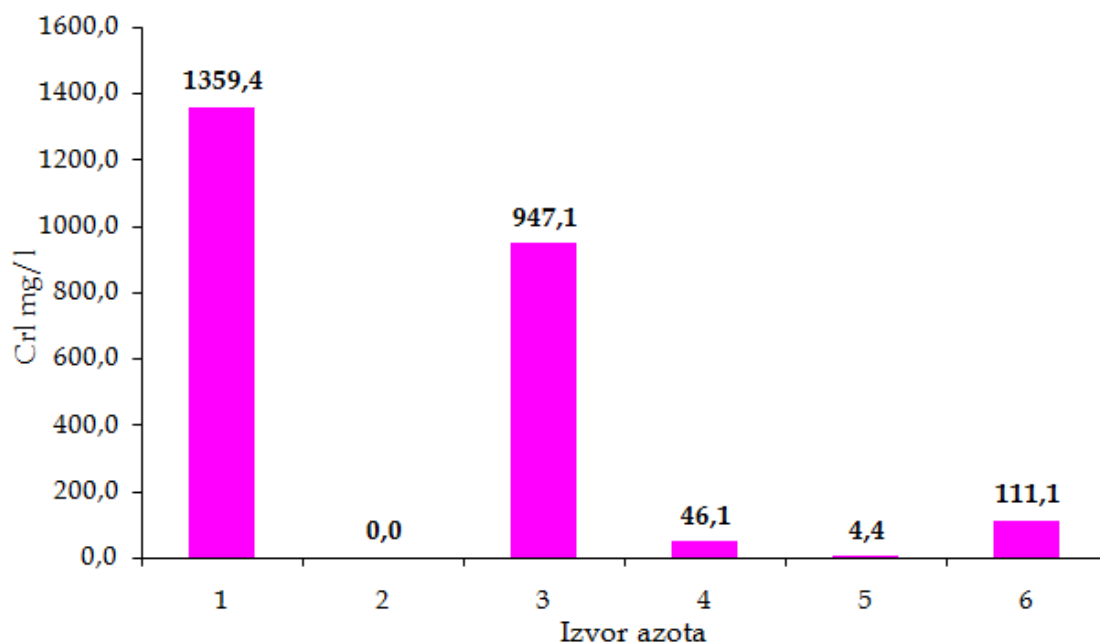
Slika 3.3. a) Uticaj različitih izvora ugljenika na produkciju ramnolipida pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380. PPAS podloga sa (2%) : 1 - kerozin, 2 - suncokretovo ulje nakon prženja, 3 - suncokretovo ulje, 4 - maslinovo ulje, 5 - suncokretovo ulje i glukoza, 6 - ulje za sečenje metala i glukoza, 7 - etanol, 8 - glicerol, 9 - glukoza, 10 - SOME 1, 11 - SOME 2; 12 - 0,5 % glukoza (originalni PPGAS).

visoka produkcija je postignuta na suncokretovom ulju nakon prženja (0,96 g/l), što ukazuje na mogućnost produkcije RL iz otpadnih sirovina. Niska produkcija RL je dobijena na SOME 2 i ostalim izvorima ugljenika (glicerol,

etanol, glukoza, kerozin, ulje za sečenje matala, glukoza u kombinaciji sa suncokretovim uljem). Zbog toga je suncokretovo ulje odabrano za optimalni izvor ugljenika.

3.2.2.2. Uticaj izvora azota na produkciju ramnolipida

Korišćenjem PPAS kao osnovne podloge i suncokretovog ulja kao izvora ugljenika, ispitan je efekat šest različitih izvora azota (surutka, mesni ekstrakt, ekstrakt kvasca, sojino brašno i pepton I) na produkciju RL. Preliminarni eksperimenti sa ureom, natrijum-nitratom i amonijum-hloridom kao jedinim izvorima azota su pokazali da ovi izvori nisu pogodni ni za minimalni bakterijski rast, pa je i produkcija RL je bila izuzetno niska. Slika 3.4.



Slika 3.4. Uticaj različitih izvora azota na produkciju ramnolipida pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380. PPAS podloga sa 2 % suncokretovim uljem uz dodatak (1%): 1 – pepton I (kontrola), 2 – surutka, 3 – mesni ekstrakt, 4 – ekstrakt kvasca, 5 – sojino brašno, 6 – tripton.

pokazuje da je najveća produkcija ramnolipida postignuta na peptonu I (1,35 g/l) i mesnom ekstraktu (0,95 g/l). Produkcija na ostalim izvorima azota

(surutka, ekstrakt kvasca i sojino brašno) je bila ili niska ili nedovoljna za spektrofotometrijsku detekciju. Zbog toga je pepton I izabran kao optimalni izvor azota.

Eksperimenti su pokazali da su biljna ulja i njihov otpad, kao izvori ugljenika, a pepton I, kao organski izvor azota, dobri supstrati za produkciju ramnolipida pomoću soja NCAIM. Dobijeni rezultati se razlikuju od literaturnih, gde se glukoza, glicerol i maslinovo ulje u kombinaciji sa neorganskim azotom navode kao izvori koji su pogodni za produkciju ramnolipida (Robert *et al* 1989; Rahman *et al* 2002; Rashedi *et al* 2006; Santa Anna *et al* 2002; Tahzibi *et al* 2004). Osim toga, za različite sojeve *P. aeruginosa*, literatura pokazuje da industrijski otpad i bioproducti (surutka, melasa, "soap stock", ulje nakon prženja, tečnost nakon otečnjavanja kukuruza) predstavljaju dobre supstrate za produkciju ramnolipida (tabela 1.5. Pregled literature).

Poređenje produkcije ramnolipida pomoću *P. aeruginosa* NCAIM koji je gajen na LB podlozi, koja je često korišćena podloga i optimizovanoj PPAS podlozi, koja je bila 15 i 3000 mg/l, redom, jasno je pokazalo potencijal *P. aeruginosa* NCAIM za komercijalnu produkciju ramnolipida.

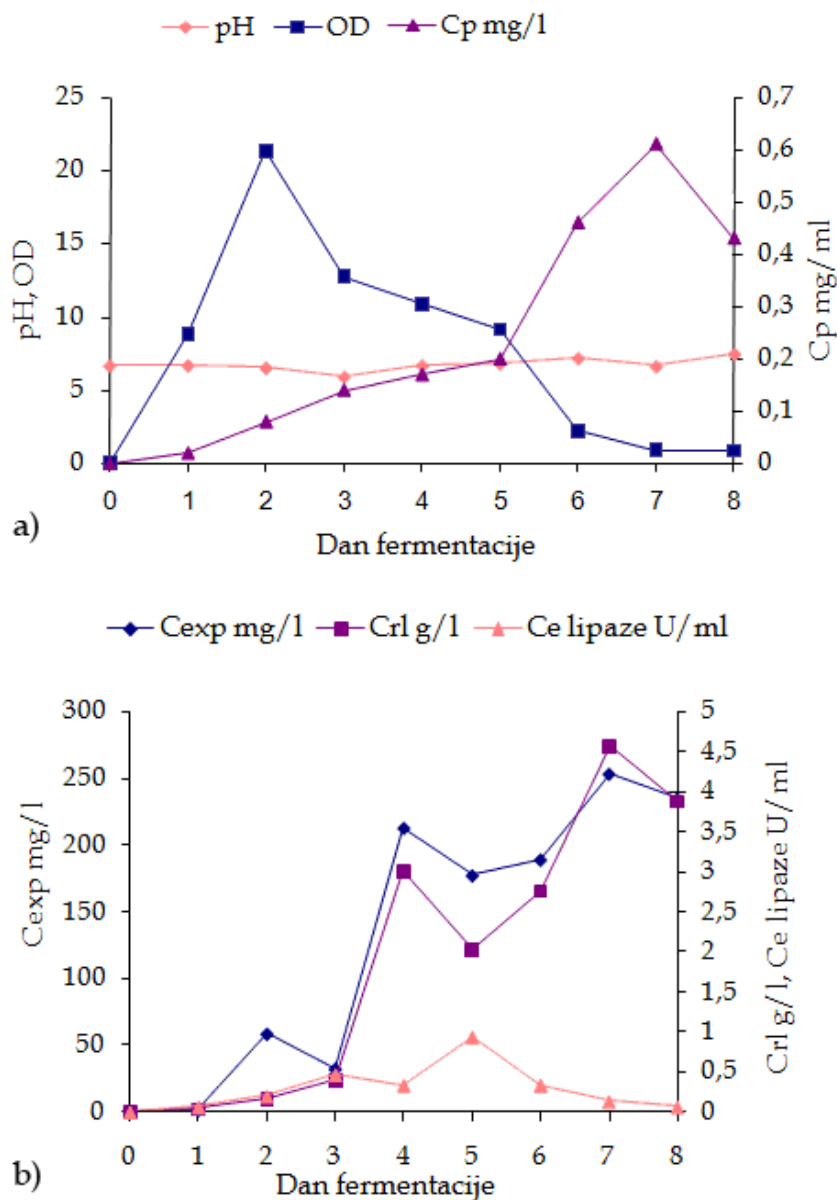
3.2.3. Dinamika fermentacije na optimalnoj podlozi

3.2.3.1. Dinamika fermentacija *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 na optimalnoj podlozi

Na slici 3.5. je prikazana produkcija RL pomoću *P. aeruginosa* NCAIM na optimalnoj podlozi (PPAS sa suncokretovim uljem, ako izvorom ugljenika i amonijum-hloridom i peptonom I kao izvorom azota) u trajanju od 8 dana.

Na slici 3.5.a), koja pokazuje parametre rasta (pH, rast mikroorganizma i koncentraciju proteina), može se videti da se vrednost pH fermentacione tečnosti kretala u opsegu od 6,65 prvog dana do blago alkalne vrednosti 7,2. Koncentracija proteina je imala tokom prvih 5 dana postepen rast od 0,02 do 0,17 mg/ml, da bi u periodu od petog do osmog dana rasla od 0,43 do 0,67

mg/ml, što je posledica prelaska populacije od eksponencijalne ka stacionarnoj i na kraju ulaska u fazu odumiranja, kada dolazi do lize ćelija, što se poklapa i sa vrednostima dobijenim za rast mikroorganizma.



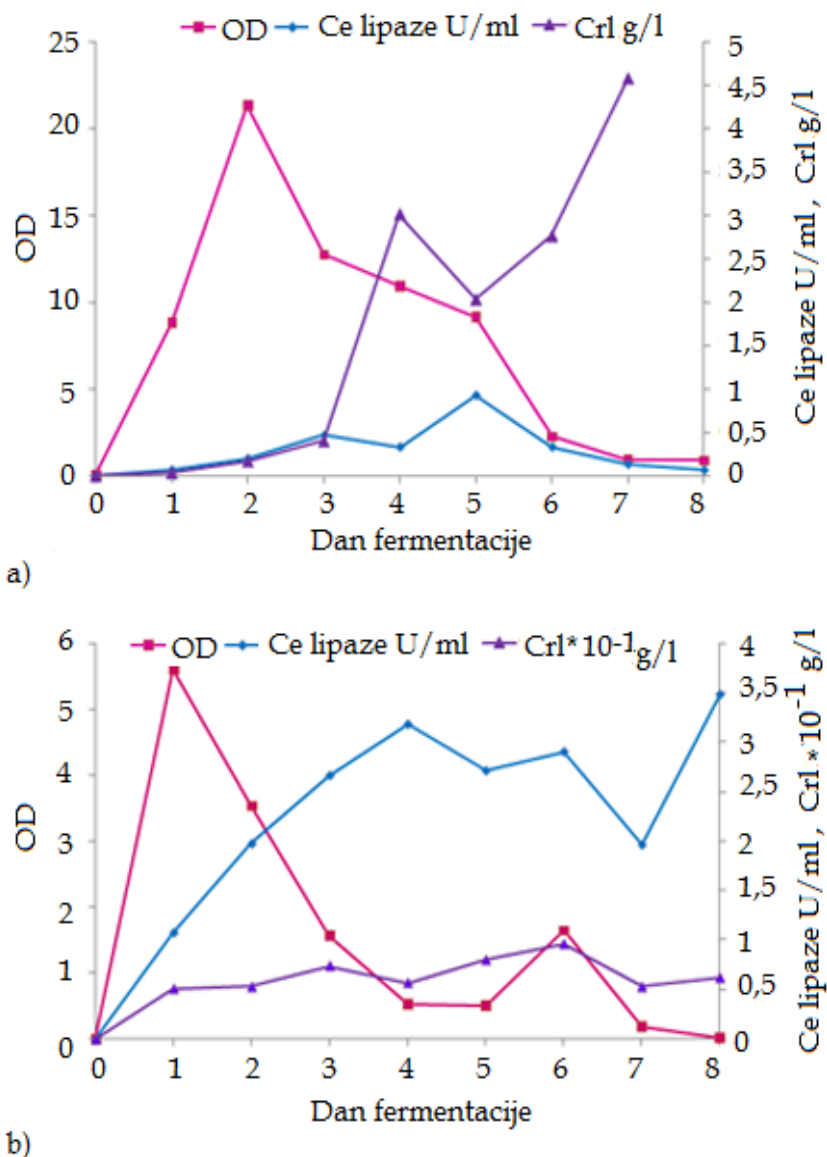
Slika 3.5. Dinamika fermentacije na optimizovanoj PPAS podlozi (izvor ugljenika suncokretovo ulje, izvor azota pepton I): a) parametri rasta pH vrednost, OD - optička gustina i Cp - koncentracija proteina; b) sekundarni metaboliti Cexp - koncentracija egzopolisaharida, Crl - koncentracija ramnolipida i Ce lipaze - enzimaska aktivnost lipaze.

Na slici 3.5. b) prikazani su sekundarni ekstracelularni metaboliti egzopolisaharid, ramnolipid i lipaza. Očekivano, značajna produkcija sekundarnih metabolita, pa i ramnolipida počela je nakon trećeg dana fermentacije, kada je bakterijska populacija ušla u stacionarnu fazu rasta, što se slaže sa činjenicom da se RL kao sekundarni metaboliti proizvode nakon faze intenzivnog rasta. Koncentracija RL (Cr1) je varirala tokom fermentacije sa maksimalnom vrednošću četvrtog dana (3,0 g/l) kada je rast mikroorganizma bio intenzivan (OD - 2,2) dok je sedmog dana koncentracija bila 4,6 g/l, sa slabim rastom mikroorganizma (OD - 0,25) što ukazuje na lizu ćelija (slika 3.5. a i b). Takođe, na slici 3.5.a se može videti da koncentracija egzopolisaharida ima sličnu dinamiku produkcije kao i ramnolipid, ali sa značajno nižim koncentracijama za maksimum (213,0 mg/l četvrtog dana), dok se maksimum sedmog dana može smatrati, kao i za ramnolipid, rezultatom lize ćelija. Vrednosti za lipolitičku aktivnost su bile relativno niske, a maksimum produkcije lipaze je bio petog dana, kada su koncentracije biosurfaktanta (ramnolipida i egzopolisaharida) bile u padu.

3.2.3.2. Poređenje dinamika fermentacije *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 na optimizovanoj PPAS i LB podlozi

Poređenjem dinamika fermentacije (OD, Cr1 i Ce lipaze) na optimizovanoj PPAS podlozi (slika 3.6.a) i često korišćenoj LB podlozi (slika 3.6.b) uočavaju se razlike. Bakterijska kultura je bila aktivnija na optimizovanoj podlozi, koja je dala 4 puta veći rast (4 puta veća vrednost za OD) i favorizovala produkciju ramnolipida (povećanje 30 puta) u odnosu na LB podlogu. Interesantno je, da je sa druge strane, LB podloga bila pogodnija za biosintezu lipaze. Uočene razlike između rasta i produkcije RL i produkcije lipaze su povezane sa „cell to cell“ komunikacijom. Naime, kao što je već pomenuto ramnolipidi imaju vitalnu ulogu u regulaciji genske ekspresije regulisane gustinom ćelijske populacije, odnosno QS, (Duan and Surrete 2007). Uočene promene u gustini ćelija i izmenjena enzimski aktivnosti lipaze, kao indikatora

QS odgovora na promene u okolini jasno pokazuju da efekat hranljivih supstanci može biti posmatran u kontekstu regulacije okoline QS sistema kod *P. aeruginosa*.



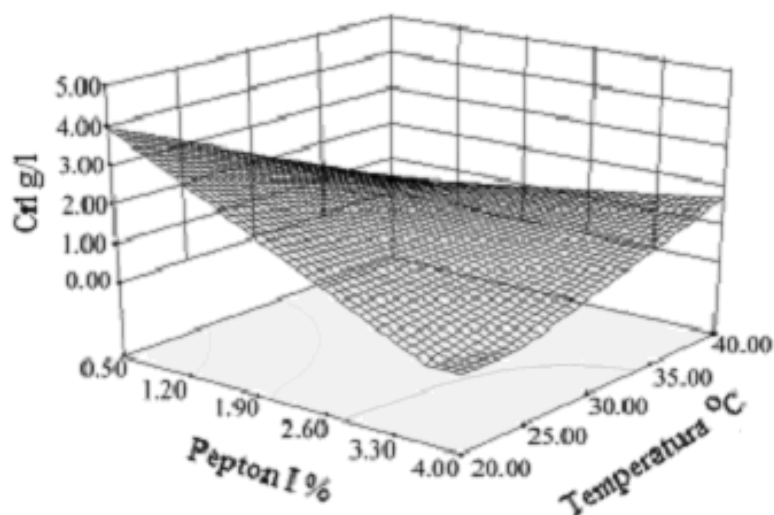
Slika 3.6. Dinamika rasta (OD), produkcije ramnolipida (Crl) i enzimske aktivnosti lipaze (Ce) *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 na: a) optimizovanoj PPAS podlozi (suncokretovo ulje i pepton I) i b) LB podlozi.

3.2.4. RSM (Response Surface Methodology) optimizacija

Najveća produkcija ramnolipida postignuta u pristupu sa jednim faktorom (tj. variranjem jednog faktora - samo izvora ugljenika ili samo izvora azota, eksperimentalno bez statistike) bila je 3,0 g/l. Analize efekta temperature i koncentracije izvora ugljenika i azota na optimizovaoj PPAS podlozi urađena je pomoću metodologije RSM eksperimentalnog dizajna. Sličan pristup koji je zasnovan na kombinaciji jednog faktora i statističkog RSM dizajna je publikovan relativno skoro (Wei *et al* 2008). Za RSM analizu urađeno je 17 eksperimenata pomoću dizajna po Box-Behnken (BC) sa tri faktora. Dobijene vrednosti F (3,51) i P testa (0,0389) pokazale su da je model adekvatan za opisivanje eksperimentalnih rezultata, a P vrednost BC uslova modela (kombinacija temperature i koncentracije azota) koja je bila 0,0167, bila je statistički značajna. Jednačina statističkog modela bila je:

$$Y = 1,42 - 0,50A - 0,78B - 0,36C + 1,06 AB + 0,37AC + 1,44BC$$

gde A , B , C i Y odgovaraju sadržaju suncokretovog ulja i peptona I, %, temperaturi, °C, and koncentraciji ramnolipida, g/l, redom.



Slika 3.7. 3D grafik: uticaj temperature i koncentracije izvora azota, sa 3,5 % koncentracijom izvora ugljenika, na produkciju ramnolipida pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380.

Rezultati eksperimenata za dobijanje RSM modela su prikazani u tabeli 3.4. 3D dijagram na slici 3.7. pokazuje efekat peptona I i temperature (suncokretovo ulje 3,5%). Kao optimalni odgovor pomoću RSM predviđeno je 4,07 g/l ramnolipida, koji je dobijen sa 3,5 % suncokretovog ulja i 0,5 % peptona (odnos C/N 12,83), na 20 °C. Sa 1 % suncokretovog ulja i 0,5 % pepton I (odnos C/N 5,68) na 30 °C, koncentracija ramnolipida je bila 3,0 g/l. C/N odnosi na osnovnoj, optimizovanoj sa jednom faktorom i RSM optimizovanoj PPAS podlozi sa najvećim prinosom ramnolipida su bili 4; 7,7 i 12,83, redom. Ovaj podatak je u skladu sa činjenicom da povišen C/N odnos daje veću produkciju ramnolipida (Chayabutra *et al* 2001; Soberón-Chávez *et al* 2005; Thazibi *et al* 2004). Ipak, produkcija ramnolipida uslovljena C/N odnosom je i pod uticajem temperature, što se vidi iz tabele 3.4.

Tabela 3.4. RSM dizajn po Box-Behnken metodi: produkcija ramnolipida na optimizovanoj PPAS podlozi sa ukupnim C/N odnosom po eksperimentu

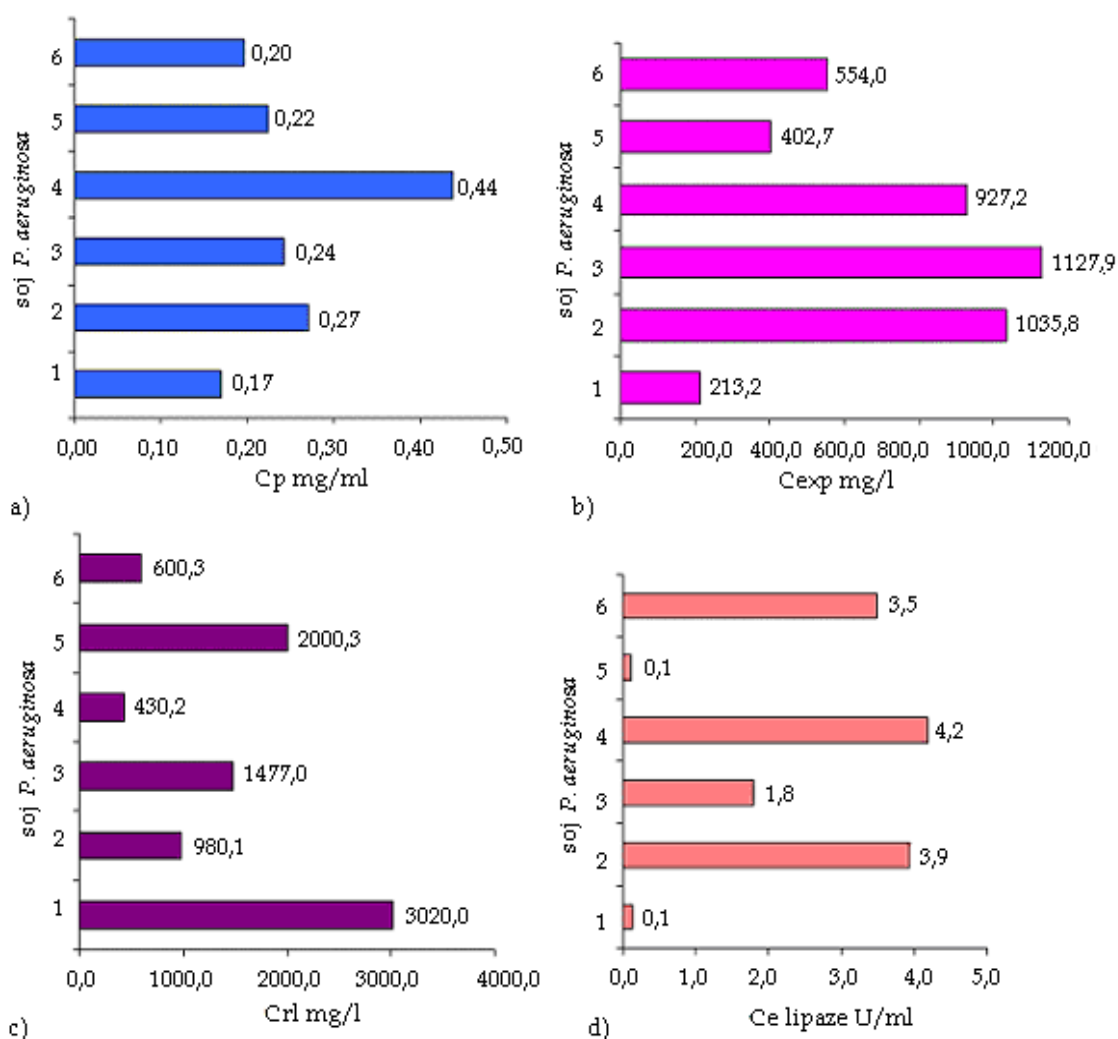
Eksperiment	Izvor ugljenika, %	Izvor azota, %	Temperatura, °C	Ukupni C/N odnos	CrI, g/l
1	6,00	4,00	30	9,78	0,36
2, 4, 9, 12, 14	3,50	2,25	30	8,73	1,59
3	3,50	0,50	20	12,83	4,07
5	6,00	0,50	30	19,51	0,00
6	3,50	4,00	20	7,10	0,83
7	6,00	2,25	20	12,55	0,26
8	1,00	2,25	20	4,83	0,68
10	3,50	4,00	40	7,10	1,56
11	6,00	2,25	40	12,55	1,72
13	1,00	0,50	30	5,68	3,00
15	3,50	0,50	40	12,83	0,05
16	1,00	2,25	40	4,83	0,67
17	1,00	4,00	30	4,39	0,56

Ranije publikovana optimizacija produkcije ramnolipida pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 na LB podlozi dala je prinos od samo 138 mg/l (Bezbradica *et al* 2009), dok je optimizacija urađena u ovom istraživanju, kombinovanjem jednog faktora sa statističkim pristupom, povećala je produkciju 30 puta.

3.2.5. Poređenje parametara dinamike fermentacije sojeva *P. aeruginosa* na optimizovanoj PPAS podlozi

U okviru preliminarne analize ekoloških izolata *P. aeruginosa*: NCAIM (P) B 001380, konzorcijuma D1-D3, soja 67 i kontrolnog soja ATCC upoređeni su produkcionni profili ne samo RL već i nekih od ekstracelularnih polimera: koncentracije proteina, egzopolisaharida, kao i enzimska aktivnost lipaze nakon 96 sati gajenja sojeva na optimizovanoj PPAS podlozi.

Na slici 3.8. a) na kojoj su prikazane koncentracije ekstracelularnih proteina za različite sojeve, vidi se da su to sve niske koncentracije, pri čemu je najveća koncentracija proteina bila za soj D3, dok su ostali sojevi imali slične vrednosti. Poređenjem produkcije biosurfaktanata (egzopolisaharida i ramnolipida) može se zaključiti da su najveću produkciju imali sojevi NCAIM (P) B 001380 i soj 67, članovi konzorcijuma D1 i D2, dok su sojevi D3 i ATCC 27853 imali nešto nižu produkciju (slika 3.8. b i c). Slika 3.8. d) pokazuje enzimsku aktivnost lipaze, kao QS enzima, koja je relativno niska sa najvećim vrednostima za sojeve D1, D3 i ATCC 27853. Uopšteno, može se zaključiti da svi ispitivani sojevi produkuju biosurfaktante (ramnolipidi i egzopolisaharidi), koja su na ovoj podlozi favorizovana zbog čega bi sojevi mogli biti upotrebljeni u biotehnološkim procesima produkcije biosurfaktanata.

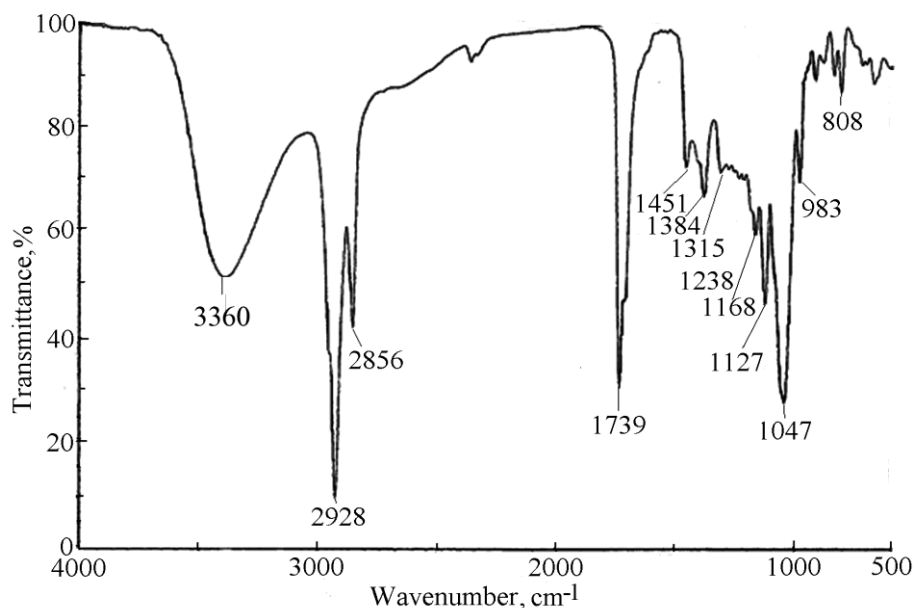


Slika 3.8. Poređenje parametara dinamike fermentacije ekoloških izolata *P. aeruginosa* NCAIM (P) B001380 (1), D1(2), D2 (3), D3 (4) i 67 (5) i kontrolnog soja ATCC 27853 (6) nakon 96 sati rasta na optimizovanoj PPAS podlozi: a) koncentracije proteina (Cp), b) koncentracije egzopolisaharida (Cexp), c) koncentracije ramnolipida (Crl), d) enzimska aktivnost lipaze (Ce lipaze).

Za fokus daljih istaživanja određena je jedna grupa prisutnih biosurfaktanata - ramnolipidi.

3.3. Strukturna karakterizacija i prečišćavanje ramnolipida iz *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380

3.3.1. Karakterizacija ramnolipida IR analizom



Slika 3.9. IR spektar ramnolipida: C-H istezanje (2928 i 2856 cm⁻¹), C=O istezanje (1739 cm⁻¹), C-H deformacije (1451, 1238 i 808 cm⁻¹), C-H/O-H deformacije (1384 cm⁻¹), O-H deformacije u ravni (1315 cm⁻¹), C-O istezanje (1168, 1127 i 1047 cm⁻¹), CH₃ deformacije (983 cm⁻¹).

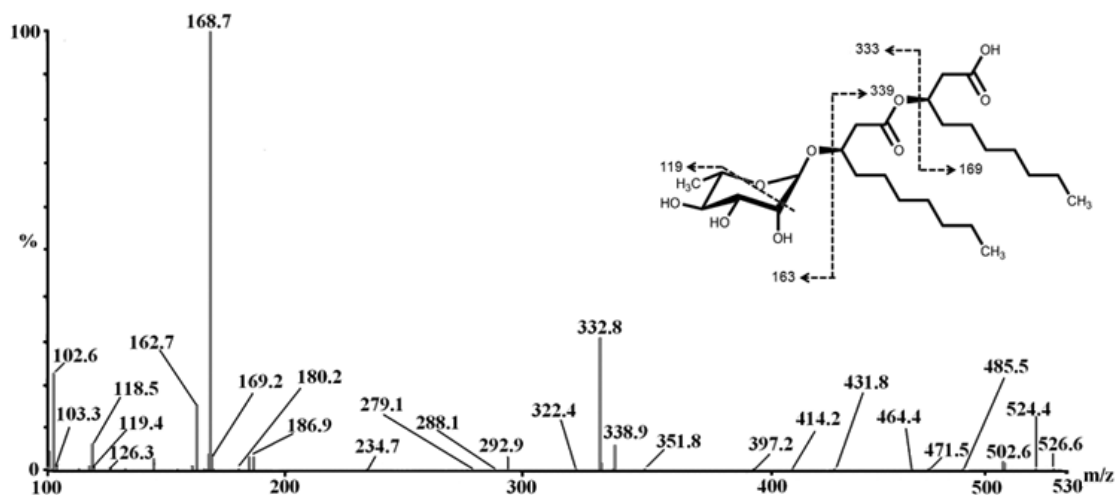
Na slici 3.9. je prikazan IR spektar ramnolipida dobijenih pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380. "Fingerprint" područje u oblasti od 400 do 1500 cm⁻¹ je pokazalo deformacije C-OH traka na 1384 cm⁻¹, O-H deformacije u ravni na 1315 cm⁻¹, O-C-O simetrične trake na 1047 cm⁻¹, C-O istezanje na 1168, 1127 i 1047 cm⁻¹, C-H deformacije na 1451, 1238 i 808 cm⁻¹ i CH₃ na 983 cm⁻¹. Takođe, uočene su i tipične vibracije COO⁻ grupe. Snažno simetrično istezanje C=O trake karboksilatne grupe ramnolipida je bilo vidljivo na 1739 cm⁻¹. IR spektar ramnolipida je dao apsorpcione trake na 3360 cm⁻¹ za simetrično O-H istezanje i vibracije na 2928 cm⁻¹ i 2856 cm⁻¹ tipičano za C-H

vibracije istezanja CH₂ i CH₃ grupa (slika 3.9.) Dobijeni rezultati se slažu sa publikovanim IR spektrom za ramnolipide (Leitermann *et al* 2008).

3.3.2. Karakterizacija mono- i di-ramnolipida tandem masenom spektrometrijom

Struktura ramnolipidnog biosurfaktanta dobijenog pomoću soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 je dalje analizirana tandem MS sa fragmentacijom izazvanom pomoću CID. Na slici 3.10. je prikazan tandem maseni spektar mono-ramnolipida Rha-C₁₀-C₁₀ (m/z=503) i način njegove fragmentacije.

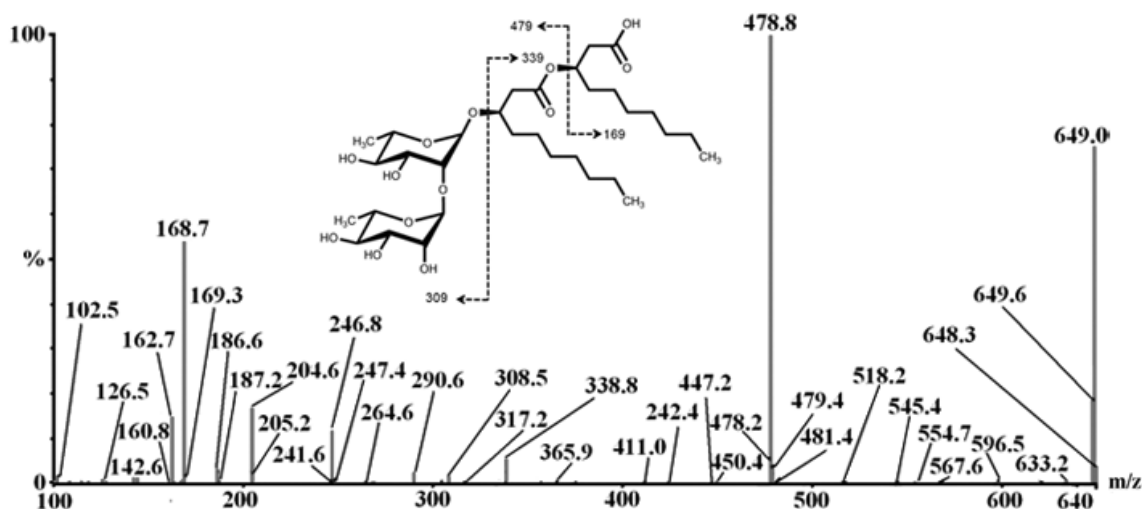
Kao što se na slici 3.10. vidi u MS² mono-ramnolipida Rha-C₁₀-C₁₀ (m/z=503), jasno se uočavaju fragmentni joni: 119, 163, 169, 333, 339. Ovim fragmentacionim profilom je nedvosmisleno dokazana ramnolipidna struktura biosurfaktanta Rha-C₁₀-C₁₀, koji produkuje *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380.



Slika 3.10. Tandem maseni spektar fragmentisanog mono-ramnolipida Rha-C₁₀-C₁₀ (m/z=503) i shema njegove fragmentacije.

Tandem maseni spektar di-ramnolipida Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ ($m/z=649$) i shematski prikaz njegove fragmentacije je prikazani na slici 3.11.

Kao što se na slici 3.11. u tandem masenom spektru di-ramnolipida Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ ($m/z=649$), jasno se uočavaju fragmentni joni: 119, 163, 169, 333, 339 i 479. Ovim je nedvosmisleno dokazana ramnolipidna struktura biosurfaktanta Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, koji proizvodi *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380.



Slika 3.11. Tandem maseni spektar fragmentisanog di-ramnolipida Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ ($m/z=649$) i shema njegove fragmentacije.

3.4. Produkcioni profili ramnolipida ekoloških izolata dobijeni pomoću MALDI-TOF analize

Potreba za pronalaženjem alternativnih sojeva koji proizvode ramnolipide dovela je do neophodne upotrebe strukturnih analiza i prilagođavanja analitičkih metoda. Veliki uspeh masene spektrometrije u biološkim naukama i intenzivan razvoj lipidomiksa doveo je razvoju MS kao analitičke platforme za raznovrsna istraživanja ramnolipida. MALDI-TOF MS se razvio kao nova tehnika za brza "high-throughput skrining" uzoraka koji

sadrže ramnolipide i sojeva koji ih proizvode. MALDI-TOF MS istraživanja se uspješno potvrđuju pomoću GC/MS, HPLC i IR spektroskopije, zbog čega su pogodna za brzu početnu analizu (Price *et al* 2009). MALDI TOF se pokazao kao efikasan method za "large scale" identifikaciju ramnolipida, iako metoda ima nedostatak budući da ne može da razlikuje pozicione (Rha-C₈-C₁₀ i Rha-C₁₀-C₈) i funkcionalni izomere (Rha-C₁₀-C_{14:1} i Rha-C₁₂-C_{12:1}).

3.4.1. MALDI-TOF poređenje profila ukupnog ekstrakta i frakcije prečišćenih ramnolipida dobijenih pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380

Ramnolipidi iz *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 su izolovani iz fermentacione tečnosti nakon gajenja na eksperimentalnoj optimizovanoj PPAS podlozi (2% suncokretovo ulje kao izvor ugljenika i 1% pepton) na 30 °C u trajanju od 96 h. Sirovi ekstrakt i prečišćena mono-RL frakcija su analizirane pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije. Spektri ramnolipida koji su detektovani u sirovom ekstraktu i prečišćenoj frakciji su prikazani na slici 3.12. a) i b), redom. Očekivano, u čistoj frakciji su bili prisutni samo mono-RL: Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-C₁₀-C₁₀-CH₃ and Rha-C_{12:2}, dok je sirovi ekstrakt sadržao i mono- i di-ramnolipine strukture. Sirovi ekstrakt u poređenju sa čistom frakcijom daje kompletan RL profil (što se može označiti i kao ukupni ramnolipidom) za proizvodeći soj *P. aeruginosa*. Generisani MS spektar je pokazao da je ova metoda pogodna za preliminarno skeniranje ukupnog ramnolipidoma, kao i da je sirovi ekstrakt, dobijen jednostavnim procedurom izolovanja, dobar preparat za MS analizu.

U tabeli 3.5. su prikazani ramnolipidi uočeni u masenom spektru sirovog ekstrakta. Detaljna analiza je pokazala prisustvo mono-ramno-di-lipidnih struktura: Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂ and Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₆-C₁₆ kao [M+Na]⁺ adukt jona na m/z 499, m/z 527, m/z 555, m/z 553 i m/z 695, redom. [M+2Na-H]⁺ adukt joni su detektovani za Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-C₁₀-C_{12:1} na m/z 521, m/z 549 i m/z 575, redom. Kao što je generalno slučaj sa MALDI-TOF MS analizom glikolipida, sporadično su primećeni i [M+K]⁺

adukt joni na m/z 543, m/z 569, m/z 711 i m/z 695 za Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₆-C₁₆ i dekanoil-Rha-C₁₀-C₁₀, redom.

Tabela 3.5. Ukupni ramnolipidom sirovog ekstrakta iz *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 detektovan pomoću MALDI-TOF MS

Molekulska formula	Molekulska masa	Ramnolipidna struktura
C ₂₄ H ₄₄ O ₉	476,60	Rha-C ₈ -C ₁₀ /Rha-C ₁₀ -C ₈ ^a
C ₂₆ H ₄₈ O ₉	504,65	Rha-C ₈ -C ₁₂ /Rha-C ₁₂ -C ₈ //Rha-C ₁₀ -C ₁₀ ^b
C ₂₈ C ₅₀ O ₉	530,69	Rha-C ₁₀ -C _{12:1} /-Rha-C _{12:1} -C ₁₀
C ₂₈ H ₅₂ O ₉	532,71	Rha-C ₁₀ -C ₁₂ /Rha-C ₁₂ -C ₁₀
C ₃₈ H ₇₂ O ₉	672,97	Rha-C ₁₆ -C ₁₆
C ₂₇ H ₅₀ O ₉	518,68	Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃
C ₃₆ H ₆₄ O ₁₀	656,89	dekanoil-Rha-C ₁₀ -C ₁₀
C ₁₈ H ₃₀ O ₇	358,68	Rha-C _{12:2}
C ₃₀ H ₅₄ O ₁₃	622,74	Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀ /Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈
C ₃₂ H ₅₈ O ₁₃	650,79	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀
C ₃₄ H ₆₀ O ₁₃	676,83	Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1} /Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀
C ₃₄ H ₆₄ O ₁₃	678,84	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂ /Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₀
C ₄₀ H ₇₄ O ₁₃	763,00	Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄
C ₂₄ H ₄₄ O ₁₁	508,60	Rha-Rha-C ₁₂

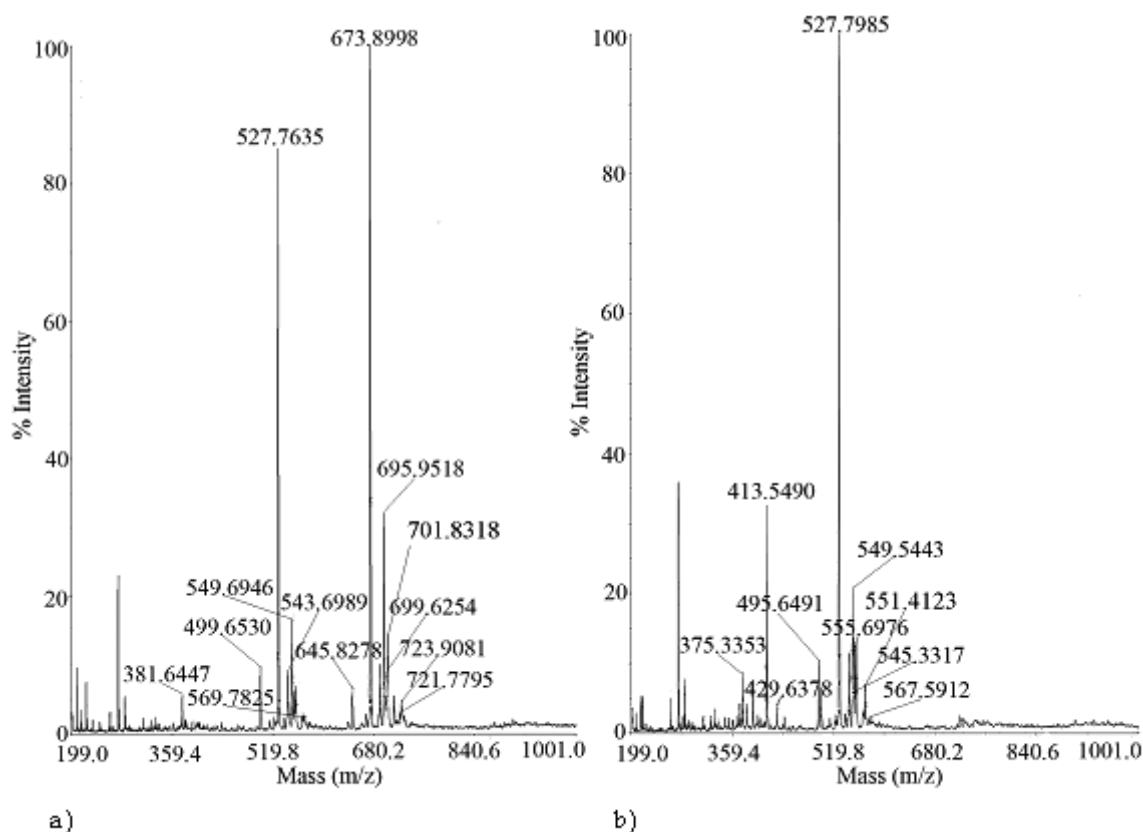
Strukture koje ne mogu biti razlikovane pomoću MALDI TOF:

^a Pozicioni izomeri ramnolipida za sve različite hidroksi-masne kiseline (npr. Rha-C₈-C₁₀ i Rha-C₁₀-C₈) prikazani su kao Rha-C₈-C₁₀/Rha-C₁₀-C₈.

^b Svi izomeri su prikazani odvajanjem pozicionih od funkcionalnih (npr Rha-C₁₀-C₁₄ i Rha-C₁₂-C₁₂) kao: Rha-C₁₀-C₁₄/ Rha-C₁₄-C₁₀//Rha-C₁₂-C₁₂.

[M+Na]⁺ adukt joni su primećeni za di-ramno-di-lipidne strukture Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1} i Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ na m/z 645, m/z 673, m/z 699 i m/z 701, redom. [M-H+2Na]⁺ adukt joni su detektovani na m/z 667, m/z 695, m/z 721 i m/z 723. [M+K]⁺ adukt jon je detektovan na m/z 689. Osim ramnolipida koji su opisani i dobro okarakterisani (Haba *et al* 2003a; Heyd *et al* 2008), uočeni su joni i nekih drugih ramnolipidnih struktura. [M+Na]⁺ adukt joni mono-ramno-di-lipidnih struktura su detektovani za Rha-

C₁₀-C₁₀-CH₃ na m/z 541 i mono-ramno-mono-lipidne strukture za Rha-C_{12:2} na m/z 381. [M+2Na-H]⁺ adukt jon mono-ramno-lipidne strukture Rha-Rha-C₁₂ je detektovan na m/z 553. [M+K]⁺ adukt jon mono-ramno-di-lipidne strukture dekanoil-Rha-C₁₀-C₁₀ je detektovan na m/z 695.



Slika 3.12. MALDI-TOF MS [M+Na]⁺, [M+K]⁺ i [M-H+2Na]⁺ molekularni joni ramnolipida dobijenih pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 na optimizovanoj PPAS podlozi: a) sirovi hloroformski ekstrakt, b) prečišćena mono-RL frakcija sa hromatografije na koloni.

Prethodni eksperimenti sa *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 su pokazali da je PPAS podloga sa suncokretovim uljem (2%), kao izvorom ugljenika i peptonom I (1%) i NH₄Cl (0,02M) kao kombinovanim izvor azota dala prinos od 3 g/l. Optimizovana podloga je korišćena za ispitivanje produkcije ramnolipida ostalih sojeva *P. aeruginosa*. Pokazalo se da se sojevi se značajno

razlikuju u produkciji ramnolipida. Naime, visoki prinosu ramnolipida su dobijeni pomoću *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 (3,0 g/l), D3 (1,5 g/l), D1 (1,0 g/l) i referentni ATCC 27583 (1,2 g/l), dok su D2 i 67 imali nižu produkciju od 0,7 g/l i 0,8 g/l, redom. Ovaj rezultat pokazuje da svi sojevi imaju dobar potencijal za produkciju biosurfaktanata u bioremedijaciji.

3.4.2. *Produkcija ramnolipida pomoću ekoloških izolata i komercijalnog soja P. aeruginosa*

Na slici 3.13. su prikazani MS spektri ekstrakata ramnolipida iz fermentacionih tečnosti različitih sojeva *P. aeruginosa*. Produkcija ramnolipida u ovoj studiji pokazala je da je u skladu sa ranijim istraživanjima produkcija ramnolipida za soj specifična (Maier 2003; Nie *et al* 2010). Broj mono-ramnolipida različitih sojeva je varirao od 7 (soj 67) do 4 (soj D2), dok je broj di-ramnolipida bio od 9 (soj D2) do 5 (soj D1). Svi ili skoro svi ispitivani sojevi *P. aeruginosa* su produkovali ramnolipidne strukture RL1 (Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₀-C₁₄, Rha-C₁₀-C_{14:1}, Rha-C₁₄-C₁₆) i RL3 (Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}), koji su osnovni ramnolipidi (Thazibi *et al* 2004). Sporadično su detektovane RL1 strukture Rha-C₁₀-C_{14:1}, Rha-C₁₂-C₁₄, Rha-C₁₀-C₁₀-CH₃ i dekanoil-Rha-C₁₀-C₁₀, dok su se od RL2 struktura pojavili Rha-Rha-C₁₀-C_{10:1}, Rha-Rha-C₁₀-C_{14:1}, Rha-Rha-C₁₂-C₁₄ i Rha-Rha-C₁₄-C₁₄ (tabela 3.6.)

U MS spektrima su pored RL detektovane i i površinski aktivne HAA. Kao što je već objašnjeno u poglavlju 1.4.4. (Pregled literature) RL i HAA su kao lipidni medijatori važni za process QS, formiranja biofilma i preživljavanja bakterijske populacije u različitim uslovima sredine. Samo četiri HAA strukture su detektovane u smešama RL različitih sojeva: C₁₀-C₆, C₁₀-C₈, C₁₀-C₁₀ i C₁₀-C_{12:1}. Dve HAA su bile identične za sve sojeve C₁₀-C₁₀ (osim za soj ATCC 27853) i C₁₀-C₈ (slika 3.8.) Uzevši u obzir površinski aktivne osobine, različiti HAA profili ukazuju da je, ne samo ramnolipidni, već ukupni profil biosurfaktanata

soj- specifičan. Takođe, RL i HAA mogu biti posmatrane kao soj-specifične i u kontekstu “cell-to-cell” i formiranja biofilma.

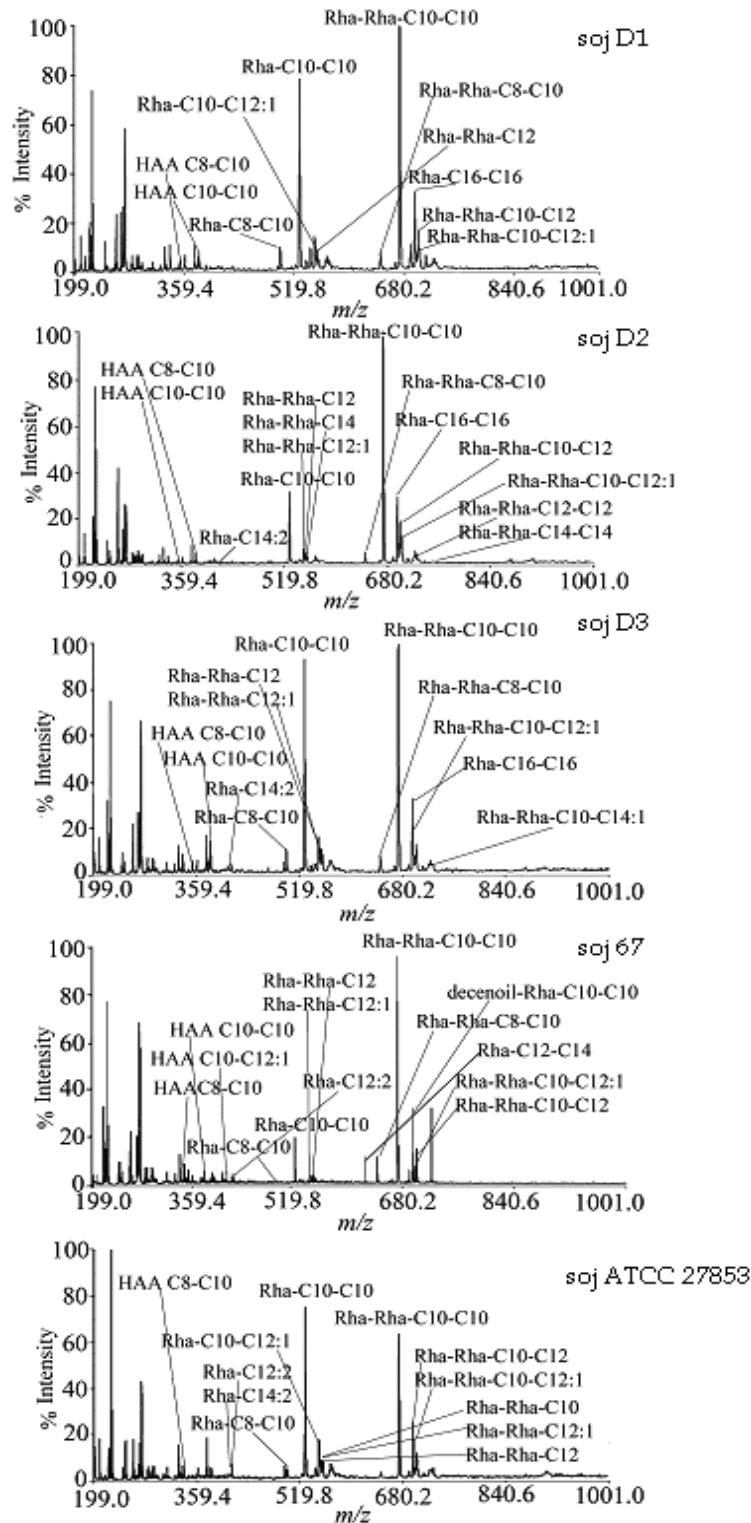
Tabela 3.6. Mono- i di-ramnolipidne strukture i HAA za pet ekoloških izolata sa specifičnim poreklom *P. aeruginosa* i kontrolni klinički soj ATCC 27852 koji su dobijeni na optimizovanoj PPAS podlozi, detektovanih pomoću MALDI-TOF

Simbol ramnolipida i molekulska masa	Prisustvo RL i HAA struktura u ramnolipidnim smešama soja					
	NCAIM (P) B 001380	D1	D2	D3	67	ATCC 27853
Rha-C _{12:2} , 358,68	+	-	-	-	+	+
Rha-C _{14:2} , 386,48	-	-	+	+	+	+
Rha-C ₈ -C ₁₀ /Rha-C ₁₀ -C ₈ ^a , 476,60	+	+	-	+	+	+
Rha-C ₁₀ -C ₁₀ //Rha-C ₈ -C ₁₂ /Rha-C ₁₂ -C ₈ , 504,65	+	+	+	+	+	+
Rha-C ₁₀ -C _{12:1} /Rha-C _{12:1} -C ₁₀ , 530,69	+	+	+	+	+	+
Rha-C ₁₀ -C _{14:1} /Rha-C _{14:1} -C ₁₀ //Rha-C ₁₂ -C _{12:1} /Rha-C _{12:1} -C ₁₂ , 558,74 ^b	-	-	+	-	-	-
Rha-C ₁₂ -C ₁₄ /Rha-C ₁₄ -C ₁₂ , 588,81	-	-	-	-	+	-
Rha-C ₁₆ -C ₁₆ , 672,97	+	+	+	+	-	-
Rha-C ₁₀ -C ₁₀ -CH ₃ , 518,68	+	-	-	-	-	-
dekanoil-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ , 656,89	+	-	-	-	+	-
Rha-Rha-C ₁₀ , 480,55	-	-	-	-	-	+
Rha-Rha-C ₁₂ , 508,60	+	-	+	+	+	+
Rha-Rha-C _{12:1} , 506,60	-	+	+	+	+	+
Rha-Rha-C ₁₄ , 536,65	-	-	+	-	-	-
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀ /Rha-Rha-C ₁₀ -C ₈ , 622,74	+	+	+	+	+	+
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀ , 650,79	+	+	+	+	+	+
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{10:1} /Rha-Rha-C _{10:1} -C ₁₀ , 520,64	+	-	-	-	-	-
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂ /Rha-C ₁₂ -C ₁₀ , 678,84	-	-	-	-	-	-
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{12:1} /Rha-Rha-C _{12:1} -C ₁₀ , 676,83	-	-	-	-	-	-
Rha-Rha-C ₁₀ -C _{14:1} /Rha-Rha-C _{14:1} -C ₁₀ //Rha-C ₁₂ -C _{12:1} /C _{12:1} -C ₁₂ , 704,89	-	-	-	+	-	-
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂ , 706,90	-	-	+	-	-	-
Rha-Rha-C ₁₄ -C ₁₄ , 763,00	-	-	+	-	-	-
Simbol HAA i molekulska masa						
C ₁₀ -C ₆ , 302,21	+	-	-	-	-	-
C ₁₀ -C ₈ , 330,24	+	+	+	+	+	+
C ₁₀ -C ₁₀ , 358,27	+	+	+	+	+	-
C ₁₀ -C _{12:1} , 384,29	-	-	-	-	+	-

Strukture koje ne mogu biti razlikovane pomoću MALDI TOF:

^a Pozicioni izomeri ramnolipida za sve različite hidroksi-masne kiseline (npr. Rha-C₈-C₁₀ i Rha-C₁₀-C₈) prikazani su kao Rha-C₈-C₁₀/Rha-C₁₀-C₈.

^b Svi izomeri su prikazani odvajanjem pozicionih od funkcionalnih (npr Rha-C₁₀-C₁₄ i Rha-C₁₂-C₁₂) kao: Rha-C₁₀-C₁₄/ Rha-C₁₄-C₁₀//Rha-C₁₂-C₁₂.



Slika 3.13. MALDI-TOF MS $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ i $[M-H+Na_2]^+$ molekularni joni iz hloroformskih ekstrakata rhamnolipida dobijenih pomoću sojeva *P. aeruginosa* D1, *P. aeruginosa* D2, *P. aeruginosa* D3, *P. aeruginosa* 67, *P. aeruginosa* ATCC 27853 na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika i peptonom I kao izvorom azota.

3.5. Kvantitativna LC-ESI-MS analiza ramnolipida iz ekoloških izolata *P. aeruginosa*

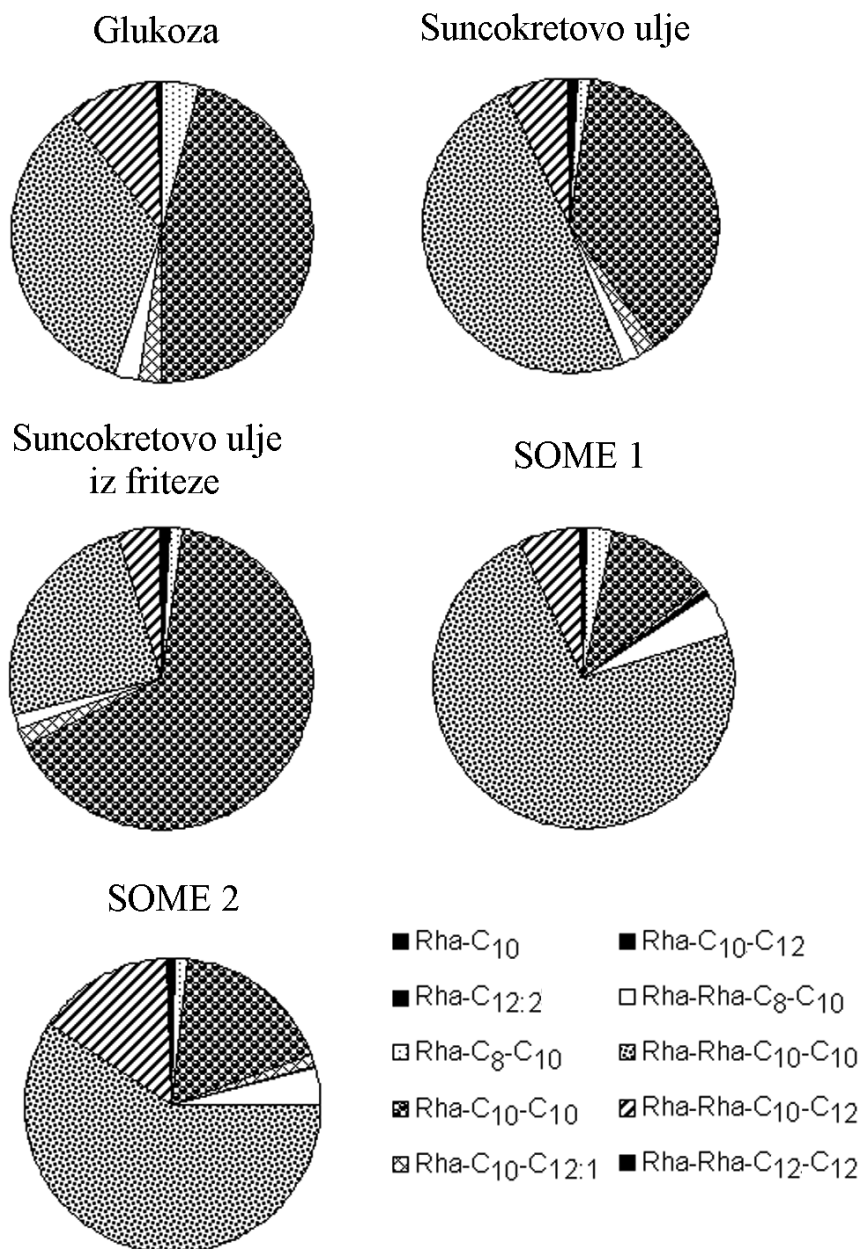
Kao što je već rečeno ramnolipidni biosurfaktanti se uvek produkuju kao smeše različitih RL struktura, što je primećeno kod različitih sojeva *P. aeruginosa* (Abalos *et al* 2001; Abdel-Mawgoud *et al* 2009; Benincasa *et al* 2004; Haba *et al* 2003a; Mata-Sandoval *et al* 1999; Pornsunthorntawee *et al* 2008). Ako se uzme u obzira da je sastav RL smeše uslovljen produkcionim sojem (vrstom kojoj soj pripada i poreklom soja), (Haba *et al* 2003a; Dubeau *et al* 2009), izborom izvora ugljenika (Benincasa *et al* 2002; Benincasa and Accorsini 2008; Rahman *et al* 2002) i vremenom kultivacije (Haba *et al* 2003a), kao i načinom izolovanja (Déziel *et al* 1999; Nitschke *et al* 2010), kompleksnost ove teme je još veća. Bez obzira na prijavljene RL strukture, broj studija koji se bavi kvalitativnom (detektovanjem RL struktura u smeši) i kvantitativnom (produkcijom i relativna zastupljenost detektovane RL strukture) analizom RL smeša nije veliki.

Sva kvantitativna određivanja RL u ovoj studiji su urađena na triple tandem kvadripol masenom spektrometru Quattro Premier, korišćenjem 4-hidroksi-2-heptilhinolin (4-hydroxy-2-heptylquinoline, HHQ-D4), obeleženog deuterijumom, kao internog standarda.

3.5.1. Produkcionni profil ramnolipida iz *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 koji je gajen na PPAS podlozi sa različitim izvorima ugljenika

Soj *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 je izabran za ispitivanje efekta ugljenika na nivo produkcije ramnolipida, budući da je okarakterisan kao producent ekstracelularnih supstanci koje imaju potencijal za industrijsku primenu kao što su: lipaza, proteaza, egzopolisaharidid (Dimitrijevic *et al* 2011; Karadzic *et al* 2004, 2006). Uticaj izvora ugljenika na produkciju RL pomoću *P. aeruginosa* NCAIM je praćen: 1. određivanjem sastava, 2. relativne zastupljenosti i koncentracije prisutnih RL na PPAS medijumu, u koji su dodavani različiti

izvori ugljenika, uključujući jednostavne (glukoza i suncokretovo ulje) i kompleksne kao što je otpad iz industrije i domaćinstva (suncokretovo ulje iz friteze i dve frakcije iz rafinerije suncokretovog ulja – SOME 1 i SOME 2).



Slike 3.14. "Pie" grafik zastupljenosti (%) mono- i di-RL struktura koje je produkovao *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 0013800 na PPAS podlozi sa različitim izvorima ugljenika. RL strukture sa zastupljenošću ispod 1% za sve ispitivane izvore uljenika su označeni crnom bojom.

Suncokretovo ulje i otpad, ulje iz friteze i SOME 1, su dali visoke prinose RL od 427,62; 1295,97 i 396,08 mg/l, redom, dok je glukoza dala nižu produkciju (270,36 mg/l), (tabela 3.7.). RL su izolovani iz stacionarne faze rasta (96h) kada je zabeležena najveća produkcija ramnolipida na optimizovanoj podlozi. Nekoliko studija u kojima su korišćena biljna ulja i njihov otpad za produkciju ramnolipida, pokazale su da su ovi jeftini hidrofobni supstrati odlični izvori ugljenika za produkciju ramnolipida pomoću *P. aeruginosa* (Makkar *et al* 2011).

Razlike u koncentracijama RL dobijene orcinolnom metodom i pri kvantitativnom LC-MS određivanju koje se pojavljuju u preparatu RL izolovanom iz podloge sa suncokretovim uljem su posledica korišćenja ulja različitih proizvođača i verovatnog prisustva interferirajućih supstanci koje su dovele do povišenih vrednosti u orcinolnoj metodi, koja bi, zbog svoje nespecificnosti, trebalo da bude uzeta u obzir samo kao preliminarna metoda

Tabela 3.7. Produkcija i relativna zastupljenost HAA i RL iz *P. aeruginosa* (P) B 001380 na PPAS podlozi sa različitim izvorima ugljenika

Produkcija (mg/l) i relativna zastupljenost (%) HAA i ramnolipidnih struktura dobijenih pomoću <i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380 na PPAS podlozi sa različitim izvorna ugljenika*										
Izvor ugljenika	Glukoza		SOME 1		SOME 2		Suncokretovo ulje iz friteze		Suncokretovo ulje	
HAA/Ramnolipid	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
C ₈ -C ₈ /C ₆ -C ₁₀	0,01	-	0,54	-	0,04	-	0,30	-	0,13	-
C ₈ -C ₁₀	0,06	-	0,89	-	0,07	-	0,67	-	0,25	-
C ₁₀ -C ₁₀	0,06	-	1,14	-	0,15	-	4,49	-	0,97	-
C ₁₀ -C ₁₂	0,01	-	0,11	-	0,02	-	0,68	-	0,13	-
C ₁₂ -C ₁₂	0,16	-	5,68	-	0,07	-	40,61	-	13,76	-
C ₈ -C _{12:1}	<0,01	-	0,27	-	0,02	-	1,06	-	1,10	-
C ₁₀ -C _{12:1}	<0,01	-	0,13	-	0,04	-	0,56	-	0,11	-
Ukupne HAA	0,30	-	8,77	-	0,40	-	48,37	-	16,45	-
Rha-C ₁₀	0,29	0,11	0,44	0,11	0,35	0,26	1,19	0,09	0,34	0,08
Rha-C _{12:2}	0,04	0,02	0,90	0,23	0,16	0,12	9,76	0,75	2,79	0,65
Rha-C ₈ -C ₁₀	10,10	3,73	11,18	2,82	1,85	1,41	18,05	1,39	6,56	1,54
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	124,69	46,13	44,64	11,27	23,13	17,57	850,00	65,59	162,69	38,05
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	7,05	2,61	2,27	0,57	1,70	1,29	25,87	2,00	7,65	1,79
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	0,07	0,02	2,50	0,63	0,14	0,11	0,08	0,01	0,73	0,17
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	7,10	2,63	18,10	4,57	5,59	4,24	15,43	1,19	7,78	1,82
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	92,77	34,32	288,39	72,82	78,16	59,35	314,02	24,23	208,66	48,80
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	26,99	9,98	26,97	6,81	19,80	15,04	58,95	4,55	29,10	6,81
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	1,27	0,47	0,69	0,17	0,80	0,61	2,62	0,20	1,31	0,31
Ukupni RL	270,36	100	396,08	100	131,69	100	1296,97	100	427,62	100
Ukupni mono-RL	142,23	52,61	6,94	15,64	27,33	20,75	904,95	69,83	180,77	42,27
Ukupni di-RL	128,13	47,39	334,14	84,36	104,36	79,25	391,02	30,17	246,85	57,73
Odnos ukupni di- /mono- RL	0,90		5,39		3,82		0,43		1,37	

*Sva kvantitativna LC-MS određivanja HAA i RL su urađena u triplikatu i data kao srednja vrednost.

Potvrda strukture prekursorskih ramnolipidnih jona, je urađena njihovom fragmentacijom i MS² analizom dobijenih fragmenata i samo strukture za koje se potvrdilo da su RL su prikazane u rezultatima. Kako izomerni par ramnolipida nose dve 3-hidroksi masne kiseline različitih dužina (na primer Rha-C₁₀-C₁₂ i Rha-C₁₂-C₁₀), koji ne mogu biti razlikovani hromatografski, analiziran je LC/MS/MS spektar njihovih tipičnih pseudomolekularnih jona da bi se našao fragmentni jon karakterističan za ova jedinjenja. Važno napomenuti da je u okviru svakog izomernog para, ramnolipidna struktura sa kraćim lancem koji je vezan za ramnozu zastupljenija (Déziel *et al* 2000).

Korišćenjem svih navedenih izvora ugljenika uočeno je da je Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ najzastupljeniji di-ramnolipid sa vrednostima od 24% do 72% u odnosu na ukupne ramnolipide, dok je njegov prekursor Rha-C₁₀-C₁₀ dominantan mono-ramnolipid sa zastupljenošću 11 to 66% ukupnih ramnolipida. Rha-C₁₀, Rha-C_{12:2} i Rha-C₁₀-C₁₂ su predstavljali retke mono-RL strukture (ispod 1%), dok je u di-RL frakciji nisku zastupljenost imao Rha-Rha-C₈-C₁₀ (opseg 1-4,5%), a najmanje zastupljena struktura je bila Rha-Rha-C₁₂-C₁₂ (ispod 1%), za sve ispitivane izvore ugljenika (tabela 3.7., slika 3.14.).

Najveće koncentracije glavnih mono-RL strukture Rha-C₁₀-C₁₀ su bile 850,00; 162,69 i 124,69 mg/l za suncokretovo ulje iz friteze, suncokretovo ulje i glukozu, redom, dok je za SOME 1 kao izvor ugljenika bilo nešto niže 44,64 mg/l. Niske koncentracije mono-RL, u opsegu od 7 do 26 mg/l, dobijene su za: Rha-C₈-C₁₀ (glukoza, SOME 1 i suncokretovo ulje iz friteze), Rha-C₁₀-C₁₀ (SOME 2), Rha-C₁₀-C_{12:1} (suncokretovo ulje iz friteze, suncokretovo ulje i glukozu) i Rha-C_{12:2} (suncokretovo ulje iz friteze), (tabela 3.7.). Detektovane koncentracije glavnog di-ramnolipida Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ su bile: 314,02, 288,39, 208,66, 92,77 i 78,16 mg/l za suncokretovo ulje iz friteze, SOME 1, suncokretovo ulje, glukozu i

SOME 2, redom, dok je za Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ detektovano: 58,95, 29,10, 26,99, 26,97 and 19,80 mg/l, za suncokretovo ulje iz friteze, suncokretovo ulje,

glukozu, SOME 1 and SOME 2, redom (tabela 3.7.). Niske koncentracije (opseg 5-8 mg/l) za Rha-Rha-C₈-C₁₀ su dobijene za glukozu, SOME 1 i suncokretovo ulje, kao izvor ugljenika. Struktura Rha-Rha-C₁₂-C₁₂ je bila najmanje zastupljen ramnolipid sa koncentracijama ispod 1 mg/l za SOME 1 and SOME 2 (tabela 3.7.). Detektovane strukture HAA se pojavljuju u koncentracijama (mg/l): 48,37 (suncokretovo ulje iz friteze), 16,34 (suncokretovo ulje), 8,77 (SOME 1), 0,40 (SOME 2) i 0,30 (glukoza). U RL smeši soja *P. aeruginosa* NCAIM detektovane su i 3-hidroksi masne kiseline sa lancima koji variraju od C₈-C₈ do C₁₀-C_{12:1}, sa koncentracijama manjim od 0,01 do skoro 50,00 mg/l, što je takođe doprinelo raznovrsnosti profila biosurfaktanta (tabela 3.7.).

Odnos di-/mono-RL frakcija je bio najveći za SOME 1 i SOME 2 (5,39 i 3,82, redom), a nešto niži za suncokretovo ulje kao izvor ugljenika (1,37), što ukazuje da ovi izvori favorizuju produkciju di-RL kao finalnih produkata (tabela 3.7.). Sa druge strane, glukoza i suncokretovo ulje iz friteze su imali veći % mono-RL, tako je odnos di-/mono-RL bio 0,90 i 0,43, redom (tabela 3.7.).

3.5.2. Poređenje eksperimentalnih rezultata u ovoj studiji sa publikovanim studijama o produkciji ramanolipida na različitim izvorima ugljenika

Od svih nutritivnih faktora izvor ugljenika je najraznovrsniji (biljna ulja, ugljenih hidrati, ugljovodnici, industrijski otpad) i do sada je publikovano nekoliko studija koje se bave distribucijom i koncentracijama različitih RL struktura dobijenih pomoću "single strain" produkcije korišćenjem različitih izvora ugljenika (Aparna *et al* 2012; Dubeau *et al* 2009; Maier 2003; Nie *et al* 2010).

U studiji Aparne i saradnika (2012) ispitivan je efekat pet ekonomičnih izvora ugljenika (melasa, surutka, ulje kokosa, glicerol, ljuske narandže), na modifikovanoj PPGAS podlozi, na produkciju ramnolipida iz *Pseudomonas* sp. 2B koji je izolovan iz zemljišta kontaminiranog naftom. Soj je bio sposoban da raste na svim ponuđenim izvorima ugljenika uz produkciju biosurfaktanta.

Maksimalni prinos je 4,97 g/l, nakon 96 h kultivacije na modifikovanoj PPGAS podlozi sa melasom (1% v/v) na 30 °C i 150 obrtaja. Produkcija biosurfaktanta je bila uslovljena izborom izvora, pa je proizvodnja na ostalim izvorima bila 4,14 (glicerol); 4,38 (ulje kokosa); 3,24 (ljuske narandže) i 4,09 g/l (surutka). Smanjenje i potrošnja supstrata su ukazale da je rast povezan sa biosintezom surfaktanta i da je veća relativna zastupljenost di- u odnosu na mono-ramnolipide. Ukupan broj struktura na optimalnoj modifikovanoj PPGAS podlozi je bio 9, pri čemu su najzastupljenije strukture bile Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-C₁₀-C₁₀.

U eksperimentalnom radu u ovoj studiji ispitivan je efekat različitih izvora ugljenika (glukoza, suncokretivi ulje, suncokretovo ulje iz friteze i dve SOME frakcije) na produkciju RL soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380, takođe na PPGAS modifikovanoj podlozi (ranije označenoj kao PPAS). Ulje iz friteze, suncokretovo ulje i SOME 1 frakcija su bile najbolji izbor za produkciju RL pomoću ovoga soja sa prinosom RL od: 1,30; 0,43 i 0,40 g/l, redom, nakon 96 h kultivacije na 30 °C i 250 obrtaja. Na svim pomenutim izvorima ugljenika strukture Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-C₁₀-C₁₀ su bile najzastupljenije. Odnos ukupnih di-/mono-RL je bio najviši za SOME- 1 i -2 (5,39 i 3,82, redom), dok je niži odnos dobijen za suncokretovo ulje (1,37), što ukazuje da SOME frakcije favorizuju produkciju di-ramnolipida. Sa druge strane, glukoza i suncokretovo ulje iz friteze daju veći % monoramnolipida (odnos di-/mono-RL je bio 0,90 i 0,43, redom).

Dubeau i saradnici (2009) su pokazali da, iako su detektovane RL strukture za različite izvore ugljenika slične, njihova produkcija je različita. Naime, glavne strukture RL za poređene izvore ugljenika u studiji Dubeau i saradnika (glicerol i ulje uljane repice) su iste, dok su se varijacije pojavile u retkim detektovanim strukturama, što se slaže sa našim rezultatima. Takođe, Dubeau i saradnici su tvrdili da su vrednosti za odnos di-RLs/mono-RLs za *P. aeruginosa* oko 4, što je u skladu sa genetičkim aspektom biosinteze ramnolipida.

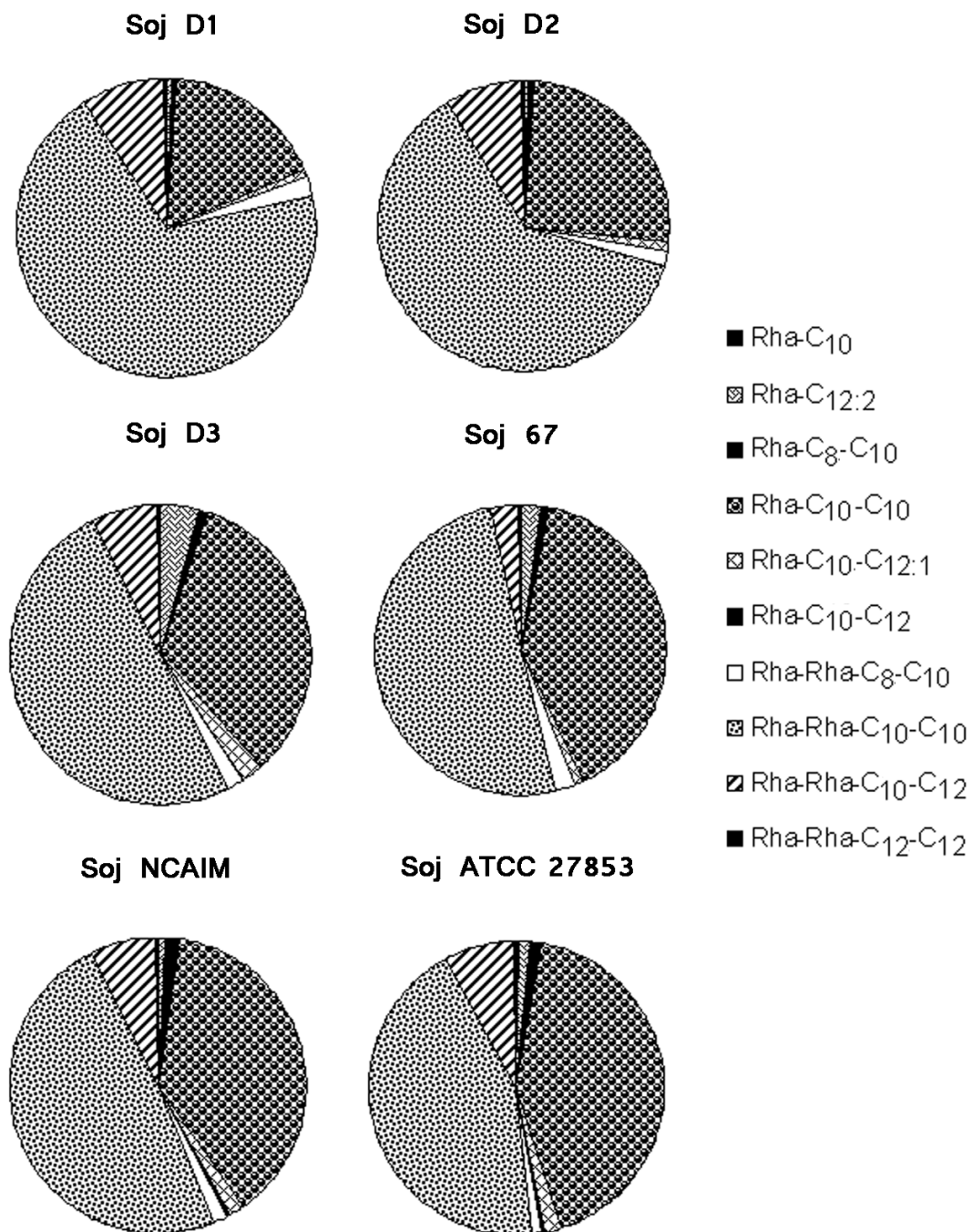
Nie i saradnici (2010) su proučavali produkciju ramnolipidnog biosurfaktanta pomoću soja *P. aeruginosa* NY3 (koji izolovan iz zemljišta zagađenog naftom) sa ciljem da odrede najbolji izvor ugljenika i sastav ramnolipidne smeše na optimalnom izvoru ugljenika pomoću MALDI-TOF MS i MS². Oni su pokazali da je optimalni izvor ugljenika glukoza i da je RL smeša bila sastavljena od širokog spektra različitih RL struktura, ali nisu uradili njihovu kvantifikaciju. Takođe, izvori ugljenika koje su izabrali Nie i saradnici, razlikovali su se u odnosu na ovu studiju. Dok su oni koristili: *n*-alkane, dizel ulje, goveđi ekstrakt, glicerol i glukozu, mi smo istraživali biljna ulja i njihov otpad, jer se ranije pokazalo da su ovi izvori smatrani boljim izborom za produkciju ramnolipida (Mata-Sadalova *et al* 2001; Wei *et al* 2005). Dodatno naši rezultati su pokazali da otpadna ulja iz domaćinstva i prehrambene industrije imaju potencijal za poboljšanu produkciju ramnolipida, posebno supstrati iz otpada rafinerije suncokretovog ulja (SOME 1 i SOME 2) i korišćeno jestivo ulje (suncokretovo ulje iz friteze), što je u skladu sa principima zelene hemije i daje mogućnost za rešavanje problema industrijskog otpada.

Bitno je istaći da ova studija i navedene publikacije potvrđuju mogućnost produkcije ramnolipida korišćenjem jeftinih obnovljivih izvora, čime se osim ekonomične produkcije ramnolipida rešava problem otpada. Takođe, navedene publikovane studije i rezultati ove studije potvrđuju da su sojevi *P. aeruginosa* izolovani iz sredina zagađenih naftom dobri kandidati za industrijsku primenu u proizvodnji ramnolipidnog surfaktanta.

3.5.3. Produkcionni profil RL iz različitih ekoloških izolata *P. aeruginosa* gajenih na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika

Dosadašnja istraživanja u svetu potvrđuju da ramnolipidi imaju primarnu ulogu u bakterijskoj pokretljivosti koja je vezana za interakcije sa površinom i razvoj biofilma, međutim, razlozi i mehanizmi važni za njihovu produkciju i funkciju su i dalje nejasni (Chrazanovski *et al* 2012). Kako niska rastvorljivost ugljovodonika iz nafte ograničava njihovu biodostupnost, očekivano je da rastvorljivost koja je indukovana biosurfaktantima treba da rezultuje poboljšanim procesima biodegradacije (Miller 1995a). Mnogi autori ističu da biosurfaktante produkuju i hidrofilni i hidrofobni sojevi, nevezano za korišćene izvore ugljenika (Arino *et al* 1996; Mata-Sandoval *et al* 2001), što ukazuje da njihova uloga snažno zavisi od uslova okoline.

Na osnovu produkcionih profila biosurfaktanta (sastav, relativna zastupljenost i koncentracija) pet ekoloških izolata *P. aeruginosa* sa specifičnim poreklom: NCAIM (mineralno ulje za sečenje metala), konzorcijum D1, D2 i D3 (zemljište kontaminirano (mazutom), soj 67 (zemljište kontaminirano naftom) i referentnog soja ATCC 27853, na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem, može se zaključiti da su svi ispitivani sojevi su pokazali značajnu produkciju ramnolipida. Visoke koncentracije ukupnih ramnolipida su dobijene za soj 67 (3339,00 mg/l), D1 (1729,16 mg/l), D2 (1706,04 mg/l) a nešto niže za soj NCAIM (427,62 mg/l), referentni ATCC 27853 (107,92 mg/l) i D3 (53,38 mg/l) (tabela 3.8.). Najveće koncentracije glavne mono-RL strukture Rha-C₁₀-C₁₀ su bile 1327,23; 433,41 i 300,86 mg/l za sojeve 67, D2 i D1, redom. Najveće koncentracije glavne di-RL strukture Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ su bile 1685,65; 1197,78 i 1052,12 mg/l za sojeve 67, D1 i D2, (tabela 3.8.). Odnosi ukupnih di-/mono-RL za sve ispitivane sojeve *P. aeruginosa* su bili veći od 1,00, što znači da je veća zastupljenost di-RL, pri čemu su najveće vrednosti dobijene za sojeve D1 (4,17) i D2 (2,62), (tabela 3.8.).



Slika 3.15. "Pie" grafik zastupljenosti (%) of mono- i di-RL struktura koje su proizveli različiti sojevi *P. aeruginosa* na PPAS podlozi sa suncokretovim ulje kao izvorom ugljenika. RL struktura čije su zastupljenosti ispod 2% za sve sojeve označeni su crnom bojom.

Tabela 3.8. Produkcija i relativna zastupljenostima RL i HAA iz ekoloških izolata *P. aeruginosa*, dobijenih pri rastu na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika

Produkcija (mg/l) i relativna zastupljenost (%) HAA i ramnolipidnih struktura dobijenih na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika*												
<i>P. aeruginosa</i> soj	D1		D2		D3		67		NCAIM (P) B 001380		ATCC 27853	
HAA/Ramnolipid	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
C ₈ -C ₈ /C ₆ -C ₁₀	0,02	-	0,1	-	0,05	-	7,00	-	0,13	-	0,01	-
C ₈ -C ₁₀	0,23	-	0,5	-	0,30	-	30,53	-	0,25	-	0,10	-
C ₁₀ -C ₁₀	5,1	-	6,76	-	0,66	-	76,48	-	0,97	-	0,46	-
C ₁₀ -C ₁₂	0,98	-	1,11	-	0,06	-	3,33	-	0,13	-	0,04	-
C ₁₂ -C ₁₂	8,16	-	7,18	-	5,39	-	0,60	-	13,76	-	2,22	-
C ₈ -C _{12:1}	1,11	-	0,60	-	0,03	-	19,74	-	1,10	-	0,09	-
C ₁₀ -C _{12:1}	0,72	-	0,87	-	0,05	-	2,66	-	0,11	-	0,05	-
Ukupne HAA	16,73	-	16,58	-	6,55	-	140,34	-	16,45	-	2,97	-
Rha-C ₁₀	1,21	0,07	0,59	0,03	0,07	0,13	2,07	0,06	0,34	0,08	0,18	0,17
Rha-C _{12:2}	9,36	0,54	10,40	0,61	2,14	4,01	68,32	2,05	2,79	0,65	1,29	1,20
Rha- C ₈ -C ₁₀	9,14	0,53	8,28	0,49	0,51	0,96	35,78	1,07	6,56	1,54	1,52	1,41
Rha- C ₁₀ -C ₁₀	300,86	17,40	433,41	25,40	17,76	33,26	1327,23	39,75	162,69	38,05	45,52	42,19
Rha- C ₁₀ -C _{12:1}	13,55	0,78	19,04	1,12	1,12	2,10	29,12	0,87	7,65	1,79	2,22	2,06
Rha- C ₁₀ -C ₁₂	0,05	<0,01	0,07	<0,01	0,26	0,49	0,10	<0,01	0,73	0,17	0,07	0,07
Rha-Rha- C ₈ -C ₁₀	38,25	2,21	28,91	1,69	0,77	1,44	71,83	2,15	7,78	1,82	1,36	1,26
Rha-Rha- C ₁₀ -C ₁₀	1197,78	69,27	1052,12	61,67	26,88	50,33	1685,65	50,48	208,66	48,80	46,96	43,50
Rha-Rha- C ₁₀ -C ₁₂	152,95	8,85	147,85	8,67	3,79	7,10	113,76	3,41	29,10	6,81	8,51	7,88
Rha-Rha- C ₁₂ -C ₁₂	5,97	0,35	5,36	0,31	0,09	0,16	5,13	0,15	1,31	0,31	0,28	0,26
Ukupni RL	1729,16	100	1706,04	100	53,38	100	3339,00	100	427,62	100	107,92	100
Ukupni mono-RL	334,21	19,33	471,79	27,65	21,86	40,95	1462,63	43,80	180,77	42,27	50,82	47,09
Ukupni di-RL	1394,95	80,67	1234,25	72,35	31,52	59,05	1876,37	56,20	246,85	57,73	57,10	52,91
Odnos ukupni mono-/di-RL	0,24		0,38		0,68		0,78		0,73		0,88	
Odnos ukupni di-/mono-RL	4,17		2,62		1,44		1,28		1,37		1,12	

*Sva kvantitativna LC-MS određivanja HAA i RL su urađena u triplikatu i data kao srednja vrednost

U smešama svih 6 sojeva *P. aeruginosa* su detektovane HAA vrste sa lancima čija dužina varira od C₈-C₈ do C₁₀-C_{12:1} (tabela 3.8.). Najveća produkcija ukupnih HAA dobijena je za soj 67 (140,34 mg/l). Za sojeve D1, D2 i NCAIM detektovane koncentracije HAA su bile slične (oko 16-17 mg/l), dok je za sojeve D3 i ATCC dobijena niža produkcija od 6,55 i 2,97 mg/l, redom (tabela 3.8) Ramnolipidne smeše koje su produkovali sojevi D1 i D2 su bile sastavljene dominantno od di-RL, dok je za ostale sojeve zastupljenost di- i mono-ramnolipida bila približno slična, dok su HAA nađene u manjim koncentracijama sa izuzetkom soja 67 (tabela 3.8.).

Glavna mono-RL struktura za sve sojeve je bila Rha-C₁₀-C₁₀ sa zastupljenošću u opsegu 17-50 % (slika 3.15.). Zastupljenosti u opsegu 1-5 % su detektovane za Rha-C_{12:2} (D3, 67 i ATCC 27853), Rha-C₈-C₁₀ (NCAIM, ATCC 27853 i 67) i Rha-C₁₀-C_{12:1} (D2, D3, ATCC 27853 i NCAIM). Najmanje zastupljene mono-RL strukture za sve sojeve su bile Rha-C₁₀ (zastupljenost ispod 0,2%) i Rha-C₁₀-C₁₂ (zastupljenost ispod 0,1%) za sve sojeve osim D3. Takođe, slaba zastupljenost (ispod 1%) je dobijena i za: Rha-C_{12:2} (sojevi D1, D2 i NCAIM), Rha-C₈-C₁₀ (sojevi D1, D2 i D3) i Rha-C₁₀-C_{12:1} (sojevi D1 i 67), (tabela 3.8., slika 3.15.). Glavna struktura kod di-RL frakcije je bila Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ sa zastupljenošću 48-70%, nakon koje su sledile Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (4-9%) i Rha-Rha-C₈-C₁₀ (1-3%), za sve sojeve. Najmanje zastupljen di- RL je bio Rha-Rha-C₁₂-C₁₂ (ispod 0,5%), (tabela 3.8., slika 3.17.).

Svi ekološki izolati *P. aeruginosa* (osim soja D3) su pokazali dobar potencijal za produkciju ramnolipida, posebno sojevi 67, D1 i D2. Referentni soj ATCC 27853 u poređenju sa izolatima je imao nižu produkciju RL (sa izuzetkom soja D3). Sojevi D1 i D2 su imali najveći odnos di-RL/mono-RL, dok su ostali izolati i referentni soj ATCC 27853 imali niži odnos ovih dveju frakcija.

Članovi konzorcijuma koji čine sojevi D1, D2 i D3, iako imaju isto poreklo (halda kontaminirana mazutom) i slične fiziološko-biohemijske karakteristike, pokazali su razlike u koncentraciji ukupnih ramnolipida i odnosima frakcija di- i mono-RL. Dobijeni rezultat bi mogao da ukazuje na komplementarnu funkciju u

mikrobnom konzorcijumu, u procesima solubilizacije ugljovodonika u kontaminiranoj sredini, kada je *in situ* produkcija biosurfaktanta pomoću mikroorganizama od izuzetne važnosti u bioremedijaciji okoline kontaminirane naftom (Beskoski *et al* 2011), pa je simultana i sinergistična produkcija biološki poželjna.

3.5.4. Poređenje eksperimentalnih rezultata u ovoj studiji i publikovanih studija o ramanolipidima dobijenih pomoću ekoloških izolata *P. aeruginosa* izolovanih iz sredina bogatih ugljovodonicima

Potreba za poboljšavanjem produkcije ramnolipida se pojavila kao rezultat njihovog potencijala da budu ekološki kompatibilni agensi za bioremedijaciju organskih jedinjenja, teških metala i biološku kontrolu. Tri glavna zahteva vezana za poboljšavanje produkcije ramnolipida su: visokog prinosa, niska cena proizvodnje i ekološka produkcija.

Zahtev za ekonomičnom proizvodnjom ramnolipida, kao i svih ostalih biosurfaktanata i pronalaženje alternativnih produkcionih sojeva je povezan sa efikasnom analizom (Hayd *et al* 2008). Metode koje se koriste obuhvataju od indirektnih analiza zasnovanih na fizičkim osobinama ramnolipida (određivanje hemolitičke aktivnosti i površinske aktivnosti), kolorimetrijskih merenja (cetrilmetilamonijum-bromid agar test, orcinolni i antronski test) do sofisticiranih analiza uzorka pomoću masene spektrometrije (Abdel-Mawgoud *et al* 2011). HPLC kuplovan sa MS danas predstavlja najprecizniji metod za identifikaciju i kvantifikaciju ramnolipida (Hayd *et al* 2008), uz MALDI-TOF MS koji je razvijen kao metod za brz "skrining" smeša ramnolipida iz *Pseudomonas* spp., (Price *et al* 2009).

Ovo poglavlje sumira objavljene studije o ramnolipidima dobijenim pomoću izolata *P. aeruginosa* poreklom iz sredina bogatih ugljovodonicima (kao što su mazut, nafta i njeni derivati, različit industrijski otpad) i poredi ih sa dobijenim rezultatima u ovoj studiji u cilju korelacije različitih faktora koji utiču na produkcionu profila ramnolipida ekoloških izolata *P. aeruginosa*.

3.5.4.1. Sastav ramnolipidnih smeša

U pregledu literature je objašnjena složenost produkcije RL u smislu interakcije QS signala, faktora okoline i nutritivnih faktora. Zato se može očekivati da sastav ramnolipidne smeše i zastupljenost određenih tipova struktura zavisi od: produkcionog soja i njegovog porekla, vrste izvora ugljenika (što je analizirano u prethodna dva poglavlja), uslova kultivacije i starosti kulture.

U tabeli 3.9. je lista detektovanih struktura nekoliko ekloških izolata *P. aeruginosa*: 2 KM, 3 KM i 10 TK (Górna *et al* 2011), D1, D2 i D3 (ova studija), AT10 i 47T2 (Haba *et al* 2003a). Može se zaključiti da su neke RL strukture zajedničke za sve (ili skoro sve) sojeve (Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ and Rha-Rha-C₁₀-C₁₂), dok su ostale soj- ili grupa-specifične.

Price i saradnici (2009) su analizirali smešu RL koje je proizveo soj *Pseudomonas* spp. koji je izolovan iz zemljišta pomoću MALDI-TOF. Autori su detektovali osam RL struktura (Rha-C₁₀-C₈, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-Rha-C₁₀-C₈, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-C₁₀-C_{12:1}). Kako u ovi ramnolipidi obično detektovani u smešama ramnolipida koje proizvode različiti ekološki sojevi iz *Pseudomonas* spp., (Aparna *et al* 2012; Haba *et al* 2003a; Nie *et al* 2010; Price *et al* 2009; Sarachat *et al* 2010), oni se mogu smatrati *Pseudomonas* specifičnim.

Table 3.9. Lista detektovanih RL struktura poreklom od ekoloških izolata *P. aeruginosa*, analiziranih pomoću HPLC MS analize

RL struktura	<i>P. aeruginosa</i> soj							
	2 KM	3 KM	10 TK	D1	D2	D3	AT10	47T2
Rha-C _{8:1}	-	-	-	-	-	-	+	-
Rha-C ₁₀	-	-	-	+	+	+	-	-
Rha-C _{12:2}	-	-	-	+	+	+	+	-
Rha-C ₈ -C ₈	+	+	+	-	-	-	-	-
Rha-C ₈ -C ₁₀	+	+	+	+	+	+	-	+
Rha-C _{8:1} -C ₁₀	-	-	+	-	-	-	-	-
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	+	+	+	+	+	+	+	+
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	-	+	+	+	+	+	+	+
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	-	+	+	+	+	+	+	+
Rha-Rha-C ₈ -C ₈	+	+	-	-	-	-	-	-
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	+	+	+	+	+	+	-	+
Rha-Rha-C _{8:1} -C ₁₀	+	+	+	-	-	-	-	-
Rha-Rha-C _{8:1} -C ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	+
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	+	+	+	+	+	+	+	+
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	+	+	+	+	+	+	+	+
Rha-Rha-C ₁₀ -	-	+	+	-	-	-	+	+
C _{12:1}								
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	-	-	-	+	+	+	-	-
Rha-Rha-C _{12:1} -	-	-	-	-	-	-	-	+
C ₁₂								
Rha-Rha-C ₁₀ -	-	-	-	-	-	-	-	+
C _{14:1}								

Nie i saradnici (2010) su proučavali soj *P. aeruginosa* NY3 koji je izolovan iz zemljišta zagađenog naftom i osim što produkuje rhamnolipide ima sposobnost da razlaže PAH jedinjenja. Soj NY3 je bio sposoban da produkuje strukturno raznoliku smešu ramnolipida (ukupno of 25 različitih RL) koji su detektovani pomoću MALDI-TOF. Pored glavnih RL struktura autori su prijavili i 10 novih jedinjenja. (Rha-C₈-C_{8:1}, Rha-C₁₆, Rha-C_{16:1}, Rha-C_{17:1} and Rha-C_{24:1}, Rha-Rha-C₆-C_{6:1}, Rha-Rha-C_{9:1}, Rha-Rha-C_{10:1}-C_{10:1}, Rha-Rha-C₂₄, and Rha-Rha-C_{24:1}). Soj je produkovao Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ kao glavne i najzastupljenije strukture. Ovo je u skladu sa drugim publikacijama, za *P. aeruginosa* SP4 (Sarachat *et al* 2010), *P. aeruginosa* LBI (Nitschke *et al* 2010) i *P. aeruginosa* NRRL B-59182 (Rooney *et al* 2009), *P. aeruginosa* 2 KM, 3KM, 10 TK (Górna *et al* 2011) i kao i eksperimentalnim rezultatima dobijenim u ovoj studiji za sojeve *P. aeruginosa* D1, D2, D3, 67, NCAIM (P)B 001380.

3.5.4.2. Glavne ramnolipidne strukture i odnos di- i mono-ramnolipinih struktura

Iako je broj detektovanih mono- i di-ramnolipidnih struktura je preko 60 (Abdel-Mawgoud *et al* 2010), samo neke od njih se pojavljuju kao glavne, "the major", (Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ and Rha-Rha-C₁₀-C₁₂), dok se ostale strukture smatraju se sporednim, "the minor", strukturama.

U studiji Górne i saradnika (2011) su analizirani i upoređeni ramnolipidi koje su proizvela tri soja *P. aeruginosa*, izolovana iz zemljišta zagađenog naftom. U svim RL smešama su detektovani Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ u zastupljenosti 81-87%. Ipak, primećene su određene razlike u odnosu Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, koji su bili 25,4 : 56,3 za soj Pa 2 KM; 16,1 : 64,9 za soj Pa 3 KM i 39,1 : 47,9 za soj Pa 10 TK. Najmanju količinu mono-RL je proizveo soj Pa 3 KM, a najveću soj Pa 10 TK, dok je za di-RL bilo obrnuto. Odnos ukupnih di-/mono-RL frakcija je bio 1,8 za soj Pa 2 KM, 3,6 za soj Pa 3 KM i 1,0 za soj Pa 10 TK (tabela 3.10.). Takođe, Górna i saradnici (2011) su pokazali da se razlike između ramnolipida iz sojeva *P. aeruginosa* izolovanih iz zemljišta kontaminiranog naftom reflektuju i na zastupljenosti RL struktura i di-RL/mono-RL odnos.

U ovoj studiji su analizirana tri soja *P. aeruginosa* (D1, D2 i D3) koja su činila konzorcijum, izolovan iz zemljišta kontaminiranog mazutom. RL smeše koje su analizirane pomoću HPLC MS. Glavne strukture su takođe bile Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ sa ukupnom zastupljenošću 83-88%. Odnos ukupnih di-/mono-RL su bili 4,2 za soj D1; 2,6 za soj D2 i 1,4 za soj D3 (tabela 3.10.), što je prethodno primećeno da je tipična vrednost za smeše ramnolipida koje proizvode *P. aeruginosa* (Dubeau *et al* 2009).

Tabela 3.10. Poređnje ramnolipida dobijenih pomoću sojeva *P. aeruginosa* izolovanih iz kontaminiranih sredina: % zastupljanost glavnih mono- i di-RL, odnos Rha-C₁₀-C₁₀/ Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, odnos ukupnih di-/mono-RL

Soj <i>P. aeruginosa</i>	Glavni mono-RL	Glavni di-RL	Glavni mono- i di- RL, %	Odnos Rha- C ₁₀ -C ₁₀ / Rha- Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Odnos ukupnih di- /mono-RL
D1	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	86,7	17,4:69,3	4,2
D2	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	87,1	25,4:61,7	2,6
D3	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	83,6	33,3:50,3	1,4
2 KM	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	81,7	25,4:56,3	1,8
3 KM	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	81,0	16,1:64,9	3,6
10 TK	Rha-C ₁₀ -C ₁₀	Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	87,0	39,1:47,9	1,0

3.5.4.3. Ramnolipidni profil i vreme kultivacije

Haba i saradnici (2003a) su pratili produkciju različitih RL struktura u toku 96h fermentacije. Najzastupljeniji par RL homologa u smeši je bio Rha-C₁₀-C₁₀/Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, i činio do to 50,5 % smeše; mono-RL homolog je prvi detektovan (23,8 %) nakon 24 h kultivacije, dok se di-RL par pojavio nakon 48 h, a akumulirao između 72 i 96 h gajenja. Slično tome produkcija ovih RL struktura je prijavljena kao najzastupljenijih kada su korišćeni kukuruzno ulje za *P. aeruginosa* UG2 (Mata-Sandoval *et al* 2001), manitol za *P. aeruginosa* 57RP (Dénzil *et al* 1999), glukozu za *P. aeruginosa* Pa 2 KM, 3 KM, TK 10 (Górna *et al* 2011), glicerol za *P. aeruginosa* NY3 (Nie *et al* 2010) i suncokretovo ulje i njegov otpad za *P. aeruginosa* D1-D3, 67, NCAIM (P) B001380 u ovoj studiji.

Može se zaključiti da produkcija ramnolipida varira u toku vremena i da su samo najdominantnije, tj. glavne, strukture konstantne i prisutne u visokoj koncentraciji tokom fermentacije. Ostali ramnolipidni molekuli variraju u toku kultivacije, što može biti u vezi sa time da su neke strukture prekursori ili nastaju degradacijom složenijih ramnolipidnih struktura u toku same biosinteze.

3.6. Karakterizacija rhamnolipida iz različitih sojeva *P. aeruginosa* sa specifičnim poreklom

3.6.1. Hidrofobno-lipofilni balans (HLB)

U tabeli 3.11. su prikazane izračunate HLB vrednosti i očekivana svojstva RL struktura koje su detektovane pomoći LC-MS analize RL smeša. Iz tabele se može zaključiti da dobijene RL smeše ponašaju kao: O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi i detergentski.

Tabela 3.11. Izračunate vrednosti za HLB detektovanih mono- i di-RL struktura u RL smešama pomoću LC-MS analize

Detektovani mono- i di-rhamnolipidi	HLB vrednost	Predviđena svojstva
Rha-C ₁₀	10,24	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi
Rha-C _{12:2}	10,90	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi
Rha-C ₈ -C ₁₀	13,15	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi, tipični detergentski
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	13,53	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi, tipični detergentski
Rha-C ₁₀ -C _{12:1}	13,85	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi, tipični detergentski
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	13,87	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi, tipični detergentski
Rha-Rha-C ₈ -C ₁₀	10,08	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	10,59	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	10,90	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	11,25	O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi

3.6.2. Kritična micelarna koncentracija (CMC)

Kritična micelarna koncentracija RL je određivana kako bi se ispitalo potencijal za snižavanje površinske aktivnosti ramnolipidnih smeša koje produkuju izolovani sojevi *P. aeruginosa*. CMC je određivana za smeše ramnolipida koji su izolovane iz PPAS podloge sa suncokretovim uljem kao izvorom ugljenika nakon 96 h rasta. Važno je napomenuti da odnos i sastav homologa, prisustvo nezasićenih veza, grananje i dužina alki-lanaca ili veličina hidrofilnih elemenata u strukturi surfaktanta mogu uticati na CMC vrednost (Dubeau *et al* 2009; Haba *et al* 2003b). Osim ovoga HAA koje su detektovane u RL smešama imaju potencijal za snižavanje površinskog napona, koji je čak izraženiji nego kod samih ramnolipida (Dubeau *et al* 2009). Takođe, interesantno je istaći da su vrednosti za površinsku aktivnost *in silico* generisanih RL i HAA sa lancima dužine od C₈ do C₁₂ 47-53 (mono-RL), 53-57 (di-RL) i 37-40 (HAA) mN/m (tabela 3.12.).

CMC vrednosti dobijene eksperimentalno (tabeli 3.13. i slika 3.16.) su bile: 162,2 mg/l sa površinskom aktivnošću 39,6 mN/m (soj D1); 143,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 39,8 mN/m (soj D2); 135,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 38,8 mN/m (soj D3); 131,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 40,5 mN/m (soj 67); 131,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 40,1 mN/m (soj NCAIM) i 88 mg/l sa površinskom aktivnošću of 39,1 mN/m (soj ATCC 27853). Dobijene vrednosti su konzistentne sa publikovanim podacima za površinsku aktivnost od oko 30 mN/m i CMC vrednosti u opsegu od 20 do 20-200 mg/l (Abalos *et al* 2001; Dubeau *et al* 2009; Haba *et al* 2003b), (tabela 3.13.).

Tabela 3.12. *In silico* predikcija vrednosti za površinsku aktivnost različitih struktura HAA, mono-ramnolipida i di-ramnolipida dobijenih pomoću Chem Sketch softwera

Struktura	Koeficijent površinske aktivnosti α , mN/m
HAA	
C ₈ -C ₈ /C ₆ -C ₁₀	39,9±3
C ₈ -C ₁₀	39,3±3
C ₁₀ -C ₁₀	38,7±3
C ₈ -C _{12:1}	39,6±3
C ₁₀ -C _{12:1}	39,0±3
C ₁₀ -C ₁₂	38,3±3
C ₁₂ -C ₁₂	37,9±3
Mono-ramnolipid	
Rha-C ₁₀	52,3±5
Rha-C _{12:2}	53,4±5
Rha- C ₈ -C ₁₀	49,0±5
Rha-C ₁₀ -C ₁₀	42,2±5
Rha- C ₁₀ -C _{12:1}	48,4±5
Rha-C ₁₀ -C ₁₂	47,6±5
Di-ramnolipid	
Rha-Rha- C ₈ -C ₁₀	57,0±5
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₀	55,7±5
Rha-Rha-C ₁₀ -C ₁₂	54,6±5
Rha-Rha-C ₁₂ -C ₁₂	53,7±5

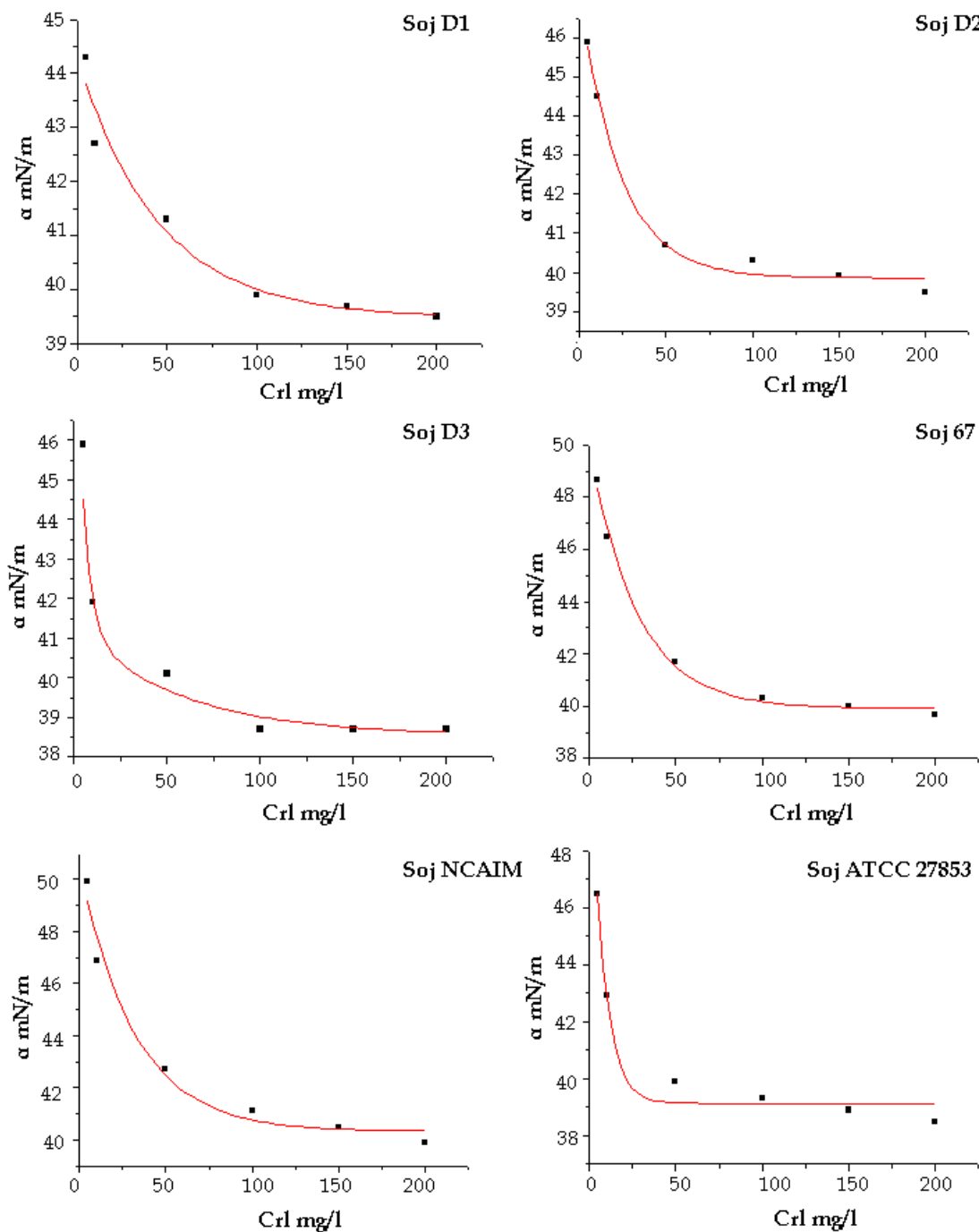
Ako se uzmu u obzir dobijeni rezultati i kvantifikacija komponenata ramnolipidnih smeša urađena pomoću LC-ESI MS analize može se zaključiti da površinska aktivnost potiče od ramnolipinih struktura, jer su koncentracije HAA bile niske, pa njihov doprinos površinskoj aktivnosti nije značajan. Takođe, iz eksperimentalnih rezultata (tabela 3.12.) vidi se da dobijene vrednosti α u odnosu na *in silico* predikciju koeficijenta površinske aktivnosti (tabela 3.13.) odgovaraju opsegu vrednosti za mono-ramnolipide, što je u skladu sa činjenicom da oni više doprinose površinskoj aktivnosti.

Tabela 3.13. Vrednosti za koeficijente površinske aktivnosti pri koncentraciji ramnolipida od 20-200 mg/l za određivanje CMC ramnolipida dobijenih pomoću različitih sojeva *P. aeruginosa*

Uzorak RL, mg/l	Koeficijent površinske aktivnosti α , mN/m
Soj D1	
200	39,50±0,90
100	39,90±0,90
50	41,30±1,12
10	42,70±0,94
5	44,30±0,96
Soj D2	
200	39,50±0,90
100	40,30±0,91
50	40,70±0,91
10	44,5±1,2
5	45,89±0,58
Soj D3	
200	38,71±0,89
100	38,70±0,90
50	40,1±1,1
10	41,90±0,93
5	45,89±0,98
Soj 67	
200	39,7±1,1
100	40,3±1,0
50	41,7±1,2
10	46,5±1,2
5	48,7±1,1
Soj NCAIM (P) B 001380	
200	39,9±0,9
100	41,10±0,92
50	42,70±0,94
10	46,9±1,2
5	49,9±1,1
Soj ATCC 27853	
200	38,5±1,1
100	39,3±1,1
50	39,90±0,90
10	41,90±0,93
5	46,5±1,2

Analizirane izolovane RL smeše svih ispitivanih sojeva su bile slične što se tiče dužine lanaca koje su bile od C₈-C₁₂, najzastupljenijih struktura Rha-C₁₀-C₁₀ i Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ i niskog sadržaja HAA. Uprkos sličnim RL profilima, odnos ukupnih di-/mono-RL se razlikovao. Visoka negativna korelacija je dobijena ne samo za CMC vrednosti i odnos ukupnih mono-/di-RL, već i za odnos CMC i odnos ukupnih mono-/di-RL ($r=-0,847$, $P=0,033$), već i za vrednosti CMC i odnos

Rha-C₁₀-C₁₀/Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ ($r=-0,892$, $P=0,015$). Niže vrednosti CMC dobijene su za viši odnos ukupnih mono-/di-RL (odnosno niži odnos di-/mono-RL), što je ukazivalo na to da mono-RL formiraju micelle pri nižim koncentracijama od di-RL.



Slika 3.16. Grafici za određivanje CMC vrednosti za smeše ramnolipida dobijenih pomoću sojeva *P. aeruginosa* D1, D2, D3, 67, NCAIM i ATCC 27853. Zavisnost koeficijenta površinskog napona (α) od koncentracije ramnolipida (Crl).

Ramnolipidne smeše se posmatraju kao jedan proizvod, ali je očekivano da će imati različite osobine, pa i površinsku aktivnost u zavisnosti od molekularnog sastava (Haba *et al* 2003a). U tabeli 3.14. su upoređene površinske aktivnosti nekoliko ekoloških izolata *P. aeruginosa*. Iz tabele se može videti da je površinska aktivnost u vodi je bila viša za RL dobijenog pomoću soja AT10 (26,8 mN/m) nego za RL koga je produkovao soj 47T2 (32,8 mN/m), ali je CMC vrednost bila niža za RL iz soja 47T2, nego za RL iz soja AT10 (108,8 i 150 mg/l, redom), (Haba *et al* 2003a). Obe vrednosti za CMC su niže od sojeva iz ove studije (D1, D2, D3, 67 i NCAM (P) B001380). Ovo bi mogao biti rezultat veće hidrofobnosti komponenata, jer je u smeši ramnolipida soja AT10 zastupljenost di-RL bila niža nego kod soja 47T2. Sličan efekat su prijavili Mata-Sandoval i saradnici (Mata Sandoval *et al* 1999). Alternativno, vrednost CMC za RL sojeva AT10 i 47T2 bi mogla da bude uslovljena % nezasićenih veza masnih kiselina u sastavu ramnolipida, koji je kod RL soja AT10 bio 35,7%, a kod RL soja 47T2 17,9%, što su mnogo veći sadažaj nego za sojeve iz ove studije, pa bi i efekat mogao da bude značajniji (tabela 3.14.)

Tabela 3.14. Fizičko-hemijska svojstva (CMC i površinska aktivnost) i sastav ramnolipidnih smeša iz različitih ekoloških izolata *P. aeruginosa* nakon 96 h kultivacije

Soj <i>P. aeruginosa</i>	CMC mg/l	Površinska aktivnost, mN/m	Di-RL frakcija, %	Mono-RL frakcija, %	Nezasićene masne kiseline, %	Vreme kultivacije, h
D1	162,0	39,6	80,7	19,3	1,3	96
D2	143,0	39,8	72,6	27,4	1,7	96
D3	135,0	38,8	59,1	41,9	6,1	96
67	131,0	40,5	56,2	43,8	2,9	96
PNCAIM (P) B 001380	131,0	40,1	57,7	42,3	2,4	96
AT10	150,0	26,8	37,8	62,2	35,7	96
47T2	108,8	32,8	> 37,8	> 62,2	17,9	96

3.6.3. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost ramnolipida dobijenih pomoću ispitivanih izolata (sojevi NCAIM, D1-D3, 67) i referentnog soja ATCC 27853 određivana je kao MIK. Praćeno je antimikrobno dejstvo na Gram-negativne (*E. coli*, *P. aeruginosa*) i Gram-pozitivne (*B. subtilis*, *M. luteus* i *S. aureus*) bakterijske sojeve i na gljive (*C. albicans* i *A. niger*). U tabeli 3.15. su sumirani dobijeni rezultati.

Tabela 3.15. Vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ramnolipida iz različitih sojeva *P. aeruginosa* za ispitivane sojeve Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija i sojeve gljiva

Ispitivani soj	Vrednosti MIK (mg/ml) za ramnolipide soja <i>P. Aeruginosa</i>					
	D1	D2	D3	67	NCAIM (P) B 001380	ATCC 27853
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2,5	5,0	2,5	2,5	5,0	2,5
<i>M. luteus</i> ATCC 4698	2,5	5,0	2,5	2,5	5,0	2,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	60	60	30	30	60	60
<i>P. aeruginosa</i> D1	>60	>60	>60	>60	>60	>60
<i>P. aeruginosa</i> D2	>60	>60	>60	>60	>60	>60
<i>P. aeruginosa</i> D3	30	>60	30	>60	>60	>60
<i>P. aeruginosa</i> 67	>60	>60	>60	>60	>60	>60
<i>P. aeruginosa</i> NCAIM (P) B 001380	>60	>60	>60	30	>60	>60
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>60	>60	30	>60	>60	>60
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	30	30	30	30	30	30
<i>A. Niger</i>	>60	>60	>60	>60	>60	>60

Dobijene vrednosti MIK-a za Gram-pozitivne bakterijske sojeve su nesto veće od literaturnih podataka (Haba *et al* 2003b; Benicasa *at al* 2004). Od Gram-negativnih sojeva jedno je *E.coli* bila osetljiva sa relativno visokim MIK vrednostima, dok su sojevi *P. aeruginosa* bili uglavno otporni na antimikrobno

dejstvo ramnolipida (tabela 3.15.). Sa izuzetkom soja D3 koji je bio osetljiv na dejstvo svog ramnolipida i ramnolipida soja D1 i soja NCAIM koji je bio osetljiv na ramnolipide soja 67 (tabela 3.15.). MIK za gljive pokazuje da soj *C. albicans* osetljiv na dejstvo ramnolipida sa relativno visokom vrednošću za MIK (30 mg/ml), dok je *A. niger* nije bio osetljiv na ispitivane koncentracije ramnolipida (tabela 3.15.). Dobijeni podaci su u skladu sa literaturom, u kojoj je prijavljena veća osetljivost Gram-pozitivnih bakterijskih vrsta na antimikrobno dejstvo ramnolipida u odnosu na Gram-negativne bakterije i gljive (Abdel-Mougwoud *et al* 2010; Abalos *et al* 2001; Benincasa *et al* 2004; Haba *et al* 2003b). Ipak, u odnosu na objavljene radove dobijene vrednosti MIK za izolovane ramnolipide za Gram-pozitivne bakterije su više, a od ispitivanih Gram-negativnih samo neki sojevi su pokazali osetljivost, dok su gljive, takođe, imale visoke vrednosti MIK ili su bile neosetljive.

3.7. Ispitivanje potencijala soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 za primenu u procesima bioremedijacije teških metala

3.7.1. Ispitivanje otpornosti na različite teške metale

Ispitivanje otpornosti na teške metale (Hg, Cu i Cd) urađeno je određivanjem vrednosti MIK. Rezultati dati u tabeli 3.16. pokazuju da je soj *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 otporan na prisustvo kadmijuma i bakra, dok je vrednost MIK za živu bila znatno niža, ukazujući na osetljivost soja na prisustvo jona žive. Dobijeni podaci su saglasni sa sa podacima objavljenim u dosadašnjim studijama sa nativnim sojevima (Hassen *et al* 1998; Singh *et al* 2010).

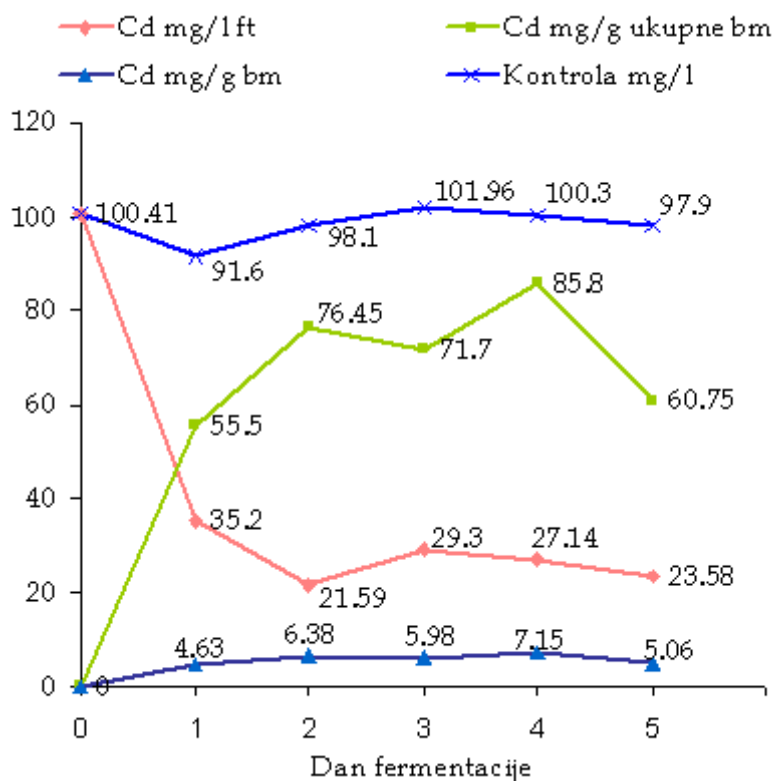
Tabela 3.16. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) Hg, Cu i Cd za *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380

Metal	MIK, mM	Literatura*
Bakar	2	2-10
Kadmijum	4	0,95-6
Živa	<0,5	<0,5

*Vrednosti za nativne sojeve (Hassen *et al* 1998; Singh *et al* 2010)

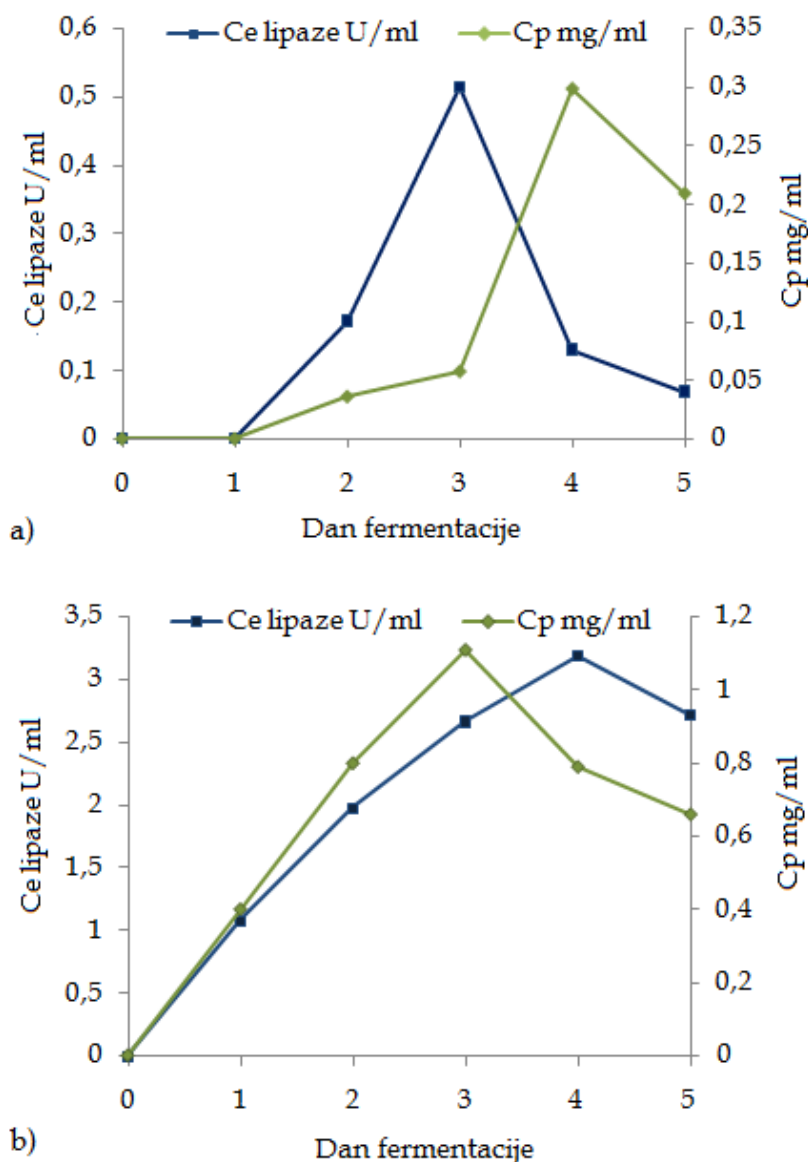
3.7.2. Usvajanje kadmijuma

3.7.2.1. Dinamika usvajanja kadmijuma



Slika 3.17. Dinamika usvajanja kadmijuma soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B001380 koji je gajen na LB podlozi sa CdCl_2 (ft- fermentaciona tečnost, bm- biomasa).

Dinamika usvajanja kadmijuma koji je dodat u LB podlogu je praćena: kao promena koncentracije metala u fermentacionoj tečnosti i biomasi u trajanju od pet dana i kao raspodela Cd u biomasi i fermentacionoj tečnosti (slika 3.17.). Početna koncentracija metala u podlozi je bila 100 mg/l. Kao što se na slici može videti najintenzivnija faza usvajanja metala je bila tokom prvih 24 časa kultivancije. U tom periodu koncentracija metala u fermetacionoj tečnosti je smanjena četiri puta, što sugeriše da je proces usvajanja vezan za bioakumulatciju, tj. da se metal akumulirao u citosolu i ćelijskim strukturama.



Slika 3.18. Dinamika koncentracije proteina (Cp) i enzimska aktivnosti lipaze (Ce lipaze) tokom fermentacije *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380: a) LB podloga sa dodatkom CdCl₂ i b) na LB podloga bez metala.

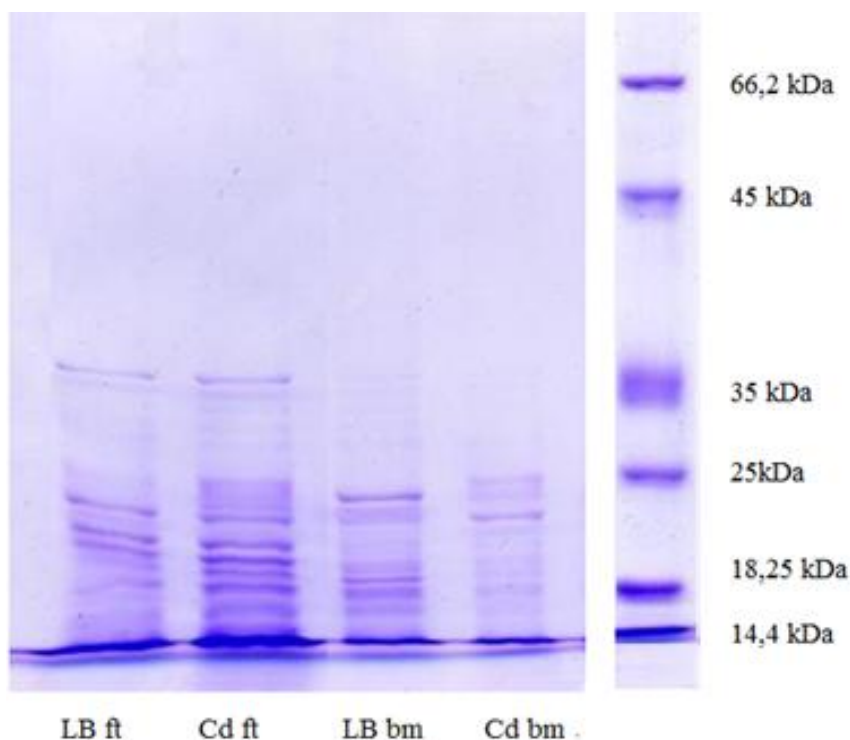
Rezultati su pokazali da soj *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 ima potencijal za primenu u procesima bioremedijacije sredina kontaminiranih ovim teškim metalom. Takođe, određivanje kadmijuma u ramnolipidu izolovanom iz fermentacione tečnosti pokazalo da je koncentracija metala koju je vezao biosurfaktant (0,04 mg/l) izrazito mala što je potvrdilo da su u usvajanje kadmijuma uključene intracelularne strukture.

Osim raspodele kadmijuma u fermentacionoj tečnosti, tokom trajanja fermentacije praćeni su i ostali parametri: pH, koncentracija proteina, egzopolisaharida, ramnolipida i aktivnost lipaze. Vrednost pH fermentacione tečnosti se kretala od 8,1 do 8,7. Koncentracije egzopolisaharida i ramnolipida su bile veoma niske i nisu mogle da budu detektovane standardnim spektrofotometrijskim metodama. Takođe, niske koncentracija proteina (opseg 0,04 do 0,21 mg/ml) i aktivnost lipaze (opseg 0,011 do 0,019 U/ml) tokom fermentacije ukazuju na efekat metala na biosintetske procese soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 (slika 3.18.a). Poređenje sa kontrolnom fermentacijom, kada je soj gajen na LB podlozi bez prisustva metala (slika 3.18. a i b), potvrđuje efekat metala na metabolizam soja, jer je profil dinamike za proteine i lipazu sličan za fermentaciju sa kadmijumom i bez njegovog prisustva, ali sa nižim vrednostima i vremenskim pomakom. Naime, maksimalana koncentracija proteina kada je soj gajen na LB podlozi sa kadmijumom je bila 10 puta manja u odnosu na koncentraciju proteina koja je izmerena na LB podlozi bez metala, a maksimum je dostignut dan kasnije, dok je maksimum enzimske aktivnosti dostignut dan ranije, a maksimalna vrednost je bila 6 puta manja nego kada je soj gajen na LB podlozi (slika 3.18. a i b).

3.7.2.2. Elektroforetski profil intra- i ekstracelularnih proteina

Efekat kadmijuma na ekspresiju proteina praćen je pomoću SDS elektroforeze. Na slici 3.19. je prikazan profil intra- i ekstracelularnih proteina soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 koji je gajen na LB podlozi bez i uz prisustvo kadmijuma. U svim uzorcima su detektovane proteinske trake ispod 45 kDa. Profili intra- i ekstracelularnih proteina su različiti, u smislu broja proteinskih traka kao i u njihovih intenziteta. Ovakva promena je rezultat stresa koji je izazvan izlaganjem bakterijske kulture kadmijumu. Dobijeni rezultat se može tumačiti u kontekstu dosadašnjih studija. Naime, Jain i saradnici su pomoću *in silico* pristupa na sojevima *P. putida* 710A i *P. montelli* 97AN, pokazali da kao rezultat stresa nakon izlaganja mikroorganizma kadmijumu dolazi do promene u proteinskoj ekspresiji enzima koji su uključeni u metaboličke putanje sinteze amino-kiselina,

metabolizma purina i pirimidina, metabolizma histidina, proteina koji su medijatori u elektron transportu i sintezi kofaktor, kao i promene u ekspresiji metal i ATP vezujućih enzima (Jain *et al* 2010). Bitno je napomenuti da su molekulske mase ekspresiranih proteina u uslovima stresa ispod 45 kDa. Kako je značaj izmenjene biosinteze purina i metabolizma histidina već dokumentovan kod kvasca, enzimi koji su bili ekspimirani u prisustvu kadmijuma iz studije, potvrdili su njihovu funkciju tokom preživljavanja u prisutvu kadmijuma. Dodatno proteini koji su ekspimirani su uglavnom su važni za energetske procese, što potvrđuje njihov značaj da bi se prevazišle energetske potrebe ćelije kada je izložena kadmijumu (Jain *et al* 2010).



Slika 3.19. Proteinski profil fermentacione tečnosti i biomase soja *P. aeruginosa* NCAIM (P)B 001380 koji je gajen na podlozi sa kadmijumom i kontrolnoj prodlozi bez metala: LB ft - fermentaciona tečnost sa LB bez CdCl₂, Cd ft - fermentaciona tečnost sa LB sa CdCl₂, LB bm - biomasa sa LB bez CdCl₂, Cd bm - biomasa sa CdCl₂.

ZAKLJUČCI

Na osnovu svih izloženih i diskutovanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. Biohemijska i molekularna karakterizacija sojeva izolovanih iz sredina zagađenih naftom i naftnim derivatima potvrdila je da svi sojevi pripadaju vrstama *P. aeruginosa* iz grupe I, "pravi Pseudomonasi" ili "*Pseudomonas sensu stricto*". Filogenetska analiza pokazala je da između sojeva postoje određene filogenetske korelacije.

2. Površinske aktivnosti fermentacionih tečnosti su u opsegu od 36,3 do 39,9 mN/m, što pokazuje da svi sojevi proizvode biosurfaktante.

3. Strukturna karakterizacija biosurfaktanta je potvrdila da je izolovani biosurfaktat ramnolipid.

4. Na osnovu produkcije ramnolipida pomoću soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 na LB, MSM i PPAS podlogama, koja je bila 15,5; 10,7 i 1010,4 mg/l, redom, PPAS podloga sa kombinovanim izvorom azota (NaNH₄ i peptonom I) je izabrana kao osnovna podloga.

5. Daljom optimizacijom PPAS podloge, utvrđeno je da je suncokretovo ulje optimalni izvor ugljenika, a pepton I optimalni izvor azota, sa prinosom od 3000 mg/l.

6. Uslovi produkcije su dalje analizirani pomoću RSM. Dobijeno je 4,07 g/l ramnolipida, na podlozi sa 3,5 % suncokretovog ulja i 0,5 % peptona (odnos C/N 12,83), na 20 °C, dok je sa 1 % suncokretovog ulja i 0,5 % pepton I (odnos C/N 5,68) na 30 °C, koncentracija ramnolipida je bila 3,0 g/l.

7. Sirovi ekstrakt i prečišćena mono-RL frakcija dobijeni pomoću soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 na optimizovanoj PPAS podlozi su analizirane pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije. Spektri su pokazali da su u čistoj frakciji bili prisutni samo mono-RL, dok je sirovi ekstrakt sadržao i mono- i di-

ramnolipine strukture. Sirovi ekstrakt u poređenju sa čistom frakcijom daje kompletan RL profil (što se može označiti i kao ukupni ramnolipidom) za produkujući soj *P. aeruginosa*. Generisani MS spektar je pokazao da je ova metoda pogodna za preliminarni "skrining" ukupnog ramnolipidoma, kao i da je sirovi ekstrakt, dobijen jednostavnom procedurom izolovanja, dobar preparat za MS analizu.

8. MALDI TOF spektri ekstrakata ramnolipida iz fermentacionih tečnosti različitih sojeva *P. aeruginosa* pokazali su da je broj mono-ramnolipida različitih sojeva je varirao od 7 (soj 67) do 4 (soj D2), dok je broj di-ramnolipida bio od 9 (soj D2) do 5 (soj D1).

9. Svi ili skoro svi ispitivani sojevi *P. aeruginosa* su produkovali ramnolipidne strukture RL1 (Rha-C₈-C₁₀, Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-C₁₀-C_{12:1}, Rha-C₁₀-C₁₄, Rha-C₁₀-C_{14:1}, Rha-C₁₄-C₁₆) i RL3 (Rha-Rha-C₈-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, Rha-Rha-C₁₀-C₁₂, Rha-Rha-C₁₀-C_{12:1}). Sporadično su detektovane RL1 strukture Rha-C₁₀-C_{14:1}, Rha-C₁₂-C₁₄, Rha-C₁₀-C₁₀-CH₃ i dekanoil-Rha-C₁₀-C₁₀, dok su se od RL2 struktura pojavili Rha-Rha-C₁₀-C_{10:1}, Rha-Rha-C₁₀-C_{14:1}, Rha-Rha-C₁₂-C₁₄ i Rha-Rha-C₁₄-C₁₄.

10. Nakon preliminarnih studija pomoću MALDI TOF, analiza RL je nastavljena pomoću HPLC-MS metode. Utvrđeno je da je korišćenjem svih navedenih izvora ugljenika Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ najzastupljeniji di-ramnolipid sa vrednostima od 24% do 72% u odnosu na ukupne ramnolipide, dok je njegov prekursor Rha-C₁₀-C₁₀ dominantan mono-ramnolipid sa zastupljenošću 11 to 66% ukupnih ramnolipida. Rha-C₁₀, Rha-C_{12:2} i Rha-C₁₀-C₁₂ su predstavljali retke mono-RL strukture (ispod 1%), dok je u di-RL frakciji nisku zastupljenost imao Rha-Rha-C₈-C₁₀ (opseg 1-4,5%), a najmanje zastupljena struktura je bila Rha-Rha-C₁₂-C₁₂ (ispod 1%), za sve ispitivane izvore ugljenika.

11. Koncentracije glavnih mono-RL strukture Rha-C₁₀-C₁₀ su bile 850,00; 162,69 i 124,69 mg/l za suncokretovo ulje iz friteze, suncokretovo ulje i glukozu, redom, dok je za SOME 1 kao izvor ugljenika bilo nešto niže 44,64 mg/l.

12. Detektovane koncentracije glavnog di-ramnolipida Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ su bile: 314,02; 288,39; 208,66; 92,77 i 78,16 mg/l za suncokretovo ulje iz friteze, SOME 1, suncokretovo ulje, glukozu i SOME 2, redom.

13. Detektovane HAA se pojavljuju u koncentracijama (mg/l): 48,37 (suncokretovo ulje iz friteze); 16,34 (suncokretovo ulje); 8,77 (SOME 1); 0,40 (SOME 2) i 0,30 (glukoza).

14. U RL smeši soja *P. aeruginosa* NCAIM detektovane su i 3-hidroksi masne kiseline sa lancima koji variraju od C₈-C₈ do C₁₀-C_{12:1}, sa koncentracijama manjim od 0,01 do skoro 50,00 mg/l, što je takođe doprinelo razovrsnosti profila biosurfaktanta.

15. Odnos di-/mono-RL frakcija je bio najveći za SOME 1 i SOME 2 (5,39 i 3,82, redom), a nešto niži za suncokretovo ulje kao izvor ugljenika (1,37), što ukazuje da ovi izvori favorizuju produkciju di-RL kao finalnih produkata. Sa druge strane, glukozu i suncokretovo ulje iz friteze su imali veći % mono-RL, tako je odnos di-/mono-RL bio 0,90 i 0,43, redom.

16. Analizom produkcionih profila biosurfaktanta (sastav, relativna zastupljenost i koncentracija) pet ekoloških izolata *P. aeruginosa* sa specifičnim poreklom: NCAIM (mineralno ulje za sečenje metala), konzorcijum D1, D2 i D3 (zemljište kontaminirano (mazutom), soj 67 (zemljište kontaminirano naftom) i referentnog soja ATCC 27853, na PPAS podlozi sa suncokretovim uljem, može se zaključiti da su svi ispitivani sojevi su pokazali značajnu produkciju ramnolipida.

17. Visoke koncentracije ukupnih ramnolipida su dobijene za soj 67 (3339,00 mg/l), D1 (1729,16 mg/l), D2 (1706,04 mg/l) a nešto niže za soj NCAIM (427,62 mg/l), referentni ATCC 27853 (107,92 mg/l) i D3 (53,38 mg/l).

18. Koncentracije glavne mono-RL strukture Rha-C₁₀-C₁₀ su bile 1327,23; 433,41 i 300,86 mg/l za sojeve 67, D2 i D1, redom, dok su koncentracije glavne di-RL strukture Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ su bile 1685,65; 1197,78 i 1052,12 mg/l za sojeve 67, D1 i D2.

19. Odnosi ukupnih di-/mono-RL za sve ispitivane sojeve *P. aeruginosa* su bili veći od 1,00, ukazujući na veću zastupljenost di-RL, posebno za sojeve D1 (4,17) i D2 (2,62).

20. U smešama svih 6 sojeva *P. aeruginosa* su detektovane HAA vrste sa lancima čija dužina varira od C₈-C₈ do C₁₀-C_{12:1}. Najveća produkcija ukupnih HAA dobijena je za soj 67 (140,34 mg/l). Za sojeve D1, D2 i NCAIM detektovane koncentracije HAA su bile slične (oko 16-17 mg/l), dok je za sojeve D3 i ATCC dobijena niža produkcija od 6,55 i 2,97 mg/l, redom.

21. Ramnolipidne smeše koje su produkovali sojevi D1 i D2 su bile sastavljene dominantno od di-RL, dok je za ostale sojeve zastupljenost di- i mono-ramnolipida bila približno slična, dok su HAA nađene u manjim koncentracijama sa izuzetkom soja 67.

22. Glavna mono-RL struktura za sve sojeve je bila Rha-C₁₀-C₁₀ sa zastupljenošću u opsegu 17-50 %. Najređje mono-RL strukture za sve sojeve su bile Rha-C₁₀ (zastupljenost ispod 0,2%) i Rha-C₁₀-C₁₂ (zastupljenost ispod 0,1%) za sve sojeve osim D3.

23. Glavna di-RL struktura je bila Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ sa zastupljenošću 48-70%, nakon koje su sledile Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (4-9%) i Rha-Rha-C₈-C₁₀ (1-3%), za sve sojeve. Najmanje zastupljen di-RL je bio Rha-Rha-C₁₂-C₁₂ (ispod 0,5%).

24. Članovi konzorcijuma koji čine sojevi D1, D2 i D3, iako imaju isto poreklo (halda kontaminirana mazutom) i slične fiziološko-biohemijske karakteristike, pokazali su razlike u koncentraciji ukupnih ramnolipida i odnosima frakcija di- i mono-RL. Dobijeni rezultat bi mogao da ukazuje na komplementarnu funkciju u mikrobnom konzorcijumu, u procesima solubilizacije ugljovodonika u kontaminiranoj sredini, kada je *in situ* produkcija biosurfaktanta pomoću mikroorganizama od izuzetne važnosti u bioremedijaciji okoline kontaminirane naftom, pa je simultana i sinergistična produkcija biološki poželjna.

25. Na osnovu izračunatih HLB vrednosti koje se za mono-RL kreću od 10,08 do 13,87 i za di-RL od 10,24 do 11,25 očekivane osobine RL struktura koje su detektovane pomoći LC-MS analize u RL smešama može se zaključiti da se dobijene RL smeše ponašaju kao: O/W emulzeri, rastvarači ili hidrotopi i detergentski.

26. Eksperimentalno određene CMC vrednosti za ramnolipide dobijene pomoću različitih izolata *P. aeruginosa* su bile: 162,2 mg/l sa površinskom aktivnošću 39,6 mN/m (soj D1); 143,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 39,8 mN/m (soj D2); 135,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 38,8 mN/m (soj D3); 131,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 40,5 mN/m (soj 67); 131,0 mg/l sa površinskom aktivnošću 40,1 mN/m (soj NCAIM) i 88 mg/l sa površinskom aktivnošću of 39,1 mN/m (soj ATCC 27853).

27. Uprkos sličnim RL profilima, odnos ukupnih di-/mono-RL se značajno razlikovao. Visoka negativna korelacija je dobijena ne samo za CMC vrednosti i odnos ukupnih mono-/di-RL, već i za odnos CMC i odnos ukupnih mono-/di-RL ($r=-0,847$, $P=0,033$), već i za vrednosti CMC i odnos Rha-C₁₀-C₁₀/Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ ($r=-0,892$, $P=0,015$). Niže vrednosti CMC dobijene su za viši odnos ukupnih mono-/di-RL (odnosno niži odnos di-/mono-RL), što je ukazivalo na to da mono-RL formiraju micelle pri nižim koncentracijama od di-RL.

28. Određivanje antimikrobne aktivnosti je dalo nešto veće vrednosti MIK-a za Gram-pozitivne bakterije u odnosu na literaturne podatke. Gram-negativna *E.coli*, kao i gljiva *C. albicans* su pokazala malu osetljivost na RL.

29. Soj *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 otporan na prisustvo kadmijuma i bakra (MIK 2 i 4 mM, redom), dok je vrednost MIK za živu bila znatno niža (<0,5 mM), što ukazuje na osetljivost soja na prisustvo jona žive.

30. Praćenje dinamike usvajanja kadmijuma sugerira da se metal akumulirao u citosolu i ćelijskim strukturama, dok je koncentracija kadmijuma u

vezanog za ramnolipid izrazito mala što je potvrdilo da su u usvajanju kadmijuma prevashodno uključene intracelularne strukture.

31. Elektroforetski profil intra- i ekstracelularnih proteina soja *P. aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 su različiti, u smislu broja proteinskih traka kao i u njihovih intenziteta i mogu se tumačiti kao rezultat stresa koji je izazvan izlaganjem bakterijske kulture kadmijumu.

LITERATURA

1. Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F., Manresa, A., Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* (2001) 17: 1367–1371
2. Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.H., Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Appl Biochem Biotechnol* (2009) 157: 329–345
3. Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 86: 1323–1336
4. Abdel-Mawgoud, A.M., Hausmann, R., Lépine, F., Müller, M.M., Déziel, E., Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation and bioengineering of production. In: Biosurfactants, Microbiology Monographs 20, G. Soberón-Chávez (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2011) doi: 10.1007/978-3-642-14490-5_2
5. Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., Nabi, A., Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination* (2008) 223: 143–151
6. Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M., Rhamnolipid induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol* (2000) 66: 3262–3268
7. Andrä, J., Rademann, J., Howe, J., Koch, M.H.J., Heine, H., Zähringer, U., Brandenburg, K., Endotoxin-like properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. *Biol Chem* (2006) 387: 301–310
8. Aparna, A., Srinkethan, G., Smitha, H., Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids Surf B* (2012) 95: 23– 29
9. Arino, S., Marchal, R., Vandecasteele, J.P., Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* (1996) 45: 162–168
10. Arino, S., Marchal, R., Vandecasteele, J.P., Production of new extracellular glycolipids by a strain of *Cellulomonas cellulans (Oerskovia xanthineolytica)* and their structural characterization. *Can J Microbiol* (1998) 44: 238–24
11. Asci, Y., Nurbas, M., Acikel, Y.S., A comparative study for the sorption of Cd (II) by soils with different clay contents and mineralogy and the

- recovery of Cd (II) using rhamnolipid biosurfactant. *J Hazard Mater* (2008) 154: 663–673
12. Baath, E., Effect of heavy metals in soil on microbial processes and populations. *Water Air Soil Pollut* (1989) 47: 335-379
 13. Bai, E., Brusseau, M.L., Miller, R.M., Biosurfactant-enhanced removal of hydrocarbon from soil. *J Contam Hydrol* (1997) 25: 157-170
 14. Beal, R., Betts, W.B., Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* (2000) 89: 158–168
 15. Benincasa, M., Contiero, J., Manresa, M.A., Moraes, I.O., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. *J Food Eng* (2002) 54: 283-288
 16. Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., Manresa, A., Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek* (2004) 85: 1–8
 17. Benincasa, M., Accorsini, F.R., *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as substrate. *Biores Technol* (2008) 99: 3843-3849
 18. Bergström, S., Theorell, H., Davide, H., On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*. Pyolipic acid, active against *M. tuberculosis*. *Arkiv Chem Mineral Geol* 23A (1946a) 13: 1–12
 19. Bergström, S., Theorell, H., Davide H Pyolipic acid. A metabolic product of *Pseudomonas pyocyanea* active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* (1946b) 10: 165–166
 20. Beskoski V.P.: Ph.D. thesis, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, 2011
 21. Beskoski, V.P., Gojgic-Cvijovic, G., Milic, J., Ilic, M., Miletic, S., Solevic, T., Vrvic, M.M., Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) - A field experiment. *Chemosphere* (2011) 83: 34-40
 22. Bezbradica, D., Jankovetic, S., Grbavcic, S., Avramovic, N., Milosavic, N., Knezevic-Jugovic, Z., Karadzic, I., in *Proceeding of the 47th Meeting of the Serbian Chemical Society*, (2009), Proceedings, Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia, 2009, p. 168
 23. Bradford, M. M., A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* (1976) 72: 248-254

24. Boles, B.R., Thoendel, M., Singh, P.K., Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* (2005) 57: 1210–1223
25. Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M., O'Toole, G.A., Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* (2007) 189: 3603–3612
26. Camara, M., Williams, P., Hardman, A., Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *Lancet* (2002) 2: 667–676
27. Cameotra, S.S., Singh, P., Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *Inter Biodeter Biodegrad* (2008) 62: 274–280
28. Cameotra, S.S., Singh, P., Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Fact* (2009) 8: 1–7
29. Campos-Garcia, J., Caro, A.D., Najera, R., Miller-Maier, R.M., Al-Tahhan, R.A., Soberon-Chavez, G., The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol* (1998) 180: 4442–4451
30. Chandrasekaran, E.V., BeMiller, J.N., In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler RL (ed.). Academic Press, (1980) New York, p 89
31. Chrzanowski, Ł., Ławniczak, Ł., Czaczyk, K., Why do microorganisms produce rhamnolipids?, *World J Microbiol Biotechnol* (2012) 28:401–419
32. Chayabutra, C., Wu, J., Kwang, J.K., Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon sources. *Biotechnol Bioeng* (2001) 72: 25–33
33. Christova, N., Tuleva, B., Lalchev, Z., Jordanova, A., Jordanov, B., Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on *n*-hexadecane. *Z Nat Forsch C J Biosci* (2004) 59: 70–74
34. Clarke, K.G., Ballot, F., Reid, S.J., Enhanced rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under phosphate limitation. *World J Microbiol Biotechnol* (2010) 26: 2179–2184
35. Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., van Delden, C., Curty, L.K., Köhler, T., *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* (2002) 184: 3027–3033

36. Costa, S.G.V.A.O., Nitschke, M., Hadaad, R., Eberlin, M.N., Contiero, J., Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils *Process Biochem* (2006) 41: 483-488
37. Das, N., Chandran, P., Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an Overview. *Biotechnol Res Int* (2011) doi:10.4061/2011/941810
38. Das, K., Mukherjee, A.K., Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technol* (2007) 98: 1339-1345
39. Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A., Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* (2003) 185: 1027-1036
40. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg E.P., The involvement of cell-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* (1998) 280: 295-298
41. de Kievit, T.R. Iglewsky, B.H., Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *J Bacteriol* (2000) 68: 4839-4849
42. de Koster, C.G., Vos, B., Versluis, C., Heerma, W., Haverkamp, J., High-performance thin-layer chromatography/fast atom bombardment (tandem) mass spectrometry of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biol Mass Spectrom* (1994) 23: 179-185
43. Desai, J.D., Bant, I.M., Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* (1997) 61: 47-64
44. Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O.A., Villemur, R., Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1440: 244-252
45. Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1485: 145-152
46. Déziel, E., Comeau, Y., Villemur, R., Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* (2001) 183: 1195-1204
47. Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., Villemur, R., *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in

- Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol Sgm* (2003) 149: 2005–2013
48. Déziel, E., Lepine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N. Tompkin R.G., Rahme L.G., Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101: 1339–134
 49. Diggle, S.P., Winzer, K., Chhabra, S.R., Worrall, K.E., Camara, M., Williams, P., The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* (2003) 50: 29–43
 50. Dimitrijevic, A., Velickovic, Rikalovic, M., Avramovic, N., Milosavic, N., Jankov, R., Karadzic, I., Simultaneous production of exopolysaccharide and lipase from extremophylic *Pseudomonas aeruginosa* san-ai strain: a novel approach for lipase immobilization and purification. *Carbohydr Polym* (2011) 83: 1397–1401
 51. Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Zhang, L.-H., Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications, *Phil Trans R Soc B* (2007) 362: 1201–1211
 52. Dong, Y.-H., Zhang L.-H., Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *J Microbiol* (2005) 43: 101–109
 53. Duan, K., Surette, M., Environmental regulation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 Las and Rhl quorum-sensing systems. *J Bacteriol* (2007) 189: 4827–4836
 54. Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D., Lépine, F., *Burkholderia thailandensis* harbors two identical *rhl* gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology* (2009) 9: 263, doi:10.1186/1471-2180-9-263
 55. Dubey, K., Juwarkar, A., Distillery and crud whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World J Microbiol Biotechnol* (2001) 17: 61–69
 56. Dusane, D.H., Zinjarde, S.S., Smita S., Venugopalan, V.P., Mclean, R.J.C.; Weber, M.M., Rahman, P. K.S.M. Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnol Genet Eng Rev* (2010) 27: 159–184
 57. Eccles, H., Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?. *Trends Biotechnol* (1999) 17: 462–465
 58. Edwards, J.R., Hayashi, J.A., Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys* (1965) 111: 415–421

59. Florence, T.M., Trace Element Speciation in Biological Systems. In: Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems Batley, G. E. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1989) pp 319-338
60. Foght, J.M., Westlake, D.W., Johnson, W.M., Ridgway, H.F., Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chernotaxonornic and molecular techniques. *Microbiology* (1996) 142: 2333-2340
61. Franklin, M.T., Nivens, D.E., Weadge, J.T., Lynne-Howell, L., Biosynthesis of *P. aeruginosa* extracelullar polisacharides alginate, Pel and Psl, *Front Microbiol* (2011) 2: 1-16 doi: 10.3389/fmicb.2011.00167
62. Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T.J., Banat, I.M., Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur J Lipid Sci Tech* (2010), 112: 617-627
63. Fraser, G.M., Hughes, C., Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* (1999) 2: 630-635
64. Fuqua, C., Greenberg, E.P., Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3: 685-695
65. Gabr, R.M., Hassan, S.H.A., Shoreit, A.A.M., Biosorption of lead and nickel by living and nonliving cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *Int Biodeterior Biodegrad* (2008) 62: 195-203
66. Gallagher, L.A., Mcknight, S.L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C., Manoil, C., Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (2002) 184: 6472-6480
67. Górna, H., Lawniczak, Ł., Zgoła-Greškowiak, A., Kaczorek, E., Differences and dynamic changes in cell surface properties of three *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from petroleum-pollutes soil as a response to various carbon sources and the external addition of rhamnolipids, *Biores Technol* (2011) 102: 3028-3033
68. Griffin, W., Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J Soc of Cosm Chem* (1954) 5: 235-249
69. Gunther, N.W., Nunez, A., Fett, W., Solaiman, D.K.Y., Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol* (2005) 71: 2288-2293
70. Gunther, N.W., Nunez, A., Fortis, L., Solaiman, D.K.Y., Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. *J Ind Microbiol Biotech* (2006) 33: 914-920

71. Gupta, R., Ahuja, P., Khan, S., Saxena, R.K., Mohapatra, H., Microbial biosorbents: meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Curr Sci* (2000) 78: 967-973
72. Gupta, A., Ray, S., Kapoor, S., Khare, S.K., Solventstable *Pseudomonas aeruginosa* PseA protease gene: Identification, molecular characterization, phylogenetic and bioinformatic analysis to study reasons for solvent stability. *J Mol Biol Biotechnol* (2008) 15: 234-243
73. Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manresa, A., Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J Appl Microbiol* (2000) 88: 379-387
74. Haba, E., Abalos, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Manresa, A., Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Surfactants Deterg* (2003a) 6: 155-161
75. Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M.J., Infante, M.R., Manresa, A., Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol Bioeng* (2003b) 81: 316-322
76. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Oxygen toxicity, Oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* (1984) 219: 1-14
77. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley, P., Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* (2004) 2: 95-108
78. Hassan, S.H.A., Awad, Y.M., Kabir, M.H. Oh, S.E., Joo, J.H., Bacterial Biosorption of heavy metals In *Biotechnology Cracking New Pastures*, 2010, MD Publications PVT LTD New Delhi, pp 80-110 Chapter: 01/2010; ISBN: 978-81-7533-233-1
79. Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M., Boudabous, A., Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Biores Technol* (1998) 65: 73-82
80. Hauser, G., Karnovsky, M.L., Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (1954) 68: 645-654
81. Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z. J., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N., Givskov, M., Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* (2003) 22: 3803-3815

82. Heyd, M., Kohnert, A., Tan, T.-H., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., Franzreb, M., Berensmeier, S., Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal Bioanal Chem* (2008) 391: 1579–1590
83. Hoang, T.T., Schweizer, H.P., Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *J Bacteriol* (1999) 18: 5489–5497
84. Hodge, J.E., Hofreiter, B.T., In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler RL, Wolfrom ML (eds). Academic Press, (1962) New York, p 380
85. Hoefer protein electrophoresis Application guide, San Francisco, CA 1994, SAD, pp 19-30
86. Hommel, R., Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates. In: *Biochemistry of microbial degradation*, Ratledge C. (ed). Kluwer Academic Publishers, (1994) London, pp 63–87
87. Hussein, H., Farag, S., Kandil, K., Moawad, H., Tolerance and uptake of heavy metals by *Pseudomonads*. *Process Biochem* (2005) 40: 955-961
88. Ilic, V., Saponjic, Z., Vodnik, V., Potkonjak, B., Jovancic, P., Nedeljkovic, J., Radetic, M., The influence of silver content on antimicrobial activity and color of cotton fabrics functionalized with Ag nanoparticles, *Carbohydr Polym* (2009) 78: 564-569
89. Irie, Y., O'Toole, G.A., Yuk, M.H., *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* (2005) 250: 237–243
90. Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., Trevors, J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Meth* (1991) 13: 271–279
91. Jain, D.K., Lee, H., Trevors, J., Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J Industri Microbiol* (1992) 10: 87-93
92. Jain, S., Rani, A., Marla, S., Goel, R., Differential proteomic analysis of psychrotolerant *Pseudomonas putida* 710a and alkalophilic *Pseudomonas monteilli* 97 an for cadmium stress. *Intel J Bio Med Res* (2010) 1: 234-241
93. Jarvis, F.G., Johnson, M.J., A Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc* (1949) 71: 4124–4126

94. Johnson, M.K., Boese-Marazzo, O., Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* (1980) 29: 1028–1033
95. Jovancicevic, B., Antic, M., Pavlovic, I., Vrvic, M., Beskoski, V., Kronimus, A., Schwarzbauer, J. Transformation of petroleum saturated hydrocarbons during soil bioremediation experiments. *Water Air Soil Pollut* (2008) 190: 299-307
96. Juwarkar, A.A., Nair, A., Dubey, K.V. Singh, S.K., Devotta, S., Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. *Chemosphere* (2007) 68: 1996–2002
97. Kadukova, J., Vircikova, E., Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. *Environ Int* (2005) 31: 227-232
98. Karadzic, I., Masui, A., Fujiwara, N., Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* growth in cutting oil. *J Biosci Bioeng* (2004) 98: 145-152
99. Karadzic, I., Masui, A., Izrael-Zivkovic, L., Fujiwara, N., Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as metal working fluid, *J Biosci Bioeng* (2006) 102: 82-89
100. Kiewitz, C., Tummeler, B. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol* (2000) 182:3125-3135
101. Kilic N.K, Stensballe, A., Otzen, D.E., Donmez, G., Proteomic changes in response to chromium(VI) toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biores Technol* (2010) 101: 2134-2140
102. Kim, K.K., Jang, W.H., Ko, J.H., Kang, J.S., Noh, M.J., Yoo, O.J., Lipase and its modulator from *Pseudomonas* sp. strain KFCC 10818: proline-to-glutamine substitution at position 112 induces formation of enzymatically active lipase in the absence of the modulator. *J Bacteriol* (2001) 183: 5937-5941
103. Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P., Devos, W.M., Quorum sensing by peptide pheromones and two component signal transduction systems in Gram positive bacteria. *Mol Microbiol* (1997) 24: 895–904
104. Koch, A.K., Käppeli, O., Fiechter, A., Reiser, J., Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol* (1991) 173: 4212–4219

105. Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., Pechère, J.C., Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* (2000) 182: 5990–5996
106. Kovalick, W., Perspectives on health and environmental risks of soil pollution and experiences with innovative remediation technologies. In: Abstracts of the 4th World Congress of Chemical Engineering abstract 33.3-1 (1991) Karlsruhe, Germany
107. Kumpulainen J., in Quantitative trace elements analysis of biological materials, H.A. Mc Kenize, L.E. Smythe, Eds., Elsevier, Amsterdam, New York Oxford, 1988, pp 451-462
108. Lazdunski, A.M., Ventre, I., Sturgis, J.N., Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* (2004) 2: 581-592
109. Lee, M., Kim, M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, S.H., Kang, M.S., Lee, S.T., *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* (2005) 55: 1409–1413
110. Leedjävrv, A., Ivask, A., Virta, M., Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* (2008) 190: 2680–2689
111. Leitermann F., Syldatk, C., Hausmann, R., Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy. *J Biol Eng* (2008) 2: 13, doi:10.1186/1754-1611-2-13
112. Lépine, F., Déziel, E., Milot, S., Villemur, R., Liquid chromatographic/ mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanooyloxy) alkanolic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Mass Spectrom* (2002) 37: 41–46
113. Ma, Y., Mills, J.A., Belisle, J.T., Vissa, V., Howell, M., Bowlin, K., Scherman, M.S., McNeil, M., Determination of the pathway for rhamnolipid biosynthesis in mycobacteria: cloning, sequencing and expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding alpha-D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *Microbiology* (1997) 143: 937-45
114. Maier, R.M., Soberon-Chávez, G., *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential application, *Appl Microbiol Biotechnol* (2000) 54: 625-633
115. Maier, R.M., Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. *Adv Appl Microbiol* (2003) 52: 101-121

116. Makkar, R.S., Cameotra, S. S., Banat, I. M, Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *ABM Express* (2011) 1:5, doi:10.1186/2191-0855-1-5
117. Maneerat, S., Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarinn J Sci Technol* (2005) 27: 675-683
118. Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A., Moulis, J.M., Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* (2006) 88: 1807-1814
119. Mashburn, L.M., Whiteley, M., Membrane vesicles traffic signals and facilitates group activities in a prokaryote. *Nature* (2005) 437: 422-425
120. Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M., Brandenburg, K., Whiteley, M., Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* (2008) 69: 491-502
121. Mashburn-Warren, L., Howe, J., Brandenburg, K. and Whiteley, M., Structural requirement of the *Pseudomonas* quinolone signal for membrane vesicle stimulation. *J Bacteriol* (2009) 191: 3411-3414
122. Maslin, P., Maier, R.M., Rhamnolipid-enhanced mineralization of phenanthrene in organic-metal co-contaminated soils. *Bioremediat J* (2000) 4: 295-308
123. Masse, E., Majdalani, N., Gottesman, S., Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr Opin Microbiol* (2003) 6: 120-124
124. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura S.I., Lee, Y., Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochem* (2005) 339: 69-72
125. Mata-Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A., High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J Chromatogra* (1999) 864: 211-220
126. Mata-Sandalova, J.C., Karns, J., Torrents, A., Effect of nutritional and environmental conditions on production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2, *Microbiol Res* (2001) 155: 249-256
127. Matsufuji, M., Nakata, K., Yoshimoto, A., High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol Lett* (1997) 19: 1213-1215

128. Matsuyama, T., Nakagawa, Y., Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J Microbiol Methods* (1996) 25: 165–175
129. McKnight, S.L., Iglewski, B.H., Pesci, E.C., The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (2000) 182: 2702–2708
130. Mechaly, A., Belakhov, V., Shoham, Y., Baasov, T., An efficient chemical-enzymatic synthesis of 4-nitrophenyl [beta]-xylobioside: a chromogenic substrate for xylanases. *Carbohydr Res* (1997) 304: 111–115
131. Mercade, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, M.J., De Andres, C., Guinea, J., Olive oil mill effluent (OOME): New substrate for biosurfactant production. *J Bioresour Technol* (1993) 43: 1-6
132. Miller, R.M., Surfactant-enhanced bioavailability of slightly soluble organic compounds. Eds. H.D. Skipper, R.F. Turco RF in *Bioremediation: science and applications*. Soil Science Society of America Madison (USA) 1995a, pp 322–354
133. Miller, R.M., Biosurfactant-facilitated remediation of metalcontaminated soils. *Environ Health Perspect* (1995b) 103: 59–61
134. Miller, M.B., Bassler, B.L., Quorum sensing in bacteria. *Ann Rev Microbiol* (2001) 55: 165–199
135. Miller, D. J., Zhang, Y.M., Rock, C. O., White S. W., Structure of RhlG, an essential β -ketoacyl reductase in the rhamnolipid biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* (2006) 281: 18025–18032
136. Miller C.D., Pettee B., Zhang, C., Pabst, M., McLean, J.E., Anderson, A.J., Copper and cadmium: responses in *Pseudomonas putida* KT2440. *Lett Appl Microbiol* 49 (2009) 775-783
137. Mireles, J.R., Toguchi, A., Harshey, R.M., *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* swarming mutants with altered biofilmforming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* (2001) 183: 5848–5854
138. Monroe, D., Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*, (2007) 5 e307
139. Monteiro, S.A., Sasaki, G.L., de Souza, L.M., Meira, J.A., de Araujo, J.M., Mitchell, D.A., Ramos, L.P., Krieger, N., Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chem Phys Lipids* (2007) 147: 1–13
140. Moore, E.R. B., B.J. Tindal, V.A.P. Martins Dos Santos, D.H. Pieper, J.L. Ramos, and N.J. Palleroni: Nonmedical *Pseudomonas*. In: *Prokaryotes*, Eds.

- M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt, vol.6. Springer, New York (USA), 2006, pp 646-703
141. Morikawa, M., Hirata, Y., Imanaka, T., A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim Biophys Acta* (2000) 1488: 211-218
142. Müller, M.M., Kügler, J.H., Henkela, M., Gerlitzki, M., Hörmanna, B. Pöhnleina, M., Syldatka, C., Hausmann, R., Rhamnolipids – Next generation surfactants? *J Biotechnol* (2012) 162:366-380
143. Mulligan, C.N. Yong, C.N. Gibbs, B.F., On the use of biosurfactants for the removal of heavy metals from oil contaminated soil, *Environ Prog* (1999) 18: 31-35
144. Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., Surfactant enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng Geol* (2001a) 60: 371-38
145. Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J Hazard Mat* (2001b) 85: 111-125
146. Mulligan, C.N., Wang, S.L. Remediation of a heavy metalcontaminated soil by rhamnolipid foam. *Eng Geol* (2006) 85: 75-81
147. Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Kochupappy Ravi, T., Sivachidambaram, P., Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Curr Sci* (2008) 94: 736- 744
148. Nie, M., Yin, X., Ren, C., Wang, Y., Xu, F., Shen, Q., Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a PAH-degrading bacterium *P. aeruginosa* strain NY3. *Biotechnol Adv* (2010) 28: 635-643
149. Nielson, J.W., Artiola, J.F., Maier, R.M., Characterization of lead removal from contaminated soils by nontoxic soil-washing agents. *J Environ Qual* (2003) 32: 899-908
150. Nielson, J.W., Zhang, L., Veres-Schalnat, T.A., Chandler, K.B., Neilson, C.H., Crispin, J.D., Pemberton, J.E., Maier, R.M., Cadmium effect on on transcriptional expression of rhlB/rhlC genes and congener distribution of monorhamnolipid and dirhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 88: 953-963
151. Nies, D.H., Eflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMES Microbiol Rev* (2003) 27: 313-339.
152. Nitschke, M., Costa, S. G., Contiero, J., Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol Prog* (2005) 21: 1593-1600

153. Nitschke, M., Costa, S.G.V.A.O., Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sci Tech* (2007) 18: 252-259
154. Nitschke, M., Costa, S.G., Contiero, J., Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Appl Biochem Biotechnol* (2010) 160: 2066–2074
155. Noordman, W.H., Brusseau, M.L., Janssen, D.B., Adsorption of a multicomponent rhamnolipid surfactant to soil. *Environ Sci Technol* (2000) 34: 832–838
156. Noordman, W.H., Janssen, D.B., Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* (2002) 68: 4502–4508
157. Nriagu, J. O., Humans influence on the global cycling of trace metals. In: Heavy metals in the environment. Frame, J. G. (ed.), (1990) 1 CEP consultants Ltd Edinburg
158. Ochoa-Loza, F.J., Artiola, J.F., Maier, R.M., Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *J Environ Qual* (2001) 30: 479–485
159. Ochsner, U.A., Fiechter, A., Reiser, J., Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* (1994) 269: 19787–19795
160. Ochsner, U.A., Reiser, J., Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 6424–6428
161. Ohlendorf, B., Lorenzen, W., Kehraus, S., Krick, A., Bode, H.B., König, G.M. Myxotyrosides A and B, unusual rhamnosidase from *Myxococcus sp.* *J Nat Products* (2008) 72: 82–86
162. Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., Environmental applications of biosurfactants: Recent Advances, *Int J Mol Sci* (2011) 12: 633-654 doi:10.3390/ijms12010633
163. Pajarron, A.M., Dekoster, C.G., Heerma, W., Schmidt, M., Haverkamp, J., Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast-atom-bombardment tandem mass-spectrometry. *Glycoconj J* (1993) 10: 219–226
164. Palleroni, N. J., Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.). Williams and Wilkins. Baltimore, MA. (1984) pp 141–199.

165. Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T., Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (2007) 189: 2531–2539
166. Pappas, K., Weingart, C.L., Winans, S.C., Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signaling. *Mol Microbiol* (2004) 53: 755–769
167. Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M., Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putid*. *Anal Bioanal Chem* (2003) 376: 26–32
168. Patel, R.M., Desai, A.J., Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett Appl Microbiol* (1997) 25: 91–94
169. Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., Environmental applications of biosurfactants: Recent Advances. *Int J Mol Sci* (2011) 12: 633–654 doi:10.3390/ijms12010633
170. Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski B.H., Greenberg E.P., Structure of the autoinducer required for expression of *P. aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) 91: 197–201
171. Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P., A second *N*-acyl homoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92: 1490–1494
172. Pesci, E.C., Milbank, J.B., Pearson, J.P., Mcknight, S., Kende, A.S. Greenberg E.P., Iglewski B.H., Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96: 11229–11234
173. Pētänen, T., Assessment of Bioavailable Concentrations and Toxicity of Arsenite and Mercury in Contaminated Soils and Sediments by Bacterial Biosensors. University of Helsinki, Academic Dissertation. 2001.
174. Pinzon, N., Ju, L.K., Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnol Lett* (2009) 31: 1583–1588
175. Pornsunthorntawe, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M., Rujiravanit, R., Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresour Technol* (2008) 99: 1589–1595
176. Price, N.P.J., Ray, K.J., Vermillion, K., Kuo, T.M., MALDI-TOF mass spectrometry of naturally occurring mixtures of monorhamnolipids and dirhamnolipids. *Carbohydr Res* (2009) 344: 204–209

177. Prozialeck, W.C., Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* (2000) 164: 231-249
178. Radetic, M., Radojevic, D., Ilic, V., Jovic, D., Povrenovic, D., Potkonjak, B., Puac, N., Jovancic, P., Removal of metal cations from wastewater using recycled wool-based non-woven material, *J Serb Chem Soc* (2007) 72: 605-614
179. Rahim, R., Ochsner, U.A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S., Soberón-Chávez, G., Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* (2001) 40: 708-718
180. Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., McClean, S., Marchant, R., Banat, I.M., Rhamnolipid biosurfactants production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. *Biotechnol Prog* (2002) 18: 1277-1281
181. Rashedi, H., Jamshidi, E., Mazaheri, A.M., Bonakdarpour, B., Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. *J Iran Chem Eng* (2006) 25: 25-30
182. Rehm, B. H., Kruger, N., Steinbuchel, A., A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The PhaG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacylacyl carrier protein-coenzyme A transferase. *J Biol Chem* (1998) 273: 24044-24051
183. Rehm, B. H., Mitsky, T. A., Steinbuchel, A., Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* (2001) 67: 3102-3109
184. Robert M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A., Guinea, J., Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett* (1989) 11: 871-874
185. Rodrigues L., Teixeira J., Oliveira R., van der Mei, H.C., Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochem* (2006) 41: 1-10
186. Rooney, A.P., Price, N.P., Ray, K.J., Kuo, T.M. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS Microbiol Lett* (2009) 295: 82-87
187. Rosenberg, E., Ron, E.Z., High and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* (1999) 52: 154-162

188. Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N., The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Infect* (2000) 2: 1721–1731
189. Sabra B., Zeng, A.P., Microbial production of alginates: physiology and process aspects In: *Alginates: Biology and Applications*, Rehm, B.H.A. (ed), Springer Verlag Berlin Heidelberg (Germany), 2009, pp153-174
190. Sarachat, T., Pornsunthorntawe, O., Chavadej, S., Rujiravanit, R., Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. *Bioresour Technol* (2010) 101: 324–30
191. Sandrin, T.R., Chech, A.M., Maier, R.M., A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Appl Environ Microbiol* (2000) 66: 4585–4588
192. Santa Anna, L.M., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Pereira, N. Jr., Freire, D.M.G., Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Braz J Chem Eng* (2002) 19: 159-166
193. Satpute, S.K. Banpurkar, A.G., Dhakephalkar, P.K., Banat, I.M., Chopade, B.A., Methods for investigating of biosurfactats and bioemulsifiers: a review. *Crit Rev Biotechnol* (2010) 1–18, informahealthcare.com
194. Scheibenbogen, K., Zynter, R.G., Lee, H., Trevors, J.T., Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactant and some chemical surfactants. *J Chem Tech Biotechnol* (1994) 59: 53-59
195. Schenk, T., Schuphan, I., Schmidt, B., High-performance liquid-chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chromatogr A* (1995) 693: 7–13
196. Schiller, J., Süß, R., Arnhold, J., Fushs, B., Leßig, J., Petkovic, M., Spalteholz, H., Zschörnig, O., Arold, K., Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *J Prog Lipid Res* (2004) 43: 449-488
197. Schooling, S.R., Charaf, U.K., Allison, D.G., Gilbert, P., A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* (2004) 1: 91–99
198. Shaw, N., Bacterial glycolipids. *Microbiol Mol Biol Rev* (1970) 34: 365–377
199. Shreve, G.S., Inguva, S, Gunnam, S., Rhamnolipid biosurfactant Enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Mar Biol Biotechnol* (1995) 4: 331–337

200. Silver, S., Bacterial resistances to toxic metal ions - a review. *Gene* (1996) 179:9-19
201. Silver, S., Genes for all metals a bacterial view of the periodic table. *J Ind Microbiol Biotechnol* (1998) 20: 112
202. Singh, A., Van Hamme, J.D., Ward, O.P., Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv* (2007) 25: 99-121
203. Singh, V., Chauhan, P.K., Kanta, R., Dhewa, T., Kumar, V., Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants, *Int J Pharm Sci Rev Res* (2010) 3: 164-167
204. Smith, R.S., Iglewski, B.H., *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* (2003) 6: 56-60
205. Soberon-Chavez, G., Lepine, F., Deziel, E., Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) 68: 718-725
206. Song, H., Liu, Y., Xu, W., Zeng, G., Aibibu, N., Xu, L., Chen, B., Simultaneous Cr(VI) reduction and phenol degradation in pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB91095. *Biores Technol* (2009) 100: 5079-5084
207. Sotirova, A.V., Spasova, D.I., Galabova, D.N., Karpenko, E., Shulga, A., Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Curr Microbiol* (2008) 56: 639-644
208. Spangenberg, C., Montie, T.C., Tumbler, B. Structural and functional implications of sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa* genes *oriC*, *ampC* and *fliC*. *Electrophoresis* (1998) 19: 545-550
209. Spiers, A.J., Buckling, A., Rainey P.B., The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* (2000) 146: 2345-2350
210. Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol* (1966) 43: 159-271
211. Stanghellini, M.E., Miller, R.M., Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Dis* (1997) 81: 4-12
212. Stephenson, K., Yamaguchi, Y., Hoch, J. A., Themechanism of action of inhibitors of bacterial twocomponen signal transduction systems. *J Biol Chem* (2000) 275: 38900-38904
213. Tahzibi, A., Kamal, F., Assadi, M.M., Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Iran Biomed J* (2004) 8: 25-31

214. Tarangini, K.: PhD thesis, National Institute of Technology, University of India, 2009
215. Teitzel, G.M., Parsek, M.R., Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2003) 69: 2313-2320
216. Thai, L.T., Maier, W.J., Solubilisation and biodegradation of octadecane in presence of two commercial surfactants. Proceedings of the 47th Annual Purdue University Industrial Waste Conference (1992) Ann Arbor Press, Chelsea, Mich
217. Thangamani, S., Shreve, G.S., Effect of anionic biosurfactant on hexadecane partitioning in multiphase systems. *Environ Sci Technol* (1994) 28: 1993-2000
218. Thompson, D.K., Chourey, K., Wickham, G.S., Thieman, S.B., VerBerkmoes, N.C., Zhang, B., McCarthy, A.T., Rudisill, M.A., Shah, M., Hettich, R.L., Proteomics reveals a core molecular response of *Pseudomonas putida* F1 to acute chromate challenge. *BCM Genomics* (2010) 11:311, doi:10.1186/1471-2164-11-311
219. Torrens, J.L., Herman, D.C., Miller-Maier, R.M., Biosurfactant (rhamnolipid) sorption and the impact on rhamnolipid-facilitated removal of cadmium from various soils. *Environ Sci Technol* (1998) 32: 776-781
220. Tremblay, J., Richardson, A.P., Lépine, F., Déziel, E., Self-produced extracellular stimuli modulate the *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility behaviour. *Environ Microbiol* (2007) 9: 2622-2630
221. Tripathi, M., Munot, H.P., Souche, Y., Meyer, J.M., Goel, R., Isolation and functional characterization of siderophore producing lead and cadmium resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Curr Microbiol* (2005) 50: 233-237
222. Turnidge, J.D., Bell, J.M, Antimicrobial Susceptibility on Solid Media, in: *Antibiotics in laboratory medicine*, V. M.D. Lorian (ed) 5th ed, Lippincott Wilkins & Williams Philadelphia, USA, 2005, pp 8-61
223. Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., Trevors, J.T., *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J Microbiol* (1993) 39: 1071-1078
224. Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P., Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 1. Physiological aspects. *Biotechnol Adv* (2006) 24: 604-620
225. Vasileva-Tonkova, E., Gesheva, V., Glycolipids produced by antarctic *Nocardioides* sp during growth on *n*-paraffin. *Process Biochem* (2005) 40: 2387-2391

226. Vasileva-Tonkova, E., Gesheva, V., Biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea sp* during growth on hydrocarbons. *Curr Microbiol* (2007) 54: 136-141
227. Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J., Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* (2008) 16: 496-506
228. Wang, S., Mulligan, C.N., Rhamnolipid foam enhanced remediation of cadmium and nickel contaminated soil. *Water Air Soil Pollut* (2004) 157:315-330
229. Wang, X., Gong, L., Liang, S., Han, X., Zhu, C., Li, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmful Algae* (2005) 4: 433-443
230. Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard, W. A, Tang, Y., Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnol Bioeng* (2007) 98: 842-853
231. Wei, Y.-H., Chou, C.-L., Chang, J.-S., Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater, *Biochem Engin J* (2005) 27: 146-154
232. Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., Salmond, G.P., Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* (2001) 25: 365-404
233. Wienholds, E., Plasterk, R.H., MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* (2005) 579: 5911-5922
234. Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F., Jaeger, K. E. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas* is required for rhamnolipid production, cell motility and biofilm formation. *J Bacteriol* (2007) 189: 6695-6703
235. Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., Camara, M., Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos T Roy Soc B: Biol Sci* (2007) 362: 1119-1134
236. Williams, P., Camara, M., Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* (2009) 12: 182-191
237. Wu, J.Y., Yeh, K.L., Lu, W.B., Lin, C.L., Chang J.S., Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour Technol* (2008) 99: 1157-1164

238. Yahr, T.L., Parsek, M.R. (2006) *Pseudomonas aeruginosa*. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., and Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds). New York, Springer Science+Business Media, LLC, pp 704–713
239. Yeung, A.T., Torfs, E.C., Jamshidi, F., Bains, M., Wiegand, I., Hancock, R.E., Overhage, J., Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol* (2009) 191: 5592–5602
240. Zhang, Y.M., Miller, R.M., Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl Environ Microbiol* (1994) 60: 2101–2106
241. Zhang, Y., Miller, R.M., Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. *Appl Environ Microbiol* (1995) 61: 2247–2251
242. Zhao B, Poh CL. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics* (2008) 8:874–881
243. Zhu, K., Rock, C.O., RhlA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the betahydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (2008) 190: 3147–3154

PRILOG

Sekvence 16S rRNK ekoloških izolata *P. aeruginosa* u FASTA formatu

Soj *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM (P) B 001380 (prethodno označen ako san ai):

>*Pseudomonas aeruginosa* strain san ai, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTT
GCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGG
ATAACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCT
TCGGACCTCAGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCT
ACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTG
ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAG
GAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATA
CTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACCGGA
TAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCC
TTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAAC
CCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTG
CTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCG
ATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGT
GAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
GGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTACCACGGAGTG
ATTCATGACTGGGG
```

Soj *Pseudomonas aeruginosa* D2:

> *Pseudomonas aeruginosa* strain D2, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
AGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCT
CCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATA
ACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCG
GACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACC
AAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGG
TCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA
```

GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTT
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA
AGCGCGGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTG
CATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTG
ACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAA
GTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTG
ACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAGGTGCTGC
ATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCT
TGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGG
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAACCGAT
CGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGA
ATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTCACACCATGGG
AGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACC GCAAGGGGACGGTACCACGGAGTGATCA
TGACTGGGGTGA

Soj *Pseudomonas aeruginosa* 67:

> *Pseudomonas aeruginosa* strain 67,16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAG
CTTGCTCCIGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGG
GGATAACGTCCGGAACGGGGCGTAATACCGCATACTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGA
TCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGG
CCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAG
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGC
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGG
GAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGG
CTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAACCTGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACT
GATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGCGCAGCTAAC
GCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGG
GGGCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCT
GGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCG
CAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACA
AACC GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACA
CGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAA
ACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTA
ATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTCACA
CCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACC GCAAGGGGGACGGTTACCAC
GGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCG

Soj *Pseudomonas aeruginosa* D1:

> *Pseudomonas aeruginosa* strain D1, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

AGAGTTTTGAACTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGC
GGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT
GCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGGA
GAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC
ACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA
ATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAG
CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAG
AATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGG
AATTTCCIGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGA
CCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTG
GCGCAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA
ATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGA
ACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGTAACGAGCGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGA
CTGCCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGC
CAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGC
TAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGG
AATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGA
CGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGT

Soj *Pseudomonas aeruginosa* D3:

> *Pseudomonas aeruginosa* strain D3, 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

ACTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGG
AGCTTGCTCCTGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTG
GGGGATAACGTCCGAAACGGGCGCTAATACCGCATAACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGG
GATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAA
GGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGT
AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAA
GCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTT
GGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACC
GGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGGAAGTGCATCCAAAATACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGA
CTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTA

ACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACCTCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTAC
CTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAG
CGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCACICTAAGGAGACTGCCGGTGA
CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATA
AAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAG
TAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACC GCAAGGGGACGGTTACCAC
GGAGTGATTCATGACT

BIOGRAFIJA AUTORA

Milena G. RIKALOVIĆ rođena je 20. 01. 1983. godine u Beogradu. Diplomirala je biohemiju sa prosečnom ocenom 8,65 i ocenom 10,00 na diplomskom radu na temu „LC-MS karakterizacija komponenata heksaenskog kompleksa H-85” na Hemijskom fakultetu u Beogradu 2008. godine. Iste godine upisala je doktorske studije na matičnom fakultetu, takođe na katedri za biohemiju. U periodu od 2009. do 2012. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj republike Srbije (sada Ministarstvo nauke i prosvete), kada je bila angažovana na projektu Centra za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju u Beogradu.

Oblast interesovanja i naučno-istraživačkog rada su: selekcija i kultivacija sojeva *Pseudomonas aeruginosa* koji produkuju površinski aktivne metabolite, optimizacija produkcije ramnolipida, metode za strukturnu i fizičko-hemijsku karakterizaciju ramnolipida.

Autor i koautor je tri naučna rada sa ISI liste objavljenih u uglednim domaćim i inostranim časopisima i ukupno 11 saopštenja na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu štampanih u celini ili u izvodu.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милена Г. Рикаловић

број индекса 18/2008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

“Испитивање рамнолипида добијених помоћу сојева *Pseudomonas aeruginosa* изолованих из средина загађених нафтом и нафтним дериватима”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 14.3.2013.

Milena Rikalović

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милена Г. Рикаловић

Број индекса 18/2008

Студијски програм Доктор биохемијских наука

Наслов рада “Испитивање рамнолипида добијених помоћу сојева *Pseudomonas aeruginosa* изолованих из средина загађених нафтом и нафтним дериватима”

Ментор проф. др Мирослав М. Врвић

Потписани

Miroslav M. Vrvic

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 14.3.2013.

Milena Rikalović

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Испитивање рамнолипида добијених помоћу сојева *Pseudomonas aeruginosa* изолованих из средина загађених нафтом и нафтним дериватима”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 14.3.2013.

Milena Rikalović

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.