

**М.О. Фіногенова, М.Б. Галкін, А.С. Семенець,  
І.В. Пріщенко, Г.С. Калєва, Б.М. Галкін, І.П. Метеліцина,  
Т.О. Філіпова**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,  
e-mail: tphilippova@ukr.net

## **СИНТЕЗ БІОСУРФАКТАНТІВ БАКТЕРІЯМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ІЗОЛЬОВАНИМИ З ПОВЕРХНІ МУШЕЛЬ МІДІЙ ЧОРНОГО МОРЯ**

**Мета.** Встановлення здатності до синтезу поверхнево-активних сполук бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, ізольованих з мушель чорноморських мідій. **Методи.** Під час досліджень було використано кілька штамів морських *Pseudomonas spp.*, виділених із забруднених нафтовими вуглеводнями ділянок Чорного моря: *P. aeruginosa M1*, *P. aeruginosa M4*, та *P. aeruginosa PA01* як референтний штаб, які вирощували у суспензійних та біоплівкових культурах у середовищах LB та Гіса. Культивування штамів *Pseudomonas aeruginosa* проводили при 37 °С протягом 120 і 168 годин. Ріст планктонної культури визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нм. Масу біоплівки визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 592 нм за допомогою CV-тесту. Наявність поверхнево-активних сполук оцінювали у дрон-тесті. Кількісний вміст рамноліпідів визначали за кольоровою реакцією рамнози з орцином. **Результати.** Штами *P. aeruginosa M1* і *M4*, виділені з поверхонь чорноморських мідій, синтезують на 25% і 66% більше ПАР, ніж штаб *PA01*. Усі штами в середовищі Гіса синтезували у 10–20 разів менше рамноліпідів ніж у середовищі LB. У біоплівкових культурах спостерігається така ж залежність синтезу біосурфактанта від складу живильного середовища, що й у суспензійних культурах. За інтенсивністю продукції рамноліпідів у біоплівкових культурах досліджувані штами можна розташувати таким чином: *P. aeruginosa M4* > *P. aeruginosa M1* >> *P. aeruginosa PA01*. **Висновки.** Штами *P. aeruginosa*, виділені з Чорного моря, є більш ефективними продуцентами рамноліпідів, ніж еталонний штаб *P. aeruginosa PA01*; Інтенсивність синтезу біосурфактантів істотно залежить від складу живильного середовища та способу вирощування.

**Ключові слова:** морські бактерії, *Pseudomonas aeruginosa*, біосурфактанти, суспензійні і біоплівкові культури, склад живильних середовищ

Морські мікроорганізми мають унікальні властивості завдяки своїй адаптаційній здатності до морських умов, таких як висока або низька температура, лужні або кислотні значення рН середовища, високий тиск і обмежений вміст субстратів живлення на глибині. Ці відмінні характеристики



привернули увагу багатьох дослідників до детального вивчення можливості використання морських мікроорганізмів у промисловості [10,11].

Серед різноманітних біологічно активних сполук значний інтерес представляють біосурфактанти (біоємальгатори) через їх структурну та функціональну різноманітність. Поверхнево-активні речовини біологічного походження (біоПАР) – це поліфункціональні молекули, які цікавлять багатьох дослідників завдяки своїй біосумісності, універсальності та застосуванню в біотехнології. Зараз відомі п'ять класів біосурфактантів: гліколіпіди, ліпополіцукриди та поліцукридно-ліпідні комплекси, ліпопептиди, жирні кислоти та нейтральні ліпіди. Фізіологічна роль біосурфактантів полягає в адгезії мікроорганізмів до субстрату та емульгуванні поживних речовин, десорбції з поверхонь, антибактеріальній та протигрибковій активності, а деякі мембранозв'язані біоПАР є рецепторами для бактеріофагів [16].

Біосурфактанти мають низку переваг перед хімічними поверхнево-активними речовинами, включаючи незначну токсичність, високу здатність до біологічного розкладання, кращу екологічну сумісність, високе піноутворення, селективність, толерантність до високих температур, рН і солей. Вони синтезуються з відновлюваних субстратів і ефективні за невеликих концентрацій [3].

За даними метагеномного аналізу світовий океан містить приблизно  $3 \times 10^{28}$  різноманітних бактерій, дослідження яких робить можливим відкриття нових речовин, таких як антибіотики, ферменти, вітаміни, ліки, біосурфактанти, біоємальгатори та інші цінні сполуки комерційного значення [7, 9]. Значна частина досліджень біосурфактантів зосереджена на ґрунтових ізолятах та, перш за все, представниках *Pseudomonas* і *Bacillus*, однак виробництво біоПАР морськими мікроорганізмами залишається практично невивченим, що пов'язується з труднощами їх культивування у лабораторних умовах [2, 18]. Це стосується і бактерій Чорного моря, біотехнологічний потенціал яких практично не оцінений.

У зв'язку з вищенаведеним, метою даної роботи було встановлення здатності до синтезу поверхнево-активних сполук бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, ізолюваних з мушель чорноморських мідій.

### Матеріали і методи

В роботі були використані 2 морських штами *P. aeruginosa*: М1 і М4 та *P. aeruginosa* РА01 як референтний штам з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова.

Культивування штамів *Pseudomonas aeruginosa* здійснювали при 37 °С впродовж 120 та 168 годин у конічних плоскодонних колбах за умов струшування (суспензійні культури) та у стаціонарних біоплівкових культурах.

Було використано два живильних середовища – LB (1% пептону, 1% дріжджового екстракту, 0,5% NaCl) та середовище Гіса (1% пептону, 1% глюкози, 0,5% NaCl).

По завершенні культивування спектрофотометрично при 600 нм визначали оптичну густину суспензії і встановлювали кількість клітин за калібрувальною кривою. Далі розводили суспензії живильним середовищем до



концентрації  $10^9$  клітин в 1 мл. Для отримання безклітинних супернатантів проби центрифугували 20 хв при 3000 обертів у хвилину. Потім супернатанти відбирали у чисті пробірки і використовували для виявлення в них біосурфактантів.

Наявність поверхнево-активних продуктів визначали у дроп-тесті [12]. Для цього до 200 мкл супернатанту додавали 5 мкл 1% розчину метиленового синього і по 20 мкл наносили у центр квадрата (1×1 см) на поверхні парафільму. За контроль слугувала проба, яка замість супернатанту містила дистильовану воду.

Після висихання крапель смужки парафільму сканували і з використанням комп'ютерної програми Altami Studio визначали діаметри плям [<https://bit.ly/2BupzWt>].

Кількісний вміст рамноліпідів оцінювали за кольоровою реакцією рамнози з орцином [13]. Після центрифугування проб до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл етилацетату. Верхню фазу етилацетату з розчиненими в ньому рамноліпідами відбирали у флакони і залишили до повного випаровування розчинника. Після цього додавали у флакони 0,5 мл метанолу і перенесли 0,1 мл у скляні пробірки. До пробірок додавали 1 мл розчину 10 г орцину в 25 мл 56% сірчаної кислоти. Прогрівали пробірки 20 хвилин при температурі 80–100 °С до появи жовто-коричневого кольору. У контрольну пробу до орцинового реактиву додавали 100 мкл метанолу. Після охолодження проб до кімнатної температури оптичну густину дослідних проб вимірювали проти контрольного зразка на спектрофотометрі при довжині хвилі 420 нм. Розрахунки вмісту рамноліпідів у мг/мл проводили за калібрувальною кривою, побудованою з використанням рамнози у концентраціях від 2,5 до 50 мкг/мл.

Метод визначення маси біоплівки базується на здатності барвника кристалічного фіолетового зв'язуватися з клітинами та матриксом біоплівки [6].

Після того, як планктонну культуру видаляли з лунок, біоплівку у планшетах відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином та фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв. Після фіксації зразки висушували та забарвлювали 1% водним розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв. Біоплівку у планшетах після 24 годин висушування при кімнатній температурі розчиняли у лізувальному розчині (0,1 М NaOH + 1% SDS) та інкубували при кімнатній температурі 1,5 години. Облік результатів проводили на спектрофотометрі «Quant» BioTek за довжини хвилі відповідній до максимуму поглинання використаного барвника: 592 нм.

Усі експерименти проводили у трьох незалежних дослідах з 3–4 повторами у кожному.

Статистичне опрацювання результатів досліджень здійснювали з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників ( $\bar{X}$ ) та їх стандартну похибку ( $S_{\bar{X}}$ ). Достовірність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи достовірність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [1].



### Результати та їх обговорення

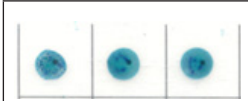
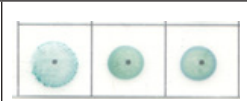
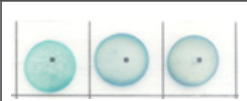

Мідії були зібрані у забруднених нафтопродуктами ділянках Чорного моря в районі Одеського порту, де на поверхні води існує райдужна плівка. З поверхні їх мушель було виділено 7 штамів бактерій. Два з виділених штамів на підставі оцінки морфологічних, біохімічних та тінкторіальних властивостей були віднесені до виду *Pseudomonas aeruginosa* і класифіковані як *P. aeruginosa* М1 та *P. aeruginosa* М4. Ідентифікація цих штамів була підтверджена визначенням складу жирних кислот з використанням системи MIDI Sherlock. У табл. 1 наведені результати оцінки їх здатності до продукції біосурфактантів. Як контрольний був використаний колекційний штам *P. aeruginosa* PA01.

Таблиця 1

Результати оцінки здатності бактерій, виділених з поверхні мушель мідій, до синтезу біосурфактантів у дроп-тесті

Table 1

The results of the evaluation of the ability of bacteria isolated from the surface of musselshells to synthesize biosurfactants in the drop test

<i>P. aeruginosa</i> PA01	<i>P. aeruginosa</i> M1	<i>P. aeruginosa</i> M4	Вода
			

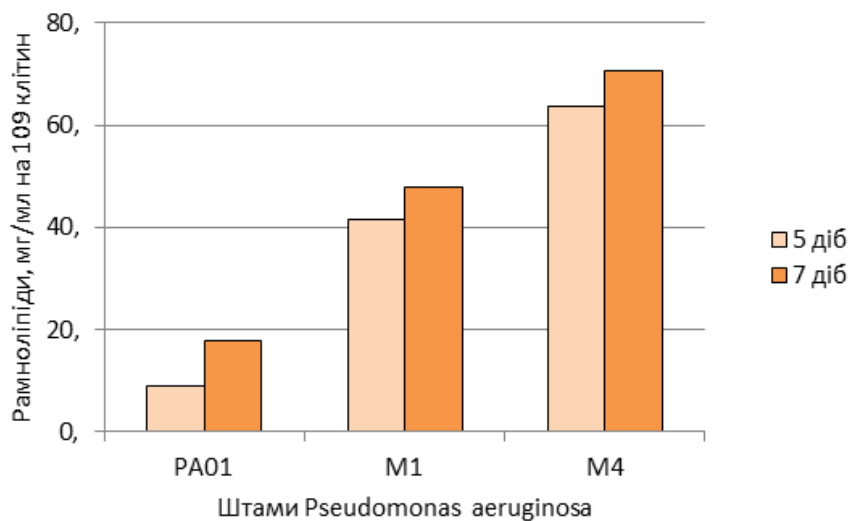
Аналіз даних дроп-тесту свідчить що за здатністю синтезувати біосурфактанти штамми *P. aeruginosa* можна розташувати таким чином: *P. aeruginosa* М4 > *P. aeruginosa* М1 > *P. aeruginosa* PA01. Відповідні діаметри розповсюдження крапель по поверхні парафільму дорівнювали  $7,20 \pm 0,41$  мм,  $5,44 \pm 0,25$  мм та  $4,35 \pm 0,18$  мм. Таким чином, у порівнянні з колекційним штамом морські ізоляти синтезували на 25% (штам М1) і 66% (штам М4) більше поверхнево-активних речовин.

Враховуючи, що від складу середовища залежать кількість синтезованих біосурфактантів та їх структура [14, 17], культивування досліджуваних штамів проводили у двох живильних середовищах: LB і Гіса. Оскільки морські штамми *P. aeruginosa* були виділені з біоплівки поверхні мушель мідій дослідження проводили як у суспензійних зі струшуванням, так і у стаціонарних біоплівкових культурах. Результати виражали у мг рамноліпідів в 1 мл на  $10^9$  клітин у разі суспензійних культур та у мг рамноліпідів на одиницю маси біоплівки у разі біоплівкових культур.

Дослідження вмісту рамноліпідів в суспензійних культурах (рис. 1 і 2) показало, що їх кількість при культивуванні у середовищі LB значно перевищує вміст біосурфактантів у середовищі Гіса для усіх досліджених штамів.

Так, якщо у референтного штаму *P. aeruginosa* PA01 вміст рамноліпідів на середовищі Гіса становив 1,1 мг на  $10^9$  КУО на п'яту добу та 1,6 мг на  $10^9$  КУО на сьому добу, то на середовищі LB він був у 8–10 разів вищим та



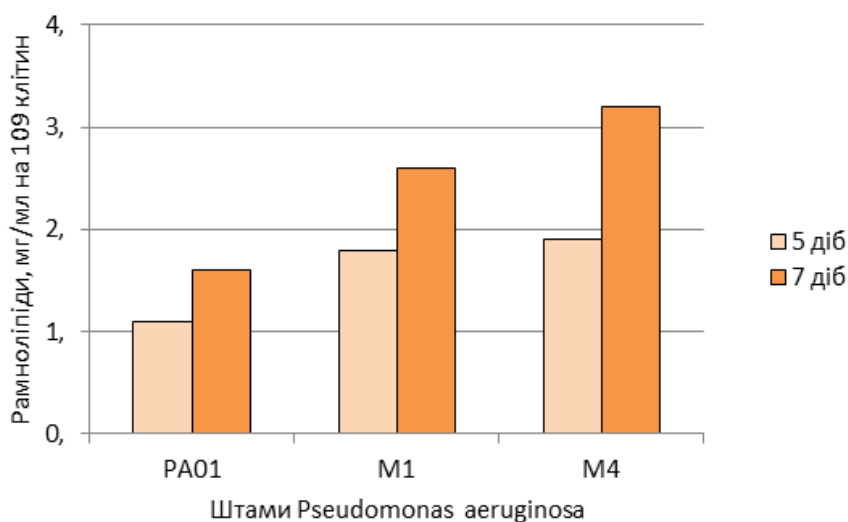


**Рис. 1. Вміст рамноліпідів за культивування досліджуваних штамів у суспензійній культурі у середовищі LB**

Примітка: \* – різниця достовірна у порівнянні з штамом *P. aeruginosa* PA01;  
\*\* – різниця достовірна у порівнянні з штамом *P. aeruginosa* M1

**Fig. 1. The content of rhamnolipids during the cultivation of the studied strains in suspension culture in LB medium**

Note: \* – significant difference compared with *P. aeruginosa* PA01;  
\*\* – significant difference compared with *P. aeruginosa* M1



**Рис. 2. Вміст рамноліпідів за культивування досліджуваних штамів у суспензійній культурі в середовищі Гіса**

Примітка: \* – різниця достовірна у порівнянні з штамом *P. aeruginosa* PA01;

**Fig. 2. The content of rhamnolipids during the cultivation of the studied strains in suspension culture in Giss medium**

Note: \* – significant difference compared with *P. aeruginosa* PA01



становив 8,9 та 17,8 мг на  $10^9$  КУО, відповідно. Штами *P. aeruginosa* М1 та М4 виявили ще більшу здатність до синтезу рамноліпідів за умов культивування. Вміст рамноліпідів в цьому випадку також був значно вищим при використанні середовища LB. Так, вміст рамноліпідів на п'яту добу інкубування в супернатанті суспензійних культур *P. aeruginosa* М1, що росли на середовищі Гіса становив 1,8 мг на  $10^9$  КУО, а на сьому добу інкубації – 2,6 мг на  $10^9$  КУО. У той самий час, у середовищі LB вміст рамноліпідів був майже у 20 разів більшим і становив 41,5 мг на п'яту та 48 мг на сьому добу інкубації.

Найбільший рівень біосинтезу рамноліпідів спостерігався у *P. aeruginosa* М4. Загальна тенденція, що була притаманна накопиченню рамноліпідів у суспензійних культурах досліджених штамів спостерігалася і в цьому випадку. Так, якщо на середовищі Гіса на п'яту та сьому добу інкубації вміст рамноліпідів становив 1,9 та 3,2 мг на  $10^9$  КУО, то на середовищі LB – 63,7 та 70,6 мг, відповідно.

Враховуючи, що штами *P. aeruginosa* М1 і *P. aeruginosa* М4 були виділені з біоплівки, які знаходилися на поверхні мушель мідій, культивування здійснювали також у плоскодонних планшетах Nuclon, що забезпечувало утворення біоплівки на їх дні. В даних умовах культивування також були використані обидва живильні середовища: LB і Гіса. Вміст рамноліпідів розраховували у мг на одиницю маси біоплівки. Для цього по закінченні культивування і видалення середовища з лунок біоплівки фіксували етанолом і забарвлювали кристалічним фіолетовим. Результати наведені у табл. 2.

Таблиця 2

Маси біоплівки, утворених досліджуваними штамми *P. aeruginosa*  
(ОГ 592 нм)

Table 2

Masses of biofilms formed by the studied strains of *P. aeruginosa*  
(OD 592 nm)

Середовище	Доба	<i>P. aeruginosa</i> РА01	<i>P. aeruginosa</i> М1	<i>P. aeruginosa</i> М4
LB	5	3,243 ± 0,264	3,581 ± 0,286	2,283 ± 0,205
	7	2,834 ± 0,230	3,154 ± 0,261	2,106 ± 0,153
Гіса	5	3,027 ± 0,184	3,096 ± 0,193	2,185 ± 0,152
	7	2,873 ± 0,174	2,965 ± 0,180	1,937 ± 0,169

Примітка: за усіх умов культивування достовірної різниці між штамми не виявлено ( $p > 0,05$ )

Як видно з представлених даних суттєвих відмінностей у здатності утворювати біоплівки між штамми немає. Також цей показник не залежав від живильного середовища. Можна відмітити тенденцію до зменшення маси



біоплівки на сьому добу. Цей факт, скоріше за все, пов'язаний зі старінням біоплівок та вивільненням з них клітин [4]. Причому важливу роль в цих процесах відіграють саме рамноліпіди.

Дослідження синтезу рамноліпідів у біоплівкових культурах (рис. 3 і 4) показало у цілому таку саму картину що і у випадку суспензійної культури за виключенням того, що накопичення рамноліпідів в цих умовах було інтенсивнішим ніж у суспензійних культурах для усіх штамів на сьому добу інкубації.

Як і у попередньому випадку найбільшу здатність до продукції рамноліпідів показав штам *P. aeruginosa* M4. На п'яту добу інкубації вміст рамноліпідів при культивуванні на середовище Гіса становив 1,9 мг, що дорівнювало вмісту цих сполук при суспензійному культивуванні за тих самих умов, а на середовище LB майже у 58 разів більше – 111 мг. На сьому добу ці показники сягали 4,3 мг на середовищі Гіса, та 130 мг на середовищі LB.

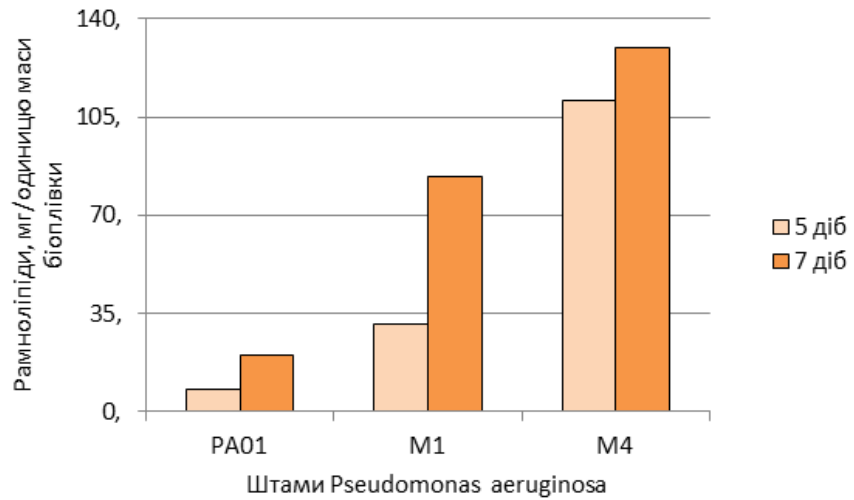
Супернатанти біоплівкових культур штамів *P. aeruginosa* M1 та *P. aeruginosa* PA01 містили значно меншу кількість рамноліпідів, яка на 7 добу інкубації дорівнювала у випадку середовища Гіса 2,6 та 2,7 мг відповідно, а на середовищі LB – 20 та 84,1 мг.

Така суттєва різниця у кількості біосурфактантів на різних середовищах може пояснюватися тим, що, з одного боку, середовище LB містить набагато більше білкового компоненту ніж середовище Гіса. Зважаючи на те, що *P. aeruginosa* є облігатно протеолітичним видом та практично не утилізує цукри окрім глюкози, можна зробити висновок що середовище LB є значно оптимальнішим для росту та розвитку популяції клітин цього мікроорганізму, що також має позначатися і на синтезі різних екзопродуктів. З іншого боку, глюкоза, що міститься у використаному варіанті середовища Гіса може викликати катаболітну репресію синтезу сполук що містять цукри, зокрема, й рамноліпідів [19]. Також не можна виключати що дріжджовий екстракт, який входить до складу середовища LB може містити широкий спектр малих молекул з сигнальними властивостями (зокрема, фарнезол), які можуть впливати на клітини *P. aeruginosa* і таким чином призводити до підвищення біосинтезу рамноліпідів [8].

З даних літератури відомо, що морські штами *P. aeruginosa*, виділені з забруднених ділянок, продукують велику кількість біосурфактантів та є ефективними деструкторами біфенілів та поліциклічних вуглеводнів. Особливо це стосується штамів, які знаходилися у складі природних біоплівок [5,15]. Спираючись на ці дані, можна припустити, що виділений з біоплівок на поверхні мушель чорноморських мідій штам *P. aeruginosa* M4 може бути перспективним для використання у біоремедіації забруднених органічними поллютантами водойм.

Підсумовуючі отримані дані слід зазначити: виділені з Чорного моря штами *P. aeruginosa* є ефективнішими продуцентами рамноліпідів, ніж референтний штам *P. aeruginosa* PA01; інтенсивність біосинтезу поверхнево-активних сполук суттєво залежить від складу живильного середовища. В подальших дослідженнях буде доцільним встановити роль інших умов культивування: рН, температура, порівняти якісний склад рамноліпідів різних



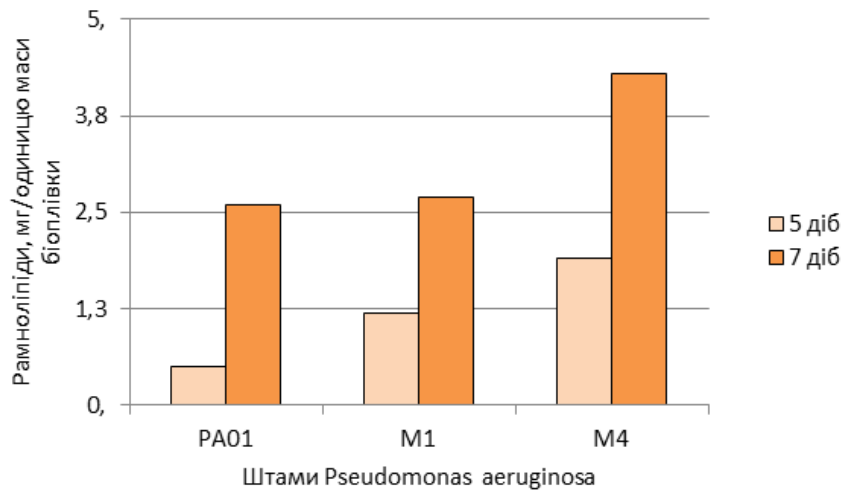


**Рис. 3. Вміст рамноліпїдів за культивування досліджуваних штамів у біоплівковій культурі в середовищі LB**

Примїтка: \* – рїзниця достовїрна у порївнянні з штамом *P. aeruginosa* PA01;  
\*\* – рїзниця достовїрна у порївнянні з штамом *P. aeruginosa* M1

**Fig. 3. The content of rhamnolipids during the cultivation of the studied strains in biofilm culture in LB medium**

Note: \* – significant difference compared with *P. aeruginosa* PA01;  
\*\* – significant difference compared with *P. aeruginosa* M1



**Рис. 4. Вміст рамноліпїдів за культивування досліджуваних штамів у біоплівковій культурі в середовищі G1a**

Примїтка: \* – рїзниця достовїрна у порївнянні з штамом *P. aeruginosa* PA01;  
\*\* – рїзниця достовїрна у порївнянні з штамом *P. aeruginosa* M1

**Fig. 4. The content of rhamnolipids during the cultivation of the studied strains**

Note: \* - significant difference compared with *P. aeruginosa* PA01;  
\*\* - significant difference compared with *P. aeruginosa* M1





штамів та активність системи міжклітинної комунікації. Для морських штамів буде цікавим визначити ефекти морської води і синтетичного морського середовища.

**М.А. Финогенова, Н.Б. Галкин, А.С. Семенец, А.С. Калева,  
И.В. Прищенко, Б.Н. Галкин, И.П. Метелицына,  
Т.О. Филиппова**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: tphilippova@ukr.net

## **СИНТЕЗ БИОСУРФАКТАНТОВ БАКТЕРІЯМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ИЗОЛИРОВАННЫМИ С ПОВЕРХНОСТИ МИДИЙ ЧЕРНОГО МОРЯ**

### **Реферат**

**Цель работы** – оценка способности к синтезу поверхностно-активных соединений бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, изолированных с поверхности черноморских мидий. **Методы.** В ходе исследования были использованы несколько морских штаммов *Pseudomonas spp.*, выделенных из районов Черного моря, загрязненных нефтяными углеводородами: *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* M4, и *P. aeruginosa* PA01 в качестве эталонного штамма, которые выращивали в суспензионных и биопленочных культурах в средах LB и Гисса. Культивирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa* проводили при 37 °С в течение 120 и 168 часов. Рост планктонных культур определяли спектрофотометрически на длине волны 600 нм. Массу биопленки определяли спектрофотометрически на длине волны 592 нм с помощью CV-теста. Присутствие поверхностно-активных соединений оценивали с помощью дроп-теста. Количественное содержание рамнолипидов определяли по цветной реакции рамнозы с орцином. **Результаты.** Штаммы *P. aeruginosa* M1 и M4, выделенные с поверхности черноморских мидий, синтезируют на 25% и 66% больше поверхностно-активных веществ, чем контрольный штамм PA01. Все штаммы в среде Гисса синтезировали в 10–20 раз меньше рамнолипидов чем в среде LB. В биопленочных культурах наблюдается такая же зависимость синтеза биосурфактантов от состава питательной среды, что и в суспензионных культурах. По интенсивности продукции рамнолипидов в биопленочных культурах исследованные штаммы можно расположить таким образом: *P. aeruginosa* M4 > *P. aeruginosa* M1 >> *P. aeruginosa* PA01. **Выводы.** Штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из Черного моря, являются более эффективными продуцентами рамнолипидов, чем эталонный штамм *P. aeruginosa* PA01. Интенсивность синтеза биосурфактантов существенно зависит от состава питательной среды и способа выращивания.

**Ключевые слова:** морские бактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, биосурфактанты, суспензионные и биопленочные культуры, состав питательной среды



**M.O. Finogenova, M.B. Galkin, A.S. Semenets, G.S. Kaleva,  
I.V. Prishchenko, B.M. Galkin, I.P. Metelitsyna, T.O. Filipova**

Odesa I.I. Mechnykov National University,  
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
tel.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: tphilippova@ukr.net

## **BIOSURFACTANTS SYNTHESIS BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIA ISOLATED FROM THE SURFACE OF MUSSELS OF THE BLACK SEA**

### **Summary**

**Aim.** Establishing of the ability to synthesize surface-active compounds by *Pseudomonas aeruginosa* bacteria isolated from the surface of Black Sea mussels. **Methods.** During the research several marine *Pseudomonas* spp strains isolated from petroleum hydrocarbon contaminated areas of Black Sea were used: *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* M4 and *P. aeruginosa* PA01 as reference strain in suspension and biofilm cultures (LB and Giss media). Cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* strains was performed at 37 °C for 120 and 168 hours. Planktonic culture growth was determined spectrophotometrically on the wave length 600 nm. Biofilm mass was determined spectrophotometrically on the wave length 592 nm by CV-test. The presence of surface-active compounds was determined in a drop test. The quantitative content of rhamnolipids was evaluated by the color reaction of rhamnose with orcin. **Results.** *P. aeruginosa* strains M1 and M4 isolated from Black Sea mussel's surfaces synthesize 25% and 66% more surfactants than the reference strain PA01. All strains in Giss medium synthesized 10–20 times less rhamnolipids than in LB medium. In biofilm cultures the same biosurfactant synthesis dependence on the composition of the nutrient medium is observed as in suspension cultures. According to the intensity of rhamnolipid production in biofilm cultures, the studied strains can be arranged in the following row: *P. aeruginosa* M4 > *P. aeruginosa* M1 >> *P. aeruginosa* PA01. **Conclusions.** The strains of *P. aeruginosa* isolated from the Black Sea are more efficient producers of rhamnolipids than the reference strain of *P. aeruginosa* PA01; the intensity of biosynthesis of surfactants significantly depends on the composition of the nutrient medium and the method of cultivation.

*Key words:* marine bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, biosurfactants, suspension and biofilm cultures, the composition of the nutrient medium

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион. – 2001. – 260 с.
2. Alyousif N. A., Luaibi Y.Y.A., Hussein W. Distribution and molecular characterization of biosurfactant-producing bacteria // Biodiversitas. – 2020. – V. 21. – P. 4034–4040.
3. Banat I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R., Nyayanit N.V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production // Front. Microbiol. – 2014. – V. 5. – P. 697.
4. Bedi B., Maurice N.M., Sadikot R.T. Microarchitecture of *Pseudomonas*



- aeruginosa* biofilms: A biological perspective // Biomed. Biotechnol. – 2018. – V. 2, № 4. – P. 227–236.
5. Chakraborty J., Das S. Characterization of the metabolic pathway and catabolic gene expression in biphenyl degrading marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11 // Chemosphere – 2016. – V. 144 – P. 1706–1714.
  6. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices // J. Clin. Microbiol. – 1985. – V. 22, № 6. – P. 996–1006.
  7. Copley J. All at sea // Nature. – 2002. – V. 415. – P. 572.
  8. Cugini C., Morales D. K., Hogan D. A. *Candida albicans* produced farnesol stimulates *Pseudomonas* quinolone signal production in LasR-defective *Pseudomonas aeruginosa* strains // Microbiology. – 2010. – V. 156. – P. 3096–3107.
  9. Dang N.P., Landfald B., Willassen N.P. Biological surfaceactive compounds from marine bacteria // Environ. Technol. – 2016. – V. 37. –P. 1151–1158.
  10. Darvishi P., Ayatollahi S., Mowla D. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPI-2 // Colloids Surf. B. Biointerfaces. – 2011. – V. 84 – P. 292–300.
  11. Fracchia L., Cavallo M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications: Present status and potential M. // Biomed. Science, Engineering and Technology. – 2012. – V. 10 – P. 325– 370.
  12. Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H., Trevors J.T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms // J. Microbiol. Methods. – 1991. – V. 13. – P. 271–279.
  13. Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser R. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants // J. Bacteriol. – 1991. – V. 173. –P. 4212–4219.
  14. Koim-Puchowska B., Kłosowski G., Drózd-Afelt J.M., Mikulski D., Zielinska A. Influence of the Medium Composition and the Culture Conditions on Surfactin Biosynthesis by a Native *Bacillus subtilis* natto BS19 Strain // Molecules. – 2021. – V. 26. – 2985. doi:10.3390/molecules26102985.
  15. Mahto K.U., Das S. Whole genome characterization and phenanthrene catabolic pathway of a biofilm forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PFL-P1 // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2020. – V. 206. – 111087. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111087>
  16. Maier R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria // Adv. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 52. – P. 101–121. 10.1016/s0065-2164(03)01004-9
  17. Nurfarahin A.H., Mohamed M.S., Phang L.Y. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production – An Overview // Molecules. – 2018. – V. 23. – P. 1049. doi:10.3390/molecules23051049.
  18. Tripathi L., Irorere V.U., Marchant R., Banat I.M. Marine derived biosurfactants: a vast potential future resource // Biotechnol. Lett. – 2018. – V. 40. – P. 1441–1457.
  19. Valentini M., Lapouge K. Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 regulates the uptake of C4-dicarboxylates depending on succinate concentration // Environ. Microbiol. – 2013. – V. 15, № 6. – P. 1707–1716.



## REFERENCES

1. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v medikobiologicheskikh issledovaniyach s ispolsovanіem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260 p. (in Russian)
2. Alyousif NA, Luaibi YYYY, Hussein W. Distribution and molecular characterization of biosurfactant-producing bacteria. Biodiversitas. 2020;21:4034-4040. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210914>
3. Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. Front Microbiol. 2014;5: 697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>
4. Bedi B, Maurice NM, Sadikot RT. Microarchitecture of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A biological perspective. Biomed Biotechnol. 2018;2:227-236. doi: 10.4103/bbrj.bbrj\_98\_1
5. Chakraborty J, Das S. Characterization of the metabolic pathway and catabolic gene expression in biphenyl degrading marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JP-11. Chemosphere. 2016;144:1706-1714. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.059>
6. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22: 996-1006. doi: 10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985
7. Copley J. All at sea. Nature. 2002;415: 572. <https://doi.org/10.1038/415572a>
8. Cugini C, Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* produced farnesol stimulates *Pseudomonas* quinolone signal production in LasR-defective *Pseudomonas aeruginosa* strains. Microbiology. 2010;156:3096-3107. doi: 10.1099/mic.0.037911-0
9. Dang NP, Landfald B, Willassen NP. Biological surfaceactive compounds from marine bacteria. Environ Technol. 2016;37:1151-1158. doi: 10.1080/09593330.2015.1103784
10. Darvishi P, Ayatollahi S, Mowla D. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCP-PI-2. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011;84:292-300. doi: 10.1016/j.col-surf.2011.01.011
11. Fracchia L, Cavallo M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – Present status and potential. In book: Biomedical Science, Engineering and Technology. 2012;10: 325-370. doi: 10.5772/23821
12. Jain DK, Collins-Thompson DL, Lee H, Trevors JT. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. J Microbiol Methods. 1991;13: 271-279. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(91\)90064-W](https://doi.org/10.1016/0167-7012(91)90064-W)
13. Koch AK, Kappeli O, Fiechter A, Reiser R. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J Bacteriol. 1991;173: 4212-4219. doi: 10.1128/jb.173.13.4212-4219.1991
14. Koim-Puchowska B, Kłosowski G, Drózd-Afelt JM, Mikulski D, Zielinska A. Influence of the Medium Composition and the Culture Conditions on



- Surfactin Biosynthesis by a Native *Bacillus subtilis* natto BS19 Strain. *Molecules*. 2021; 26: 2985. doi:10.3390/molecules26102985
15. Mahto KU, Das S. Whole genome characterization and phenanthrene catabolic pathway of a biofilm forming marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PFL-P1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;206: 111087. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111087>
  16. Maier RM. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 2003;52:101-121. doi:10.1016/s0065-2164(03)01004-9
  17. Nurfarahin AH, Mohamed MS, Phang LY. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production – An Overview. *Molecules*. 2018;23: 1049; doi:10.3390/molecules23051049
  18. Tripathi L, Irorere VU, Marchant R, Banat IM. Marine derived biosurfactants: a vast potential future resource. *Biotechnol Lett*. 2018;40: 1441–1457. doi: 10.1007/s10529-018-2602-8
  19. Valentini M, Lapouge K. Catabolite repression in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 regulates the uptake of C4-dicarboxylates depending on succinate concentration. *Environ Microbiol*. 2013;15:1707–1716. doi: 10.1111/1462-2920.12056

Стаття надійшла до редакції 24.11.2021 р.

