

Uticaj aminoglikozidnih antibiotika na rast, produkciju biosurfaktanata i biodegradaciju dizela kod *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas stutzeri*

Aminoglikozidni antibiotici mogu imati ulogu signalnih molekula koji pokreću određene reakcije u bakterijskoj populaciji i modulišu transkripciju gena za sintezu biosurfaktanata. Stoga bi ovi molekuli mogli stimulisati biodegradaciju dizela kod pripadnika roda *Pseudomonas*. Da bi se proverila tačnost ove hipoteze ispitan je efekat subinhibitornih koncentracija tobramicina i gentamicina na kinetiku rasta, kinetiku sinteze biosurfaktanata i biodegradaciju dizela kod dva pripadnika roda *Pseudomonas*: *Pseudomonas* sp. koji proizvodi biosurfaktante i *Pseudomonas stutzeri* koji ih ne proizvodi. Sojevi su kultivisani u shaking flask bioreaktorima, gde su dodavane različite početne koncentracije antibiotika tobramicina i gentamicina i gde je dizel bio jedini izvor ugljenika. Aminoglikozidi su kod soja *Pseudomonas* sp. indukovali intenzivniju sintezu biosurfaktanata, koja je rezultovala promenom fenotipa bakterijske populacije i formacijom biofilma. Sa povećanjem koncentracije tobramicina i gentamicina došlo je do intenzivnije sinteze biosurfaktanata. Sinteza biosurfaktanata bila je najintenzivnija tokom lag faze rasta i zaustavlja se sa ulaskom bakterijske populacije u stacionarnu fazu. Reakcija populacije *Pseudomonas* sp. na prisustvo aminoglikozida uočljiva je i u kinetici rasta ovog soja. Tako je povećanje koncentracije tobramicina dovelo do većeg porasta broja ćelija, dok je povećanje koncentracije gentamicina dovelo do intenzivnijeg skraćivanja lag faze. Pri višim koncentracijama aminoglikozidi su izgubili ulogu signala i inhibirali rast kod *Pseudomonas* sp. Kod soja *P. stutzeri* aminoglikozidi nisu stimulisali rast i biodegradaciju dizela, što se pripisuje njegovoj nesposobnosti da sintetizuje biosurfaktante. Formiranje biofilma, veći porast broja ćelija i intenzivnija sinteza biosurfaktanata u prisustvu aminoglikozida rezultovali su efikasnijom biodegradacijom dizela kod soja *Pseudomonas* sp. Rezultati ovog istraživanja otvaraju mogućnost primene stimulacije mikrobne aktivnosti pomoću aminoglikozida kao novog postupka u bioremedijacionim tehnologijama.

Uvod

Ubrzan razvoj naftne industrije učinio je naftu i njene derivate čestim kontaminantima zemljišnih ekosistema. U ukupnoj proizvodnji naftnih derivata dizelna goriva imaju visoko učešće. Ova goriva u zemljište mogu dospeti direktno – kao posledica eksploatacije ili havarije, ili indirektno –

Iva Atanasković
(1993), Beograd,
Kneza Miloša 64,
učenica 3. razreda
gimnazije „Sveti Sava”
u Beogradu

MENTORI:
dr Blažo Lalević,
Poljoprivredni fakultet,
Beograd

dipl. bio. Jelena Savić,
XII beogradska
gimnazija

sa zagađenim zalivnim vodama (Milošević 1999). Posledice kontaminacije zemljišnih ekosistema dizelnim gorivima su mnogobrojne. Osim što do- vodi do promene niza hemijskih i fizičkih svojstava zemljišta, ovaj konta- minant introdukuje mnogobrojna toksična i mutagena jedinjenja (Leahy i Colwell 1990). Ta toksična jedinjenja se potom akumuliraju u lancima is- hrane, što može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema i genetičkih oboljenja kod stanovnika zagađenih staništa (Milošević 1999).

Posledice kontaminacije zemljišta dizelom uslovile su potrebu za raz- vijanjem novih i efikasnijih metoda remedijacije zagađenih staništa. Kao najefikasniji metod remedijacije ističe se postupak bioremedijacije, u ko- jem se mikrobnom aktivnošću ugljovodonici dizela razgrađuju do manje toksičnih ili netoksičnih jedinjenja (Ugrinov i Stojanov 2010). Bioremedi- jacione tehnologije se zasnivaju na stimulaciji procesa biodegradacije kon- taminanta. Procesi biodegradacije se stimulišu obezbeđivanjem optimalnih uslova za mikrobnu aktivnost u specifičnim aparatima – bioreaktorima. Za povećanje efikasnosti bioremedijacionih tehnologija ključno pronalaženje što efikasnijih metoda stimulacije mikrobne aktivnosti u bioraktoru (Rai- čević *et al.* 2007).

U postupcima bioremedijacije mogu se koristiti bakterije roda *Pseu- domonas*, jer one dominiraju u biocenozi zemljišnih mikroorganizama koji oksiduju ugljovodonike dizela (Jemcev i Đukić 2000). Neki od pripadnika ovog roda se na uslove gde su ugljovodonici dizela jedini izvor ugljenika adaptiraju produkcijom biosurfaktanata (Emtiazi *et al.* 2005). Biosurfak- tanti su molekuli koji sadrže hidrofilan i hidrofoban region. Ova dva re- giona omogućuju disperziju molekula ugljovodonika u vodi i bolji pristup bakterija hidrofobnom supstratu. Na ovaj način produkcija biosurfaktanata povećava efikasnost biodegradacije dizela kod pripadnika roda *Pseudomo- nas* (Zhang *et al.* 2005).

Biosurfaktanti kod roda *Pseudomonas* imaju ključnu ulogu i u ada- ptaciji na aminoglikozidne antibiotike. U prisustvu aminoglikozida bakte-rije ovog roda mogu intenzivirati sintezu biosurfaktanata radi formacije mikrokolonija i biofilma. Ove strukture sprečavaju prodor antibiotika u bakterijsku ćeliju (Lambert 2002). U bakterijskoj populaciji produkcija biosurfaktanata u prisustvu dizela razlikuje se od mehanizma njihove produkcije u prisustvu antibiotika. U uslovima kada je dizel izvor uglje- nika, biosurfaktante produkuju samo one bakterije koje su u kontaktu sa hidrofobnim supstratom (Kumara *et al.* 2006). U uslovima sa aminogli- kozidom, biosurfaktante sintetišu samo rezistentne bakterijske ćelije. One ujedno oslobađaju i različite signalne molekule. Ovi signali aktiviraju od- govor na prisustvo aminoglikozida tako što lančano pokreću sintezu bio- surfaktanata i kod drugih ćelija u bakterijskoj populaciji (Kievit 2009). I sami antibiotici mogu funkcionisati kao alternativni signalni molekuli i mogu kontrolisati ekspresiju gena zaduženih za sintezu biosurfaktanata.

Tako aminoglikozid tobramicin pri niskim koncentracijama gubi svoju bakterioidnu ulogu i dobija ulogu signalnog molekula koji stimuliše nastanak biofilma kod *Pseudomonas aeruginosa* (Kievit 2009).

Na osnovu navedenog može se pretpostaviti da subinhibitorne koncentracije aminoglikozida mogu stimulisati sintezu biosurfaktanata i biodegradaciju dizela kod pripadnika roda *Pseudomonas*. Stoga je cilj ovog istraživanja ispitati da li aminoglikozidi tobramicin i gentamicin stimulišu biodegradaciju dizela kod dva pripadnika roda *Pseudomonas*, gde jedan pripadnik ima a drugi nema sposobnost sinteze biosurfaktanata.

Materijal i metode

Ispitivana su dva soja iz roda *Pseudomonas* – *Pseudomonas* sp. koji produkuje biosurfaktante i *Pseudomonas stutzeri* koji ih ne produkuje. Sojevi su kultivisani u shaking flask bioreaktorima, u koje su dodavane različite koncentracije gentamicina ili tobramicina (0.3125, 0.625 i 1.25 $\mu\text{g/mL}$). Za svaki soj formirana je i po jedna kontrolna grupa, u koju antibiotik nije dodavan. Jedini izvor ugljenika u bioreaktorima bio je dizel D-2. U njima je na svakih 24 h određivan broj bakterijskih ćelija, kao i apsorbanca bakterijske suspenzije. Uporedo je praćena i efikasnost sinteze biosurfaktanata, koja je izražena kao promena prečnika jasne zone sa vremenom. Nakon inkubacionog perioda od 96 h iz svih bioreaktora ekstrahovan je preostali dizel i efikasnost biodegradacije je određena na osnovu razlike u početnoj i preostaloj masi dizela.

Bakterijski sojevi – izolacija i karakterizacija. Soj *Pseudomonas stutzeri* dobijen je iz kolekcije IHTM-Centar za hemiju, istraživačka grupa prof. dr. Miroslava M. Vrvica. Soj *Pseudomonas* sp. sposoban da koristi dizel D-2 kao jedini izvor ugljenika izolovan je iz zemljišta kontaminiranog naftom. Uzorci zemljišta su sterilno prikupljeni u Rafineriji nafte Beograd, u zoni pogona za rerafinaciju rabljenog ulja. Uzorak je suspendovan u tečnu UG D-2 podlogu (1 g NH_4NO_3 , 0.25 g K_2HPO_4 , 50 mL ekstrakta zemlje, 1 mL dizela D-2 u 1000 mL dH_2O ; Končarević 2009) u koncentraciji 10 g/L. Suspenzija je inkubirana (200 rpm, 30°C, 7 dana) radi umnožavanja biomase mikroorganizama i selekcije mikroorganizama rezistentnih na dizel. *Pseudomonas* sp. je iz suspenzije izolovan zasejavanjem na selektivnu *Pseudomonas* Cetrimid Agar podlogu (1.6 g peptona, 1 g kazein hidrolizata, 1 g K_2SO_4 , 0.14 g MgCl_2 , 1.1 g agara, 5 mL glicerola, u 1000 mL dH_2O , sa dodatkom *Pseudomonas* C-N SR0102E suplementa; Buck i Cooke 1969). Sposobnost izolovanog soja da koristi dizel kao jedini izvor ugljenika ispitana je zasejavanjem na čvrstu UG D-2 podlogu (1 g NH_4NO_3 , 0.25 g K_2HPO_4 , 50 mL ekstrakta zemlje, 16 g agara, 1 mL dizela D-2, u 1000 mL dH_2O ; Končarević 2009). Da bi se

potvrdila pripadnost izolata rodu *Pseudomonas*, izvršene su morfološka i biohemijska karakterizacija soja. Određivane su sledeće karakteristike:

- Da li je metabolizam aeroban ili anaeroban zasejavanjem na Kliglerov dvostruki šećer (3 g mesnog ekstrakta, 3 g ekstrakta kvasca, 20 g peptona, 10 g laktoze, 1 g dekstroze, 5 g NaCl, 0.2 g fero-sulfata, 0.3 g natrijum tiosulfata, 12 g agara, 0.024 g fenol crvenog u 1000 mL dH₂O; Kljujev 2006);
- Sposobnost korišćenja manitola i pokretljivost ubodnim zasejavanjem na Pariski manit (20 g peptona, 10 g manitola, 5 g agara, 0.025 g fenol crvenog u 1000 mL dH₂O; Kljujev 2006);
- Sposobnost razgradnje uree zasejavanjem na Christensen-ovu ureu (1 g peptona, 1 g dekstroze, 5 g NaCl, 2 g K₃PO₄, 20 g uree, 0.012 g fenol crvenog u 1000 mL dH₂O; Kljujev 2006);
- Sposobnost korišćenja citrata zasejavanjem na Simmons-ov citratni agar (0.2 g MgSO₄, 1 g amonijum fosfata, 2 g natrijum citrata, 5 g NaCl, 15 g agara, 0.08 g brom timol plavog u 1000 mL dH₂O; Knežević i Simić 1997);
- Produkcija citohroma c oksidaza testom (Knežević i Simić 1997);
- Produkcija katalaze katalaza testom (Knežević i Simić 1997);
- Fluorescencija posmatranjem pod UV-A zracima (Kljujev 2006);
- Građa ćelijskog zida bojenjem po Gram-u (Knežević i Simić 1997);
- Morfologija ćelije posmatranjem pod mikroskopom (Knežević i Simić 1997).

Sposobnost ispitivanih sojeva da produkuju biosurfaktante ustanovljena je drop collapse testom. Sojevi su inkubirani (24 h, 30 °C) u Drop Collapse podlozi (20 g glukoze, 0.7 g KH₂PO₄, 2 g Na₂HPO₄, 0.4 g MgSO₄×7H₂O, 0.01 g CaCl₂×2H₂O, 0.001 g FeSO₄×7H₂O, 1 g NH₄NO₃ u 1000 mL dH₂O; Končarević 2009). U otvore mikrotitar ploče dodato je 10 µL suncokretovog ulja i 10 µL kulture u DC podlozi. Kao kontrola korišćena je destilovana voda (Končarević 2009).

Osetljivost ispitivanih sojeva na aminoglikozide ustanovljena je mikrodilucionom metodom (Hanel i Raether 1988). Ovom metodom su određivane i subinhibitorne koncentracije tobramicina i gentamicina u opsegu od 0.3125 do 200 µg/mL.

Kultivacija i praćenje rasta. Sojevi su kultivisani u shaking flask bioreaktorima zapremine 150 mL (Zhang *et al.* 2005), na temperaturi od 30°C i pri agitaciji od 200 rpm. Tečna faza u bioreaktoru bila je mineralna podloga (1g NH₄NO₃, 0.25g K₂HPO₄, 50 mL ekstrakta zemlje u 1000 mL dH₂O; Končarević 2009) sa dodatkom 1 g/L dizela D-2 kao jedinog izvora ugljenika. U mineralnu podlogu inokulirano je 10% odgovarajuće bakterijske suspenzije (0.0645×10^9 ćelija/mL). Priprema bakterijskih suspenzija vršena je homogenizacijom čvrste kulture starosti 48 h u fiziološkom rastvoru (Končarević 2009). Pre inokulacije, metodom deci-

malnih razblaženja i primenom CFU formule (Knežević i Simić 1997) određen je broj bakterija u suspenziji.

U bioreaktore su dodavani aminoglikozidi tobramicin i gentamicin. Za svaki soj kreirano je šest eksperimentalnih grupa, sa po tri uzastopne subinhibitorne koncentracije (0.3125, 0.625 i 1.25 $\mu\text{g/mL}$) tobramicina, odnosno gentamicina. Oformljene su i biotičke kontrolne grupe, u koje nije dodavan antibiotik, kao i abiotička kontrola, u koju nije dodavana bakterijska suspenzija.

Bakterijski rast praćen je u tečnoj fazi bioreaktora, metodom decimalnih razblaženja sa primenom CFU formule (Knežević i Simić 1997). Promena optičke gustine (600 nm) bakterijske suspenzije praćena je PG Instruments T70 UV/VIS LTD spektrofotometrom. Merenja su ponavljana u intervalu od 12 h u periodu od 96 h.

Oil spreading test. Promena koncentracije biosurfaktanata u bakterijskoj suspenziji praćena je na osnovu promene prečnika jasne zone. Prečnik jasne zone određivan je oil spreading testom (Youssefa *et al.* 2004). Jasna zona se javlja usled povećanja mešljivosti vode i nafte u prisustvu suspenzije koja sadrži biosurfaktante. Njen prečnik srazmeran je koncentraciji biosurfaktanata u testiranoj suspenziji. Kao hidrofobna faza korišćena je laka sirova nafta ($\rho = 0.67 \text{ g/mL}$), a kao hidrofilna faza destilovana voda. Odnos hidrofilne faze, hidrofobne faze i analizirane suspenzije bio je 104 : 2 : 1.

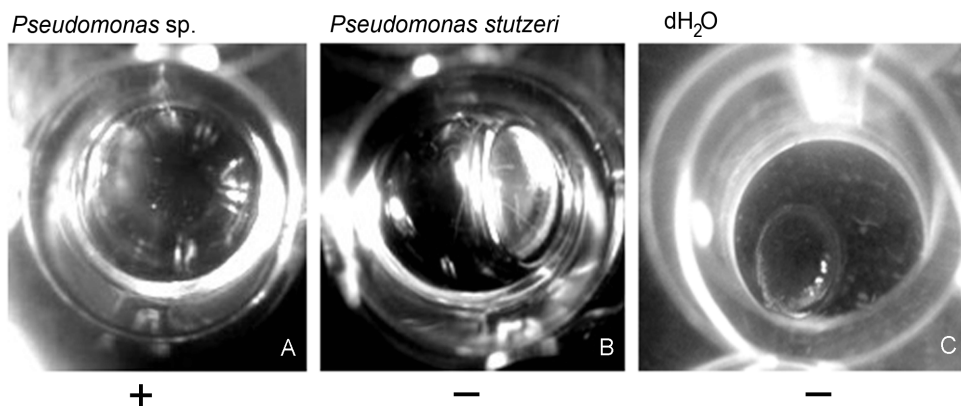
Efikasnost biodegradacije. Preostali dizel je iz bioreaktora izolovan nakon 96 h inkubacije. Ekstrakcija je vršena n-heksanom, gde je odnos smeše iz koje se ekstrahuje i n-heksana bio 3:1. N-heksan odvojen je od ekstrakta zagrevanjem u vakuum uparivaču na 48-49°C, a zatim je izmerena masa ekstrakta (US EPA 1999). Abiotički gubici dizela određeni su ekstrakcijom preostalog dizela iz abiotičke kontrolne grupe. Efikasnost biodegradacije u eksperimentalnim grupama izračunata je po formuli (Kritika i Shalini 2009):

$$\text{Efikasnost biodegradacije} = (\text{početna masa dizela} - \text{masa preostalog dizela}) / (\text{početna masa dizela}) * 100\% - \text{abiotički gubici}$$

Rezultati i diskusija

Karakterizacija bakterijskih sojeva

Sojevi *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas stutzeri* ispoljili su sposobnost rasta u uslovima gde je dizel D-2 jedini izvor ugljenika. Drop collapse testom pokazano je da pri kontaktu sa uljem dolazi do kolabiranja kapljica suspenzije soja *Pseudomonas* sp, čime je ustanovljena njegova sposobnost produkcije biosurfaktanata. Kapljica kulture *P. stutzeri* ostala



Slika 1. A: Rezultati Drop collapse testa. '+' – pozitivna reakcija (kolabiranje kapljice), '-' – negativna reakcija (kapljica je postojana); *Pseudomonas* sp. (B) i *P. stutzeri* (C) na podlozi sa dizelom kao jedinim izvorom ugljenika.

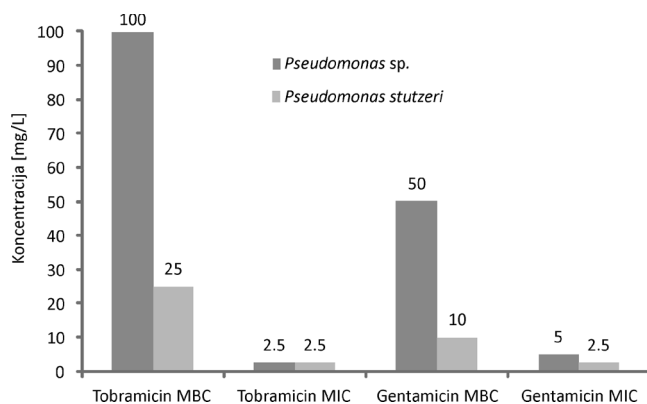
Figure 1. A: Results of the Drop collapse test. '+' – positive reaction (the drop is collapsing), '-' – negative reaction (the drop is stable); *Pseudomonas* sp. (B) and *P. stutzeri* (C) on media with diesel as the only carbon source.

je postojana u kontaktu sa uljem, što znači da ovaj soj nema sposobnost produkcije biosurfaktanata (slika 1).

- Konstatovane su sledeće karakteristike izolata *Pseudomonas* sp.:
- Striktna aerobnost.
- Pokretljivost.
- Nesposobnost korišćenja manitola kao izvora ugljenika.
- Sposobnost korišćenja citrata kao izvora ugljenika.
- Sposobnost razgradnje uree.
- Produkcija citohroma c.
- Produkcija katalaze.
- Fluorescencija pod UV-A lampom.
- Izolovani soj je gramnegativan i pod mikroskopom su uočene ćelije štapićastog oblika.

Ove karakteristike su opšte odlike roda *Pseudomonas* (Mihajlović 1983), čime je potvrđena pripadnost izolata ovom rodu.

Soj *Pseudomonas* sp. pokazao je veću otpornost na tobramicin i gentamicin od soja *P. stutzeri* (slika 2). Veća otpornost ovog soja na ispitivane aminoglikozide može se pripisati njegovoj sposobnosti da sintetiše biosurfaktante. Pokazano je da pripadnici roda *Pseudomonas* koji produkuju biosurfaktante ispoljavaju veću otpornost na aminoglikozide. Ovi molekuli povećavaju hidrofobnost ćelija i omogućavaju formiranje ćelijskih agregacija, sprečavajući penetraciju antibiotika u ćeliju (Drenkard i Ausubel 2002). Soj *P. stutzeri* nema sposobnost sinteze biosurfaktanata, što je moglo usloviti njegovu veću antibiotsku osetljivost.

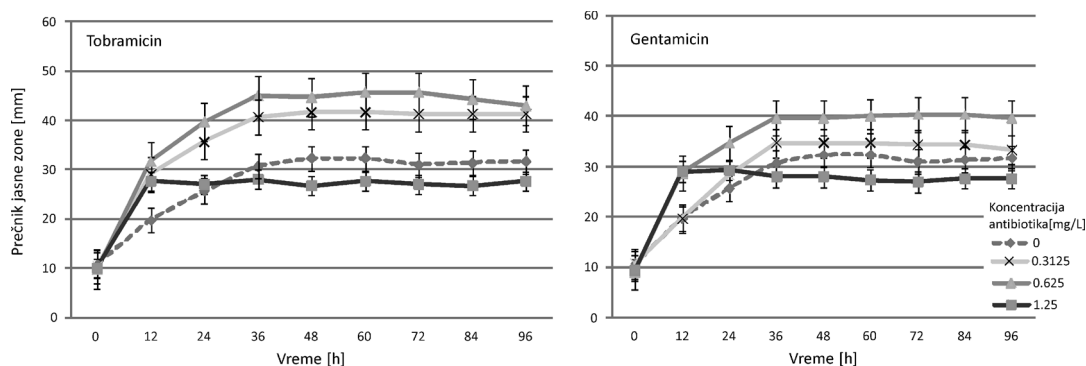


Slika 2. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije ($\mu\text{g/ml}$) tobramicina i getamicina za *Pseudomonas sp.* i *P. stutzeri*.

Figure 2. Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal (MBC) concentrations ($\mu\text{g/ml}$) of tobramycin and gentamycin for *Pseudomonas sp.* and *P. stutzeri*.

Stimulusni efekat subinhibitornih koncentracija aminoglikozida na produkciju biosurfaktanata kod soja *Pseudomonas sp.*

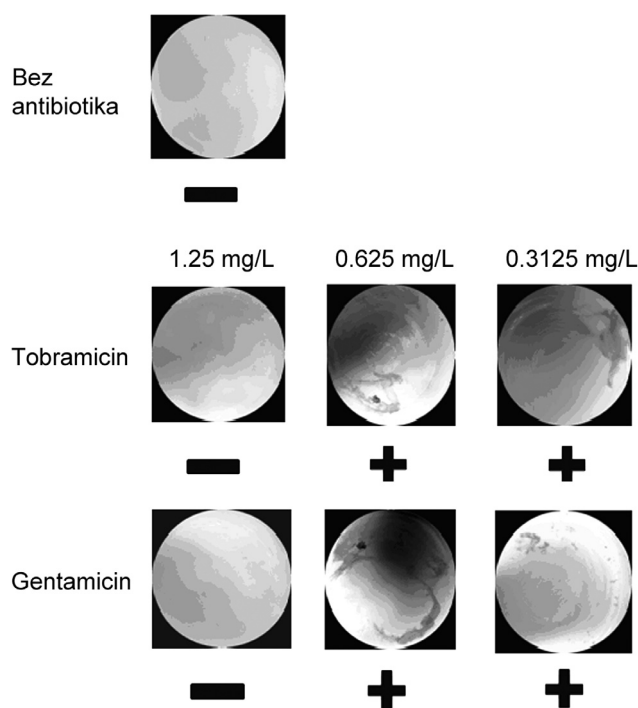
Na slici 3 prikazana je vremenska promena prečnika jasne zone, koji je analogan koncentraciji biosurfaktanata u eksperimentalnim grupama. Soj *Pseudomonas sp.* sintetisao je biosurfaktante različitim intenzitetom u zavisnosti od aplicirane doze antibiotika. U uslovima nižih koncentracija oba ispitivana aminoglikozida (0.3125 i $0.625 \mu\text{g/mL}$) došlo je do intenzivnije produkcije biosurfaktanata u odnosu na kontrolu. U prisustvu ovih koncentracija antibiotika došlo je i do promene fenotipa bakterijske populacije u oblik biofilma nakon 48 h inkubacije (slika 4).



Slika 3. Uticaj subinhibitornih koncentracija tobramicina (A) i gentamicina (B) na produkciju biosurfaktanata kod *Pseudomonas sp.*

Figure 3. Effect of tobramycin (A) and gentamycin (B) subinhibitory concentrations on biosurfactant production in *Pseudomonas sp.*

Stimulacija formiranja biofilma u prisustvu aminoglikozida opisana je i kod drugih pripadnika roda *Pseudomonas* (Khan *et al.* 2010). Ova stimulacija se zasniva na postojanju transmembranskog Aminoglycoside response regulator (Arr) senzora, koji detektuje molekule aminoglikozida u spoljašnjoj sredini. Arr senzor potom pokreće niz unutarćelijskih reakcija koje omogućavaju agregiranje ćelija i nastanak biofilma (Hoffman *et al.* 2005). Jedna od tih reakcija jeste i sinteza biosurfaktanata, koji su neophodni za formiranje mikrokolonija, osnovnih gradivnih jedinica biofilma (Drenkard i Ausubel 2002). Na osnovu navedenog možemo pretpostaviti da je prisustvo Arr senzora kod izolata *Pseudomonas* sp. osnovni uzrok nastanka biofilma i pojačane sinteze biosurfaktanata u prisustvu aminoglikozida.



Slika 4. Pojava biofilma u bioreaktorima nakon 48 h inkubacije (+); odsustvo biofilma (-).

Figure 4. Biofilm appearance in bioreactors after 48 h incubation (+); no biofilm appearance (-).

U uslovima sa $0.625 \mu\text{g/mL}$ gentamicina ili tobramicina sinteza biosurfaktanata bila je intenzivnija nego u uslovima sa $0.3125 \mu\text{g/mL}$. U prethodnim istraživanjima pokazano je da aminoglikozid tobramicin stimuliše transkripciju gena za sintezu biosurfaktanata kod *Pseudomonas aeruginosa* (Linares *et al.* 2006). Takođe je pokazano da bakterijska transkripcija zavisi od koncentracije antibiotika u spoljašnjoj sredini. Sa povećanjem koncentracije antibiotika, povećava se i broj antibiotikom modulisanih transkripcija, čime se povećava i ekspresija transkribovanog gena (Davies *et al.* 2006). Na osnovu navedenog možemo pretpostaviti da se sa pove-

ćanjem koncentracije aminoglikozida povećala i ekspresija gena za sintezu biosurfaktanata, što je dovelo do njihove intenzivnije sinteze.

Promena koncentracije tobramicina i gentamicina imala je isti efekat na sintezu biosurfaktanata kod *Pseudomonas* sp. Sličan efekat ova dva aminoglikozida je verovatno posledica njihove pripadnosti istoj grupi antibiotika. Ova pojava ukazuje da je uticaj subinhibitornih koncentracija aminoglikozida na bakterijsku populaciju povezan sa njihovim antibiotskim mehanizmom.

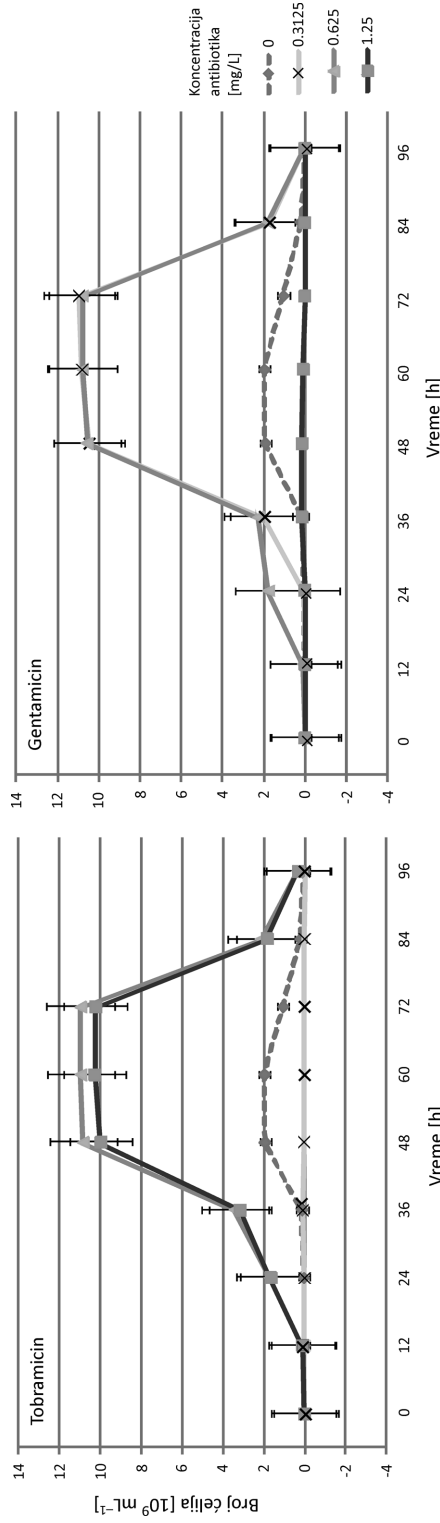
Kinetika rasta u bioreaktorima.

Kinetika rasta soja *Pseudomonas* sp. menja se u zavisnosti od aplicirane koncentracije tobramicina (slika 5A). Pri nižim koncentracijama tobramicina (0.3125 i 0.625 $\mu\text{g/mL}$) lag faza rasta je kraća nego u uslovima bez antibiotika. To znači da se u prisustvu ovih koncentracija ispitivani soj brže adaptirao na uslove gde je dizel jedini izvor ugljenika. U prisustvu ovih koncentracija došlo je i do većeg porasta broja ćelija nego u kontroli. Ovo nije slučaj sa najvišom ispitivanom koncentracijom tobramicina (1.25 $\mu\text{g/mL}$), koja je inhibirala bakterijski rast.

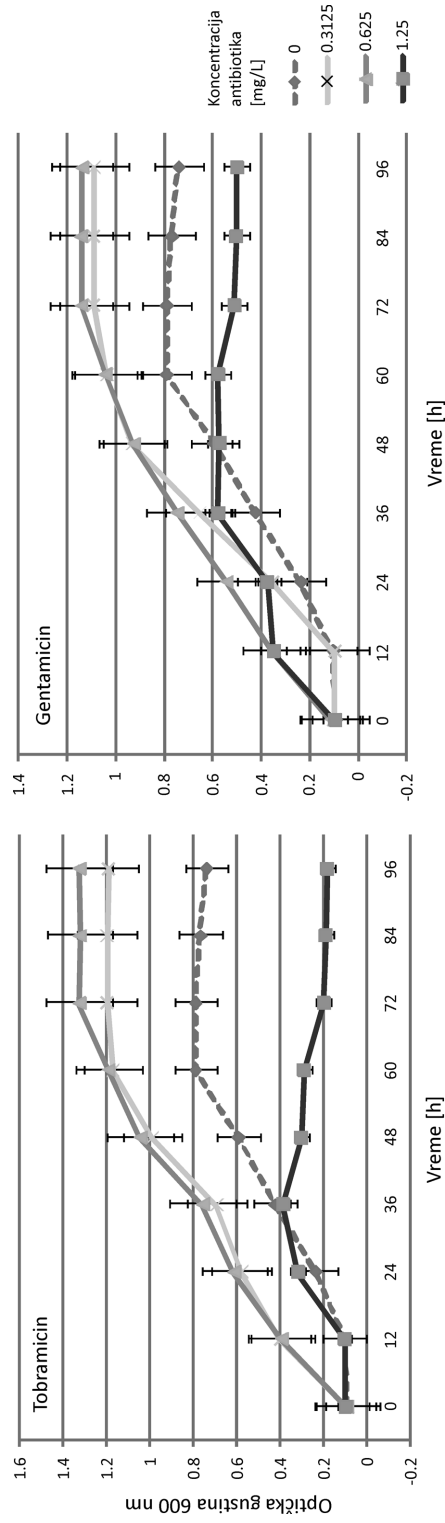
Kao i u slučaju tobramicina, niže koncentracije (0.3125 i 0.625 $\mu\text{g/mL}$) gentamicina izazvale su skraćivanje lag faze i bržu adaptaciju soja u odnosu na kontrolnu grupu (slika 5B). Ove koncentracije gentamicina uslovile su i veći porast broja ćelija u log fazi rasta. Najviša ispitivana koncentracija gentamicina (1.25 $\mu\text{g/mL}$) je takođe skratila lag fazu, ali je inhibirala porast broja ćelija u log fazi.

U uslovima nižih koncentracija (0.3125 i 0.625 $\mu\text{g/mL}$) tobramicina i gentamicina porast broja ćelija intenzivniji je nego u kontroli (slika 5). Povećanje koncentracije oba aminoglikozida sa 0.3125 na 0.625 $\mu\text{g/mL}$ indukovalo je intenzivnije reakcije populacije *Pseudomonas* sp. Tako je povećanje koncentracije tobramicina dovelo do većeg porasta broja ćelija (slika 5A), dok je povećanje koncentracije gentamicina dovelo do intenzivnijeg skraćivanja lag faze u odnosu na kontrolu (slika 5B). Ovakve reakcije bakterijske populacije ukazuju da tobramicin i gentamicin imaju funkciju signalnih molekula kod soja *Pseudomonas* sp. Dobijeni rezultati takođe ukazuju da intenzitet bakterijske reakcije zavisi od koncentracije aminoglikozida. Više koncentracije aminoglikozida ponašaju se kao jači signali i indukuju intenzivnije reakcije u bakterijskoj populaciji (veći broj ćelija u log fazi, kraća lag faza). I u drugim istraživanjima pokazano je da se subinhibitorne koncentracije aminoglikozida u bakterijskoj populaciji mogu ponašati kao signalni molekuli (Fajardo i Martinez 2008; Hoffman *et al.* 2005; Linares *et al.* 2006).

Funkciju signala koji pokreće određene reakcije u bakterijskoj populaciji nije ispoljila najviša ispitivana koncentracija tobramicina, odnosno



Slika 5. Uticaj subinhibitorskih koncentracija tobramicina (A) i gentamicina (B) na kinetiku rasta kod *Pseudomonas* sp.
Figure 5. Effect of tobramycin (A) and gentamycin (B) subinhibitory concentrations on growth kinetics of *Pseudomonas* sp.



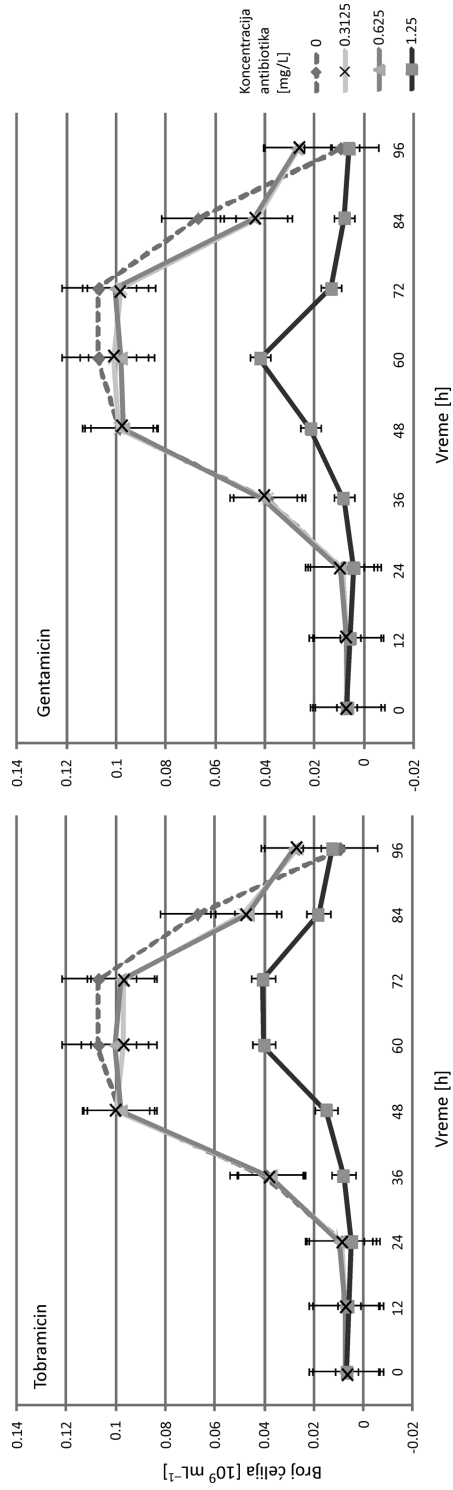
Slika 6. Uticaj tobramicina (A) i gentamicina (B) na optičku gustinu (600 nm) suspenzije *Pseudomonas* sp.
Figure 6. Effect of tobramycin (A) and gentamycin (B) on optical density (600 nm) of *Pseudomonas* sp. suspension

gentamicina ($1.25 \mu\text{g/mL}$). Ova koncentracija aminoglikozida je inhibirala bakterijski rast (slika 5). Iako se koncentracija od $1.25 \mu\text{g/mL}$ primenom mikrodilucione metode pokazala kao subinhibitorna, ona je u bioreaktoru usporila rast bakterijske populacije. Ovo ukazuje da se u bioreaktoru anti-biotska osetljivost soja *Pseudomonas* sp. povećala. Povećanje antibiotske osetljivosti može biti posledica izloženosti soja ekstremnim uslovima u bioreaktoru. Ti ekstremni uslovi su hidrofobnost dizela kao jedinog nutrijenta, jer je hidrofoban nutrijent nedostupan hidrofilnim bakterijskim ćelijama. Da bi konzumirale ovakav nutrijent, hidrofilne bakterijske ćelije moraju proći niz adaptacija (Jemcev i Đukić 2000). Povećana antibiotska osetljivost kod pripadnika roda *Pseudomonas* u ekstremnim uslovima konstatovana je i u drugim istraživanjima (Reller *et al.* 1974).

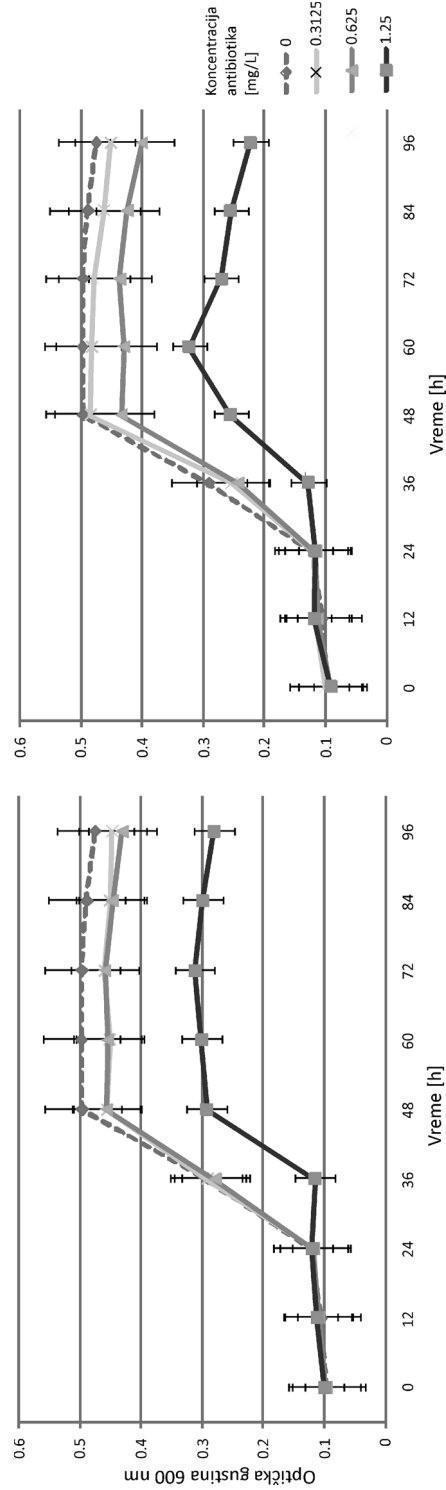
U uslovima nižih koncentracija (0.3125 i $0.625 \mu\text{g/mL}$) tobramicina i gentamicina stacionarna faza duža je nego u kontroli (slika 5). Pri ovim koncentracijama aminoglikozida opadanje broja ćelija dešava se kasnije, ali sa drastičnijim padom nego u ostalim eksperimentalnim grupama. Ovakog nagao pad brojnosti ćelija može biti posledica brže potrošnje hranljivih materija u ovim grupama, ali i posledica oslobađanja toksičnih produkata bakterijskog metabolizma. Slična kinetika rasta opisana je i u prethodnim istraživanjima, gde je nastanak toksičnih intermedijernih metabolita izazvao naglo opadanje broja ćelija u bioreaktorima (Emtiazi i Shakarami 2005).

Optička gustina bakterijskih suspenzija (slika 6) raste i tokom lag faze, iako u ovom periodu ne dolazi do promene broja ćelija. Promena optičke gustine bakterijskih suspenzija nije isključivo posledica bakterijskog rasta. Možemo pretpostaviti da je njena promena ujedno posledica sinteze biosurfaktanata i drugih proizvoda bakterijskog metabolizma. Uočeno je da soj *Pseudomonas* sp. proizvodi narandžasti pigment. S obzirom da je merena talasna dužina (600 nm) u okviru narandžastog dela spektra, možemo pretpostaviti da je pigmentacija izolata uticala na promenu optičke gustine bakterijske suspenzije.

U uslovima nižih koncentracija aminoglikozida (0.3125 i $0.625 \mu\text{g/mL}$) optička gustina suspenzije ne opada sa odumiranjem bakterijskih ćelija. Zajednička karakteristika grupa u kojima nije došlo do opadanja optičke gustine je prisustvo biofilma. Pretpostavljamo da je njegovo prisustvo uzrok stabilnosti optičke gustine u ovim grupama. Ova pretpostavka odgovara podacima iz literature, jer je i u drugim istraživanjima uočena postojanost optičke gustine usled formacije biofilma (Meyer *et al.* 2011). Postojanost optičke gustine u prisustvu biofilma ukazuje da opadanje broja ćelija u tečnoj fazi bioreaktora (slika 5) ne mora biti posledica odumiranja bakterijske populacije u bioreaktoru. Opadanje broja ćelija u tečnoj fazi



Slika 7. Uticaj tobramicina (A) i gentamicina (B) na kinetiku rasta kod *P. stutzeri*
 Figure 7. Effect of tobramycin (A) and gentamycin (B) on growth kinetics of *P. stutzeri*



Slika 8. Uticaj tobramicina (A) i gentamicina (B) na optičku gustinu (600 nm) suspenzije *P. stutzeri*
 Figure 8. Effect of tobramycin (A) and gentamycin (B) on optical density (600 nm) of *P. stutzeri* suspension

može biti posledica migriranja bakterijskih ćelija iz tečne faze u biofilm (Klausen *et al.* 2003).

Tobramicin i gentamicin nisu stimulisali porast broja ćelija kod *P. stutzeri*, kao što je to slučaj sa sojem *Pseudomonas* sp. (slika 7). Dužina trajanja lag, log i stacionarne faze rasta u uslovima nižih koncentracija (0.3125 i 0.625 $\mu\text{g/mL}$) tobramicina i gentamicina ista je kao i u kontrolnoj grupi. Najviše ispitivane koncentracije oba aminoglikozida (1.25 $\mu\text{g/mL}$) produžile su lag fazu i inhibirale bakterijski rast u log fazi.

Optička gustina suspenzije *P. stutzeri* je manja u prisustvu svih ispitivanih koncentracija aminoglikozida nego u kontroli. Ova razlika u optičkoj gustini uočljiva je tokom log i stacionarne faze za najvišu ispitivanu koncentraciju aminoglikozida. Za ostale ispitivane koncentracije razlika u optičkoj gustini uočljiva je tokom stacionarne faze (slika 8). Ovo ukazuje da su sve koncentracije tobramicina i gentamicina ispoljile inhibitorno dejstvo na *P. stutzeri*, dok jačina inhibicije raste sa koncentracijom antibiotika. Kao i u slučaju soja *Pseudomonas* sp., antibiotska osetljivost *P. stutzeri* porasla je u uslovima sa dizelom kao jedinim nutrijentom. Porast antibiotske osetljivosti znatno je izraženiji kod *P. stutzeri*, jer su kod njega sve ispitivane koncentracije aminoglikozida ispoljile inhibitorno dejstvo. Zato postoji mogućnost da do stimulacije bakterijskog rasta u prisustvu aminoglikozida kod *P. stutzeri* nije došlo zato što su koncentracije antibiotika bile previsoke.

Veza kinetike rasta i produkcije biosurfaktanata u bioreakotrima.

Kinetika rasta soja *Pseudomonas* sp. tesno je povezana sa kinetikom sinteze biosurfaktanata. Najintenzivnija sinteza biosurfaktanata odgovara periodu lag faze rasta. Poznato je da su biosurfaktanti ključni u adaptaciji bakterija na uslove gde je dizel jedini izvor ugljenika (Sivapathasekaran *et al.* 2010). Zato možemo pretpostaviti da je intenzivna sinteza biosurfaktanata u lag fazi posledica adaptiranja soja na uslove u bioreaktoru. Sinteza biosurfaktanata tokom lag faze rasta bila je intenzivnija u uslovima sa aminoglikozidom nego u kontroli (slika 5 i 6). U ovim uslovima je intenzivnije i skraćenje lag faze u odnosu na kontrolu (slike 8 i 9). Stoga možemo pretpostaviti da je aminoglikozid indukovao bržu adaptaciju soja povećanjem sinteze biosurfaktanata tokom lag faze. Intenzivna sinteza biosurfaktanata tokom lag faze rasta ispoljila se pri svim koncentracijama oba ispitivana aminoglikozida, sem u slučaju najniže koncentracije gentamicina. U uslovima ove koncentracije sinteza biosurfaktanata počela je kasnije nego u ostalim eksperimentalnim grupama (slika 6). Zakasnela sinteza biosurfaktanata praćena je i lag fazom koja je duža nego pri višim koncentracijama gentamicina (slika 9).

Porast koncentracije biosurfaktanata u eksperimentalnim grupama izražen je tokom log faze rasta. U grupama sa većim brojem ćelija u log

fazi detektovana je i veća koncentracija biosurfaktanata. Poznato je da biosurfaktanti omogućavaju disperziju dizela u vodenoj sredini i tako povećavaju njegovu dostupnost bakterijskim ćelijama (Zhang *et al.* 2005). Moguće je da su na ovaj način biosurfaktanti indukovali veću dostupnost nutrijenata, stoga i veći porast broja ćelija u log fazi.

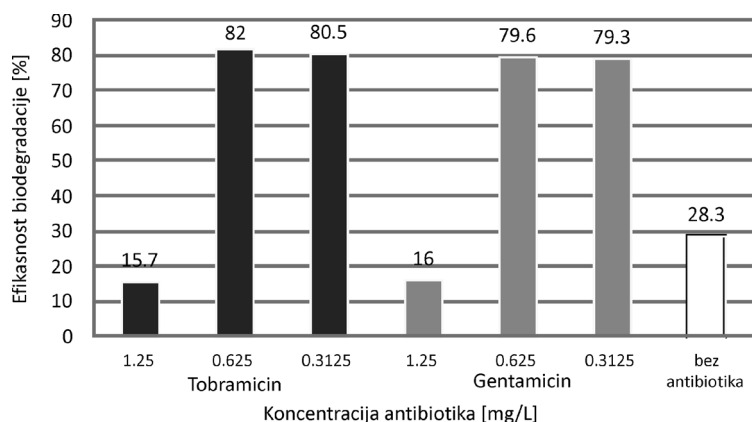
Povećanje koncentracije biosurfaktanata u svim eksperimentalnim grupama staje sa ulaskom bakterijske populacije u stacionarnu fazu rasta. Iako su u populaciji i dalje prisutne vijabilne ćelije, sinteza biosurfaktanata se ne ispoljava i njihova koncentracija u bakterijskoj suspenziji ostaje konstantna. Prema podacima iz literature efikasnost emulzifikacije ugljovodnika u prisustvu ramnolipida, biosurfaktanta koji produkuje *P. aeruginosa*, drastično opada kada koncentracija ramnolipida pređe određenu granicu (Zhang i Miller 1992). Stoga je pretpostavljeno da bakterijska populacija *Pseudomonas* sp. staje sa sintezom biosurfaktanata jer bi pri višim koncentracijama oni izgubili svoj emulzifikacioni efekat.

Soj *P. stutzeri* nije ispoljio sposobnost sinteze biosurfaktanata i formiranja biofilma. Kod ovog soja lag faza rasta je bila duža a porast broja ćelija manji u odnosu na soj *Pseudomonas* sp. Prema podacima iz literature, sojevi koji ne sintetišu biosurfaktante ispoljavaju slabiju aktivnost u uslovima gde su nutrijenti hidrofobni (Whanga *et al.* 2008). Stoga se drugačija kinetika rasta soja *P. stutzeri* može pripisati njegovoj nesposobnosti sinteze biosurfaktanata. Za razliku od soja koji sintetiše biosurfaktante, soj *P. stutzeri* nije reagovao na prisustvo aminoglikozida (slika 12 i 13). Stoga možemo pretpostaviti da je za reakciju na aminoglikozid kao signalni molekul neophodna sposobnost sinteze biosurfaktanata. Ova pojava takođe ukazuje da je sinteza biosurfaktanata osnovni odgovor bakterijske populacije na prisustvo aminoglikozida.

Uticaj aminoglikozida na efikasnost biodegradacije dizela

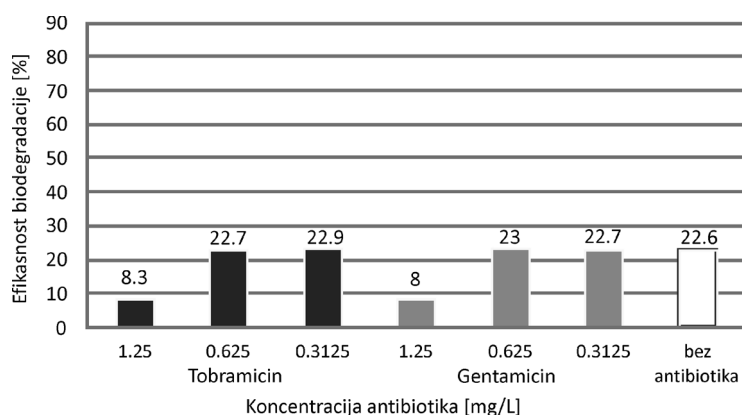
Gentamicin i tobramicin u koncentracijama 0.3125 i 0.625 $\mu\text{g/mL}$ stimulisali su biorazgradnju dizela kod soja *Pseudomonas* sp. (slika 9). Pretpostavljamo da je veća efikasnost biodegradacije u prisustvu ovih koncentracija aminoglikozida posledica većeg broja ćelija (slika 5) u biorreatoru, kao i intenzivnije produkcije biosurfaktanata (slika 3) nego u kontroli. Ova pretpostavka odgovara podacima iz literature, po kojima intenzivnija sinteza biosurfaktanata rezultuje efikasnijom biodegradacijom sirove nafte kod prirodnika roda *Pseudomonas* (Zhang *et al.* 2005).

Sve eksperimentalne grupe u kojima je došlo do formiranja biofilma ispoljile su veću efikasnost biodegradacije od ostalih grupa (slika 4). I u drugim istraživanjima je pokazano da se ćelije u biofilmu bolje adaptiraju i preživljavaju u uslovima gde je naftni kontaminant jedini izvor ugljenika, jer su zaštićene matriksom biofilma. U populaciji biofilma izraženi



Slika 9.
Uticaj aminoglikozida na efikasnost biodegradacije dizela kod *Pseudomonas* sp.

Figure 9.
Effect of aminoglycosides on diesel biodegradation efficiency in *Pseudomonas* sp.



Slika 10.
Uticaj aminoglikozida na efikasnost biodegradacije dizela kod *P. stutzeri*

Figure 10.
Effect of aminoglycosides on diesel biodegradation efficiency in *P. stutzeri*.

su procesi hemoatrakcije i imobilizacije nutrijenata, čime se povećava efikasnost biorazgradnje (Singh *et al.* 2006). Efikasnost biodegradacije dizela u prisustvu aminoglikozida je kod soja *P. stutzeri* ista kao i u kontroli (slika 10). Kod ovog soja najviše ispitivane koncentracije oba antibiotika su inhibirale biodegradaciju. Pretpostavljamo da je ova inhibicija posledica manje intenzivnog porasta broja ćelija u prisustvu najviših koncentracija antibiotika (slika 7).

Bakterijska suspenzija koja je na početku eksperimenta inokulirana u bioreaktore imala je istu koncentraciju ćelija i za soj *P. stutzeri* i za soj *Pseudomonas* sp. (0.065×10^9 ćel/mL). Iako je bakterijska populacija iste brojnosti inokulirana u bioreaktore, soj *P. stutzeri* je ispoljio mnogo manju sposobnost razgradnje dizela u odnosu na soj *Pseudomonas* sp. Kod *P. aeruginosa* efikasnost biodegradacije alkana, dominantnih komponenti dizela, povećava se usled njihove disperzije biosurfaktantima. Mutantni *P. aeruginosa* koji ne proizvode biosurfaktante nisu mogli da razgrađuju različite vrste alkana prisutnih u dizelu (Rocha *et al.* 2011). Stoga se manja efikasnost biodegradacije dizela kod soja *P. stutzeri* može pripisati njegovoj nesposobnosti da sintetiše biosurfaktante.

Zaključak

Sojevi *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas stutzeri* ispoljili su sposobnost korišćenja dizela D-2 kao jedinog izvora ugljenika. Razlika između ova dva soja je u sposobnosti sinteze biosurfaktanata, koju je ispoljio samo soj *Pseudomonas* sp. Subinhibitorne koncentracije tobramicina i gentamicina stimulisale su biodegradaciju dizela kod ovog soja. Aminoglikozidi su kod *Pseudomonas* sp. stimulisali i sintezu biosurfaktanata, doveli do skraćenja lag faze rasta, intenzivirali porast broja ćelija u log fazi i indukovali nastanak biofilma. Ovakva bakterijska reakcija na aminoglikozide ukazuje da se oni u populaciji *Pseudomonas* sp. ponašaju kao signalni molekuli. Kod oba ispitivana aminoglikozida povećanje koncentracije sa 0.3125 na 0.625 $\mu\text{g/mL}$ indukovalo je intenzivniju reakciju bakterijske populacije. Tako je tobramicin doveo do većeg porasta broja ćelija a gentamicin do intenzivnijeg skraćenja lag faze u odnosu na kontrolu. Funkciju signala u bakterijskoj populaciji aminoglikozidi su izgubili u okviru najviše ispitivane koncentracije koja je ispoljila antibiotsko dejstvo.

Kinetika rasta soja *Pseudomonas* sp. povezana je sa kinetikom sinteze biosurfaktanata. Najintenzivnija sinteza biosurfaktanata odgovara periodu lag faze rasta. Ovo ukazuje na značaj biosurfaktanata u adaptaciji ispitivanog soja na uslove gde je dizel jedini izvor ugljenika. U grupama sa većim brojem ćelija detektovana je i veća koncentracija biosurfaktanata, dok njihova sinteza staje sa ulaskom bakterijske populacije u stacionarnu fazu rasta. Da bi se ova pojava objasnila neophodno je ustanoviti vezu kinetike produkcije biosurfaktanata i promene površinskog napona bakterijske suspenzije.

Kod soja *P. stutzeri* aminoglikozidi nisu stimulisali biodegradaciju dizela, verovatno zbog toga što ovaj soj nije sposoban da sintetiše biosurfaktante. Stoga je u budućim istraživanjima značajno ustanoviti da li je sposobnost sinteze biosurfaktanata odlika bakterijske populacije koja joj je neophodna da odgovori na aminoglikozidni signal. Moguće je i da je drugačija reakcija soja *P. stutzeri* na aminoglikozid posledica njegove veće antibiotske osetljivosti. Stoga je neophodno ispitati i efekat nižih koncentracija aminoglikozida na ovaj soj.

Izolat *Pseudomonas* sp. ispoljio je veliku efikasnost degradacije dizela (i do 82%) u kratkom vremenskom periodu (96 h inkubacije). Ovaj soj bi mogao naći primenu u postupcima bioremedijacije. Pre primene izolata u bioremedijaciji neophodno je ustanoviti na koje komponente razgrađuje dizel, kao i da li su te komponente netoksične. Veću efikasnost biodegradacije dizela ovaj soj je ispoljio usled formacije biofilma.

Stimulisan porast broja ćelija i sinteza biosurfaktanata u prisustvu aminoglikozida kod soja *Pseudomonas* sp. rezultovalo je efikasnijom

biorazgradnjom dizela. Ovakva stimulaciju mikrobne aktivnosti u bioreaktorima može se primeniti kao novi postupak u bioremedijacionim tehnologijama. Pre aplikacije takvog postupka neophodna su dodatna istraživanja. Osnovni problem sa ovom tehnologijom bila bi introdukcija antibiotika u tretirane uzorke zagađenog zemljišta ili vode. Na ovaj način povećava se rizik selekcije bakterijskih sojeva koji su rezistentni na antibiotike, kao i rizik introdukcije ovakvih sojeva u spoljašnju sredinu. Stoga bi se stimulacija mikrobne aktivnosti aminoglikozdom mogla primenjivati samo u bioreaktorima koji sprečavaju introdukciju apliciranog soja u tretirani uzorak (Fluidized bed ili Packed bed bioreaktori). Neophodno ispitati aktivnost soja *Pseudomonas* sp. u ovakvim bioreaktorima. Značajna tema budućih istraživanja je i pronalaženje novih signalnih molekula koji u bakterijskoj populaciji izazivaju pojačanu sintezu biosurfaktanata ili formaciju biofilma, jer ovakve reakcije bakterijske populacije dovode do intenzivnije biodegradacije dizela. Kao model za ovakve signalne molekule mogu poslužiti ovde ispitivani aminoglikozidi.

Zahvalnost. Ovo istraživanje realizovano je u saradnji sa katedrom za ekološku mikrobiologiju Poljoprivrednog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Najsrdačnije se zahvaljujem Dr Veri Raičević, redovnom profesoru i Dr Blaži Laleviću, docentu Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu na laboratorijskim uslovima koji su obezbedili za ovo istraživanje. Zahvaljujem se i:

- Budimiru Marjanoviću i firmi Centrohem na n-heksanu koji su donirali za ovo istraživanje;
- Ljiljani Stojanović i Galenika AD na doniranim uzorcima antibiotika;
- Jeleni Milić, Vladimiru Beškoskom i prof. dr. Miroslavu M. Vrvicu iz IHTM-Centra za hemiju na soju *Pseudomonas stutzeri* koji su donirali za ovo istraživanje;
- Mijatu Ugrinoviću, direktoru pogona za rerafinaciju rabljenog ulja u Rafineriji nafte Beograd, na uzorcima kontaminiranog zemljišta.

Literatura

- Buck A. C., Cooke M. E. 1969. The fate of ingested *Pseudomonas aeruginosa* in normal persons. *Journal of Medical Microbiology*, **2**: 521.
- Davies J., Spiegelman G., Yim G. 2006. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, **9**: 445.
- Drenkard E., Ausubel F. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, **146**: 740.
- Emtiazi G., Shakarami H. 2005. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*, **4** (2): 172.

- Fajardo A., Martinez J. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology*, **11**: 161.
- Hanel H., Raether W. 1988. A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*, **31**: 148.
- Hoffman L., D'Argenio D., MacCoss M., Zhang Z., Jones R., Miller S. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, **436**: 1171.
- Jemcević V., Đukić D. A. 2000. *Mikrobiologija*. Beograd: Vojnoizdavački zavod
- Klausen M., Aaes-Jorgensen A., Tolker-Nielsen T. 2003. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*, **50** (1): 61.
- Khan W., Bernier S., Kuchma S., Hammond J., Hasan F., O'Toole G. 2010. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms modulated by extracellular polysaccharide. *International Microbiology*, **13**: 207.
- Kievit T. 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, **11** (2): 279.
- Kritika S., Shalini R. 2009. Isolation of crude oil degrading marine bacteria and assessment for biosurfactant production. *The Internet Journal of Microbiology*, **7** (2), DOI: 10.5580/1d0e.
- Končarević M. R. 2009. Ispitivanje mikroorganizama producenata površinskih aktivnih supstanci izolovanih iz uzoraka zemljišta kontaminiranih naftom i naftnim derivatima. Diplomski rad. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Studentski trg 12-16, Beograd
- Kljujev I. 2006. Bakterijske populacije u rizosferi paradajza (*Lycopersicon Esulentum* Mill.). Magistarski rad. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Nemanjina 6, Zemun
- Kumara M., Leona V., Materano A. S., Ilzinsa O. A., Castroa I. G., Fuenmayora S. L. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. IR1. *Z. Naturforsch.*, **61**: 203.
- Knežević J., Simić D., 1997. *Metode u mikrobiologiji – prvi deo*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Lambert P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Jr. Soc. Med.*, **95** (41): 22.
- Linares J., Gustafsson I., Baquero F., Martínez J. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**: 19484.
- Leahy G. J., Colwell R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microb. Rev.*, **54** (3): 305.
- Milošević D. 1999. *Čovek, nafta i životna sredina*. Beograd: Publikum
- Meyer M., Roy V., Bentley W., Ghodssi R. 2011. Development and validation of a microfluidic reactor for biofilm monitoring via optical methods. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **21** (5) (#054023)
- Raičević V., Lalević B., Dabić D., Kiković D., Jovanović Lj., Nikšić M. 2007. Mikroorganizmi u remedijaciji zemljišta i voda. *Zaštita Materijala*, **2**: 49.

- Reller B., Schoenknecht M., Sherris K., Sherris J. 1974. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*: Selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media. *The Journal of Infectious Diseases*, **130** (5): 454-463.
- Rocha C., Pedregosa A., Laborda F. 2011. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *AMB Express.*, **1** (1): 9.
- Sivapathasekaran C., Mukherjee S., Sen R. 2010. Biosurfactant production and growth kinetics of bacteria in a designer marine medium: improved physiochemical properties. *Biotechnol. J.*, **5** (10): 1060.
- Singh R., Paul D., Jain R. 2006. Biofilms – implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, **14** (9): 389.
- US EPA 1999. Method 1664, Revision A: N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated N-Hexane Extractable Material (SGTHEM; Non-polar Material) by Extraction and Gravimetry. United States Office of Water, Washington.
- Ugrinov D., Stojanov A. 2010. Bioremediacija u tretmanu zagađenog zemljišta. *Zaštita materijala*, **4**: 237.
- Whanga L., Lui P., Maa C., Chenga S. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, **151** 1): 155.
- Youssefa N. H., Duncana K. E., Naglea D. P., Savagea K. N., Knappb R. M., McInerneya M. J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, **56** (3): 339.
- Zhang G., Wu Y., Qian X., Meng Q. 2005. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *J Zhejiang Univ. Sci. B.*, **6** (8): 725.
- Zhang Y., Miller R. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3276.

Iva Atanasković

Effect of Aminoglycoside Antibiotics on Growth, Biosurfactant Synthesis and Diesel Biodegradation in Genus *Pseudomonas*

A promising technology for dealing with oil hydrocarbons contamination is bioremediation, a process in which the contaminants are degraded by microbial activity. In bioremediation procedures bacteria from the genus *Pseudomonas* could be used (Ugrinov and Stojanov 2010). These bacteria adapt on oil hydrocarbons by production of biosurfactants. Biosurfactants are molecules that contain both hydrophobic and hydrophilic regions and enhance oil in water dispersion (Emtiazi and Shakarami 2005). Biosurfactant synthesis in genus *Pseudomonas* could be regulated

by aminoglycoside antibiotics. It is shown that sub-inhibitory concentrations of these antibiotics can act as signaling molecules in *Pseudomonas aeruginosa* populations, in which aminoglycoside tobramycin enhanced the expression of biosurfactant synthesis genes (Kievit 2009). The aim of this research was to find if aminoglycosides tobramycin and gentamicin can stimulate biosurfactant production and diesel biodegradation in genus *Pseudomonas*. To determine this, the effect of tobramycin and gentamicin sub-inhibitory concentrations on growth kinetics, biosurfactant synthesis kinetics and diesel biodegradation was studied. Effect of aminoglycosides was compared between two strains from genus *Pseudomonas*: *Pseudomonas* sp. that produces biosurfactants and *Pseudomonas stutzeri*, that's unable to produce them.

The strains were cultivated in shaking flask bioreactors (Zhang *et al.* 2005), in which different concentrations of tobramycin or gentamicin were added (0.3125, 0.625 and 1.25 $\mu\text{g/mL}$). The only carbon source in all bioreactors was diesel D-2. The growth kinetics was expressed via cell number and absorbance of the bacterial suspension (Knežević and Simić 1997). The biosurfactant synthesis was expressed via the clear zone diameter, which was obtained by the drop collapse test (Youssefa *et al.* 2004). After 96 h of incubation residual diesel was extracted by n-hexane (US EPA 1999), and the efficiency of biodegradation was determined according to the equation:

Efficiency of biodegradation = (beginning oil mass – residual oil mass) / beginning oil mass – abiotic losses (Kritika and Shalini 2009).

Aminoglycosides stimulated biosurfactant production in *Pseudomonas* sp. (Figure 3) in the range of sub-inhibitory concentrations (0.3125 and 0.625 $\mu\text{g/mL}$). These concentrations of both gentamicin and tobramycin also induced the formation of biofilm (Figure 4). The production of biosurfactants was most expressed during the lag phase and continues until the stationary phase. Aminoglycosides also induced changes in *Pseudomonas* sp. growth kinetics (Figure 5). The increase of tobramycin concentration induced a higher cell number in the log phase, while the increase of gentamicin concentration induced shortening of the lag phase. In higher concentrations aminoglycosides lost their role of signaling molecules and caused growth inhibition in *Pseudomonas* sp. Strain *P. stutzeri* did not react on the presence of aminoglycosides as *Pseudomonas* sp. (figures 6 and 7), which is related with its inability to produce biosurfactants. Stimulation of biofilm formation, increase of cell number and biosurfactant synthesis resulted in more efficient biodegradation of diesel in *Pseudomonas* sp. In a period of 96 h this strain degraded 82% of diesel (Figure 9), so it could find application in bioremediation of diesel polluted sites. Results presented in this paper suggest application of aminoglycosides for stimulating bioremediation processes.

