

***Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Sekonder Metabolitleri¹**

Dilşad Onbaşılı², Belma Aslım³

Özet

Mikrobiyal sekonder metabolitler, doğada birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedirler. Özellikle de *Pseudomonas* cinsine ait türler, polisakkaridler, antibiyotikler, enzimler, antijenler, antitümör ajanları ve zehirler v.s. gibi çok sayıda sekonder metabolit üretmektedirler. Ticari öneme sahip bu metabolitlerin çoğu tıp, eczacılık, kozmetik, gıda, tarım, çevre ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır.

Bu derlemede, *Pseudomonas* cinsi bakterilerin biyoteknolojik açıdan önemli olan bazı sekonder metabolitleri (ekzopolisakkarit-EPS, piyosiyenin ve rhamnolipidleri) hakkında bilgi verilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas*, sekonder metabolit, piyosiyenin, EPS ve rhamnolipid

GİRİŞ

Mikrobiyal sekonder metabolitler

Mikrobiyal sekonder metabolitler, üretilen kültürlerin gelişimi için önemli olmayan fakat insan sağlığı için çok önemli olan düşük moleküler ağırlıklı ürünlerdir (1). Mikroorganizmalar tarafından üretilen bu metabolitler biyolojik olarak aktif bileşiklerin zengin bir kaynağını sunarlar (2) ve birçok yönde insanlık için önemli olan enzimler, pigmentler ve antibiyotikleri içerirler (3). Doğada yaygın olarak bulunan birçok mikroorganizma ticari olarak önemli primer (aminoasit, proteinler, karbohidratlar, vitaminler, aseton, etanol, organik asitler v.s) ve sekonder metabolitler (antibiyotikler, toksinler, alkoloitler v.s) üretirler.

¹ Bu çalışma, 2006 yılında Prof. Dr. Belma Aslım danışmanlığında tamamlanan "Çevredeki bazı organik kirleticilerden biyoteknolojik olarak bazı ikincil metabolitlerin üretimi" adlı doktora tezinden düzenlenmiştir. ² Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji ABD, 38039, Kayseri. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: dilsad@erciyes.edu.tr; odilsad@gmail.com ³ Gazi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, 06830, Gölbaşı, Ankara- TÜRKİYE

Primer metabolitlerin mikrobiyal olarak üretimi, onların yaşam kalitesine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Ucuz karbon kaynakları üzerinde büyüyen mikroorganizmalar fermantasyon yoluyla, amino asitler, nükleotidler, organik asitler ve vitaminler gibi değerli ürünler üretebilir. (4). Primer metabolitler, bakteri gelişimine paralel olarak mikroorganizmanın gelişme fazının başlangıcında oluşurken, sekonder metabolitler, sıklıkla gelişme fazının sonuna doğru ya da durgun fazda sadece bazı mikroorganizmalar tarafından üretilir ve bakteri gelişimi ve üremesi için gerekli değildir (5). Sentez, kültür besiyerini oluşturan maddelerin konsantrasyonu ve tipi değiştirilerek etkilenebilir. Bu maddeler arasında karbon kaynaklarının etkisi, endüstri ve araştırma gruplarının her ikisi için sürekli bir çalışma konusu olmuştur (1).

Metabolitlerden sekonder metabolit denilen ikincil metabolitlerin birçoğu önemli metabolitler olup, endüstriyel alanda oldukça önem taşımaktadırlar. Sekonder metabolitlerin temel özellikleri;

-Sekonder metabolitler gelişme ve reproduksiyon için gerekli olmayan bir özelliktedirler.

-Sekonder metabolitler, ekstra büyüme şartlarında özellikle besiyerinin bileşimine bağlı olarak oluşur.

-Sekonder metabolitler, bir grup ile yakından ilişkili olarak sıklıkla üretilir. Örneğin, *Streptomyces*'in bir türünün tek bir suşun, 30'un üzerinde ürünle ilişkili olduğu bulunmuştur. Fakat bunlar, farklı antraksilin antibiyotikleridir.

-Sıklıkla sekonder metabolitlerin yüksek üretimi mümkün iken, genellikle primer metabolitlerin yüksek oranda üretilmeleri mümkün değildir (6).

Mikrobiyal sekonder metabolitler, günümüzde daha çok tarımda, endüstride ve sağlık alanında kullanılmaktadır (7). Genel olarak sıradışı yapılara sahiptirler ve oluşumları besinler, büyüme oranı, feedback kontrol, enzim aktivasyonu ve enzim indüksiyonu ile düzenlenmiştir. Sekonder metabolitlerin sentezi, kromozal DNA ve nadiren plasmid DNA daki genler tarafından kodlanmıştır. Primer metabolizmadan farklı olarak sekonder metabolizma süreçleri hala tam anlamıyla anlaşılabilir değildir. Bu yüzden sekonder metabolitler, enzimoloji, kontrol ve farklılaşma üzerine temel araştırmalar için fırsatlar sağlar.

Sekonder metabolizma besin, biyosentez, indükleyicilerin ilavesi ile veya gelişim oranındaki azalma ile ortaya çıkar (8). Birçok sayıda bakteri ve mantar sekonder metabolit adı verilen bu metabolizma atıkları üretmektedirler. Bugüne kadar sekonder metabolit üreten 2000'nin üzerinde bakteri karakterize edilmiştir. Mikroorganizmalar yardımı ile özellikle *Pseudomonas* cinsine ait türlerden polisakkaridler, antibiyotikler, enzimler, antijenler, ve zehirler gibi çok sayıda sekonder metabolit üretilmektedir (9, 10). Endüstride, sekonder metabolitler daha kararlı ürün oluşturduğu ve daha az enerji gerektirdiği için tercih edilmekle birlikte (8), bu metabolitlerin seçiminde, suşların endüstriyel önemleri ve yüksek üretim kapasiteleride önemli olmaktadır. Antibiyotik ve diğer sekonder metabolitler mikroorganizmaların ticari önemini artırmaktadır (11).

Piyosiyenin

Antibiyotikler, biyolojik kökenli ve düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen bazı mikroorganizmaların ürettiği sekonder metabolitlerdir. Genelde engelleyici ve öldürücü etkilere sahiptirler. Antibiyotik oluşturma yeteneği genelde; *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium Actinomyces* grubuna giren mantarlarda ve bazı bakterilerde vardır (9, 10). Son yıllarda, sürekli olarak, etki alanı geniş ve güçlü antibiyotikler üreten, yeni mikroorganizma tiplerinin araştırılması önem kazanmıştır (12).

Pseudomonas spp.'lerden metabolitlerin tedavi amaçlı kullanımındaki araştırmalar ilk kez 80 yıl öncesine dayanmaktadır ve ilk olarak enzimatik aktivite gösteren Piyosiyenaz olarak isimlendirilen bir ilacın varlığıyla bildirilmiştir. Bu ilaç diftera, influenza ve menenjit tedavisinde kullanılmıştır. Fakat bugün klinik kullanımı bırakılmıştır. *Pseudomonas* spp.'lerden elde edilen antimikrobiyal maddelerin sadece 3 tanesi tıbbi olarak faydalı bulunarak (piyosiyenin, piyrolnitrit ve pseudomonik asit) ticari olarak üretilmiş (13) ve pratik uygulamalarda kullanılmıştır. Bu amaçla *Pseudomonas* spp.'lerden piyosiyenin üretimi birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve bu çalışmalar fluoresens *Pseudomonas* spp.'lerin temsilcilerinden özellikle de besiyeri içerisinde mavi-yeşil piyosiyenin pigmentini üreten *P. aeruginosa* ile yürütülmüştür.

Fenazin ve piyrolnitrit sentezinin haricinde sekonder metabolizmanın biyosentezi, genetiği ve regülasyonu hakkındaki mevcut bilgiler çok azdır. Yinede *Pseudomonas* spp.'lerin biyokimyası ve genetiği üzerine yapılan araştırmalara sekonder metabolitler ile ilgili olan araştırmaların katılması, sekonder metabolizmanın aydınlatılması açısından önemli olmuştur. Son yıllardaki çalışmalar, yabani tip *Pseudomonas*'ların pigmentlerinin, bu *Pseudomonas*'ların pigment oluşturmayan mutant suşları arasındaki gelişim ve rekabetine odaklanmış ve pigment oluşturan yabani tip *Pseudomonas*'ların mutantlarına göre çevrede canlı kalabilme şansının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (11).

Pseudomonas cinsi bakterilerin ürettiği pigmentlerin tedavi amaçlı antibiyotik olarak kullanımının yanı sıra bu bakterilerin ürettiği antibiyotik benzeri fenazin (14) ve sideroforlar (10) gibi antimikrobiyal maddelerin de birçok kök patojeninin baskılanmasında rol aldığı belirlenmiştir. Bundan dolayı antibiyotik üreten *Pseudomonas*'ların etkin bir biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı ön görülmektedir (15). Ayrıca bazı araştırmacılar tarafından organik bileşiklerle kirlenmiş alanlardan izole edilen *Pseudomonas* cinsine ait türlerin çevresel önemine dikkat çekilmiş ve bu ortamda ki rekabet ve canlılıkları için bir takım metabolitler ürettikleri ve *P. aeruginosa*'nın doğal çevrelerde uzun süreli canlı kalabilmesinin tamamen sekonder metabolizmalarına bağlı olduğu bildirilmiştir (16).

Ekzopolisakkarit (EPS)

Biyoteknolojik uygulamalarda önemli olan antibiyotiklerin yanı sıra, son yıllarda mikrobiyal ekzopolisakkaritler (EPS)'de birçok alanda kullanılmaktadır. EPS'ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler (17). EPS'ler glikozid bağları ile birbirine bağlı olan şeker ünitelerinden oluşmaktadır. Bakteriyel EPS'lerin çoğunluğu düzenli oligosakkaridlerin tekrarlanan birimlerinden oluşmuş heteropolisakkarid yapıda, bazı bakteriyel EPS'ler ise tek tip şekerden

meydana gelen bir homopolisakkarid yapıdadır. Ayrıca polisakkaridler hidrofilik özellik taşıyarak birlikte çoğu polimerler lipofilik, hidrofilik ve biyofilm yapısında olabilen heterojenlerdir (17- 20).

Son yıllarda yeni mikrobiyal EPS'lerin araştırmasına büyük önem verilmiş, mikroorganizmaların birçoğunun değişen kompozisyonlarda ekzopolisakkarit ürettikleri rapor edilmiştir (19, 21, 22). Mikrobiyal EPS'lerin, birçok bakteri ve maya cinsleri tarafından üretildikleri ve bu ürünlerin karbon kaynakları için yarışan metabolitler oldukları bildirilmektedir (19, 23). EPS'ler toprak, deniz, tatlı su gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, *Bacillus*'lar, *Pseudomonas*'lar, *Lactobacillus*'lar ve *Azotobacter*'ler gibi daha birçok bakteri tarafından sentezlenmektedir (19). Bitki patojeni olan cinslerin birçoğu (*Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Ralstonia* ve *Xanthomonas*) EPS üretimi gerçekleştirebilen bakterilerdir (24). Yine *Xanthomonas campestris* tarafından ksantan zımkı, *Sphingomonas paucimobilis* tarafından gellan, *Pseudomonas* türleri ve *Acetobacter chorococcum* tarafında alginatlar, *Acetobacter xylinium* bakterisi tarafından bakteriyal selülozlar, *Streptococcus equii* tarafından hiyaluronik asit ve *Rhizobium* tarafından süksinoglikan sentezlenmektedir (19, 21, 22). Alginat, amilovorana, selüloz, levan, marginalan, stevartan, süksinoglikan ve ksantan zımkının tam yapıları bilinmektedir. Bu EPS'ler genellikle endüstriyel amaçla üretilir ve ticari olarak gıda sanayisinde ve diğer bazı alanlarda kullanılmaktadır (19, 25).

EPS'ler bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadır. Mikroorganizmayı veya ortamı kurumaya karşı korur, zararlı bir ortamdan uzaklaştırır (26, 27). EPS, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sarmakta ve olası tehlikelere karşı onları korumaktadır. EPS'nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere karşıda fiziksel bir koruyuculuk şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Ortamdaki metalik iyonların tutulmasını sağlarlar ayrıca bitki, insan ve hayvan patojenlerinin ürettikleri EPS'lerin virulans faktörler oldukları da bilinmektedir (18, 28).

EPS'ler yeni işlevsellikleri ile pek çok ilginç fiziki, kimyasal ve reholojikal (maddenin sıvı halindeki özellikleri) özelliklerinden dolayı yeni biyomateryallerdir ve tekstil, deterjan, yapıştırıcı, mikrobiyal olarak zenginleştirilmiş petrol iyileştirmeleri (NEOR), atık su iyileştirmeleri, dere yatağı temizlemeleri, mayalanma, akarsu işleme sürecinde, kozmetik, tıp, eczacılık ve gıda katkı maddesi olarak oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler (29-31). Ayrıca biyofilm özelliği gösteren EPS'ler bakteriyi deterjanlara ve antibiyotiklere karşı dirençli hale getirirler (32-36). Yine biyofilm bakteriyi yalnızca dış ortamdan koruyarak yaşayabilmesi için değil aynı zamanda genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişiminde de daha iyi ortamlar hazırlamaktadır (37). Bu polimerler sadece bakteriyi saran bir biyofilm tabakası olarak fonksiyon göstermeyip ticari amaçla da kullanılmaktadır. EPS'ler aynı zamanda anti-tümör (38), antivirüs, ve ateş düşürücü etmen olarak, ilaç sanayisinde de kaplama materyali olarak pek çok fizyolojik aktivitelere katkıda bulunurlar ayrıca interferon, trombosit yığınları birikmesi ve faktör sentezlerini uyaran koloniler için teşvik edici olarak kullanılırlar. Dekstran-demir kompleksi anemi vakalarında, dekstran-kalsiyum kompleksi ise hayvan beslemede hipokalsemi tedavisinde kullanılır. Ağ yapılı sephadeks dekstranlar ise, biyolojik maddelerin saflaştırılması ve fraksiyonlara ayrılmasında devreye girerler (17, 21). Yapılan çalışmalar sonucunda EPS'lerin bağırsak florasını düzenlediği, kolesterolü düşürdüğü ve antiülser

aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (20, 23). Aynı zamanda kimya alanında inceltici olarak ve farmokolojinin birçok alanında da EPS'den yararlanılmaktadır (19).

Son araştırmalarla, *Pseudomonas* spp. tarafından üretilen ekzopolimerlerin ve biofilmlerin de çevresel önemine dikkat çekilmektedir. EPS'nin yüzey ve ara yüzey gerilimini azaltarak kirli alanların temizlenmesi (biyoremediasyonu) ve birçok endüstriyel uygulamalarda kullanılan biyoemülsülfeye aktivitesi ve (39) buna ilaveten topraktaki organik bileşiklerin ortadan kaldırılması için, bu bileşikleri parçalayan ve eriten, biyoremediasyonda kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (40).

Ramnolipid

Pseudomonas cinsi bakterilerin ürettiği bir diğer sekonder metabolit olan biyosürefektanlar da biyoteknolojik açıdan önemli birçok alanda (gıda sanayi, tıp, kozmetik, çevre teknolojileri, tarım gibi) kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyosürefektanlar bileşiklerin parçalanması ve emülsifikasyonu artırmaya yardım eder. Biyoemülsifiyerler ticari olarak petrolle kirlenmiş toprak ve suların biyoremediasyonunda, petrol iyileşimini artırmaya yönelik, petrolle kirli boruların temizlenmesi için kullanılan klorlu çözücülerin yerine kullanılabilir (41).

Birçok mikroorganizma farklı kimyasal özellikte ve moleküler ağırlıkta biyosürefektanlar üretmektedirler. Biyosürefektanların sınıflandırılması farklı şekillerde yapılmaktadır. Çoğunlukla kimyasal kompozisyon ve mikrobiyal orijinlerine göre sınıflandırılır. Genelde yapılarında peptit veya amino asitlerin oluşturduğu yarı hidrofilik mono, di veya polisakkaritler; doymuş veya doymamış yağ asitlerinden oluşan yarı hidrofobik bileşiklerdir. Biyosürefektanlar; glikolipidler, lipopeptitler ve lipoproteinler, fosfolipidler ve yağ asitleri ile polimerik ve partiküler biyosürefektanlar şeklinde 5 sınıfta ele alınır (42). Bazı durumlarda biyosürefektanlar düşük molekül ağırlıklı moleküller ve yüksek moleküler ağırlıklı polimerler şeklinde de sınıflandırılmaktadırlar. Düşük molekül ağırlıklı biyosürefektanlar genelde glikolipid veya lipopeptid yapısındadır. Yüksek molekül ağırlıklı biyosürefektanlar ise amfipatik polisakkaritler, proteinler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler veya biyopolimerlerin kompleks karışımlarıdır (42-44). Biyosürefektanların etkinliğinin içerdiği yapıların farklılığına bağlı olarak değiştiği belirtilmektedir (45).

Pseudomonas cinsi bakterilerin biyosürefektan üretimleri bildirilmiştir (46). Biyosürefektanların en fazla çalışılan ve en iyi bilinen çeşidi *Pseudomonas aeruginosa* türleri tarafından üretilen glikolipid yapısındaki ramnolipid biyosürefektanlarıdır. Ramnolipidler de ekzopolisakkaritler (EPS) gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen ve üreticilerine çeşitli avantajlar sağlayan şeker içerikli polimerlerdir (39, 47, 48). Ramnolipidlerin mikrobiyal üremenin gelişme, durgun ve ölüm fazlarında sentezlendiği belirtilmektedir (49). Bunlar, hücre duvarının yapısında buldukları zaman hidrokarbonlu bileşikleri periplazmik yüzeye penetrasyonunu kolaylaştırmaları, ekstraselular olarak salındıklarında ise hidrokarbonlu bileşikleri emülsifiye etmeleri ile özellikle çevre kirliliğinin kontrolünde önemli rol alan biyosürefektanlardır (50). Ramnolipid biyosürefektanları, kontamine olmuş bölgelerde kirlenmeyi azaltan maddelere, terminal elektron tutuculara veya besin ve diğer temizleyici maddelere ilave edilerek kirlenici maddelerin parçalanmasını arttıran ve çevrenin kendi kendisini yenilemesini sağlayan bileşikler olduğu belirtilmiştir (51). Ayrıca organik bileşiklerle

kirletilmiş topraklarda ramnolipid biyosürefektanların eklenmesinin biyolojik parçalanmayı arttırması ile ilgili de çalışmalar bulunmaktadır (41, 52).

Ramnolipidin 4 tipi vardır. Bunlardan tip I ve tip II ağır metal giderimi ve toprak yıkamaları için, tip III kağıt ve kağıt hamuru sanayinde, metal sanayinde, deri sanayinde ve yağlayıcı alanlarında uygulanabilir. Tip 4 ise genellikle tekstil sanayin, temizlik alanında, besin sanayi, boya sanayi, mürekkeplerde, kişisel bakım ürünlerinde, zirai uygulamalarda ve suyun işlenmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır (53).

Bakterilerin hücre duvarındaki hidrofobik bileşiklerle ortamdaki hidrokarbonlu bileşiklere bağlanmaları arasında sıkı bir ilişkinin olduğu bilinmektedir. Zhang ve Miller (1995) ile Rahman ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmalarının sonuçlarına göre, hidrokarbonlu bileşiklerin ramnolipidlerce tutulabileceğini ve tekrar kullanılabilceğini belirtmişlerdir (52, 54). Petrol ve hidrokarbon biyodegradasyonunda önemli bir rol oynayan biyosürefektanların, biyoremidasyon uygulamaları içinde potansiyel bir madde olduğu bildirilmiştir (50, 55-61).

SONUÇ

Günümüzde mikroorganizmalar, doğal kaynakların azalması nedeniyle birçok üretim alanı için potansiyel olarak görülmekte ve mikrobiyal ürünlerin eldesi ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı ürünlerin ekonomik olmaları, mevsimsel ve potansiyel kısıtlamalara bağlı kalmamaları onları endüstriyel üretim açısından avantajlı kılmaktadır. Endüstriyel amaçlı kullanılacak olan mikroorganizmaların özellikle de *Pseudomonas*'ların sekonder metabolitleri, biyoteknolojik açıdan önemli bir doğal kaynak olabilmekte ve kontrollü koşullar yaratıldığında üretim artmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., Rocha, D., Sánchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*. 36 (2), 146-67.
2. Fakhouri, W., Walker, F., Vogler, B., Armbruster, W., Buchenauer, H. (2001). Isolation and identification of *N*-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry*. 58, 1297-1303.
3. Giri, A.V., Anandkumar, N. Muthukumar, G., Pennathur, G.A. (2004). Novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*. 4, 11.
4. Demain, A.L. (1980). Microbial production of primary metabolites. *Naturwissenschaften*. 67, 582-587.
5. Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G.P.C., Bycroft, B.W., Lazdunski, A., Stewart, G.S.A.B., Williams, P. (1995). Multiple *N*-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 9427-9431.

6. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J., Brock. (2003). Chapter 12 & Chapter 30: Biology of Organisms. Tenth Edition, (416-444) & (966-972).
7. Robinson, T., Singh, D., Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55, 284-289.
8. Demain, A.L. (1998). Induction of secondary metabolism. *International Microbiology*. 1, 259-264.
9. Schlegel, H. (1992). Produktion Sekundärer Metabolite. *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg-Thieme Verlag. 362-371.
10. Demain, A.L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 52: 455-463
11. Leisinger, T., Margraff, R. (1979). Secondary Metabolites of The Fluorescent Pseudomonads. *Microbiological Reviews*. 43, 422-442.
12. Norman, R.S., Moeller, P., McDonald, T.J., Morris, P.J. (2004). Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 4004-4011.
13. King, E.O., Ward, W.K., Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 44, 301-307.
14. Mandelbaum, R.T., Allan, D.L., Wackett, L.P. (1995). Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. 61,1451–1457.
15. Budzikiewicz, H. (1993). Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Revs.* 104, 209-228.
16. Weinberg, E.D. (1971). Secondary Metabolism: raison d'être. *Perspect. Biology and Medicine*. 14, 565-577.
17. Calazans, G.M.T., Lopes, C.E., Lima, R.M.O.C., de Franc, F.P. (1997). Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strains. *Biotechnology Letters*. 19, 19-21.
18. Gugliandola, C., Maugeri, T.L., Cacamo, D., Stackebrandt, E. (2003). *Bacillusaeolius* sp. Nov a Novel Thermophilic, Holophilic Marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy). *Systematic and Applied Microbiology*. 26 (2), 172-176.
19. Lee, I.Y., Seo, W.T., Kim, G.J., Kim, M.K., Ahn, S.G., Kwon, G.S., Park, Y.H. (1997). Optimization of Fermentation Conditions for Production of Exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 16 (2), 71-75.
20. Kenne, L., Lindberg, B., (1983). The Polysaccharides. In Aspinall, G.O., editors, vol. 2, Academic Press, New York, 287-363.
21. Margaritis, A., Pace, G.W. (1985). Microbial Polysaccharides. In: Blanch, H.W., Drew, S., Wang, D.I.C., editors, *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. The Practice of Biotechnology: Current Commodity Products. Oxford: Pergamon Press,. 1005-1044.
22. Sutherland, I.W. (1996). Extracellular Polysaccharides. In: Rehm, H.J., Reed, G., editors. *Biotechnology*, Weinheim VCH., 6, 615-57.

23. Tavernier, P., Portais, J.C., Nava, Saucedo J.E., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N. (1997). Exopolysaccharide and Poly- β -Hydroxybutyrate Coproduction in two *Rhizobium Meliloti* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 21-26.
24. Fett, W.F. (1993). Bacterial Exopolysaccharides their Nature Regulation and Role in Host-Pathogen Interactions. *Current Topics in Botanical Research*, 1, 367-390.
25. Sutherland, I.W., (1993). *Xanthomonas*, In: Swings, J.G. Civerolo, E.L., eds., Chapman & Hall, London, 363-388.
26. Moriello, V.S., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T.L., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (2003). Production of Exopolysaccharides from a Thermophilic Microorganism Isolated from a Marine Hot Spring in Flegrean Areas. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30 (2), 95-101.
27. Ophir, T., Gutnick, D.L. (1994). A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 740-745.
28. Denny, T.P. (1995). Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis, *Annual Review of Phytopathology*. 33, 173-197.
29. Yalpani, M., Sandford, P.A. (1987). Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. In: Yalpani, M., editor, *Industrial Polysaccharides Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 311-35.
30. Sutherland, I.W. (1998). Novel and Established Applications of Microbial Polysaccharides. *Trends in Biotechnology*. 16, 41-46.
31. Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., Lelpie, L. (1998). Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical/Genetic Perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50, 145-152.
32. Wolfaardt, G., Lawrence, J., Robarts, R., Caldwell, S., Caldwell, D. (1994). Multicellular Organization in a Degradative Biofilm Community. *Applied and Environmental Microbiology*. 60, 434-446.
33. Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., Lappin-Scott, H. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49, 711-745.
34. Davey, M., O'Tool, G. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64, 847-867.
35. Stewart, P., Costerton, J. W. (2001). Antibiotic Resistance in Biofilms. *Lancet*. 358, 135-138.
36. Krylova, T., Popova, L., Pechurkin, N., Kashperova, T., Belyavskaya, V. (2000). Population Heterogeneity of Plasmidbearing and Plasmid-Free *Bacillus subtilis* Strains Under Different Environmental Conditions. *Microbiologia*, 69, 220-224.
37. Moller, S., Sternberg, C., Andersen, J., Christensen, B., Ramos, J., Givskov, M., Molin, S. (1998). Insituexpression in Mixed-Culture Biofilms: Evidence of Metabolic Interactions Between Community Members. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 721-732.
38. Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., Yamaguchi, T. (1991). Antitumoral Activity of Slime-Forming, Encapsulated *Lactococcus lactis* subsp.

cremoris Isolated from Scandinavian Ropy Sour Milk, viili. Animal Science Technology. 62, 277-283.

39. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F., Porcel, J., Quesada E. (2002). Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. Applied Microbiology and Biotechnology. 60, 347-351.

40. Tortora, G. J. (1991). Microbiology: An introduction, The Benjamin Cummings Publishings Company, California, p., 217-276.

41. Herman, D.C., Zhang, Y., Miller, R.M. (1997). Rhamnolipid (Biosurfactant) Effects on Cell Aggregation and Biodegradation of Residual Hexadecane Under Saturated Flow Conditions. Applied and Environmental Microbiology. 63, 3622-3627.

42. Maneerat, S. (2005b). Biosurfactants from marine microorganisms. Songklanakarin. Journal of Science and Technology. 27 (6), 1263-1272.

43. Desai, J.D., Banat, I.M., (1997). Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. American Society for Microbiology, 61, 47–64.

44. Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000). Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology. 53, 495-508.

45. Youssef, N.H., Duncan, K.E., McInerney, M.J. (2005). Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. Applied and Environmental Microbiology. 711 (2), 7690-7695.

46. Raza, Z.A., Khan, M.S., Khalid, Z.M., Rehman, A. (2006). Production of Biosurfactant Using Different Hydrocarbons by *Pseudomonas aeruginosa* EBN-8 Mutant. Zeitschrift für Naturforschung. 61c, 87-94.

47. Moraes, I.O., Benincasa, M., Alegre, R.M. (2002). Production and characterization of rhamnolipids produced by a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Brazilian Journal of Food Technology. 5, 145-149. 60

48. Rocha, M.V.P., Oliveira, A.H.S., Souza, M.C.M., Gonçalves, L.R.B. (2006). Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22, 1295–1299. 61

49. Guerra-Santos, L.H., Käppeli O., Fiechter A. (1986). Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Applied Microbiology and Biotechnology. 24, 443–448.

50. Patel, R.M., Desai, A.J. (1997). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. Letters in Appl. Microbiology. 25, 91-94.

51. Bonilla, M., Olivaro, C., Corona, M., Vazquez, A., Soubes, M. (2005). Production and Characterization of A New Bioemulsifier From *Pseudomonas putida* ML2. Journal of Applied Microbiology. 98, 456-463.

52. Zhang, Y., Miller, R.M. (1995). Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n-Alkanes. Applied and Environmental Microbiology. 61, 2247-2251.

53. Azma, B.D. (2002). Extraction of copper from minning residues by rhamnolipids, Master Thesis, Concordia University, Montreal, Quebec, Canada.

54. Rahman, K.S., Banat, I.M., Thahira, J., Thayumanavant., Lakshmanaperumalsamy P. (2002). Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology*. 81(1), 25-32.
55. Makkar, R.S., Rockne, K.J. (2003). Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22 (10), 2280-2292.
56. Wong, J.W.C., Fang, M., Zhao, Z., Xing, B. (2004). Effect of surfactants on solubilization and degradation of phenanthrene under thermophilic conditions. *J. Environmental Quality*. 33 (6), 2015-2025.
57. Guo-liang, Z., Yue-ting, W., Xin-ping, Q., Qin, M. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B (8), 725-730.
58. Zhang, G., Wu, Y., Qian, X., Meng, Q. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science*, 6B (8), 725-730.
59. Kumar, M., Leon, V., Materano, A.D.S., Ilzins, O.A. (2006). Enhancement of oil degradation by co-culture, of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. *Polish of Microbiology*, 55 (2), 139-146.
60. Song, R., Hua, Z., Li, H., Chen, J. (2006). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by two *Pseudomonas aeruginosa* strains with different uptake modes. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 41, 733–748.
61. Jarvis, F.G., Johnson, M.J., (1949). A glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*. 71, 4124-4126.