

# *Detection and identification of mucus-producing bacteria: producers of biopolymers*

Article

Published Version

Zhuniszhan, A. Z., Berzhanova, R. Z., Abay, G. K., Khutoryansky, V. V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7221-2630>, Rakhmetova, T. T., Mukash, A. A., Zhumagalikyzy, A., Kumargazhinova, A. A., Seksenbayev, A. and Mukasheva, T. D. (2024) Detection and identification of mucus-producing bacteria: producers of biopolymers. *Microbiology and Virology*, 3 (46). pp. 161-180. ISSN 3005-222X doi: <https://doi.org/10.53729/mv-as.2024.03.09> Available at <https://centaur.reading.ac.uk/119609/>

It is advisable to refer to the publisher's version if you intend to cite from the work. See [Guidance on citing](#).

Identification Number/DOI: <https://doi.org/10.53729/mv-as.2024.03.09>  
<<https://doi.org/10.53729/mv-as.2024.03.09>>

Publisher: Research and Production Center for Microbiology and Virology

All outputs in CentAUR are protected by Intellectual Property Rights law, including copyright law. Copyright and IPR is retained by the creators or other copyright holders. Terms and conditions for use of this material are defined in the [End User Agreement](#).

[www.reading.ac.uk/centaur](http://www.reading.ac.uk/centaur)

**CentAUR**

Central Archive at the University of Reading

Reading's research outputs online

IRSTI: 34.27.17

A.Zh. ZHUNISZHAN<sup>1</sup>, R.Zh. BERZHANOVA<sup>1\*</sup>, G.K. ABAY<sup>2</sup>, V.V. KHUTORYANSKY<sup>3</sup>,  
T.T. RAKHMETOVA<sup>1</sup>, A.A. MUKASH<sup>1</sup>, A.A. KUMARGAZHINOVA<sup>1</sup>,  
A. SEKSENBAYEV<sup>1</sup>, T.D. MUKASHEVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

<sup>2</sup>LLP «BioClean», Almaty, Kazakhstan

<sup>3</sup>School of Pharmacy, University of Reading, UK

\*e-mail: ramza05@mail.ru

## DETECTION AND IDENTIFICATION OF MUCUS-PRODUCING BACTERIA: PRODUCERS OF BIOPOLYMERS

doi:10.53729/MV-AS.2024.03.09

### Abstract

The paper reports on the detection and isolation of mucus-forming microorganisms from soil samples, rhizosphere and plant tissue growing in the foothill and foothill plains of the Zailiyskiy Alatau, belonging to the families *Lamiaceae*, *Didymochlaenaceae* and *Compositae*. 232 isolates were used in this work: 216 of them were mucus-forming isolates and 16 were isolated from oil-contaminated soil samples. A high percentage of mucus-forming bacteria has been isolated from the soil, rhizosphere and roots of peppermint plants (*Mentha piperita*). Screening methods for assessing the ability of microorganisms to produce mucus on various media, by visual observation of the phenotypic characteristics of colonies (mucous or mucoid), relative viscosity and density of the culture fluid. It was found that the highest percentage of colonies with a viscous phenotype among mucus-forming bacteria was observed on dishes with YPG and YM media. From 232, 9 viscous/mucoid isolates were selected: MRK, FRK, TRK8, TRK27, PRK4, MEK33, PRK13, MEK9 and PEK1, characterized by the highest mucus yield, with higher relative viscosity values from 38.8±7.1% to 40.1 ±6.4% and the density of the culture fluid in various media is 4.9001 - 5.0001 g/cm<sup>3</sup>.

**Keywords:** mucus-forming microorganisms, soil, rhizosphere, viscosity, mucoid.

Among biomolecules, bacterial polymers such as exopolysaccharides (EPS) have emerged as innovative materials of industrial importance. Bacterial polymers are highly diverse in structure and composition; their thickening, stabilizing, gelling and/or emulsifying properties are used in food, pharmaceutical, medical industries and agricultural technologies [1].

Many microorganisms are capable of synthesizing polymers: bacteria, algae, yeast, and, to a lesser extent, microscopic fungi [2, 3]. Bacteria that synthesize microbial biopolymers include *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Sphingomonas*, *Aureomonas*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Zymomonas*, *Aureobasidium*, *Acetobacter*, *Mucorales*, *Achromobacter*, etc. Bacterial polymers constitute a significant portion of the extracellular substances surrounding cells in microbial communities.

Interest in mucus-forming bacteria that synthesize exopolymers is due to the fact that biopolymers with unique functional properties are required to form highly viscous solutions, to produce emulsifying and surfactants with immunomodulatory, anti-inflammatory and bactericidal properties. The mucous phenotype of microorganisms is an important adaptive defense reaction of bacteria to the environment. It is known that the viability of mucus-forming bacteria in various ecosystems is often associated with their ability to synthesize a complex of substances with emulsifying and surfactant properties [4].

The purpose of this research was to study mucus-forming microorganisms isolated from soil samples, rhizosphere and plant tissue as promising producers of biopolymers.

## Materials and methods of research

### Objects of research

The objects for isolating and studying mucus-producing microorganisms were: soils on which plants grew; rhizosphere and plant roots. For the experiments, specimens of seven different species of higher plants were taken: peppermint (*Mentha piperita*) and lemon balm (*Melissa officinalis*), common bracken (*Pteridium aquilinum*), small-flowered yarrow (*Achillea micrantha Willd*) and white-earth wormwood (*Artemisia terae-albae Krasch*), great plantain (*Plantago major*), stinging nettle (*Urtica Dioica L.*), tansy phacelia (*Phacelia tanacetifolia*) (Figure 1).

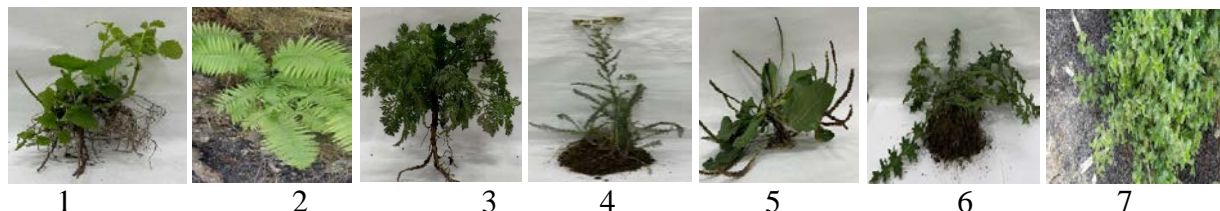


Figure 1 -Plant objects for isolating isolates of mucus-forming microorganisms (1 - peppermint (*Mentha piperita*); 2 - bracken (*Pteridium aquilinum*); 3 - lemon balm (*Melissa officinalis*); 4 - small-flowered yarrow (*Achillea micrantha Willd*); 4 - white-earth wormwood (*Artemisia terae-albae Krasch*), 5 – large plantain (*Plantago major*); 6 – stinging nettle (*Urtica Dioica L.*), 7 – tansy phacelia (*Phacelia tanacetifolia*))

In this work we used 16 isolates isolated from oil-contaminated soil samples from Zaburye, Dossor and S. Balgimbaev fields, which were tested for their ability to grow on crude Balgimbaev oil, which were tested for their ability to grow on crude oil.

### Nutrient media

For experiments and maintenance of microorganisms we used standard nutrient media of the following manufacturers: "Haimedia", "Labhim": LB (Luria-Bertani), YM and YPG, composition glucose -20 g, yeast extract - 3 g, peptone - 5 g, agar - 20 g, pH 7.0 (g/L tap water) [5].

### Methods

Determination of the number of microorganisms in the soil and isolation of microorganisms with mucous morphotype were carried out by the traditional method. The number of bacteria was estimated on different nutrient media [6].

Determination of bacterial abundance and their isolation from the rhizosphere of plants. The bacterial population in the rhizosphere was counted according to the generally accepted method by sowing the suspension on agarized nutrient media [7].

Determination of the number of endophytic bacteria and their isolation from plant roots. Determination of the number of endophytic microorganisms in plant tissues and roots according to the method described in reference [8].

Phenotypic characterization of mucus-forming microorganisms. Mucus-forming isolates were phenotypically characterized based on colony morphology, cell morphology, and Gram's reaction [9, 10, 11].

Mucus production and its evaluation. Mucus-forming isolates were selected based on their ability to form mucus colonies on the surface of an agar nutrient medium [12]. Mucus-forming colonies were assessed by mucus viscosity, stickiness, and colony size, covering a large surface of the agar nutrient medium. Colonies of the mucoid phenotype were moist, with a raised surface.

When growing isolates in a liquid medium, the viscosity of the medium was determined using a glass viscometer with a capillary diameter of 0.82 mm, according to the viscometer instructions. Then, the flow time of the culture liquids was measured, and the viscosity of the liquid was calculated using the formula:

$$V = \frac{g}{9.807} * T * K$$

Where  $g$ -is the acceleration of gravity at the measurement location in  $m/s^2$ ,  $K$ -is the viscometer constant,  $mm^2/s^2$ ,  $V$ -kinematic viscosity of the liquid,  $mm^2/s$ ,  $T$ -is the time of fluid flow, s.

The density of the culture liquid was assessed using a pycnometer according to GOST 3900-85. The density of the viscous culture fluid was determined by using a pipette with an adjustable volume to take 5000  $\mu L$  of the culture fluid, transfer it to a watch glass, weigh it, and calculate the density [13].

Statistical analysis was performed using RStudio software (version 2022.07.2+576 “Spotted Wakerobin”, RStudio PBC, 2022). Data were assessed using ANOVA followed by pairwise comparisons of Tukey Honestly Significant Difference. Statistical significance is declared at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

The microbial population of soils, rhizosphere and plant tissues is an inexhaustible source for the isolation of unique mucus-forming microorganisms - producers of exopolysaccharides. Therefore, mucus-forming bacteria were isolated from the soil, rhizosphere and plant tissues growing in the foothill and foothill plains of the Trans-Ili Alatau (Figure 1).

Studies have shown that the soil microbial community under plants is characterized by a high density. The number of microorganisms was calculated using the traditional method per 1 g of soil. Data on recording the number of soil and mucus-forming bacteria are presented in Table 1. It was established that the maximum number of soil bacteria is observed from under the small-flowered yarrow plant (*Achillea micrantha* Willd) on all determined organic media and their number ranged from  $21.5 \pm 1.8 \times 10^4$  to  $153.8 \pm 15.2 \times 10^4$  CFU/g soil, and the number of mucus-forming bacteria was one or two orders of magnitude less and amounted to  $10.3 \pm 0.5 \times 10^3$  CFU/g soil. The number of mucous bacteria was approximately the same for soil samples taken from under plants and ranged from  $10.8 \pm 0.9 \times 10^3$  to  $20.3 \pm 1.6 \times 10^3$  CFU/g soil. The largest number of bacteria with different morphotypes of colonies forming mucus was noted in the soil from under the plant Peppermint (*Mentha piperita*) and ranged from  $10.8 \pm 0.9 \times 10^3$  to  $10.7 \pm 3.6 \times 10^3$  CFU/ g soil.

Table 1 - The number of microorganisms in soil samples taken under the plants

Plants	Total number of bacteria, $\times 10^4$ CFU/g soil			Number of mucus-forming bacteria, $\times 10^3$ CFU/g soil		
	Nutrient media					
	YPG	YM	LB	YPG	YM	LB
<i>Peppermint</i>	22,1 $\pm$ 2,1	15,7 $\pm$ 1,5	38,4 $\pm$ 2,4	10,8 $\pm$ 0,9	20,3 $\pm$ 1,6	12,1 $\pm$ 0,9
<i>Big plantain</i>	22,4 $\pm$ 2,1	25,5 $\pm$ 2,6	33,7 $\pm$ 3,4	11,5 $\pm$ 0,7	21,7 $\pm$ 2,1	19,1 $\pm$ 1,3
<i>White-earth wormwood</i>	23,1 $\pm$ 2,2	24,2 $\pm$ 2,6	20,3 $\pm$ 6,8	12,1 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 0,6	11,1 $\pm$ 3,7
<i>Melissa officinalis</i>	12,4 $\pm$ 1,1	12,1 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 0,3	11,3 $\pm$ 0,5	12,1 $\pm$ 1,2	10,7 $\pm$ 3,6
<i>Small-flowered yarrow</i>	21,5 $\pm$ 1,8	108,1 $\pm$ 4,8	153,8 $\pm$ 15,2	10,3 $\pm$ 0,5	11,3 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 0,5
<i>Stinging nettle</i>	132,6 $\pm$ 8,8	40,1 $\pm$ 3,3	22,6 $\pm$ 9,2	11,1 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 1,1	13,2 $\pm$ 5,4
<i>Pteridium aquilinum</i>	26,6 $\pm$ 2,5	51,5 $\pm$ 4,9	42,8 $\pm$ 4,1	11,7 $\pm$ 0,9	21,3 $\pm$ 1,9	10,7 $\pm$ 1,1

In recent years, the study of rhizosphere microorganisms has been dictated by the need to solve both theoretical and a number of practical problems associated with the search for valuable producer strains and the construction of plant-microbial symbiotic systems to increase the productivity of agricultural plants. Therefore, the identification of bacteria from the rhizosphere that produce surfactants is due to the fact that the substances they secrete have a significant impact

on various soil properties and plant productivity. The results of the study showed that the number of bacteria in the rhizosphere, regardless of the plant type, is high. Thus, the number of bacteria in the rhizosphere ranged from  $4.5 \pm 1.7 \times 10^4$  to  $147.2 \pm 11.1 \times 10^4$  CFU/g soil (Table 2).

Table 2 - Number of microorganisms in the rhizosphere of plants

Plants	Total number of bacteria, $\times 10^4$ CFU/g soil			Number of mucus-forming bacteria, $\times 10^3$ CFU/g soil		
	Nutrient media					
	YPG	YM	LB	YPG	YM	LB
<i>Peppermint</i>	119,1 $\pm$ 12,4	44,2 $\pm$ 2,1	147,2 $\pm$ 11,1	10,7 $\pm$ 1,1	20,1 $\pm$ 2,2	17,5 $\pm$ 1,7
<i>Big plantain</i>	23,1 $\pm$ 2,2	18,2 $\pm$ 1,2	71,2 $\pm$ 6,2	12,8 $\pm$ 1,1	25,8 $\pm$ 3,9	-
<i>White-earth wormwood</i>	13,4 $\pm$ 1,4	25,4 $\pm$ 2,2	28,8 $\pm$ 9,7	10,8 $\pm$ 1,1	10,7 $\pm$ 0,9	29,2 $\pm$ 9,8
<i>Melissa officinalis</i>	12,1 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 1,7	9,7 $\pm$ 0,6	-	-
<i>Small-flowered yarrow</i>	44,3 $\pm$ 1,8	56,3 $\pm$ 3,4	109,8 $\pm$ 14,2	11,6 $\pm$ 0,5	12,5 $\pm$ 1,2	15,5 $\pm$ 1,3
<i>Stinging nettle</i>	29,1 $\pm$ 2,2	46,3 $\pm$ 4,4	41,2 $\pm$ 1,6	11,1 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 1,1	5,6 $\pm$ 2,5
<i>Pteridium aquilinum</i>	42,3 $\pm$ 3,6	16,5 $\pm$ 0,9	12,1 $\pm$ 1,1	11,8 $\pm$ 1,1	12,5 $\pm$ 1,2	-

Note: YPG – glucose yeast medium; YM – malt medium; LB – Luria Bertani

However, the number of mucus-forming bacteria was several orders of magnitude lower, and ranged from  $5.6 \pm 2.5 \times 10^3$  to  $25.8 \pm 3.9 \times 10^3$  CFU/g soil. The largest number of mucus-forming bacteria was observed in two media, YPG and YM (Table 3). There is enough information that the root emergence zone is extensively colonized by microorganisms [14]. It was found that the number of bacteria isolated from plant roots was significantly lower than those isolated from the soil and rhizosphere of plants. Thus, the number of endophytes was recorded in the range from  $12.8 \pm 1.3 \times 10^3$  CFU/g of plant tissue in lemon balm to  $108.5 \pm 11.8 \times 10^3$  CFU/g of plant tissue in peppermint.

Table 3 - Numbers of microorganisms in plant roots

Plants	Total number of microorganisms, $\times 10^3$ CFU/g plant tissue			Number of mucus-forming bacteria, $\times 10^2$ CFU/g plant tissue		
	Culture media					
	YPG	YM	LB	YPG	YM	LB
<i>Peppermint</i>	47,1 $\pm$ 3,4	66,1 $\pm$ 5,2	108,5 $\pm$ 11,8	12,1 $\pm$ 1,3	11,3 $\pm$ 1,0	13,1 $\pm$ 1,4
<i>Big plantain</i>	24,5 $\pm$ 2,2	22,5 $\pm$ 2,1	81,7 $\pm$ 8,8	12,4 $\pm$ 0,8	16,3 $\pm$ 1,5	10,7 $\pm$ 0,4
<i>White-earth wormwood</i>	17,3 $\pm$ 1,1	26,2 $\pm$ 1,8	21,5 $\pm$ 7,1	19,2 $\pm$ 2,1	21,8 $\pm$ 1,3	20,2 $\pm$ 3,7
<i>Melissa officinalis</i>	12,8 $\pm$ 1,3	24,1 $\pm$ 2,2	24,5 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 5,0	22,7 $\pm$ 3,8
<i>Small-flowered yarrow</i>	43,5 $\pm$ 2,5	89,8 $\pm$ 6,4	21,6 $\pm$ 2,2	10,1 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 1,1	-
<i>Stinging nettle</i>	42,5 $\pm$ 3,2	16,5 $\pm$ 0,9	41,2 $\pm$ 1,6	4,6 $\pm$ 0,8	12,2 $\pm$ 1,8	5,6 $\pm$ 0,4
<i>Pteridium aquilinum</i>	32,1 $\pm$ 2,9	42,4 $\pm$ 3,9	33,8 $\pm$ 2,9	-	16,1 $\pm$ 1,2	-

Note: YPG – glucose yeast medium; YM – malt medium; LB – Luria– Bertani

It was shown that a high content of mucus-forming bacteria was isolated from the rhizosphere of plants: yarrow (*Achillea micrantha* Willd), peppermint (*Méntha piperíta*), wormwood (*Artemisia terae-albae* Krasch), Plantaginaceae (plantains), plantain (*Plantago major*) Urticacrae (nettles) nettle (*Urtica Dioica* L.). Among endophytic bacteria, a high number of

isolates that form mucus and viscous colonies was noted in peppermint (*Méntha piperita*), the largest number of mucus-forming endophytes was isolated from two media, YPG and YM.

A total of 216 isolates were selected with colony morphology: shiny mucilage with different viscosity. The plant-specific distribution was as follows: 48 isolates of peppermint, 17 isolates of plantain, 25 isolates of common wormwood, 10 isolates of melissa, 14 isolates of fern, 30 isolates of yarrow, 13 isolates of thistle, and 5 isolates of phacelia. It should be noted that a high percentage of slime-forming bacteria was isolated from soil, rhizosphere and roots of *Méntha piperita* plants. Three nutrient media were used to identify slime-forming bacteria. Comparing their abundance on different nutrient media, it can be noted that the highest percentage of colonies with a viscous phenotype and observed on cups with YPG and YM media.

A simple and express method based on the ability to form colonies of mucoid phenotype on the surface of agar nutrient medium was used for the targeted search and selection of biopolymer producers among slime-forming microorganisms. For this purpose, the isolates were seeded on dishes with medium to compare the mucoid phenotype of the colonies. The dishes containing 25 to 50 colonies were evaluated for the presence of mucoid. Microbial cells from mucoid colonies were surrounded by a layer of mucous material. It should be noted that this method is widely used in screening studies to select strains of microorganisms - active producers of biopolymers [15, 16]. The use of this method is reasonable when testing mucus-forming microorganisms as possible producers of exoglycans or biopolymers [17, 18]. It is very likely that biopolymer-producing bacteria form colonies with viscous thick mucus (mucoid). An initial screening of biopolymer producers was carried out based on this characteristic [19]. An initial ranking of colonies according to their ability to produce mucus was done with categorization from thick to mucoid heavy mucus on nutrient media. Figure 2 shows colonies of mucus-producing bacteria exhibiting a viscous phenotype when grown on YM agar.

Numerous studies have used colony mucoidity as a qualitative indicator of biopolymer production. Large differences in colony mucoidity were observed among the strains tested. For example, Figure 2 shows that some isolates appeared much more mucoid and larger in size than others. The colonies of the polymer overproducers grew over time on the agar dishes, which explains why, these colonies were larger in size. It should be noted, in some cases the colonies became semi-liquid and eventually covered the entire surface of the Petri dish.

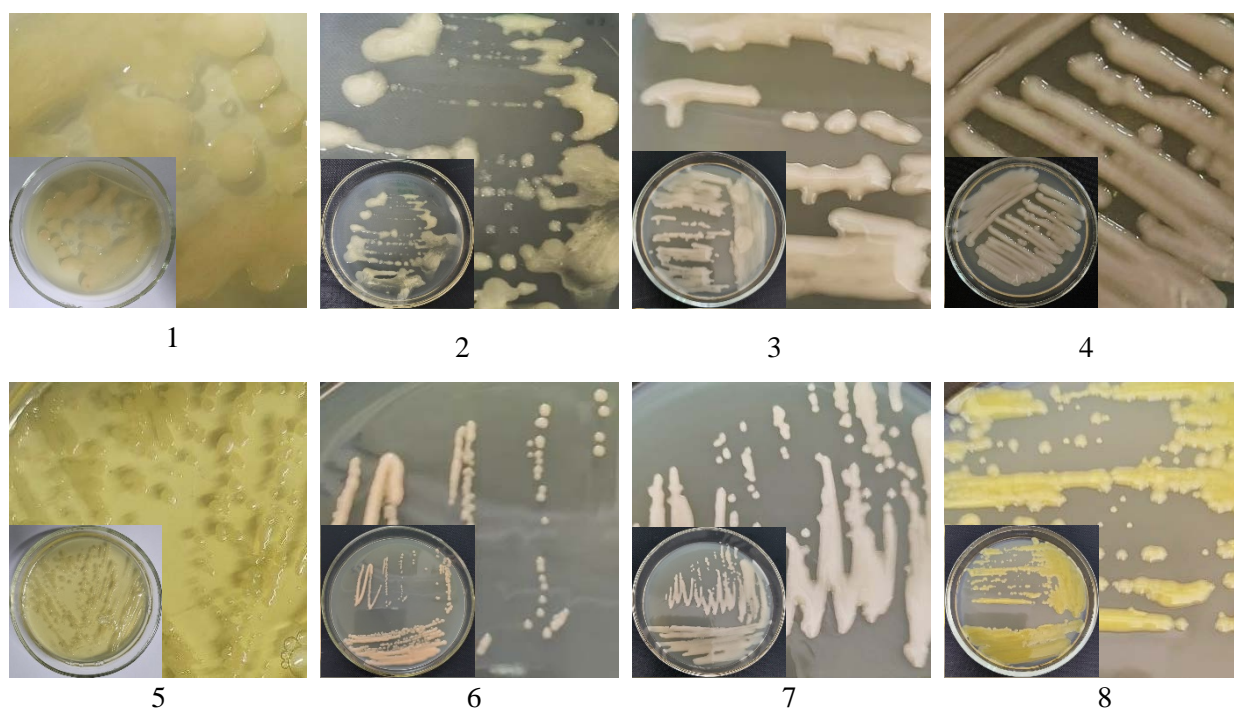


Figure 2 – Morphology of mucoid isolates on agar medium (1-PEK1, 2-PAP4, 3-PAP13, 4-FRK, 5-TRK8, 6-TRK27, 7-MEK9, 8-MRK)

All isolates were classified by phenotype as mucoid and non-mucoid. The phenotype of colonies was determined after incubation for one day at 30 °C on optimal nutrient medium. The phenotype was assessed by several parameters of colony morphology including texture, height, margin, size and shape. The data are summarized in Table 4. The mucoidity of the colonies was tested by touching the surface of the colonies with a transfer needle and observing the formation of long, stringy filaments. Thus, out of 216 strains tested, 46 strains were positive for mucus production. Mucus production is a vital factor as it is related to the viscosity and the manifestation of mucoid phenotype by cells is attributed to its ability to produce biopolymers [21, 22].

Out of 46 strains, 26 isolates showed maximum tractability by forming various convex colonies with glossy surface with abundant mucus. Most of the isolates formed colony phenotypes with different architectural (Table 4). 58 strains showed no sticky phenotype on the surface of agar nutrient medium. In these strains, the phenotype was evaluated as non-mucoid type [20]. All isolates isolated from oil-contaminated soils were not classified as colonies with a mucoid phenotype.

As can be seen from the data in Table 4, most isolates with a mucoid phenotype had cream or rarely yellow coloration. A few isolates formed pink and orange colonies. Among the lysed isolates, Gram-negative and non-spore-forming bacteria were approximately twice as numerous as Gram-positive and spore-forming bacteria. Cell motility was also observed for most of the isolates.

The viscosity of the culture fluid is the most important criterion for the selection of polysaccharide-producing bacteria. At the next stage of selection, the slime-forming isolates were grown in liquid medium and tested for mucoidity of the medium using inoculation loops. It should be noted that the mucoid isolates changed the viscosity of the nutrient medium differently: slimy and thick viscous, which formed filaments when touched with a microbial loop (Figure 3).

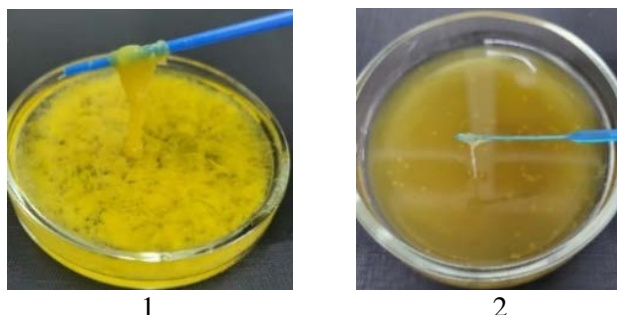


Figure 3 – Macroscopic view of a "viscous" chain formed by a cell mass producing mucus (1-MRK, 2-TRK8)

The isolates were found to exhibit different mucoid phenotypes when grown in liquid nutrient media. Isolates with increased mucoidity were isolated mainly from the rhizosphere of plants. It is worth noting that 9 endophytic isolates formed a sticky (viscous) slippery gel with viscoelastic properties when growing in liquid medium. Based on the results, it was found that a large percentage of high-mucoid isolates were distributed in the internal tissues and rhizosphere of *Méntha piperíta*.

Table 4 - Colony and cell characteristics of strains with mucoid phenotype

Strain	Source	Description of colony	Characteristics		
			Gram	Spore formation	Mobility
1	2	3	4	5	6
MRK	Rhizosphere wormwood	Irregular bright yellow oily.	-	-	+



Table 4 continued

1	2	3	4	5	6
FRK	Rhizosphere phacelia	Irregular, creamy, slimy	-	-	+
TRK8	Rhizosphere yarrow	Irregular, greenish-yellow, slimy	-	-	+
TRK27	Rhizosphere yarrow	Round, pink, slimy	-	-	-
PRK4	Rhizosphere fern	Irregular, creamy slimy	-	-	+
PRK13	Rhizosphere fern	Irregular, creamy slimy	+	-	+
MEK9	Endophyte peppermint	Amoeboid, cream mucus	-	-	+
MEK33	Endophyte peppermint	Irregular, creamy slimy	-	-	+
PEK1	Endophyte wormwood	Irregular, creamy slimy	-	-	+
PI3/5	Rhizosphere plantain	Amoeboid, rounded light gray mucilage	-	+	+
M1	Endophyte peppermint	Rhizoid, cream-colored, shiny, mucous	-	-	+
M13	Endophyte peppermint	Round, creamy, mucous smooth, shiny, convex	+	+	+
M20	Endophyte peppermint	Amoeboid, creamy mucous membranes are smooth, shiny with smooth edges	-	-	-
M21	Endophyte peppermint	Correct, creamy, shiny	-	-	-
M28	Peppermint soil	Irregular creamy mucous membranes are smooth, shiny, convex	-	-	+
M30	Rhizosphere peppermint	Rhizodaceous, orange, fluid, mucous	-	-	+
M33	Endophyte peppermint	Regular, orange in color, fluid, slimy, convex	-	+	+
M45	Endophyte peppermint	Regular, mustard green, slimy, convex	-	-	+
T9	Rhizosphere of yarrow	Irregular, pale pink, slimy, convex	+	-	+
P32	Rhizosphere of wormwood	Amoeboid, creamy mucous membrane, smooth, shiny, even edges	-	+	+

The relative viscosity of the culture fluid was studied. The relative viscosity of the bacterial growth medium was determined using a VPZh-1 capillary viscometer with a capillary diameter of 0.86 mm. Studies have shown that the values of this indicator depended on the individual characteristics of the bacteria. Thus, when isolates were cultivated in a liquid nutrient medium, as they grew, an increase in the viscosity of the culture liquid was observed. The viscosity of the medium differed in the cultures of different isolates. Maximum values of relative viscosity (above  $24.5 \pm 3.5 \text{ mm}^2/\text{sec}$ ) were observed in 9 strains on the 5th day of incubation when grown in YPG or YM medium. The relative viscosity values for other crops were significantly lower (Table 5).

Table 5 - Relative viscosity and density of the culture fluid of strains with a mucoid phenotype

Strain	Relative viscosity (mp/sec) QOL on media		Density, g/cm <sup>3</sup>	
	YPG.	YM	YPG.	YM
1	2	3	4	5
MRK	27,7±1,4	14,6±3,5	4,9004	4,8007
FRK	35,6±7,6	26,2±3,5	4,9003	4,9112
TRK8	13,1±1,2	25,1±3,6	5,0001	5,1132
TRK27	30,2±1,4	6,9±1,9	4,9001	4,8011
PRK4	13,1±4,4	22,7±8,9	4,9002	4,9101

Table 5 continued

1	2	3	4	5
PRK13	26,2±5,4	19,5±4,8	4,8009	4,9106
MEK9	39,8±3,9	37,9±8,2	4,9003	4,9014
MEK33	38,8±7,1	18,8±3,2	4,9008	4,9003
PEK1	40,1±6,4	25,8±3,4	4,9001	4,8001
PI3/5	12,7±1,7	10,1±0,4	5,2002	4,8001
M1	19,6±3,3	8,6±1,4	4,9005	4,9004
M13	24,5±3,5	12,2±0,5	4,9043	4,9001
M20	16,1±5,6	10,7±1,7	4,9002	4,9012
M21	11,7±0,9	4,2±0,2	4,8001	4,8012
M28	37,5±7,7	17,6±2,6	5,1002	4,9001
M30	15,1±1,7	6,2±0,5	3,5002	4,8001
M45	19,1 ± 1,4	14,3±1,4	4,9001	4,9003
T9	10,3±3,7	6,2±0,5	4,9004	4,9009
P32	11,5±2,8	8,7±0,9	4,9007	4,9003
Nutrient media	1,4±0,2	1,2±0,2	1,8456	1,4589

Thus, the maximum value of relative viscosity was observed in isolates isolated from the rhizosphere of mint MEK9, MEK33 and wormwood root PEK1 on the 5th day of incubation. The viscosity of other crops was significantly lower. Thus, among the studied bacterial isolates, strain M45, when cultivated on YPG medium, the maximum increase in the viscosity of the culture liquid was observed, compared to other cultures. This may indicate that bacteria of this strain produce an extracellular substance of a surfactant nature. The nature of the change in the viscosity of the medium in isolates may be due to the differences in molecular weight of the biopolymers.

The viscosity of such a complex substance as mucus requires a further study. Therefore, in further studies, the density of the culture fluid of mucus-forming microorganisms was determined. Density is one of the main indicators by which the quality of liquid substances or biopolymers is determined. Biopolymer properties such as density, viscosity and mucilage formation are considered critical parameters for biopolymer quality control. Density is the most important parameter affecting the functional properties of the polymer. A pycnometer was used to determine density. It was established that the relative viscosity of the culture fluid and the density of polymer solutions were determined by the strain. In general, there was complete agreement between the results of the density test and the determination of the phenotype of the studied crops.

High density of the culture fluid is characteristic of isolates with a mucoid phenotype. The density values of the culture liquid in bacteria strains MRK, FRK, TRK8, TRK27, PRK4, PRK13, MEK9 and PEK1 were practically at a high level, as were the relative viscosity indicators. It is believed that bacteria that secrete large quantities of mucus into the environment increase the thickness and density of the mucus layer [21]. It can be assumed that the mucus of these isolates contains large amounts of carbohydrates, and the density of the culture fluid is also high.

### Conclusion

Hence, promising strains of mucus-producing microorganisms were selected using simple, rapid and reliable screening methods. These studies focused on identifying strains exhibiting a mucoid colony phenotype, maximizing mucus production, and displaying high viscosity in the culture fluid across different media.

### Funding

The work was carried out within the framework of project No. AP14871512 “Microbial multifunctional exopolysaccharides: biochemical characteristics, production methods and prospects for use in the oil industry”

**References:**

- 1 Concórdio-Reis, P., Alves, V. D., Moppert, X., Guézennec, J., Freitas, F., & Reis, M. A. M. (2021). Characterization and Biotechnological Potential of Extracellular Polysaccharides Synthesized by *Alteromonas* Strains Isolated from French Polynesia Marine Environments. *Marine Drugs* 2021, Vol. 19, Page 522, 19(9), 52 (doi.org/10.3390/md19090522)
- 2 Rosenberg E, DeLong EF, Thompson F, Lory S, Stackebrandt E Microbial Exopolysaccharides. *The Prokaryotes* [Applied Bacteriology and Biotechnology] (pp.179-192)(doi:10.1007/978-3-642-31331-8\_25)
- 3 Sohan' T.S., Dyanyan' Chzhan, Botvinko I.V., Netrusov A.I. Poisk novyh bakterial'nyh ekzopolisaharidov dlya neftegazovogo kompleksa. *Zashchita okruzhayushchej sredy v neftegazovom komplekse*, 2008, №5. – С. 62-64. (eLIBRARY id: 33269938)
- 4 Rafigh S.M., Yazdi A.V., Vossoughi M., Safekordi A.A., Ardjmand M. Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014; 70:463–473. (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.034.)
- 5 Somasegaran P, Hoben HJ. 1994. Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. New York: Springer Science & Business Media., Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S, Joner EJ. 2005. Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 12(1):34–48. (doi:10.1065/espr2004.08.213.)
- 6 T. Mukasheva, R. Berzhanova, L. Ignatova, A. Omirbekova, Y. Brazhnikova, R. Sydykbekova and M. Shigaeva Bacterial endophytes of Trans-Ili Alatau region's plants as promising components of a microbial preparation for agricultural use. *Acta Polonica* Vol. 63, No 2/2016 321–328 (doi.org/10.18388/abp.2015\_1157.)
- 7 Park YK, MPL Mortatti and HH Sato. 1983. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Biotechnol Lett* 5: 515–518. DOI:10.1007/BF01184941. Dawes E.A., D.W. Ribbon and D.A. Rees. 1968. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochem J* 98: 804–81. (doi: 10.1042/bj0980804.)
- 8 Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P.H. A., Staley, J.T., and Williams, S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Edn. Baltimore, MD: *Williams & Wilkins*, 75-673. (doi: 10.1001/jama.1924.02650280079041) Google Scholar,
- 9 Pacarynuk LA, Danyk HC. Biochemical Tests. In: *Principles of Microbiology, Laboratory Manual*. USA: Spring, TX; 2004:28–34. (https://doi.org/10.1099/00222615-10-1-147)
- 10 Dworkin, M., Falkow, S. and Rosenberg, E., Eds., *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3th Edition, *Springer-Verlag*, New-York, 2003).
- 11 Latha, P. Endophytic bacteria: prospects and applications for the plant disease management. *Plant Health under Biotic Stress*. –2019. – P. 1-50. (doi: 10.1007/978-981-13-6040-4\_1)
- 12 Patrick S, Reid JH. Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteroides fragilis* on a discontinuous density gradient. *J Med Microbiol.* 1983;16:239 – 41. (doi: 10.1099/00222615-16-2-239)
- 13 ГОСТ 3900-85 *Нефть и нефтепродукты. Методы определения плотности.* (rostest.info)
- 14 J.A. Grondin, Y.H. Kwon, P.M. Far, S. Haq, W.I. Khan, Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning from Clinical and Experimental Studies, *Front. Immunol*, 11, 2020, 2054. (doi: 10.3389/fimmu.2020.02054)
- 15 Mu'minah, Baharuddin, Hazarin Subair, Fahrudin and Baso Darwisah Isolation and Screening of Exopolysaccharide Producing Bacterial (EPS) from Potato Rhizosphere for Soil Aggregation Procedia Food Science 3(6):74-81 (doi:10.1016/j.profoo.2015.01.007)
- 16 T. Mukai, N. Keita, M. Sugiyama, Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin // *Microorganisms*, 4, 3, 2016, 34. (doi: 10.3390/microorganisms4030034)
- 17 Vipul D Prajapati, Girish K Jani, Bhumi S Zala, Tohra A Khutliwala An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydr Polym.* 2013 2;93(2):670-8. (doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.030)
- 18 Castro-Bravo, N.; Wells, J.M.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2426. (doi: 10.3389/fmicb.2018.02426)
- 19 Karen P. Dierksen, William E. Sandine, and Janine E. Trempey Expression of Ropy and Mucoid Phenotypes in *Lactococcus lactis* Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis 97331-

3804 1997 J Dairy Sci 80:1528–1536; *Microbiological Research* Volume 246, May 2021. (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76082-X)

20 Wulin Shan, Huanhuan Zhang, Jinsong Kan, Meiling Yin, Jiayun Zhang, Lingling Wan, Renliang Chang, Ming Li Acquired mucoid phenotype of *Acinetobacter baumannii*: Impact for the molecular characteristics and virulence (<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126702>.)

21 Hadas Kon, David Schwartz, Elizabeth Temkin, Yehuda Carmeli, Jonathan Lellouche Rapid identification of capsulated *Acinetobacter baumannii* using a density-dependent gradient test *BMC Microbiol.* 2020 Sep 16;20(1):285. (doi: 10.1186/s12866-020-01971-9.)

А.Ж. ЖҮНІСЖАН<sup>1</sup>, Р.Ж. БЕРЖАНОВА<sup>1\*</sup>, Г.К. АБАЙ<sup>2</sup>, В.В. ХУТОРЯНСКИЙ<sup>3</sup>,  
Т.Т. РАХМЕТОВА<sup>1</sup>, А.А. МУКАШ<sup>1</sup>, А.А. КУМАРГАЖИНОВА<sup>1</sup>, А. СЕКСЕНБАЕВ<sup>1</sup>,  
Т.Д. МУКАШЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университеті, Алматы қаласы, Қазақстан

<sup>2</sup>ЖШС «BioClean», Алматы қаласы, Қазақстан

<sup>3</sup>Фармация мектебі, Реддинг университеті, Ұлыбритания

\*e-mail: ramza05@mail.ru

## БИОПОЛИМЕР ПРОДУЦЕНТТЕРІН ТҮЗЕТІН ШЫРЫШ БАКТЕРИЯЛАРДЫ ІЗДЕУ ЖӘНЕ АНЫҚТАУ

### Түйін

Жұмыста *Lamiaceae*, *Didymochlaenaceae* және *Compositae* тұқымдасына жататын Іле Алатауының тау бөктері мен тау асты жазықтарында өсетін топырақ, ризосфера және өсімдік ұлпаларының үлгілерінен шырыш түзетін микроорганизмдерді іздеу және оқшаулау туралы мәлімет беріледі. Жұмыста 232 изолят пайдаланылды: 216 шырыш түзетіндер және 16 мұнаймен ластанған топырақ үлгілерінен бөлінген микроорганизмдер. Шырыш түзетін бактериялардың жоғары пайызы топырақтан, ризосферадан және жалбыз өсімдіктерінің тамырынан (*Mentha piperita*) оқшауланған. Колониялардың фенотиптік сипаттамаларын (мукоидты немесе шырышты), дақыл сұйықтығының салыстырмалы тұтқырлығы мен тығыздығын сырт сипаты бойынша бақылау арқылы микроорганизмдердің әртүрлі орталарда шырыш түзу қабілетін бағалауға арналған скрининг әдістері қолданылды. Шырыш түзетін бактериялар арасында тұтқыр фенотипі бар колониялардың ең жоғары пайызы YPG және YM орталарда анықталды. 232-ден 9 тұтқыр/шырышты изолят таңдалды: MRK, FRK, TRK8, TRK27, PRK4, MEK33, PRK13, MEK9 және PEK1, ең жоғары шырыш түзушілігімен сипатталады, салыстырмалы тұтқырлық мәндері  $38,8 \pm 7,1$  мп/сек дан жоғары.  $40,1 \pm 6,4$  мп/сек және әртүрлі орталардағы дақылдық сұйықтықтың тығыздығы 4,9001 - 5,0001 г/см<sup>3</sup>.

**Кілтті сөздер:** шырыш түзуші микроорганизмдер, топырақ, ризосфера, тұтқырлық, мукоид.

MPHTI: 34.27.17

А.Ж. ЖУНИСЖАН<sup>1</sup>, Р.Ж. БЕРЖАНОВА<sup>1\*</sup>, Г.К. АБАЙ<sup>2</sup>, В.В. ХУТОРЯНСКИЙ<sup>3</sup>,  
Т.Т. РАХМЕТОВА<sup>1</sup>, А.А. МУКАШ<sup>1</sup>, А.А. КУМАРГАЖИНОВА<sup>1</sup>,  
А. СЕКСЕНБАЕВ<sup>1</sup>, Т.Д. МУКАШЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

<sup>2</sup>ТОО «BioClean», Алматы, Казахстан

<sup>3</sup>Школа Фармации университета Реддинг, Великобритания

\*e-mail: ramza05@mail.ru

## ПОИСК И ВЫЯВЛЕНИЕ СЛИЗЕОБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ - ПРОДУЦЕНТОВ БИОПОЛИМЕРОВ

doi:10.53729/MV-AS.2024.03.09

### Аннотация

В работе сообщается о поиске и выделении слизеобразующих микроорганизмов из образцов почв, ризосферы и ткани растений, произрастающих в предгорных и подгорных равнинах Заилийского Алатау, относящиеся к семейству *Lamiaceae*, *Didymochlaenaceae* и *Compositae*. В работе использовано 232 изолята: из них 216 слизеобразующих и 16 выделенных из нефтезагрязненных почвенных образцов. Высокий процент слизеобразующих бактерий изолирован из почвы, ризосферы и корней растений мяты перечной (*Méntha piperíta*). Скрининговые методы по оценке способности микроорганизмов продуцировать слизь на различных средах проводили по визуальному наблюдению фенотипических характеристик колоний (слизистый или мукоидный), относительной вязкости и плотности культуральной жидкости. Установлено, что наибольший процент колоний с вязким фенотипом среди слизеобразующих бактерии наблюдали на чашках со средами YPG и YM. Из 232 выбрано 9 вязких/мукоидных изолятов MRK, FRK, TRK8, TRK27, PRK4, MEK33, PRK13, MEK9 и PEK1, характеризующийся наибольшим выходом слизи, с более высокими значениями относительной вязкости от 38,8±7,1 (мп/сек) до 40,1±6,4 (мп/сек) и плотности культуральной жидкости на различных средах в пределах 4,9001 - 5,0001 г/см<sup>3</sup>.

**Ключевые слова:** слизеобразующие микроорганизмы, почва, ризосфера, вязкость, мукоид.

Среди биомолекул бактериальные полимеры, такие как экзополисахариды (ЭПС), стали инновационными материалами, имеющими важное промышленное значение. Бактериальные полимеры отличаются высоким разнообразием по структуре и составу, их загущающая, стабилизирующая, гелеобразующая и/или эмульгирующая способность используется в пищевой, фармацевтической, медицинской промышленности и агротехнологиях [1].

К синтезу биополимеров способны многие микроорганизмы: бактерии, водоросли дрожжи и, в меньшей степени микроскопические грибы [2, 3]. К бактериям, синтезирующие микробные биополимеры относятся такие, как *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Sphingomonas*, *Aureomonas*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Zymomonas*, *Acetobacter*, *Mucorales*, *Achromobacter* и т.д. Бактериальные полимеры составляют существенную часть внеклеточных веществ, окружающих клетки в микробных сообществах.

Интерес к слизеобразующим бактериям, синтезирующим экзополимеры связано с тем, что требуются биополимеры, обладающие уникальными функциональными свойствами: способностью к образованию высоковязких растворов, продуцировать эмульгирующие и поверхностно-активные вещества, обладающие иммуномодулирующими, противовоспалительными и бактерицидными свойствами. Поэтому слизистый фенотип микроорганизмов является важной адаптивной защитной реакцией бактерий на внешние стрессы. Известно, что у слизеобразующих бактерий жизнеспособность в различных экосистемах часто сопряжена с их способностью к синтезу

комплекса веществ, обладающих эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами [4].

Целью настоящего исследования являлось изучение слизиобразующих микроорганизмов, выделенных из образцов почв, ризосферы и ткани растений как перспективных продуцентов биополимеров.

### Материал и методы исследования

#### Объекты исследований

Объектами для изолирования и исследования микроорганизмов, продуцирующих слизь, служили образцы: почвы, на которых росли растения; ризосфера и корни растений. Для проведения экспериментов были взяты экземпляры семи различных видов высших растений, мята перечная (*Mentha piperita*) и Melissa лекарственная (*Melissa officinalis*), орляк обыкновенный (*Pteridium aquilinum*), тысячелистник мелкоцветковый (*Achillea micrantha Willd*) и полынь белоземельная (*Artemisia terae-albae Krasch*), подорожник большой (*Plantago major*), крапива двудомная (*Urtica Dioica L.*), фацелия пижмолистная (*Phacelia tanacetifolia*) (Рисунок 1).

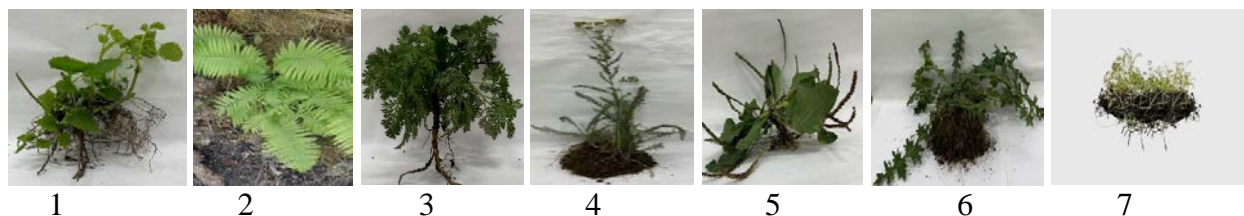


Рисунок 1 – Растительные объекты для выделения изолятов слизиобразующих микроорганизмов (1 - мята перечная (*Mentha piperita*); 2 – орляк обыкновенный (*Pteridium aquilinum*); 3 - Melissa лекарственная (*Melissa officinalis*); 4 - тысячелистник мелкоцветковый (*Achillea micrantha Willd*); 4 - полынь белоземельная (*Artemisia terae-albae Krasch*), 5 – подорожник большой (*Plantago major*); 6 – крапива двудомная (*Urtica Dioica L.*), 7 - фацелия пижмолистная (*Phacelia tanacetifolia*)).

В работе использовали 16 изолятов, выделенных из нефтезагрязненных почвенных образцов месторождения Забурунье, Доссор и С. Балгимбаев, которые проверены на способность к росту на сырой нефти.

#### Питательные среды

Для проведения экспериментов и поддержания микроорганизмов использовали стандартные питательные среды фирм: «Haimedia», «Лабхим»: LB (Лурия -Бертани), YM и YPG, состава глюкоза – 20 г, дрожжевой экстракт – 3 г, пептон – 5 г, агар – 20 г, pH 7,0 (г/л водопроводной воды) [5].

#### Методы исследования

Определение численности микроорганизмов в почве и выделение микроорганизмов, имеющих слизистый морфотип проводили традиционным методом. Оценивали численность бактерий на разных питательных средах [6].

Определение численности бактерий и их выделение из ризосферы растений. Учет численности бактерий в ризосфере проводили по общепринятой методике посевом суспензии на агаризованные питательные среды [7].

Определение численности эндофитных бактерий и их выделение из корней растений. Определение численности эндофитных микроорганизмов в тканях и корнях растений согласно методике, описанной в статье [8].

Фенотипическая характеристика слизиобразующих микроорганизмов. Слизеобразующие изоляты были фенотипически охарактеризованы на основе морфологии колонии, клеточной морфологии и реакции Грама [9, 10, 11].

Продукция слизи и ее оценка. Отбирали слизиобразующие изоляты по способности к образованию ослизненных колоний на поверхности агаризованной питательной среды [12].

Слизеобразующие колонии оценивали по вязкости слизи, клейкости, размеру колонии, покрывающие большую поверхность агаризованной питательной среды. Колонии мукоидного фенотипа были влажными, с приподнятой поверхностью.

При выращивании изолятов в жидкой среде проводили определение вязкости среды с помощью стеклянного вискозиметра ВПЖ-1 с диаметром капилляра 0,82 мм, согласно прилагаемой инструкции. Далее измеряли время истечения культуральных жидкостей и рассчитывали вязкость жидкости по формуле:

$$V = \frac{g}{9.807} * T * K$$

Где  $g$ -ускорение свободного падения в месте измерений в  $\text{м/с}^2$ ,  $K$ -постоянная вискозиметра,  $\text{мм}^2/\text{с}^2$ ,  $V$ -кинематическая вязкость жидкости,  $\text{мм}^2/\text{с}$ ,  $T$ -время истечения жидкости, с.

Плотность культуральной жидкости оценивали с использованием пикнометра согласно ГОСТ 3900-85. Плотность вязкой культуральной жидкости определяли следующим образом: с помощью пипетки с регулируемым объемом отбирали 5000 мкл культуральной жидкости переносили на часовое стекло, взвешивали и рассчитывали плотность [13].

Результаты исследования статистически обработаны с использованием Microsoft Excel (2019). Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение.

### Результаты и обсуждение

Микробное население почв, ризосфера и ткани растений являются неистощимым источником для изоляции уникальных слизеобразующих микроорганизмов - продуцентов экзополисахаридов. Поэтому в данной работе проводили выделение слизеобразующих бактерий из почвы, ризосферы и тканей растений, произрастающих в предгорных и подгорных равнинах Заилийского Алатау (Рисунок 1).

Исследования показали, что микробное сообщество почвы под растениями характеризуется высокой плотностью. Численность микроорганизмов была подсчитана традиционным методом в расчёте на 1 г почвы. Данные по учету численности почвенных и слизеобразующих бактерий представлены в таблице 1. Установлено, что максимальная численность почвенных бактерий наблюдается из-под растения тысячелистник мелкоцветковый (*Achillea micrantha Willd*) на всех определяемых органических средах, и их количество составило от  $21,5 \pm 1,8 \times 10^4$  до  $153,8 \pm 15,2 \times 10^4$  КОЕ/г почвы, а число слизеобразующих бактерий было на один или два порядка меньше и составило  $10,3 \pm 0,5 \times 10^3$  КОЕ/г почвы. Примерно одинаковой была численность слизистых бактерий для образцов почв, взятых из под растений и была в пределах от  $10,8 \pm 0,9 \times 10^3$  до  $20,3 \pm 1,6 \times 10^3$  КОЕ/г почвы. Наибольшее количество бактерий с различным морфотипом колоний, образующих слизь отмечено в почве из-под растения мята перечная (*Mentha piperita*) и было в пределах от  $10,8 \pm 0,9 \times 10^3$  до  $10,7 \pm 3,6 \times 10^3$  КОЕ/г почвы.

В последние годы изучение микроорганизмов ризосферы продиктовано необходимостью решения как теоретических, так и ряда практических задач, связанных с поиском ценных штаммов-продуцентов и конструирование растительно-микробных симбиотических систем для повышения продуктивности агрокультур. Поэтому, поиск бактерий из ризосферы, продуцентов поверхностно-активных веществ связан тем, что выделяемые ими вещества, оказывают существенное влияние на различные свойства почвы и урожайность растений. Результаты исследования показали, что численность бактерий ризосферы независимо от вида растений высокая. Так, количество бактерий в ризосфере составило от  $4,5 \pm 1,7 \times 10^4$  до  $147,2 \pm 11,1 \times 10^4$  КОЕ/г почвы (Таблица 2).

Таблица 1 - Численность микроорганизмов в почвенных образцах, взятых из-под растений

Растения	Численность бактерий, $\times 10^4$ КОЕ/г почвы			Численность слизеобразующих бактерий, $\times 10^3$ КОЕ/г почвы		
	Питательные среды					
	YPG	YM	LB	YPG	YM	LB
Мята перечная	22,1 $\pm$ 2,1	15,7 $\pm$ 1,5	38,4 $\pm$ 2,4	10,8 $\pm$ 0,9	20,3 $\pm$ 1,6	12,1 $\pm$ 0,9
Подорожник большой	22,4 $\pm$ 2,1	25,5 $\pm$ 2,6	33,7 $\pm$ 3,4	11,5 $\pm$ 0,7	21,7 $\pm$ 2,1	19,1 $\pm$ 1,3
Полынь белоземельная	23,1 $\pm$ 2,2	24,2 $\pm$ 2,6	20,3 $\pm$ 6,8	12,1 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 0,6	11,1 $\pm$ 3,7
Мелисса лекарственная	12,4 $\pm$ 1,1	12,1 $\pm$ 1,1	1,7 $\pm$ 0,3	11,3 $\pm$ 0,5	12,1 $\pm$ 1,2	10,7 $\pm$ 3,6
Тысячелистник мелкоцветковый	21,5 $\pm$ 1,8	108,1 $\pm$ 4,8	153,8 $\pm$ 15,2	10,3 $\pm$ 0,5	11,3 $\pm$ 0,5	10,3 $\pm$ 0,5
Крапива двудомная	132,6 $\pm$ 8,8	40,1 $\pm$ 3,3	22,6 $\pm$ 9,2	11,1 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 1,1	13,2 $\pm$ 5,4
Орляк обыкновенный	26,6 $\pm$ 2,5	51,5 $\pm$ 4,9	42,8 $\pm$ 4,1	11,7 $\pm$ 0,9	21,3 $\pm$ 1,9	10,7 $\pm$ 1,1

Однако численность слизеобразующих бактерий была на несколько порядков ниже, и находилась в пределах  $5,6\pm 2,5 \times 10^3$  -  $25,8\pm 3,9 \times 10^3$  КОЕ/г почвы. Наибольшее количество слизеобразующих бактерий отмечалось на двух средах YPG и YM (Таблица 3). Имеется достаточно сведений о том, что зона появления корней является обширно колонизируемой микроорганизмами [14]. Установлено, что количество бактерий, изолированных из корней растений было значительно ниже, чем выделенные из почвы и ризосферы растений. Так, численность эндофитов была зафиксирована в пределах от  $12,8\pm 1,3 \times 10^3$  КОЕ/г растительной ткани в мелиссе лекарственной и до  $108,5\pm 11,8 \times 10^3$  КОЕ/г растительной ткани мяты перечной.

Таблица 2 - Численность микроорганизмов в ризосфере растений

Растения	Численность бактерий, $\times 10^4$ КОЕ/г почвы			Численность слизеобразующих бактерий, $\times 10^3$ КОЕ/г почвы		
	Питательные среды					
	YPG	YM	LB	YPG	YM	LB
Мята перечная	119,1 $\pm$ 12,4	44,2 $\pm$ 2,1	147,2 $\pm$ 11,1	10,7 $\pm$ 1,1	20,1 $\pm$ 2,2	17,5 $\pm$ 1,7
Подорожник большой	23,1 $\pm$ 2,2	18,2 $\pm$ 1,2	71,2 $\pm$ 6,2	12,8 $\pm$ 1,1	25,8 $\pm$ 3,9	-
Полынь белоземельная	13,4 $\pm$ 1,4	25,4 $\pm$ 2,2	28,8 $\pm$ 9,7	10,8 $\pm$ 1,1	10,7 $\pm$ 0,9	29,2 $\pm$ 9,8
Мелисса лекарственная	12,1 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 1,7	9,7 $\pm$ 0,6	-	-
Тысячелистник мелкоцветковый	44,3 $\pm$ 1,8	56,3 $\pm$ 3,4	109,8 $\pm$ 14,2	11,6 $\pm$ 0,5	12,5 $\pm$ 1,2	15,5 $\pm$ 1,3
Крапива двудомная	29,1 $\pm$ 2,2	46,3 $\pm$ 4,4	41,2 $\pm$ 1,6	11,1 $\pm$ 0,9	11,5 $\pm$ 1,1	5,6 $\pm$ 2,5
Орляк обыкновенный	42,3 $\pm$ 3,6	16,5 $\pm$ 0,9	12,1 $\pm$ 1,1	11,8 $\pm$ 1,1	12,5 $\pm$ 1,2	-

Примечание: YPG – глюкозо – дрожжевая среда ; YM – среда с солодом; LB – Лурия - Бергани

Показано, что высокое содержание слизеобразующих бактерий изолировано из ризосферы растений: тысячелистник мелкоцветковый (*Achillea micrantha Willd*), мята перечная (*Méntha piperíta*), полынь белоземельная (*Artemisia terae-albae Krasch*), подорожник (*Plantago major*), крапива двудомная (*Urtica Dioica L.*). Среди эндофитных бактерий, высокая численность изолятов, образующих слизь и вязкие колонии, отмечена у



мяты перечной (*Méntha piperíta*), наибольшее количество слизиобразующих эндофитов изолировано из двух сред YPG и YM.

Отобрано 216 изолята с морфотипом колонии: блестящие слизистые с различной вязкостью. Распределение с учетом растений было следующее: 48 изолята - мяты перечной, 17 изолята - подорожник большой, 25 изолята - полынь белоземельная, 10 изолята-мелисса лекарственная, 14 изолята – орляк обыкновенный, 30 изолята – тысячелистник мелкоцветковый, 13 изолята – крапива двудомная, 5 – фацелия пижмолистная. Стоит отметить, что высокий процент слизиобразующих бактерий изолирован из почвы, ризосферы и корней растений мяты перечной (*Méntha piperíta*). Для выявления слизиобразующих бактерий использовали три питательные среды. Сравнивая их численность на различных питательных средах, можно отметить, что наибольший процент колоний с вязким фенотипом наблюдали на чашках со средами YPG и YM.

Таблица 3 - Численность микроорганизмов в корнях растений

Растения	Численность бактерий, $\times 10^3$ КОЕ/г растительной ткани			Численность слизиобразующих бактерий, $\times 10^2$ КОЕ/г растительной ткани		
	Питательные среды					
	YPG	YM	LB	YPG	YM	LB
Мята перечная	47,1 $\pm$ 3,4	66,1 $\pm$ 5,2	108,5 $\pm$ 11,8	12,1 $\pm$ 1,3	11,3 $\pm$ 1,0	13,1 $\pm$ 1,4
Подорожник большой	24,5 $\pm$ 2,2	22,5 $\pm$ 2,1	81,7 $\pm$ 8,8	12,4 $\pm$ 0,8	16,3 $\pm$ 1,5	10,7 $\pm$ 0,4
Полынь белоземельна	17,3 $\pm$ 1,1	26,2 $\pm$ 1,8	21,5 $\pm$ 7,1	19,2 $\pm$ 2,1	21,8 $\pm$ 1,3	20,2 $\pm$ 3,7
Мелисса лекарственная	12,8 $\pm$ 1,3	24,1 $\pm$ 2,2	24,5 $\pm$ 1,1	11,1 $\pm$ 0,7	13,5 $\pm$ 5,0	22,7 $\pm$ 3,8
Тысячелистник мелкоцветковая	43,5 $\pm$ 2,5	89,8 $\pm$ 6,4	21,6 $\pm$ 2,2	10,1 $\pm$ 0,4	12,1 $\pm$ 1,1	-
Крапива двудомная	42,5 $\pm$ 3,2	16,5 $\pm$ 0,9	41,2 $\pm$ 1,6	4,6 $\pm$ 0,8	12,2 $\pm$ 1,8	5,6 $\pm$ 0,4
Орляк обыкновенный	32,1 $\pm$ 2,9	42,4 $\pm$ 3,9	33,8 $\pm$ 2,9	-	16,1 $\pm$ 1,2	-
Примечание: YPG – глюкозо – дрожжевая среда ; YM – среда с солодом; LB – Лурия - Бергани						

При осуществлении направленного поиска и отбора продуцентов биополимеров среди слизиобразующих микроорганизмов был использован простой в исполнении экспрессный метод, основанный на способности к образованию колоний мукоидного фенотипа на поверхности агаризованной питательной среды. Следует отметить, что данный метод широко используется в скрининговых работах для отбора штаммов микроорганизмов - активных продуцентов биополимеров [15, 16]. Применение данного метода целесообразно при тестировании слизиобразующих микроорганизмов, как возможных продуцентов экзогликанов или биополимеров [17, 18]. Весьма вероятно, что бактерии, продуцирующие биополимеры, образуют колонии, имеющие вязкую густую слизь (мукоид). По этому признаку был проведен первичный скрининг продуцентов биополимеров [19]. Для этого изоляты были высеваны на чашках со средой для сравнения мукоидного фенотипа колоний. Чашки, содержащие от 25 до 50 колоний, оценивали на наличие мукоида. Клетки микроорганизмов из мукоидных колоний покрыты слоем слизистого вещества. Первоначально проведено ранжирование колоний по способности вырабатывать слизь с категорией от густой до мукоидной тягучей слизи на питательных средах. На рисунке 2 представлены колонии слизиобразующих бактерий, демонстрирующие вязкий фенотип при выращивании на YM агаре.

В многочисленных исследованиях мукоидия колоний применяется в качестве качественного показателя продукции биополимеров. Среди тестируемых штаммов наблюдались большие различия в мукоидности колоний. Так, на рисунке 2 показано, что часть изолятов оказались гораздо более слизистыми и больше по размеру, чем другие. Колонии сверхпродуцентов полимерного вещества со временем разрастались на чашках с агаром, что объясняет почему, эти колонии были больше по размеру. Надо отметить, что в некоторых случаях колонии становились полужидкими и, в конечном итоге, покрывали всю поверхность чашки Петри.

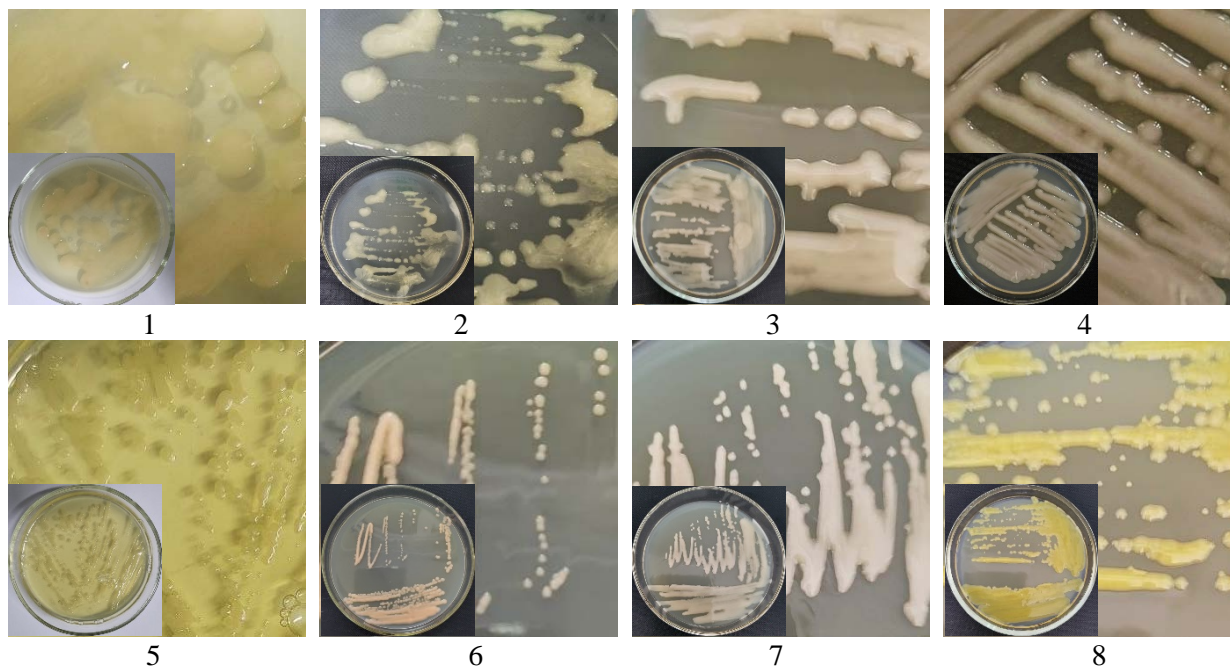


Рисунок 2 – Морфология мукоидных изолятов на агаризованной среде (1-PEK1, 2-PAP4, 3-PAP13, 4-FRK, 5-TRK8, 6-TRK27, 7-MEK9, 8-MRK)

Все изоляты были классифицированы по фенотипу как мукоидные и немучоидные. Фенотип колоний определяли после инкубации в течение суток при 30 °С на оптимальной питательной среде. Фенотип оценили по нескольким параметрам морфологии колонии, включая текстуру, высоту, край, размер и форму. Данные представлены в таблице 4. Мукоидность колоний проверяли с помощью касания поверхности колоний иглой для переноса и наблюдали за образованием длинных, вязких нитей. Так, из 216 протестированных штаммов 46 штаммов были положительными на продукцию слизи. Образование слизи является жизненно важным фактором, поскольку он связан с вязкостью и проявлением мукоидного фенотипа клетками, что объясняется ее способностью продуцировать биополимеры [21, 22].

Из 46 изолятов - 26 продемонстрировали максимальную тягучесть, формируя различные выпуклые колонии с глянцевой поверхностью с обильной слизью. Большинство выделенных изолятов образовывали фенотипы колонии с различной архитектурной (Таблица 4). 58 изолятов не выявили липкого фенотипа на поверхности агаризованной питательной среды. У этих штаммов фенотип оценен как немучоидный тип [20].

Все изоляты, выделенные из нефтезагрязненных почв не были отнесены к колониям с мукоидным фенотипом. Как видно из данных таблицы 4 большинство изолятов, с мукоидным фенотипом, имели кремовую или редко желтую окраску. Несколько изолятов образуют розовые и оранжевые колонии. Среди ослизнённых изолятов грамотрицательных и неспорообразующих бактерий было приблизительно в два раза больше, чем грамположительных и спорообразующих. Подвижность клеток также отмечена для большинства отобранных изолятов.

Таблица 4 - Характеристика колонии и клеток штаммов с мукоидным фенотипом

Штамм	Источник	Описание колонии	Признаки		
			Грам	Спорообразование	Подвижность
MRK	Ризосфера полынь	Неправильные яркожелтые маслянистые	-	-	+
FRK	Ризосфера фацелия	Неправильные, кремовые ослизненные	-	-	+
TRK8	Ризосфера тысячелистника	Неправильные, зеленоватожелтые ослизненные	-	-	+
TRK27	Ризосфера тысячелистника	Круглые розовые, ослизненные	-	-	-
PRK4	Ризосфера папоротника	Неправильные, кремовые ослизненные	-	-	+
PRK13	Ризосфера папоротника	Неправильные, кремовые ослизненные	+	-	+
MEK9	Эндифит мята перечная	Амебовидные, кремовые ослизненные	-	-	+
MEK33	Эндифит мята перечная	Неправильные, кремовые ослизненные	-	-	+
PEK1	Эндифит полынь	Неправильные, кремовые ослизненные	-	-	+
P13/5	Ризосфера подорожник	Амебовидные, округлая светло-серая ослизненная	-	+	+
M1	Эндифит мята перечная	Ризоидный, кремового цвета блестящие, слизистые	-	-	+
M13	Эндифит мята перечная	Округлые, кремовые, слизистые гладкие, блестящие, выпуклые	+	+	+
M20	Эндифит мята перечная	Амебовидные, кремовые слизистые гладкие, блестящие с ровными краями	-	-	-
M21	Эндифит мята перечная	Правильная, кремовая ослизненная, блестящая	-	-	-
M28	Почва мята перечная	Неправильные кремовые слизистые гладкие, блестящие, выпуклые	-	-	+
M30	Ризосфера мята перечная	Ризодные, оранжевого цвета, текучая, слизистая	-	-	+
M33	Эндифит мята перечная	Правильного, оранжевого цвета, текучая, слизистая, выпуклая	-	+	+
M45	Эндифит мята перечная	Правильная, горчично зеленого цвета, слизистая, выпуклая	-	-	+
T9	Ризосфера тысячелистника	Неправильная, бледно розового цвета, слизистая, выпуклая	+	-	+
P32	Ризосфера полынь белоземельная	Амебовидная, кремовая слизистая гладкая, блестящие, ровные края	-	+	+

Вязкость культуральной жидкости является наиболее важным критерием для отбора полисахаридпродуцирующих бактерий. На следующем этапе отбора слизиобразующие изоляты выращивали в жидкой среде и проводили тест на мукоидность, используя инокуляционные петли. Следует отметить, что мукоидные изоляты изменяли вязкость питательной среды различно: слизистая и тягучая вязкая, которая образовывала нити при прикосновении микробиологической петлей (Рисунок 3).

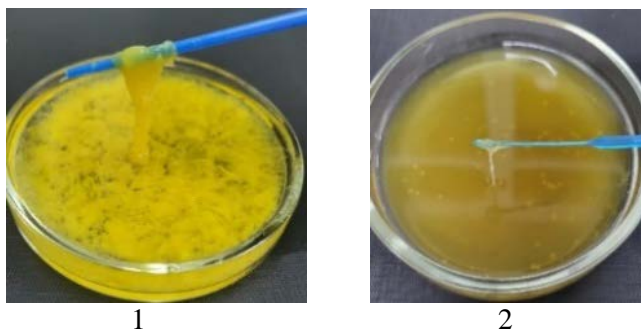


Рисунок 3 – Макроскопический вид «вязкой» цепи, образованной клеточной массой, продуцирующей слизь (1-MRK, 2-TRK8)

Установлено, что изоляты при выращивании в жидких питательных средах демонстрировали разные мукоидные фенотипы. Изоляты с повышенной мукоидностью были изолированы в основном из ризосферы растений. 9 эндофитных изолятов при росте в жидкой среде образуют липкий (вязкий) и скользкий гель с вязкоупругими свойствами. По результатам исследований выяснилось, что большой процент высокомукоидных изолятов был распространен во внутренних тканях и ризосфере *Méntha piperíta*.

Далее в работе изучали относительную вязкость культуральной жидкости. Относительную вязкость среды роста бактерий определяли с помощью капиллярного вискозиметра ВПЖ-1 с диаметром капилляра 0,82 мм. Исследования показали, что значения этого показателя зависели от индивидуальных особенностей бактерий. Так, при культивировании изолятов в жидкой питательной среде по мере их роста наблюдалось увеличение вязкости культуральной жидкости. Вязкость среды отличалась в культурах разных изолятов. Максимальные значения относительной вязкости (выше  $24,5 \pm 3,5$  мм<sup>2</sup>/сек) наблюдалось у 9 штаммов на 5 сутки инкубации при выращивании в среде YPG или YM. Значения относительной вязкости у остальных культур была существенно ниже (Таблица 5).

Так, максимальное значение относительной вязкости наблюдалось у изолятов, выделенных из ризосферы мяты MEK9, MEK33 и корня полыни PEK1 на 5 сутки инкубации. Вязкость культуральной среды у остальных культур была существенно ниже. Так, среди изучаемых изолятов бактерий штамм M45 при культивировании на среде YPG показал максимальное повышение вязкости культуральной жидкости по сравнению с другими культурами. Это может свидетельствовать о продукции данным штаммом внеклеточного вещества поверхностно-активной природы. Характер изменения вязкости среды у изолятов может быть обусловлен различиями в значениях молекулярной массы синтезируемых биополимеров.

Вязкость такого сложного вещества, как слизь, требует отдельного исследования. В связи с чем в дальнейших исследованиях было проведено определение плотности культуральной жидкости слизиобразующих микроорганизмов. Плотность является одним из основных показателей, с помощью которого определяют качество жидких веществ или биополимеров. Свойства биополимеров, такие как плотность, вязкость и образование слизи считаются критическими параметрами для контроля качества биополимера. Плотность является важнейшим параметром, влияющим на функциональные свойства полимера. Для определения плотности был использован пикнометр. Установлено, что показатели относительной вязкости культуральной жидкости и плотность растворов полимеров определялись штаммовой принадлежностью. В целом, наблюдалось полное согласие между результатами теста на плотность и определением фенотипа исследованных культур.

Таблица 5 - Относительная вязкость и плотность культуральной жидкости штаммов с мукоидным фенотипом

Штамм	Относительная вязкость КЖ (мп/сек)		Плотность КЖ, г/см <sup>3</sup>	
	Питательные среды			
	YPG.	YM	YPG.	YM
MRK	27,7±1,4	14,6±3,5	4,9004	4,8007
FRK	35,6±7,6	26,2±3,5	4,9003	4,9112
TRK8	13,1±1,2	25,1±3,6	5,0001	5,1132
TRK27	30,2±1,4	6,9±1,9	4,9001	4,8011
PRK4	13,1±4,4	22,7±8,9	4,9002	4,9101
PRK13	26,2±5,4	19,5±4,8	4,8009	4,9106
MEK9	39,8±3,9	37,9±8,2	4,9003	4,9014
MEK33	38,8±7,1	18,8±3,2	4,9008	4,9003
PEK1	40,1±6,4	25,8±3,4	4,9001	4,8001
P13/5	12,7±1,7	10,1±0,4	5,2002	4,8001
M1	19,6±3,3	8,6±1,4	4,9005	4,9004
M13	24,5±3,5	12,2±0,5	4,9043	4,9001
M20	16,1±5,6	10,7±1,7	4,9002	4,9012
M21	11,7±0,9	4,2±0,2	4,8001	4,8012
M28	37,5±7,7	17,6±2,6	5,1002	4,9001
M30	15,1±1,7	6,2±0,5	3,5002	4,8001
M45	19,1 ± 1,4	14,3±1,4	4,9001	4,9003
T9	10,3±3,7	6,2±0,5	4,9004	4,9009
P32	11,5±2,8	8,7±0,9	4,9007	4,9003
Питательная среда	1,4±0,2	1,2±0,2	1,8456	1,4589

Высокая плотность культуральной жидкости характерна для изолятов с мукоидным фенотипом. Значения плотности культуральной жидкости у бактерий штаммов MRK, FRK, TRK8, TRK27, PRK4, PRK13, MEK9 и PEK1 практически были на высоком уровне, как и показатели относительной вязкости. Считается, что у бактерий, выделяющие в большом количестве слизь в окружающую среду, увеличивается толщина и плотность слоя слизи [21]. Можно предположить, что у данных изолятов в составе слизи содержатся в большом количестве углеводы.

### Заключение

На основании простых, быстрых и надежных методов скрининга были отобраны перспективные штаммы среди слизиобразующих микроорганизмов. Проведенные исследования позволили выбрать штаммы, продемонстрировавшие мукоидный фенотип колоний, максимально продуцирующие слизь и обладающие высокой вязкостью культуральной жидкости на различных средах.

### Финансирование

Работа выполнена в рамках проекта № AP14871512 «Микробные многофункциональные экзополисахариды: биохимическая характеристика, методы получения и перспективы применения в нефтедобывающей промышленности» на 2022 – 2024 гг.

### Литература:

1 Concórdio-Reis P., Alves V. D., Moppert X., Guézennec J., Freitas F., & Reis M. A. Characterization and Biotechnological Potential of Extracellular Polysaccharides Synthesized by *Alteromonas* Strains Isolated from French Polynesia Marine Environments. *Marine Drugs* 2021, Vol. 19, Page 522, 19(9), 52 (doi: 10.3390/md19090522)

2 Rosenberg E., DeLong E.F., Thompson F., Lory S., Stackebrandt E. Microbial Exopolysaccharides. The Prokaryotes Applied Bacteriology and Biotechnology (pp.179-192) 2013. (doi:10.1007/978-3-642-31331-8\_25)

3 Сохань Т.С., Дянянь Чжан, Ботвинко И.В., Нетрусов А.И. Поиск новых бактериальных экзополисахаридов для нефтегазового комплекса. *Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе*, 2008, №5. – С. 62-64. (eLIBRARY id: 33269938)

4 Rafigh S.M., Yazdi A.V., Vossoughi M., Safekordi A.A., Ardjmand M. Optimization of curdlan production from *Paenibacillus polymyxa* by RSM and ANN. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014; 70:463–473. (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.034)

5 Somasegaran P., Hoben H.J. 1994. Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. New York: *Springer Science & Business Media.*, Chaudhry Q, Blom-Zandstra M, Gupta S, Joner E.J. 2005. (doi:10.1007/978-1-4613-8375-8)

6 Mukasheva T., Berzhanova R., Ignatova L., Omirbekova A., Brazhnikova Y., Sydykbekova and Shigaeva M. Bacterial endophytes of Trans-Ili Alatau region's plants as promising components of a microbial preparation for agricultural use. *Acta Polonica* Vol. 63, No 2/2016 pp. 321–328 (doi.org/10.18388/abp.2015\_1157)

7 Dawes E.A., Ribbon D.W. and Rees D.A. 1968. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochem J* 98: pp. 804–81. (doi: 10.1042/bj0980804)

8 Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P.H. A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Edn. Baltimore, MD: *Williams & Wilkins*, 75-673. Google Scholar. (doi: 10.1001/jama.1924.02650280079041)

9 Pacarynuk LA, Danyk HC. Biochemical Tests. In: *Principles of Microbiology*, Laboratory Manual. USA: Spring, TX; 2004:28 – 34. (https://doi.org/10.1099/00222615-10-1-147)

10 Dworkin, M., Falkow, S. and Rosenberg, E., Eds., The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, *3th Edition*, *Springer-Verlag*, New-York, 2003.

11 Latha, P. Endophytic bacteria: prospects and applications for the plant disease management. *Plant Health under Biotic Stress*. 2019. Pp. 1-50. (doi: 10.1007/978-981-13-6040-4\_1)

12 Patrick S, Reid JH. Separation of capsulate and non-capsulate *Bacteroides fragilis* on a discontinuous density gradient. *J Med Microbiol.* 1983; 16:239 – 41. (doi: 10.1099/00222615-16-2-239)

13 ГОСТ 3900-85 *Нефть и нефтепродукты*. Методы определения плотности. (rostest.info)

14 J.A. Grondin, Y.H. Kwon, P.M. Far, S. Haq, W.I. Khan, Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning from Clinical and Experimental Studies, *Front. Immunol*, 11, 2020, 2054. (doi: 10.3389/fimmu.2020.02054)

15 Mu'minah, Baharuddin, Hazarin Subair, Fahrudin and Baso Darwisah Isolation and Screening of Exopolysaccharide Producing Bacterial (EPS) from Potato Rhizosphere for Soil Aggregation Procedia Food Science 3(6):74-81( https://www.sci-hub.ru/10.1016/j.profoo.2015.01.007)

16 T. Mukai, N. Keita, M. Sugiyama, Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms*, 4, 3, 2016, 34. (doi: 10.3390/microorganisms4030034)

17 Vipul D Prajapati, Girish K Jani, Bhumi S Zala, Tohra A Khutliwala An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. *Carbohydr Polym.* 2013 2;93(2):670-8. (doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.030)

18 Castro-Bravo, N.; Wells, J.M.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. Interactions of surface exopolysaccharides from *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* within the intestinal environment. *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2426. (doi: 10.3389/fmicb.2018.02426)

19 Karen P. Dierksen, William E. Sandine, and Janine E. Trempey Expression of ropy and mucoid phenotypes in *Lactococcus lactis* Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis 97331-3804 1997 *J Dairy Sci* 80:1528–1536; *Microbiological Research* Volume 246, May 2021. (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76082-X)

20 Wulin Shan, Huanhuan Zhang, Jinsong Kan, Meiling Yin, Jiayun Zhang, Lingling Wan, Renliang Chang, Ming Li Acquired mucoid phenotype of *Acinetobacter baumannii*: Impact for the molecular characteristics and virulence. *Microbiol Res.* May: 246:126702. Epub 2021 Jan 11. (doi: 10.1016/j.micres.2021.126702)

21 Hadas Kon, David Schwartz, Elizabeth Temkin, Yehuda Carmeli, Jonathan Lellouche Rapid identification of capsulated *Acinetobacter baumannii* using a density-dependent gradient test *BMC Microbiol.* 2020 Sep 16;20(1):285. (doi: 10.1186/s12866-020-01971-9)