

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Exprese genů pro rhamnosu a kyselinu hyaluronovou u
bakterií permafrostu produkujících EPS**

Bakalářská práce

Aneta Vazačová

Školitel: Doc. Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

České Budějovice 2024

Bibliografické údaje:

Vazačová, A., 2024: Exprese genů pro rhamnosu a kyselinu hyaluronovou u bakterií permafrostu produkujících EPS. [Expression of genes for rhamnose and hyaluronic acid in permafrost bacteria producing EPS. Bc. Thesis, in Czech] – 28 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Permafrost represents extreme conditions with which bacteria living there must cope. These microorganisms have adapted to the cold and freezing environment by incorporating various components into the structure of extracellular polymeric substances they produce, allowing them to withstand the freezing conditions of permafrost. Components of bacterial structures may include rhamnose and hyaluronic acid. Our study aimed to confirm or refute this theory using new molecular methods.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích,

dne

.....

Aneta Vazačová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Jiřímu Bártovi za odborné vedení i poskytování cenných rad při psaní práce a Monice Strejčkové, která mě v mých začátcích naučila metodické postupy v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Simoně Zelenkové, velmi si vážím její trpělivosti při společné spolupráci v laboratoři, za rady a věcné komentáře a v neposlední řadě také za její podporu při dokončování této práce. Velké poděkování patří také mojí rodině, která mi byla po celou dobu oporou.

Obsah

1 Teoretická část	- 1 -
1.1 Mikrobiální společenstvo permafrostu	- 1 -
1.2 Extracelulární polymerní látky (EPS)	- 2 -
1.2.1 Bakteriální producenti EPS	- 3 -
1.2.1.1 Rod Curtobacterium	- 4 -
1.2.2 Využití EPS	- 4 -
1.3 Struktura EPS	- 5 -
1.3.1 Rhamnóza	- 6 -
1.3.2 Kyselina hyaluronová	- 7 -
1.4 Metodika detekce EPS	- 8 -
1.4.1 Mikroskopické metody detekce EPS	- 8 -
1.4.2 Molekulární metody detekce EPS	- 9 -
2 Cíle práce	- 10 -
3 Materiály a metody	- 11 -
3.1 Použité druhy bakterií	- 11 -
3.2 Izolace DNA	- 11 -
3.3 Kvantifikace DNA	- 12 -
3.4 Polymerázová řetězová reakce - PCR	- 13 -
3.5 Gelová elektroforéza	- 14 -
4 Výsledky a diskuse	- 15 -
4.1 Druhá rozmanitost	- 15 -
4.2 Výsledky PCR a gelové elektroforézy	- 16 -
4.2.1 Zjištění kvality DNA izolátů	- 16 -
4.2.1 Testování PCR podmínek	- 17 -
4.2.2 Gradientová PCR	- 19 -
5 Závěr	- 21 -
6 Seznam literatury	- 22 -

Seznam použitých zkratk

exDNA	extracelulární deoxyribonukleová kyselina
UV záření	ultrafialové záření
EPS	extracelulární polymerní látky
dTDP-L-rhamnóza	deoxythymidin-5'-difosfát-L-rhamnóza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
SEM	rastrovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
AFM	mikroskopie atomárních sil
PCR	polymerázová
3D	trojrozměrný
DEPC	diethylpyrokarbonát
rml	geny zodpovědné za vylučování rhamnózy
RNA	ribonukleová kyselina

1 Teoretická část

1.1 Mikrobiální společenstvo permafrostu

Permafrost je definován jako půda, která zůstala zamrzlá (tedy pod 0 °C) po dobu alespoň 2 po sobě jdoucích let. Tento mikrobiální ekosystém představuje důležitou součást permafrostového prostředí, které je zároveň klíčovou zásobárnou vázaného uhlíku na celosvětové úrovni (Bottos et al. 2018). Plynné formy uhlíku, představující metan a oxid uhličitý, se zde vyskytují ve vyšší koncentraci než v atmosféře. Množství jeho organických forem závisí na místě odběru vzorků (Steven et al. 2006). Půdy permafrostu mohou pocházet z mokřadů, glaciofluviálních usazenin, spraší nebo zvětralého skalního podloží (Waldrop et al. 2023).

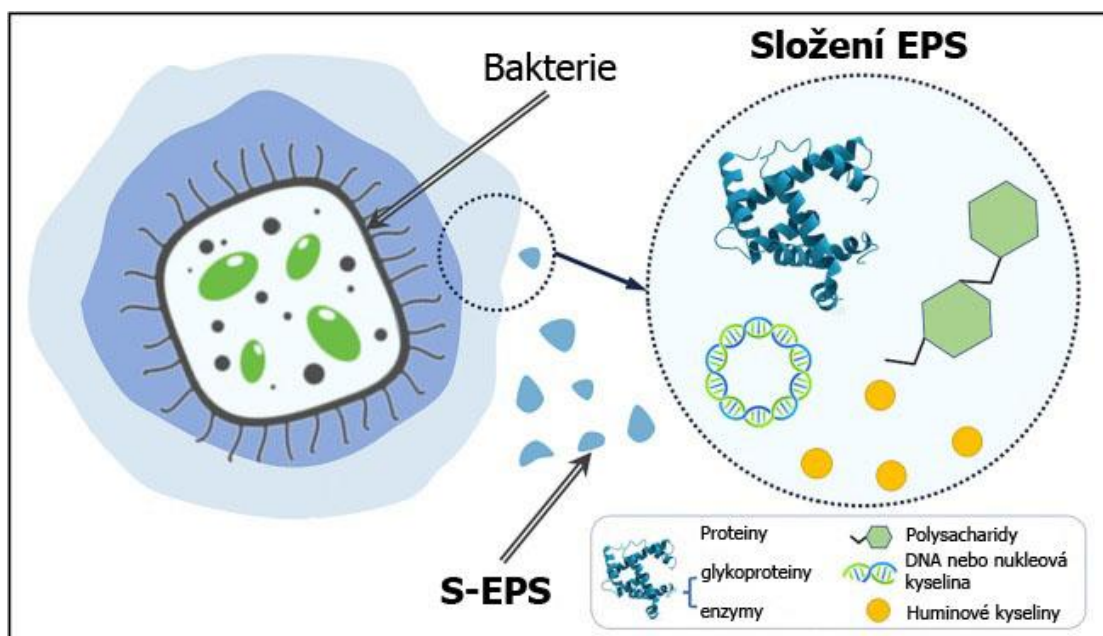
V permafrostu se vyskytuje poměrně vysoká mikrobiální rozmanitost představující rozdíly ve složení společenstev, mezi vlastnostmi permafrostu a různými lokalitami (Jansson and Tas, 2014). Organismy žijící v permafrostu jsou adaptovány na podmínky, ve kterých žijí. Kromě nízkých teplot se musejí vyrovnávat s vysokou salinitou prostředí, nedostatkem vody a živin i anoxickým prostředím s nízkým pH (Wu et al. 2022). Nejčastěji zde najdeme druhy psychrotrofní, vyskytuje se zde i malé množství mesofilních druhů, ale i určité množství termofilních organismů, je zde tedy bohatá taxonomická i funkční různorodost. Byly identifikovány aerobní heterotrofní organismy, anaerobní bakterie, dusík fixující bakterie a bakterie schopné oxidace a redukce síry (Gilichinsky et al. 1989). I přes extrémní podmínky typické pro permafrost jsou bakterie schopny růst a množit se (Steven et al. 2006). Právě psychrofilní bakterie jsou izolovány ze vzorků spíše zřídka. I u aerobních bakterií jde především o psychrotolerantní druhy, které spory většinou netvoří, ale existují zástupci, které se takto vůči nepříznivým podmínkám bránit mohou, jako tomu je u aerobního rodu bakterií *Virgibacillus* (Steven et al. 2006, Vishnivetskay et al. 2000). Pro houby nejsou podmínky chladného prostředí s přetrvávajícím mrazem příliš příznivé, proto je zde najdeme převážně ve stádiu spor (Vorobyova et al. 20001), přičemž nejčastěji izolovanými zástupci byly kvasinky, ty jsou jedinečné pro svoji fyziologickou aktivitu při teplotách až 20 °C pod bodem mrazu. Mezi nejvíce odolné rody nalezené ve vzorcích permafrostu patří *Cryptococcus*, *Protomyces* a *Rhodotorulla*, vykazující mimořádnou odolnost díky své relativně malé velikosti, vysoké odolnosti vůči nízkým teplotám i schopnosti využít širokou škálu zdrojů uhlíku a dusíku (Vorobyova et al. 1997, Butinar

et al. 2007, Zalar and Gunde-Cimerman, 2013). Dalšími zástupci v permafrostu jsou eukaryota, které za určitých podmínek mohou dokonce převýšit početně prokaryota (Vorobyova et al. 2001).

Mikrobiální společenstva hrají v ekosystému permafrostu klíčovou roli, přeměňují organickou hmotu a přispívají k emisím skleníkových plynů při tání. Jejich změnu lze pozorovat v čase i prostoru, jsou ovlivněna stářím permafrostu, sedimentací, historií tání a minerálním složením (Waldrop et al. 2023). Právě zkoumáním těchto společenstev budeme schopni přijít na to, jak se bude v budoucnu měnit struktura ekosystému permafrostu.

1.2 Extracelulární polymerní látky (EPS)

Extracelulární polymerní látky (EPS) jsou metabolické produkty, které se hromadí na povrchu bakteriálních buněk (Liu and Fang, 2002). Hlavními složkami EPS jsou různé sacharidy a strukturální proteiny, přítomny jsou ale i lipidy, nukleové kyseliny a huminové kyseliny (Flemming 2016). Jejich složení je velmi heterogenní a variabilní, jinak tomu není ani u chemického složení, které je ovlivněno několika faktory i druhem organismu (Bello-Morales et al. 2022). Biosyntéza EPS je energeticky náročný proces, proto jejich produkce podmiňuje výhody pro organismus, jenž je produkuje (Wingender et al. 1999). EPS mohou mít různé struktury i funkce.



Obrázek 1: Složení bakteriálního EPS (Wei et al. 2024). S-EPS – sekreční extracelulární polysacharidy.

EPS matrix, vylučována na povrch bakteriálních buněk, tvoří ochrannou vrstvu chránící proti změnám vnějšího prostředí představující změnu pH nebo teploty (Wingender et al. 1999). Při nepříznivých podmínkách může sloužit jako zdroj uhlíku, a to i jako jediný zdroj u některých bakteriálních druhů (Wang et al. 2006). K dalším funkcím patří schopnost zadržovat vodu v obdobích sucha, ochrana před UV zářením a chemickými látkami, adheze a komunikace mezi mikroby, u které se ukázalo, že probíhá i v rámci interakcí mezi predátorem a kořistí (Flemming et al. 2007, Netrusov et al. 2023). Pro fyzikální vlastnosti půdy a její úrodnost je klíčová schopnost EPS spojovat půdní částice. Tato schopnost je zajištěna jejich slizovitou texturou a iontovými náboji, díky nimž fungují jako lepidlo, které se váže na jílové částice a ionty, čímž udržuje částice pohromadě (Chenu, 1995). Další významný vliv má i na přenos genetického materiálu (exDNA) zodpovědného za adhezivní vlastnosti u některých EPS mezi organismy (Costa et al. 2018).

V arktických oblastech byl prokázán výskyt extracelulárních polymerních látek jako součást rozpuštěného organického uhlíku, biofilmů nebo mikrobiálních společenstev mořského ledu. Současné působení extrémních podmínek (nízká teplota, sucho, vysoká salinita) vede k vysoké heterogenitě prostředí, což spolu se sezónními výkyvy teplot vede k velké míře mikrobiální diverzity, a tedy k produkci polymerů s odlišným složením a úlohou. I přesto, že permafrost na Antarktidě představuje potenciál pro objevení nových mikrobiálních extremofilů, kteří by mohli být využiti pro účely bioprospekce, prozatím je známo jen velmi málo o chemické struktuře EPS z tavných bakteriálních společenstev (Lo Giudice et al. 2020).

1.2.1 Bakteriální producenti EPS

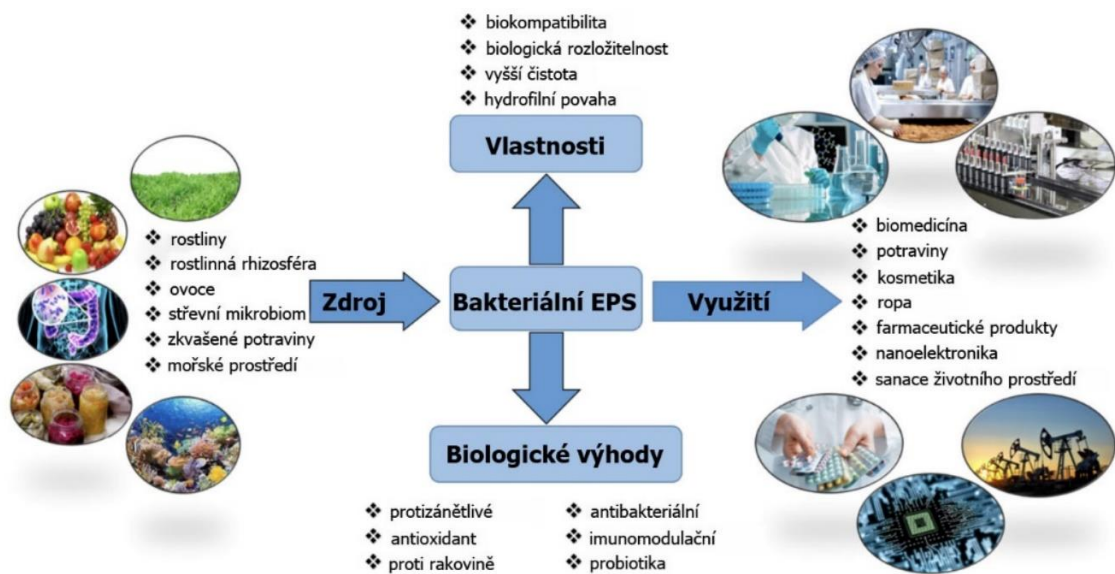
Různá ekologická prostředí, včetně těch s nepříznivými podmínkami, mohou být kolonizována bakteriemi. Většina z těchto bakterií má ochranný buněčný obal, který slouží jako fyzická bariéra nejen pro přežití a toleranci ekologického stresu, ale také pro adaptaci a komunikaci s prostředím, které osidlují. Většina bakterií má svůj povrch pokryt extracelulárními polymerními látkami (EPS), ty byly izolovány z různých organismů. Patří mezi ně zástupci extremofilní, termofilní, halofilní, psychrofilní, acidofilní a alkalifilní (Kaur and Dey, 2023)

1.2.1.1 Rod *Curtobacterium*

Rod *Curtobacterium*, u kterého byla prokázána produkce EPS (Vimal et al. 2019), je znám pro svůj všestranný anaerobní metabolismus (Domingues et al. 2020). Tento organismus vykazuje vysokou produkci hyaluronové kyseliny jako součást EPS. V porovnání se *Streptococcus equisimilis*, který se využívá k průmyslové výrobě tohoto polymeru má rod *Curtobacterium* až o 20% vyšší produkci kyseliny hyaluronové (Parada-Pinilla et al. 2021). Zástupci rodu *Curtobacterium* byly nalezeny v mnoha biotopech včetně půd arktického permafrostu, analýza buněčné stěny vybraných zástupců kmene Actinobacteria ukázala, že se zde rhamnóza vyskytuje jako jeden z dominantních cukrů (Zaychikov et al. 2021).

1.2.2 Využití EPS

V nedávné době získaly bakteriální EPS významnou pozornost kvůli jejich unikátním vlastnostem a možnostem využití v širokém spektru oblastí včetně vědy, průmyslu, medicíny a biotechnologie. Jejich velká výhoda spočívá v možnosti průmyslového získávání po celý rok bez závislosti na počasí či povětrnostních podmínkách (Netrusov et al. 2023). Pro své jedinečné atributy získávají čím dál častější komerční využití v potravinářském, farmaceutickém, kosmetickém, chemickém, textilním nebo třeba ropném průmyslu. V potravinářství nacházejí využití jako zahušťovadla, emulgátory, želírovací přípravky, používají se i pro zlepšení kvality různých potravinářských výrobků. V současné době se o bakteriálním EPS mluví v souvislosti s udržitelným a čistým prostředím, ke kterému by nám tyto látky mohly dopomoci, protože by do budoucna mohly nahradit plastové a těžko rozložitelné materiály (Khalid and Arif, 2022, Pérez-Ramoz et al. 2015, Netrusov et al. 2023). Potenciál můžeme vidět i v biomedicíně, ukazuje se totiž, že některé bakteriální EPS mohou mít protizánětlivé, antioxidační až dokonce protinádorové účinky. Pozornost se nyní velmi zaměřuje na EPS produkované probiotickými bakteriemi (zejména *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* nebo *Enterococcus*), ty se pacientům doporučují užívat jako podpůrná léčba při onemocněních trávicího traktu. Navzdory jejich unikátním vlastnostem je počet průmyslově vyráběných druhů velmi omezený, to může být způsobeno nízkou bakteriální produkcí a vysokými náklady na výsledný produkt (Netrusov et al. 2023, Angelin and Kavitha, 2020).



Obrázek 2: Zdroje bakteriálního EPS, jejich vlastnosti, využití a biologické výhody (Netrusov et al. 2023).

1.3 Struktura EPS

Chemická struktura extracelulárních polymerních látek závisí na prostředí, ve kterém mikroorganismus produkující EPS žije (Nouha et al. 2018). Největší složku EPS tvoří polysacharidy určující antigenní specifitu povrchu většiny buněk (Wilkinson, 1958). Cukerné jednotky (exopolysacharidy) jsou syntetizovány pentózovo fosfátovou cestou odehrávající se v cytoplasmě (Bore et al. 2017), mohou se skládat buď z homopolysacharidů (jejichž produkce převažuje) nebo heterosacharidů. Homopolysacharidy jsou složeny pouze z jednoduchých cukrů, oproti tomu heteropolysacharidy obsahují opakující se jednotky monosacharidů jako je D-glukóza, L-fruktóza nebo L-rhamnóza (Rehm, 2010), v některých případech mohou obsahovat i nesacharidové jednotky představující acetát, glycerát nebo propionát (De Vuyst and Degeest, 1999). Důležitým rozdílem mezi homopolysacharidy a heterosacharidy je místo jejich syntézy a syntetické enzymy. Homopolysacharidy jsou syntetizovány mimo buňku za potřeby speciálního substrátu (jako je sacharóza), který se působením vylučovaných enzymů přeměňuje na polymer. Heteropolysacharidy vznikají intracelulárně přes prekurzorové opakující se jednotky, ty jsou poté translokovány přes membránu za pomoci isoprenoidních glykosylových lipidů pro jejich extracelulární polymerační aktivitu (Kaur and Dey, 2023). Bakteriální EPS jsou charakterizovány přítomností velkého počtu funkčních skupin jako je hydroxyl, karboxyl, karbonyl nebo acetát, které jim umožňují modifikovat své molekuly tak, aby získaly nové cenné vlastnosti (Netrusov et al. 2023).

1.3.1 Rhamnóza

Rhamnóza je deoxyhexózový cukr vyskytující se hojně v bakteriích a rostlinách. Organismy mohou začleňovat rhamnózu do EPS, které produkují, pro zlepšení její struktury, ta totiž může zvýšit strukturní pevnost (Roca et al. 2015). Vyskytuje se ve dvou formách, D-rhamnózy není příliš častá. Oproti tomu L-rhamnózu (enantiomer D-rhamnózy) můžeme najít u mnoha gramnegativních i grampozitivních bakterií, a to i u patogeních zástupců, tvořící prvky buněčné stěny (Mistou et al. 2016, Roca et al. 2015). Deoxycukry jsou klíčovým typem sacharidů lišící se od běžných monosacharidů nahrazením hydroxylových skupin vodíkem (Maki and Renkonen, 2004). Tento monomer je součástí polysacharidů, které díky svým silnějším chemickým strukturám mohou tvořit biofilm (Roca et al. 2015). Některé bakterie nemohou přežít nebo vykazují sníženou virulenci bez přítomnosti L-rhamnózy (Maki and Renkonen, 2004).

L-rhamnóza patří mezi cukry, které se v přírodě nevyskytují v tak velké míře jako třeba D-glukóza nebo D-fruktóza. Svými mnoha vlastnostmi oslovuje různé oblasti aplikace. Spolu s kyselinou uronovou a L-fukózou nachází mnohostranné využití ve farmakologii k tvorbě protizánětlivých léků či antioxidantů (Kumar et al. 2007).

Metabolismus rhamnózy je vysoce konzervovaný, ale běžný u grampozitivních i gramnegativních bakterií kam patří i *Escherichia coli*, u které se vyskytuje jako lipopolysacharid O-antigenu, hlavní složka přispívající k variaci gramnegativní buněčné stěny (Giraud and Naismith, 2000, Li and Reeves, 2000). O-antigen je viditelná část lipopolysacharidu ve vnější vrstvě vnější membrány, skládá se z opakujících se oligosacharidových jednotek o velikosti 3-6 monosacharidových zbytků (Li and Reeves, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* disponuje širokým rozsahem metabolických schopností, což mu umožňuje přizpůsobit se řadě prostředí. Ve svém O-antigenu má zakomponované obě formy rhamnózových zbytků, které podporují virulenci organismu (Maki and Renkonen, 2004). Pro začlenění L-rhamnózy do polysacharidových struktur bakterií je potřeba nejdříve vytvořit prekurzor nukleotidového cukru, samotná katalytická reakce je čtyřstupňová a vede k tvorbě dTDP-L-rhamnózy, která zvyšuje schopnost virulence a bakteriální zdatnost organismu (Mistou et al. 2016). Geny kódující enzymy zapojené do metabolismu rhamnózy se souhrně označují rml. Rhamnóza je v bakteriích přítomna pouze jako složka polysacharidu na jejich povrchu, geny rml jsou uspořádány jako samostatná skupina součástí genové skupiny pro O-antigen. Byly identifikovány 4 geny rml společně

pro řadu druhů, a i když se pořadí u jednotlivých organismů může lišit, ve všech případech byly geny homologní. Tyto geny vykazují určitou variabilitu v rámci druhu i jejich širokého spektra, která se projevuje rhamnózovou hybridizací DNA a to až ve 3 ze 4 pozorovaných rml genů (Li and Reevese, 2000). Mutace v kterémkoliv z genů rml vede až ke ztrátě L-rhamnózy v buněčné stěně bakterie, v jiných případech ovšem žádná ztráta nenastala, záleží tedy na konkrétním druhu (Mistou et al. 2016). Jsou ovšem známy i O-antigeny, které rhamnózu neobsahují (Li and Reevese, 2000).

1.3.2 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová je lineární heteropolysacharid s vysokou molekulovou hmotností složený ze střídajících se N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové. Představuje důležitý materiál pro lékařské, kosmetické a potravinářské aplikace. Známa je pro své pozitivní účinky na růst buněk, proliferaci a hojení ran (Xiao et al. 2013). V kosmetice má kyselina hyaluronová ze všech EPS nejuniverzálnější použití. Její význam spočívá v tom, že představuje hlavní strukturní složku extracelulární matrix pojivové tkáně u lidí a představuje důležitou roli v řízení transportu mezibuněčných makromolekul, hydratace i regulaci imunitní odpovědi. Fyzikálně chemické vlastnosti kyseliny hyaluronové jsou proto využívány v kosmetických produktech pro své klíčové vlastnosti představující mazivost, vazkost nebo elasticitu. Přidává se jako složka do produktů proti stárnutí, což z této kosmetiky dělá pro zájemce jednu z těch nákladnějších investic (Kaur and Dey, 2023).

Pro její komerční získávání se stále více využívá procesu mikrobiálního kvašení (Izawa et al. 2009) nebo extrakce biopolymeru ze zvířecích tkání. V poslední době se zaměření přesunulo na výrobu hyaluronové kyseliny pomocí bezpečných, nepatogenních kmenů, jako jsou kmeny *Streptococcus thermophilus* s vysokou schopností produkce prospěšných EPS, které obsahují hyaluronovou kyselinu a lze je extrahovat z běžných mléčných produktů, i když jsou tyto metody zatím v experimentální fázi, do budoucna nabízí velký potenciál (Mohammed and Niamah, 2022). Určitý problém může představovat nízká produktivita bakterií tvořící kromě kyseliny hyaluronové hlavně glukózu, v tomto odvětví je zapotřebí učinit další výzkum pro nastavení vysoce efektivní výroby EPS (Revin et al. 2022).

1.4 Metodika detekce EPS

Studium EPS je náročné a závisí na metodách analýzy, které využívají běžné chemické sloučeniny pro kvantifikaci. Pro frakce EPS, představující bílkoviny, sacharidy i jiné složky jako jsou huminové kyseliny, se v současné době používají kolorimetrické metody. Ty se vyznačují svou rychlostí, snadnou použitelností i nízkou cenou, nevýhodou ovšem je, že tyto metody slouží pouze ke zjištění koncentrace. Rozbor EPS se provádí s cílem porozumět složení biofilmu a jeho přizpůsobení se změnám v prostředí. Interpretace založená na tomto složení může být správná pouze tehdy, jsou-li výsledky dostatečně přesné a pečlivě aplikované (Felz et al. 2019).

1.4.1 Mikroskopické metody detekce EPS

Bylo vyvinuto hned několik mikroskopických metod, které jsou schopné zobrazit označené i neoznačené bakteriální EPS, a to ve vysokém rozlišení. Tyto metody jsou široce uznávané díky jejich významnému potenciálu ve zkoumání biofilmů (Pan et al. 2016).

Jeden z typů mikroskopické detekce EPS se nazývá rastrovací elektronová mikroskopie (SEM), ta využívá interakce elektronů s látkami pomocí jemně zaostřených paprsků s vysokou energií ke skenování vzorků ve vakuu, což umožňuje získávání různých fyzikálních vlastností. Získané informace lze při zobrazení zvětšit, tím dokážeme získat 3D obraz povrchu vzorku. Vzhledem k tomu, že biologické vzorky nemají vodivé vlastnosti, musí být vzorky biofilmu před pozorováním pomocí SEM precizně a důkladně zpracovány pomocí fixace vzorku, dehydratace a následného nanášení tenké vrstvy vodivého kovu, kterým může být třeba zlato. Zpracování vzorku je tedy složité a proces sušení může ovlivnit pozorování skutečného vzhledu vzorku, i přes to se dá tato metoda použít i k porovnání vzhledu EPS za různých podmínek (Huang et al. 2022, Pan et al. 2016).

Další velmi často používanou metodou je transmisní elektronová mikroskopie (TEM), využívá zrychlený a koncentrovaný paprsek pro prosvícení extrémně tenkého vzorku ve vakuu, to vede k jeho rozptylu pod pevným úhlem. Velikost úhlu rozptylu je pak úměrná hustotě vzorku, což umožňuje vytváření obrazů s různými odstíny. Mezi hlavní výhody patří vysoké rozlišení a velké zvětšení a používání techniky ultratenkých řezů k selektivnímu pozorování různých vrstev mikrobiálních agregátů. To může být velmi

nápomocné pro komplexní pochopení struktury a distribuce EPS v mikrobiálních agregátech (Huang et al. 2022).

Metoda CLSM je založena na fluorescenční mikroskopii, využívá laserový skenovací paprsek k vytvoření bodového zdroje světla skrz malou díрку, který poté skenuje každý bod v ohniskové rovině. Světelný signál jednotlivých bodů je zachycován pomocí detekční dířky, následně je detekován a shromažďován pomocí fotonásobičové trubice. Po zpracování signálu je následně poslán do počítače pro zobrazení 3D struktury. Touto metodou lze provést kvalitativní i kvantitativní hodnocení složek vzorku díky možnosti použití různých fluorescenčních barev. Při zkoumání EPS lze touto metodou vizualizovat distribuci polysacharidů, proteinů nebo nukleových kyselin (Lin et al. 2016), ne všechny složky EPS jdou obarvit, proto metoda CLSM může poskytnout informace o složkách barvitelných (Huang et al. 2022, Pan et al. 2016).

Mikroskopie atomárních sil (AFM) pracuje tak, že udržuje konstantní odpudivou sílu mezi sondou a povrchem vzorku pomocí mikrokantileveru. Sonda je k mikrokantileveru připevněná a dotýká se povrchu vzorku, to způsobuje, že s ním pohybuje a senzor poté zaznamenává pohyb vzorku. AFM využívá topografické zobrazování s vysokým rozlišením (až miliardkrát) a zobrazování laterálních sil k odhalení vnějších znaků EPS a vytváření jejich grafické vizualizace. (Huang et al. 2022).

Každá z metod má své výhody i nevýhody, proto se může přistoupit ke kombinaci metod pro zjištění co nejpřesnějších výsledků ať už jde o charakterizaci stejné vlastnosti více metodami nebo zjištění několika různých znaků (Huang et al. 2022).

1.4.2 Molekulární metody detekce EPS

Nové technologie i snižování nákladů na sekvenování vede k zájmu o molekulární metody detekce EPS. Toto studium ovšem není vůbec jednoduché, a to díky genetické specifitě každého organismu, protože genetická variabilita není záležitostí jen mezidruhovou, ale i v rámci jednoho druhu, ty totiž interagují se svými stanovišti, na kterých se nacházejí, což má za následek jejich genetickou specifitost, představující adaptaci na podmínky (Wooley et al. 2010). Pro molekulární metody detekce DNA je důležité správně nadesignovaný primer s vysokou specifitou. Návrh specifických primerů vyžaduje různé typy genomických informací, kromě cílové sekvence DNA to mohou být i opakující se prvky DNA. Všechny potřebné informace jsou poté zkombinovány a

předány programu pro jeho samotné vytvoření. Celý proces je zdlouhavý, a i po navržení primerů je nutná optimalizace jejich použití, která může být časově i prostředkově náročná (Piriyapongsa et al. 2009). Což je hlavním důvodem častějšího využívání detekce EPS pomocí mikroskopických metod.

2 Cíle práce

Cílem této práce je zjistit, zda se genetická informace zodpovědná za metabolické dráhy rhamnózy a kyseliny hyaluronové vyskytuje u bakteriálních producentů EPS nalezených v permafrostu.

3 Materiály a metody

3.1 Použité druhy bakterií

Půdní vzorky permafrostu byly odebrány ve Fairbanks na Aljašce v USA roku 2021. Vzorky pochází jak z vlhkého, tak suchého prostředí porovnané s kontrolní neroztátou půdou permafrostu. Využité vzorky pro tento výzkum byly izolovány a identifikovány a byla u nich potvrzena produkce EPS v letech 2022 – 2023. Tyto bakterie byly vybrány na základě jejich vysoké koncentrace glukózy v extracelulárních sloučeninách a jejich druhové různorodosti (viz. Tabulka 1).

Tabulka 1: Bakterie vybrané pro tento výzkum se zjištěnou vyšší koncentrací EPS.

název bakterie	kmen bakterie	(mg/L) koncentrace EPS	číslo vzorku
<i>Streptomyces brevispora</i>	Actinomycetota	343	A11
<i>Microbacterium flavescens</i>	Actinomycetota	137	A2
<i>Luteimonas arsenica</i>	Proteobacteria	227	A12
<i>Curtobacterium (oceanosedimentum)</i>	Actinobacteria	217	S7
<i>Peribacillus simplex</i>	Firmicutes	87	S3
<i>Bacillus micoides</i>	Firmicutes	515	A24
<i>Leclercia (adecarboxylata/sp.)</i>	Proteobacteria	667	S5
Nekultivováno		966	S2
<i>Frigoribacterium faeni</i>	Actinobacteria	943	S17
<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	Actinobacteria	208	S23
<i>Curtobacterium (oceanosedimentum)</i>	Actinobacteria	1309	A17

3.2 Izolace DNA

Izolace DNA i analýza PCR byla provedena podle protokolu užívaného v molekulární laboratoři Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Nejdříve bylo 1,8 ml mikrobiální kultury převedeno do 2 ml zkumavek, poté byl vzorek stočen a přebytečná tekutina byla odstraněna. Na dně zůstala peleta, která byla rozpuštěna ve 300 µl roztoku PowerBead, ten obsahuje pufr, který stabilizuje a homogenně rozptyluje mikrobiální vzorky před lýzou. Vzorek byl promíchán a přenesen do zkumavky PowerBead. Po přidání 50 µl roztoku SL byl vzorek vložen do přístroje Mini-Beadbeater™ na dobu 30 sekund. Zkumavky byly přesunuty do centrifugy na dalších 30 sekund

při maximálním výkonu. Tekutina byla odsáta mikropipetou a přendána do čisté zkumavky o objemu 2 µl. Po přidání 100 µl roztoku IRS byl vzorek přendán na led na 5 minut. Roztok IRS způsobuje vysrážení non-DNA organických i anorganických materiálů jako jsou buněčné fragmenty a proteiny. Vzorek byl vrácen do centrifugy na 1 minutu a poté byla všechna tekutina bez pelety přenesena mikropipetou do čisté sběrné zkumavky. Dále bylo do vzorku přidáno 900 µl roztoku SB, který vytváří podmínky s vysokým obsahem soli, které jsou nezbytné pro navázání DNA na membránu mikrozkumavek v dalším kroku. Na membránu mikrozkumavky bylo přidáno 700 µl vzorku a zkumavka byla stočená pomocí centrifugy. Tekutina, která prošla membránou byla vylita, tento postup byl opakován s celkovým množstvím vzorku. Poté bylo na membránu přidáno 300 µl roztoku CB a vzorek byl opět dán do centrifugy, přebytečná tekutina, která protekla byla vylita. Roztok CB je založen na bázi ethanolu a jeho úkolem je zbavit membránu přebytečné soli a jiných kontaminantů, DNA ale zůstává navázaná na membránu. Do čisté 2 µl zkumavky byla přendána membrána z mikrozkumavky, na jejíž střed bylo přidáno 50 µl roztoku EB. Zkumavka byla dána do centrifugy na 30 sekund, membrána byla poté vyhozena a vzorek byl zamražen pro pozdější použití na kvantifikaci.

DNA bakterií byla extrahována ze vzorků podle pokynů příručky DNeasy UltraClean microbial kit 2020 firmy QIAGEN z ledna 2020.

3.3 Kvantifikace DNA

Pro kvantifikaci DNA byl připraven roztok 1x TE pufru a roztoku s barvou pro 15 vzorků podle Tabulky 2. Pro 15 vzorků byl připraven roztok 1x TE pufr pomocí smíchání 150 µl 20x TE pufru a 2850 µl 0,1% vody ošetřené DEPC (diethylpyrokarbonát). Pro roztok s barvou bylo odebráno 1492,5 µl 1x TE pufru, který byl smíchán se 7,5 µl barvy QuantiFluor. Blank (kontrolní vzorek) byl připraven pomocí smíchání 100 µl roztoku 1x TE pufru a 100 µl roztoku s barvou QuantiFluor. Standard a vzorky obsahující DNA byly připraveny smícháním 98 µl 1x TE pufru, 100 µl roztoku s barvou a 2 µl standardu nebo DNA. Před měřením koncentrace byly vzorky uschovány několik minut ve tmě. Výsledné koncentrace vzorků s DNA byla změřena pomocí fluorometru Quantus (značky Promega).

Tabulka 2: Příprava roztoků pro DNA kvantifikaci.

Připravované roztoky	Složky roztoku	Množství na 1 vzorek
1x TE pufr	20x TE pufr	10,0 µl
	DEPC H ₂ O	190,0 µl
roztok s barvou	1x TE pufr	99,5 µl
	barva QuantiFluor	0,5 µl

3.4 Polymerázová řetězová reakce - PCR

Pro PCR byl v digestoři připraven mastermix (předpřipravená směs reaktivních složek). Bylo smícháno 10,7 µl ddH₂O, 12,5 µl FastPCR pufru, 0,3 µl BSA, 0,25 µl od F i R primeru (kódující primer 9bfm, antikódující 1512uR) a 1 µl DNA. Jako pozitivní kontrola byla použita bakterie *Curtobacterium oceanosedimentum* představující vzorek A17, pro negativní kontrolu byla použita voda (H₂O). Pro PCR byl použit termocykler Labcycle německé značky SensoQuest GmbH. Na začátku proběhla úvodní denaturace při teplotě 95 °C, tato fáze trvala 3 minuty. Poté následovala fáze 30 cyklů rozdělených do 3 časových úseků po 60 sekundách. Počáteční fáze denaturace při 94 °C, navázání primerů na kompletní úseky cílové DNA při 60 °C a fáze extenze, dochází k syntéze nového DNA řetězce na základě cílové DNA šablony, při teplotě 72 °C. Poslední fáze elongace trvala 10 minut při teplotě 72 °C. Přehled primerů použitých pro metody PCR je zobrazen v Tabulce 3.

Tabulka 3: Primery použité pro metodu PCR.

Použité primery	Typ primeru	Sekvence aminokyselin
Rhamnóza 1	kódující	5'-CGAGCTCGACATCACCGAC 3'
	antikódující	5'ACGTAGTCGGTGGAGACCT- 3'
Rhamnóza 2	kódující	5'-CCACCGACTACGTCTTCGAC 3'
	antikódující	5'GACCATCGTCTTGACGAAGTTC- 3'
Kyselina hyaluronová 1	kódující	5'-AACCTCGTGTTAACCAGCCG 3'
	antikódující	5'ATGGTAAACGCCACGCCTTA- 3'
Kyselina hyaluronová 2	kódující	5'-CTCTGTATAAGGCGTGGCGT 3'
	antikódující	5'CTCGGATCGACGATGGTAG- 3'

3.5 Gelová elektroforéza

Nejdříve byl připraven 1 % agarózový gel, který byl připraven tak, že do 1x TE pufru byl přidán agarózový prášek. Postupným zahříváním v mikrovlnné troubě byl prášek rozpuštěn až vznikla čirá kapalina, která byla poté pod tekoucí vodou zchlazena, aby do ní mohl být přidán roztok LeliDNA fluorescenční barvy. Po promíchání byl roztok nalit do připravené nalévací vany s hřebínky a ponechán 1 hodinu stranou, než gel zatuhl. Pomocí mikropipety byly na gel přidávány 4 μ l produktu amplifikovaného pomocí PCR smíchaného s 1 μ l barvy. Do první jamky bylo přidáno 5 μ l velikostního markeru (ladder). Gelová elektroforéza byla spuštěna při 120 V na 45 minut. Výsledný gel byl zobrazen pomocí transiluminátoru Azure 200 (Azure Biosystem, Inc, US).

4 Výsledky a diskuse

4.1 Druhová rozmanitost

Pro výzkum byly vybrány zástupci kmenů s prokázanou produkcí kyseliny hyaluronové. Podle Izawa et al. (2009) rod *Streptococcus*, patřící do kmene Firmicutes, prokazatelně produkuje hyaluronovou kyselinu, proto jsme na základě příbuznosti se zástupci *Peribacillus simplex* a *Bacillus micoides* očekávali, že se nám podaří prokázat produkci i u těchto zástupců. Bohužel námi vybrané metody pro potvrzení produkce kyseliny hyaluronové nebyly úspěšné. Druhy ostatních kmenů použité v této práci nebyly v aktuálních výzkumech označeny za producenty kyseliny hyaluronové. Za její producenty se považují především bakterie mléčného kvašení (Izawa et al. 2009), a jelikož naši producenti EPS byli odebráni z permafrostových půd, může tím být odhadnuto, že za těchto podmínek se genetické předpoklady pro tuto produkci nebudou u těchto izolátů vyskytovat. Pro produkci v tomto prostředí by na metabolismus hyaluronové kyseliny bylo prospěšné mít více zaměřených studií, jelikož se postupně prokazuje, že kyselina hyaluronová dokáže ovlivnit a regulovat relativní podíl mikroorganismů a tím dochází k rovnováze mezi druhy, které jí jsou schopni produkovat (Zhang et al. 2023), tyto studie bude ještě nutné provést v půdním prostředí, aby se tyto teorie mohly potvrdit.

Naopak o produkci rhamnózy půdními druhy bakterií existuje více informací. Rhamnóza patří mezi vzácné cukerné složky, které mohou být za určitých omezených podmínek vylučovány jako součást bakteriálního EPS, především potom buněčné stěny (Roca et al. 2015). *Curtobacterium*, představující v našem výzkumu pozitivní kontrolu, byl na základě genomové sekvence prokazatelně označen jako producent rhamnózy, jako součást buněčné stěny obsahuje rhamnan, což je polysacharid tvořený z řetězců rhamnózy (Zaychikov et al. 2021). Lze tedy předpokládat, že *Curtobacterium* použité v našem výzkumu bude pravděpodobně také producentem rhamnózy, předmětem dalšího zkoumání bude tento předpoklad potvrdit. Bude nutné detailně prozkoumat genový klastr kódující produkci rhamnózy, navrhnout primery na např. konzervativnější úseky. Srovnávací studie zkoumající složení buněčné stěny u čeledi *Microbacteriaceae* z kmene Actinobacteria prokázala strukturní specifitu glykopolymerů v buněčné stěně mezi jednotlivými druhy bakterií (Zaychikov et al. 2021), neprokázání produkce rhamnózy u *Curtobacteria*, *Frigoribacterium faeni* a *Pseudarthrobacter sulfonivorans* nemusí znamenat pouze špatně navržené primery, ale může být zapříčiněno druhovou odlišností.

4.2 Výsledky PCR a gelové elektroforézy

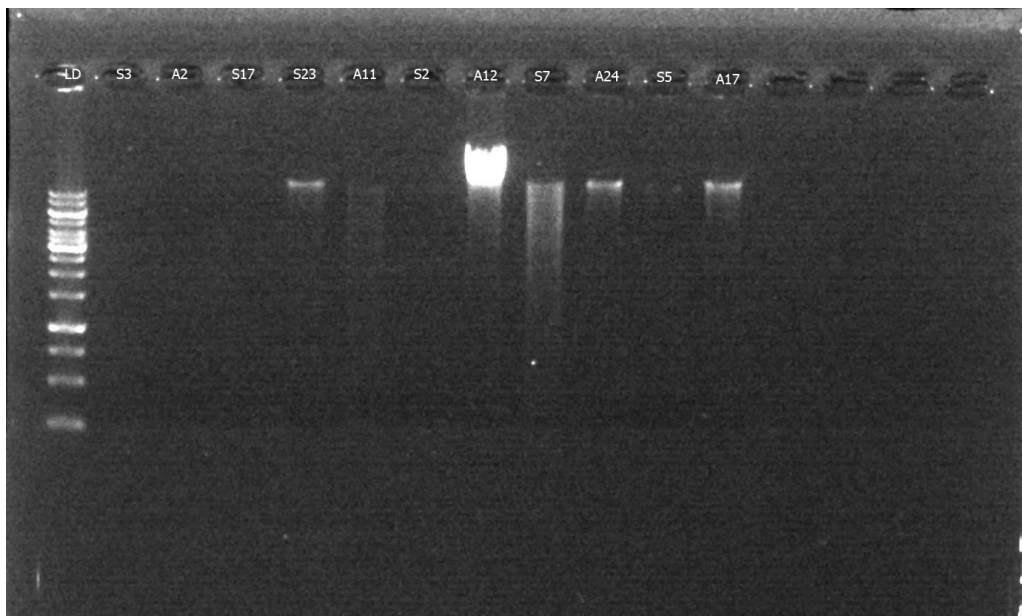
4.2.1 Zjištění kvality DNA izolátů

Použité bakteriální druhy izolované z permafrostu jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Naměřená koncentrace DNA u vzorků.

Název bakterie	(ng/ul) Koncentrace DNA	Číslo vzorku
<i>Streptomyces brevispora</i>	23	A11
<i>Microbacterium flavescens</i>	0,075	A2
<i>Luteimonas arsenica</i>	104	A12
<i>Curtobacterium (oceanosedimentum)</i>	85	S7
<i>Peribacillus simplex</i>	1,51	S3
<i>Bacillus micoides</i>	31	A24
<i>Leclercia (adecarboxylata/sp.)</i>	7,4	S5
Nekultivováno	2,67	S2
<i>Frigoribacterium faeni</i>	0,29	S17
<i>Pseudarthrobacter sulfonivorans</i>	18	S23
<i>Curtobacterium (oceanosedimentum)</i>	77	A17

Pro kontrolu čistoty vzorků byla provedena gelová elektroforéza bez předchozí úpravy pomocí PCR. Touto metodou jsme si chtěli ověřit kvalitu DNA našich vzorků. Výsledek pokusu byl zobrazen na Obrázku 3.

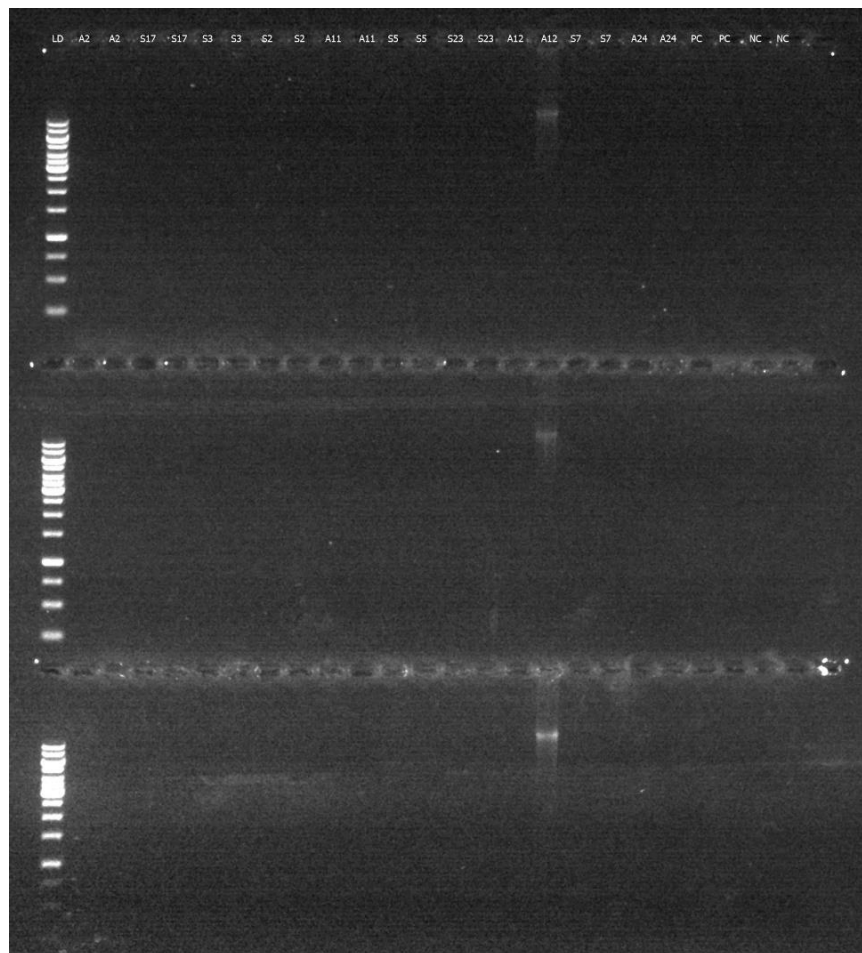


Obrázek 3: Výsledek gelové elektroforézy reálné koncentrace použitých vzorků.

Ze vzorků *Pseudarthrobacter sulfonivorans* (S23), *Bacillus micoides* (A24) a *Curtobacterium (oceanosedimentum)* (A17) byla izolovaná málo fragmentovaná a kvalitní DNA, u *Streptomyces brevispora* (A11) a *Curtobacterium (oceanosedimentum)* (S7) je vidět tzv. „smear“, který ukazuje na částečně degradovanou DNA. U vzorku *Luteimonas arsenica* (S7) je vysoké množství kvalitní, neporušené DNA. Vzorky s příliš nízkou koncentrací DNA (viz. Tabulka 4) se na výsledném gelu nezobrazily.

4.2.1 Testování PCR podmínek

Pro testování PCR podmínek byly použité různé koncentrace vzorků, a to koncentrace neředěné i ředěné. Vzorky DNA byly naředěny zhruba na 2 ng/μl. Teplota u provedené PCR pro nasedání primerů byla 60 °C, tato teplota byla vybrána jako počáteční zkušební teplota na základě navržené sekvence primerů. Nakonec byla provedena gelová elektroforéza pro zobrazení výsledků (viz. Obrázek 4).



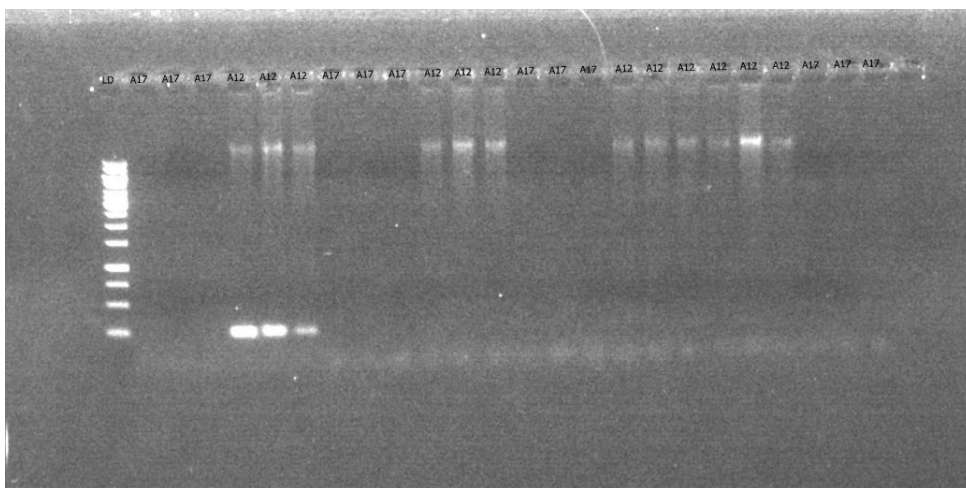
Obrázek 4: Výsledek gelové elektroforézy vzorků různých koncentrací při teplotě nasedání primerů 60 °C. LD – 250 DNA ladder, PC – pozitivní kontrola, NC – negativní kontrola, označení vzorků viz. Tabulka 1.

Na gelové elektroforéze je očividné, že využití již popsaných podmínek PCR navržených primerů nebyla úspěšná. Jediný pozitivní vzorek představující *Luteimonas arsenica* (koncentrace DNA činila 104 ng/ µl), byl s největší pravděpodobností pozitivní pouze z důvodu velice vysoké DNA koncentrace, a tudíž se jednalo o falešnou pozitivitu, jelikož nebyl tento vzorek za nižší koncentrace viditelný. Pozitivní kontrola zastupující *Curtobacterium oceanosedimentum*, podle kterého byly primery designovány, nevyšlo také, proto se dá předpokládat, že bude potřeba znovu navrhnout vhodnější primery.

Postup byl zopakován s polovičními koncentracemi primerů i vzorků, gelová elektroforéza ovšem ukázala identické, a to negativní výsledky.

4.2.2 Gradientová PCR

Pro vyzkoušení různých teplot pro nasedání primerů byla provedena gradientová PCR, pro kterou se použilo *Curtobacterium oceanosedimentum* (PC) a *Luteimonas arsenica* (A12), jelikož se jednalo o pozitivní produkt předchozí PCR. Vybrané teploty pro tuto metodu byly 53 °C, 55 °C a 57 °C. Vzhledem k velké specifitě použitých primerů, bylo odhadováno, že snížení teploty by mohlo pomoci ke snazšímu nasedání primerů, podle Sipos et al. (2007) je důležité najít nejnižší možnou teplotu, při které mohou primery nasedat, aby byla zachována specifita, ale aby nedošlo k misprimingu. Dané vzorky byly neředěny a o koncentraci DNA (*Curtobacterium sedimentum* při koncentraci DNA 85 ng/μl, *Luteimonas arsenica* při koncentraci 104 ng/μl), stejně tomu bylo i u primerů, jejichž koncentrace nebyla nijak pozměněna. Výsledek gradientové PCR byl zobrazen pomocí gelové elektroforézy (viz. Obrázek 5).



Obrázek 5: Výsledek gelové elektroforézy pro gradientovou PCR vzorků *Curtobacterium sedimentum* a *Luteimonas arsenica*.

Na výsledku gradientové PCR lze vidět, že ve všech případech pozitivita byl úspěšný pouze vzorek *Luteimonas arsenica* (A12), vzorek *Curtobacterium sedimentum* (PC) nebyl úspěšný ani v jednom případě.

V případě primeru pro Rhamnózu 1 můžeme vidět, že DNA není zcela čistá, vyskytuje se zde totiž i proužek o neznámé velikosti. Pozitivní PCR amplikony u *Luteimonas arsenica* byly přečištěny pomocí Qiagen PCR Cleaning kitu a poslány na sekvenaci do SEQme. Výsledky budou v budoucnu porovnávány, avšak v aktuální době nelze jednoznačně potvrdit ani vyvrátit pozitivitu pro primery Rhamnóza 1 a 2.

Pro eliminaci kontaminace vzorků byly všechny druhy zpětně kultivovány na Petriho misky s tuhým EPS médiem. Kontaminace byla vyloučena ve všech případech, tudíž důvodem negativních výsledků bude s vysokou pravděpodobností problém ve špatně zvolených postupech pro metody PCR, může být i ve špatně provedené extrakci DNA nebo v metodách navrhování primerů. Pro správnou funkčnost primeru musí být splněno několik podmínek, pokud primer nebude optimálně navržen, může dojít k selhání reakce v důsledku nespecifické amplifikace, tvorbě dimerů nebo samokomplementarity (Apte and Daniel, 2009, Rychlik, 1995). Při navrhování primerů v programu Geneious se však tyto faktory jako je pravděpodobnost tvorby dimerů, vlásenek (hairprintů) testují. Toto může být i důvod, proč námi navržené primery neprokázaly výskyt genů pro rhamnózu a kyselinu hyaluronovou u vybraných izolátů. Genetická sekvence podílející se na produkci EPS u bakterií se mezi jednotlivými zástupci může významně lišit, vysoká specifická primeru je schopná vyloučit možnost nasednutí na DNA geneticky vzdálenějšího organismu (Piriyaongsa et al. 2009, Wooley et al. 2010).

5 Závěr

Nově navržená metodika využívající detekci specifických genů pro produkci rhamnózy a hyaluronové kyseliny, jako indikátory produkce extracelulárních polymerních látek, nebyla ještě optimalizovaná. Bude potřeba navrhnout a otestovat nově navržené primery a optimalizovat PCR podmínky. Dále by po konzultaci se školitelem byla možnost využít naší metagenomické a metatranskriptomické analýzy původní DNA a RNA, kde by bylo možné navrhnout primery na sekvence přítomných genů účastnících se syntézy EPS.

6 Seznam literatury

ANGELIN, J. a M. KAVITHA. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, roč. 162, s. 853–865. ISSN 0141-8130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190

APTE, Arun a Saurabha DANIEL. PCR Primer Design. *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009, roč. 2009, č. 3, s. pdb.ip65. ISSN 1940-3402, 1559-6095. DOI: 10.1101/pdb.ip65

BELLO-MORALES, Raquel et al. Extracellular Polymeric Substances: Still Promising Antivirals. *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022, roč. 14, č. 6, s. 1337. ISSN 1999-4915. DOI: 10.3390/v14061337

BORE, Ezekiel K. et al. Microbial Metabolism in Soil at Subzero Temperatures: Adaptation Mechanisms Revealed by Position-Specific ¹³C Labeling. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 2017, roč. 8. ISSN 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00946

BOTTOS, Eric M et al. Dispersal limitation and thermodynamic constraints govern spatial structure of permafrost microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 2018, roč. 94, č. 8. ISSN 1574-6941. DOI: 10.1093/femsec/fiy110

BUTINAR, Lorena, Isabel SPENCER-MARTINS a Nina GUNDE-CIMERMAN. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eukaryotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2007, roč. 91, č. 3, s. 277–289. ISSN 1572-9699. DOI: 10.1007/s10482-006-9117-3

COSTA, Ohana Y. A., Jos M. RAAIJMAKERS a Eiko E. KURAMAE. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Frontiers in Microbiology*. undefined, 2018, roč. 9. ISSN 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01636

DE VUYST, Luc a Bart DEGEEST. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999, roč. 23, č. 2, s. 153–177. ISSN 0168-6445. DOI: 10.1016/S0168-6445(98)00042-4

DOMINGUES, Patrícia M. et al. Biosurfactant Production in Sub-Oxic Conditions Detected in Hydrocarbon-Degrading Isolates from Marine and Estuarine Sediments. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020, roč. 17, č. 5, s. 1746. ISSN 1660-4601. DOI: 10.3390/ijerph17051746

FELZ, Simon et al. Chemical characterization methods for the analysis of structural extracellular polymeric substances (EPS). *Water Research*. 2019, roč. 157, s. 201–208. ISSN 0043-1354. DOI: 10.1016/j.watres.2019.03.068

FLEMMING, Hans-Curt. EPS—Then and Now. *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2016, roč. 4, č. 4, s. 41. ISSN 2076-2607. DOI: 10.3390/microorganisms4040041

FLEMMING, Hans-Curt, Thomas R. NEU a Daniel J. WOZNIAK. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 2007, roč. 189, č. 22, s. 7945–7947. DOI: 10.1128/jb.00858-07

GILICHINSKIY, D. A. et al. MICROBIOLOGY OF SEDIMENTARY MATERIALS IN THE PERMAFROST ZONE. *International Geology Review*. Taylor & Francis Group, 1989. DOI: 10.1080/00206818909465938

GIRAUD, Marie-France a James H NAISMITH. The rhamnose pathway. *Current Opinion in Structural Biology*. 2000, roč. 10, č. 6, s. 687–696. ISSN 0959-440X. DOI: 10.1016/S0959-440X(00)00145-7

HUANG, Xiaoxiao et al. Characterization of Extracellular Polymeric Substances by Microscopic Imaging Techniques in Wastewater Biotreatment: A Review. *Environmental Engineering Science*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2022, roč. 39, č. 6, s. 493–511. DOI: 10.1089/ees.2021.0199

IZAWA, Naoki et al. *Streptococcus thermophilus* produkuje exopolysacharidy včetně kyseliny hyaluronové. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, roč. 107, č. 2, s. 119–123. ISSN 1389-1723. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008.11.007

JANSSON, Janet K. a Neslihan TAŞ. The microbial ecology of permafrost. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 2014, roč. 12, č. 6, s. 414–425. ISSN 1740-1534. DOI: 10.1038/nrmicro3262

KAUR, Navneet a Priyankar DEY. Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. *Research in Microbiology*. 2023, roč. 174, č. 4, s. 104024. ISSN 0923-2508. DOI: 10.1016/j.resmic.2022.104024

KHALID, Muhammad Yasir a Zia Ullah ARIF. Novel biopolymer-based sustainable composites for food packaging applications: A narrative review. *Food Packaging and Shelf Life*. 2022, roč. 33, s. 100892. ISSN 2214-2894. DOI: 10.1016/j.fpsl.2022.100892

LI, Qun a Peter R. REEVES. Genetic variation of dTDP-l-rhamnose pathway genes in *Salmonella enterica* The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are AF279615–AF279625 for the rml gene sets and AF279626–AF279648 for the rmlB gene fragments. *Microbiology*. Microbiology Society, 2000, roč. 146, č. 9, s. 2291–2307. ISSN 1465-2080. DOI: 10.1099/00221287-146-9-2291

LIN, Di et al. Interactions of EPS with soil minerals: A combination study by ITC and CLSM. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016, roč. 138, s. 10–16. ISSN 0927-7765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.026

LIU, Hong a Herbert H.P. FANG. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology*. 2002, roč. 95, č. 3, s. 249–256. ISSN 01681656. DOI: 10.1016/S0168-1656(02)00025-1

LO GIUDICE, Angelina et al. Peculiarities of extracellular polymeric substances produced by Antarctic bacteria and their possible applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020, roč. 104, č. 7, s. 2923–2934. ISSN 1432-0614. DOI: 10.1007/s00253-020-10448-8

MÄKI, Minna a Risto RENKONEN. Biosynthesis of 6-deoxyhexose glycans in bacteria. *Glycobiology*. 2004, roč. 14, č. 3, s. 1R-15R. ISSN 0959-6658. DOI: 10.1093/glycob/cwh040

MISTOU, Michel-Yves, Iain C. SUTCLIFFE a Nina M. VAN SORGE. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016, roč. 40, č. 4, s. 464–479. ISSN 1574-6976. DOI: 10.1093/femsre/fuw006

MOHAMMED, Ameer A. a Alaa Kareem NIAMAH. Identifikace a antioxidační aktivita kyseliny hyaluronové extrahované z lokálních izolátů *Streptococcus thermophilus*. *Materials Today: Proceedings*. 2022, roč. 60, s. 1523–1529. ISSN 2214-7853. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.12.038

NETRUSOV, Alexander I. et al. Exopolysaccharides Producing Bacteria: A Review. *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2023, roč. 11, č. 6, s. 1541. ISSN 2076-2607. DOI: 10.3390/microorganisms11061541

PAN, Mei et al. Detection Techniques for Extracellular Polymeric Substances in Biofilms: A Review. *BioResources*. 2016, roč. 11, č. 3, s. 8092–8115. ISSN 19302126, 19302126. DOI: 10.15376/biores.11.3.8092-8115

PARADA-PINILLA, Maria Paula et al. Biopolymer production by halotolerant bacteria isolated from Caatinga biome. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021, roč. 52, č. 2, s. 547–559. ISSN 1678-4405. DOI: 10.1007/s42770-021-00426-1

PÉREZ-RAMOS, Adrián et al. Current and Future Applications of Bacterial Extracellular Polysaccharides. . 2015, s. 329–344. ISBN 978-0-12-802189-7. DOI: 10.1016/B978-0-12-802189-7.00022-8

PIRIYAPONGSA, Jittima et al. REXPrimer: an integrated primer designing tool increases PCR effectiveness by avoiding 3' SNP-in-primer and mis-priming from structural variation. *BMC Genomics*. 2009, roč. 10, č. 3. DOI: 10.1186/1471-2164-10-S3-S4

REHM, Bernd H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 2010, roč. 8, č. 8, s. 578–592. ISSN 1740-1534. DOI: 10.1038/nrmicro2354

REVIN, Viktor V. et al. Bacterial Cellulose-Based Polymer Nanocomposites: A Review. *Polymers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2022, roč. 14, č. 21, s. 4670. ISSN 2073-4360. DOI: 10.3390/polym14214670

ROCA, Christophe et al. Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, 2015, roč. 6. ISSN 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00288

RYCHLIK, Wojciech. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Molecular Biotechnology*. 1995, roč. 3, č. 2, s. 129–134. ISSN 1559-0305. DOI: 10.1007/BF02789108

SIPOS, Rita et al. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*. 2007, roč. 60, č. 2, s. 341–350. ISSN 0168-6496. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x

STEVEN, Blaire et al. Microbial ecology and biodiversity in permafrost. *Extremophiles*. 2006, roč. 10, č. 4, s. 259–267. ISSN 1433-4909. DOI: 10.1007/s00792-006-0506-3

SURESH KUMAR, Anita, Kalpana MODY a Bhavanath JHA. Bacterial exopolysaccharides – a perception. *Journal of Basic Microbiology*. 2007, roč. 47, č. 2, s. 103–117. ISSN 1521-4028. DOI: 10.1002/jobm.200610203

VIMAL, Shobhit Raj, Vikas Kumar PATEL a Jay Shankar SINGH. *Růst rostlin Curtobacterium albidum* kmen SRV4: Zemědělsky významný mikrob ke zmírnění stresu ze slanosti u neloupaných rostlin. *Ecological Indicators*. 2019, roč. 105, s. 553–562. ISSN 1470-160X. DOI: 10.1016/j.ecolind.2018.05.014

VISHNIVETSKAYA, Tatiana et al. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles*. 2000, roč. 4, č. 3, s. 165–173. ISSN 1431-0651, 1433-4909. DOI: 10.1007/s007920070031

VOROBYOVA, E. et al. *Micro-organisms and biomarkers in permafrost*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001. ISBN 978-0-7923-6784-0. DOI: 10.1007/978-94-010-0684-2_36

VOROBYOVA, Elena et al. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 1997, roč. 20, č. 3–4, s. 277–290. ISSN 0168-6445. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1997.tb00314.x

WALDROP, Mark P et al. Permafrost microbial communities and functional genes are structured by latitudinal and soil geochemical gradients. *The ISME Journal*. 2023, roč. 17, č. 8, s. 1224–1235. ISSN 1751-7362. DOI: 10.1038/s41396-023-01429-6

WANG, Zhiping et al. Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Chemosphere*. 2006, roč. 63, č. 10, s. 1728–1735. ISSN 0045-6535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.09.018

WEI, Zhuo et al. The role of extracellular polymeric substances (EPS) in chemical-degradation of persistent organic pollutants in soil: A review. *Science of The Total Environment*. 2024, roč. 912. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.168877

WILKINSON, J. F. THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES OF BACTERIA. *Bacteriological Reviews* [online]. 1958, roč. 22, č. 1, s. 46–73 [cit. 09.04.2024]. ISSN 0005-3678. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180929/>

WINGENDER, Jost, Thomas R. NEU a Hans-Curt FLEMMING. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In: WINGENDER, Jost, Thomas R. NEU a Hans-Curt FLEMMING, eds. *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1999, s. 1–19. ISBN 978-3-642-60147-7. DOI: 10.1007/978-3-642-60147-7_1

WOOLEY, John C., Adam GODZIK a Iddo FRIEDBERG. A Primer on Metagenomics. *PLOS Computational Biology*. Public Library of Science, 2010, roč. 6, č. 2. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000667

WU, Ruonan et al. Permafrost as a potential pathogen reservoir. *One Earth*. 2022, roč. 5, č. 4, s. 351–360. ISSN 25903322. DOI: 10.1016/j.oneear.2022.03.010

XIAO, Longxi et al. Hyaluronic Acid-Based Hydrogels Containing Covalently Integrated Drug Depots: Implication for Controlling Inflammation in Mechanically Stressed Tissues. *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 2013, roč. 14, č. 11, s. 3808–3819. ISSN 1525-7797. DOI: 10.1021/bm4011276

ZALAR, Polona a Nina GUNDE-CIMERMAN. Cold-Adapted Yeasts in Arctic Habitats. In: BUZZINI, Pietro a Rosa MARGESIN, eds. *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014, s. 49–74. ISBN 978-3-642-39681-6. DOI: 10.1007/978-3-642-39681-6_3

ZAYCHIKOV, V. A. et al. Cell Wall Rhamnan in Actinobacteria of the Genus *Curtobacterium*. *Microbiology*. 2021, roč. 90, č. 3. DOI: 10.1134/S0026261721030139

ZHANG, Xuelin et al. Analysis of the effect of hyaluronic acid on intestinal flora and its metabolites in diabetic mice via high-throughput sequencing and nontargeted metabolomics. *Journal of Functional Foods*. 2023, roč. 103, s. 105496. ISSN 1756-4646. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105496