

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

# **Mikrobiální extracelulární polymerní sloučeniny**

**Bakalářská práce**

**Magdalena Korelusová**

Školitel: Doc. Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

České Budějovice 2024

Korelusová, M., 2024: Mikrobiální extracelulární polymerní sloučeniny. [Microbial extracellular polymeric substances. Bc. Thesis, in Czech] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

This work summarizes available information on several aspects of extracellular polymeric substances produced by microorganisms (EPS). It covers their composition and factors influencing their production. It elaborates on the formation of biofilms and their functional properties. Roles of EPS in natural habitats such as soil and water environments are examined along with some notable EPS producers. The role of different microscopy methods for EPS detection is investigated.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 9. 4. 2024

---

Magdalena Korelusová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za pomoc poskytnutou při sepisování této bakalářské práce.

## Obsah

|       |                                                              |    |
|-------|--------------------------------------------------------------|----|
| 1     | Úvod.....                                                    | 1  |
| 2     | Klasifikace EPS.....                                         | 2  |
| 3     | Složení EPS.....                                             | 3  |
| 3.1   | Sacharidy.....                                               | 3  |
| 3.2   | Proteiny.....                                                | 4  |
| 3.3   | Nukleové kyseliny.....                                       | 5  |
| 3.4   | Lipidy.....                                                  | 5  |
| 3.5   | Huminové látky.....                                          | 5  |
| 4     | Faktory ovlivňující produkci EPS.....                        | 5  |
| 4.1   | Růstová fáze.....                                            | 5  |
| 4.2   | Typ substrátu, uhlík a dusík.....                            | 6  |
| 4.3   | Fosfor a stopové prvky.....                                  | 7  |
| 4.4   | Fyzicko-chemické faktory prostředí.....                      | 8  |
| 4.5   | Anaerobní a aerobní produkce.....                            | 9  |
| 4.6   | Čisté a smíšené kultury.....                                 | 10 |
| 5     | Produkce EPS a biofilmy.....                                 | 11 |
| 5.1   | Charakteristika biofilmů.....                                | 11 |
| 5.1.1 | Struktura a složení.....                                     | 11 |
| 5.1.2 | Formování.....                                               | 13 |
| 5.1.3 | Výhody.....                                                  | 14 |
| 6     | Výskyt EPS v přírodě a jejich role v různých habitatech..... | 15 |
| 6.1   | Půda.....                                                    | 15 |
| 6.1.1 | Tvorba agregátů.....                                         | 15 |
| 6.1.2 | Stabilita organické hmoty.....                               | 17 |
| 6.1.3 | Zadržování vody.....                                         | 18 |
| 6.1.4 | Vliv na rostliny.....                                        | 20 |

|       |                                                    |    |
|-------|----------------------------------------------------|----|
| 6.2   | Vodní prostředí .....                              | 20 |
| 6.2.1 | Sedimenty a cyklus uhlíku.....                     | 20 |
| 6.2.2 | Extrémní biotopy .....                             | 22 |
| 6.2.3 | EPS a znečištění .....                             | 23 |
| 6.3   | EPS a patogenní mikroorganismy a komenzálové ..... | 23 |
| 6.3.1 | EPS a patogenní mikroorganismy .....               | 23 |
| 6.3.2 | EPS a komenzálové .....                            | 25 |
| 7     | Producenti EPS.....                                | 25 |
| 7.1   | Bakterie.....                                      | 25 |
| 7.2   | Archea.....                                        | 26 |
| 7.3   | Houby .....                                        | 27 |
| 7.4   | Řasy .....                                         | 27 |
| 8     | Detekce EPS.....                                   | 27 |
| 8.1   | Elektronová mikroskopie.....                       | 27 |
| 8.2   | Fluorescence .....                                 | 29 |
| 8.3   | Světelná mikroskopie .....                         | 30 |
| 9     | Závěr.....                                         | 33 |
| 10    | Seznam použité literatury .....                    | 35 |

# 1 Úvod

Extracelulární polymerní sloučeniny jsou polymerní látky produkované mikroorganismy do okolí buňky, kde vytváří slizový obal, takzvanou matrix. Produkují je jak prokaryotické a eukaryotické organismy, tak skupina Archea. (Wingender et al., 1999)

V této práci bude pro extracelulární sloučeniny nadále používána zkratka EPS („extracellular polymeric substances“), ačkoliv ve starší literatuře bylo zvykem zkratkou EPS označovat pouze extracelulární polysacharidy. Ty sice tvoří významnou část extracelulárních polymerních látek, nicméně později se i díky detailnějším a sofistikovanějším analýzám objevila snaha zkoumat matrix jako celek a zkratka se začala používat pro všechny polymery produkované vně buňky. Tento rozkol pěkně shrnuje Flemming (2016) a přidává i zajímavý historický exkurz do vývoje představ o podobě bakteriálních „slizů“.

Organické látky, ze kterých je EPS matrix mohou být tvořeny samotnou mikrobiální buňkou, ale do matrix bývají často inkorporovány i látky uvolněné do prostoru při odumírání okolních buněk. (More et al., 2014)

EPS matrix vykonává pro buňku mnoho důležitých funkcí. Chrání buňku před škodlivými vlivy prostředí, například vysycháním. V případě sucha jsou mikroorganismy schopné upravit produkci a export extracelulárních látek, především polysacharidů, a nemusí tak jen pasivně vzdorovat nepřízni okolí (Flemming, 2011). Díky enzymatické aktivitě zde může docházet k přeměně živin v okolí buňky a slizový obal tak může také sloužit jako místo pro vytváření mimobuněčné zásobárny živin bohatých na uhlík, dusík i fosfor (Flemming, 2016).

Důležitou vlastností organismů produkujících EPS je schopnost přichycovat se na nejrůznější povrchy. Mohou se také přichycovat jeden na druhý a tvořit tak obsáhlá mikrobiální společenství. Ve vodě lze tento jev pozorovat okem například v podobě vloček ve vodním sloupci, či hmatem na povrchu kamenů jako kluzký biofilm (More et al., 2014). Právě biofilmy jsou nesmírně zajímavým uskupením s mnoha potenciálně aplikovatelnými vlastnostmi, proto bude téma rozvinuto podrobněji v další části této práce.

Cílem této práce je shrnout poznatky o EPS z některých oblastí jejich výzkumu. Zabývá se jejich složením a faktory, které ovlivňují množství a vlastnosti vyprodukovaných EPS. Přibližuje funkci EPS v různých přírodních habitatech, včetně půdy a vodního prostředí a tvorbu biofilmů. Krátce se dotýká jejich detekce pomocí mikroskopických technik.

## 2 Klasifikace EPS

Podle toho, v jakém vztahu jsou EPS vůči buňce je lze rozlišit na tzv. kapsulární a slizové. Kapsulární EPS přiléhají k buňce těsně. Tloušťka kapslí, které vytváří se může pohybovat od rozměrů detekovatelných pouze elektronovým mikroskopem (100 nm) až po tloušťku přesahující 10  $\mu\text{m}$ . Oproti slizovým obsahují kapsulární EPS více proteinů, především pak glykoproteinů, které zajišťují těsnou terciární konfiguraci molekul. Díky svým fyzickým vlastnostem a složení slouží organismům jako obrana vůči vnějším vlivům. Naopak slizové EPS obklopují buňku spíše volně. Obsahují větší podíl polysacharidů než kapslové EPS a molekuly nejsou drženy pohromadě tak silnými terciárními konfiguracemi. K produkci slizových EPS dochází při nevyváženém poměru dostupných látek v okolí, např. při nadbytku uhlíku a nedostatku ostatních látek, přebytečný uhlík je tak přeměněn na polysacharidy. V důsledku toho představují slizové EPS dobře stravitelný zdroj uhlíku pro ostatní organismy (Decho and Lopez, 1993).

V literatuře se objevuje i mnoho jiných označení pro různé druhy EPS. EPS byly dříve klasifikovány především na základě jejich fyzických vlastností a způsobů, kterými je lze extrahovat a jejich definice není vždy úplně jednotná (Wang et al., 2014). Lze se tak setkat s termíny „vázané EPS“ (bound EPS) a „rozpustné EPS“ (soluble EPS), které byly ustanoveny na základě rozdílných výsledků získaných centrifugací. Rozpustné EPS bylo možné tímto způsobem od buňky oddělit, zatímco pro oddělení vázaných EPS se muselo využít jiných metod, např. ultrasonikace nebo extrakce pomocí chemikálií (např. EDTA) (Han et al., 2013). Později došlo k dalšímu rozlišení vázaných EPS a to sice na „volně vázané EPS“ (loosely bound EPS, LB-EPS) a „pevně vázané EPS“ (tightly bound EPS, TB-EPS), ale kvůli různým metodickým postupům, kterých bylo k jejich získání užito nejsou definice těchto termínů jednoznačné a při čtení výsledků tak může docházet k nejasnostem (Wang et al., 2014). Wang et al. (2014) navrhuje zohlednit při kategorizování EPS spíše jejich složení, které ovlivňuje jejich vlastnosti a pro praktické využití je důležitější než jejich fyzická forma. Konkrétně navrhuje rozlišení na polymery, které se vyskytují na povrchu mikrokolonií organismů produkujících EPS neboli vloček (extra-microcolony polymers, EMPS) a polymerů, které se vyskytují uvnitř mikrokolonií (extra-cellular polymers, ECPS), které se liší funkcí i složením.

### 3 Složení EPS

EPS matrix nemá u všech organismů stejné složení. Obsah a typ EPS může být ovlivněn faktory souvisejícími s podmínkami okolního prostředí, například dostupností živin. U větších uskupení pak záleží také na druhovém složení. Pokud mikroorganismy vytvářejí agregace, lze nalézt rozdíly v poměru komponent mezi jednotlivými částmi společenství. Obecně lze ale říci, že 75–90 % EPS tvoří proteiny a sacharidy. Dále jsou zde přítomné také deriváty těchto látek, lipidy a nukleové kyseliny (Tab. I.) (More et al., 2014). Matrix je držena pohromadě na základě působení slabé fyzicko-chemické síly, nikoliv tedy pomocí kovalentních vazeb. Stabilitu zajišťují vodíkové vazby, přítomnost van der Waalsovy síly, elektrostatické a iontové interakce a také tvar, délka a vzájemné postavení molekul s dlouhými řetězci (Flemming, 2011).

**Tab. I:** Množství a funkce jednotlivých komponent EPS. (More et al., 2014)

| Složka EPS               | Podíl   | Klíčová role v EPS                                                                                                        |
|--------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sacharidy</b>         | 40–90 % | Adheze, agregace buněk, ochranná bariéra, zadržování vody, vazba enzymů, sorpce iontů, zdroj živin                        |
| <b>Proteiny</b>          | 1–60 %  | Adheze, agregace buněk, ochranná bariéra, zadržování vody, enzymatická aktivita, sorpce iontů, donory/akceptory elektronů |
| <b>Nukleové kyseliny</b> | 1–10 %  | Adheze, agregace buněk, výměna genetické informace                                                                        |
| <b>Lipidy</b>            | 1–10 %  | Adheze, antibiotika                                                                                                       |
| <b>Huminové látky</b>    | –       | Donory/akceptory elektronů                                                                                                |

#### 3.1 Sacharidy

Sacharidy, především ve formě polysacharidů, tvoří většinu hmoty EPS, kolem 40–95 %. V EPS lze nalézt jak monosacharidy neutrální povahy, zastoupené především hexózou, zřídka i pentózou, tak i látky ze skupiny uronových kyselin, které mohou díky karboxylové skupině nést elektrický náboj. Homopolysacharidy jsou složeny z jedné opakující se jednotky monosacharidu, zde často D-glukózy či L-fruktózy, a nemají žádný náboj (např. dextran, kurdlan a celulóza). Na rozdíl od homopolysacharidů obsahují heteropolysacharidy různé druhy monosacharidů (mimo D-glukózy a L-fruktózy třeba i D-galaktózu, či D-



kyselinu glukuronovou) a v závislosti na jejich vlastnostech mohou mít i různý náboj. Významnými heteropolysacharidy tvořící EPS jsou alginát, xantanová guma a kyselina hyaluronová. (More et al., 2014)

Jako poměrově významná složka EPS zastávají sacharidy mnoho funkcí; zajišťují přilnavost buněk, vytváří pro ně ochranou bariéru a dokáží na sebe vázat enzymy, čímž vytváří jejich vnější zásobárnu, stejně tak jako místo pro skladování přebytečného uhlíku. Hydrofilní polysacharidy pak zadržují vodu. Nabité polysacharidy zase umí vázat organické sloučeniny a anorganické ionty (Flemming, 2011). Náboj polysacharidových molekul může mít také vliv na jejich interakci s povrchy nebo jílovými částicemi. Vazebná schopnost závisí na délce a lineární struktuře molekuly, dále na její flexibilitě, která umožňuje kontakt s částicí a tím tvorbu spojení pomocí van der Waalovy síly. Roli hraje také množství hydroxylových skupin, jež podporují tvorbu vodíkových můstků, a kyselých, zejména karboxylových skupin zajišťujících tvorbu iontových vazeb (Martin, 1971). Záleží také na umístění těchto skupin, zda jsou vazbě vůbec přístupné. Nejlépe se váží skupiny, které jsou součástí postranního řetězce (Labille et al., 2005).

### **3.2 Proteiny**

Proteiny zauímají v EPS až 60 % a bývají tak po polysacharidech nejhojnější (More et al., 2014), někde ale mohou tvořit i hlavní složku (Flemming, 2011).

Slouží především jako stavební materiál (strukturní proteiny) nebo jako katalyzátor chemických reakcí (enzymy). Mezi strukturní proteiny lze zařadit lektiny a jim podobné látky, které jsou schopné vázat na sebe cukry a fungují tak jako spojnice mezi povrchem buňky a okolím. Drží matrix pohromadě a napomáhají tvorbě buněčných agregátů. Do slizové matrix může být také vylučováno několik druhů enzymů (např. lipázy, esterázy, lipázy, proteázy, ...). Enzymy mohou působit jednak na látky, která buňka sama vyprodukovala, ale i na látky, které se do matrix dostaly z okolního prostředí. Pokud se buňka ocitne v situaci dlouhodobého hladovění, může využít některých enzymů k degradaci nejen vlastních EPS, ale i EPS svých sousedů i v případě, že se nejedná o organismus stejného druhu. Mimo tyto skupiny proteinů zde lze nalézt také glykoproteiny, které slouží ke komunikaci mezi buňkou a jejím okolím. (More et al., 2014)

### **3.3 Nukleové kyseliny**

Nukleové kyseliny v podobě extracelulární deoxyribonukleové kyseliny (eDNA) tvoří další významnou složku EPS, její vyprodukované množství se může lišit napříč druhy (More et al., 2014). Mezi organismy obklopenými EPS v biofilmu může díky výměně této eDNA docházet k horizontálnímu přenosu genů (Flemming, 2011), eDNA také napomáhá soudržnosti buněk v biofilmech (Allesen-Holm et al., 2006).

### **3.4 Lipidy**

Lipidy a jejich deriváty tvoří co do objemu ne tak významnou složku EPS (cca 10 %). Jejich přítomnost pomáhá mikroorganismu lépe přilnout k povrchu. Některé povrchově aktivní molekuly (např. surfaktin) jsou schopné dispergovat hydrofobní látky a mohou být účinnými antibiotiky nebo fungicidy a poskytují tak jedinci kompetiční výhodu. (More et al., 2014)

### **3.5 Huminové látky**

Huminové látky nejsou produkovány organismy samotnými, ale přesto se v matrixu nacházejí. Do směsi EPS se dostávají z okolí a od toho se také odvíjí jejich množství v konkrétním vzorku (More et al., 2014). Vznikají rozkladem organické hmoty jako jsou části rostlin nebo mikroorganismy a tvoří složité chemické komplexy. Vyskytují se v půdě, rašelině, hnědém uhlí nebo v přírodní i splaškové vodě a sedimentech. Lze je rozdělit na 3 skupiny, které se liší mimo jiné svou rozpustností; huminy, které jsou zcela nerozpustné a dále fulvonové a huminové kyseliny, které jsou rozpustné pouze při zásaditých hodnotách pH (Peña-Méndez et al., 2005). Huminové látky mají schopnost ovlivňovat adsorpční schopnost EPS nebo jejich biologickou rozložitelnost (More et al., 2014).

## **4 Faktory ovlivňující produkci EPS**

Produkce EPS je ovlivněna jak vnitřním stavem buňky, její genetickou výbavou a syntetickými drahami, tak dostupností živin a dalšími vnějšími podmínkami. (More et al., 2014; Nouha et al., 2018)

### **4.1 Růstová fáze**

Množství vyprodukovaných EPS se liší během života buňky, nelze ale vyvodit jednoznačný závěr, při které růstové fázi dochází k maximální produkci, neboť tato hodnota závisí i na vnějších podmínkách (Mezhoud et al., 2014) a liší se napříč různými organismy.

Byla zaznamenána produkce EPS ve fázi exponenciálního růstu, stacionární fázi i v endogenní fázi (More et al., 2014). Obecně se ukazuje, že u hub dochází k významné syntéze EPS později než u bakterií (obvykle po 4–15 dnech) a to zejména v pozdní fázi exponenciálního růstu či v brzké fázi růstu stacionárního (Mahapatra a Banerjee, 2013).

## 4.2 Typ substrátu, uhlík a dusík

Významným faktorem ovlivňujícím tvorbu EPS je typ substrátu. Jako zdroj uhlíku se v laboratoři nejčastěji využívá glukóza, sacharóza, maltóza, fruktóza či laktóza (Mahapatra a Banerjee, 2013). Jako zdroj dusíku jsou využívány anorganické zdroje (např. síran amonný, dusičnan sodný) i zdroje organické (např. pepton, trypton, hovězí vývar). Ve většině zkoumaných případů (Elisashvili et al., 2009; Xiao et al., 2010) byl růst buněk i produkce EPS vyšší při použití organických zdrojů dusíku oproti anorganickým, existují ale i výjimky, například Lim et al. (2004) zaznamenal vysokou produkci EPS při využití anorganického chloridu amonného. Není zcela jasné, proč jsou organické zdroje lepším poskytovatelem dusíku, je možné, že kromě dusíku poskytují organismům i jiné látky jako třeba aminokyseliny nebo vitamíny (Xiao et al., 2010). Catley (1971) popsal vliv koncentrace dusíku a amonných iontů na vstřebávání a využívání uhlíku houbou *Aureobasidium pullulans* při produkci polymeru pullulanu. Po využití amonných iontů jako zdroje dusíku došlo k vypuzení protonů z buňky do okolí, čímž došlo ke změně pH. *A. pullulans* poté lépe vstřebávala glukózu a získaný uhlík využívala k syntéze pullulanu.

Důležitým faktorem je také poměr mezi obsahem uhlíku a dusíku, jejichž preference se liší napříč organismy (More et al., 2014). Oproti uhlíku stačí většinou i malá koncentrace dusíku, aby docházelo k produkci EPS. Optimální množství uhlíku se pohybuje v rozmezí 30–60 gm/L, zatímco pro dusík stačí 1–10 gm/L, v obou případech lze ale nalézt výjimky (Mahapatra and Banerjee, 2013). Platí, že čím větší je poměr C/N, tím více roste produkce polysacharidů. Nárůst je pravděpodobně způsoben tím, že při malé koncentraci dusíku nemají buňky dostatek materiálu pro svůj růst, nemohou například syntetizovat proteiny, a proto jim zbývá více energie pro produkci polysacharidů (Miqueleto et al., 2010). Podobně působí poměr C/N na složení produkovaných EPS, při malém poměru koncentrací obsahují vyprodukované EPS více proteinů, zatímco při výrazné převaze uhlíku jsou produkovány zejména sacharidy (Yuncu et al., 2006).

Typ substrátu může také určovat vlastnosti, které budou vyprodukované EPS mít. Bhattacharjee et al. (2020) zkoumal vliv typu použitého substrátu na chemické složení EPS a

s tím související schopnost EPS zadržovat vodu. Vzorky odebrané z aridní půdy chudé na organickou hmotu byly pěstovány na dvou typech substrátu, jeden byl obohacený o rozpustný N-acetylglukosamin (NAG) a druhý o nerozpustný chitin (který je polymerem NAG, poměr C a N byl proto u obou substrátů stejný). U obou vypěstovaných vzorků byl prokázán podobný obsah glukózy, galaktózy a manózy či aminokyselin jako alanin, glycin a lysin. Naopak EPS kultur, které byly pěstovány na substrátu s chitinem obsahovaly v porovnání s kulturami pěstovaných na NAG více kyseliny asparagové a monomerních cukrů jako jsou fukóza, ribóza a arabinóza. Právě tyto cukry jsou základními stavebními jednotkami některých polysacharidů, které jsou známé svou schopností zadržovat vodu (např. xanthan, alginát). Při analýze složení mikrobiálních komunit bylo zjištěno, že kultura na NAG byla méně rozmanitá a vyskytovali se zde zejména zástupci řádu Burkholderiales, zatímco na substrátu s přidavkem chitinu byli zástupci řádů Chitinophagales, Xanthomonadales nebo Pseudomonadales. Bhattacharjee et al. (2020) se domnívá, že různé typy substrátů vyhovují mikroorganismům s různými typy metabolismu, což se promítá do druhové diverzity. Chitin je na rozložení složitější než NAG a nabízí tak prostor pro více různých strategií. Diverzita v druhovém složení pak ovlivňuje i diverzitu produkovaných EPS. Více různorodá kultura na chitinu obsahovala více organismů, jež jsou známé svou produkcí vodu-zadržujících EPS.

### 4.3 Fosfor a stopové prvky

Produkci EPS významně ovlivňuje i fosfor, pozitivní vliv na produkci EPS má zejména jeho nedostatek. Deficit fosforu, podobně jako nedostatek dusíku, zpomaluje buněčný růst a buněčné dělení (Babiak a Krzemińska, 2021). Na nedostatek fosforu buňka reaguje přepnutím metabolických drah, dochází ke zvýšené produkci molekul, které slouží k zásobě energie a uvnitř buňky se hromadí sacharidy (Deb et al., 2019). Většina výzkumů, které se vlivem fosforu na produkci EPS zabývají, jsou vykonávány na fotosyntetických mikroorganismech, zejména rozsivkách a sinicích; Theodorou et al. (1991) se domnívá, že nedostatek fosforu způsobuje, že je nově fixovaný uhlík z fotosyntézy použit především na výrobu nefosforylovaných polyglukanů, což zvyšuje obsah zásobních sacharidů v buňce; Roux (1996) zase, že zvýšená produkce EPS je důsledkem snahy buňky zbavit se nadbytečného uhlíku získaného fotosyntézou; ke zvýšené produkci EPS při nedostatku fosforu ale dochází i u nefotosyntetických organismů, například u bakterie *Bacillus cereus* (Evans, 2013). U většiny zkoumaných organismů byl prokázán pozitivní vliv nedostatku fosforu na produkci EPS, jeho nedostatek ale zároveň vede k zastavení množení samotných

buněk, či dokonce jejich odumírání, což může v důsledku výnos EPS negativně ovlivnit. Jako efektivní řešení tohoto problému se ukázala metoda, která využívá v průběhu času dva různé substráty. Organismy byly nejdříve několik dní pěstovány na médiu bohatém na fosfor, které podpořilo jejich růst a množení a poté byl substrát vyměněn za médium chudé na fosfor, aby se zvýšila produkce EPS (Deb et al., 2019). Pozitivní vliv nedostatku fosforu ale opět neplatí pro všechny organismy, jak ukazuje Penna (1999) na příkladu rozsivky *Chaetoceros* sp, která při nedostatku fosforu neprodukovala žádné polysacharidy, na rozdíl od rozsivky *Nitzschia closterium*, u níž se produkce zvýšila téměř třikrát.

Kromě běžných živin je k syntéze potřeba i stopové množství prvků jako jsou mangan, zinek nebo kobalt a také řada vitamínů, například K, B1, B2 nebo B6 (More et al., 2014).

#### **4.4 Fyzicko-chemické faktory prostředí**

Nezanedbatelný vliv mají i fyzicko-chemické vlastnosti okolí. EPS bývají nejvíce produkovány v rozmezí pH 5–7 (More et al., 2014). Příliš nízké či naopak příliš vysoké pH má za příčinu morfologické změny na buňkách a také ovlivňuje biosyntetické dráhy pro produkci EPS (Czaczyk a Myszka, 2007). Většina organismů vykazovala zvýšenou produkci při teplotách 25–30°C (More et al., 2014). Ideální podmínky se zřejmě odvíjí od přirozeného prostředí, ve kterém se daný organismus běžně vyskytuje. Nichols et al. (2005) testoval produkci EPS u psychofilní mořské bakterie z rodu *Pseudoalteromonas*, jež produkovala při nízkých teplotách (-2°C a 10°C) téměř 30krát více EPS než při 20°C. Odlišuje se ideální teplota pro růst buňky a teplota, při které dochází k maximální produkci EPS. Optimální teplota pro tvorbu EPS je nižší než růstová. To je zřejmě dáno tím, že při nižší teplotě dochází ke zpomalení růstu a s tím spojeným utlumením syntézy stavebních látek, pro tvorbu EPS tak zbývá více prekurzorů (More et al., 2014).

U fototrofních producentů EPS – řas a sinic – hraje roli také množství světelného záření. Se zvyšující se intenzitou světla zpravidla roste i produkce EPS, dokud není dosaženo bodu světelného nasycení. (Babiak a Krzemińska, 2021)

Produkci EPS také může ovlivnit přítomnost kovových iontů v okolí, které za normálních okolností napomáhají vazbě EPS na buňku. Pokud se v prostředí vyskytuje příliš mnoho těžkých kovů, začne buňka produkovat více exopolymerů, aby se před jejich působením uchránila. (Sheng et al., 2010)

## 4.5 Anaerobní a aerobní produkce

EPS jsou produkovány jak aerobními organismy, které kyslík využívají ve svůj prospěch, tak fakultativními či obligátními anaeroby. Anaerobním organismům chybí mechanismy, jak se účinně vypořádat s vysoce reaktivním kyslíkem, který mění strukturu enzymů potřebných k fungování jejich metabolismu a kyslík je pro ně v různé míře škodlivý (Imlay, 2002). Vliv koncentrace kyslíku se proto mezi těmito skupinami výrazně liší, ale ani uvnitř skupiny není vždy jednoznačný.

*Thermotoga maritima* je striktně anaerobní bakterie, která obývá prostředí, jakými jsou třeba hlubokomořské prūduchy kde může čas od času přijít do styku s kyslíkem. Vyvinula si proto obranné mechanismy, jako je produkce enzymů redukujících kyslík nebo tvorba EPS. Lakhal et al. (2011) testoval vliv koncentrace kyslíku na produkci EPS tímto druhem bakterie a zaznamenal souvislost mezi zvýšenou produkcí EPS za aerobních podmínek a množstvím spotřebovaného substrátu (glukózy), nicméně kvůli metodickým problémům a flokulaci, ke které došlo po přidání kyslíku, nebyl schopen přesného měření. Jeho závěr však podporuje Le Fourn et al. (2008), který testoval stejný organismus a zaznamenal, že při aerobních podmínkách docházelo k tvorbě biofilmu. Zjistil také, že geny pro syntézu některých proteinů, které by se mohly na tvorbě biofilmu podílet byly přítomné na stejné multicistronní jednotce, jako geny pro oxidoreduktázu.

Rod *Bifidobacterium* představuje skupinu obligátně anaerobních mikroorganismů, mezi jednotlivými zástupci ale existují rozdíly v míře, do jaké jsou schopni kyslík tolerovat, některé druhy jsou schopné přežívat i při koncentracích přesahujících 20 %. Ninomiya et al. (2009) zkoumal produkci EPS u zástupce tohoto rodu – bakterie *Bifidobacterium longum* – a její závislost jak na koncentraci kyslíku, tak na koncentraci CO<sub>2</sub>, který je využíván pro anabolické reakce. Se zvyšující se koncentrací CO<sub>2</sub> stoupala i produkce EPS, která dosáhla vrcholu při koncentraci 20 % CO<sub>2</sub> a dále již nevzrůstala. Hladina CO<sub>2</sub> ale měla zřejmě spíše vliv na celkový nárůst biomasy buněk než na samotnou produkci EPS, která s celkovou biomasou buněk souvisí. Při testování reakce na různé koncentrace kyslíku bylo dosaženo největší produkce při anaerobních podmínkách, kdy hladina kyslíku nepřesáhla hodnotu 0,05 ppm, po překročení hodnoty 0,3 ppm množství vyprodukovaných EPS významně kleslo. Pro optimální produkci EPS bakterií *Bifidobacterium longum* je důležité navodit vhodnou koncentraci jak CO<sub>2</sub>, aby mohly buňky prosperovat, tak udržovat anaerobní prostředí. *Lactobacillus rhamnosus* je anaerobní organismus, který dokáže tolerovat i koncentraci kyslíku vyšší než 60 %, největší produkce EPS u něj bylo dosaženo při

koncentraci kyslíku 10 %, která stimulovala jak jeho růst, tak produkci EPS (Gamar-Nourani et al., 1998).

Ma et al. (2023) zkoumal efekt koncentrace kyslíku na produkci EPS na houbě *Schizophyllum commune*. Při anaerobních podmínkách byla specifická koncentrace EPS (= zohledňující podíl EPS a celkové biomasy) 1,5krát vyšší než v podmínkách bez kyslíku. Byly také více aktivovány geny, které jsou kromě syntézy EPS zodpovědné i za glykolýzu, zatímco např. geny pro Krebsův cyklus nebo dýchací řetězec byly utlumeny, tato úprava metabolismu umožňuje efektivnější využívání substrátu. Při anaerobních podmínkách však nedošlo k takovému nárůstu biomasy buněk jako v aerobním prostředí, takže skutečné množství vyprodukovaných EPS (nezohledňující podíl EPS k biomase) bylo při aerobních podmínkách vyšší. Thompson a Leps (1986) pozorovali podobný trend na organismu *Rhizobium leguminosarum* – s klesající hladinou kyslíku rostla produkce EPS, ale klesala rychlost nárůstu biomasy.

Většina hub jsou aerobními nebo fakultativně anaerobními producenty a nedostatek kyslíku jim neprospívá. Houby produkovaly rozdílné množství EPS, když byly pěstovány za různých kultivačních podmínek. Kultury, které byly inkubovány na třepacích vykazovaly větší koncentraci EPS než kultury, které byly ponechány v klidu. Vyšší produkce EPS byla způsobena lepší dostupností kyslíku při intenzivním třepání (Mahapatra and Banerjee, 2013).

Zhang et al. (2019) zkoumal efekty různých typů provzdušňování na vzorek aktivovaného kalu. Byl srovnáván vliv provzdušňování vzduchem a čistým kyslíkem. U obou způsobů se objevil podobný trend – EPS byly produkovány zejména v počátečních fázích růstu, kdy organismy spotřebovávaly substrát. Ve stacionární fázi poté produkce EPS klesla, EPS byly degradovány a využívány jako zdroj živin. Množství EPS bylo nižší ve všech fázích, pokud byl vzorek provzdušňován kyslíkem, jehož snadnější dostupnost podporovala vstřebávání uhlíku z okolí a také rozklad EPS při pozdějších fázích růstu. Podle Shin et al. (2001) má množství dostupného kyslíku vliv také na složení EPS, při vyšším průtoku vzduchu vzorkem byl zaznamenán zvýšený podíl sacharidů, zatímco množství proteinů zůstávalo nezměněno.

#### **4.6 Čisté a smíšené kultury**

Existuje zatím málo studií, které by se zabývaly studiem produkce EPS u komplexních mikrobiálních společenstvech, většina studií bývá zaměřena na čisté kultury. V důsledku toho není příliš známo o mezidruhové interakci a vzájemném ovlivňování tvorby

EPS (More et al., 2014). Z několika málo výzkumů vyplývá, že smíšené kultury vyprodukují více EPS (Li et al., 2012; Zhang et al., 2007). Vliv na to mají zřejmě různé symbiotické vztahy – pokud organismus produkující EPS začne tvořit biofilm spolu s některým organismem, který exopolymery neprodukuje, musí jich vytvořit o to víc, aby se mohly efektivně přichytit na podklad. Neproducent mu naopak může poskytovat některé potřebné látky. Tento pozitivní vztah ovšem nebyl prokázán u všech testovaných kombinací mikroorganismů, jak ukazuje Bala Subramanian et al. (2010) na příkladu mikrobiálního kalu odebraného z odpadní vody, kde byl naopak výnos EPS smíšené kultury vlivem kompetice nižší, než u čistých kultur.

Jelikož mají EPS potenciálně mnoho praktických využití, je v našem zájmu přijít na způsob, jak jejich výrobu maximalizovat. Prozatím se jeví jako nejlepší navozovat vhodné podmínky individuálně, na míru využívaného organismu (např. poskytnutí preferovaného substrátu nebo navození optimální teploty). Nabízí se také genetická manipulace, ale znalosti o biosyntetických drahách exopolymerů a jejich genetických kódech zatím nejsou dostatečné. (Finore et al., 2014; Nouha et al., 2018)

## **5 Produkce EPS a biofilmy**

### **5.1 Charakteristika biofilmů**

#### **5.1.1 Struktura a složení**

Biofilmy jsou uskupení různých mikroorganismů, které jsou k sobě přichyceny slizovou matrix z EPS (Costerton et al., 1995). Pod pojmem biofilm se neskývá jen náhodný a neměnný slepenec buněk, nýbrž organizovaná, přizpůsobivá a živoucí struktura. Watnick a Kolter (2000) přirovnávají biofilmy k „mikrobiálním městům“, kde si organismy vybírají k usazení právě tu čtvrt, která jim svými podmínkami a sousedy vyhovuje nejvíce. Flemming et al. (2007) pak rozvádí tuto metaforu dále a připodobňuje matrix buňky k „domu“, jehož vlastnosti (např. propustnost pro vodu) přímo ovlivňuje kvalitu jejího života. Tato přizpůsobivost vnějším podmínkám a možnost kooperace je pravděpodobně důvod, proč jsou biofilmy tak úspěšnou a rozšířenou formou života (Flemming, 2011).

Jako ve všech živých systémech, i zde hraje podstatnou roli voda. Zaujímá až 99 % objemu vnější matrix (Mayer et al., 1999). Jednotlivým buňkám zajišťuje prostředí pro fyziologické procesy, ale nejen to. Pomocí vody je možné rozvádět skrz kanály a póry v biofilmu živiny do jeho odlehlých částí (Flemming, 2011). Zajišťuje také stabilitu matrix

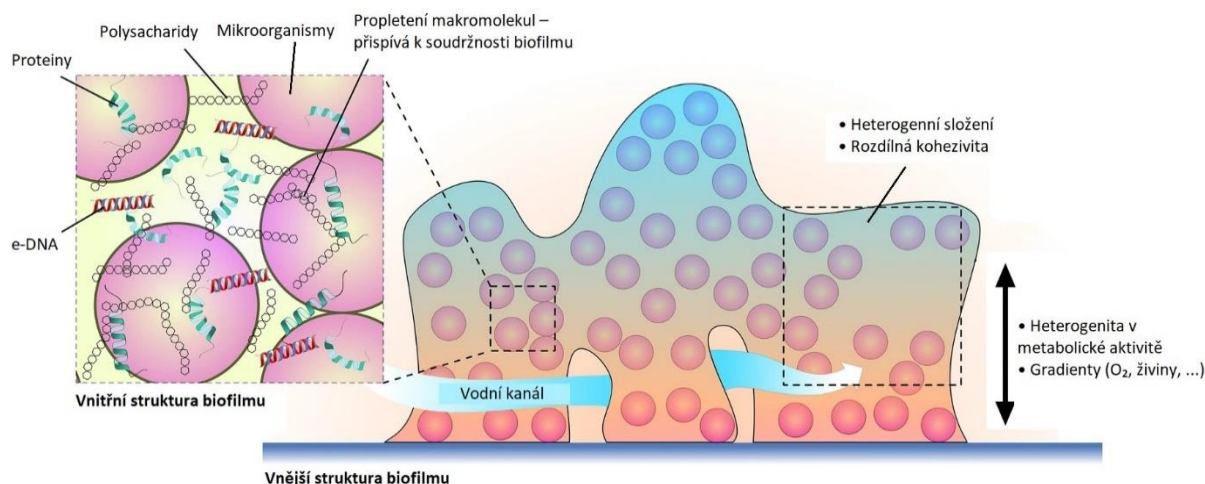


tím, že drží EPS molekuly dostatečně daleko od sebe, pokud by byly molekuly příliš blízko, mohly by se mezi nimi tvořit vazby, což by vedlo ke zhroucení konstrukce (Mayer et al., 1999). Voda je pro biofilmy důležitou součástí, proto mikroorganismy vyvinuly způsob, jak předcházet její nadměrné ztrátě, a to sice upravením exportu polysacharidů (Flemming, 2011).

Nadpoloviční většinu veškeré organické hmoty v biofilmech tvoří EPS (H-C a Wingender, 2001). Biofilm je ale značně heterogenním uskupením a různé komponenty tvořící EPS nejsou mezi buňkami rozloženy rovnoměrně, vyskytují se oblasti s větším nebo naopak menším obsahem eDNA, polysacharidů, proteinů, ... to způsobuje gradienty hodnot jako jsou pH nebo redoxní potenciál (Obr. 1) (Flemming, 2011). Buňky jsou také schopné upravovat produkci EPS a zprostředkovaně tak ovlivňovat i další parametry okolí (propustnost pro vodu, obsah vody, náboj, ...). V matrix samotné dochází pouze k difúznímu transportu, zatímco struktura biofilmu s četnými kanály a póry umožňuje rozvádět vodu s živinami napříč biofilmem. I tak se ale mohou vlivem vnějších podmínek (např. dostupností světla, typem podkladu, pravidelným vysycháním, ...) nebo interakcí mezi organismy vytvářet různé niky. Příkladem mohou být mnohvrstevnaté biofilmy. Heterotrofní organismy blíže k povrchu spotřebovávají veškerý kyslík, proto se v nižších vrstvách vytváří bezkyslíkaté prostředí obsazené anaerobními organismy. (Flemming, 2011)

Enzymy vylučované do slizového obalu slouží k znovuvyužití látek získaných z odumřelých sousedních buněk a trávení živin získaných prostředím, v této části se také odehrávají významné procesy pro globální cykly dusíku, například nitrifikace (Flemming, 2011). K nitrifikaci může docházet díky blízkému soužití bakterií oxidujících amoniak na dusitany a bakterií dále přeměňujících tyto dusitany na dusičnany (H-C a Wingender, 2001). Probíhá zde také transformace dalších důležitých prvků, jako je uhlík, dusík nebo fosfor, tato vlastnost biofilmů významně přispívá k samočisticí schopnosti půd a vodních sedimentů (Flemming, 2011).

V matrix lze také nalézt látky, které se tam dostaly zvenčí a jejichž přítomnost může ovlivňovat podmínky uvnitř některých částí biofilmu. Těmi mohou být látky rozpuštěné ve vodě (včetně živin), nebo pevné částice jako zrnka bahna, huminové částice nebo síran vápenatý. (H-C a Wingender, 2001)



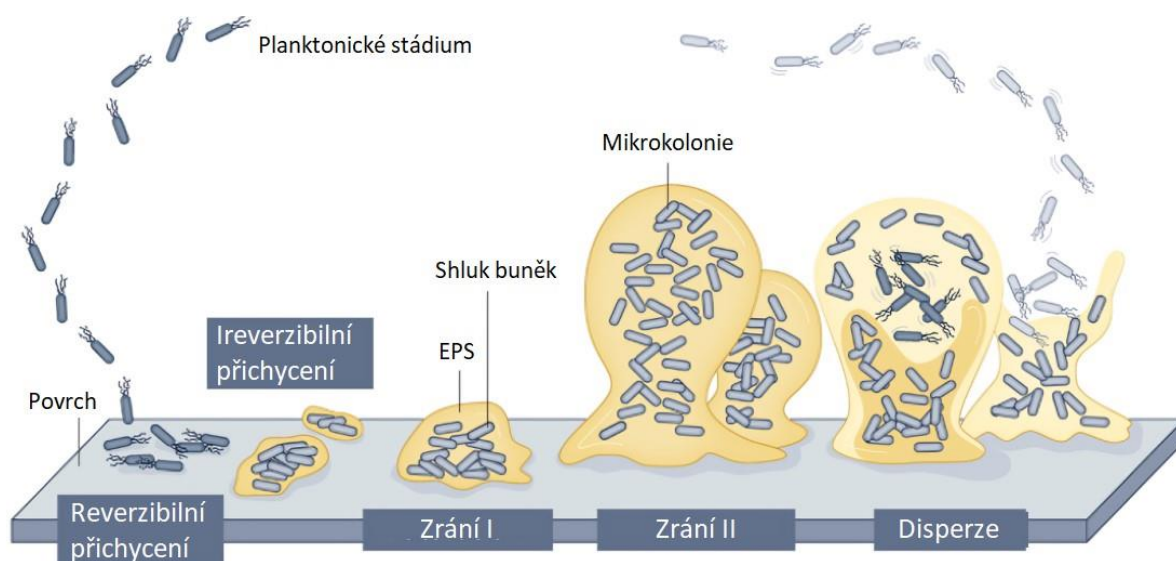
**Obr. 1:** Schéma struktury biofilmu. (Boudarel et al., 2018), upraveno

### 5.1.2 Formování

Tvorba biofilmu začíná přichycením prvotní buňky k podkladu. Buňka k tomu může využít bičíky, pilusy nebo speciálně vyprodukované proteiny (Madigan et al., 2019). Podle typu povrchu, který se chystá osídlit, mohou být aktivovány různé geny. Liší se například geny aktivované pro přichycení k povrchu, který může být využit i jako potenciální zdroj živin pro buňku (např. chitinový krunýř bezobratlých) oproti genům aktivovaným na přichycení na potravně nevyužitelný povrch (např. sklo) (Watnick a Kolter, 2000). Po ukotvení na místě začne buňka exprimovat specifické geny pro tvorbu biofilmu, dochází k tvorbě proteinů zajišťující komunikaci s okolními buňkami a také polysacharidů, které začnou vytvářet základní kostru vnější matrix (Madigan et al., 2019). Watnick a Kolter (2000) se na základě několika studií domnívají, že zvýšená produkce exopolysacharidů tvořící matrix negativně ovlivňuje výrobu proteinu tvořícího bičík, který už není po přichycení k podkladu potřeba. Postupně dochází k nárůstu struktury a přibývání dalších buněk, formuje se biofilm (Obr. 2).

Buňky ovšem nejsou v matrix uvězněny navždy a dokáží toto uskupení opustit. Důvodem k opuštění biofilmu jsou zejména nepříznivé podmínky prostředí, například nedostatek živin či změna v koncentraci kyslíku. Když naroste biofilm do přílišné velikosti, buňky ze středu mohou mít problém dostat se k živinám, hrozbou je také hromadění toxických a odpadních látek v matrix. Buňky mohou aktivně iniciovat migraci změnou svého fenotypu. Takové změny zahrnují vlastní aktivní vylučování enzymů, které rozkládají vnější matrix (např. alginát lyázy). Buňky, které se aktivně odprošťují od biofilmu se vyznačují

sníženou hladinou molekuly cyklického di-GMP, která slouží k vnitrobuněčné signalizaci a jejíž nízká hladina je typická pro buňky planktonních stádií. Zpravidla nedochází k disperzi celého biofilmu, ale jen několika buněk či některé z „mikrokolonií“ (Petrova and Sauer, 2016). K odpojení buněk může docházet i pasivně, působením vnějších faktorů, například erozí či rozkladem matrix pomocí chelatačních činidel nebo cizích enzymů, těmi mohou být třeba některá z hydroláz (např. Dispersin B (Kaplan et al., 2003)) nebo DNAáz (účinné hlavně na počáteční stadia biofilmu (Whitchurch et al., 2002)).



**Obr. 2:** Schéma zachycující utváření biofilmu. (Sauer et al., 2022), upraveno

### 5.1.3 Výhody

Společný život v biofilmu má pro zúčastněné organismy hned několik výhod. Matrix slouží jako účinná bariéra proti škodlivým vlivům z okolí. Buňky „slepené“ v tomto konsorciu jsou méně ohroženy predací, protože představují pro potenciální konzumenty příliš velké sousto. Současně tím komplikují buňkám imunitního systému jejich zneškodnění, jelikož nemohou být dost dobře pohlceny fagocytózou. Slizový obal také slouží jako hradba zpomalující pronikání toxických chemikálií k povrchu buněk. Tato vlastnost může vést ke snížené účinnosti některých antibiotik, biofilmy tak mohou být těžko odstranitelné a působit komplikace jak v rozvodních trubkách, tak při léčbě některých mikroby způsobených onemocnění. Polysacharidová struktura umožňuje stabilní přichycení se na vhodném místě s vyhovujícím podkladem a dostatečným přísunem živin. Matrix drží

buňky účinně pohromadě a organismům nehrozí, že by byly proudem vody z výhodného místa odneseny. V neposlední řadě může mezi sousedními buňkami probíhat komunikace. Vyměňují si mezi sebou živiny, ale také genetickou informaci. Horizontální přenos genů je zde běžný a poskytuje organismům šanci, jak se lépe přizpůsobit okolním podmínkám a zvyšuje celkovou šanci na přežití (Madigan et al., 2019). Podle Costerton et al. (1995) tvoří plankton méně významné zastoupení mikroorganismů ve vodním prostředí. Domnívá se, že biofilmy schopné kolonizovat téměř každý povrch jsou převládajícím společenstvím a při studiu vodních ekosystémů nesmí být opomenuty. Je tedy pravděpodobné, že tvoření biofilmů je pro bakterie přirozenější než osamělý život. Soliterní způsob života volí hlavně organismy adaptované na prostředí s malým obsahem živin (Madigan et al., 2019).

Soužití v biofilmu ale nemusí být vždy tak idylické. Probíhá zde, jako všude jinde, kompetice o zdroje a vzájemné požírání, aktivní jsou i parazité. Organismy se navzájem oslabují produkcí antibiotických látek. (Flemming, 2011)

## **6 Výskyt EPS v přírodě a jejich role v různých habitatech**

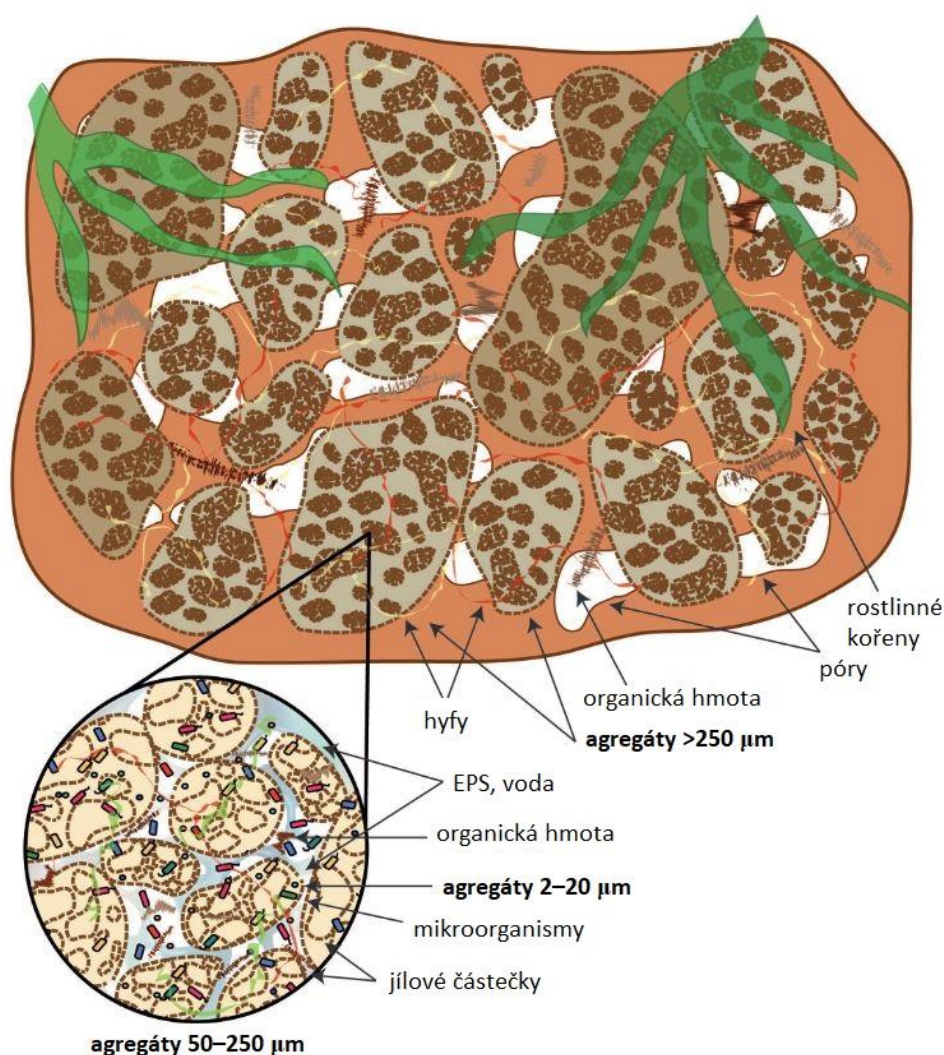
### **6.1 Půda**

#### **6.1.1 Tvorba agregátů**

Podle velikosti jsou rozlišovány 3 typy půdních agregátů, přičemž agregáty větší velikosti jsou tvořeny několika agregáty menší velikosti. Nejmenší mikroagregáty dosahují velikosti 2–20  $\mu\text{m}$ . Jsou tvořeny jílovými částicemi, které dohromady pojí extracelulární polysacharidy produkované půdními mikroorganismy, či některé anorganické látky jako jsou oxidy, aluminosilikáty a huminové látky. Tyto mikroagregáty jsou spojeny pomocí houbových hyf a rostlinných kořinek ve větší mikroagregáty, jež dosahují velikostí 20–250  $\mu\text{m}$ . Spojením těchto větších mikroagregátů vznikají makroagregáty o velikostech přesahujících 250  $\mu\text{m}$ . Jejich vazba je zajištěna opět pomocí polysacharidů (Obr. 3). (Costa et al., 2018)

Princip agregace minerálních částic pomocí EPS spočívá v přilnutí iontově nabitě matrix k jejich povrchu, pomocí elektrostatických interakcí jsou pak připojeny další částice. Schopnost EPS matrix chovat se tímto způsobem závisí na vlastnostech obsažených polysacharidů, například na jejich lineární struktuře, délce řetězců či počtu OH skupin a u různých organismů se liší. Do určité míry může být tato schopnost ovlivněna i vlastnostmi půdy, které se mohou odvíjet od jejího předchozího využívání, takovou vlastností je

například hodnota pH (Costa et al., 2018). Hodnota pH ovlivňuje náboj, kterým jsou nabity okraje půdních částecek. Při zásaditém pH je náboj negativní, při kyselém naopak pozitivní. To má vliv na iontové vazby s kyselými polysacharidy, které se tvoří jen mezi pozitivně nabitými místy na okrajích půdních částic (Labille et al., 2005).



**Obr. 3:** Schéma zachycující hierarchické členění půdních agregátů. (Costa et al., 2018), upraveno

V laboratoři se pro účely produkce EPS a lepší agregace půdy nejvíce pěstují bakteriální rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, a *Paenibacillus*, jelikož se vykazují nenáročností a vysokým výnosem (Costa et al., 2018). Podle Swabyho (1949) mají ale nejlepší schopnost tvořit agregáty houby, dále některé bakterie, a naopak téměř žádnou takovou vlastností se

nevykazují kvasinky. Mnoho druhů bakterií ale tuto schopnost také neprokázalo, neboť se jimi zformované agregáty rozpustily poté, co byly vystaveny vodě. Podobných výsledků bylo dosaženo jak na mikroagregátech, tak na makroagregátech. Při zkoumání smíšených kultur hub bylo prokázáno jemné zlepšení stability mikroagregátů i makroagregátů v porovnání s čistými kulturami, to ale naplatilo pro smíšené kultury bakterií. Vůbec nejlepšími výsledky se vyznačovaly některé kultury kombinující houby a bakterie, směs však musela být složena tak, aby neobsahovala bakterie produkující látky, které by omezovaly houbový růst. Swaby si to vysvětluje tím, že bakterie byly ve smíšených kulturách zřejmě chráněny houbovými hyfami a odplavování bakteriálních EPS proto nebylo tak rychlé.

Rashid et al. (2016) se domnívá, že přidání kombinace bakteriálních a houbových kultur do půdy by mohlo napomoci znovunastolení žádoucích vlastností půdy, o které přišla kvůli extenzivnímu zemědělskému využití, v takovém případě by ale bylo vhodné obohatit půdu také o organická hnojiva, protože organismy by nemusely v živinově chudém prostředí přežít, či by se navzájem omezovaly kompeticí.

Jednou z variant, jak podpořit agregaci půdy by mohlo být přidání samotných EPS, bez organismů, jež je produkují. Geoghegan a Brian (1948) přidali do půdy levany a dextransy. I malé množství těchto látek jednoznačně přispělo ke zvýšení stability agregátů. Vlastnosti levanu byly závislé na médiu, na kterém byl pěstován jeho producent *Bacillus subtilis*. Média se lišila obsahem sacharózy a dusíku, množství levanu bylo pozitivně korelováno se zvyšující se koncentrací sacharózy, jeho schopnost tvořit agregáty ale klesla. Koncentrace dusíku na ní neměla žádný vliv. Ač agregáty s levany vodě odolaly, byly časem rozloženy mikroorganismy.

### **6.1.2 Stabilita organické hmoty**

Půda je důležitou zásobárnou organického uhlíku. Probíhají v ní rozkladné procesy, které uhlík uvolňují, fotosyntetizující organismy ho naopak zase váží a po odumření navrací zpět do půdy. Množství uhlíku je mimo jiné ovlivněno lidskou činností a zemědělstvím, které může přispívat k rychlejšímu úbytku C z půdy a jeho unikání do atmosféry v podobě CO<sub>2</sub> (Chaplot a Cooper, 2015). Organický uhlík se z půdy vytrácí rychleji, než dochází k jeho přirozenému obnovování. Tento problém se někdy řeší jeho umělým doplňováním. Pochopení procesů, ke kterým dochází mezi jednotlivými půdními složkami může přispět k jejímu efektivnějšímu využívání (Redmile-Gordon et al., 2020).



Doba, po jakou C v půdě zůstává, než je rozložen a uvolněn do atmosféry, je určena několika faktory. K delšímu setrvání C v půdě mohou pozitivně přispět mikroorganismy, které zajišťují vznik komplexů jílu a organické hmoty tím, že rozkládají aromatické huminové látky (Umer and Rajab, 2012). Svou roli ve stabilitě hrají vazby mezi organickými molekulami a minerály, biochemické vlastnosti organické hmoty, ale také půdní agregáty (Six et al., 2002). Výzkumy ukázaly, že mikroagregáty, ať už jako součást makroagregátů, ale především volné, mají na stabilitu C výraznější vliv, než makroagregáty, kde nebyl prokázán vliv téměř žádný (Bossuyt et al., 2002; Six et al., 2002). Jastrow et al. (1996) pomocí sledování izotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  zjistili, že C setrvává v makroagregátech jen asi 140 let, zatímco v mikroagregátech výrazně déle – průměrně 412 roků. V agregátech se vytváří fyzická bariéra, která oddělí mikroorganismy od organické hmoty, ta je tak uvnitř agregátu chráněna před rozkladem, jelikož se k ní mikroorganismy kvůli příliš malé velikosti pórů či výskytu vody v nich nedostanou. Dvnitř agregátů se hůře dostává i kyslík a jeho nedostupnost vede ke snížené biologické aktivitě mikroorganismů uvnitř agregátů (Six et al., 2002). Při rozpadu agregátů dochází k uvolňování chráněné organické hmoty, která může na vzduchu snadněji oxidovat a unikat ve formě  $\text{CO}_2$  do atmosféry. Negativní vliv má například i eroze, kdy je exponovaná organická hmota odplavována pryč. Na půdu tedy mají agregáty pozitivní vliv a jejich soudržnost je žádoucí (Chaplot and Cooper, 2015).

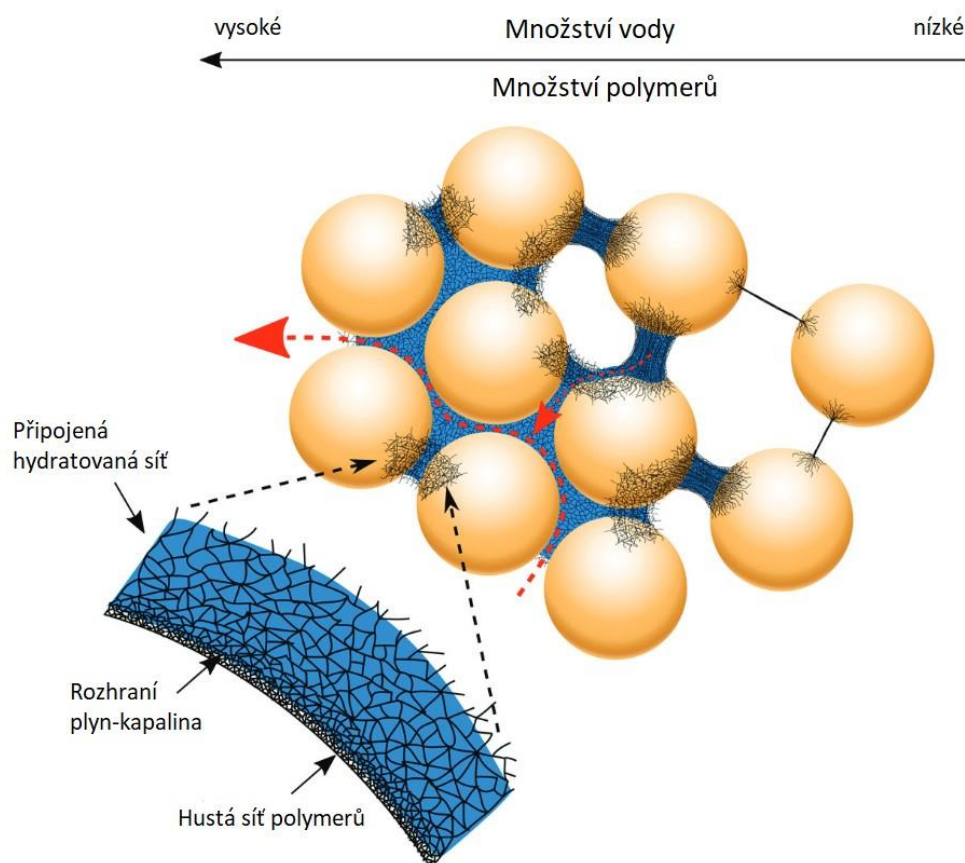
Kromě pozitivního vlivu na zadržování uhlíku pomocí stabilizace agregátů mohou i EPS samotné sloužit jako zásobárna C, který by teoreticky mohl být dobrým zdrojem pro ostatní organismy, jehož konzumací by ho dopravovaly do vyšších trofických vrstev. Vzhledem k množství enzymů, které by byly pro strávení molekul EPS nutné ale není známo mnoho organismů, které by se tímto způsobem živily (Costa et al., 2018). Wang et al. (2015) použil k odhalení takových organismů metodu sondování pomocí stabilních izotopů, jimiž obohatil EPS vyprodukované bakterií *Beijerinckia indica*. Výsledky ukázaly, že většina konzumentů EPS byly dosud neznámé bakterie, které patřily do kmene Planctomycetes.

### 6.1.3 Zadržování vody

Matrix je sama o sobě, jak již bylo řečeno z velké části tvořena vodou. Sacharidy, které obsahuje, na sebe velmi dobře vážou vodu a pomáhají tak chránit bakterie před rychlým vyschnutím. Matrix zpomaluje ubývání vody a bakterie tak mají dostatek času, aby si zajistily potřebné změny metabolismu a přizpůsobily se novým podmínkám (Roberson and Firestone, 1992). Z toho nemusí těžit jen organismus samotný, ale může to přinášet

benefity pro celý ekosystém – tyto vlastnosti EPS by mohly být užitečné například v zemědělství nebo v boji proti stále se zhoršujícímu vysychání krajiny (Deng et al., 2015).

Zvýšená schopnost zadržovat vodu v zeminách obsahující EPS spočívá zejména ve tvorbě agregátů, mezi jejichž úzkými prostory se lépe drží voda (Deng et al., 2015). Napříč volnými prostory mezi částčkami zeminy se vytváří husté sítě vláken z EPS. Poměrně hustý spletenec vláken na okraji zabraňuje odpařování, navíc při úbytku vody dochází ke smršťování sítě vláken a tím ještě k většímu zhuštění a nepropustnosti. Pod povrchem v hloubi sítě se pak dále drží voda v tekuté formě, která může napříč touto konstrukcí proudit a být využívána například rostlinami (Obr. 4) (Benard et al., 2019). Některá mikrobiální společenství také mohou vytvářet pevné půdní krusty a zpomalovat tak odpařování vody ze substrátu pod nimi (Benard et al., 2019). Roberson a Firestone (1992) zjistili, že i půda obohacená jen o samotné EPS, extrahované z mikroorganismů rodu *Pseudomonas*, vysychala pomaleji než vzorek neobohacený EPS, dokázala také zadržet větší objem vody.



**Obr. 4:** Zobrazení vztahu hydratace a hustoty polymerní sítě mezi částčkami půdy. Červené šipky symbolizují proudění vody. (Benard et al., 2019), upraveno



#### 6.1.4 Vliv na rostliny

Přítomnost producentů EPS má pozitivní vliv na růst rostlin, prospěšnost ale nespočívá jen v již výše zmíněné schopnosti zadržovat vodu. EPS zřejmě hraje důležitou roli při ustanovování symbiotického vztahu mezi rostlinami a bakteriemi fixující dusík. Konkrétně EPS produkované rhizobiálními bakteriemi jsou rozpoznávány rostlinným symbiontem – luštěninou – pomocí speciálních receptorů, při zaznamenání těchto látek začne rostlina vytvářet nody a posléze těmto bakteriím umožní je osídlit. Pro osídlení a aktivaci receptoru je nutná určitá struktura EPS, rostlina tedy neumožňuje vstup zdaleka všem bakteriím (Kawaharada et al., 2015).

Upadhyay et al. (2011) pozoroval zvýšenou odolnost rostlin vůči nadměrné salinitě, pokud byly přítomné bakterie produkující EPS. Matrix rhizobakterií zachycovala  $\text{Na}^+$  ionty z okolí a tím snižovala množství iontů, s kterými se musela rostlina vypořádat. Některé druhy bakterií také dokázaly vytvářet rozpustné formy fosfátu a zpřístupnit tak tyto živiny rostlinám, které dorůstaly větších velikostí. Rhizobakterie pomáhají rostlině zadržovat vodu v blízkosti kořenů pomocí tvorby agregátů a získávat živiny jako je draslík či dusík, symbiotické bakterie z tohoto vztahu naopak získávají organický uhlík (Costa et al., 2018; Rashid et al., 2016). Všestrannou prospěšnost EPS pro půdu a rostliny prokázali Rogers a Burns (1994), kteří pozorovali změny způsobené přítomností sinice *Nostoc mucorum*. Agregace půdy se po 300 dnech zvýšila o 18 %, došlo také k nárůstu počtu organismů, které půdu obývaly. Množství celkového uhlíku se zvýšilo v průměru o více než 50 %, u dusíku byl nárůst ještě výraznější o téměř 120 %. Pozitivní vliv měla přítomnost sinice také na klíčení semenáčků salátu, jež oproti neošetřené půdě vzrostlo o více než 50 %.

### 6.2 Vodní prostředí

#### 6.2.1 Sedimenty a cyklus uhlíku

V usazeninách na dně vodních těles žije mnoho organismů produkujících EPS, patří mezi ně některé řasy (zejména rozsivky) i prokaryotní organismy, které svými produkty zvyšují stabilitu sedimentů. I malá přítomnost EPS dokáže výrazně zlepšit jejich soudržnost. EPS funguje jako pojivo mezi zrnky substrátu, vytváří mezi nimi vlákna. Působí také na jemnější úrovni, kde ovlivňuje sílu molekulárních vazeb mezi částčkami. Přítomnost

organismů produkujících exopolymery významně zpomaluje odnos částí sedimentů proudem. (Tolhurst et al., 2002)

Stmelovací schopnosti EPS také přispívají k agregaci drobných částeczek a tvorbě vloček. Jedna z důležitých období vloček je tzv. mořský sníh, který se z velké části skládá právě z EPS. Sníh hraje významnou roli v potravním řetězci oceánů, EPS tak zásadně ovlivňuje cyklus uhlíku v mořích. Uhlík obsažen ve sněhových vločkách klesá ke dnu, kde je jinak organických látek nedostatek, a slouží jako zdroj pro další organismy. Organismy produkující exopolymery mohou být také přímo požírány jinými živočichy, například heterotrofními bakteriemi. Větší uskupení pak mohou sloužit jako dobrý zdroj uhlíku pro větší živočišný plankton (Sohm et al., 2011). Podobným způsobem se ale do potravního řetězce mohou dostávat i škodlivé látky, jako jsou třeba některé kovy, které se v matrix hromadí. Ve vločkách se mohou usazovat i některé potenciálně nebezpečné patogenní bakterie (Decho, 2000).

Tvorby vloček se hojně využívá při čištění odpadních vod, kde tvoří součást aktivovaného kalu a napomáhají sedimentaci. Mají také schopnost vstřebávat ionty těžkých kovů, které se váží na karboxylové skupiny v EPS. Tímto způsobem může být odstraňována například měď, uran nebo kadmium (H-C and Wingender, 2001b).

Proces flokulace může být ovlivněn množstvím EPS, ale neexistuje zde jednoznačná shoda. Badireddy et al. (2010) zaznamenal nízkou míru flokulace při exponenciální fázi růstu mikroorganismů. V této fázi bylo produkováno málo EPS a převažovaly zde odpudivé elektrostatické síly, jejich vliv byl překonán ve fázi stacionární, kdy vzrostla produkce EPS a došlo k tvorbě shluků. Wilén et al. (2003) naopak při vysoké koncentraci EPS dospěl k horším výsledkům a poznamenává, že složení EPS má na flokulaci větší vliv než množství EPS. Vzorek nejlépe flokuloval při vysokém obsahu proteinů v matrix, zatímco přítomnost huminových látek měla na flokulaci negativní vliv. Podrobný princip a podíl jednotlivých komponent EPS na tvorbu vloček není zatím uspokojivě vysvětlen (Lai et al., 2018). Určitý podíl na agregaci buněk může mít i náboj jejich povrchu či jeho hydrofobicita, tyto faktory ovlivňují tvorbu shluků ještě před tím, než začnou buňky produkovat větší množství EPS. Schopnost tvořit agregáty může být ovlivněna také sekundárními strukturami molekul, pozitivní vliv mají třeba proteiny v konformaci  $\beta$ -sheet nebo  $\alpha$ -helix (Badireddy et al., 2010). Na tvorbu vloček mají vliv i vlastnosti vodního prostředí, např. hodnota pH nebo

koncentrace kationtů, a také velikostní a chemické složení minerálních částic sedimentu (Lai et al., 2018).

### 6.2.2 Extrémní biotopy

Některé mikroorganismy mohou být i ve vodním prostředí vystaveny extrémním vlivům, matrix jim při tom slouží jako dobrá ochrana.

Takovým příkladem mohou být mikroorganismy využívající povrchového napětí vodní hladiny a žijící těsně na nebo pod ní, tzv. neuston. Na hladině dochází k častým změnám teploty a organismy musí čelit přímému UV záření ze slunce. Výhodou takového prostředí je, že na hladině dochází k hromadění organických látek, například lipidů nebo polysacharidů, které mohou být buňkami využity. Vytváří se zde také vazká vrstva, tvořená exopolysacharidy příznivá pro život bakterií. Stav této povrchové vrstvy může mít vliv na výměnu plynů mezi oceánem a atmosférou, protože kyslík a oxid uhličitý vyprodukovaný mořskými organismy uniká do atmosféry právě tudy. Bakterie žijící v neustonu produkují do okolí různé látky, některé z nich mohou měnit sílu povrchového napětí – čím menší povrchové napětí, tím lépe můžou plyny procházet. (Flemming, 2011)

Dalším příkladem jsou organismy žijící v přílivové zóně, kde dochází k výrazným změnám podmínek během dne. Často bývají vystaveny vysychání a změnám salinity, matrix jim slouží jako zásobárna vody a iontů. Na schopnost polymerů zadržovat ionty může negativně působit UV záření, které způsobuje jejich rozpad na kratší řetězce. V přílivových oblastech dochází k tvorbě biofilmů, které mohou pokrývat povrchy rostlin, kamenů nebo sedimentu. Materiál, který tvoří slizovitý obal – především polysacharidy – je špatně rozložitelný a při přemnožení a náhlém odumření velkého množství těchto organismů může docházet k znečištění, které se projevuje například vznikem nadměrného množství pěny (Decho, 2000). Biofilmy v přílivových zónách jsou často velmi husté a několikavrstevnaté, takové útvary se označují za koberce. Mimo přílivové zóny je lze nalézt také kolem horkých pramenů. U mikrobiálních koberců je patrné rozdělení na několik vrstev, horní vrstva je zpravidla zelená a zajišťuje fotosyntézu a ochranu proti UV záření, ve spodních vrstvách se vyskytují chemotrofní organismy (Madigan et al., 2019). Dále se zde mohou vyskytovat fixátoři dusíku, např. sinice (Zammit et al., 2021).

Stromatolity jsou několikavrstevnaté zkamenělé útvary, které vznikly jako pozůstatek činnosti prvních fotosyntetizujících organismů. Jedná se o jeden z nejstarších dochovaných důkazů života na Zemi, u některých nálezů je stáří odhadováno až na 3,5 miliard let. Dříve

byly velmi hojné, asi před miliardou let ale začaly rychle mizet a dnes se dochovaly jen na několika místech na světě. Lze je nalézt v mělkých vodách australské zátoky Shark Bay či u pobřeží Bahamských ostrovů nebo v okolí horkých pramenů v americkém Yellowstonešském národním parku. Za jejich tvorbu jsou zodpovědné například zelené sirné bakterie *Chloroflexus*, ale zásadní podíl mají především sinice (Madigan et al., 2019). Konkrétně bahamské stromatolity vznikají hlavně činností sinice *Schizotrix* sp., EPS které jsou organismy produkovány způsobují, že dochází ke srážení uhličitanu vápenatého, který se v EPS zachytává, čímž vznikají tvrdé mineralizované vrstvy (Kawaguchi and Decho, 2002).

### **6.2.3 EPS a znečištění**

Biofilmy mohou ve vodním prostředí působit problémy. Vykytují se téměř všude – na lodních trupech, molech a na dalších ve vodě ponořených předmětech, kde mohou přispívat k jejich degradaci. Jsou také přítomny ve vodovodním potrubí, kde mohou působit předčasnou rezivění případně uvolňování podmíněných patogenů do pitné vody (Madigan et al., 2019). Vrstva biofilmu také zvyšuje povrchové tření, takže je na transport takto porostlých lodí potřeba využít více energie. EPS matrix je velice stabilní a odstranění biofilmů z povrchu je technicky velmi obtížné (H-C a Wingender, 2001b).

Rozvodné vodovodní potrubí běžně obsahují bakterie, které člověku nijak neškodí, občas se zde ale mohou přemnožit škodlivé patogeny (např. původce cholery *Vibrio cholerae*) a působit nepříjemnosti. I pro takovéto případy jsou vyvíjeny chemikálie, které by dokázaly narušit stabilitu biofilmů a zabít škodlivé mikroby, pokud se běžně používané procesy (např. chlorování) ukážou jako neúčinné (Madigan et al., 2019). Pouhé zabití buněk však nemusí znamenat účinné odstranění problému, v membránových reaktorech využívaných k čištění odpadních vod působí problémy i EPS, které se uvolní po odumření buněk a dále ucpávají póry membrán těchto reaktorů (H-C a Wingender, 2001b).

## **6.3 EPS a patogenní mikroorganismy a komenzálové**

### **6.3.1 EPS a patogenní mikroorganismy**

Některé organismy, které lze běžně najít ve volné přírodě nebo v lidském těle (např. v půdě či zubním povlaku) jsou za normálních okolností neškodné, když se jim ale naskytne vhodné podmínky, mohou působit zdravotní komplikace. Problém nastává zejména ve chvíli, kdy začnou utvářet biofilmy, které jim umožňují lépe přilnout k hostitelské tkáni a zabraňovat působení antibiotik (Bales et al., 2013). Takovými

organismy jsou například bakterie ze skupiny „ESKAPE“, pojmenované podle své schopnosti „uniknout“ z dosahu antibiotik, kam se řadí *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp. (Bales et al., 2013).

V matrix byly také objeveny proteiny, které mají antibakteriální účinky, jedná se například o některé proteiny s amidovými, aminovými a karboxylovými skupinami či fenolovým kruhem (Pandey et al., 2010). Mezi mikroorganismy běžně produkovaná antibiotika patří látky ze skupiny aminoglykosidů (např. streptomycin), které negativně ovlivňují růst buňky vazbou na 16S rRNA 30S podjednotky ribozomu a znemožňují správné čtení mRNA, což vede k výrobě nesprávných proteinů (Madigan et al., 2019). Beta-laktámová antibiotika zase inhibují syntézu peptidoglykanů, které jsou důležité pro stavbu buněčné stěny, jsou jimi např. peniciliny, cefalosporiny nebo monobaktamy. Antibiotika ze skupiny makrolidů (např. erythromycin) zabraňují prodlužování polypeptidového řetězce při translaci proteinů vazbou na ribozom, inhibují růst buňky a na některé organismy působí i baktericidně (Etebu and Arikekpar, 2016). Mezi toxiny (Sandkvist et al., 2000), které jsou do matrix produkovány patří například neuraminidázy, které odštěpují sialové kyseliny připojené ke glykolipidům a tím zpřístupňují sliznici kolonizaci (Soong et al., 2006), chitinázy pomáhající rozkládat chitinové složky napadeného organismu (Busby et al., 2012) nebo choleratoxin, který zvyšuje hladinu cAMP postižené buňky a tím jí způsobí ztrátu vody a elektrolytů (Vanden Broeck et al., 2007).

Škodlivé biofilmy mohou pokrývat buď přímo tkáň nebo cizí, během chirurgických zákroků do těla vpravené předměty (Murugan et al., 2016). Například povrch plicní tkáně dokáže efektivně kolonizovat a pokrývat hustým biofilmem *Pseudomonas aeruginosa*, její EPS matrix obsahuje polysacharid alginát a způsobuje obtíže při cystické fibróze (Bales et al., 2013; Madigan et al., 2019). Původce průjmového onemocnění cholery – *Vibrio cholerae* – vytváří biofilmy v lidských střevech zejména v pokročilejším stádiu nákazy, čímž znemožní vstřebávání živin skrz střevo a po jejich vyloučení z těla ven mu umožňují přežít a rozšiřovat se dál (Sengupta et al., 2016). Co se týče těla cizích předmětů, např. zdravotnických pomůcek či implantátů, velký problém tvoří biofilmy zejména na trubičkách vpravovaných do močových cest (tzv. katetrech), které jsou jedním z nejčastěji vnitřně používaných zdravotnických pomůcek. Organismy na nich se usídlující, například *Pseudomonas aeruginosa* či *Staphylococcus aureus* při dlouhodobějším používáním způsobují zánětlivá onemocnění močových cest (Murugan et al., 2016).

Kvůli zdravotním potížím, které mohou bakteriální biofilmy způsobit, se stále hledají nová řešení, jak zamezit jejich tvorbě, či jak se nárostů zbavit, pokud už se stihly vytvořit (Madigan et al., 2019). Situace je značně komplikovaná již zmíněnou schopností biofilmu tlumit účinky běžných antibiotik, to může mít několik důvodů. EPS matrix působí jako spleť bariéra, přes kterou se látky nedostanou do hlubších vrstev. Komplikace představují i efluxní pumpy, které aktivně pumpují podávaná antibiotika z buněk. Jejich syntéza a aktivita je výrazně podpořena v biofilmech oproti samostatně žijícím buňkám (Madigan et al., 2019; Murugan et al., 2016). Dále se v matrix nachází enzymy, které dokáží zabránit povětšinou hydrofilním a kladně nabitým molekulám antibiotik v účinnosti, takovými enzymy jsou např. formaldehyd lyáza, formaldehyd dehydrogenáza nebo beta-laktamázy (Murugan et al., 2016).

### 6.3.2 EPS a komenzálové

Komenzálové, např. podporující trávení potravy v zažívacím traktu vyšších organismů, nejsou na rozdíl od patogenů tolik studovanou, leč důležitou skupinou organismů. Mikrobům obývajícím trávicí trakt mohou EPS napomáhat k přežívání v extrémních podmínkách. Například u druhu *Bifidobacterium breve* bylo zjištěno, že EPS organismu pomáhají vyhnout se zničení imunitní reakcí těla, zároveň dokáží snižovat riziko rozšíření infekce. (Fanning et al., 2012)

## 7 Producenti EPS

Exopolymerní látky produkuje široká škála organismů různých velikostí od eukaryotních po prokaryotní.

### 7.1 Bakterie

Bakteriální zástupce producentů EPS lze nalézt ve velmi různých prostředích, s čímž souvisí také typ jejich metabolismu. Specifika aerobní a anaerobní produkce EPS již byly rozvedeny v dřívější kapitole.

Anaerobní zástupci se vyskytují především v bezkyslíkatých prostředích, kde jim nekompetují aerobní organismy. Jako anaerobní producenty EPS lze uvést druhy z rodu *Bifidobacterium* (např. *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *B. longum*), jehož zástupci obývají lidský zažívací trakt (Ruas-Madiedo et al., 2007). EPS které produkují mají schopnost ovlivňovat přilnavost probiotik a patogenů ke střevním stěnám, podobné vlastnosti mají EPS produkované bakteriemi mléčného kvašení (Butta et al., 2017). Bakterie

mléčného kvašení jsou převážně anaerobní organismy obývající prostředí s kyselým pH a velkým obsahem sacharidů (Rombouts et al., 2020). Tyto bakterie jsou běžně využívány k výrobě mléčných výrobků, kde jejich exopolymery dodávají výrobku požadované strukturní vlastnosti. EPS produkují druhy z rodu *Lactococcus* (např. *Lactococcus lactis*), *Streptococcus* (např. *Streptococcus mutans*) nebo *Lactobacillus* (např. *Leuconostoc mesenteroides*) (Behare and Rameshwar, 2009).

Mezi aerobní producenty lze zařadit zástupce rodu *Pseudomonas* (např. *Pseudomonas putida*, *P. mendocina*) a *Bacillus* (např. *Bacillus licheniformis*), jež se běžně vyskytují v půdě a v okolí kořenů rostlin, kterým pomáhají odolávat suchu. Za tímto účelem jsou také hojně studováni zástupci rodu *Rhizobium* (např. *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp.) (Naseem et al., 2018). EPS produkují i aerobní gramnegativní bakterie *Xanthomonas campestris*, *Komagataeibacter xylinus* nebo *Sphingomonas paucimobilis* (Behare and Rameshwar, 2009). EPS byly také detekovány u myxobakterií, tato zvláštní skupina mikroorganismů je využívá ke vzájemné komunikaci a hromadnému koordinovanému pohybu (Muñoz-Dorado et al., 2016). EPS vytváří i některé fotosyntetické bakterie – sinice. EPS byly zaznamenány jak u koloniálních druhů (např. *Microcystis aeruginosa*, *Aphanothece clathrata*), tak u vláknitých sinic (např. *Limnothrix* sp., *Planktothrix agardhii*) (Pannard et al., 2016). Sinice *Schizotrix* sp. se svou produkcí podílí na tvorbě bahamských stromatolitů (Kawaguchi and Decho, 2002).

Mezi významné producenty patří i organismy obývající extrémní biotopy, například termofilní bakterie *Bacillus thermantarcticus* a *Geobacillus thermodenitrificans*, tyto organismy se často vyskytují v blízkosti geotermálních pramenů (Osemwegie et al., 2020). Výhodami získávání EPS z těchto organismů by mohl být kratší čas, který potřebují na fermentaci, produkty se zajímavými vlastnostmi nebo fakt, že většina těchto organismů se neřadí mezi patogeny (Panosyan et al., 2018).

## 7.2 Archea

Mezi archeami byla produkce EPS dokázána u některých organismů žijících v extrémních podmínkách, z halofilních archeí se jedná například o rody *Haloferax*, *Haloarcula* nebo *Halococcus* (Poli et al., 2011), z termofilních např. *Archaeoglobus*, *Sulfobolus* a *Thermococcus* (Kannan et al., 2022). Archeální producenty lze ale nalézt i v běžnějších podmínkách, například v mořském sedimentu, tam se nachází zástupci rodu *Natrinema* či *Halomicrobium* (Kannan et al., 2022).

Zástupci skupiny archea zatím nejsou pro výrobu EPS tolik využívány, ačkoliv produkují stejné polysacharidy, pro které jsou pěstovány bakterie (xanthan, kurdlan, ...). Archea by mohly představovat potenciálně vhodný zdroj EPS, jelikož na rozdíl od bakterií u nich nejsou známy žádné druhy, které by způsobovaly onemocnění. (Charlesworth a Burns, 2015)

### 7.3 Houby

Houboví producenti EPS jsou velmi různorodí, od stopkovýtrusných hub (např. makroskopická lesklokorka lesklá – *Ganoderma lucidum*), přes některé plísně (např. *Aspergillus* sp.), až po kvasinky (např. *Candida albicans*), pořád se ale v tomto ohledu jedná o poměrně neprozkoumanou skupinu (Mahapatra a Banerjee, 2013). Některé druhy hub už jsou průmyslově využívány, kromě dříve zmíněných jsou to namátkou i hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*), *Fusarium* sp. či *Botryosphaeria* sp., naopak produkce EPS patogeny jako jsou *Candida albicans* či *Aspergillus fumigatus* je spíše nežádoucí, jelikož zvyšuje jejich odolnost (Osemwegie et al., 2020).

### 7.4 Řasy

Řasy nejsou tak zkoumanými producenty v porovnání se sinicemi nebo bakteriemi. EPS vytváří jak sladkovodní, tak mořské řasy. Zástupce lze nalézt mezi zelenými řasami (*Chlorella* sp., *Oocystis* sp., ...), rozsivkami (*Cymbella cistula*, *Navicula salinarum*, ...) i ruduchami (*Porphyridium* sp., ...). (Xiao a Zheng, 2016)

## 8 Detekce EPS

### 8.1 Elektronová mikroskopie

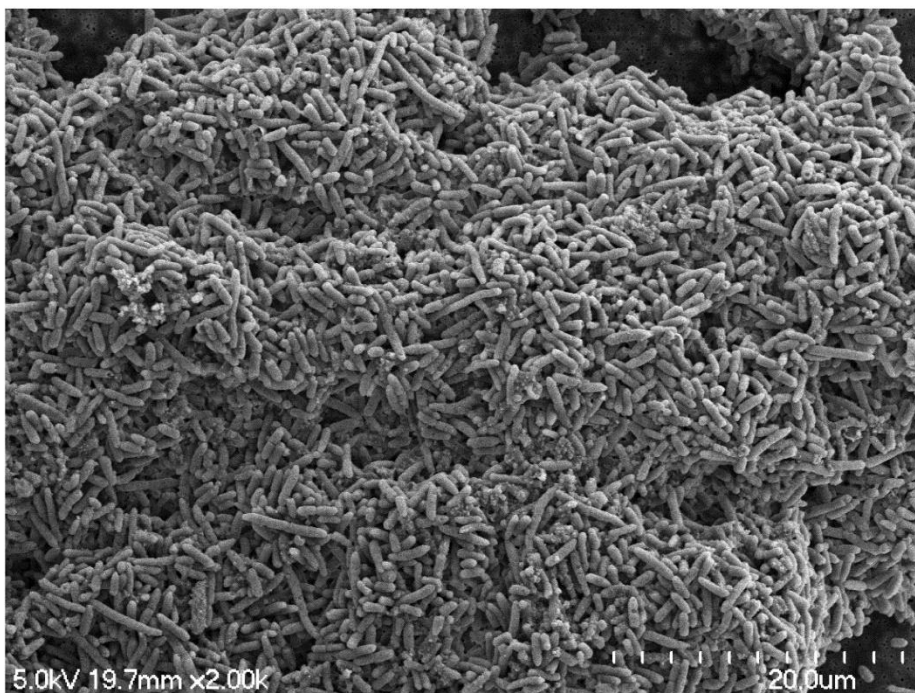
Elektronová mikroskopie umožňuje vytvářet velmi detailní snímky zkoumaného objektu. Elektronových mikroskopů existuje více druhů, lze rozlišit například skenovací (SEM) nebo transmisní (TEM) elektronový mikroskop, které se mohou objevovat v různých úpravách. Pro většinu elektronových mikroskopických technik je nutné vzorek nějak upravit, aby byl pod mikroskopem viditelný, např. pro SEM se nejčastěji vzorek pozlacuje. Největší úskalí při pozorování EPS matrix pod elektronovým mikroskopem představuje její obrovský obsah vody. Pro některé techniky je nutné vzorek předem vysušit různě koncentrovanými roztoky etanolu, což může značně pozměnit architekturu matrix. Voda také není příliš



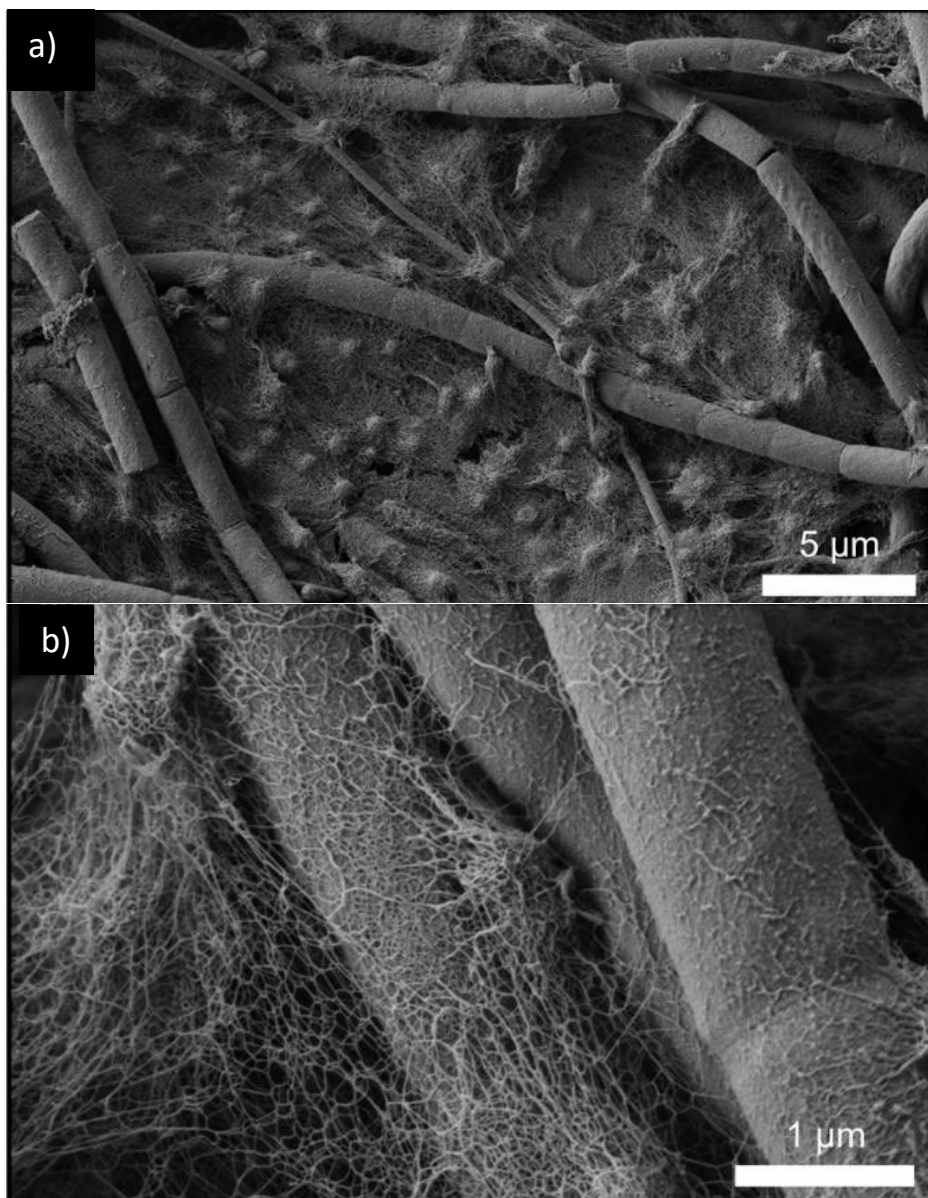
kontrastní, často se tak vzorek ošetřuje chemikáliemi pro zvýšení viditelnosti. (Priester et al., 2007)

SEM je využívána k zobrazování povrchové struktury buňky (Obr. 5, Obr. 6). Tato technika se ukázala jako nejlépe fungující na vzorky s vysokým obsahem kovů, těmi jsou například mikroorganismy, které se podílejí na jejich cyklech. Zvýšeného obsahu kovů a lepší viditelnosti lze docílit obarvením vzorku pomocí různých roztoků kovů, například ruthenia (tzv. ruthenium red) (Priester et al., 2007). Pomocí skenovací elektronové mikroskopie lze pozorovat například způsob, jakým se biofilmy přichytávají k podkladu (Priester et al., 2007) či podrobně zkoumat, jakým způsobem ovlivňuje přítomnost EPS strukturu mléčných výrobků (Hassan et al., 2003).

U TEM narážíme na podobný problém s vysokou hydratací matrix. Pro zvýšení kontrastu se přidávají roztoky kovů bohatých na elektrony. Místo vysoušení vzorku je možné zvolit metodu rychlého zmrazení (tzv. cryo-TEM), při kterém led nestihne vytvořit ledové krystalky, které by narušily strukturu buňky. Transmisní elektronové mikroskopie lze užít například pro přesné měření vzdálenosti mezi jednotlivými komponenty. (Dohnalkova et al., 2011)



**Obr. 5:** Snímek několikavrstevnatého mikrobiálního biofilmu pořízený metodou SEM. (Chitlapilly Dass a Wang, 2022)

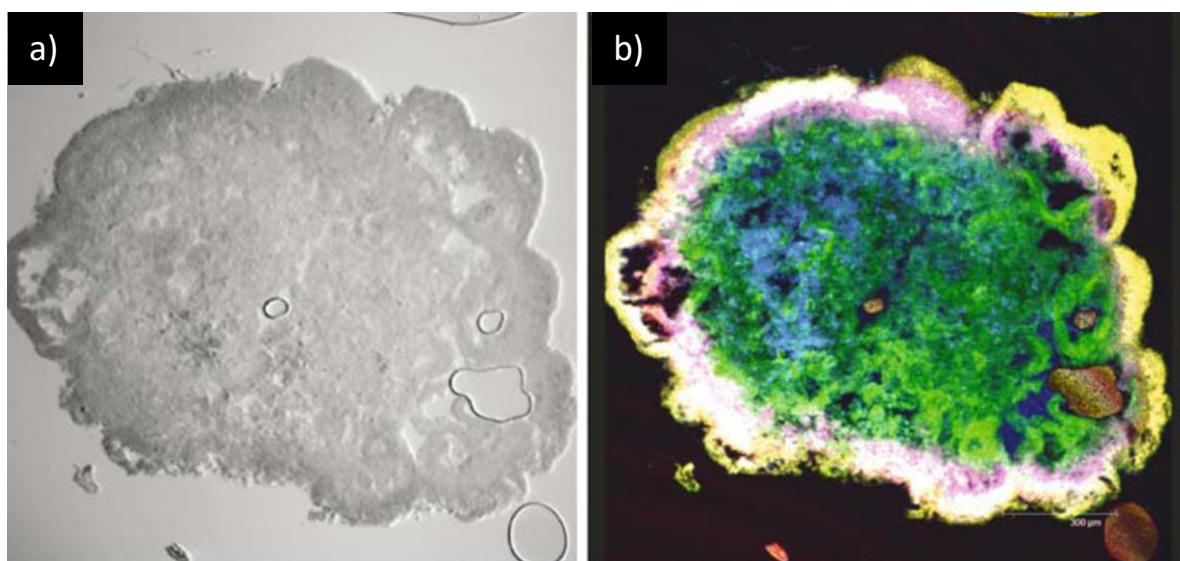


**Obr. 6:** Snímky biofilmu ze SEM; **a)** vláknité sinice a heterotrofní koky pokryté EPS; **b)** EPS shluklé do síťovité struktury, která vznikla v důsledku manipulace při mikroskopování. (McCutcheon and Southam, 2018)

## 8.2 Fluorescence

Jedním ze způsobů vizualizace EPS je využití fluorescence. Na vzorek jsou v tomto případě aplikované látky s fluorescenčními značkami, které se váží na určité molekuly. Světlo, které emitují je možné zachytit v konfokálním mikroskopu. (Strathmann et al., 2002)

Pro zobrazování polysacharidů se používají fluorescenčně značené lektiny (například concavalin A), které mají schopnost vázat se na molekuly cukrů (Strathmann et al., 2002). Jiná fluorescenční barviva je možné použít na zobrazení proteinů, lipidů nebo mrtvých buněk. Kombinaci fluoroforů je však nutné volit tak, aby se jimi vyzařované signály vzájemně nepřekrývaly. Díky fluorescenci lze získat představu, jaké je rozložení EPS napříč biofilmem, z toho lze usuzovat na různé interakce mezi jednotlivými komponenty (Obr. 7) (Chen et al., 2007).



**Obr. 7:** Snímek granule tvořené EPS z konfokálního laserového skenovacího mikroskopu; **a)** za použití fázového kontrastu; **b)** vzniklý kombinací signálů emitovaných jednotlivými fluorescenčními barvivy. (Chen et al., 2007)

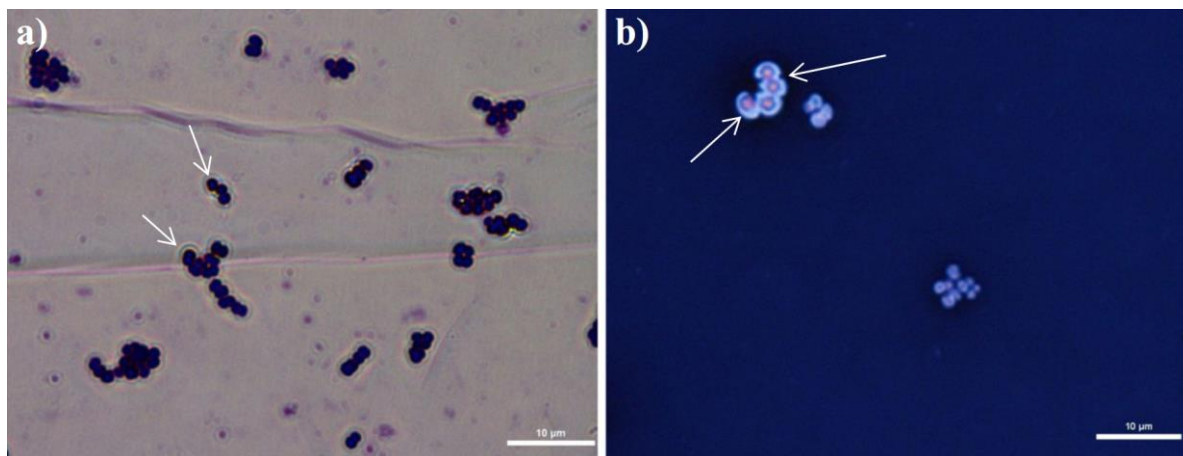
### 8.3 Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie má oproti předešlým metodám nespornou výhodu, co se týče dostupnosti. Je poměrně levná a nenáročná na vybavení – světelný mikroskop lze nalézt téměř v každé laboratoři, metodika je také výrazně jednodušší. (Oleksy and Klewicka, 2017)

Před mikroskopováním je nutné vzorek obarvit. Při barvení se většinou obarví pozadí a kyselými barvivy také vnitřek buňky, kapsule zůstávají průhledné či jen světle zabarvené. Jelikož každý organismus má poněkud jiné složení EPS, je nutné vybírat vhodné barvicí látky s přihlédnutím k individuálním vlastnostem zkoumané matrix. (Oleksy and Klewicka, 2017)

Opět se zde setkáváme s problémem matrix, která je velmi bohatá na vodu a může během tohoto procesu podléhat nežádoucím změnám. Duguid (1951) navrhuje metodu barvení běžným inkoustem bez nutnosti vysoušení či fixování vzorku plamenem, aby se minimalizovaly změny na struktuře polymerového obalu.

Barvicích technik existuje celá řada. Oleksy a Klewicka (2017) testovali některé z nich na organismu *Lactobacillus* spp., jehož kapsulovitý polymerní obal má spíše negativní náboj. Jako nejvhodnější se v tomto případě ukázaly metody podle Hisse a také Manevala (Obr. 8). Hissova metoda používá roztok krystalové violeti, kritickým krokem je fixování plamenem, které se musí provádět opatrně (Hiss, 1905). Maneval využívá roztoku konžské červené (Kuzhiyil et al., 2012). Jak však autoři výše zmíněné studie poznamenávají, jiní výzkumníci došli s jinými organismy k rozdílným výsledkům. Účinnost barvení záležela také na tom, zda byl vzorek pěstován v tekutém médiu nebo na agarové misce (Oleksy a Klewicka, 2017).



**Obr. 8:** Snímky ze světelného mikroskopu ( $\times 1000$ ), kapsle *Staphylococcus epidermidis* obarvené metodou podle **a)** Hisse a **b)** Manevala. (Oleksy a Klewicka, 2017)

Technikou se zajímavou historií je ta podle M'Fadyeana, která využívá methylenovou modř. Toto barvení bylo hojně využíváno v první polovině 20. století, kdy se využívalo k detekci bakterií způsobující tehdy rozšířené onemocnění dobytka ohrožující i člověka – anthrax (Owen et al., 2013). Ačkoliv dobře funguje na detekci EPS u původce tohoto onemocnění – *Bacillus anthracis*, u typických producentů EPS jako je *Lactobacillus* spp. se tato metodika neosvědčila (Oleksy and Klewicka, 2017).

Světelná mikroskopie byla dříve k detekci EPS běžně a hojně využívána, dnes je však nahrazována modernějšími a často složitějšími technologiemi. I přes – nebo právě pro – svou jednoduchost může být v tomto ohledu i dnes užitečným nástrojem. Zájem o EPS v poslední době obecně roste a je zájem hledat druhy organismů, které jsou schopné tyto látky produkovat. Světelná mikroskopie by mohla být vhodným, a hlavně levným prvním krokem k detekování takových producentů. Mimo to umožňuje také zobrazovat polymerní kapsule, kterými se vyznačují některé patogenní organismy. (Oleksy and Klewicka, 2017)

## 9 Závěr

Tato práce shrnula poznatky o EPS z hlediska jejich složení, produkce, funkce v přírodních habitatech a detekce pomocí mikroskopie.

Produkce EPS je závislá na mnoha faktorech. Složení a množství vyprodukovaných EPS se liší v závislosti na konkrétním druhu organismu, ale také na podmínkách kultivace. K rozdílné produkci dochází v různých růstových fázích. Složení EPS může být ovlivněno poměrem množství dostupného uhlíku a dusíku. Dvojsečný efekt má nedostatek fosforu, který sice podporuje zvýšenou produkci EPS, ale zároveň zpomaluje nárůst buněčné biomasy, což může výsledné množství vyprodukovaných EPS snižovat. Zatím nebylo objasněno, proč má nedostatek fosforu na produkci EPS pozitivní vliv. Pro dosažení optimální produkce je důležité zohlednit přirozený habitat zkoumaného organismu a tomu přizpůsobit inkubační teplotu a hodnotu pH. Velmi nejasný je vliv kyslíku na produkci EPS, studie se neshodly na jednoznačném efektu kyslíku jak na aerobní, tak na anaerobní organismy. V důsledku rozdílných efektů zmíněných faktorů na množství a složení vyprodukovaných EPS je důležité stanovovat podmínky individuálně, pro každý pěstovaný organismus zvlášť. Produkce EPS smíšenými kulturami může při zvolení vhodné kombinace mikroorganismů přesahovat produkci čistých kultur, ale tato oblast nebyla zatím příliš prozkoumána. Interakce smíšených kultur by mohly být zajímavým směrem výzkumu i proto, že v přírodě se organismy nevyskytují izolovaně.

EPS představují pro mnoho mikroorganismů důležitý způsob, jak se vyrovnávat s nepříznivými podmínkami okolí, slouží také jako zásobárna látek a enzymů a hrají důležitou roli při tvorbě biofilmů. Organismy produkující EPS či jen samotné EPS z nich extrahované by mohly být využity pro podpoření tvorby půdních agregátů, které zabraňují rychlému vysychání půdy. Zejména půdní mikroagregáty pak přispívají k delšímu setrvání uhlíku v půdě. Přítomnost EPS má pozitivní vliv i na rostliny. Velmi studovanou formou EPS jsou vločky, kterých je využíváno v čištění odpadních vod za účelem sedimentace. Mechanismus flokulace ale ještě není zcela známý, nejasný je vliv složení EPS na tento proces. Stále se také hledají účinná řešení, jak efektivně odstraňovat biofilmy z nejrůznějších povrchů jako jsou vodovodní trubky nebo lidské tkáně.

Potenciálně zajímavým a neprobádaným zdrojem EPS by mohly být extremofilní bakterie či organismy z říše Archea, u kterých nejsou známy žádné patogeny.

EPS produkuje velké množství mikroorganismů, k jejich prvotní detekci je možné využít světelnou mikroskopii v kombinaci s vhodně zvolenou metodou barvení.

## 10 Seznam použité literatury

- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology* 59, 1114–1128. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x>
- Babiak, W., Krzemińska, I., 2021. Extracellular Polymeric Substances (EPS) as Microalgal Bioproducts: A Review of Factors Affecting EPS Synthesis and Application in Flocculation Processes. *Energies* 14, 4007. <https://doi.org/10.3390/en14134007>
- Badireddy, A.R., Chellam, S., Gassman, P.L., Engelhard, M.H., Lea, A.S., Rosso, K.M., 2010. Role of extracellular polymeric substances in bioflocculation of activated sludge microorganisms under glucose-controlled conditions. *Water Research* 44, 4505–4516. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.024>
- Bala Subramanian, S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) producing bacterial strains of municipal wastewater sludge: Isolation, molecular identification, EPS characterization and performance for sludge settling and dewatering. *Water Research* 44, 2253–2266. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.046>
- Bales, P.M., Renke, E.M., May, S.L., Shen, Y., Nelson, D.C., 2013. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLOS ONE* 8, e67950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067950>
- Behare, P., Rameshwar, S., 2009. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review. *Journal of Food Science and Technology* 46, 1–11.
- Benard, P., Zarebanadkouki, M., Brax, M., Kaltenbach, R., Jerjen, I., Marone, F., Couradeau, E., Felde, V.J.M.N.L., Kaestner, A., Carminati, A., 2019. Microhydrological Niches in Soils: How Mucilage and EPS Alter the Biophysical Properties of the Rhizosphere and Other Biological Hotspots. *Vadose Zone Journal* 18, 180211. <https://doi.org/10.2136/vzj2018.12.0211>
- Bhattacharjee, A., Thompson, A.M., Schwarz, K.C., Burnet, M.C., Kim, Y.-M., Nunez, J.R., Fansler, S.J., Farris, Y., Brislawn, C.J., Metz, T.O., McClure, R.S., Renslow, R.S., Shor, L., Jansson, J.K., Hofmockel, K.S., Anderton, C.R., 2020. Soil microbial EPS resiliency is influenced by carbon source accessibility. *Soil Biology and Biochemistry* 151, 108037. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108037>
- Bossuyt, H., Six, J., Hendrix, P.F., 2002. Aggregate-Protected Carbon in No-tillage and Conventional Tillage Agroecosystems Using Carbon-14 Labeled Plant Residue. *Soil Science Society of America Journal* 66, 1965–1973. <https://doi.org/10.2136/sssaj2002.1965>
- Boudarel, H., Mathias, J.-D., Blaysat, B., Grédiac, M., 2018. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *npj Biofilms Microbiomes* 4, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0062-5>
- Busby, J.N., Landsberg, M.J., Simpson, R.M., Jones, S.A., Hankamer, B., Hurst, M.R.H., Lott, J.S., 2012. Structural Analysis of Chi1 Chitinase from Yen-Tc: The Multisubunit Insecticidal ABC Toxin Complex of *Yersinia entomophaga*. *Journal of Molecular Biology* 415, 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.11.018>
- Butta, H., Sardana, R., Vaishya, R., Singh, K.N., Mendiratta, L., 2017. Bifidobacterium: An Emerging Clinically Significant Metronidazole-resistant Anaerobe of Mixed Pyogenic Infections. *Cureus* 9, e1134. <https://doi.org/10.7759/cureus.1134>



- Catley, B.J., 1971. Role of pH and Nitrogen Limitation in the Elaboration of the Extracellular Polysaccharide Pullulan by *Pullularia pullulans*. *Applied Microbiology* 22, 650–654. <https://doi.org/10.1128/am.22.4.650-654.1971>
- Chaplot, V., Cooper, M., 2015. Soil aggregate stability to predict organic carbon outputs from soils. *Geoderma* 243–244, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.12.013>
- Charlesworth, J.C., Burns, B.P., 2015. Untapped Resources: Biotechnological Potential of Peptides and Secondary Metabolites in Archaea. *Archaea* 2015, e282035. <https://doi.org/10.1155/2015/282035>
- Chen, M.-Y., Lee, D.-J., Tay, J.-H., Show, K.-Y., 2007. Staining of extracellular polymeric substances and cells in bioaggregates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75, 467–474. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0816-5>
- Chitlapilly Dass, S., Wang, R., 2022. Biofilm through the Looking Glass: A Microbial Food Safety Perspective. *Pathogens* 11, 346. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030346>
- Costa, O.Y.A., Raaijmakers, J.M., Kuramae, E.E., 2018. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Frontiers in Microbiology* 9, 1636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49, 711–745.
- Czaczyk, K., Myszka, K., 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances. *Polish Journal of Environmental Studies* 16, 799–806.
- Deb, D., Mallick, N., Bhadoria, P.B.S., 2019. Analytical studies on carbohydrates of two cyanobacterial species for enhanced bioethanol production along with poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, C-phycocyanin, sodium copper chlorophyllin, and exopolysaccharides as co-products. *Journal of Cleaner Production* 221, 695–709. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.02.254>
- Decho, A.W., 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20, 1257–1273. [https://doi.org/10.1016/S0278-4343\(00\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S0278-4343(00)00022-4)
- Decho, A.W., Lopez, G.R., 1993. Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnology and Oceanography* 38, 1633–1645. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.8.1633>
- Deng, J., Orner, E.P., Chau, J.F., Anderson, E.M., Kadilak, A.L., Rubinstein, R.L., Bouchillon, G.M., Goodwin, R.A., Gage, D.J., Shor, L.M., 2015. Synergistic effects of soil microstructure and bacterial EPS on drying rate in emulated soil micromodels. *Soil Biology and Biochemistry* 83, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.12.006>
- Dohnalkova, A.C., Marshall, M.J., Arey, B.W., Williams, K.H., Buck, E.C., Fredrickson, J.K., 2011. Imaging Hydrated Microbial Extracellular Polymers: Comparative Analysis by Electron Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1254–1262. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-10>
- Duguid, J.P., 1951. The demonstration of bacterial capsules and slime. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 63, 673–685. <https://doi.org/10.1002/path.1700630413>
- Elisashvili, V.I., Kachlishvili, E.T., Wasser, S.P., 2009. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45, 531–535. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050135>
- Etebu, E., Ariekpar, I., 2016. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research* 4, 90–101.

- Evans, A.N., 2013. The effect of nutrient limitations on the production of extracellular polymeric substances by drinking-water bacteria (diplomová práce). The University of Texas at Austin.
- Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., O'Connell Motherway, M., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., van Sinderen, D., 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 2108–2113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115621109>
- Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B., Poli, A., 2014. Fermentation Technologies for the Optimization of Marine Microbial Exopolysaccharide Production. *Marine Drugs* 12, 3005–3024. <https://doi.org/10.3390/md12053005>
- Flemming, H.-C., 2016. EPS—Then and Now. *Microorganisms* 4, 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>
- Flemming, H.-C., 2011. The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells.” *Journal of Bacteriology* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/jb.00858-07>
- Gamar-Nourani, L., Blondeau, K., Simonet, J. -M., 1998. Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology* 85, 664–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.00574.x>
- Geoghegan, M.J., Brian, R.C., 1948. Aggregate formation in soil. 1. Influence of some bacterial polysaccharides on the binding of soil particles. *Biochemical Journal* 43, 5–13.
- Han, X., Wang, Z., Zhu, C., Wu, Z., 2013. Effect of ultrasonic power density on extracting loosely bound and tightly bound extracellular polymeric substances. *Desalination* 329, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2013.09.002>
- Hassan, A.N., Frank, J.F., Elsoda, M., 2003. Observation of bacterial exopolysaccharide in dairy products using cryo-scanning electron microscopy. *International Dairy Journal* 13, 755–762. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00101-8)
- H-C, F., Wingender, J., 2001a. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology* 43, 1–8.
- H-C, F., Wingender, J., 2001b. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology* 43, 9–16.
- Hiss, P.H., Jr., 1905. A contribution to the physiological differentiation of *Pneumococcus* and *Streptococcus*, and to methods of staining capsules. *Journal of Experimental Medicine* 6, 317–345. <https://doi.org/10.1084/jem.6.4-6.317>
- Imlay, J.A., 2002. How Oxygen Damages Microbes: Oxygen Tolerance and Obligate Anaerobiosis. *Advances in Microbial Physiology* 46, 111–153. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(02\)46003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(02)46003-1)
- Jastrow, J.D., Miller, R.M., Boutton, T.W., 1996. Carbon Dynamics of Aggregate-Associated Organic Matter Estimated by Carbon-13 Natural Abundance. *Soil Science Society of America Journal* 60, 801–807. <https://doi.org/10.2136/sssaj1996.03615995006000030017x>
- Kannan, K., Pitchiah, S., Joseph, J.G., Ganapathy, D., Sundarajan, S., Ramakrishna, S., 2022. Marine Archaeal Extracellular Polymeric Substances from *Halococcus* AMS12, Their Characterization, and Biological Properties. *Journal of Marine Science and Engineering* 10, 1788. <https://doi.org/10.3390/jmse10111788>

- Kaplan, J.B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D.H., 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Biofilm Cells by an Endogenous  $\beta$ -Hexosaminidase Activity. *Journal of Bacteriology* 185, 4693–4698. <https://doi.org/10.1128/jb.185.16.4693-4698.2003>
- Kawaguchi, T., Decho, A.W., 2002. A laboratory investigation of cyanobacterial extracellular polymeric secretions (EPS) in influencing CaCO<sub>3</sub> polymorphism. *Journal of Crystal Growth* 240, 230–235. [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(02\)00918-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(02)00918-1)
- Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszyński, A., Carlson, R.W., Thygesen, M.B., Sandal, N., Asmussen, M.H., Vinther, M., Andersen, S.U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K.J., Ronson, C.W., Blaise, M., Radutoiu, S., Stougaard, J., 2015. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature* 523, 308–312. <https://doi.org/10.1038/nature14611>
- Kuzhiyil, A., Lee, Y., Shim, A., Xiong, A., 2012. Osmotic Stress Induces Kanamycin Resistance in *Escherichia coli* B23 through Increased Capsule Formation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 16, 5–10.
- Labille, J., Thomas, F., Milas, M., Vanhaverbeke, C., 2005. Flocculation of colloidal clay by bacterial polysaccharides: effect of macromolecule charge and structure. *Journal of Colloid and Interface Science* 284, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.001>
- Lai, H., Fang, H., Huang, L., He, G., Reible, D., 2018. A review on sediment bioflocculation: Dynamics, influencing factors and modeling. *Science of The Total Environment* 642, 1184–1200. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.101>
- Lakhal, R., Auria, R., Davidson, S., Ollivier, B., Dolla, A., Hamdi, M., Combet-Blanc, Y., 2011. Effect of Oxygen and Redox Potential on Glucose Fermentation in *Thermotoga maritima* under Controlled Physicochemical Conditions. *International Journal of Microbiology* 2010, e896510. <https://doi.org/10.1155/2010/896510>
- Le Fourn, C., Fardeau, M.-L., Ollivier, B., Lojou, E., Dolla, A., 2008. The hyperthermophilic anaerobe *Thermotoga Maritima* is able to cope with limited amount of oxygen: insights into its defence strategies. *Environmental Microbiology* 10, 1877–1887. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01610.x>
- Li, W., Mutuvulla, M., Chen, X., Jiang, M., Dong, M., 2012. Isolation and identification of high viscosity-producing lactic acid bacteria from a traditional fermented milk in Xinjiang and its role in fermentation process. *European Food Research and Technology* 235, 497–505. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1779-7>
- Lim, J.M., Kim, S.W., Hwang, H.J., Joo, J.H., Kim, H.O., Choi, J.W., Yun, J.W., 2004. Optimization of medium by orthogonal matrix method for submerged mycelial culture and exopolysaccharide production in *Collybia maculata*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 119, 159–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:119:2:159>
- Ma, Y., Zhao, M., Zhou, F., Liu, X., Liu, C., 2023. Anaerobic production and biosynthesis mechanism of exopolysaccharides in *Schizophyllum commune* 20R-7-F01. *International Journal of Biological Macromolecules* 253, 127339. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127339>
- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M., Stahl, D.A., Brock, T.D., 2019. Brock biology of microorganisms, Fifteenth edition, global edition. ed. Pearson, New York, New York.
- Mahapatra, S., Banerjee, D., 2013. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. *Microbiology Insights* 6, MBI.S10957. <https://doi.org/10.4137/MBI.S10957>

- Martin, J.P., 1971. Decomposition and binding action of polysaccharides in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 3, 33–41. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(71\)90029-0](https://doi.org/10.1016/0038-0717(71)90029-0)
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.-C., 1999. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules* 26, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00057-4)
- McCutcheon, J., Southam, G., 2018. Advanced biofilm staining techniques for TEM and SEM in geomicrobiology: Implications for visualizing EPS architecture, mineral nucleation, and microfossil generation. *Chemical Geology* 498, 115–127. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2018.09.016>
- Mezhoud, N., Zili, F., Bouzidi, N., Helaoui, F., Ammar, J., Ouada, H.B., 2014. The effects of temperature and light intensity on growth, reproduction and EPS synthesis of a thermophilic strain related to the genus *Graesiella*. *Bioprocess Biosyst Eng* 37, 2271–2280. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1204-7>
- Miqueleto, A.P., Dolosic, C.C., Pozzi, E., Foresti, E., Zaiat, M., 2010. Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 101, 1324–1330. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.026>
- More, T.T., Yadav, J.S.S., Yan, S., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management* 144, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.010>
- Muñoz-Dorado, J., Marcos-Torres, F.J., García-Bravo, E., Moraleda-Muñoz, A., Pérez, J., 2016. Myxobacteria: Moving, Killing, Feeding, and Surviving Together. *Frontiers in Microbiology* 7, 781. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00781>
- Murugan, K., Selvanayagi, K., Al-Sohaibani, S., 2016. Urinary catheter indwelling clinical pathogen biofilm formation, exopolysaccharide characterization and their growth influencing parameters. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.016>
- Naseem, H., Ahsan, M., Shahid, M.A., Khan, N., 2018. Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. *Journal of Basic Microbiology* 58, 1009–1022. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800309>
- Nichols, C.M., Bowman, J.P., Guezennec, J., 2005. Effects of Incubation Temperature on Growth and Production of Exopolysaccharides by an Antarctic Sea Ice Bacterium Grown in Batch Culture. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3519–3523. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.3519-3523.2005>
- Ninomiya, K., Matsuda, K., Kawahata, T., Kanaya, T., Kohno, M., Katakura, Y., Asada, M., Shioya, S., 2009. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on the growth and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium longum* cultivated under anaerobic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107, 535–537. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.12.015>
- Nouha, K., Kumar, R.S., Balasubramanian, S., Tyagi, R.D., 2018. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of Environmental Sciences* 66, 225–245. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.020>
- Oleksy, M., Klewicka, E., 2017. Capsular Polysaccharides of *Lactobacillus* spp.: Theoretical and Practical Aspects of Simple Visualization Methods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 9, 425–434. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9295-5>
- Osemwegie, O.O., Adetunji, C.O., Ayeni, E.A., Adejobi, O.I., Arise, R.O., Nwonuma, C.O., Oghenekaro, A.O., 2020. Exopolysaccharides from bacteria and fungi: current status

- and perspectives in Africa. *Heliyon* 6, e04205.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04205>
- Owen, M.P., Schauwers, W., Hugh-Jones, M.E., Kiernan, J.A., Turnbull, P.C.B., Beyer, W., 2013. A simple, reliable M'Fadyean stain for visualizing the *Bacillus anthracis* capsule. *Journal of Microbiological Methods* 92, 264–269.  
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.009>
- Pandey, A., Naik, M., Dubey, S.K., 2010. Hemolysin, Protease, and EPS Producing Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Strain An4 Shows Antibacterial Activity against Marine Bacterial Fish Pathogens. *Journal of Marine Sciences* 2010, e563205.  
<https://doi.org/10.1155/2010/563205>
- Pannard, A., Pédrone, J., Bormans, M., Briand, E., Claquin, P., Lagadeuc, Y., 2016. Production of exopolymers (EPS) by cyanobacteria: impact on the carbon-to-nutrient ratio of the particulate organic matter. *Aquatic Ecology* 50, 29–44.  
<https://doi.org/10.1007/s10452-015-9550-3>
- Panosyan, H., Di Donato, P., Poli, A., Nicolaus, B., 2018. Production and characterization of exopolysaccharides by *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 and *Geobacillus toebii* ArzA-8 strains isolated from an Armenian geothermal spring. *Extremophiles* 22, 725–737. <https://doi.org/10.1007/s00792-018-1032-9>
- Peña-Méndez, E.M., Havel, J., Patočka, J., 2005. Humic substances - compounds of still unknown structure: applications in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine* 3, 13–24.  
<https://doi.org/10.32725/jab.2005.002>
- Penna, A., 1999. Influence of nutrient ratios on the in vitro extracellular polysaccharide production by marine diatoms from the Adriatic Sea. *Journal of Plankton Research* 21, 1681–1690. <https://doi.org/10.1093/plankt/21.9.1681>
- Petrova, O.E., Sauer, K., 2016. Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion. *Current opinion in microbiology* 30, 67–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G.R., Nicolaus, B., 2011. Synthesis, Production, and Biotechnological Applications of Exopolysaccharides and Polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea* 2011, e693253. <https://doi.org/10.1155/2011/693253>
- Priester, J.H., Horst, A.M., Van De Werfhorst, L.C., Saleta, J.L., Mertes, L.A.K., Holden, P.A., 2007. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 68, 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.018>
- Rashid, M.I., Mujawar, L.H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I.M.I., Oves, M., 2016. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research* 183, 26–41.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007>
- Redmile-Gordon, M., Gregory, A.S., White, R.P., Watts, C.W., 2020. Soil organic carbon, extracellular polymeric substances (EPS), and soil structural stability as affected by previous and current land-use. *Geoderma* 363, 114143.  
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2019.114143>
- Roberson, E.B., Firestone, M.K., 1992. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1284–1291. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1284-1291.1992>
- Rogers, S.L., Burns, R.G., 1994. Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenous microbial populations, and seedling emergence, following inoculation of soil with *Nostoc muscorum*. *Biology and Fertility of Soils* 18, 209–215.  
<https://doi.org/10.1007/BF00647668>

- Rombouts, J.L., Kranendonk, E.M.M., Regueira, A., Weissbrodt, D.G., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M.C.M., 2020. Selecting for lactic acid producing and utilising bacteria in anaerobic enrichment cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 117, 1281–1293. <https://doi.org/10.1002/bit.27301>
- Roux, J.M., 1996. Production of polysaccharide slime by microbial mats in the hypersaline environment of a Western Australian solar saltfield. *International Journal of Salt Lake Research* 5, 103–130. <https://doi.org/10.1007/BF01995826>
- Ruas-Madiedo, P., Moreno, J.A., Salazar, N., Delgado, S., Mayo, B., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., 2007. Screening of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains Isolated from the Human Intestinal Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4385–4388. <https://doi.org/10.1128/AEM.02470-06>
- Sandkvist, M., Bagdasarian, M., Howard, S.P., 2000. Characterization of the multimeric Eps complex required for cholera toxin secretion. *International Journal of Medical Microbiology* 290, 345–350. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80038-7](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80038-7)
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S., Bjarnsholt, T., 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology* 20, 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Sengupta, C., Mukherjee, O., Chowdhury, R., 2016. Adherence to Intestinal Cells Promotes Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Infectious Diseases* 214, 1571–1578. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw435>
- Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., Li, X.-Y., 2010. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology Advances* 28, 882–894. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>
- Shin, H.-S., Kang, S.-T., Nam, S.-Y., 2001. Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Science and Technology* 43, 193–196. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0373>
- Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A., Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil* 241, 155–176. <https://doi.org/10.1023/A:1016125726789>
- Sohm, J., Edwards, B., Wilson, B., Webb, E., 2011. Constitutive Extracellular Polysaccharide (EPS) Production by Specific Isolates of *Crocospaera watsonii*. *Frontiers in Microbiology* 2, 229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00229>
- Soong, G., Muir, A., Gomez, M.I., Waks, J., Reddy, B., Planet, P., Singh, P.K., Kanetko, Y., Wolfgang, M.C., Hsiao, Y.-S., Tong, L., Prince, A., 2006. Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *The Journal of Clinical Investigation* 116, 2297–2305. <https://doi.org/10.1172/JCI27920>
- Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H.-C., 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* 50, 237–248. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00032-5)
- Swaby, R.J., 1949. The Relationship between Micro-organisms and Soil Aggregation. *Microbiology* 3, 236–254. <https://doi.org/10.1099/00221287-3-2-236>
- Theodorou, M.E., Elrif, I.R., Turpin, D.H., Plaxton, W.C., 1991. Effects of Phosphorus Limitation on Respiratory Metabolism in the Green Alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiology* 95, 1089–1095. <https://doi.org/10.1104/pp.95.4.1089>

- Thompson, B.G., Leps, W.T., 1986. Effect of dissolved oxygen on growth and production of exopolysaccharide by *Rhizobium trifolii*. *Journal of Fermentation Technology* 64, 335–338. [https://doi.org/10.1016/0385-6380\(86\)90127-5](https://doi.org/10.1016/0385-6380(86)90127-5)
- Tolhurst, T.J., Gust, G., Paterson, D.M., 2002. The influence of an extracellular polymeric substance (EPS) on cohesive sediment stability, in: Winterwerp, J.C., Kranenburg, C. (Eds.), *Proceedings in Marine Science, Fine Sediment Dynamics in the Marine Environment*. Elsevier, pp. 409–425. [https://doi.org/10.1016/S1568-2692\(02\)80030-4](https://doi.org/10.1016/S1568-2692(02)80030-4)
- Umer, M.İ., Rajab, S.M., 2012. Correlation between aggregate stability and microbiological activity in two Russian soil types. *Eurasian Journal of Soil Science* 1, 45–50.
- Upadhyay, S.K., Singh, J.S., Singh, D.P., 2011. Exopolysaccharide-Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Under Salinity Condition. *Pedosphere* 21, 214–222. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60120-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60120-3)
- Vanden Broeck, D., Horvath, C., De Wolf, M.J.S., 2007. *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 1771–1775. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.005>
- Wang, B.-B., Chang, Q., Peng, D.-C., Hou, Y.-P., Li, H.-J., Pei, L.-Y., 2014. A new classification paradigm of extracellular polymeric substances (EPS) in activated sludge: Separation and characterization of exopolymers between floc level and microcolony level. *Water Research* 64, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.003>
- Wang, X., Sharp, C.E., Jones, G.M., Grasby, S.E., Brady, A.L., Dunfield, P.F., 2015. Stable-Isotope Probing Identifies Uncultured Planctomycetes as Primary Degradors of a Complex Heteropolysaccharide in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 4607–4615. <https://doi.org/10.1128/AEM.00055-15>
- Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* 182, 2675–2679. <https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2675-2679.2000>
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 295, 1487–1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Wilén, B.-M., Jin, B., Lant, P., 2003. The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research* 37, 2127–2139. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00629-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00629-2)
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C., 1999. What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?, in: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds.), *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–19. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60147-7_1)
- Xiao, J.-H., Xiao, D.-M., Xiong, Q., Liang, Z.-Q., Zhong, J.-J., 2010. Nutritional requirements for the hyperproduction of bioactive exopolysaccharides by submerged fermentation of the edible medicinal fungus *Cordyceps taii*. *Biochemical Engineering Journal* 49, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.019>
- Xiao, R., Zheng, Y., 2016. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnology Advances* 34, 1225–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Yuncu, B., Sanin, F.D., Yetis, U., 2006. An investigation of heavy metal biosorption in relation to C/N ratio of activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 137, 990–997. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.03.020>
- Zammit, G., Schembri, S., Fenech, M., 2021. Phototrophic biofilms and microbial mats from the marine littoral of the central Mediterranean. *Acta Botanica Croatica* 80, 112–120. <https://doi.org/10.37427/botcro-2020-031>

- Zhang, H.-L., Jiang, W.-L., Liu, R., Zhou, Y., Zhang, Y., 2019. Organic degradation and extracellular products of pure oxygen aerated activated sludge under different F/M conditions. *Bioresource Technology* 279, 189–194.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.130>
- Zhang, Z., Lin, B., Xia, S., Wang, X., Yang, A., 2007. Production and application of a novel bioflocculant by multiple-microorganism consortia using brewery wastewater as carbon source. *Journal of Environmental Sciences* 19, 667–673.  
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(07\)60112-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(07)60112-0)