



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**SCREENING PRODUKCE BIOSURFAKTANTŮ U
VYBRANÝCH TERMOFILNÍCH BAKTERIÍ**

SCREENING OF BIOSURFACTANT PRODUCTION IN SELECTED THERMOPHILIC BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Veronika Řeháková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1535/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Veronika Řeháková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Screening produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše
2. Optimalizace metod pro identifikaci biosurfaktantů
3. Screening produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.7.2020:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Veronika Řeháková
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem bakalářské práce je produkce biosurfaktantů vybranými termofilními bakteriemi. Teoretická část obsahuje obecnou charakterizaci termofilních bakterií, popisuje struktury a klasifikaci biosurfaktantů, charakterizuje jejich vlastnosti a využití. Závěr teoretické části se věnuje produkci biosurfaktantů termofilními bakteriemi. Experimentální část se zabývá screeningem produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií. Termofilní bakterie byly získány z kompostů a aktivovaných kalů. Izolace není předmětem bakalářské práce. Celkově 39 bakteriálních izolátů bylo kultivováno a supernatanty kultivačního média byly testovány screeningovými metodami na přítomnost biosurfaktantů, a to stanovením aktivity emulze a solubilizací krystalického antracenu. Na základě výsledků těchto metod bylo vybráno 14 nejatraktivnějších producentů. Vybrané bakteriální kmeny byly znovu kultivovány a byla tak získána nová sada supernatantů. Pro podrobnější screening produkce vybranými termofilními bakteriemi byly kromě stanovení aktivity emulze a solubilizace krystalického antracenu přidány další metody: přímé měření povrchového napětí – Du-Noüy-Ring, metoda rozlévání kapky a metoda rozšiřování oleje. Výsledky byly zhodnoceny a metody byly znovu zopakovány pro novou sadu supernatantů za účelem ověření reprodukovatelnosti produkce. Výsledky všech testů byly porovnány a následně byli určeni tři nejspolehlivější termofilní bakteriální producenti.

ABSTRACT

The subject of the bachelor thesis is the production of biosurfactants by selected thermophilic bacteria. The theoretical part contains a general characterization of thermophilic bacteria, describes the structures and classification of biosurfactants, characterizes their properties and uses. The final part of the theoretical part deals with the production of biosurfactants by thermophilic bacteria. The experimental part deals with the screening of biosurfactant production by selected thermophilic bacteria. Thermophilic bacteria were obtained from composts and activated sludges. Isolation is not a subject of the thesis. In total 39 bacterial isolates were cultivated and their supernatants were tested by screening methods – emulsification capacity assay and solubilization of crystalline anthracene. Based on the results of these methods, 14 most promising producers were selected. These bacterial strains were re-cultured to obtain a new set of supernatants. For more detailed screening of production by selected thermophilic bacteria, in addition to determining the activity of the emulsion and solubilization of crystalline anthracene, other methods were added: direct surface tension measurement – Du-Noüy-Ring, drop pouring method and oil spreading method. The results were evaluated and the measurements were repeated for a new set of supernatants to verify the reproducibility of the production. The results of all the tests were compared and then three most reliable thermophilic bacterial producers were determined.

KLÍČOVÁ SLOVA

Termofilní bakterie, biosurfaktanty, povrchově aktivní látky, screening

KEYWORDS

Thermophilic bacteria, biosurfactants, surface active agents, screening

ŘEHÁKOVÁ, Veronika. *Screening produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123993>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala doc. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za odborné vedení, pozitivní přístup a cenné rady, které mi při zpracování bakalářské práce poskytl. Mé obrovské poděkování patří Ing. Ivě Pernicové, které děkuji především za trpělivost, všestrannou pomoc a za čas, který mi věnovala. Dále děkuji Ing. Jitce Krouské, Ph.D. a Ing. Xenii Kouřilové za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji také rodině, příteli a blízkým přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporují.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Extremofilní organismy	8
2.1.1	Termofilní bakterie	9
2.1.1.1	Podmínky adaptace na prostředí	9
2.1.1.2	Výskyt termofilních bakterií	10
2.2	Biosurfaktanty	11
2.2.1	Chemická struktura biosurfaktantů	11
2.2.2	Klasifikace biosurfaktantů	11
2.2.2.1	Glykolipidy	12
2.2.2.2	Lipopeptidy a lipoproteiny	13
2.2.2.3	Mastné kyseliny a fosfolipidy	13
2.2.2.4	Polymerní biosurfaktanty	14
2.2.3	Vlastnosti biosurfaktantů	15
2.2.4	Metody pro identifikaci produkce biosurfaktantů	17
2.2.4.1	Přímé měření povrchového/mezifázového napětí	17
2.2.4.2	Metoda solubilizace antracenu	18
2.2.4.3	Stanovení emulgační aktivity	18
2.2.4.4	Metoda rozšiřování oleje	18
2.2.5	Syntéza biosurfaktantů	19
2.2.5.1	Významní termofilní bakteriální producenti biosurfaktantů	20
2.2.6	Aplikační využití biosurfaktantů	22
2.2.6.1	Technologie MEOR	22
2.2.6.2	Bioremediace	22
2.2.6.3	Využití biosurfaktantů v potravinářském průmyslu	23
2.2.6.4	Aplikace biosurfaktantů v medicíně	23
2.3	Produkce biosurfaktantů pomocí termofilních bakterií v současnosti	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy	26
3.1.1	Použité chemikálie	26
3.1.2	Přístrojové vybavení	26
3.1.3	Použité mikroorganismy	27
3.2	Kultivace bakterií	27
3.2.1	Příprava a složení inokulačního média	27
3.2.2	Příprava a složení produkčního média	28

3.2.3	Průběh kultivace.....	29
3.3	Gravimetrické stanovení biomasy.....	29
3.4	Metody pro screening produkce biosurfaktantů.....	30
3.4.1	Stanovení aktivity emulze.....	30
3.4.2	Metoda solubilizace antracenu.....	30
3.4.3	Přímé měření povrchového napětí – metoda Du-Noüy-Ring	30
3.4.4	Metoda rozlévání kapky	31
3.4.5	Metoda rozšiřování oleje	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1	Screening produkce biosurfaktantů u izolovaných termofilních bakterií.....	33
4.1.1	Stanovení aktivity emulze.....	33
4.1.2	Solubilizace krystalického antracenu	36
4.1.3	Vyhodnocení vhodných producentů.....	37
4.2	Analýza produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií.....	38
4.2.1	Stanovení emulgační aktivity.....	38
4.2.2	Solubilizace krystalického antracenu	40
4.2.3	Metoda Du-Noüy-Ring.....	40
4.2.4	Metoda rozlévání kapky	41
4.2.5	Metoda rozšiřování oleje	43
4.2.6	Vyhodnocení screeningu produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií	45
4.3	Ověření reprodukovatelnosti produkce BS.....	46
4.3.1	Stanovení emulgační aktivity.....	46
4.3.2	Solubilizace krystalického antracenu	48
4.3.3	Metoda Du-Noüy-Ring.....	49
4.3.4	Metoda rozlévání kapky	50
4.3.5	Metoda rozšiřování oleje	51
4.3.6	Vyhodnocení reprodukovatelnosti produkce BS u vybraných termofilních bakterií	53
5	ZÁVĚR	55
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	57
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	68

1 ÚVOD

V současnosti se společnost stále více zaměřuje na šíření povědomí o životním prostředí. Svou pozornost obrací na kontaminaci životního prostředí špatně odbouratelnými látkami a neustále hledá možné bio-alternativy. Většina povrchově aktivních látek, které jsou běžnou součástí našeho každodenního života, pochází především z petrochemických zdrojů. Takové látky jsou obtížně odbouratelné a mnohdy bývají pro okolní prostředí toxické. Vědecká komunita se tak soustředí na hledání povrchově aktivních látek, které budou k životnímu prostředí šetrnější. Řešení této problematiky nabízí využití biosurfaktantů.

Biosurfaktanty jsou povrchově aktivní látky produkované mikroorganismy. Jedná se o amfifilní sloučeniny, které efektivně snižují povrchové a mezifázové napětí. Díky jejich unikátním vlastnostem, jako je nízká toxicita, snadná biodegradabilita, antimikrobiální vlastnosti nebo stabilita v širokém rozmezí pH a teplot, stále roste jejich popularita a biosurfaktanty se dostávají do popředí vědeckých zájmů. Biosurfaktanty tak mají oproti svým chemicky syntetizovaným protějškům řadu výhod. Problémem jejich využití je ekonomická stránka samotné produkce. Vědci se tak snaží nalézt takové producenty, které jsou nenáročné na kultivaci a které disponují vysokými výtěžky povrchově aktivních látek.

Ačkoliv mají termofilní bakterie pro biotechnologické aplikace velký potenciál, většina dosavadních studií a výzkumů se soustředí především na produkci biosurfaktantů za mezofilních podmínek. Potenciál termofilních bakterií tkví zejména v produkci termostabilních látek, produkce biosurfaktantů termofilními bakteriemi se tak postupně stává více atraktivní.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Extremofilní organismy

Pojem extremofil zavedl roku 1974 Robert MacElroy. Takovému organismu se daří v lokalitách, které jsou pro jiné tvory nehostinné, nebo dokonce smrtelné. Extremofilní organismy prospívají v horkých pramenech, ledu, v prostředí se zvýšenou koncentrací solí. Některé dokonce rostou v toxickém odpadu, organických rozpouštědlech nebo za přítomnosti těžkých kovů. Tato extrémní prostředí se na první pohled zdají příliš „tvrdá“ na to, aby v nich existoval život [1, 2]. Dříve se myšlenka, že by jakýkoliv organismus upřednostňoval růst při pH 1, nebo teplotu kolem 110 °C, zdála směšná. S postupem času došlo ke zlepšení metod detekce mikrobů, a tak již není překvapivé objevovat organismy 3 km pod zemským povrchem, v kyselých pramenech, kde se hodnota pH pohybuje okolo 0,5, nebo v okolí tzv. „černých kuřáků“ (hlubokomořské horké průduchy) až 2 km pod hladinou moře [1]. Extremofily tyto podmínky nejenže snášejí, ale často i vyžadují pro své přežití. Hlavní složkou extremofilů tvoří mikroorganismy, ale najdeme zde členy, které patří do všech třech domén života – bakterie, archea a eukaryota [3].

Extremofilní organismy lze dělit do dvou skupin. Jednu z nich tvoří „pravé“ extremofilní organismy. Ty pro optimální růst a rozmnožování přímo vyžadují jednu nebo více extrémních podmínek. Druhou skupinou jsou extremofily, které takové podmínky poměrně dobře tolerují, avšak optimálně rostou za podmínek normálních. Extremofily jsou nejčastěji klasifikovány podle parametrů charakterizujících jejich přirozená prostředí (tabulka 1) [1, 3]. Někteří vědci rozšiřují definici extremofilů o organismy tolerující vysoké koncentrace těžkých kovů nebo ionizující záření, ačkoli tyto organismy prosperují stejně dobře i za absence těchto podmínek. Do extremofilů bývají zařazovány také xerofilní nebo xerotolerantní organismy. Jedná se o organismy, které snášejí velmi nízkou vodní aktivitu. Jde nejčastěji o endolity, nacházející se uvnitř hornin, halofily, nebo obecně organismy obývajících suchá prostředí [1].

Tabulka 1: Klasifikace extremofilních organismů [4].

parametr	typy organismů a jejich optima				
pH	hyperacidofilní (<3)	acidofilní (<5)	neutrofilní (5–9)	alkalifilní (>9)	hyperalkalifilní (>11)
teplota		psychrofilní (<20 °C)	mesofilní (20–45 °C)	termofilní (45–80 °C)	hypertermofilní (>80 °C)
salinita*		ne-halifolní (<1,2 %)	halotolerantní (1,2–2,9 %; toleruje ≤14,6 %)	halofilní (>8,8 %)	extrémně halofilní (>14,6 %; <8,8 % nerostou)
tlak			piezotolerantní (0,1–10 MPa)	piezofilní (10–50 MPa)	hyperpiezofilní (>50 MPa)
vodní aktivita			xerofilní ($a_w < 0,7$)		

* salinita = koncentrace NaCl (w/v)

2.1.1 Termofilní bakterie

První výzkum zabývající se charakterizací termofilních bakterií, které tvořily aerobní spóry a byly schopné růstu při 70 °C, provedl Miquel v roce 1888. Od té doby bylo popsáno mnoho termofilních bakteriálních druhů, patřící zejména k rodům *Bacillus* a *Clostridium* [5]. Termofilní bakterie jsou předmětem zájmu mnoha vědců. Některé z nich totiž rostou a prosperují při teplotách, kdy by se dalo očekávat, že jejich proteiny a nukleové kyseliny budou denaturovány [6].

Jako termofilní označujeme takovou bakterii, jejíž optimální růstová teplota přesahuje 45 °C. Má-li bakterie optimální růstovou teplotu nad 80 °C, je definována jako hypertermofilní [7]. Termofilní bakterie lze dělit do dvou skupin: striktně termofilní bakterie, které pro svůj optimální růst vyšší teplotu přímo vyžadují, a termotolerantní bakterie – ty rostou i při teplotách nižších, než 38 °C [8]. Potenciál termofilních bakterií tkví zejména v produkci termostabilních enzymů a ve tvorbě dalších průmyslových produktů, které jsou pro člověka užitečné [5].

2.1.1.1 Podmínky adaptace na prostředí

Každá složka těchto malých prokaryotických buněk je trvale vystavena vysokým teplotám prostředí a musí být upravena, aby za těchto podmínek správně fungovala. Všechny molekuly, od povrchových struktur buňky, cytoplazmatické membrány, ribozomů až po metabolické enzymy a intermediární metabolity se tedy musí vypořádat s nebezpečím případného poškození nebo rozpadu buněčných komponent. Ačkoli některé z těchto molekulárních adaptací již byly identifikovány, mnoho z nich stále zůstává neznámých [9].

Bakterie lze obecně dělit podle struktury buněčné stěny na gramnegativní a grampozitivní. Buněčná stěna gramnegativních bakterií obsahuje velice tenkou peptidoglykanovou vrstvu mezi cytoplasmatickou membránou a lipopolysacharidovou vnější membránou. U grampozitivních bakterií obsahuje peptidoglykanová vrstva murein a je mnohem silnější. Buněčná stěna termofilních bakterií disponuje strukturálními rozdíly, které je činí stabilními při zvýšených teplotách. Obsahuje totiž více thiolových skupin a stejně tak více disulfidických vazeb, a liší se tak od ostatních bakteriálních druhů [10].

Termofilní organismy jsou schopni růstu při vysokých teplotách především díky chemické stabilitě jejich membránových lipidů. Příkladem může být methanoarchaea *Methanocaldococcus jannaschii*. Pokud se teplota prostředí, ve kterém se tento mikroorganismus vyskytuje, zvýší ze 45 na 65 °C, podíl dietherlipidů se sníží z 80 na 20 %, zatímco podíl standardních lipidů na bázi caldarchaeolů a cykloarchaeolů se zvýší z 10 na 40 %. Dojde tedy k znásobení počtu etherových vazeb. Tetraetherové vazby v membránách termofilních archaea jsou vhodnější pro přežití při vysoké teplotě než bakteriální dvojvrstvé membrány složené z esterových lipidů, protože etherové vazby jsou lépe odolné vůči vysokým teplotám [11, 12].

Vyšší teplota zvyšuje fluiditu membrán, a proto pro udržení optimální fluidity musí buňka upravit její složení. Teplota ovlivňuje strukturu a typ proteinů. Aby se proteiny přizpůsobily vyšším teplotám, je třeba zvýšit množství iontových párů v jejich struktuře. Proteiny termofilních organismů mají na svém povrchu více nabitých polárních aminokyselin, které mají na svědomí vznik většího množství intracelulárních solných můstků [11]. Studie struktury proteinů termofilních organismů poukazují na poměrně malý počet nekovalentních interakcí, nepolární jádro proteinu, nízký obsah glycinu a zvýšený počet iontových interakcí. Všechny zmíněné fakty korelují se zvýšenou termostabilitou organismů. Hydrofobní jádro proteinu pomáhá vyloučit rozpouštědlo z centrální části proteinu, takže se protein stává poněkud

„lepkavým“ a tím i odolnějším proti rozvinutí. Poměr povrchu ku objemu proteinu je značně snížen, a to v konečném důsledku pravděpodobně zlepšuje jeho stabilitu. Snížení obsahu glycinu v termostabilních proteinech snižuje flexibilitu proteinu a protein se stává tužším; spolu s rozsáhlými iontovými interakcemi, které tvoří síť přes povrch molekuly, pomáhá ztuhnutí proteinu odolávat rozvinutí při vysoké teplotě. Termostabilita enzymů u různých druhů hypertermofilů je fenomenální, některé enzymy hypertermofilů zůstávají aktivní až do 140 °C [13].

2.1.1.2 Výskyt termofilních bakterií

V šedesátých letech minulého století učinil Thomas Brock průlomový objev – prokázal přítomnost hypertermofilní bakterie *Thermus aquaticus* v horkých pramenech Yellowstonekého národního parku. Od té doby byly termofily izolovány z nejrůznějších prostředí, které se vyznačují neobvykle vysokou teplotou. Kromě horkých pramenů se jedná o sopečné oblasti, půdy, které jsou často vystavovány přímému slunečnímu záření, fermentované půdní komposty, nebo například podzemní lokality, jako jsou ropné nádrže [11, 14].

Kompostování je řízený aerobní biodegradativní proces organických látek se samovolným ohřevem. Procesu se účastní řada mezofilních a termofilních mikroorganismů, které v několika po sobě jdoucích krocích degradují organické substráty na humifikované produkty a anorganické látky. „Samoohřívání“ je způsobeno právě metabolickou činností těchto mikroorganismů. Za optimálních podmínek lze proces compostování rozdělit do čtyř fází: Počáteční mezofilní fáze (10–42 °C), trvající několik hodin až několik dnů, termofilní fáze (45–70 °C), která trvá několik dní až týdnů, druhá mezofilní fáze, které se účastní mezofilní organismy často nepodobné organismům z první fáze, a čtvrtá fáze – stabilizační, která může trvat několik dnů až měsíců. Počáteční rychlý nárůst teploty zahrnuje přechod z mezofilní mikrobioty do termofilní. Často je však pozorováno přerušení procesu při teplotách v rozmezí 42 °C až 45 °C. Počáteční mezofilní mikrobiota je inhibována vysokou teplotou, zatímco termofilní populace je stále inaktivní, protože se dané mikroorganismy většinou nachází pod jejich teplotním optimem. Teprve poté, co je vyvinuto dostatečné množství termofilů, dochází k dalšímu nárůstu teplot. Při teplotách kolem 60 °C je dosaženo optima pro většinu termofilních druhů. Vysoké teploty podporují degradaci organických látek jako je lignocelulóza (dřevo) a eliminují činnost patogenních mikroorganismů. Právě bakterie jsou dominantními mikroorganismy, které organickou hmotu degradují. To je také důvod, proč jsou komposty považovány za slibný zdroj nových termofilních bakteriálních druhů [15].

Vhodným prostředím pro termofilní bakterie jsou také aktivované kaly, které jsou využívány k čištění odpadních vod. Aktivovaný kal se dá popsat jako komplexní mikrobiální komunita, která je složena převážně z bakterií [16]. Teplota odpadní vody je obvykle vyšší než teplota běžné kohoutkové vody, a stává se tak ideálním místem pro růst termofilních mikroorganismů. Bakterie v aktivovaných kalech jsou obvykle menší, jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,5–2 μm [17]. Výzkumy dokazují, že hlavními aktéry v konvenčním procesu aktivovaných kalů jsou gramnegativní bakterie. Na druhou stranu grampozitivní bakterie hrají významnou roli při zlepšování procesů odstraňování fosforu [18]. Metoda využívá mikrobiální kultury k odstranění uhlíku a nitrifikaci – oxidaci amoniaku na dusičnany [16]. Organické látky jsou v odpadních vodách přeměňovány na oxid uhličitý, vodu a odpadní aktivovaný kal [18]. Poprvé byla tato metoda oficiálně představena E. Ardermem a W. Lockettem 3. dubna 1914 v Manchesteru a od té doby je využívána po celém světě [19].

2.2 Biosurfaktanty

Širokou skupinu látek, které jsou produkovány mikroorganismy a mají schopnost snižovat povrchové a mezifázové napětí, nazýváme biosurfaktanty (BS). Biosurfaktanty mají oproti svým chemicky syntetizovaným protějškům řadu výhod. Patří mezi ně nízká toxicita, biodegradabilita, vyšší specifita a obecně lepší kompatibilita s životním prostředím [20]. Nabízí se otázka, která zůstává i nadále sporná. Co vlastně určuje povrchově aktivní látku jako „přírozenou“, a tedy označenou jako biosurfaktant? Striktně řečeno, termín by měl zahrnovat pouze takové surfaktanty, které jsou získávány přímo z přírodních/biologických zdrojů, jako jsou rostliny, zvířata a mikroorganismy, a u kterých nedochází k žádným organicko-chemickým syntézám. V průběhu posledních několika let se uvolilo zahrnout pod termín biosurfaktanty také další typy povrchově aktivních látek, které nebyly získány přímo z biologického materiálu. Patří sem například alkylpolyglukosidy (APG), které se vyrábí z obnovitelných přírodních zdrojů. Obecný vzorec APG je často prezentován jako C_mG_n , kde „m“ označuje počet atomů uhlíku a „n“ počet glukózových jednotek, které tvoří hydrofilní část molekuly. V současnosti lze jako biosurfaktanty označit i takovou látku, která obsahuje pouze část přírodního původu. To znamená, že pokud povrchově aktivní látka obsahuje hydrofilní hlavu nebo hydrofobní ocas přírodního původu, lze ji označit jako biosurfaktant [21].

Dřívější studie, které se zabývaly právě biosurfaktanty, se nejčastěji soustředily na jejich strukturu, vlastnosti a syntézu za mezofilních podmínek. Mikroorganismy produkující biosurfaktanty jsou obvykle izolovány z prostředí, jako je půda, mořská voda nebo třeba sedimenty kontaminované ropnými produkty. Nicméně poměrně nedávné studie ukazují, že mikroorganismy produkující biosurfaktanty lze izolovat i z prostředí s extrémními podmínkami – například vyprahlé půdy, pouště nebo polární jezera [20].

2.2.1 Chemická struktura biosurfaktantů

Biosurfaktanty jsou amfifilní sloučeniny, které ve své struktuře obsahují jak část hydrofilní, tak část hydrofobní. Díky této struktuře mají schopnost soustředit se na rozhraní dvou odlišných fází (plyn, kapalina a pevná látka) a snižovat tak povrchové napětí (např. rozhraní vzduch-voda). Mohou tak snižovat napětí mezifázové – příkladem může být emulze voda/olej nebo olej/voda. Jedná se nejčastěji o neutrální nebo záporně nabitě sloučeniny [22, 23].

Hydrofilní část je tvořena esterem, hydroxylovou skupinou, fosfátem, karboxylovou skupinou nebo uhlovodíkovým řetězcem, který obsahuje mono, di- nebo polysacharidy či proteiny (peptidy). Část hydrofobní se skládá z nasycených nebo nenasycených mastných kyselin, z hydroxy-substituovaných mastných kyselin, nebo z alkoholů, jejichž uhlovodíkový řetězec obsahuje více než dvanáct uhlíků [22, 23].

Molární hmotnost biosurfaktantů se obvykle pohybuje mezi 500 a 1500 Daltony [24]. Biosurfaktanty s nižší molekulovou hmotností efektivně snižují povrchové a mezifázové napětí, zatímco polymerní biosurfaktanty s vyšší molekulovou hmotností jsou účinnější jako stabilizátory emulze [25].

2.2.2 Klasifikace biosurfaktantů

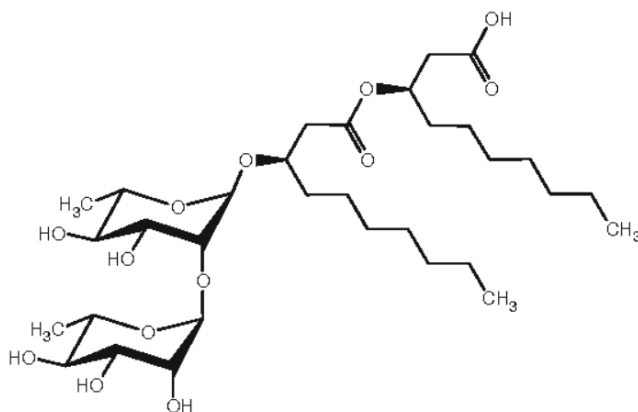
Biosurfaktanty lze klasifikovat podle různých kritérií. Mohou být děleny na základě molekulové hmotnosti (nízkomolekulární a vysokomolekulární BS), iontového náboje (anionové, kationové a neutrální BS) a typu sekrece (intracelulární, extracelulární a ulpívající na povrchu mikrobiálních buněk). Na rozdíl od chemicky syntetizovaných surfaktantů, které jsou klasifikovány nejčastěji podle celkové polaridy molekuly, je hlavním kritériem

pro dělení biosurfaktantů jejich chemická struktura. Hlavní třídy tvoří glykolipidy, lipopeptidy a lipoproteiny, mastné kyseliny, fosfolipidy a polymerní biosurfaktanty [26, 27].

2.2.2.1 Glykolipidy

Glykolipidy jsou nejznámějšími a nejvíce studovanými biosurfaktanty. Hydrofilní jednotka glykolipidů je tvořena mono- nebo disacharidem, kterým je glukóza, manóza, galaktóza, rhamnóza, sophoróza a trehalóza. Sacharid může být acetylován, připojen na řetězec mastné kyseliny nebo na její hydroxyderivát pomocí etherové (laktonové) vazby nebo pomocí vazby esterové. Vzhledem k povaze sacharidu ve struktuře biosurfaktantu jsou glykolipidy rozlišovány na několik dalších skupin. Mezi ty nejznámější patří rhamnolipidy, trehalolipidy a sophorolipidy [28, 29].

Rhamnolipidy byly objeveny roku 1946 švédským biochemikem K.S.D. Bergströmem, který zaznamenal olejovitý glykolipid produkovaný *Pseudomonas pyocyanea* (nyní *Pseudomonas aeruginosa*). F.G. Jarvis a M.J. Johnson dále objasnili strukturu rhamnolipidu (obrázek 1) izolovaného z *Pseudomonas aeruginosa* a dokázali, že je složen ze dvou β -hydroxydekanoických kyselin, které jsou spojeny glykosidovou vazbou ke dvěma molekulám L-rhamnózy. β -hydroxymastné kyseliny jsou propojeny přes esterovou vazbu a mezi rhamnózovými skupinami se nachází α -1,2-glykosidová vazba [28], [29]. Struktura rhamnolipidů se liší bakteriálním kmenem, který rhamnolipid produkuje, a zdrojem uhlíku [30]. Největším producentem rhamnolipidů jsou bakterie z rodu *Pseudomonas*. Mezi další producenty se řadí také bakterie z dalších rodů, například *Acinetobacter*, *Pseudoxanthomonas*, *Enterobacter* a *Burkholderia*. Rhamnolipidy jsou schopny snížit povrchové napětí vody ze 72 mN/m na hodnoty pod 30 mN/m a jejich kritická micelární koncentrace se pohybuje mezi 50 a 200 mg/l [31].



Obrázek 1: Chemická struktura rhamnolipidu [32].

Trehalolipidy jsou tvořeny disacharidem trehalózou, která je připojena na mykolovou kyselinu s dlouhým uhlovodíkovým řetězcem. Nejčastěji jsou produkovány grampozitivními bakteriemi *Actinomycetales*, jako jsou *Mycobacterium*, *Nocardia* a *Corynebacterium*. Liší se strukturou, velikostí a stupněm nasycení. Nejznámějšími trehalolipidy jsou trehalo-monomykoláty, trehalo-dimykoláty, sukcinoyl-trehalolipidy a trehalo-tetraestery. Produkují je hlavně bakterie z rodu *Rhodococcus*. D. A. White, L. C. Hird a S. T. Ali zjistili, že purifikovaný trehalolipid produkovaný právě touto bakterií je schopen snížit povrchové napětí vody na 29 mN/m s kritickou micelární koncentrací 250 mg/l. Byl také schopen tvořit emulze, které

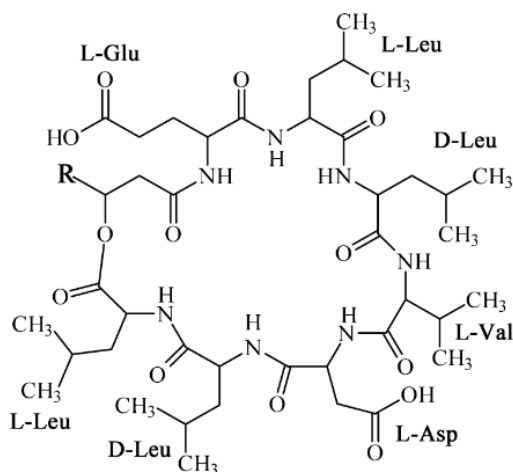
byly stabilní vůči různým podmínkám, jako je rozsah hodnot pH 2-10, teploty v rozmezí 20-100 °C a koncentrace NaCl 5-25 %hm [33].

Sophorolipidy jsou nejčastěji produkovány kvasinkovými kmeny *Starmerella bombicola*, *Candida magnoliae* a *Candida apicola*, které rostou na uhlovodíkových a lipofilních substrátech. Skládají se z disacharidu sophorózy vázanou glykosidovou vazbou na hydroxylovou skupinu, která se nachází na předposledním uhlíku mastné kyseliny. Poslední karboxylová skupina může být ve formě laktonu, nebo může být hydrolyzována za vzniku anionového surfaktantu [27].

2.2.2.2 Lipopeptidy a lipoproteiny

Lipopeptidy jsou mikrobiální povrchově aktivní látky produkované širokou škálou bakterií, hub a kvasinek. Představují třídu nízkomolekulárních sloučenin, které jsou složené z hydrofilního peptidu a hydrofobní mastné kyseliny. Vyznačují se velkou strukturální rozmanitostí – liší se strukturou peptidové jednotky, délkou uhlovodíkového řetězce mastné kyseliny a také typem vazby mezi těmito dvěma jednotkami. Mezi nejvíce studované lipopeptidy patří surfaktin, iturin, fengycin a lichenysin [34, 35].

Surfaktin je cyklický lipopeptid produkováný bakterií *Bacillus subtilis*. Jedná se o grampozitivní mikroorganismy, které tvoří endospóry. Chemickou strukturu surfaktinu tvoří sedm aminokyselin (L-asparagin, kyselina glutamová, L-valin, dva L-leuciny a dva D-leuciny) a β -hydroxy-mastná kyselina (obrázek 2) [36]. Aminokyseliny se mohou lišit v sekvenci, ale ve všech případech se jedná o pět lipofilních aminokyselin a dvě záporně nabitě hydrofilní aminokyseliny. Délka řetězce mastné kyseliny se může lišit, ale obvykle se skládá ze 13 až 16 atomů uhlíku [37]. Surfaktin o koncentraci 20 μ M snižuje povrchové napětí vody ze 72 na 27 mN/m. V posledních letech byl surfaktin charakterizován jako antibakteriální, antivirální, antifungální látka, která mimo jiné také výrazně zpomaluje srážení fibrinu tím, že inhibuje přeměnu fibrinového monomeru na polymer [38].



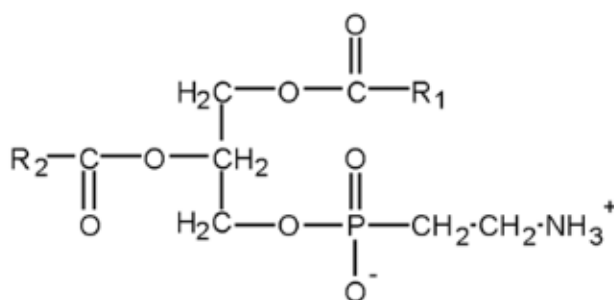
Obrázek 2: Chemická struktura surfaktinu [38].

2.2.2.3 Mastné kyseliny a fosfolipidy

Různé bakterie a kvasinky produkují velké množství mastných kyselin a fosfolipidových povrchově aktivních látek během růstu na n-alkanech. Vezikuly bohaté

na fosfatidylethanolamin jsou produkovány *Acinetobacter* a tvoří opticky čiré mikroemulze alkanů ve vodě [25]. Fosfatidylethanolamin (obrázek 3) produkováný *Rhodococcus erythropolis* (růst na n-alkanu) snižuje mezifázové napětí mezi hexadekanem a vodou na méně než 1 mN/m při kritické koncentraci micel 30 mg/l [39].

Fosfolipidy jsou polární sloučeniny, které tvoří semipermeabilní membrány v buňkách organismů. Hrají důležitou roli při separaci, ochraně a transportu buněčných složek skrze membránu. Sestávají z glycerolu, zbytku kyseliny fosforečné a dvou mastných kyselin. Uhlovodíkové řetězce mastných kyselin tvoří nepolární lipofilní konec, zatímco skupina kyseliny fosforečné a jakékoli další připojené skupiny tvoří nepolární hlavu. Pokud se tedy fosfolipid adsorbuje na fázové rozhraní olej-voda, nepolární mastné kyseliny vyčnívají do olejové fáze a polární hydrofilní hlava vyčnívá do okolní vodné fáze [40].

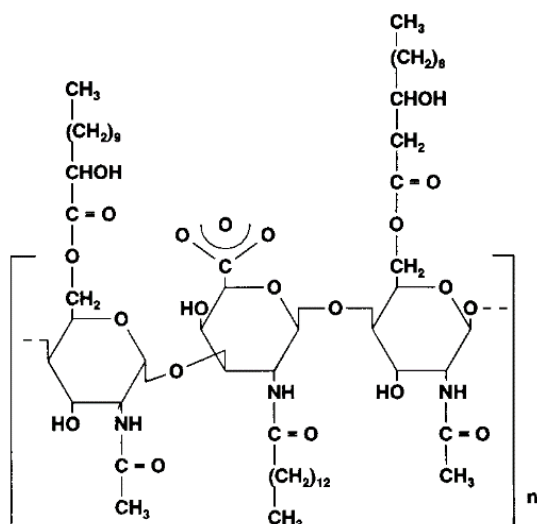


Obrázek 3: Chemická struktura fosfatidylethanolaminu [41].

Biosurfaktanty tohoto typu jsou pro medicínské aplikace nezbytné. Podle Guatama a Tyagiho je nedostatek komplexu fosfolipid-protein hlavní příčinou respiračního selhání u dětí, které se narodily předčasně. Autoři také naznačují, že izolace a klonování genů podílejících se na produkci povrchově aktivních látek lze využít ve fermentačních procesech [42].

2.2.2.4 Polymerní biosurfaktanty

Na rozdíl od ostatních biosurfaktantů jsou polymerní biosurfaktanty sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností vykazující velkou emulgační aktivitu [36]. Patří sem například emulsan, který je amfifilní mikrobiální lipopolysacharid s kovalentně navázanými mastnými kyselinami. Jeho hlavním producentem je *Acinetobacter calcoaceticus* [43]. Emulsan se skládá z polysacharidové páteře s O-acylem a N-acylem vázanými postranními řetězci mastných kyselin. Polysacharidová kostra sestává ze tří aminosacharidů v poměru 1:1:1 (obrázek 4). Boční řetězce mastných kyselin mají délku od 10 do 20 uhlíků a představují 5-23 % hmotnosti celého polymeru. Aminoskupiny emulsanu jsou buď acetylované, nebo kovalentně vázané esterovou vazbou na kyselinu 3-hydroxymáselnou. Kombinace hydrofilních opakujících se jednotek aniontového sacharidového řetězce spolu s hydrofobními postranními skupinami vede k amfipatickému chování emulsanu a tudíž i jeho schopnosti vytvářet stabilní emulze olej ve vodě [44].

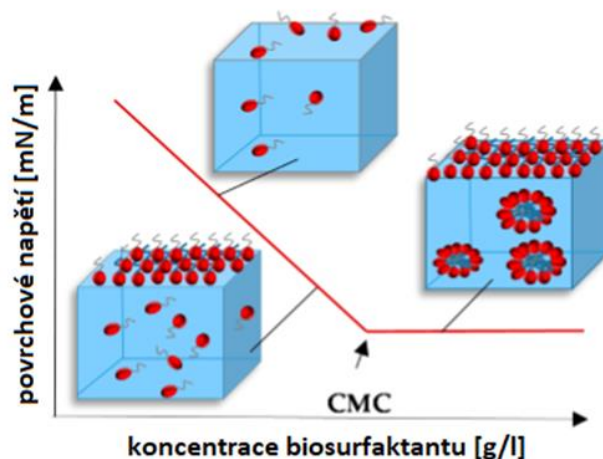


Obrázek 4: Chemická struktura emulsanu [45].

2.2.3 Vlastnosti biosurfaktantů

Díky unikátním vlastnostem těchto látek ve srovnání s jejich chemicky syntetizovanými protějšky a snadná dostupnost substrátů se biosurfaktanty stávají žádoucími látkami pro komerční aplikace. Mezi jejich charakteristické rysy patří povrchová aktivita, tolerance ke změnám pH a teplot, snadná biodegradabilita, nízká toxicita, emulgační účinky a v neposlední řadě také antimikrobiální charakter [46].

Snížení povrchového napětí je jedna z nejdůležitějších vlastností surfaktantu. Molekuly v kapce vody jsou drženy pohromadě kohezními silami. Jedná se o silné intramolekulární interakce, které vytvářejí napětí na povrchu kapalin. Na fázovém rozhraní dvou kapalin je molekula kapaliny A přitahována jinými molekulami kapaliny A silami odlišnými od sil, které na stejnou molekulu vyvíjí kapalina B. Tím pádem se na rozhraní kapalina/kapalina vytváří určité napětí, které se nazývá mezifázové. Biosurfaktanty jsou schopné toto napětí snížit [27]. Minimální koncentrace surfaktantů potřebná k maximálnímu snížení povrchového napětí kapalin se označuje jako CMC (kritická koncentrace micel). Po dosažení této koncentrace vytvoří biosurfaktanty micely a již dále nesnižují povrchové ani mezifázové napětí (obrázek 5). CMC je také nejčastěji používáno pro stanovení účinnosti povrchově aktivního činidla [24]. Povrchové napětí vody je 72,75 mN/m při 20°C. Přídavek biosurfaktantu způsobuje výrazné snížení hodnoty povrchového napětí. Dobrý biosurfaktant může tuto hodnotu snížit ze 72 mN/m až na 35 mN/m. Mezifázové napětí vody proti n-hexadekanu za přítomnosti biosurfaktantu je sníženo ze 40 mN/m až na 1,3–1 mN/m. Biosurfaktanty jsou tedy účinnými povrchově aktivními látkami a jejich hodnota CMC je 10-40 x nižší, než u běžných surfaktantů [47].



Obrázek 5: Závislost povrchového napětí na koncentraci biosurfaktantu – zobrazení CMC [24].

Schopnost tvořit emulze patří mezi další slibnou vlastnost biosurfaktantů. Jedná se o disperzi jedné kapaliny ve druhé – tvoří se mikrokapičky a dochází tak ke smíchání dvou vzájemně nemísitelných kapalin. Obecně jsou vysokomolekulární biosurfaktanty lepšími emulgátory než biosurfaktanty nízkomolekulární. Neplatí tedy pravidlo, že pokud je určitá molekula klasifikována jako biosurfaktant, musí nutně výrazně snižovat povrchové napětí a zároveň být dobrým emulgátorem. Bylo prokázáno, že sophorolipidy produkované *Starmerella bombicola* snižují povrchové a mezifázové napětí, ale nejsou dobrými emulgátory. Na druhou stranu liposan výrazně nesnižuje povrchové a mezifázové napětí, ale je výborným emulgátorem, který se využívá na stabilitu jedlých olejů v potravinářském průmyslu [22, 27].

Obrovskou výhodou biosurfaktantů oproti surfaktantům, které jsou chemicky syntetizované, je jejich snadná biodegradabilita. Mikroorganismy dokáží biosurfaktanty snadno rozložit ve vodě i v půdě. Tyto látky se tak stávají vhodnými pro bioremediace a technologie spojené s likvidací odpadů [24]. Bylo prokázáno, že rhamnolipid byl biologicky odbouratelný za aerobních podmínek, při redukci dusičnanů a sulfátů, a za fermentačních podmínek, zatímco syntetický surfaktant (Triton X-100) byl pouze částečně rozložitelný za aerobních podmínek a prakticky nerozložitelný za všech ostatních testovaných podmínek. Test byl proveden v souladu s metodologií Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD) pro snadnou rozložitelnost [23].

V západní Evropě se ročně využije 4 250 000 tun pracích prostředků a 1 190 000 tun různých změkčovadel (změkčovadla vody, textilní změkčovadla). Po použití se velké množství detergentů a jejich složek uvolní do vodního i suchozemského prostředí. Biologickou rozložitelností a toxicitou povrchově aktivních látek se zabývá mnoho studií. Většina nejnovějších prací se týká toxicity surfaktantů pro malé korýše – například pro perloočku *Daphnia magna* (Hrotnatka velká) byla stanovena akutní toxicita týkající se 26 detergentů a 5 změkčovadel vyráběných ve Švédsku. Rozsáhlé využití surfaktantů na jedné straně a jejich toxicita na straně druhé jsou důvody, proč jsou povrchově aktivní látky stále předmětem vědeckého zájmu a různých právních předpisů [48].

K. Edwards, J. Lepo a M. Lewis zkoumaly toxicitu biosurfaktantu produkovaného *Pseudomonas aeruginosa*. Biosurfaktant byl porovnán s chemicky syntetizovaným surfaktantem (Marlon A-350), který je v průmyslu hojně využíván. Testy ukázaly daleko vyšší toxicitu a mutagenní účinek u surfaktantu Marlon A-350. Srovnání akutní a chronické toxicity tří syntetických povrchově aktivních látek (Corexit 9500, Triton X-100, PES-61) a tří biosurfaktantů (rhamnolipid, emulsan, PES-51) běžně používaných v sanaci ropných skvrn

ukázalo, že emulsan vykazoval nejnižší toxicitu, zatímco nejvyšší toxicita byla prokázána u Triton X-100. I když existují informace o potenciální toxicitě biosurfaktantů, je jich jen velmi málo. Proto jsou biosurfaktanty považovány za nízkotoxické nebo netoxické látky [22].

Odolnost patogenních mikroorganismů vůči již existujícím léčivým přípravkům a vysoká poptávka po nových antimikrobiálních látkách upozornily na biosurfaktanty jako vhodné antimikrobiální látky [49]. Antimikrobiální vlastnosti biosurfaktantů závisí na různých mechanismech ničení cílových mikroorganismů. Primárně dochází k přímému narušení plazmatické membrány nebo buněčné stěny dané buňky [50]. Lipopeptidy tvoří nejrozšířenější třídu biosurfaktantů s antimikrobiální aktivitou. Surfaktin, který je produkován *B. subtilis*, je nejznámější lipopeptid. Další antimikrobiální lipopeptidy zahrnují fengycin, iturin, nebo například bacillomycin, rovněž produkován *B. subtilis*. Produkce antimikrobiálních lipopeptidů bakteriemi z rodu *Bacillus* je jedním z hlavních mechanismů, které inhibují růst patogenních mikroorganismů v gastrointestinálním (soustava žaludek-střeva) traktu [49].

Navzdory výhodám a různým potenciálním aplikacím biosurfaktantů byly pokusy o jejich komerční výrobu zatím neúspěšné. Pro snížení výrobních nákladů biosurfaktantů je proto důležité výtěžek látek zvýšit. Toho by bylo možné dosáhnout různými cestami, včetně nalezení nových kmenů produkujících biosurfaktanty a optimalizací jejich produkčních podmínek [51].

2.2.4 Metody pro identifikaci produkce biosurfaktantů

Metody pro screening produkce biosurfaktantů jsou většinou založené na fyzikálních účincích těchto látek a schopnosti interferovat s hydrofobním rozhraním. Základním cílem pro screening produkce biosurfaktantů je nalezení látek se silnou povrchovou a mezifázovou aktivitou, nízkou kritickou koncentrací micel (CMC), schopností tvořit stabilní emulze, dobrou rozpustností a aktivitou v širokém rozmezí pH. Dalším cílem je pak nalezení takových produkčních kmenů, které poskytují vysoké výtěžky těchto látek, aby byly biosurfaktanty ekonomicky konkurenceschopné vůči chemicky syntetizovaným surfaktantům. Pro identifikaci produkce biosurfaktantů existuje řada metod – od 70. let minulého století došlo v této oblasti k mnoha testům, avšak původní testy byly omezeny pouze na určitý počet vzorků. Proto v posledních letech dochází k automatizaci a miniaturizaci screeningových metod, které by v konečném důsledku mohly vést k objevení nových, komerčně zajímavých kmenů produkujících biosurfaktanty. Screeningové metody poskytují jak kvalitativní, tak kvantitativní informace. Pro základní screening biosurfaktantů jsou kvalitativní metody dostatečné [52].

2.2.4.1 Přímé měření povrchového/mezifázového napětí

Přímé měření povrchového nebo mezifázového napětí supernatantu je jednou z nejběžnějších screeningových metod. Povrchové napětí klesá se zvyšující se koncentrací biosurfaktantu, dokud není dosaženo CMC. Proto mohou dva supernatanty s rozdílnou koncentrací BS vykazovat stejnou hodnotu povrchového napětí. Tento problém lze vyřešit opakovaným ředěním. Odpovídající ředění supernatantu koreluje s koncentrací biosurfaktantu ve vzorku. Měření může být ovlivněno různými faktory, jako je pH a iontová síla roztoku. Pro měření povrchového či mezifázového napětí je využívána řada metod. Nejjednodušší a nejvyužívanější metodou je metoda Du-Noüy-Ring [52].

Metoda Du-Noüy-Ring byla vyvinuta Pierrem Lecomte du Noüy. Používá tenký platinový prstenec, který je zvedán z povrchu kapaliny. Síla potřebná k oddělení prstence od kapaliny se měří tenziometrem a je dána vztahem (1):

$$F = W + 2\pi (r_a + r_b)\gamma , \quad (1)$$

kde W je celková váha prstence, γ je povrchové napětí, r_a a r_b jsou vnější a vnitřní poloměry prstence. Oba tyto poloměry musí být brány v úvahu, neboť povrchové napětí působí jak uvnitř, tak vně obvodu prstence. Pokud je prstencový drát opravdu velmi tenký, lze předpokládat, že se poloměry rovnají jejich průměrné hodnotě R . S tímto zjednodušením dostáváme vztah (2):

$$F = W + 4\pi R\gamma \quad [53]. \quad (2)$$

Ačkoliv se v mnoha případech jedná o poměrně přesnou metodu, existuje zde několik málo nevýhod, které je nutné před vlastním experimentálním měřením zvážit. Metoda například není dostatečně spolehlivá v případě velmi nízkých hodnot povrchových napětí – obvykle nižších, než 20 mN/m. Jinak je metoda snadno ovladatelná, přesná a vhodná pro generování velkého množství dat [54].

2.2.4.2 Metoda solubilizace antracenu

Willumsen a Karlsson vyvinuli screeningovou metodu založenou na solubilizaci krystalického, vysoce hydrofobního antracenu, který je za normálních podmínek ve vodě nerozpustný. Pokud je ve vzorku přítomný biosurfaktant, dochází k tvorbě micelárních struktur. Postupně dochází k solubilizaci, tedy ke včleňování krystalického antracenu do micel biosurfaktantu. Koncentrace rozpuštěného hydrofobního antracenu se měří na spektrofotometru při 354 nm a koreluje s přítomností biosurfaktantu ve vzorku. Jedná se o poměrně jednoduchou a rychlou screeningovou metodu [52, 55].

2.2.4.3 Stanovení emulgační aktivity

Další populární screeningová metoda, která je založena na emulgační schopnosti biosurfaktantů, byla vyvinuta Cooperem a Goldbergem (1987). Test emulgační aktivity je založen na přidání testovaného supernatantu do zkumavky, ke kterému je následně přidáno stejné množství petroleje. Obsah zkumavky je pak pomocí vortexu promíchán. Po 24 hodinách je změřena výška emulgované vrstvy a výška celé směsi. Následně je vypočten emulgační index (E_{24}) dle následující rovnice (3):

$$E_{24} = \frac{h_{emulze}}{h_{směsi}} \cdot 100, \quad (3)$$

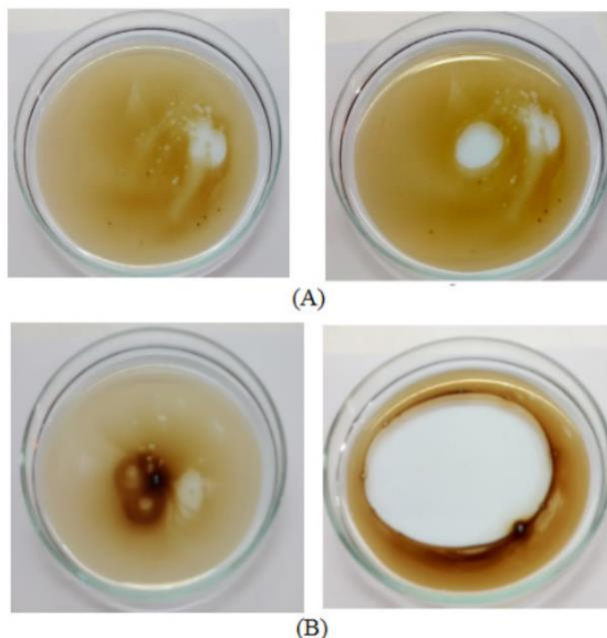
kde E_{24} značí emulgační index, h_{emulze} je výška emulgované vrstvy a $h_{směsi}$ je celková výška kapaliny ve zkumavce. Hodnota emulgačního indexu je uváděna v procentech [52].

Test emulgační aktivity je jednoduchý způsob vhodný pro první screening mikrobů produkujících biosurfaktanty. Existuje několik modifikací tohoto testu, jako je nahrazení petroleje jinými nepochlupnými, ve vodě nemísitelnými rozpouštědly, například hexadekanem. Další modifikací je použití jiného poměru supernatantu a hydrofobní sloučeniny. Například použití 1 ml supernatantu, 4 ml destilované vody a 6 ml nepochlupného rozpouštědla za účelem dosažení maximální emulgate [52, 55, 56].

2.2.4.4 Metoda rozšiřování oleje

Metoda rozšiřování oleje byla vyvinuta M. Morakawou (2000). Jejím základem je přidání malého množství oleje na povrch destilované vody v Petriho misce. Do středu olejové kapky je

pak aplikován supernatant, který je testován. Pokud je pozorována tvorba tzv. čistící zóny (po přidání testovaného vzorku je olej vytlačen směrem do stran Petriho misky), je testovaný vzorek hodnocen jako pozitivní na přítomnost povrchově aktivních látek (obrázek 6). Průměr této zóny koreluje s aktivitou biosurfaktantu, která je jinak nazývána aktivita vytlačení oleje [57].



Obrázek 6: Metoda rozšiřování oleje. (A) Petriho miska před přidáním (vlevo) a po přidání negativní kontroly (vpravo). (B) Petriho miska před (vlevo) a po přidání supernatantu obsahujícího biosurfaktanty (vpravo)[58].

2.2.5 Syntéza biosurfaktantů

Co vlastně vede bakterie k tomu, aby biosurfaktanty produkovaly? Tato otázka má zásadní význam pro pochopení fyziologie těchto mikroorganismů a poskytuje logický rámec pro zlepšení produkce a objevování nových mikrobiálních povrchově aktivních látek. Významnou úlohou biosurfaktantů je zprostředkování interakce bakteriálních buněk k povrchům. Růst mikrobů na určitých površích je ovlivňován biosurfaktanty, které tvoří film na fázovém rozhraní, čímž stimulují specifické mikroorganismy, aby se připojily k rozhraní, zatímco inhibují připojení všech ostatních nežádoucích mikrobů. Kromě adheze hraje také důležitou roli desorpce. Po určité době se podmínky, ve kterých mikroorganismy žijí, stanou nepříznivými. Postupně se začínají hromadit toxiny a další metabolity, a zhorší se tak transport potřebných živin, které bakterie pro svoje přežití potřebují. Desorpce je v této fázi pro buňky zásadní, protože vzniká potřeba nalezení nového, vhodného stanoviště. Jednou z přirozených vlastností biosurfaktantů je právě regulace desorpce produkujícího kmene z hydrofobních povrchů [59]. Chen G., Qiao M. a Zhang H. v roce 2004 použili rhamnolipidový biosurfaktant za účelem zkoumání kinetiky desorpce *Lactobacillus casei* a *Streptococcus mitis*. Zjistili, že se zvyšující se koncentrací rhamnolipidu se snížily interakce mezi bakteriemi a křemičitým pískem, které následně vedly k úplné desorpci [60]. Podle Puchkova by biosurfaktanty mohly být také evoluční obrannou strategií mikrobů [61]. Příkladem je *Pseudomonas fluorescens* produkující biosurfaktanty, které patří do třídy lipopeptidů. Tento biosurfaktant by tak měl mít silný vliv na přežití *P. fluorescens* v jeho přirozeném prostředí – půdě a rhizosféře. Jeho

nedostatek má totiž vliv na množení jiných, nepřátelských kmenů, které ovlivňují růst a vývoj *P. fluorescens* [62].

Různé typy biosurfaktantů jsou produkovány zejména během růstu mikroorganismů na substrátech nemísitelných s vodou. Většina těchto látek je produkována bakteriemi, přičemž se jedná o jejich sekundární metabolity [63]. To znamená, že nejsou přímo spojené s procesem růstu a vývoje organismů, ale mají speciální funkce, jako je jejich ochrana. Nepřítomnost sekundárního metabolitu tedy nepovede k okamžité smrti organismu, může pouze z dlouhodobého hlediska zhoršit jeho vývoj. Syntéza biosurfaktantů začíná ve stacionární fázi mikroorganismů, kdy mikroby z kultivačního média již vyčerpaly potřebné živiny, jako je uhlík, dusík, fosfor a minerální látky [64].

Řada studií naznačila, že typ média a růstové podmínky mohou ovlivnit druh a množství produkovaného biosurfaktantu [63]. Syntéza biosurfaktantů některými mikroorganismy je způsobena skupinou genů, které se projevují pouze za přítomnosti některých vybraných uhlovodíků [65]. Důležité pro produkci BS je zvolit vhodný zdroj uhlíku. P. Edmons a J. Cooney zjistily, že různé zdroje uhlíku v médiu mají na produkci biosurfaktantů u bakteriálního rodu *Pseudomonas* značný vliv. Například za přítomnosti D-glukózy, acetátu a trikarboxylových kyselin bylo pozorováno drastické snížení produkce rhamnolipidů bakteriemi *Pseudomonas aeruginosa*. V opačném případě růstem bakterie *Arthrobacter paraffineus* na D-glukóze doplněnou o hexadekan dochází ke zvýšení produkce povrchově aktivních látek. Správně zvolený substrát může mít na svědomí také uvolnění biosurfaktantu z buněčného povrchu bakteriální buňky do média [63].

M. Yakimov popsal charakterizaci lipopeptidového biosurfaktantu produkovaného termofilní a halofilní bakterií *Bacillus licheniformis*. Produkce surfaktantu probíhala za aerobních i anaerobních podmínek, za přítomnosti 5 % NaCl a při teplotách mezi 35 °C a 45 °C. Biosurfaktant byl purifikován a ve výsledku byl určen jako lichenysin. Dokázal snížit povrchové napětí vody ze 72 nN/m na 28 nN/m a jeho hodnota CMC byla 12 mg/l. K. Denger a B. Schink izolovali dva nové kmeny fermentujících bakterií z olejnatého kalu za podmínek zvýšené koncentrace soli a teploty 50 °C. Bakterie produkovaly značné množství biosurfaktantů, rostli na sacharidových substrátech a stávali se tak zajímavými pro použití v technologii MEOR. Ve snaze určit, zda mikroorganismy produkují nebo neprodukují biosurfaktanty, izolovaly G. Trebbau de Acevedo a M. J. McInerney biosurfaktanty z *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Látky se osvědčily jako velmi efektivní bioemulgátory, které byly aktivní v rozmezí pH 5–10, při koncentracích solí až 200 g/l a při teplotách do 80 °C. Sloučeniny formovaly viskózní emulze, ale příliš nesnižovali povrchové napětí vody ani mezifázové napětí mezi vodou a hexadekanem [63].

2.2.5.1 Významní termofilní bakteriální producenti biosurfaktantů

- Rod *Bacillus*

Rod *Bacillus* měl klíčový význam v rané mikrobiologii. Ferdinand Cohn v roce 1876 díky pozorování bakterií *Bacillus subtilis* a jejich spór vyvrátil teorii spontánní generace – tedy že se živé organismy mohou vyvíjet z neživé hmoty, a studie o životě *Bacillus anthracis* Roberta Kocha dala vznik klinické bakteriologii [66].

Jedná se o velkou skupinu aerobních nebo fakultativně anaerobních grampozitivních bakterií ve tvaru tyčinek, které tvoří spóry. Některé druhy se mohou s procesem stárnutí stávat gramnegativními. Většina druhů vykazuje širokou škálu fyziologických schopností, které jim umožňují žít téměř v každém přírodním prostředí. Spóry jsou odolné vůči teplu, chladu, radiaci, vysoušení i desinfekčním prostředkům [67].

Rod *Bacillus* je známý pro produkci lipopeptidů s vysokou povrchovou aktivitou. *Bacillus licheniformis* jsou tyčinkovité grampozitivní bakterie, které se běžně vyskytují v půdě. Jedná se o termofilní bakterie s optimální růstovou teplotou 50 °C, ale přežívají i při teplotách vyšších [68]. Nawazish Ali, Fenghuan Wang a spol. (2019) izolovali *B. licheniformis* z půdy. Tyto bakterie vykazovaly schopnost produkce biosurfaktantu během 24 hodin v médiu. Získaný biosurfaktant byl charakterizován jako lipopeptid (lichenysin-A) a vykazoval vynikající povrchovou aktivitu. Zjistili, že lichenysin-A je vysoce stabilní při extrémních podmínkách, jako je změna pH (2-12) za použití kyseliny chlorovodíkové, salinity o koncentraci 0-30 g/l NaCl, teploty (20,25,30,35,37,40,45 a 50 °C) a míchání (100,150,200,250 a 300 ot./min) [69].

Surfaktin produkovaný termofilní *Bacillus subtilis* je jedním z nejúčinnějších dosud známých biosurfaktantů. Eduardo J. Gudiña a spol. (2015) ve své práci studovali produkci surfaktinu *B. subtilis* za využití 10 % kukuřičného výluhu (Corn steep liquor – CSL) jako kultivačního média. CSL je produkt vznikající při fermentaci kukuřice. Povedlo se jim získat biosurfaktant o koncentraci 1,3 g/l. Jedná se o první studii popisující produkci surfaktinu *B. subtilis* za využití CSL. Následně byly studovány vlivy různých kovů (železo, mangan a hořčík) na produkci biosurfaktantu. Bylo zjištěno, že u všech testovaných kovů došlo ke zvýšení produkce (4,1, 4,4, a 3,5 g/l). Kultivační médium tedy bylo doplněno o optimální koncentraci všech třech kovů současně a celkový výtěžek biosurfaktantu nakonec dosáhl 4,8 g/l [70].

- Rod *Geobacillus*

Rod *Geobacillus* zahrnuje termofilní grampozitivní spórotvorné bakterie, které jsou aerobní, nebo fakultativně anaerobní. Před rokem 2001 byly charakterizovány jako termofilní varianta rodu *Bacillus*, později došlo k jejich reklasifikaci na samostatný rod s charakteristickým druhem *Geobacillus stearothermophilus*. Většina druhů roste v teplotním rozmezí 45-70 °C, vyskytují se převážně v horkých pramenech, hlubokých geotermálních lokalitách včetně ropných vrtů, ale i v kompostech [71,72]. Bakterie tohoto rodu však mohou být izolovány i z prostředí, kde je poměrně nízká teplota. Ve skutečnosti mohou být izolovány i z míst, kde teplota jen zřídka přesáhne 30 °C, proto jsou v podstatě považovány za všudypřítomné. Tento paradox poměrně nedávno zanalyzoval Zeigler (2014), který schopnost přežití při nízkých teplotách přisuzuje hlavně spórám [73].

Zhou J., Li G. a spol. (2016) izolovali termofilní, fakultativně anaerobní *G. stearothermophilus* z půdy kontaminované ropou (přístav Recife Pernambuco, Brazílie), která se ukázala jako spolehlivý producent bioemulgátorů. Otestovali několik různých zdrojů uhlíku v produkčních médiích – zdroje uhlíku rozpustné ve vodě: glukóza, ethanol a octan sodný, a také dva nerozpustné: hexadekan a olivový olej. Nejvyšší výtěžek bioemulgátoru byl získán za využití octanu sodného. Bioemulgátor zůstal stabilní při různých teplotách, pH i salinitě [74].

- Rod *Thermus*

Bakterie rodu *Thermus* byly poprvé izolovány v pozdních šedesátých letech minulého století v Japonsku a USA. Nejčastěji se vyskytují v neutrálních nebo alkalických horkých pramenech, a to jak v přírodních, tak umělých (domácí a průmyslové systémy). Jedná se gramnegativní termofilní bakterie, které po počáteční izolaci tvoří filamenta, ale po opakovaných přenosech z laboratorních médií roste většina z nich jako pleomorfní tyčinky nebo tvoří krátká vlákna s výjimkou *T. filiformis*, která vždy tvoří velmi dlouhá, propletená vlákna. Většina bakteriálních buněk tohoto rodu obsahuje žluté, oranžové nebo červené karotenoidy, některé buňky mohou být i téměř bezbarvé, vykazující velmi bledou růžovou barvu díky cytochromům [75].

Pantazaki Anastasia, Dimopoulou Maria a spol. (2010) se zabývali produkcí rhamnolipidů pomocí *Thermus thermophilus* za využití slunečnicového oleje a kyseliny olejové jako zdroje uhlíku. Syntéza rhamnolipidů byla při použití slunečnicového oleje rychlejší než při použití kyseliny olejové, a hodnoty výtěžků byly srovnatelné s výtěžky produkovanými patogenním druhem *Pseudomonas aeruginosa*, která patří mezi hlavní producenty rhamnolipidů. Chemické složení produkovaného biosurfaktantu bylo analyzováno pomocí FTIR analýzy a LC-MS analýzy. Také byla detekována jejich antimikrobiální aktivita proti bakteriím *Micrococcus lysodeikticus* [76].

2.2.6 Aplikační využití biosurfaktantů

2.2.6.1 Technologie MEOR

MEOR (= microbial enhanced oil recovery) je proces, při kterém se mikroorganismy a jejich produkty využívají k regeneraci ropy. Technologie MEOR byla poprvé plně využita v roce 1954 a od té doby dochází k neustálému rozvoji této metody. Alarmující míra poklesu dodávek ropy činí MEOR užitečným; v budoucnu by mohla stabilizovat celosvětovou produkci ropy a zajistit tak odpovídající dodávky energie [77]. Koncept mikrobiální role v regeneraci ropy byl poprvé představen v roce 1926 a do roku 1940 se začalo vyvíjet několik prvních studií na toto téma. Technologii patentoval v roce 1946 C.E. Zobell, který jako první inicioval aplikace MEOR a vysvětlil mikrobiální mechanismy, které jsou za MEOR zodpovědné [77,78]. Technologii MEOR lze aplikovat dvěma způsoby – *in-situ* a *ex-situ*. V *in-situ* metodě jsou do ropného vrtu vstřikovány potenciální mikroby (pokud se již v rezervoáru nacházejí, stačí aplikovat jen potřebné živiny), následně dojde k uzavření a zaplavení vodou. Během toho mikroorganismy v ropném vrtu rostou a produkují různé bioprodukty, které vedou k ropné regeneraci. V *ex-situ* metodě jsou mikrobiální produkty vyvíjeny samostatně, a následně jsou aplikovány do ropného vrtu [78].

Některé bakterie jsou schopné produkovat biosurfaktanty, polymery, plyny a rozpouštědla, která přispívají k mobilizaci oleje v rezervoáru. Mechanismy MEOR zahrnují snížení mezifázového napětí, modifikaci permeability, snížení viskozity ropy, změny ve smáčitelnosti a biologickou degradaci. Právě biosurfaktanty snižují mezifázové napětí v systému olej-voda. Jejich účinnost spojená s regenerací ropy z porézních systémů při zvýšených teplotách byla potvrzena mnoha experimenty [79]. Emulsan má v ropném průmyslu důležité uplatnění. Právě vytvořením a stabilizací emulze výrazně snižuje viskozitu ropy při její přepravě potrubím. Pokud ho použijeme při regeneraci ropy, je schopen po fázi zaplavení vodou vytěsnit až 28 % dalšího zbytkového oleje [80].

2.2.6.2 Bioremediace

Aby se zabránilo kontaminaci životního prostředí mnoha toxickými látkami, používají se při čištění průmyslových areálů a oblastí různé fyzikální a chemické procesy. Ty ale bývají extrémně drahé. Alternativou pro tyto procesy je právě využití bioremediace pomocí biosurfaktantů. Díky mikroorganismům a jejich produktům jsou tak nebezpečné látky přeměňovány na látky méně toxické, nebo úplně netoxické [80].

Bioremediace se dá využít jako metoda pro čištění půdy a podzemních vod, které jsou kontaminovány převážně uhlovodíky, nejčastěji ropou [49]. Ropa a její deriváty mohou být součástí jiných organických látek, minerálních částic nebo samotných organismů. Výzkum interakce mezi uhlovodíky a mikroorganismy podpořil hypotézu, že je ropa díky této vazbě podrobena mikrobiální degradaci. Biosurfaktanty mohou zlepšit účinnost bioremediace pomocí

dvou mechanismů. První mechanismus zahrnuje zvýšení dostupnosti substrátu pro mikroorganismy a druhý zahrnuje interakci s buněčným povrchem – tato interakce pak zvyšuje hydrofobní charakter mikrobiální buněčné stěny. Mikroorganismy se tak k hydrofobním substrátům dostanou snadněji [81].

2.2.6.3 Využití biosurfaktantů v potravinářském průmyslu

Potravinářský průmysl může využívat biosurfaktanty dvěma různými způsoby:

- a) nepřímé využití – úpravy/ čištění povrchů
- b) přímé využití – potravinářská aditiva [82].

Mikroorganismy využívají tvorbu biofilmu jako ochranu pro jejich přežití, respektive pro přizpůsobení se změnám podmínek prostředí. Pod ochranou biofilmu se mikrobiální buňky stávají velmi odolnými [83]. Právě biofilm je často příčinou přetrvávající kontaminace potravin vedoucí k jejich zkáze a také přenosu nemocí. Aby se zabránilo adhezi bakterií a tvorbě biofilmů, využívá se úpravy povrchů pomocí biosurfaktantů. Biosurfaktanty mohou modifikovat fyzikálně-chemické vlastnosti daného povrchu a tím zabráňují bakteriální interakci s povrchem, a tedy i tvorbu biofilmu [84].

Lecitin a jeho deriváty, estery mastných kyselin obsahující glycerol, sorbitol, nebo ethylenglykol a ethyloxylované deriváty monoglycerolů, včetně nedávno syntetizovaných oligopeptidů, se využívají v potravinářském průmyslu jako emulgátory. Biosurfaktanty také nacházejí uplatnění v pekařských a masných výrobcích, kde ovlivňují reologické vlastnosti mouky nebo emulgaci částečně rozbitých tukových tkání [39]. Odpady z potravinářského průmyslu pak mohou být zpětně využity jako substráty pro syntézu povrchově aktivních látek [82].

2.2.6.4 Aplikace biosurfaktantů v medicíně

Biosurfaktanty v lidském těle účinně bojují proti infekcím a zánětům. Plicní biosurfaktant je lipoproteinový komplex syntetizovaný a vylučovaný epiteliálními plicními buňkami do extracelulárního prostoru, kde snižuje povrchové napětí na rozhraní vzduch-kapalina a představuje klíčový faktor v boji proti infekcím a zánětlivým plicním onemocněním [85].

Vzhledem k jejich struktuře a různým biofyzikálním vlastnostem se biosurfaktanty objevily jako možná činidla pro chemoterapii/ bioterapii, které jsou využívány při léčbě rakoviny. Byl poskytnut první důkaz, že zastavení růstu, apoptóza a diferenciací buněk myšího maligního melanomu může být indukováno právě mikrobiálními extracelulárními glykolipidy – konkrétně manosylerythritol lipidy (MEL) produkované *C. antartica* [86]. Biosurfaktant produkovaný *A. indicus* inhibuje proliferaci buněk karcinomu plic při koncentraci 200 mg/ml a potvrzuje tak svou protinádorovou aktivitu. Tento biosurfaktant nemá žádný negativní vliv na nenádorové buňky, ani neovlivňuje jejich životaschopnost. Proto byly tyto povrchově aktivní látky klasifikovány jako netoxické [87].

V posledním desetiletí byla věnována velká pozornost nanočásticím jako materiálům pro transport léčiva do cílové tkáně. Nanočástice jsou schopné solubilizovat hydrofobní léčiva ve vodných podmínkách a poskytnout tak dlouhodobou stabilitu bez rizika agregace. Emulsan se využívá pro zlepšení vlastností nanočástic. Povrch nanočástic je potažen emulsanem a jejich jádro je naplněno lněným olejem. Tak vznikají nanočástice na bázi emulzí, jejichž transport je pak snadněji realizován [88].

Rhamnolipidy jsou důležitými biosurfaktanty díky antimikrobiálním vlastnostem. Jsou účinné proti velkému množství jak gramnegativních, tak grampozitivních druhů bakterií. Rhamnolipidy ovlivňují buněčnou imunosupresi, hojení ran a uplatnění nacházejí také při léčbě onemocnění dásní [86]. Surfactin, jeden z prvních známých biosurfaktantů, má různé farmakologické aplikace, jako je například inhibice tvorby fibrinových sraženin a tvorba iontových kanálků v lipidových membránách [39].

2.3 Produkce biosurfaktantů pomocí termofilních bakterií v současnosti

Produkce biosurfaktantů termofilními mikroorganismy stále nebyla zcela prozkoumána, protože se většina studií soustředí především na produkci za mezofilních podmínek. Obecně produkce extremofilními mikroorganismy zahrnuje určité výzvy a překážky, které je třeba překonat, aby ji bylo možné realizovat ve velkém průmyslovém měřítku. Některá omezení jsou stejná jako u mezofilních druhů; jde především o náklady na výrobu povrchově aktivních látek, ztráta produktu při izolaci a purifikaci, a také konečná cena. Ačkoliv mají termofilní bakterie velký potenciál pro biotechnologické aplikace, je obtížné nalézt takového producenta, který je schopný opakované produkce vysokých výtěžků. Součástí výzvy je napodobení extrémních podmínek v laboratoři tak, aby prostředí co nejvíce odpovídalo přirozenému prostředí daného mikroorganismu. V současné době začínají vědci využívat nové metody, které by produkci termofilními bakteriemi usnadnili. Příkladem je metagenomická a metatranskriptomická analýza, díky které je možné lépe porozumět pozoruhodné složitosti a všestrannosti extremofilů [89].

V České republice se produkcí biosurfaktantů termofilními bakteriemi zabýval Tomáš Řezanka a kol. (2011). Konkrétně zkoumal tři termofilní druhy: *Thermus aquaticus*, *Meiothermus ruber* a bakterie z rodu *Thermus* (druh neuveden), které dříve nebyly popsány jako producenti rhamnolipidů. Mikroorganismy byly získány ze sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně. Kultivace probíhala za aerobních podmínek po dobu 44 hodin při 65 °C a 200 rpm. Po odstředění byly supernatanty extrahovány a purifikovány pomocí TLC. Hmotnostní spektrometrie následně odhalila 77 rhamnolipidů, které se lišily délkou řetězce a nasycením. Tandemová hmotnostní spektrometrie identifikovala mono- a di-rhamnolipidy, které obsahují jednu nebo dvě 3-hydroxymastné kyseliny, nasycené i nenasycené, s neobvykle dlouhými řetězci – až 24 atomů uhlíku. Všechny tři druhy bakterií se ukázali jako producenti rhamnolipidů, které se svou strukturou lišily od těch, které běžně produkuje *Pseudomonas aeruginosa*. Důležité je si uvědomit, že všechny tři zkoumané druhy bakterií jsou na rozdíl od *P. aeruginosa* pro člověka nepatogenní [90].

V roce 2019 publikovali S. Ebrahimi, H. Jalili a spol. studii, která jako první popisuje produkci biosurfaktantů bakteriemi, které jsou izolované z horkých kyselých pramenů v Íránu. Celkově bylo izolováno 12 bakteriálních druhů. Kultivace probíhala po dobu 72 hodin a následně proběhl screening supernatantů za účelem zjistit, zda termofilní bakterie produkují biosurfaktanty. Supernatanty byly testovány pomocí metody emulgačního indexu, měření povrchového napětí (Du-Noüy-Ring), metody rozšiřování oleje, testu hemolýzy a cetyltrimethylamoniumbromid-agarovým testem (CTAB). Všech dvanáct bakteriálních izolátů bylo schopno růstu na kukuřičném oleji, který byl jediným zdrojem uhlíku. Test CTAB dokázal, že žádný z těchto izolátů nebyl schopen produkovat rhamnolipidové biosurfaktanty. Na základě výsledků screeningových metod byl izolát č. 12, později identifikován jako *Bacillus subtilis*, vybrán jako nejúčinnější producent. Biosurfaktant produkovaný touto bakterií byl tepelně stabilní do 140 °C a jeho struktura byla nejvíce podobná surfaktinu [91].

G. Mehetre, S. Dastager a M. Dharne (2019) se zabývali degradací polycyklických aromatických uhlovodíků termofilními a termotolerantními bakteriemi, které produkují biosurfaktanty. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) zahrnují skupinu organických

znečišťujících látek. Tyto látky vzbuzují značné obavy kvůli jejich toxickým, mutagenním a karcinogenním vlastnostem. Mikroorganismy jsou schopné určité znečišťující látky transformovat nebo plně degradovat. PAH jsou vysokomolekulární hydrofobní látky, takže jejich dostupnost pro mikrobiální buňky je značně omezená. Zvýšená teplota způsobí nižší viskozitu, a to v konečném důsledku zvýší difuzi molekul PAH. Vyšší teplota ale snižuje metabolickou aktivitu mesofilních mikroorganismů, a tak je v tomto případě výhodné využít termofily. Využití biosurfaktantů v procesech bioremediace značně zlepšuje degradaci organických látek. Studie G. Mehetre a spol. se zabývala degradací čtyř aromatických uhlovodíků (antracen, fluoren, fenantren, a pyren) pomocí termofilních bakterií. Z horkého pramene v Indii byly odebrány vzorky vody, které byly doplněny o minerální solné médium obsahující směs aromatických uhlovodíků. Kultivace probíhala při 37 °C a 50 °C. Následně byly z těchto izolátů odebrány čtyři nejsilnější bakteriální kmeny, které byly identifikovány na základě analýzy genové sekvence 16S rRNA jako *Aeribacillus pallidus* (UCPS2), *Bacillus axarquiensis* (UCPD1), *Bacillus siamensis* (GHP76) a *Bacillus subtilis* – poddruh *inaquosorum* (U277). Degradace byla prováděna čistými kulturami (UCPD1, GHP76 a U277) při 37 °C a bakterií UCPS2 při 50 °C. Všechny zmíněné kmeny prokázali degradaci aromatických uhlovodíků (antracen, fluoren, fenantren a pyren). Degradční experiment byl také proveden smíšenou kulturou těchto bakterií při 50 °C, kdy bylo dosaženo lepších výsledků než při použití čisté kultury UCPS2. Pomocí screeningové metody rozšiřování oleje a měření povrchového napětí bylo zjištěno, že všechny čtyři bakteriální kmeny produkují biosurfaktanty. Dalšími metodami bylo zjištěno, že produkovaným biosurfaktantem všemi kmeny je cyklický lipopeptid, který se svou strukturou nejvíce podobá surfaktinu. Produkce surfaktinu bakterií *Aeribacillus* dříve nebyla popsána, tyto mikroorganismy byly popsány pouze jako producenti bioemulgátorů [92].

Biosurfaktanty produkované extremofily mohou mít v budoucnu značný význam. Jejich poměrně velká část je totiž stabilní vůči výraznějším změnám prostředí. Například lichenysin produkovaný *Bacillus licheniformis* je odolný vůči teplotám do 50 °C, hodnotám pH od 4,5 do 9 a koncentraci NaCl a Ca^{2+} až do 50 g/dm³. Další biosurfaktant produkovaný *Arthrobacter protophormiae* je stabilní v rozmezí pH hodnot 2-12 a teplot od 30 do 100 °C. Protože průmyslové procedury často používají extrémní výchylky teplot a pH, je nezbytné vyčlenit mikrobiální položky, které jsou vhodné k práci za těchto podmínek [40].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy

3.1.1 Použité chemikálie

- Antracen (Sigma-Aldrich, Německo)
- Citronan amonno-železitý (Sigma-Aldrich, Německo)
- D-glukóza monohydrát (Lach-Ner, Česká republika)
- Dihydrát chloridu měďnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Dihydrát chloridu vápenatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, Česká republika)
- Glycerol bezvodý (Lach-Ner, Česká republika)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Hexahydrát chloridu manganatého (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid amonný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid zinečnatý (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid železitý (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina trihydrogenboritá (Lachema, Česká republika)
- n-Hexan (VWR Chemicals BDH PROLABO, Spojené státy americké)
- Nutrient Broth (HiMedia, Indie)
- Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kvasničný extrakt (HiMedia, Indie)
- γ -butyrolakton (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Boeco, Německo)
- Centrifuga Hettich EBA 20 (Maneko, Česká republika)
- Centrifuga vysokorychlostní chlazená, Z 36 HK (Hermle, Německo)
- Inkubátor IP30 (BioTech, Česká republika)
- Laminární box Aura mini (BioAir-Euroclone, Spojené státy americké)
- Magnetická míchačka Kartell (MERCİ s.r.o., Česká republika)
- Nanofotometr P 300 (Implen, Velká Británie)
- pH metr (Termo Scientific, Nizozemí)
- Předvážky Kern EW 620-3NM (Německo)
- Temperovaná třepačka Incubator 1000 (Heidolph, Česká republika)
- Tenzimetr Sigma 701 (KSV Instruments)
- Vortex BENCHMIXER (Benchmark Scientific, Inc., Spojené státy americké)
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.1.3 Použité mikroorganismy

Z kompostů a aktivovaných kalů bylo izolováno 39 bakteriálních izolátů, u kterých byla testována produkce biosurfaktantů. Místa izolace a označení jednotlivých bakteriálních kultur jsou uvedeny v tabulce 2. Izolace bakterií nebyla předmětem bakalářské práce.

Tabulka 2: Seznam izolovaných bakteriálních kultur.

zdroj	označení izolátu	zdroj	označení izolátu
kal – Bystřice pod Hostýnem	1	kal – Bystřice pod	FŇ2
	2	Hostýnem	H24
	3		H30
	3a	kompost – Brno	F103
	4		F104
	4a		F105
	5		F106
	5a		F107
	6		F108
	7		F109
	8	kal – Modřice	F110
	9		M1
	21		M2
	22		M3
	23		M4
	25		M5
	26		M6
	27		M7
	28	kompost – Blansko	BŽ
	FŇ1		

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Příprava a složení inokulačního média

Do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml bylo přidáno 50 ml komplexního média (Nutrient Broth o koncentraci 25 g/l). Připravená média byla následně sterilizována. Složení komplexního média je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení komplexního média.

chemikálie	c [g/l]
pepton	10
masný extrakt	10
NaCl	5

3.2.2 Příprava a složení produkčního média

Za účelem produkce biosurfaktantů termofilními bakteriemi byla připravena minerální média. Do Erlenmeyerových baněk o objemu 250 ml bylo připraveno vždy 100 ml média, jehož složení je uvedeno v tabulce 4. Minerální média byla následně sterilizována. Následně byl do média přidán zdroj uhlíku a roztok stopových prvků (TES II), jehož složení je uvedeno v tabulce 5. Jako zdroj uhlíku byl použit glycerol (20 g/l), glukóza (20 g/l) nebo γ -butyrolakton (γ BL, 8 g/l). Zvolené zdroje uhlíku pro jednotlivé izoláty uvádí tabulka 6. Zdroje uhlíku byly vybrány dle substrátu, který byl využit k izolaci bakterií.

Tabulka 4: Složení produkčního média.

chemikálie	c [g/l]	c [ml/l]
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	9	
KH_2PO_4	1,5	
NH_4Cl	1	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,02	
$\text{NH}_4\text{Fe}^{(\text{III})}$ citrát	0,0012	
Kvasničný extrakt	0,5	
TES II		1

Tabulka 5: Složení roztoku stopových prvků TES II.

chemikálie	c [g/l]
EDTA	50
FeCl_3	8,3
ZnCl_2	0,84
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,13
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,016
H_3BO_3	0,1

Tabulka 6: Zvolené zdroje uhlíku pro bakteriální kultury.

izolát	zdroj uhlíku	izolát	zdroj uhlíku
1	glycerol	FŇ2	glukóza
2	glycerol	H24	glukóza
3	γ BL	H30	glukóza
3a	γ BL	F103	glukóza
4	glukóza	F104	glukóza
4a	glukóza	F105	glukóza
5	glukóza	F106	glukóza
5a	glukóza	F107	glukóza
6	glukóza	F108	glukóza
7	glukóza	F109	glukóza
8	glukóza	F110	glukóza
9	glukóza	M1	glukóza
21	glukóza	M2	glukóza
22	glukóza	M3	glukóza
23	glukóza	M4	glycerol
25	glukóza	M5	glycerol
26	glukóza	M6	γ BL
27	glukóza	M7	γ BL
28	glukóza	BŽ	glycerol
FŇ1	glukóza		

3.2.3 Průběh kultivace

Bakterie byly uchovávány v kryozkumavkách při -80 °C v 10 % roztoku glycerolu. Připravená inokulační média byla zaočkována kryozkumavkami ve sterilním laminárním boxu. Kultivace bakterií v inokulačních médiích probíhala na temperované třepačce při teplotě 50 °C a frekvenci 180 rpm. Po 24 hodinách kultivace byla ve sterilním laminárním boxu z inokula zaočkována produkční média, a to v koncentraci 10 % (v/v). Kultivace bakterií v produkčním médiu probíhala 48 hodin na temperované třepačce při 50 °C a 180 rpm.

3.3 Gravimetrické stanovení biomasy

Gravimetrické stanovení biomasy probíhalo vždy ve dvou paralelních sadách. Z produkčních médií, které obsahovaly příslušné bakteriální kultury, bylo nejprve odebráno 2 x 10 ml do menších centrifugačních zkumavek a následně byl zbytek kultury přidán do velkých centrifugačních zkumavek. Malé zkumavky byly centrifugovány 5 minut při 6000 rpm, velké pak 3 minuty při 5000 rpm. Supernatanty byly slity a uchovány pro následující detekci

biosurfaktantů. Biomasa z menších zkumavek byla promyta malým množstvím destilované vody a tyto zkumavky byly za stejných podmínek znovu centrifugovány. Následně byly zkumavky vysoušeny do konstantní hmotnosti. Poté byl obsah zkumavek zvážen na analytických vahách.

3.4 Metody pro screening produkce biosurfaktantů

Za účelem screeningu produkce biosurfaktantů termofilními bakteriemi bylo vybráno pět metod: stanovení aktivity emulze, solubilizace krystalického antracenu, metoda Du-Noüy-Ring, metoda rozlévání kapky a metoda rozšiřování oleje. Pro srovnání byla připravena pozitivní a negativní kontrola. Za pozitivní kontrolu byl zvolen 5 % roztok Tritonu-X 100, za negativní kontrolu pak destilovaná voda. Kromě vzorků byla proměřena také samotná produkční média s různými zdroji uhlíku, aby byl stanoven jejich případný vliv při testování vzorků screeningovými metodami.

3.4.1 Stanovení aktivity emulze

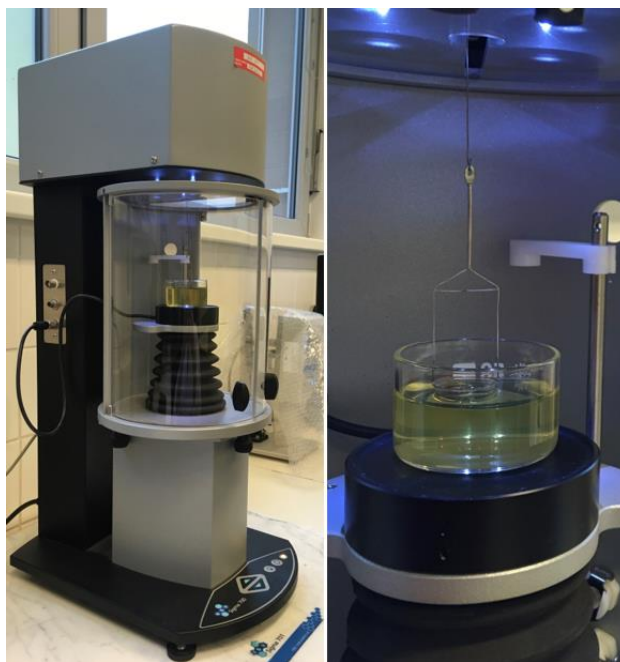
Do skleněných uzavíratelných zkumavek byly odebrány 3 ml supernatantu příslušné bakteriální kultury a 3 ml n-hexanu. Obsah každé zkumavky byl pomocí vortexu promíchán po dobu 1 minuty. Zkumavky byly následně ponechány ve stojanu při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách byl porovnán obsah zkumavek s pozitivní a negativní kontrolou. Následně byla změřena výška emulgované vrstvy a celková výška směsi ve zkumavce. Pomocí rovnice (3) byl u všech vzorků vypočten emulgační index a hodnoty byly zapsány. Pokud se ve zkumavce vytvoří emulgovaná vrstva, která je stabilní i po 24 hodinách, je ve vzorku prokázána přítomnost biosurfaktantu.

3.4.2 Metoda solubilizace antracenu

Do centrifugačních zkumavek bylo přidáno malé množství antracenu a 4 ml supernatantu. Všechny zkumavky s takto připravenou směsí byly umístěny na rotátor. Po 24 hodinách inkubace na rotátoru byly zkumavky centrifugovány při 6000 rpm po dobu 5 minut. Takto připravené vzorky byly následně proměřeny na spektrofotometru při 354 nm v křemenné kyvetě. Jako blank byla použita negativní kontrola. Hodnoty absorbance byly zapsány a následně porovnány s absorbancí pozitivní kontroly. Schopnost vzorku solubilizovat hydrofobní antracen značí přítomnost biosurfaktantu.

3.4.3 Přímé měření povrchového napětí – metoda Du-Noüy-Ring

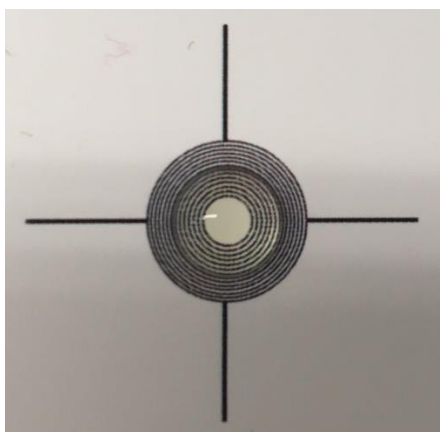
Povrchové napětí supernatantů bylo měřeno pomocí tenziometru s platinovým kroužkem (obrázek 7) a softwaru SGSERVER. V tomto softwaru byly nastavené potřebné parametry, tenziometr byl kalibrován a poté bylo provedeno samotné měření. Do nízké kádinky bylo nalito 30 ml supernatantu, který byl následně proměřen. Měření každého vzorku trvalo 10 minut a naměřená data byla exportována do MS EXCEL. Platinový kroužek byl z důvodu možné kontaminace po každém měření vyžítán. Následně byl vypočten aritmetický průměr všech hodnot vzorku, které přístroj naměřil. Hodnoty byly porovnány s negativní a pozitivní kontrolou a také s hodnotou čistého média.



Obrázek 7: Tenziometr Sigma 701.

3.4.4 Metoda rozlévání kapky

Pro tuto metodu byl použit speciální hydrofobní papír s tištěnými terčíky (obrázek 8). Na střed terčíku byla pomocí automatické pipety nanесena kapka supernatantu o objemu 60 μl . Kapky byly ihned po nanесení pozorovány a srovnávány s negativní a pozitivní kontrolou. Pokud nanесená kapka zabírala větší plochu terčíku než kapka negativní kontroly, byl vzorek hodnocen jako pozitivní.



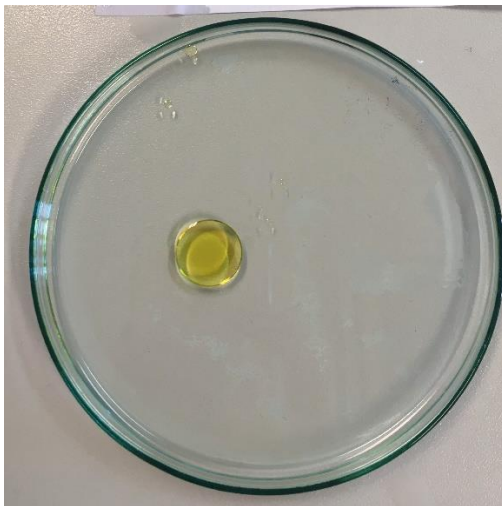
Obrázek 8: Ukázka metody rozlévání kapky.

3.4.5 Metoda rozšiřování oleje

První variantou bylo přidání 50 ml destilované vody do Petriho misky, na jejíž povrch bylo nanесeno 100 μl slunečnicového oleje. Následně bylo do středu olejové kapky aplikováno

100 μ l testovaného supernatantu. Aby bylo možné test vizuálně hodnotit, slunečnicový olej bylo nutné před samotným testem obarvit roztokem nilské červeně.

Ve druhém případě byl slunečnicový olej nahrazen olivovým olejem. Díky jeho zelené barvě nebylo nutné olej barvit. Do Petriho misky bylo přidáno 20 ml destilované vody. Množství oleje a testovaného supernatantu bylo navýšeno na 500 μ l, olejová skvrna a její případné šíření tak bylo lépe pozorováno (obrázek 9). Čistící zóny supernatantů byly porovnávány s dosaženými výsledky pozitivní a negativní kontroly.



Obrázek 9: Olejová kapka před nanesením testovaného vzorku.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na produkci biosurfaktantů bakteriálními kmeny, které byly izolovány z kompostů a aktivovaných kalů. Za účelem analýzy produkce BS byly vybrány následující screeningové metody: stanovení aktivity emulze, solubilizace krystalického antracenu, metoda Du-Noüy-Ring, metoda rozlévání kapky a metoda rozšiřování oleje.

Nejprve bylo testováno všech 39 supernatantů získaných po kultivaci bakteriálních izolátů. Pro první screening byly vybrány dvě metody: stanovení aktivity emulze a solubilizace krystalického antracenu. Výsledky testů byly zhodnoceny a pro podrobnější screening bylo vybráno 14 nejslibnějších producentů. Bakterie byly znovu kultivovány a byla tak získána nová sada supernatantů. Ta byla následně testována všemi uvedenými metodami – stanovením aktivity emulze, solubilizací krystalického antracenu, metodou Du-Noüy-Ring, metodou rozlévání kapky a metodou rozšiřování oleje. Za účelem ověření produkce BS u vybraných termofilních bakterií byly metody ještě jednou zopakovány, opět s novou sadou supernatantů. Na základě všech provedených testů byli vybráni nejlepší termofilní bakteriální producenti biosurfaktantů.

4.1 Screening produkce biosurfaktantů u izolovaných termofilních bakterií

Pro první screening produkce biosurfaktantů byly použity supernatanty získané po kultivaci izolovaných bakterií. Cílem prvního screeningu bylo analyzovat vhodné producenty biosurfaktantů. Za tímto účelem byly vybrány dvě jednoduché metody: stanovení aktivity emulze a solubilizace krystalického antracenu.

4.1.1 Stanovení aktivity emulze

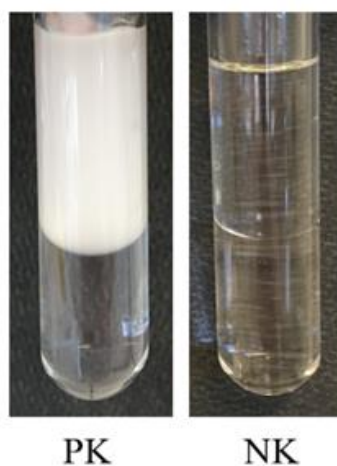
Aktivita emulze byla stanovena na základě hodnoty emulgačního indexu, který byl vypočten pomocí rovnice (3), a vizuálnímu popisu emulgované vrstvy. Pozitivní kontrola (5% Triton X 100) vytvořila po 24 hodinách inkubace stabilní emulgovanou vrstvu, která byla bílá, zcela neprůhledná a kompaktní v celém svém objemu. Hodnota emulgačního indexu pozitivní kontroly odpovídala 59,09 %. Negativní kontrola (destilovaná voda) nevytvořila žádnou emulgovanou vrstvu a její emulgační index byl tedy roven 0 %. Porovnání pozitivní a negativní kontroly je zobrazeno na obrázku 10. Test aktivity emulze byl proveden u všech 39 supernatantů. Emulgační indexy a vizuální popisy emulgovaných vrstev jsou uvedeny v tabulce 7. Na obrázku 11 je ukázka některých testovaných vzorků.

Tabulka 7: Emulgační indexy a popisy emulgovaných vrstev u testovaných supernatantů.

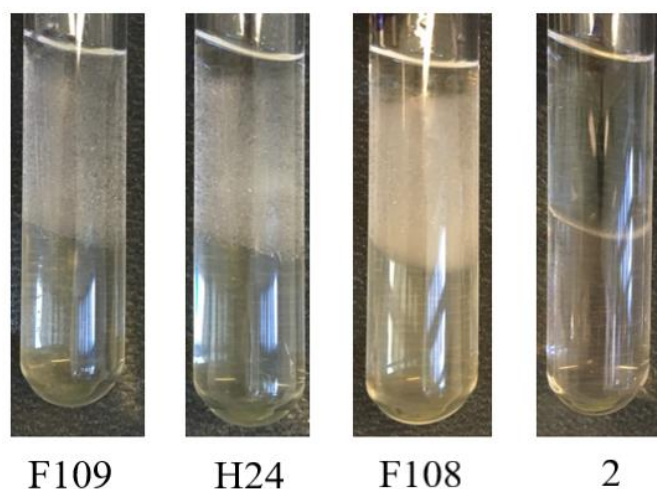
vzorek	E ₂₄ [%]	popis emulgované vrstvy	vzorek	E ₂₄ [%]	popis emulgované vrstvy
PK	59,09	bílá, krémová, neprůhledná vrstva bez pórů	FŇ1	25	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry
1	19,64	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry	FŇ2	45,28	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
2	0	netvoří emulgovanou vrstvu	H24	48,15	hustá vrstva téměř bez pórů
3	25,45	hustá vrstva téměř bez pórů	H30	47,27	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry
3a	37,04	hustá vrstva téměř bez pórů	F103	7,27	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry
4	1,82	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry	F104	7,41	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry
4a	25	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů	F105	3,64	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry
5	55,35	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů	F106	1,79	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry
5a	9,8	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry	F107	0	netvoří emulgovanou vrstvu
6	31,48	hustá vrstva téměř bez pórů	F108	41,82	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
7	37,04	hustá vrstva téměř bez pórů	F109	40	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
8	54,55	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů	F110	32,73	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry
9	27,27	hustá vrstva téměř bez pórů	M1	31,48	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry
21	57,41	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů	M2	26,42	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry
22	41,82	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry	M3	27,27	hustá vrstva téměř bez pórů
23	18,52	hustá vrstva téměř bez pórů	M4	5,55	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry
25	44,64	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů	M5	50,91	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
26	23,21	hustá vrstva téměř bez pórů	M6	12,5	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry
27	26,79	hustá vrstva téměř bez pórů	M7	0	netvoří emulgovanou vrstvu
28	45,45	hustá vrstva téměř bez pórů	BŽ	27,27	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry

Pouze tři testované vzorky (2, F107, M7) nevykazovali žádnou emulgační aktivitu, a tudíž byl jejich E_{24} nulový. Není jasné, zda tyto vzorky skutečně neobsahují žádné povrchově aktivní látky, protože ne všechny biosurfaktanty dokážou emulze stabilizovat. Pozitivní kontrole se nejvíce přiblížil vzorek 21, jehož emulgační index dosáhl 57,41 %. Emulgovaná vrstva byla neprůhledná, celistvá a vykazovala gelovitý charakter. Dalších výborných výsledků dosáhly supernatanty 5, 8 a M5, u kterých hodnoty E_{24} přesáhly 50 %. Hodnota emulgačního indexu byla u některých testovaných vzorků poměrně vysoká, ale jejich emulgovaná vrstva připomínala spíše pěnu, nebyla kompaktní a obsahovala hodně bublin (např. vzorek H30). V takovém případě supernatant pravděpodobně obsahoval BS, které stabilizují emulze, jejich koncentrace ve vzorku je ale nízká. Vzorky F106 a 4 vytvořily na rozhraní fází pouze tenký, pěnový kroužek. E_{24} těchto vzorků je nízký a v porovnání s ostatními testovanými vzorky je jeho hodnota zanedbatelná.

Kromě supernatantů, pozitivní a negativní kontroly byla touto metodou testována také samotná média. Ve všech případech byl výsledek srovnatelný s negativní kontrolou. Média by tedy na stabilizaci emulzí neměly mít vliv.



Obrázek 10: Porovnání pozitivní (PK) a negativní (NK) kontroly.



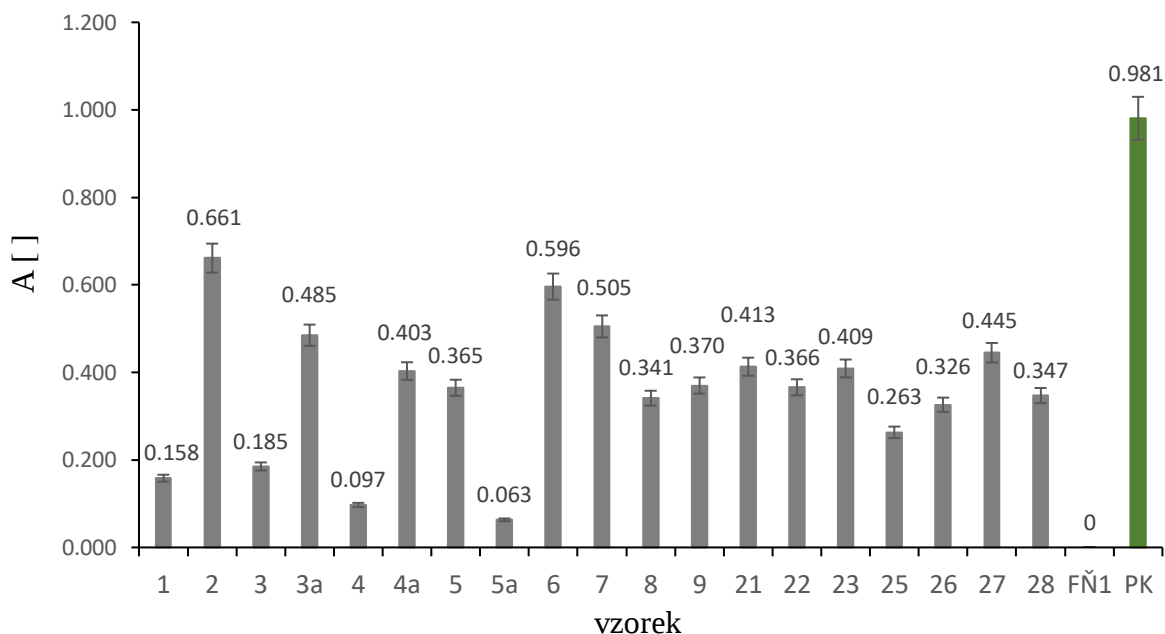
Obrázek 11: Ukázka emulgovaných vrstev u některých vybraných vzorků.

4.1.2 Solubilizace krystalického antracenu

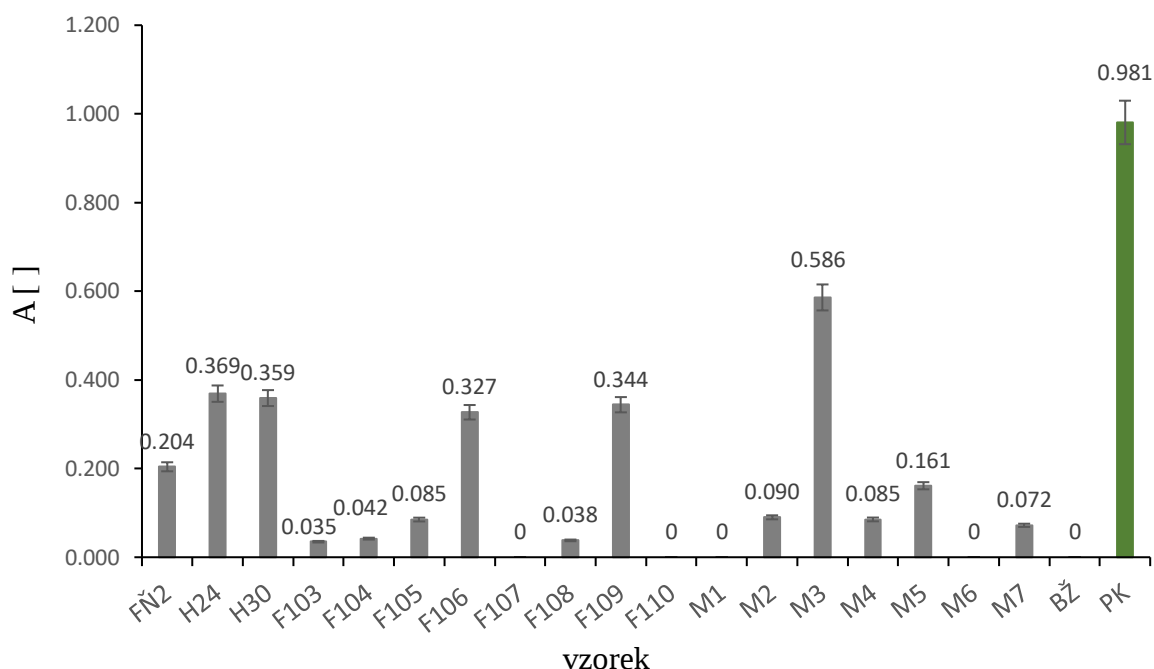
Supernatanty byly dále testovány metodou solubilizace krystalického antracenu. Antracen je hydrofobní, za normálních podmínek ve vodě nerozpustná látka. Pokud je ve vzorku přítomen biosurfaktant o dostatečné koncentraci, vytvoří micelární struktury (obrázek 5), do nichž se hydrofobní antracen začlení [52, 55].

Míra solubilizace byla měřena fotometricky při 354 nm v křemenných kyvetách. Pokud vzorek neobsahuje povrchově aktivní látky, nedojde k solubilizaci antracenu a všechny antracen se po centrifugaci vzorku usadí na dně zkumavky. Hodnota absorbance tedy bude nulová nebo velmi nízká. Pokud vzorek obsahuje biosurfaktanty, antracen se začlení do jejich micel a po centrifugaci zůstane jeho část solubilizována ve vzorku. V tomto případě naměříme vyšší absorbanci. Míra absorbance je tedy úměrná koncentraci biosurfaktantu v supernatantu.

Vzhledem k faktu, že i samotná média do jisté míry antracen solubilizují, byla míra jejich absorbance odečtena od hodnoty absorbance testovaných supernatantů. Výsledná hodnota pak byla porovnána s absorbancí pozitivní kontroly. Pro lepší přehlednost jsou naměřené hodnoty rozděleny do dvou grafů (obrázek 12, obrázek 13).



Obrázek 12: Absorbance testovaných vzorků (1–FŇ1).



Obrázek 13: Absorbance testovaných vzorků (FŇ2–BŽ).

Absorbance roztoku komerčně dostupného surfaktantu dosáhla hodnoty 0,981. Negativní kontrola sloužila v tomto případě jako blank. Z grafů vyplývá, že supernatanty bakterií FŇ1, F107, F110, M1, M6 a BŽ nebyly schopné antracen solubilizovat. V těchto vzorcích se tedy povrchově aktivní látky nenacházejí vůbec, nebo se zde nevyskytují v dostatečné koncentraci, která je nutná pro dosažení CMC. Nemůže tedy dojít k formování micelárních struktur, do kterých by se antracen mohl začlenit. Pozitivní kontrole se nejvíce přiblížil supernatant bakterie 2, jehož absorbance byla rovna 0,661. Dobrého výsledky dosáhly také supernatanty izolátů 6 ($A=0,596$) a M3 ($A=0,586$). Hodnoty absorbancí vzorků pod $A=0,1$ byly pokládány vzhledem k ostatním naměřeným hodnotám za zanedbatelné.

Na přípravu není metoda nijak náročná. Nevýhodou je stejně jako u stanovení emulgační aktivity inkubace vzorků po dobu 24 hodin. Za zmínku stojí také nutná opatrnost při manipulaci se vzorky, které musí být proměřeny ihned po jejich centrifugaci, aby nedošlo ke zvěšení usazeného antracenu na dně zkumavky. Případným zvěšením antracenu je měření značně ovlivněno. Ve vzorku se také mohou nacházet i jiné látky, které tvoří micely. Jejich přítomnost je další příčinou zkreslení naměřených hodnot.

4.1.3 Vyhodnocení vhodných producentů

Metodou solubilizace krystalického antracenu a stanovením aktivity emulze bylo z 39 bakteriálních izolátů vybráno 14 nejslibnějších producentů, kteří v těchto testech dosáhly kvalitních výsledků – supernatanty vybraných bakterií získaly dobré pozitivní výsledky v obou provedených testech, nebo alespoň v jednom z testů výrazně vynikaly. První screening produkce BS shrnuje tabulka 8. V případě stanovení aktivity emulze byl test hodnocen jako pozitivní pokud hodnota E_{24} přesáhla 3 %, u solubilizace krystalického antracenu pak musela být absorbance vyšší než $A=0,1$. Zakroužkované bakterie byly vybrány pro podrobnější zkoumání produkce BS.

Tabulka 8: První screening produkce BS (EA – stanovení aktivity emulze, ANT – solubilizace krystalického antracenu).

vzorek	EA	ANT	vzorek	EA	ANT	vzorek	EA	ANT
1	+	+	22	+	+	F106	–	+
2	–	+	23	+	+	F107	–	–
3	+	+	25	+	+	F108	+	–
3a	+	+	26	+	+	F109	+	+
4	–	–	27	+	+	F110	+	–
4a	+	+	28	+	+	M1	+	–
5	+	+	FÑ1	+	–	M2	+	–
5a	+	–	FÑ2	+	+	M3	+	+
6	+	+	H24	+	+	M4	+	–
7	+	+	H30	+	+	M5	+	+
8	+	+	F103	+	–	M6	+	–
9	+	+	F104	+	–	M7	–	–
21	+	+	F105	+	–	BŽ	+	–

+	pozitivní screeningový test
–	negativní screeningový test

4.2 Analýza produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií

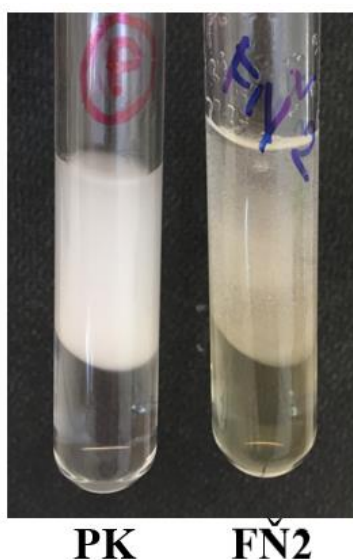
14 vybraných bakterií bylo podrobeno druhému screeningu produkce biosurfaktantů. Bakterie byly znovu kultivovány stejným postupem, který je popsán v kapitole 3.2.3. Jejich supernatanty byly testovány čtyřmi screeningovými metodami. Kromě stanovení aktivity emulze a solubilizace krystalického antracenu byla přidána také metoda Du-Noüy-Ring, metoda rozlévání kapky a metoda rozšiřování oleje.

4.2.1 Stanovení emulgační aktivity

Při stanovení aktivity emulze bylo postupováno stejně, jako v předchozím případě. Výsledky testu jsou uvedeny v tabulce 9. Nadstandardního výsledku dosáhl vzorek FÑ2, jehož emulgační index byl 57,41 %. Tato hodnota dokonce přesahuje E₂₄ pozitivní kontroly (55,77 %). Emulgovaná vrstva byla bílá, zcela neprůhledná a celistvá po celém svém objemu (obrázek 14). Za zmínku také stojí emulgační index vzorku 4a, který dosáhl srovnatelné hodnoty emulgačního indexu, jako pozitivní kontrola a emulgační index supernatantu H24, který přesáhl 50 %. K vytvoření emulgované vrstvy nedošlo u vzorků 5 a F108. Bakterie tedy po druhé kultivaci nedokázaly produkovat účinných emulgátorů.

Tabulka 9: Stanovení aktivity emulze u vybraných termofilních bakterií.

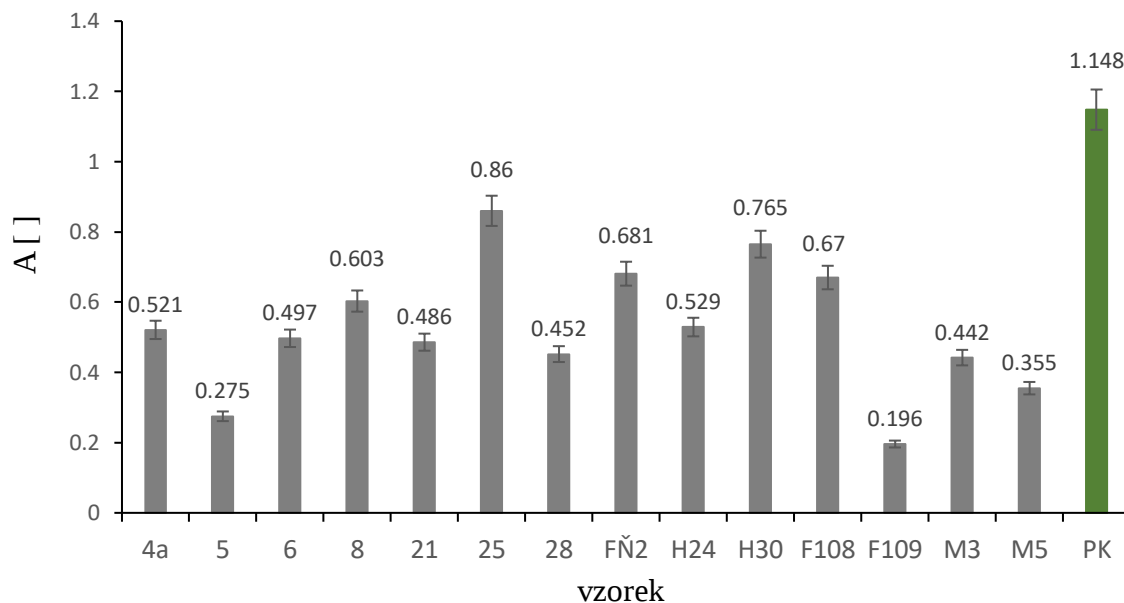
vzorek	E ₂₄ [%]	popis emulgované vrstvy	vzorek	E ₂₄ [%]	popis emulgované vrstvy
PK	55,77	bílá, krémová neprůhledná vrstva bez pórů	FŇ2	57,41	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
4a	54,72	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů	H24	52,73	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
5	0	netvoří emulgovanou vrstvu	H30	42,59	hustá vrstva téměř bez pórů
6	43,64	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů	F108	0	netvoří emulgovanou vrstvu
8	25,66	hustá vrstva téměř bez pórů	F109	46,3	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
21	41,82	hustá vrstva téměř bez pórů	M3	27,78	hustá vrstva téměř bez pórů
25	28,3	hustá vrstva téměř bez pórů	M5	5,56	řidká, průhledná vrstva tvořena malými póry
28	30,91	hustá vrstva téměř bez pórů			



Obrázek 14: Srovnání vzorku FŇ2 s pozitivní kontrolou.

4.2.2 Solubilizace krystalického antracenu

Dalším testem byla solubilizace krystalického antracenu. I zde bylo postupováno stejně, jako v předchozím případě. Naměřené hodnoty jsou zobrazeny na obrázku 15.

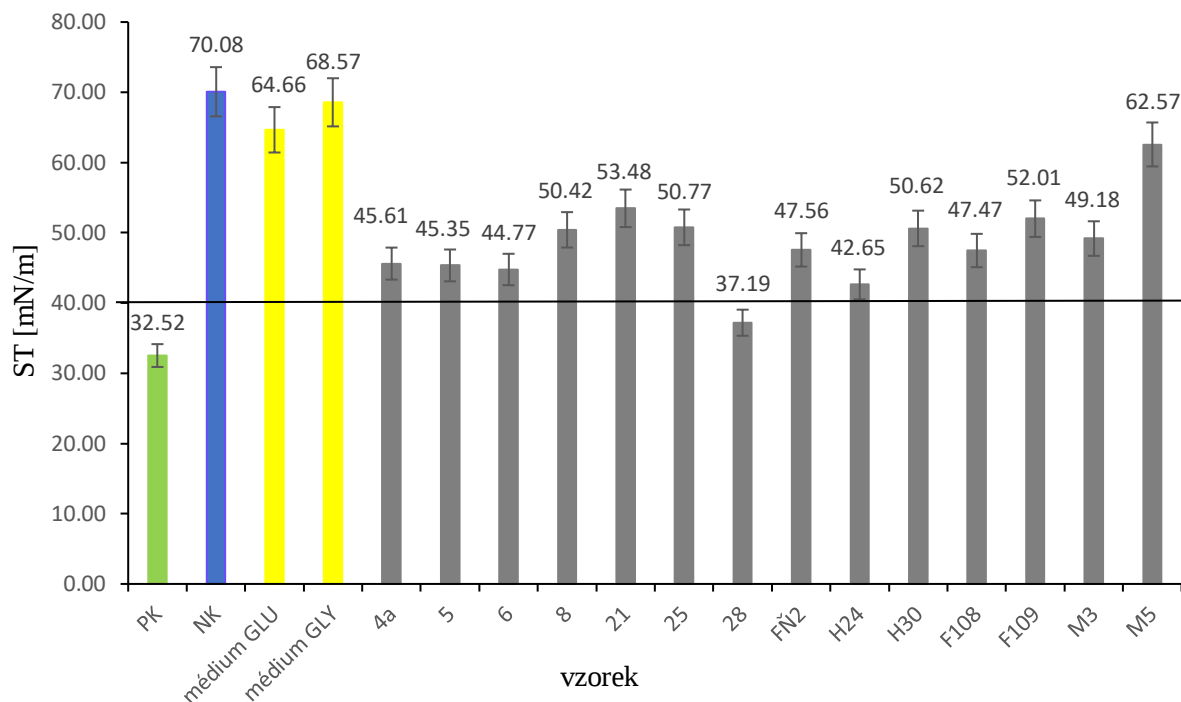


Obrázek 15: Naměřené absorbance vzorků vybraných bakterií.

Všechny supernatanty prokázaly přítomnost povrchově aktivních látek, které se v nich vyskytují v dostatečné koncentraci, kterou potřebují k formování micel. Nejlepšího výsledku tentokrát dosáhla bakterie 25, která se nejvíce přiblížila absorbanci PK.

4.2.3 Metoda Du-Noüy-Ring

U vybraných bakterií byla testována produkce BS také pomocí přímého měření povrchového napětí. Povrchové napětí destilované vody bylo stanoveno na 70,08 mN/m. Roztok 5 % Tritonu-X 100 dokázal tuto hodnotu snížit na 32,52 mN/m. Pro porovnání byla změřena také samotná produkční média. Hodnota povrchového napětí média s obsahem glukózy byla 64,66 mN/m a povrchové napětí média s obsahem glycerolu bylo stanoveno na 68,57 mN/m. Získané hodnoty jsou uvedeny v grafu – obrázek 16.



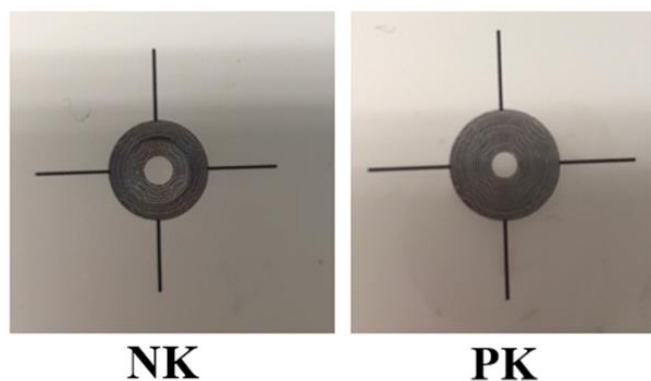
Obrázek 16: Povrchové napětí testovaných supernatantů.

Všechny testované supernatanty obsahují povrchově aktivní látky, které dokázaly snížit povrchové napětí média. Podle studie D. G. Coopera je za dobrý biosurfaktant považován ten, který dokáže snížit povrchové napětí média pod 40 mN/m [94]. To splňuje pouze bakterie 28, jejíž supernatant dokázal snížit povrchové napětí čistého média na 37,19 mN/m a bakterie se v tomto testu ukázala jako nejlepší producent biosurfaktantů, které výrazně snižují povrchové napětí.

Jedná se o přesnou metodu, kdy výsledek měření získáme do několika minut. Tato metoda však vyžaduje speciální vybavení a poměrně velký objem vzorku (desítky ml).

4.2.4 Metoda rozlévání kapky

Další screeningovou metodou byla metoda rozlévání kapky. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu, která vyžaduje speciální hydrofobní papír s natištěnými terčiky. Nejprve byla testována pozitivní a negativní kontrola. Negativní kontrola dokázala překonat 6–7 kruhů (kapka byla rozlita nerovnoměrně, na jedné straně kapky došlo k překonání 6 kruhů, na druhé 7). U pozitivní kontroly došlo ke kompletnímu rozliti nanesené kapky. Porovnání PK a NK je zobrazeno na obrázku 17.



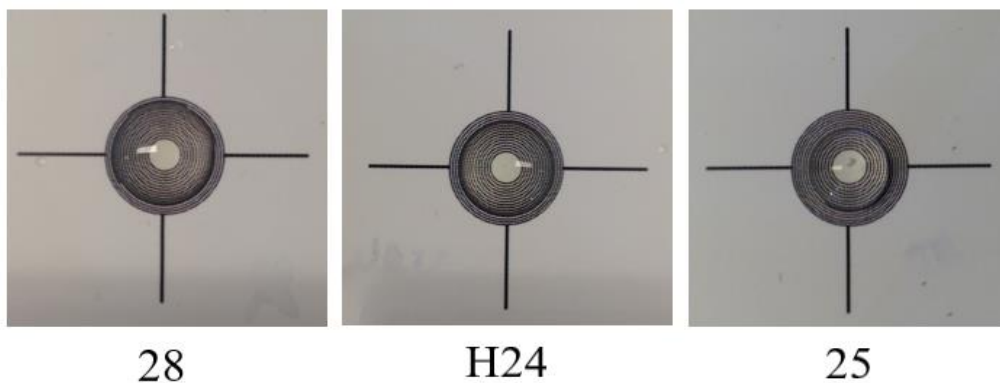
Obrázek 17: Porovnání rozlévání kapek NK a PK.

V rámci metody byly otestovány také samotná média, aby byl vyloučen jejich případný vliv na rozlití kapky supernatantu. U čistých médií nedošlo k žádnému výraznému rozlití nanesené kapky. Překonané kruhy jednotlivých supernatantů jsou zaznamenány v tabulce 10.

Tabulka 10: Výsledky metody rozlévání kapky.

vzorek	počet překonaných kruhů
NK	6–7
média	7
4a	9
5	7
6	9
8	7
21	7
25	7
28	13
FŇ2	7
H24	12
H30	8–9
F108	8
F109	8–9
M3	7
M5	8

Nejlepšího výsledku dosáhla bakterie 28, jejíž supernatant dokázal překonat 13 kruhů. Z toho vyplývá, že supernatant obsahuje amfifilní sloučeniny a vzorek se tak lépe adsorbuje na hydrofobní povrch. Dobrého výsledku dosáhla také bakterie H24 (12 překonaných kruhů). Naopak u supernatantů bakterií 5, 8, 21, 25, FŇ2 a M3 nedošlo v porovnání s čistým médiem k žádné změně. Koncentrace amfifilních sloučenin v těchto vzorcích by tak oproti jiným testovaným vzorkům měla být nižší. Porovnání některých testovaných vzorků je na obrázku 18.

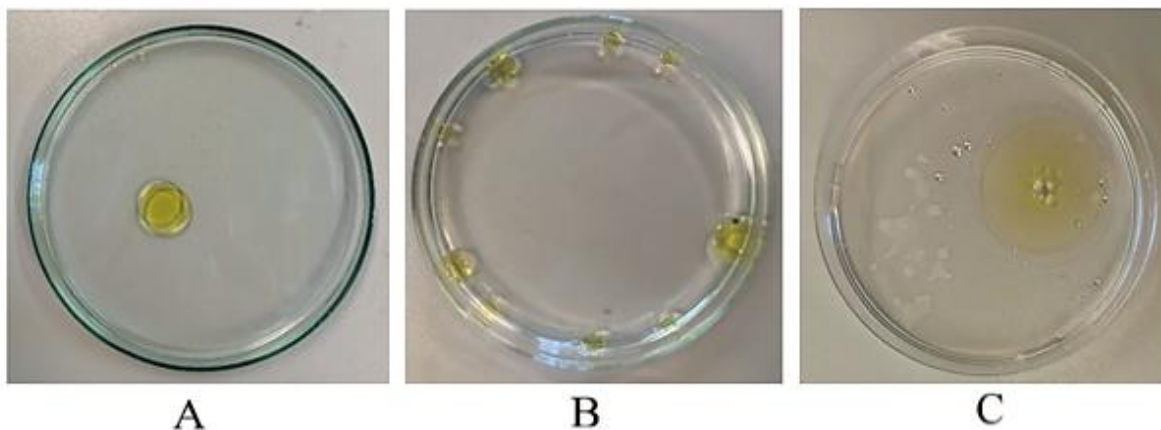


Obrázek 18: Adsorpce vybraných supernatantů na hydrofobní povrch.

4.2.5 Metoda rozšiřování oleje

Poslední screeningovou metodou byla metoda rozšiřování oleje, kterou bylo nutné nejprve optimalizovat. V prvním případě byl test proveden pomocí slunečnicového oleje. Slunečnicový olej musel být před samotným testem obarven roztokem nilské červeně, aby bylo možné výsledek testu vizuálně hodnotit. Nílská červeně mohla ovlivnit výsledky provedených testů. Ačkoliv je olej hydrofobní látka a při aplikování oleje na povrch destilované vody by tak měl zůstat v co nejmenším kontaktu, olejová skvrna se téměř ve všech případech šířila ještě před přidáním testovaného vzorku. Tento způsob testování se tedy příliš neosvědčil a metoda musela být vhodně upravena. Slunečnicový olej byl nahrazen olivovým olejem, který nebylo nutné barvit. Destilovaná voda byla přidána do Petriho misky pouze v takovém množství, aby pokryla její dno. Olejová kapka se ale v tomto případě přichytávala ke dnu Petriho misky. Poměr destilované vody, oleje a testovaného supernatantu byl vhodně upraven a nechtěné šíření olejové skvrny před nanesením vzorku bylo do jisté míry omezeno. Metoda tak mohla být aplikována na testované vzorky.

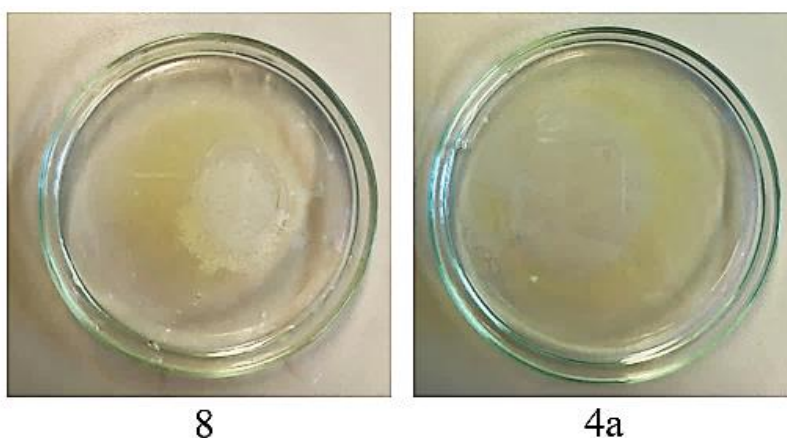
Metodou byla nejprve testována pozitivní a negativní kontrola a také kultivační média. Po nanesení negativní kontroly a samotných médií do středu olejové kapky nebyla pozorována tvorba čistící zóny, došlo pouze k většímu rozlití olejové kapky po povrchu destilované vody. Naopak ihned po nanesení pozitivní kontroly došlo k úplnému roztržení olejové kapky a olej byl vytlačen ke stranám Petriho misky. Porovnání výsledků pozitivní a negativní kontroly je zobrazeno na obrázku 19.



Obrázek 19: Porovnání výsledků pozitivní a negativní kontroly; A – olejová kapka před nanesením testovaného vzorku, B – čistící zóna po nanesení pozitivní kontroly, C – olejová skvrna po nanesení negativní kontroly.

Nejlepší pozitivní výsledky získaly supernatanty bakterií 4a, F108, FŇ2 a H24. Jejich čistící zóna se poměrně rychle šířila a olej byl vytlačen směrem ke stranám Petriho misky až do úplného roztržení olejové skvrny. U supernatantů 6, 8, 25, 28, H30 a M3 došlo rovněž k tvorbě čistících zón, ty se ale v porovnání s předešlými případy šířily o poznání pomaleji a jejich šíření nevedlo k úplnému roztržení olejové skvrny. U supernatantů 5, 21, F109 a M5 nebyla pozorována tvorba čistící zóny a výsledky jejich testů byly srovnatelné s výsledkem testu negativní kontroly. Porovnání některých vybraných vzorků je zobrazeno na obrázku 20.

Hlavní výhodou metody je její jednoduchost a časová nenáročnost, metoda také nevyžaduje žádné speciální vybavení. V literatuře je metoda popsána jako velmi efektivní a spolehlivá, která je účinná i při malé koncentraci biosurfaktantů ve vzorku [57]. Metodu bylo nejprve nutné optimalizovat tak, aby nedocházelo k šíření olejové skvrny ještě před nanesením testovaných vzorků. Ačkoliv došlo k viditelnému zlepšení při využití olivového oleje a pozměnění množství destilované vody, oleje a testovaného supernatantu, v některých případech stále docházelo k nechtěnému šíření. Možným řešením by mohlo být pokrytí celého povrchu destilované vody olejem v Petriho misce tak, jak je zobrazeno na obrázku 6.



Obrázek 20: Porovnání testovaných vzorků 8 a 4a.

4.2.6 Vyhodnocení screeningu produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií

Vyhodnocení screeningových testů je shrnuto v tabulce 11. U stanovení aktivity emulze byl test hodnocen jako pozitivní, pokud hodnota E_{24} přesáhla 3%, v případě solubilizace krystalického antracenu musela být hodnota absorbance vyšší než $A=0,1$. V metodě Du-Noüy-Ring pak byl test hodnocen jako pozitivní, pokud povrchové napětí supernatantu bylo nižší, než povrchové napětí čistého média. V případě testu rozlévání kapky musel supernatant překonat více kruhů (natištěné na speciálním hydrofobním papíře) než čisté médium. V metodě rozšiřování oleje musel přídatek supernatantu na povrch olejové skvrny zapříčinit tvorbu čistící zóny, aby byl test hodnocen jako pozitivní na přítomnost BS. Pokud se supernatant bakterie v některém z provedených testů svými výsledky výrazně přiblížil výsledku pozitivní kontroly, nebo pokud v porovnání s ostatními supernatanty získal výrazně lepší výsledek, byl tento test hodnocen jako nadprůměrný.

Pět termofilních izolátů dosáhlo pozitivních výsledků ve všech metodách (4a, 6, 28, H24 a H30). Supernatanty všech bakterií dosáhly pozitivního výsledku v testu solubilizace krystalického antracenu. Vzorky byly touto metodou proměřeny vždy dvakrát za sebou. V některých případech docházelo k neúmyslnému zvíření usazeného antracenu na dně zkumavky a hodnoty absorbancí nezůstávaly stabilní. Výsledky metody tak nemusí být zcela přesné. I přes to byla u supernatantu izolátu s označením 25 naměřena vysoká hodnota absorbance, která je oproti ostatním naměřeným hodnotám nadprůměrná.

Nejméně pozitivních výsledků pak bylo získáno metodou rozlévání kapky. U kapek supernatantu bakterie FŇ2 nedošlo oproti čistému médiu k žádné změně, ačkoliv supernatant získal v jiných testech výborné výsledky. Důvodem častého neúspěchu může být znečištění hydrofobního povrchu papíru, nebo nerovnoměrné nanesení vzorku na střed terčíku. Kapky byly zkoumány ihned po nanesení vzorků na hydrofobní povrch. Některé supernatanty se tak mohly rozlévat oproti jiným vzorkům výrazně pomaleji.

Metodou Du-Noüy-Ring byla testována schopnost supernatantů snížit povrchové napětí média. Všechny vzorky dokázaly povrchové napětí snížit. Důvodem může být přítomnost dalších látek, které mohou mít na snížení povrchového napětí vliv. Supernatant bakterie 28 dokázal snížit hodnotu povrchového napětí média pod 40 mN/m a bakterie se tak jeví jako nejlepší producent biosurfaktantů, které efektivně snižují povrchové napětí.

Za nejlepší producenty biosurfaktantů jsou zatím považovány bakterie 4a, 28, FŇ2 a H24. Jako nejlepší producent se jeví bakterie H24, která dosáhla nadprůměrných výsledků hned ve třech testech. Supernatant bakterie H24 vynikl ve stanovení emulgační aktivity, v metodě rozlévání kapky (MRK) a metodě rozšiřování oleje (MRO). Bakterie se jeví jako dobrý producent účinných emulgátorů. Bakterie 4a a FŇ2 získaly nadprůměrné výsledky v metodě stanovení emulgační aktivity a v metodě rozšiřování oleje. Stejně jako bakterie H24 by tak mohly být dobrými producenty emulgátorů. Supernatant bakterie 28 pak dokázal nejúčinněji snížit povrchové napětí média. Nejslabším producentem BS z testovaných izolátů je bakterie 5, u které byl naměřen negativní výsledek ve třech testech (stanovení emulgační aktivity, metoda rozlévání kapky a metoda rozšiřování oleje) a ani ve zbývajících dvou testech nijak výrazně nevynikala.

Tabulka 11: Vyhodnocení screeningu vybraných termofilních bakterií (EA – stanovení aktivity emulze, ANT – solubilizace krystalického antracenu, DNR – přímé měření povrchového napětí – metoda Du-Noüy-Ring, MRK – metoda rozlévání kapky, MRO – metoda rozšiřování oleje).

vzorek	EA	ANT	DNR	MRK	MRO
4a	+	+	+	+	+
5	–	+	+	–	–
6	+	+	+	+	+
8	+	+	+	–	+
21	+	+	+	–	–
25	+	+	+	–	+
28	+	+	+	+	+
FŇ2	+	+	+	–	+
H24	+	+	+	+	+
H30	+	+	+	+	+
F108	–	+	+	+	+
F109	+	+	+	+	–
M3	+	+	+	–	+
M5	+	+	+	+	–

+	pozitivní screeningový test
–	negativní screeningový test
+	nadprůměrný výsledek

4.3 Ověření reprodukovatelnosti produkce BS

Všechny screeningové metody byly pro vybraných 14 bakterií ještě jednou zopakovány za účelem ověření produkce povrchově aktivních látek. Kultivace bakterií ani samotné metody nebyly nijak modifikovány. Získané výsledky pak byly porovnány s výsledky prvního i druhého screeningu.

4.3.1 Stanovení emulgační aktivity

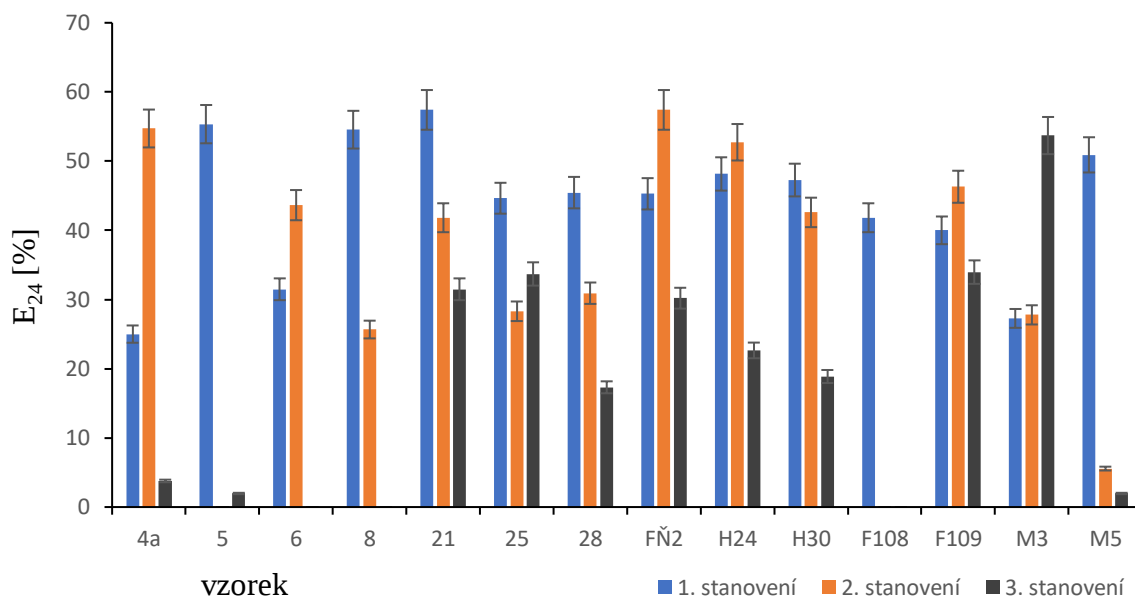
Výsledky stanovení emulgační aktivity jsou shrnuty v tabulce 12. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo se supernatantem bakterie M3, jehož hodnota emulgačního indexu je výrazně vyšší než emulgační indexy u ostatních bakterií. Supernatanty izolátů 6, 8 a F108 nedokázaly vytvořit emulgovanou vrstvu, která by zůstala po 24 hodin stabilní, jejich hodnoty E_{24} tak byly nulové. Vzorky 5 a M5 pak vytvořily pouze velmi slabou vrstvu, která byla po celém svém objemu hodně perforovaná. Emulgační indexy obou těchto vzorků dosáhly pouze 1,96 %. Tyto bakterie tak při třetí kultivaci neprokázaly produkci biosurfaktantů, které by účinně stabilizovaly emulze.

Tabulka 12: Výsledky třetího stanovení aktivity emulze.

vzorek	E ₂₄ [%]	popis emulgované vrstvy	vzorek	E ₂₄ [%]	popis emulgované vrstvy
PK	55,77	bílá, krémová neprůhledná vrstva bez pórů	FŇ2	30,19	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
4a	3,77	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry	H24	22,64	řídká, průhledná vrstva tvořena malými póry
5	1,96	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry	H30	18,87	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
6	0	netvoří emulgovanou vrstvu	F108	0	netvoří emulgovanou vrstvu
8	0	netvoří emulgovanou vrstvu	F109	33,96	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
21	31,48	hustá vrstva téměř bez pórů	M3	53,7	velmi hustá, gelovitá vrstva bez pórů
25	33,69	hustá vrstva téměř bez pórů	M5	1,96	velmi řídká, průhledná vrstva s velkými póry
28	17,31	hustá vrstva téměř bez pórů			

Pokud naměřené výsledky porovnáme s výsledky předchozích screeningů (obrázek 21), je na první pohled zřejmé, že téměř ve všech případech došlo při třetím screeningu k poklesu produkce biosurfaktantů, které stabilizují emulze. Výjimkou je bakterie M3, u které naopak došlo ke skokovému nárůstu. U bakterií 5, F108 a M5 by se mohlo jednat pouze o jednorázovou produkci emulgátorů, vzhledem k faktu, že supernatanty těchto bakterií uspěly pouze při prvním stanovení aktivity emulze. Bakterie 4a, 6, FŇ2, H24 a F109 dosáhly nejlepších výsledků při druhém testu. K postupnému snižování produkce došlo u bakterií 21, 28 a H30.

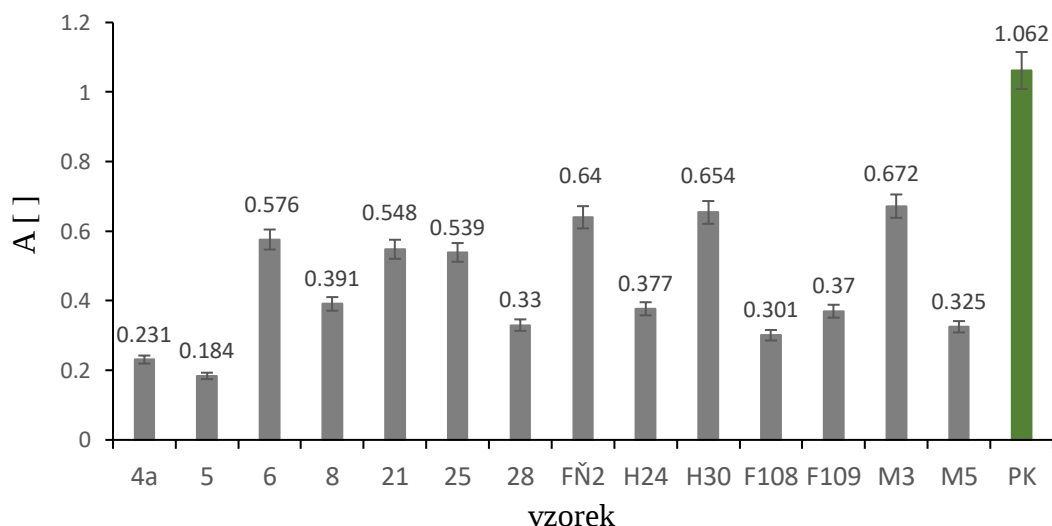
S ohledem na získané výsledky ve všech třech stanoveních jsou za dobré producenty biosurfaktantů, které účinně stabilizují emulze, považovány bakterie 21, 25, 28, FŇ2, H24, H30, F109 a M3. Jako nejlepší producent se jeví bakterie FŇ2, jejíž průměrný emulgační index vypočten ze všech testů činí 44,29 %. Dalšími dobrými producenty jsou pak bakterie H24 ($E_{24(\emptyset)} = 41,17$ %) a F109 ($E_{24(\emptyset)} = 40,09$ %). Oba supernatanty těchto bakterií dokázaly ve všech provedených testech aktivity emulze stabilizovat emulgovanou vrstvu, která byla neprůhledná, velmi hustá a zcela bez bublin.



Obrázek 21: Porovnání získaných výsledků – stanovení aktivity emulze.

4.3.2 Solubilizace krystalického antracenu

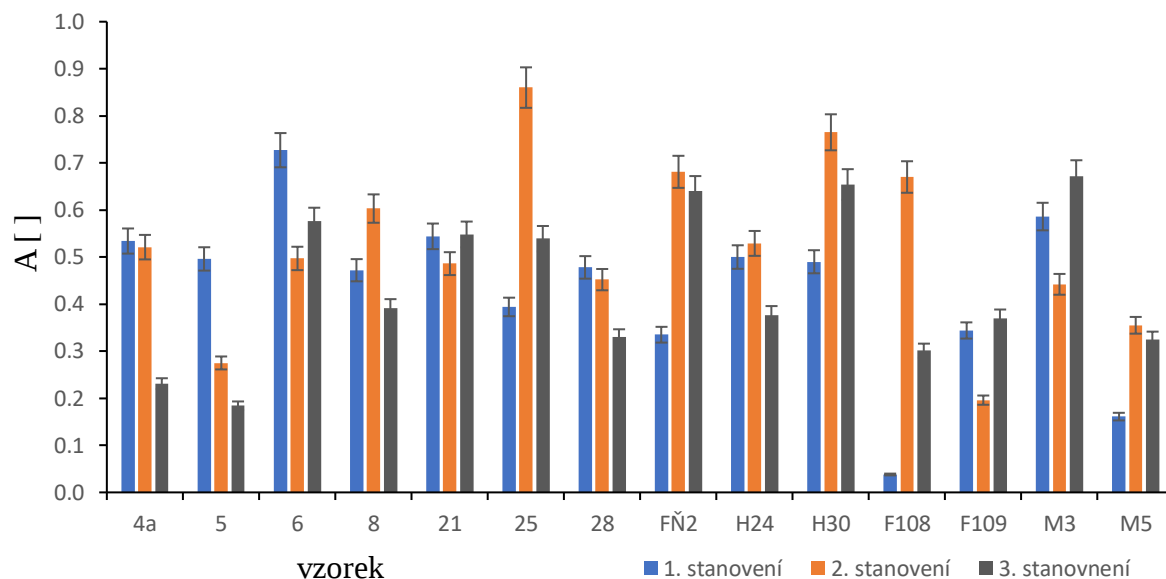
Naměřené hodnoty absorbancí po odečtu absorbance čistého média uvádí obrázek 22. U všech bakterií se touto metodou potvrdila produkce biosurfaktantů, které se v supernatantech vyskytují v dostatečné koncentraci, aby mohlo dojít k tvorbě micel. Nejvyšší absorbance byla naměřena u supernatantu bakterie M3, která dosáhla nejlepšího výsledku i ve stanovení aktivity emulze. Dobré výsledky také získaly bakterie FŇ2 a H30.



Obrázek 22: Absorbance vzorků vybraných bakterií – 3. stanovení.

Porovnání výsledků jednotlivých supernatantů v provedených testech solubilizace krystalického antracenu je zobrazeno na obrázku 23. Devět vzorků (4a, 5, 21, 28, FŇ2, H24,

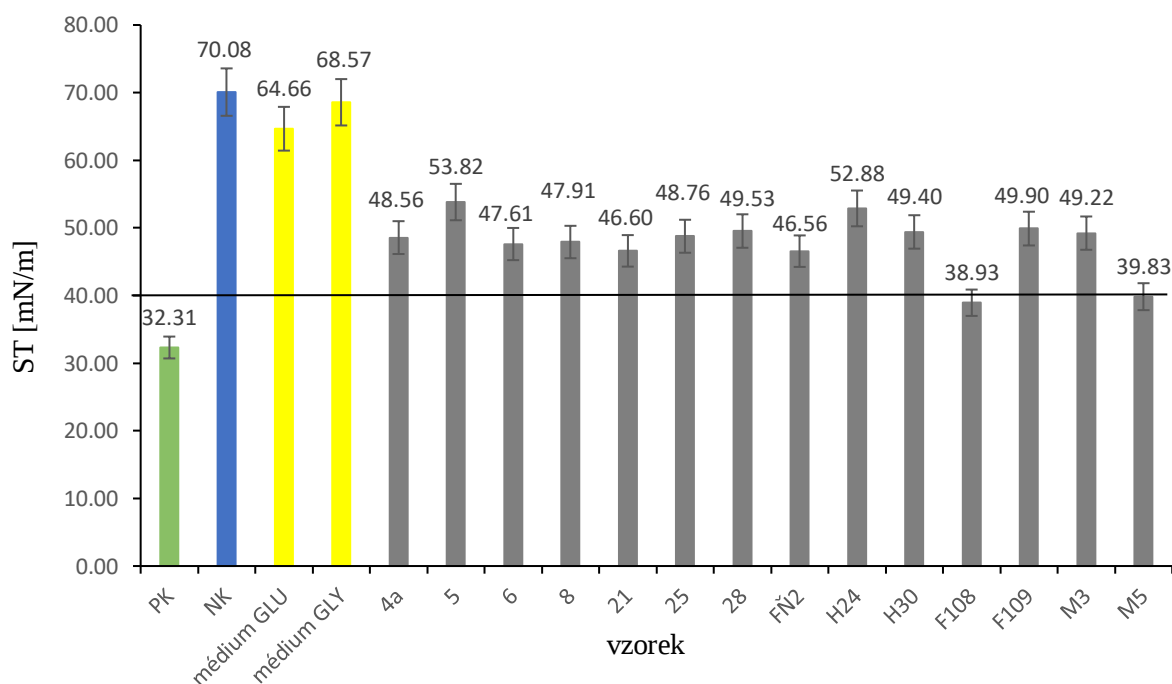
F109, M5 a M3) má vždy ve dvou testech podobné hodnoty absorbancí. Rozdíl je v těchto hodnotách menší než 0,1.



Obrázek 23: Porovnání výsledků – solubilizace krystalického antracenu.

4.3.3 Metoda Du-Noüy-Ring

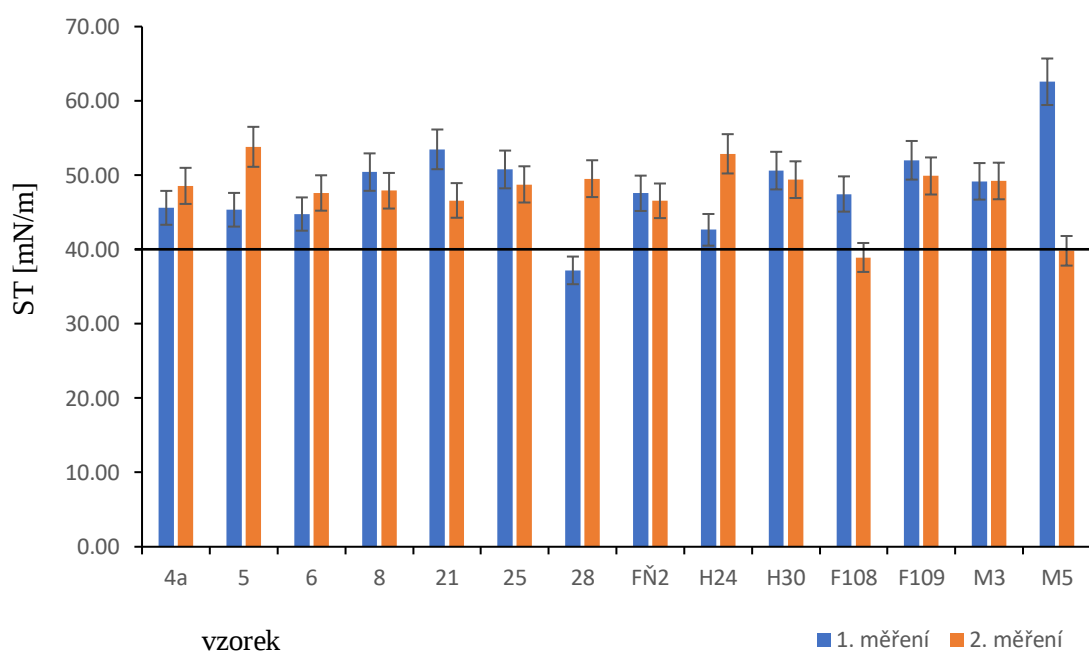
Všechny testované supernatanty dokázaly snížit povrchové napětí čistého média. Ve dvou případech došlo ke snížení povrchového napětí pod 40 mN/m, a to u vzorku F108 a M5. Obrázek 24 zobrazuje naměřené hodnoty.



Obrázek 24: Povrchové napětí testovaných supernatantů.

Porovnání dvou měření povrchového napětí supernatantů vybraných termofilních bakterií je zobrazeno na obrázku 25. Na první pohled je zřejmé, že se nejspíše jedná zatím o nejpřesnější metodu, která byla v bakalářské práci použita. Důvodem je pravděpodobně použití automatizovaného zařízení a je tak minimalizován počet možných chyb při měření. Je však zajímavé, že největší rozdíly v hodnotách povrchového napětí se vyskytují u těch vzorků, které alespoň v jednom testu dokázali snížit povrchové napětí pod 40 mN/m. Úplným extrémem je pak vzorek bakterie M5, u kterého došlo v prvním testu k minimálnímu snížení povrchového napětí oproti čistému médiu, v druhém testu pak dosáhla druhého nejlepšího výsledku. Tato bakterie při druhém a třetím screeningu nedokázala produkci emulgátorů. Bakterie M5 může být velmi citlivá na změnu prostředí, a i malé výkyvy teplot mohou mít na produkci BS vliv.

Pro potvrzení produkce biosurfaktantů, které efektivně snižují povrchové napětí, by bylo vhodné u některých supernatantů měření ještě jednou zopakovat.



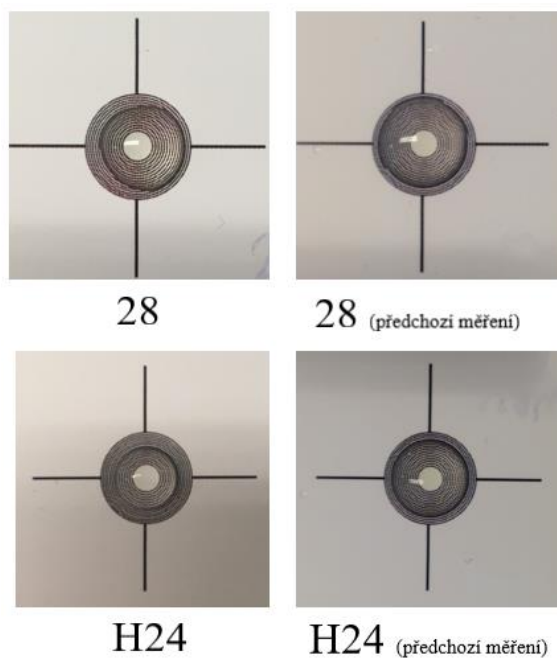
Obrázek 25: Porovnání výsledků – metoda Du-Noüy-Ring.

4.3.4 Metoda rozlévání kapky

V rámci této metody byly znovu otestovány supernatanty vybraných termofilních bakterií. Počet překonaných kruhů na hydrofobním povrchu u jednotlivých supernatantů a porovnání s předchozím testem jsou uvedeny v tabulce 13. Výborný výsledek získala bakterie H24, jejíž supernatant dokázal na hydrofobním povrchu překonat 12 kruhů. V předchozím testu ale její supernatant nevykazoval žádnou vizuální změnu oproti čistému médiu. Dobrého výsledku dosáhl vzorek 28, ačkoliv kapka vzorku byla rozlita nerovnoměrně. Přesažené kruhy této kapky byly spočteny na různých místech a z těchto hodnot byl vypočten průměr, který byl stanoven na 10–11 překonaných kruhů. Tato bakterie v předchozím testování dosáhla nejlepšího výsledku. Bakterie také uspěla při prvním měření povrchového napětí. Porovnání kapek některých vzorků je zobrazeno na obrázku 26.

Tabulka 13: Výsledky metody rozlévání kapky.

vzorek	překonané kruhy	překonané kruhy (předchozí test)
NK	6–7	6–7
média	7	7
4a	7	9
5	8–9	7
6	7	9
8	8–9	7
21	7	7
25	8–9	7
28	10–11	13
FŇ2	9	7
H24	7	12
H30	8	8–9
F108	8	8
F109	8	8–9
M3	9	7
M5	10–11	8



Obrázek 26: Porovnání některých vybraných vzorků.

4.3.5 Metoda rozšiřování oleje

Nejlepší výsledky byly naměřeny u supernatantů bakterií 6, F108, H24 a H30. Supernatanty bakterií 4a, 5, 8, 25, 28, F109 a FŇ2 byly druhým testem hodnoceny jako pozitivní, supernatanty bakterií 21, M3 a M5 pak získaly negativní výsledek. Tabulka 14 porovnává první a druhé testování touto metodou. U supernatantů bakterií 21 a M5 byl naměřen negativní

výsledek v obou provedených testech a dalo by se tak říci, že bakterie 21 a M5 biosurfaktanty vůbec neprodukují. V jiných metodách ale supernatanty dosáhly poměrně dobrých výsledků. S ohledem na tuto skutečnost bakterie biosurfaktanty pravděpodobně produkují, ale jejich aktivita vytlačení oleje je velmi nízká.

Supernatanty bakterií F108 a H24 získaly nadprůměrný výsledek v prvním i druhém testování. Po aplikaci supernatantu na povrch olejové kapky došlo k tvorbě čistící zóny, která v konečném důsledku vedla až k úplnému roztržení olejové skvrny. Aktivita biosurfaktantů, které bakterie F108 a H24 produkují, je teda poměrně velká.

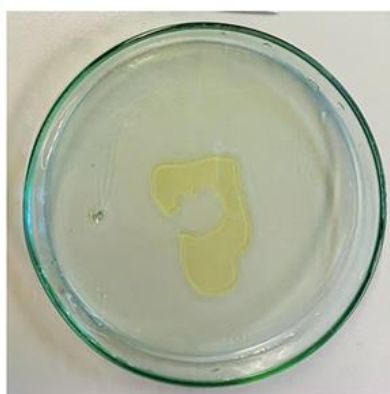
Pro přesnější screening produkce BS touto metodou by u supernatantů 5, F109 a M3 bylo vhodné metodu ještě jednou zopakovat, jejich výsledky prvního a druhého testu se liší, a nelze tak určit, zda bakterie BS skutečně produkují. Obrázek 27 zobrazuje porovnání prvního a druhého testu u bakterie FŇ2.

Tabulka 14: Výsledky metody rozšiřování oleje.

vzorek	tvorba čistící zóny	tvorba čistící zóny (předchozí test)
4a	+	+
5	+	-
6	+	+
8	+	+
21	-	-
25	+	+
28	+	+
FŇ2	+	+
H24	+	+
H30	+	+
F108	+	+
F109	+	-
M3	-	+
M5	-	-



FŇ2-1.test



FŇ2-2.test

Obrázek 27: Porovnání 1. a 2. testování supernatantu FŇ2 metodou rozšiřování oleje.

4.3.6 Vyhodnocení reprodukovatelnosti produkce BS u vybraných termofilních bakterií

Účelem třetího screeningu bylo ověření produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií. Získané výsledky byly porovnány s výsledky prvního a druhého screeningu.

Téměř u všech bakterií došlo v porovnání s prvním a druhým screeningem k výraznému poklesu produkce biosurfaktantů, které stabilizují emulze. Jako nejlepší producent účinných emulgátorů byla vyhodnocena bakterie FŇ2. Její supernatant dokázal ve všech stanoveních tvořit hustou a neprůhlednou emulgovanou vrstvu. Hydrofobní antracen dokázaly nejlépe solubilizovat supernatanty bakterií H30 a 25. Povrchové napětí média bylo nejvíce sníženo supernatanty bakterií 28 a F108, které alespoň v jednom z testů snížili hodnotu povrchového napětí pod 40 mN/m. U supernatantu bakterie M5 v metodě Du-Noüy-Ring byly naměřeny dvě zcela odlišné hodnoty: v prvním provedeném měření nedošlo k výraznému snížení hodnoty povrchového napětí oproti čistému médiu, ve druhém měření pak supernatant dokázal snížit hodnotu povrchového napětí pod 40 mN/m. U supernatantu bakterie M5 byly naměřeny nestabilní výsledky i v dalších metodách a z tohoto důvodu bakterie není považována za spolehlivého producenta BS. Bakterie 28 získala nejlepší výsledky v obou provedených testech metody rozlévání kapky a pravděpodobně tak dokáže opakovaně produkovat biosurfaktanty v hojné koncentraci. V metodě rozšiřování oleje si pak nejlépe vedly supernatanty bakterií F108 a H24. BS produkované těmito bakteriemi vynikají aktivitou vytlačení oleje.

Na základě výsledků všech screeningových metod byla sestavena tabulka (tabulka 15), která je založena na jednoduchém bodovém systému:

- Nadprůměrný (pozitivní) výsledek testu – 2 body,
- pozitivní screeningový test – 1 bod,
- negativní screeningový test – 0 bodů.

Test byl vyhodnocen jako nadprůměrný, pokud se výsledek testovaného supernatantu výrazně přiblížil výsledku testu pozitivní kontroly, nebo pokud v porovnání s ostatními testovanými supernatanty získal výrazně lepší výsledek.

Nejvyšší počet bodů získala bakterie 28. Její supernatant prokázal přítomnost biosurfaktantů ve všech metodách a ve třech provedených testech získal ve srovnání s ostatními supernatanty nadprůměrné výsledky. Bakterie tedy prokázala stabilní a spolehlivou produkci povrchově aktivních látek. Stejného počtu bodů bylo dosaženo u bakterie H24, u které byly nadprůměrné výsledky naměřeny ve čtyřech provedených testech. Bakterie H24 byla rovněž vyhodnocena jako silný producent biosurfaktantů. Ve všech metodách byly získány pozitivní výsledky také u bakterie H30. Ačkoliv bakterie ve screeningových testech nijak výrazně nevynikala, byla ověřena reprodukovatelnost produkce a lze ji tedy považovat za dobrého producenta biosurfaktantů. Reprodukovatelnost produkce byla dále potvrzena u bakterií 4a, 25, FŇ2 a F109, které v provedených testech získaly pouze jeden negativní výsledek. Nejslabšími producenty jsou s ohledem na dosažené výsledky bakterie 5 a 21.

Tabulka 15: Screening produkce BS u vybraných termofilních bakterií – celkové shrnutí výsledků.

vzorek	stanovení aktivity emulze			solubilizace antracenu			Du-Noüy-Ring		rozlévání kapky		šíření oleje		body
	1. screening	2. screening	3. screening	1. screening	2. screening	3. screening	2. screening	3. screening	2. screening	3. screening	2. screening	3. screening	
4a	1	2	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1	13
5	2	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	9
6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	2	11
8	2	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	11
21	2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	9
25	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	12
28	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	15
FŇ2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	2	1	13
H24	1	2	1	1	1	1	1	1	2	0	2	2	15
H30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	13
F108	1	0	0	0	1	1	1	2	1	1	2	2	12
F109	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	11
M3	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	11
M5	2	1	0	1	1	1	1	2	1	2	0	0	12

5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce byla analýza produkce biosurfaktantů u vybraných termofilních bakterií pomocí vhodných screeningových metod. Bakterie byly izolovány z kompostů (Brno, Blansko) a aktivovaných kalů (Bystřice pod Hostýnem, Modřice). Pro screening produkce BS byly vybrány následující metody: stanovení aktivity emulze, solubilizace krystalického antracenu, přímé měření povrchového napětí – metoda Du-Noüy-Ring, metoda rozlévání kapky a metoda rozšiřování oleje. Všechny uvedené metody jsou nenáročné na provedení a jejich výsledky jsou snadno hodnotitelné. Výsledky metod je obtížné porovnávat mezi sebou. Uvedené screeningové metody charakterizují odlišné vlastnosti biosurfaktantů, a ne všechny biosurfaktanty těmito vlastnostmi disponují (vysokomolekulární BS jsou účinnější jako stabilizátory emulzí v porovnání s BS nízkomolekulárními, které naopak lépe snižují povrchové napětí apod.).

Na začátku experimentální práce byly testovány všechny supernatanty izolovaných bakterií stanovením aktivity emulze a solubilizací krystalického antracenu. Na základě získaných výsledků bylo vybráno 14 nejatraktivnějších producentů: 4a, 5, 6, 8, 21, 25, 28, FŇ2, H24, H30, F108, F109, M3 a M5. U ostatních supernatantů nebyla přítomnost biosurfaktantů prokázána, nebo se BS v těchto supernatantech vyskytovaly jen ve velmi nízké koncentraci.

Následně proběhl podrobnější screening produkce BS u vybraných termofilních bakterií. Za tímto účelem byly využity všechny zmíněné metody. Jako nejlepší producenti biosurfaktantů, které stabilizují emulze, byly vyhodnoceny bakterie FŇ2, 4a a H24, jejichž emulgační indexy se nejvíce přiblížily emulgačnímu indexu pozitivní kontroly. Supernatant bakterie FŇ2 dokonce dokázal tuto hodnotu překonat. Supernatant bakterie 25 dokázal nejefektivněji solubilizovat krystalický antracen, ale v žádné jiné metodě výrazně nevynikl. Povrchové napětí kultivačního média pak nejvíce snížil supernatant bakterie 28. Hodnota povrchového napětí klesla pod 40 mN/m a bakterie se ukázala jako zatím nejlepší producent biosurfaktantů, které účinně snižují povrchové napětí vodných roztoků. Bakterie 28 také dosáhla nejlepšího výsledku v metodě rozlévání kapek, ve které vynikl také supernatant bakterie H24. V supernatantech těchto bakterií se tak amfifilní sloučeniny vyskytují v hojně koncentraci, a kapka se tak lépe adsorbuje na hydrofobní povrch. Nadprůměrné výsledky v metodě rozšiřování oleje získaly bakterie 4a, F108, FŇ2 a H24, jejichž čistící zóny se rychle šířily směrem ke stranám Petriho misky a šíření vedlo až k úplnému roztržení olejové skvrny.

Za nejlepší producenty biosurfaktantů byly po druhém screeningu považovány bakterie 4a, 28, FŇ2 a H24. Supernatanty bakterií 4a, 28 a H24 ve všech metodách prokázaly přítomnost BS a získaly nejvíce nadprůměrných výsledků. V metodě rozlévání kapky byl naměřený výsledek supernatantu FŇ2 shodný s výsledkem negativní kontroly, ale supernatant získal v metodě rozlévání kapky a v metodě rozšiřování oleje velmi dobré výsledky, a proto je rovněž považován za silného producenta. Ve všech metodách byly naměřeny pozitivní výsledky také u bakterií 6 a H30. Naopak nejméně pozitivních výsledků bylo dosaženo u bakterie 5. Bakterie 5 se tak po druhém screeningu nejevila jako spolehlivý producent BS.

Pro ověření reprodukovatelnosti produkce BS vybranými termofilními bakteriemi byly bakterie znovu kultivovány, a jejich supernatanty byly ještě jednou testovány všemi uvedenými metodami. Získané výsledky pak byly porovnány s výsledky 1. a 2. screeningu. Reprodukovatelnost produkce byla prokázána u sedmi bakterií (4a, 25, 28, H24, H30, FŇ2 a F109). Jako nejspolehlivější producenti biosurfaktantů byli vyhodnoceni bakterie 28, H24 a H30. Bakterie 28 byla vyhodnocena jako nejsilnější producent. Její supernatant ve všech metodách prokázal přítomnost biosurfaktantů a ve třech testech získal v porovnání s ostatními supernatanty nadprůměrné výsledky. Bakterie H24 získala jeden negativní výsledek, zároveň však prokázala poměrně silnou produkci biosurfaktantů, s ohledem na 4 nadprůměrné výsledky

v provedených metodách. Bakterie H30 svými výsledky výrazně nevynikala, ale její supernatanty uspěly ve všech screeningových metodách a je tak považována za spolehlivého producenta. Bakterie 4a a FŇ2 vykazaly v průběhu screeningů podobné výsledky. Nejspíše tak produkují biosurfaktanty, které mají podobné vlastnosti. Jako nejslabší producenti byli shledáni bakterie 5 a 21. Bakterie M5 je pravděpodobně nejvíce náchylná na změny prostředí, vzhledem ke kolísavým výsledkům screeningových metod.

V experimentální části bakalářské práce bylo manipulováno s živými termofilními mikroorganismy, které mohou být citlivé i na malé změny teplot (například v průběhu kultivace). Prostředí laboratoře je odlišné od přirozeného prostředí těchto mikroorganismů a musí tak být co nejlépe napodobeno. Z těchto důvodů bylo obtížné získat při opakované analýze stabilní výsledky testů. V supernatantech termofilních bakterií se kromě biosurfaktantů nachází také další extracelulární produkty (enzymy, organické kyseliny apod.), které mohou mít na výsledky testů vliv. Řešení nabízí extrakce biosurfaktantů organickými rozpouštědly a jejich následná analýza pomocí pokročilých analytických metod.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] HENDRY, Philip, 2006. Extremophiles: There's More to Life. *Environmental Chemistry*. 3(2), 175-243. DOI: 10.1071/ENv3n2_ES. ISSN 1448-2517. Dostupné také z: http://www.publish.csiro.au/?paper=ENv3n2_ES
- [2] SATYANARAYANA, T., RAGHUKUMAR, C., A SHIVAJI, S. ,2005. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science*, 89(1), 78-90. Retrieved March 18, 2020, from www.jstor.org/stable/24110434
- [3] RAMPELOTTO, Pabulo, 2013. Extremophiles and Extreme Environments. *Life*. 3(3), 482-485. DOI: 10.3390/life3030482. ISSN 2075-1729. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2075-1729/3/3/482>
- [4] MERINO, Nancy, Heidi S. ARONSON, Diana P. BOJANOVA, Jayme FEYHL-BUSKA, Michael L. WONG, Shu ZHANG a Donato GIOVANNELLI, 2019. Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Frontiers in Microbiology*. 10. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00780. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00780/full>
- [5] ADIGUZEL, Ahmet, Hakan OZKAN, Ozlem BARIS, Kadriye INAN, Medine GULLUCE a Fikrettin SAHIN, 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods*. (3), 321-328. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.09.026. ISSN 01677012. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701209003121>
- [6] BERGQUIST, P.L., D.R. LOV, J.E. CROFT, M.B. STREIFF, R.M. DANIEL, W.H. MORGAN a Donato GIOVANNELLI, 1987. Genetics and Potential Biotechnological Applications of Thermophilic and Extremely Thermophilic Microorganisms: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 5(1), 199-244. DOI: 10.1080/02648725.1987.10647838. ISSN 0264-8725. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02648725.1987.10647838>
- [7] AMEND, J, Energetics of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 25(2), 175-243. DOI: 10.1016/S0168-6445(00)00062-0. ISSN 01686445. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445\(00\)00062-0](http://doi.wiley.com/10.1016/S0168-6445(00)00062-0)
- [8] AGUSTINA, W, T RAHMAN, L RATNAWATI, SRIHARTI, T SALIM a I NURSYAHBANI, 2019. Potential Isolates Characterization of Thermophilic Bacteria from Hot Springs and Waste Agricultural Production in Subang District Area. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 251. DOI: 10.1088/1755-1315/251/1/012006. ISSN 1755-1315. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1755-1315/251/i=1/a=012006?key=crossref.9b925f846e3fd83a53286847268d15c2>
- [9] ROBB, Frank, Garabed ANTRANIKIAN, Dennis GROGAN a Arnold DRIESSEN, 2007. *Thermophiles: Biology and Technology at High Temperatures*. CRC Press, 368 s. ISBN 9780849392146.

- [10] ÇULHA, Mustafa, Ahmet ADIGÜZEL, M. MÜGE YAZICI, Mehmet KAHRAMAN, Fikrettin SLAHIN a Medine GÜLLÜCE, 2008. Characterization of Thermophilic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Applied Spectroscopy*. 62(11), 1226-1232. DOI: 10.1366/000370208786401545. ISSN 0003-7028. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1366/000370208786401545>
- [11] MEHTA, Ridhi, Paavan SINGHAL, Hardeep SINGH, Dhanashree DAMLE a Anil K. SHARMA, 2016. Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*. 6(1). DOI: 10.1007/s13205-016-0368-z. ISSN 2190-572X. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s13205-016-0368-z>
- [12] STERNER, Reinhard a Wolfgang LIEBL, 2008. Thermophilic Adaptation of Proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 36(1), 39-106. DOI: 10.1080/20014091074174. ISSN 1040-9238. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20014091074174>
- [13] MADIGAN, Michael T, Aharon ORENT, Hardeep SINGH, Dhanashree DAMLE a Anil K. SHARMA, 1999. Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*. 2(3), 265-269. DOI: 10.1016/S1369-5274(99)80046-0. ISSN 13695274. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527499800460>
- [14] ELLEUCHE, Skander, Christian SCHÄFERS, Saskia BLANK, Carola SCHRÖDER a Garabed ANTRANIKIAN, 2015. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology*. 25(1), 113-119. DOI: 10.1016/j.mib.2015.05.011. ISSN 13695274. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527415000624>
- [15] RYCKEBOER, J., J. MERGAERT, K. VAES, S. KLAMMER, D. DECLERCQ, J. COOSEMANS, H. INSAM a J. SWINGS, 2007. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Waste Management Series*. 349-410.
- [16] SAUNDERS, Aaron M, Mads ALBERTSEN, Jes VOLLERTSEN a Per H NIELSEN, 2016. The activated sludge ecosystem contains a core community of abundant organisms: Theory, Control Measures, Practical Experiences. *The ISME Journal*. 10(1), 11-20. DOI: 10.1038/ismej.2015.117. ISSN 1751-7362. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/ismej2015117>
- [17] TANDOI, V., D. JENKINS a J. WANNER, 2005. Activated Sludge Separation Problems: Theory, Control Measures, Practical Experiences. *Water Intelligence Online*. 4, 9781780403069-9781780403069. DOI: 10.2166/9781780403069. ISSN 1476-1777. Dostupné také z: <https://iwaponline.com/ebooks/book/161/>
- [18] SONG, Yu-Dong, Hong-Ying HU, Jes VOLLERTSEN a Per H NIELSEN, 2006. Isolation and characterization of thermophilic bacteria capable of lysing microbial cells in activated sludge: Theory, Control Measures, Practical Experiences. *Water Science and Technology*. 54(9), 35-43. DOI: 10.2166/wst.2006.874. ISSN 0273-1223. Dostupné také z: <https://iwaponline.com/wst/article/54/9/35/13025/Isolation-and-characterization-of-thermophilic>

- [19] BALKU, saziye, Hong-Ying HU, Jes VOLLERTSEN a Per H NIELSEN, 2006. Influence of Temperature on Activated Sludge Systems: Theory, Control Measures, Practical Experiences. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*. 54(9), 77-80. DOI: 10.18466/cbayarfbe.357348. ISSN 1305-130X. Dostupné také z: <http://dergipark.gov.tr/doi/10.18466/cbayarfbe.357348>
- [20] PŁAZA, Grażyna A., Ireneusz ZJAWIONY a Ibrahim M. BANAT, 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 50(1), 71-77. DOI: 10.1016/j.petrol.2005.10.005. ISSN 09204105. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920410505001646>
- [21] SAŁEK, Karina, Tony GUTIERREZ, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO, 2016. Surface-active biopolymers from marine bacteria for potential biotechnological applications: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *AIMS Microbiology*. 2(2), 92-107. DOI: 10.3934/microbiol.2016.2.92. ISSN 2471-1888. Dostupné také z: <http://www.aimspress.com/article/10.3934/microbiol.2016.2.92>
- [22] MUTHUSAMY, Krishnaswamy, Subbuchettiar GOPALAKRISHNAN, Thiengungal kochupappy RAVI a Panchaksharam SIVACHIDAMBARAM, 2008. Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Current Science* (00113891) [online]. 94(6), 736-747 [cit. 2019-04-14]. ISSN 00113891.
- [23] BANAT, Ibrahim M. a Rengathavasi THAVASI, [2019]. *Microbial biosurfactants and their environmental and industrial applications*. Boca Raton, FL. ISBN 978-1-138-19795-4.
- [24] SANTOS, Danyelle, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO, 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(3). DOI: 10.3390/ijms17030401. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/17/3/401>
- [25] SILVA, Rita, Darne ALMEIDA, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO, 2016. Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(7), 12523-12542. DOI: 10.3390/ijms150712523. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/7/12523>
- [26] DESAI, J D, I M BANAT a G DAVE, 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 61(1), 47-64. DOI: 10.1128/.61.1.47-64.1997. ISSN 1092-2172. Dostupné také z: <https://asm.org/content/61/1/47>
- [27] MNIF, Inès, Semia ELLOUZ-CHAABOUNI a Dhouha GHRIBI, 2018. Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. *Journal of Polymers and the Environment*. 26(5), 2192-2206. DOI: 10.1007/s10924-017-1076-4. ISSN 1566-2543. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10924-017-1076-4>

- [28] GEYS, Robin, Wim SOETAERT, Inge VAN BOGAERT a Rosário OLIVEIRA, 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant production: glycolipids, lipopeptides and proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 30(3), 66-72. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.002. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166914001049>
- [29] GOMILA, Margarita, Arantxa PEÑA, Magdalena MULET, Jorge LALUCAT, Elena GARCÍA-VALDÉS, J. DE BLOCK a M. HEYNDRICKX, 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. 6(2), 239-272. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00214. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: http://www.frontiersin.org/Evolutionary_and_Genomic_Microbiology/10.3389/fmicb.2015.00214/abstract
- [30] PENFOLD, Jeffrey, Robert K THOMAS a Hsin-Hui SHEN, 2012. Adsorption and self-assembly of biosurfactants studied by neutron reflectivity and small angle neutron scattering: glycolipids, lipopeptides and proteins. *Soft Matter*. 8(3), 578-591. DOI: 10.1039/C1SM06304A. ISSN 1744-683X. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C1SM06304A>
- [31] LOVAGLIO, R.B., V.L. SILVA, H. FERREIRA, R. HAUSMANN a J. CONTIERO. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. *Biotechnology Advances*. 2015, 33(8), 1715-1726. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.09.002. ISSN 07349750. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975015300343>
- [32] ABDEL-MAWGOUD, Ahmad Mohammad, François LÉPINE, Eric DÉZIEL, M.B. STREIFF, R.M. DANIEL, W.H. MORGAN a Donato GIOVANNELLI, 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86(5), 1323-1336. DOI: 10.1007/s00253-010-2498-2. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2498-2>
- [33] WHITE, D.A., L.C. HIRD, S.T. ALI, R. HAUSMANN a J. CONTIERO. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026: Looking for strategies for its industrial dissemination. *Journal of Applied Microbiology*. 2013, 115(3), 744-755. DOI: 10.1111/jam.12287. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12287>
- [34] CLEMENTS, T., T. NDLOVU, S. KHAN, W. KHAN, Wim SOETAERT a Erick J. VANDAMME, 2019. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(2), 589-602. DOI: 10.1007/s00253-018-9520-5. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-9520-5>
- [35] MNIF, Inès, Dhouha GHRIBI, Raquel RUFINO, Juliana LUNA, Valdemir SANTOS a Leonie SARUBBO. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers*. 2015, 104(3), 129-147. DOI: 10.1002/bip.22630. ISSN 00063525. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.22630>

- [36] SAJNA, Kuttuvan Valappil, Rainer HÖFER, Rajeev K. SUKUMARAN, Lalitha Devi GOTTUMUKKALA, Ashok PANDEY a Leonie SARUBBO. White Biotechnology in Biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers*. Elsevier, 2015, 104(3), 499-521. DOI: 10.1016/B978-0-444-63453-5.00016-1. ISBN 9780444634535. ISSN 00063525. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444634535000161>
- [37] VARJANI, Sunita J., Rainer HÖFER, Rajeev K. SUKUMARAN, Lalitha Devi GOTTUMUKKALA, Ashok PANDEY a Leonie SARUBBO. Biosurfactants in Microbial Enhanced Oil Recovery: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-04-22, 104(3), 369-379. DOI: 10.1007/978-3-319-49197-4_23. ISBN 978-3-319-49195-0. ISSN 00063525. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-49197-4_23
- [38] CHEN, Wei-Chuan, Ruey-Shin JUANG, Yu-Hong WEI, R. HAUSMANN a J. CONTIERO. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms: Looking for strategies for its industrial dissemination. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, 103(3), 158-169. DOI: 10.1016/j.bej.2015.07.009. ISSN 1369703X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X15300188>
- [39] SHEKHAR, Sudhanshu, Arumugam SUNDARAMANICKAM a Tangavel BALASUBRAMANIAN, 2014. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 45(14), 1522-1554. DOI: 10.1080/10643389.2014.955631. ISSN 1064-3389. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10643389.2014.955631>
- [40] MCCLEMENTS, David Julian a Cansu Ekin GUMUS, 2016. Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*. 234, 3-26. DOI: 10.1016/j.cis.2016.03.002. ISSN 00018686. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868616300380>
- [41] ACAR, Niyazi, Olivier BERDEAUX, Stéphane GRÉGOIRE, et al., 2012. Lipid Composition of the Human Eye: Are Red Blood Cells a Good Mirror of Retinal and Optic Nerve Fatty Acids? *PLoS ONE*. 7(4). DOI: 10.1371/journal.pone.0035102. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035102>
- [42] GAUTAM, K.K. a V.K. TYAGI, 2006. Microbial Surfactants: A Review. *Journal of Oleo Science*. 55(4), 155-166. DOI: 10.5650/jos.55.155. ISSN 1345-8957. Dostupné také z: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/55/4/55_4_155/_article
- [43] AMANI, Hossein, Hasan KARIMINEZHAD, D. SOLAIMAN a D.L. KAPLAN, 2016. Study on emulsification of crude oil in water using emulsan biosurfactant for pipeline transportation: A Review. *Journal of Applied Microbiology*. 34(3), 216-222. DOI: 10.1080/10916466.2015.1118500. ISSN 1091-6466. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10916466.2015.1118500>

- [44] PANILAITIS, B., G.R. CASTRO, D. SOLAIMAN a D.L. KAPLAN, 2007. Biosynthesis of emulsan biopolymers from agro-based feedstocks: A Review. *Journal of Applied Microbiology*. 102(2), 612-625. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03078.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2006.03078.x>
- [45] DESAI, J D, I M BANAT, Eric DÉZIEL, M.B. STREIFF, R.M. DANIEL, W.H. MORGAN a Donato GIOVANNELLI, 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential: diversity of structures, microbial origins and roles. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*. 61(1), 47-64. DOI: 10.1128/61.1.47-64.1997. ISSN 1092-2172. Dostupné také z: <https://asm.org/content/61/1/47>
- [46] VIJAYAKUMA, S. a V. SARAVANAN, 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*. 10(5), 181-192. DOI: 10.3923/jm.2015.181.192. ISSN 18164935. Dostupné také z: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jm.2015.181.192>
- [47] DE, Sourav, Susanta MALIK, Aniruddha GHOSH, Rumpa SAHA, Bidyut SAHA, Vijaya ramu DIRISALA a Vidya Prabhakar KODALI, 2015. A review on natural surfactants: A Review. *RSC Advances. InTech*, 1994, 5(81), 65757-65767. DOI: 10.1039/C5RA11101C. ISBN 978-953-51-2165-7. ISSN 2046-2069. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA11101C>
- [48] PETTERSSON, A, M ADAMSSON a G DAVE, 2000. Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. *Chemosphere*. 41(10), 1611-1620. DOI: 10.1016/S0045-6535(00)00035-7. ISSN 00456535. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653500000357>
- [49] BANAT, Ibrahim M., Andrea FRANZETTI, Isabella GANDOLFI, Giuseppina BESTETTI, Maria G. MARTINOTTI, Letizia FRACCHIA, Thomas J. SMYTH a Roger MARCHANT, 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87(2), 427-444. DOI: 10.1007/s00253-010-2589-0. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2589-0>
- [50] NDLOVU, Thando, Marina RAUTENBACH, Johann Arnold VOSLOO, Sehaam KHAN a Wesaal KHAN, 2017. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*. 7(1). DOI: 10.1186/s13568-017-0363-8. ISSN 2191-0855. Dostupné také z: <http://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-017-0363-8>
- [51] ATWA, NagwaA, 2015. Physiological studies on a locally isolated rhamnolipid producer, *Pseudomonas* strain. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 14(2). DOI: 10.4103/1687-4315.161283. ISSN 1687-4315. Dostupné také z: <http://www.epj.eg.net/text.asp?2015/14/2/109/161283>
- [52] WALTER, Vanessa, Christoph SYLDATK a Rudolf HAUSMANN, 2010. Screening Concepts for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. *Biosurfactants*. New York, NY: Springer New York, 2010, 1-13. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_1. ISBN 978-1-4419-5978-2. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-5979-9_1

- [53] GONCALVES, Alem-Mar B., Welica P. S. FREITAS, Diogo D. REIS, Cicero R. CENA, Diego C. B. ALVES a Doroteia F. BOZANO, 2019. Surface Tension Measured with Arduino. *The Physics Teacher*. 57(9), 640-641. DOI: 10.1119/1.5135800. ISSN 0031-921X. Dostupné také z: <http://aapt.scitation.org/doi/10.1119/1.5135800>
- [54] ERFANI, Amir, Shahin KHOSHARAY, Clint P. AICHELE, Cicero R. CENA, Diego C. B. ALVES a Doroteia F. BOZANO, 2019. Surface tension and interfacial compositions of binary glycerol/alcohol mixtures. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 135(9), 241-251. DOI: 10.1016/j.jct.2019.03.014. ISSN 00219614. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021961418300740>
- [55] SATPUTE, Surekha K., Arun G. BANPURKAR, Prashant K. DHAKEPHALKAR, Ibrahim M. BANAT, Balu A. CHOPADE a Doroteia F. BOZANO, 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 30(2), 127-144. DOI: 10.3109/07388550903427280. ISSN 0738-8551. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388550903427280>
- [56] ABOUSEOUD, M., R. MAACHI, A. AMRANE, S. BOUDERGUA, A. NABI a Doroteia F. BOZANO, 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*: a review. *Desalination*. 223(1-3), 143-151. DOI: 10.1016/j.desal.2007.01.198. ISSN 00119164. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011916407008478>
- [57] MORIKAWA, Masaaki, Yoshihiko HIRATA a Tadayuki IMANAKA, 2000. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1488(3), 211-218. DOI: 10.1016/S1388-1981(00)00124-4. ISSN 13881981. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198100001244>
- [58] SANTOS, B. F. dos, A. P. R. SIMIQUELI, A. N. PONEZI, G. M. PASTORE a A. M. F. FILETI, 2018. Monitoring of biosurfactant production of *Bacillus subtilis* using beet peel as culture medium via the development of a neural soft-sensor in an electronic spreadsheet. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 35(4), 1355-1367. DOI: 10.1590/0104-6632.20180354s20160664. ISSN 1678-4383. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2802-1>
- [59] CAMEOTRA, Swaranjit Singh, Randhir S. MAKKAR, Jasmininder KAUR a S. K. MEHTA, *Synthesis of Biosurfactants and Their Advantages to Microorganisms and Mankind. Biosurfactants*. New York, NY: Springer New York, 2010, 261-280. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_20. ISBN 978-1-4419-5978-2. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-5979-9_20
- [60] CHEN, Gang, Mingqi QIAO, Huiyun ZHANG a Honglong ZHU, 2004. Bacterial desorption in water-saturated porous media in the presence of rhamnolipid biosurfactant. *Research in Microbiology*. New York, NY: Springer New York, 2010, 155(8), 655-661. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.05.001. ISBN 978-1-4419-5978-2. ISSN 09232508. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250804001263>

- [61] PUCHKOV, Evgeny O, Ulrich ZÄHRINGER, Buko LINDNER, Tatiana V KULAKOVSKAYA, Ulrich SEYDEL a Andre WIESE, 2002. The mycocidal, membrane-active complex of *Cryptococcus humicola* is a new type of cellobiose lipid with detergent features. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. New York, NY: Springer New York, 2010, 1558(2), 161-170. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1016/S0005-2736(01)00428-X. ISBN 978-1-4419-5978-2. ISSN 00052736. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000527360100428X>
- [62] DE SOUZA, J. T., M. DE BOER, P. DE WAARD, T. A. VAN BEEK, J. M. RAAIJMAKERS a Andre WIESE, 2003. Biochemical, Genetic, and Zoosporicidal Properties of Cyclic Lipopeptide Surfactants Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. New York, NY: Springer New York, 2010, 69(12), 7161-7172. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. DOI: 10.1128/AEM.69.12.7161-7172.2003. ISBN 978-1-4419-5978-2. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.12.7161-7172.2003>
- [63] CAMEOTRA, S. S. a R. S. MAKKAR, 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50(5), 520-529. DOI: 10.1007/s002530051329. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051329>
- [64] ESWARI, Jujjavarapu Satya, Swasti DHAGAT a Ramkrishna SEN, 2019. Biosurfactants, Bioemulsifiers, and Biopolymers from Thermophilic Microorganisms. *Thermophiles for Biotech Industry*. Singapore: Springer Singapore, 2019-11-15, 87-97. DOI: 10.1007/978-981-32-9919-1_5. ISBN 978-981-32-9918-4. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-981-32-9919-1_5
- [65] GOMILA, Margarita, Arantxa PEÑA, Magdalena MULET, Jorge LALUCAT, Elena GARCÍA-VALDÉS, J. DE BLOCK a M. HEYNDRIKX, 2015. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*. 6(2), 239-272. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00214. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: http://www.frontiersin.org/Evolutionary_and_Genomic_Microbiology/10.3389/fmicb.2015.00214/abstract
- [66] LOGAN, N.A., 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*. 112(3), 417-429. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x. ISSN 13645072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2011.05204.x>
- [67] BARON, Samuel, 1996. *Medical Microbiology*. 4th ed. Texas: University of Texas Medical Branch. ISBN 0963117211.
- [68] AL-SULAIMANI, Hanaa, Yahya AL-WAHAIBI, Saif AL-BAHRY, Abdulkadir ELSHAFIE, Ali AL-BEMANI, Sanket JOSHI a Said ZARGARI, 2013. Optimization and Partial Characterization of Biosurfactants Produced by *Bacillus* Species and Their Potential for Ex-Situ Enhanced Oil Recovery. *SPE Journal*. 16(03), 672-682. DOI: 10.2118/129228-PA. ISSN 1086-055X. Dostupné také z: <http://www.onepetro.org/doi/10.2118/129228-PA>
- [69] ALI, Nawazish, Fenghuan WANG, Baocai XU, Bushra SAFDAR, Asad ULLAH, Muhammad NAVEED, Ce WANG a Muhammad Tayyab RASHID, 2019. Production and Application of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* Ali5 in Enhanced Oil

Recovery and Motor Oil Removal from Contaminated Sand. *Molecules*. 24(24), 672-682. DOI: 10.3390/molecules24244448. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/24/4448>

- [70] GUDIÑA, Eduardo J., Elisabete C. FERNANDES, Ana I. RODRIGUES, José A. TEIXEIRA, Lúcia R. RODRIGUES, Muhammad NAVEED, Ce WANG a Muhammad Tayyab RASHID, 2015. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*. 6(24), 672-682. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00059. ISSN 1664-302X. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00059/abstract>
- [71] STUDHOLME, David J., 2015. Some (bacilli) like it hot: genomics of *G. eobacillus* species. *Microbial Biotechnology*. 8(1), 40-48. DOI: 10.1111/1751-7915.12161. ISSN 17517915. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12161>
- [72] HUSSEIN, Ali H., Beata K. LISOWSKA a David J. LEAK, 2015. The Genus *Geobacillus* and Their Biotechnological Potential. Elsevier, 2015, 1-48. *Advances in Applied Microbiology*. DOI: 10.1016/bs.aambs.2015.03.001. ISBN 9780128022498. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216415000064>
- [73] ZEIGLER, Daniel R., Beata K. LISOWSKA a David J. LEAK, 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology*. Elsevier, 2015, 160(1), 1-11. *Advances in Applied Microbiology*. DOI: 10.1099/mic.0.071696-0. ISBN 9780128022498. ISSN 1350-0872. Dostupné také z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.071696-0>
- [74] ZHOU, Jie-fang, Guo-qiang LI, Jun-jie XIE, et al., 2016. A novel bioemulsifier from *Geobacillus stearothermophilus* A-2 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. *RSC Advances*. 6(98), 96347-96354. DOI: 10.1039/C6RA15626F. ISSN 2046-2069. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA15626F>
- [75] SHARP, Richard a Ralph WILLIAMS, 1995. *Thermus Species*. New York: Springer. ISBN 9781461518310.
- [76] PANTAZAKI, Anastasia A., Maria I. DIMOPOULOU, Olga M. SIMOU a Agathi A. PRITSA, 2010. Sunflower seed oil and oleic acid utilization for the production of rhamnolipids by *Thermus thermophilus* HB8. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 88, 939-951. DOI: 10.1007/s00253-010-2802-1. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-010-2802-1>
- [77] VARJANI, Sunita J., François LÉPINE a Eric DÉZIEL, 2010. Biosurfactants in Microbial Enhanced Oil Recovery: diversity of structures, microbial origins and roles. *Modern Tools and Techniques to Understand Microbes*. Cham: Springer International Publishing, 2017-04-22, 86(5), 369-379. DOI: 10.1007/978-3-319-49197-4_23. ISBN 978-3-319-49195-0. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-49197-4_23
- [78] S.J., Geetha, Ibrahim M. BANAT a Sanket J. JOSHI, 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Cham: Springer International Publishing, 2017-04-22, 14(5),

- 23-32. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.01.010. ISBN 978-3-319-49195-0. ISSN 18788181. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878818117306618>
- [79] SAFDEL, Milad, Mohammad Amin ANBAZ, Amin DARYASAFAR a Mohammad JAMIALAHMADI, 2017. Microbial enhanced oil recovery, a critical review on worldwide implemented field trials in different countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 74, 159-172. DOI: 10.1016/j.rser.2017.02.045. ISSN 13640321. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032117302575>
- [80] MUJUMDAR, Shilpa, Prachi JOSHI, Neha KARVE a Mohammad JAMIALAHMADI, 2019. Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp: A review. *Journal of Basic Microbiology*. 59(3), 277-287. DOI: 10.1002/jobm.201800364. ISSN 0233111X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201800364>
- [81] SÁENZ-MARTA, Claudia Isabel, María de Lourdes BALLINAS-CASARRUBIAS, Blanca E. RIVERA-CHAVIRA a Guadalupe Virginia NEVÁREZ-MOORILLÓN, 2015. Biosurfactants as Useful Tools in Bioremediation: A Review. *Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil*. InTech, 2015-09-09, 45(14), 1522-1554. DOI: 10.5772/60751. ISBN 978-953-51-2165-7. ISSN 1064-3389. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-bioremediation-of-wastewater-and-polluted-soil/biosurfactants-as-useful-tools-in-bioremediation>
- [82] NITSCHKE, Marcia, Sumária Sousa e SILVA, Neha KARVE a Mohammad JAMIALAHMADI, 2017. Recent food applications of microbial surfactants: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58(4), 631-638. DOI: 10.1080/10408398.2016.1208635. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2016.1208635>
- [83] KARLAPUDI, Abraham Peele, T.C. VENKATESWARULU, Jahnvi TAMMINEEDI, Lohit KANUMURI, Bharath Kumar RAVURU, Vijaya ramu DIRISALA a Vidya Prabhakar KODALI, 2018. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review: A Review. *Petroleum. InTech*, 2015-09-09, 4(3), 241-249. DOI: 10.1016/j.petlm.2018.03.007. ISBN 978-953-51-2165-7. ISSN 24056561. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405656117301530>
- [84] FLEMMING, Hans-Curt, Jost WINGENDER, Ulrich SZEWZYK, Peter STEINBERG, Scott A. RICE a Staffan KJELLEBERG, 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14(9), 563-575. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94. ISSN 1740-1526. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.94>
- [85] RODRIGUES, Lúgia, Ibrahim M. BANAT, José TEIXEIRA, Rosário OLIVEIRA, Bharath Kumar RAVURU, Vijaya ramu DIRISALA a Vidya Prabhakar KODALI, 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. InTech, 2015-09-09, 57(4), 609-618. DOI: 10.1093/jac/dkl024. ISBN 978-953-51-2165-7. ISSN 1460-2091. Dostupné také z: <http://academic.oup.com/jac/article/57/4/609/669417/Biosurfactants-potential-applications-in-medicine>

- [86] INÈS, Mnif, Ghribi DHOUBA, Ivanka KARADZIC, Rosário OLIVEIRA, Bharath Kumar RAVURU, Vijaya ramu DIRISALA a Vidya Prabhakar KODALI, 2015. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. Carbohydrate Research. InTech, 1994, 416(3), 59-69. DOI: 10.1016/j.carres.2015.07.016. ISBN 978-953-51-2165-7. ISSN 00086215. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621515002207>
- [87] VARJANI, Sunita J., Vivek N. UPASANI, Aniruddha GHOSH, Rumpa SAHA, Bidyut SAHA, Vijaya ramu DIRISALA a Vidya Prabhakar KODALI, 2017. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant: A Review. Bioresource Technology. InTech, 1994, 232(81), 389-397. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.047. ISBN 978-953-51-2165-7. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417301645>
- [88] YI, Gawon, Jihwan SON, Jihye YOO, Changhee PARK, Heebeom KOO, Vijaya ramu DIRISALA a Vidya Prabhakar KODALI, 2019. Emulsan-based nanoparticles for in vivo drug delivery to tumors: A Review. Biochemical and Biophysical Research Communications. InTech, 1994, 508(1), 326-331. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.106. ISBN 978-953-51-2165-7. ISSN 0006291X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X18325324>
- [89] SCHULTZ, Júnia a Alexandre Soares ROSADO, 2020. Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. Extremophiles. 24(2), 189-206. DOI: 10.1007/s00792-019-01151-2. ISSN 1431-0651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-019-01151-2>
- [90] ŘEZANKA, Tomáš, Lucie SIRISTOVA a Karel SIGLER, 2011. Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species Thermus and Meiothermus. Extremophiles. 15(6), 697-709. DOI: 10.1007/s00792-011-0400-5. ISSN 1431-0651. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00792-011-0400-5>
- [91] EBRAHIMI, Somayeh, Hasan KHAJEH, Kambiz NOGHABI, Maryam TAJABADI a Abdeltif AMRANE. 2019. Production and Characterization of Biosurfactants Using Bacteria Isolated from Acidic Hot Springs. Applied Food Biotechnology. 6, 127-138. DOI: 10.22037/afb.v6i2.23663. ISSN 2423-4214. Dostupné také z: <http://journals.sbm.ac.ir/afb/article/view/23663>
- [92] MEHETRE, Gajanan T., Syed G. DASTAGER a Mahesh S. DHARNE, 2019. Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by pure and mixed cultures of biosurfactant producing thermophilic and thermo-tolerant bacteria. Science of The Total Environment. 679, 52-60. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.04.376. ISSN 00489697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969719319217>
- [93] DAS, Kishore, Ashis K. MUKHERJEE a Dhouha GHRIBI, 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresource Technology. 98(7), 1339-1345. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.05.032. ISSN 09608524. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852406002446>
- [94] COOPER, D. G. Biosurfactants. Microbiological Sciences. 1986, 3(5), 145-149.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ANT	solubilizace krystalického antracenu
APG	alkylpolyglukosid
BS	biosurfaktant
CMC	kritická koncentrace micel
CSL	„corn steep liquor“
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid-agarový test
DNR	Du-Noüy-Ring
E ₂₄	emugační index
EA	stanovení emulgační aktivity
<i>F</i>	síla
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GLU	glukóza
GLY	glycerol
<i>h_{emulze}</i>	výška emulgované vrstvy
<i>h_{směsi}</i>	celková výška směsi
LS-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií
MEL	manosylerythritol lipidy
MEOR	„microbial enhanced oil recovery“
MRK	metoda rozlévání kapky
MRO	metoda rozšiřování oleje
NK	negativní kontrola
OECD	organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PK	pozitivní kontrola
<i>R</i>	průměrná hodnota poloměrů r_a a r_b

r_a	vnější poloměr prstence
r_b	vnitřní poloměr prstence
TES II	roztok stopových prvků
W	celková váha prstence
γ	povrchové napětí