

Studium produkce přírodního barviva kulturou rodu *Micrococcus*

Milan Pekárek

Bakalářská práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Milan Pekárek**

Osobní číslo: **T17989**

Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium produkce přírodního barviva kulturou rodu *Micrococcus***

Zásady pro vypracování:

- 1. Prostudujte literární zdroje s tematikou tvorby barviv bakteriemi rodu *Micrococcus*, případně příbuznými rody bakterií.**
- 2. Provedte experimenty tvorby barviva (exopigmentu) vybranou kulturou bakterií.**
- 3. Získané výsledky přehledně zpracujte a práci odevzdejte v předepsaném termínu.**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] Lu L. et al., 2002. Isolation and identification of *Streptomyces* sp and assay of its exocellular water-soluble blue pigments. *Folia Microbiologica. Web of Science*, 47(5), 493-498.

[2] Rao M.P.N et al., 2017. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Frontiers in Microbiology. Web of Science*, 8(June), 1-13.

[3] Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect a Medline.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

1. února 2019

Termín odevzdání bakalářské práce:

17. května 2019

Ve Zlíně dne 1. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odporčí-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělků jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlíží k výši výdělků dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá zkoumáním vlivu vnějších faktorů na produkci modrého pigmentu kulturou *Micrococcus lylae* CCM 4431. Pigmentu byl dán pracovní název lylein. Byl zjišťován charakter lyleinu při růstu kultury na pevném a v tekutém médiu, význam glukosy v živném médiu, produkce lyleinu v závislosti na době kultivace, dále byly otestovány kultivační teploty pro produkci lyleinu, ověřena linearita spektrofotometrického stanovení lyleinu, ověřena možnost zjednodušení přípravy TYA agaru s glukosou, ověřena tvorba lyleinu při kultivaci na minerálních a obohacených agarech a ověřen růst kultury na TYA agaru s glukosou v závislosti na pH.

Bylo prokázáno, že *Micrococcus lylae* CCM 4431 produkuje výrazné množství pigmentu na pevném TYA agaru s glukosou. Dále lze tvrdit, že k největší produkci pigmentu dochází na TYA agaru s glukosou při kultivační teplotě 30 °C. Pigment dosahuje maximálních hodnot absorbance v rozmezí vlnové délky 601 nm až 605 nm, přičemž je závislost absorbance na koncentraci téměř lineární při hodnotách absorbancí do 0,6. Dále z pokusů vyplynulo, že vyšší produkce pigmentu nastává u klasického způsobu přípravy živného agaru, tedy s přidavkem glukosy až po sterilizaci TYA agaru. Bylo také zjištěno, že nejvyšší produkce pigmentu se u minerálních agarů projevila na minerálním agaru s glukosou, tryptonem a vitamíny a bylo prokázáno, že trypton má zásadní význam pro tvorbu lyleinu. Také bylo zjištěno, že nejvyšší produkce pigmentu byla na miskách při pH 7,2 a 9,2 a krátkodobě i při pH 10,2; v alkalické oblasti pH však pigment po delší době kultivace degradoval.

Klíčová slova: *Micrococcus lylae*, pigment, produkce, trypton

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the investigation of the influence of different factors on violet pigment production in the strain *Micrococcus lylae* CCM 4431. The pigment was designated lylein and the work consisted of several experimental series: lylein characterization after strain growth on solid and in liquid media, determination of glucose important cein nutrient medium, production of lylein in dependency on cultivation time, testing of cultivation temperatures for lylein production, verification of linearity of lylein spectrophotometric determination, possibility of simplification of preparation of TYA agar with glucose, verification of lylein production during the growth on mineral and enriched agars and exploration of lylein formation at different pH levels.

Micrococcus lylae CCM 4431 has been shown to produce a significant amount of pigment on solid glucose-enriched TYA agar. Furthermore, it can be argued that the greatest pigment production was recorded on TYA glucose agar at a temperature of 30 °C. Obtained pigment achieved maximum absorbance at the wavelength from 601 nm to 605 nm, with the absorbance-to-concentration dependence nearly linear at absorbance values of up to 0.6. Further, it was shown that higher pigment production occurred if glucose was added after sterilization of TYA agar. Also it was found that mineral agar with glucose, tryptone, and vitamins was the best medium for pigment production, and tryptone was shown to be essential for lylein formation. It was also found that the highest pigment production was ensured at pH 7.2 and 9.2, and, briefly at pH 10.2; however, at the alkaline pH range, the pigment has degraded for a prolonged period of time.

Keywords: *Micrococcus lylae*, pigment, production, tryptone

Poděkování:

Rád bych na tomto místě především poděkoval panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, PhD. za jeho ochotu, odbornou pomoc, trpělivost a cenné rady. Dále bych rád poděkoval laborantkám mikrobiologie za ochotu a pomoc při praktické části bakalářské práce na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické ve Zlíně. V neposlední řadě také mé poděkování patří Bc. Marice Lhotské za cenné rady při zpracování bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	12
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 VÝZKUM PIGMENTŮ	14
2 PIGMENTY	15
2.1 OBCHODNÍ TRENDY	16
3 BAKTERIÁLNÍ PIGMENTY A BARVIVA.....	17
3.1.1 Produkce bakteriálních pigmentů a barviv.....	17
4 BAKTERIE TVOŘÍCÍ PIGMENTY A BARVIVA.....	19
4.1 NEJZNÁMĚJŠÍ BAKTERIE PRODUKUJÍCÍ PIGMENTY	22
4.1.1 <i>Sarcina</i>	22
4.1.2 <i>Micrococcus</i>	22
4.1.3 <i>Chromobacterium violaceum</i>	22
5 ROZDĚLENÍ A VYUŽITÍ BAKTERIÁLNÍCH PIGMENTŮ	23
5.1 TYPY PIGMENTŮ	23
5.1.1 Karotenoidy	23
5.1.2 Melaniny	24
5.1.3 Prodigiosin	24
5.1.4 Violacein	25
5.1.5 Riboflavin.....	25
5.1.6 Pyocyanin.....	25
5.2 APLIKACE PIGMENTŮ	26
5.2.1 Pigmenty v textilním průmyslu	26
5.2.2 Antimikrobiální činidla.....	26
5.2.3 Potravinářská barviva	27
5.2.4 Antioxidanty.....	27
5.2.5 Protinádorové látky.....	27
5.2.6 Bioindikátory.....	27
5.2.7 Chemická modifikace bakteriálních pigmentů.....	27
6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI PIGMENTŮ.....	28
6.1 TEPLOTA.....	28
6.2 PH.....	28
6.3 INKUBAČNÍ DOBA	28
6.4 ZDROJ UHLÍKU	28
6.5 ZDROJ DUSÍKU.....	29
7 ROD <i>MICROCOCCUS</i>	30
8 JINÉ BAKTERIE TVOŘÍCÍ MODRÝ A FIALOVÝ PIGMENT	31
8.1 <i>STREPTOMYCES</i> SP.	31
8.2 <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i>	32
9 KULTURA CCM 4431 A JEJÍ PŮVOD	34

II PRAKTICKÁ ČÁST	35
10 CÍL PRÁCE.....	36
11 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE.....	37
11.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	37
11.1.1 Kultivační média	37
11.1.2 Přístrojové vybavení	39
11.2 ZJIŠTĚNÍ CHARAKTERU LYLEINU PŘI RŮSTU KULTURY NA AGAROVÉM A V TEKUTÉM MÉDIU	39
11.3 ZJIŠTĚNÍ VÝZNAMU GLUKOSY V ŽIVNÉM MÉDIU	40
11.4 ZJIŠTĚNÍ PRODUKCE LYLEINU V PRŮBĚHU KULTIVACE	40
11.5 OVĚŘENÍ KULTIVAČNÍCH TEPLŮ PRO PRODUKCI LYLEINU	41
11.6 OVĚŘENÍ LINEARITY SPEKTRFOTOMETRICKÉHO STANOVENÍ LYLEINU	41
11.7 OVĚŘENÍ MOŽNOSTI ZJEDNODUŠENÉ PŘÍPRAVY TYA AGARU S GLUKOSOU	42
11.8 OVĚŘENÍ TVORBY LYLEINU PŘI KULTIVACI NA MINERÁLNÍCH A OBOHACENÝCH AGARECH	43
11.9 OVĚŘENÍ RŮSTU KULTURY A TVORBY LYLEINU PŘI KULTIVACI NA TYA AGARECH S GLUKOSOU V ROZPĚTÍ PH 5-10	44
12 VÝSLEDKY A DISKUZE	46
12.1 ZJIŠTĚNÍ CHARAKTERU LYLEINU PŘI RŮSTU KULTURY NA AGAROVÉM A V TEKUTÉM MÉDIU	46
12.1.1 Charakter pigmentu po 3 dnech růstu kultury na agarovém a v tekutém médiu	47
12.1.2 Charakter pigmentu po 5 dnech růstu kultury na agarovém a v tekutém médiu	49
12.2 ZJIŠTĚNÍ VÝZNAMU GLUKOSY V ŽIVNÉM MÉDIU	50
12.2.1 Vyhodnocení po 2 dnech kultivace	51
12.2.2 Vyhodnocení po 3 dnech kultivace	52
12.2.3 Vyhodnocení po 4 dnech kultivace	53
12.2.4 Vyhodnocení po 7 dnech kultivace	54
12.3 ZJIŠTĚNÍ PRODUKCE LYLEINU V PRŮBĚHU KULTIVACE	56
12.4 OVĚŘENÍ KULTIVAČNÍCH TEPLŮ PRO PRODUKCI LYLEINU	59
12.5 OVĚŘENÍ LINEARITY SPEKTRFOTOMETRICKÉHO STANOVENÍ PIGMENTU	61
12.6 OVĚŘENÍ MOŽNOSTI ZJEDNODUŠENÉ PŘÍPRAVY ŽIVNÉHO AGARU	62
12.6.1 Vyhodnocení přípravy TG agaru klasickým způsobem	63
12.6.2 Vyhodnocení přípravy agaru zjednodušeným způsobem	64
12.7 OVĚŘENÍ TVORBY LYLEINU PŘI KULTIVACI NA MINERÁLNÍCH A OBOHACENÝCH MÉDIÍCH.....	65
12.8 OVĚŘENÍ RŮSTU KULTURY A TVORBY LYLEINU PŘI KULTIVACI NA TYA AGARECH S GLUKOSOU V ZÁVISLOSTI NA PH	68
ZÁVĚR	73
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	75

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	83
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	84
SEZNAM TABULEK	86

ÚVOD

Barvy nás obklopují všude kolem nás, v dávné historii se jednalo především o přírodní barviva. První zmínky o používání indiga pochází ze starověké Číny, kde jej používali k výrobě oděvů. Také v Egyptě bylo barvení tkanin a používání barviv na vysoké úrovni, Egypťané používali k barvení rostliny i minerální barvy. Taktéž pokročilé barvení bylo známo v Řecku, kdy z té doby jsou známá mořidla, z nich byl používán nejčastěji vinný kámen.

S nástupem průmyslové revoluce se do popředí dostávají barviva syntetická a nahrazují drahá přírodní barviva. Syntetická barviva se zdají být na první pohled ve všem výhodnější, ať už v rychlé průmyslové produkci, cenové dostupnosti nebo jejich stabilitě.

S přibývajícím vědeckými poznatky se však zjišťuje, že syntetická barviva mají i své negativní stránky, jako je špatná biologická odbouratelnost, některá mohou být toxická a zatěžují tak životní prostředí. Právě kvůli vysoké průmyslové produkci se odhaduje, že se až 10 % dostává do odpadních vod, které pak kontaminují okolní ekosystémy. Barviva se díky své složité struktuře špatně odstraňují a jsou velmi stabilní, komplikují průnik světla ve vodních tocích, snižují tak obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě, což má negativní dopad na vodní ekosystémy. Mnoho barviv existuje i ve formě pevného odpadu, i zde je taktéž snaha eliminovat toto množství a obecně je snahou syntetická barviva nahrazovat přírodními. Tento trend nahrazování trvá už řadu let a probíhá mnoho výzkumů na zjištění různých alternativ v produkci přírodních barviv.

Jednou z možností produkce přírodních barviv jsou mikrobiální barviva, jež produkují například rody jako *Achromobacter*, *Sarcina*, *Phaffia*, *Monascus*, *Rhodotorulla*, *Bacillus* nebo *Micrococcus*. Protože podmínky produkce modrofialového rozpustného barviva bakteriemi rodu *Micrococcus* nebyly doposud detailněji studovány a nebyly ve vědecké literatuře publikovány, stalo se toto studium tématem této bakalářské práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VÝZKUM PIGMENTŮ

Pigmenty a barviva jsou zkoumána z mnoho různých důvodů, což je spjato s jejich širokým využitím. Použití barviv a pigmentů je ve všech směrech, ať už je to samotný průmysl, který využívá barviv jako přídatných látek do potravin, kosmetických prostředků či farmaceutik, nebo umění, či další lidské aktivity. Pro masivní využívání barviv a pigmentů je vysoká produkce syntetických barviv a pigmentů nezbytná, některá však mají negativní dopad na lidské zdraví nebo na životní prostředí.

Je tedy cílem využívat i mikroorganismy k produkci požadovaných pigmentů a barviv. Ty by se tak staly neškodnými pro životní prostředí, byly by snadno odbouratelné a neohrožovaly by lidské zdraví.

2 PIGMENTY

Používání pigmentů a barviv bylo lidmi prováděno již od pravěku. Archeologické důkazy odhalily, že lidstvo ve svém raném období používalo pigmenty pro estetické účely. Přidávání barviv do potravin začalo v Egyptě, když výrobci bonbonů přidali do svých výrobků přírodní extrakty. Podobné použití přírodních barviv bylo prováděno v Japonsku v shosoin v textu Nara z období 8. století, to obsahuje odkazy na zbarvení sóji a adzuki-bean koláče (Aberoumand, 2011). První syntetická barva, mauvine, byla vyvinuta sirem Wiliam Henry Perkinem v roce 1856 a tento objev zahájil revoluci v historii syntetických barev (Walford, 1980).

Syntetická barva zahltila trh díky snadné výrobě, nízké nákladnosti, vynikajícím barvicím vlastnostem a jen malým množstvím, které je potřebné k barvení. Prodejci ve své době nabízeli více než 80 umělých barviv. Mnoho barevných přísad v té době nikdy nebylo testováno na toxicitu nebo jiné nepříznivé účinky, což nakonec vedlo k nepříznivým účinkům na zdraví a životní prostředí (Downham a Collins, 2000).

Barvivo jako je tartrazin, některá červená a žlutá barviva vyvolávají alergie, buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými barvivy. A to i přesto, že u některých syntetických barviv, která byla schválena Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA) pro použití v potravinách, léčivech a kosmetických přípravcích, byla u nich zjištěna podpora vzniku rakoviny.

Například benzidinová barviva způsobují rakovinu střev, zatímco saze (široce používané jako pigment pro tiskové barvy) se považují za potenciální karcinogen. Vypouštění neupravených průmyslových odpadních látek je z ekologického hlediska neetické z důvodu dlouhodobého přetrvávání v důsledku dlouhé stability (Babitha, 2009). Nevýhody syntetických barviv zvýšily celosvětovou poptávku po přírodních pigmentech (Manikprabhu a Lingappa, 2013). Hlavními zdroji přírodních pigmentů jsou rostliny nebo mikroorganismy (Downham and Collins). Mikroorganismy jako houby a bakterie poskytují snadno dostupný alternativní zdroj přírodních pigmentů (Arulselvi et al., 2014)

2.1 Obchodní trendy

Mikrobiální produkce β -karotenu stojí přibližně 1000 USD/kg oproti syntetické výrobě, která stojí 500 USD/kg. I když jsou mikrobiální pigmenty několikanásobně dražší, stále mohou konkurovat syntetickým barvivům kvůli své přirozenosti a bezpečnosti (Venil et al., 2013)

Největším spotřebitelem organických pigmentů a barviv zůstává textilní průmysl, zatímco v ostatních průmyslových odvětvích jako jsou tiskařské barvy či nátěrové hmoty se teprve očekává rychlejší růst. Hodnota mezinárodního trhu s potravinářskými barvivy, která byla odhadována na přibližně 1,15 miliardy USD v roce 2007 (Mapari et al., 2010), se může v budoucnu zvýšit díky schváleným novým potravinářským barvivům (Aberoumand, 2011).

3 BAKTERIÁLNÍ PIGMENTY A BARVIVA

3.1.1 Produkce bakteriálních pigmentů a barviv

Pigmentace je pro některé bakterie velmi užitečná. U bakterií je tvorba pigmentů spojena s morfologickými charakteristikami, buněčnými aktivitami, patogenezí, ochranou a samotným přežitím (Bhawsar, 2011).

Významnou skupinou využívající bakteriální pigment jsou autotrofní cyanobakterie, obsahující zelený pigment, známý jako chlorofyl, který je identický s rostlinným chlorofylem. Obsahují také doplňkové pigmenty fykobilin a chlorofyl b, které jsou potřebné při jejich fotosyntéze. Další skupiny fotosyntetických bakterií mají bakteriochlorofyl, proteorhodopsin a bakteriorhodopsin; ty jsou strukturně podobné chlorofylu. U fototrofních bakterií jsou tyto pigmenty potřebné k provedení procesu fotosyntézy (Bhawsar, 2011).

Dalším z mnoha důvodů, proč bakterie produkují pigmenty, je ochrana před UV zářením. Pigment absorbuje UV záření a tím ochrání bakteriální buňky a buněčné součásti před jeho nepříznivými účinky (Bhawsar, 2011).

Některé bakteriální pigmenty dále fungují na principu antibiotik, která jsou účinná proti patogenním houbám, bakteriím a kvasinkám. Jako příkladem mohou být uvedeny pigmenty prodigiosin, erytromycin, pyocyanin, pyoverdin nebo pyochelin, jenž jsou silné antibiotické pigmenty (Bhawsar, 2011).

Bakteriální pigmenty produkované *Pseudomonas* sp., jako jsou pyoverdin a pyochelin, navíc pomáhají buňkám jako siderofóry, které pomáhají přenášet železo přes buněčnou membránu. Tento děj probíhá v oblasti půdní rhizosféry, kde panuje silná konkurence mezi mikroorganismy o důležité prvky (Bhawsar, 2011).

Také pigmentace u extrémofilních mikroorganismů jsou velmi pestré. Jasná pigmentace extrémofilních bakterií poskytuje ochranu před oxidačním stresem. Pigmenty také udržují integritu a stabilitu jejich buněčných membrán a jsou taktéž důležité při podpoře respiračních a případně i fotosyntetických funkcí (Bhawsar, 2011).

Pigmenty dále poskytují některým bakteriím ochranu a odolnost proti těžkým kovům nebo i jiným sloučeninám. Patogenní stafylokoky jsou odolné vůči některým lékům díky svému

pigmentu, který působí jako bariéra pro antibiotika působící na buněčnou stěnu nebo plazmatickou membránu. Bakterie vykazující odolnost proti těžkým kovům taktéž obvykle produkují pigmenty a jsou využívány pro sanaci půdy a vody znečištěné těžkými kovy jako je arsen, kadmium, rtuť, nikl a jiné. Pigmentující bakterie dále mohou být potenciálně využívány jako biosenzory pro detekci znečištění životního prostředí, jako jsou úniky ropy nebo pesticidy (Bhawsar, 2011).

Bakteriální pigmenty mají i velký taxonomický význam a jsou důležité pro určování určitého rodu nebo druhu, a to podle vlastností pigmentu; jsou tedy užitečné při identifikaci a klasifikaci mikroorganismů. Příkladem mohou být bakterie rodu *Xanthomonas*, kde všechny druhy produkují žlutě barevné pigmenty, známé jako xanthomonadiny. Tyto pigmenty mají podobná chromatická a absorpční spektra, což tvoří základ druhové klasifikace xanthomonád (Bhawsar, 2011).

4 BAKTERIE TVOŘÍCÍ PIGMENTY A BARVIVA

Tabulka 1 – Bakterie tvořící pigmenty a barviva a jejich potenciální aplikace

Bakterie	Pigment	Potenciální aplikace	Zdroje
<i>Micromonospora lupine</i>	Antrachinon	Protinádorové činidlo	Igarashi et al., 2007
<i>Streptomyces</i> sp.	Karotenoid	Potravinářský pigment	Dharmaraj et al., 2009
<i>Chromobacterium</i>	Violacein	Protinádorové, antimikrobiální a anti-parazitické činidlo	Duran et al., 2007
<i>Chromobacterium</i> sp. NIIST (MTCC 5522)	Violacein	Antifungální činidlo	Sasidharan et al., 2015
<i>Hymenobacter</i> sp. a <i>Chryseobacterium</i> sp.	Karotenoid	Fotosenzibilizátory v solárních článcích senzibilizovaných barvivem	Ordenes Aenishanslins et al., 2016
<i>Streptomyces glaucescens</i> NEAE-H	Melanin	Protinádorové činidlo a antioxidant	El-Naggar and El-Ewasy, 2017
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pyocyanin	Antimikrobiální činidlo	El-Fouly et al., 2015
<i>Hahella cheujensis</i>	Prodiginin	Antibiotikum	Kim et al., 2007
<i>Pedobacter</i>	Karotenoid	Antioxidant	CorreaLlanten et al., 2012
<i>Vogesella indigofera</i>	Modrý pigment	Detekce těžkých kovů	Gu and Cheung, 2001

Tabulka 2 – Bakterie tvořící pigmenty a barviva

Bakterie	Pigment	Barva	Zdroje
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Canthaxanthin	Oranžová	Tuli et al., 2015
<i>Streptomyces</i> sp.	Karotenoid	Žlutá	Venil et al., 2013
<i>Streptomyces echinoruber</i>	Rubrolon	Červená	Ahmad et al., 2012
<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	Zeaxanthin	Žlutá	Venil et al., 2013
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Astaxanthin	Růžovo – červená	Venil et al., 2013
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Canthaxanthin	Tmavě červená	Venil et al., 2013
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pyocyanin	Modrá, zelená	Tuli et al., 2015
<i>Flavobacterium</i> sp.	Zeaxanthin	Žlutá	Tuli et al., 2015
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaxanthin	Růžovo - červená	Tuli et al., 2015
<i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxanthin	Zlato – žlutá	Dufosse and Venil, 2009
<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosin	Červená	Dufosse and Venil, 2009
<i>Flavobacterium</i> sp.	Zeaxanthin	Žlutá	Dufosse and Venil, 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pyocyanin modrý	Zelená	Dufosse and Venil, 2009

Tabulka 3 – Bakterie tvořící pigment a původ jejich izolace

Bakterie	Gram	Pigment	Izolováno	Zdroje
<i>Paracoccus haeundaensis</i>	Pozitivní	Oranžový	Mořská voda	Lee et al., 2004
<i>Streptomyces vietnamensis</i>	Pozitivní	Fialově - modrý	Půda	Zhu et al., 2007
<i>Streptomyces shaanxiensis</i>	Pozitivní	Modrý	Zavlažovaná půda	Lin et al., 2012
<i>Streptomyces caeruleatus</i>	Pozitivní	Tmavě modrý	Rajčatová rhizosféra	Zhu et al., 2011
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> sp. <i>neaurantiaca</i>	Negativní	Červený	Rhizosféra	Ivanova et al., 2009
<i>Pseudomonas argentinensis</i>	Negativní	Žlutý	Rhizosféra	Peix et al., 2005
<i>Bacillus nakamurai</i>	Pozitivní	Černý	Půda	Dunlap et al., 2016
<i>Nubsella zeaxanthinifaciens</i>	Negativní	Žlutý	Sladká voda	Asker et al., 2008
<i>Kineococcus xinjiangensis</i>	Pozitivní	Hnědý	Pouštní písek	Liu et al., 2009

4.1 Nejznámější bakterie produkující pigmenty

Bakterie, řasy a houby produkují různé pigmenty. Některé z těchto pigmentů z biologických nebo mikrobiálních zdrojů mají žádoucí vlastnosti, jako je stabilita vůči světlu, teplu a pH (Heer, 2017).

4.1.1 *Sarcina*

Jedná se o grampozitivní bakterie, které produkují přirozeně žlutý pigment karotenoid (Heer, 2017).

4.1.2 *Micrococcus*

Před objevením penicilinu v roce 1928 objevil sir Alexander Fleming bakterii podobnou druhu *Micrococcus luteus*, a pojmenoval ho jako *Micrococcus lysodeikticus*. *Micrococcus* byl poté používán jako primární experimentální mikrob při Flemingově objevu lysozymu a z tohoto důvodu se stal užitečným v mikrobiologii a medicíně. Mikrokoky jsou dnes také užitečné v bioremediacích, biodegradacích znečišťujících látek a v biotechnologiích. Mikroorganismus může být také využíván pro svou schopnost v syntetických reakcích izoprenů v chemickém a farmaceutickém průmyslu. *Micrococcus luteus* rozkládá za normálních podmínek některé sloučeniny přítomné v potu, které produkují nepříjemné tělesné pachy. *Micrococcus luteus* byl také izolován ze 120 milionů starých bloků jantaru. Molekulární a biologické zjištění ukazují, že *Micrococcus luteus* a příbuzní členové rodu mají vysokou adaptabilitu na přežití v extrémním prostředí a v prostředí chudém na živiny. Pro disperzi v životním prostředí jsou tyto adaptace pro bakterie důležité (Heer, 2017).

4.1.3 *Chromobacterium violaceum*

Je to gramnegativní bakterie a jejich kolonie jsou fialové. Pigment vyrobený z fialové kolonie je violacein [3-(1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ilyden)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on] a má silný baktericidní, mykobaktericidní, trypanocidní, protinádorový a antioxidační účinky (Heer, 2017).

5 ROZDĚLENÍ A VYUŽITÍ BAKTERIÁLNÍCH PIGMENTŮ

Použití bakterií pro produkci pigmentů má několik výhod oproti houbám, jako je krátký životní cyklus a snadná genetická modifikace (Venil et al., 2013, 2014). Nicméně ve srovnání s houbovými pigmenty je většina bakteriálních pigmentů stále ve fázi výzkumu a proto by měla být zintenzivněna práce na produkci bakteriálních pigmentů, aby byly dostupné na trhu. Bakterie produkující pigmenty jsou všudypřítomné. Vyskytují se například v půdě (Zhu et al., 2007), pouštním písku (Liu a kol., 2009) et al., 2008), sladké vodě (Asker et al., 2008) a v mořských vzorcích (Franks et al., 2005). Byly objeveny v oblastech s nízkou teplotou (Nakamura et al., 2003) i vysokou teplotou (Manachini et al., 1985), mohou přetrvávat ve slaných oblastech (Asker a Ohta, 1999) a dokonce mohou být endofyti (Dengetal., 2011).

Ve srovnání s jinými bakteriálními skupinami byla dříve produkce pigmentu považována za nejpravděpodobnější u aktinobakterií (Marroquin a Zapata, 1954). Rod *Streptomyces* byl studován pro nejvyšší produkci pigmentu již v hlubší minulosti (Conn a Jean, 1941). Dnes je však známo, že bakterie produkují širokou škálu pigmentů, jako jsou karotenoidy, melanin, violacein, prodigiosin, pyocyanin, aktinorhodin a zeaxantin (Ahmad et al., 2012; Venil a kol., 2014), což je dáno tím, že bylo objeveno mnoho bakteriálních kmenů produkujících nové pigmenty a navíc byly a jsou intenzivně zkoumány podmínky pro tvorbu pigmentů.

Kultivační podmínky a optimalizace médií ukázaly zvýšenou produkci pigmentů u *Bacillus* sp., který vykazoval významnou produkci pigmentu při kultivaci při pH $7,0 \pm 0,1$ a teplotě 34°C (Mondal et al., 2015). Podobně *Duganella* sp. B2 při optimálním pH a zdrojích dusíku vykazovala zvýšenou produkci violaceinu (4,8-násobek proti standardnímu zdroji dusíku) (Wang et al., 2009).

5.1 Typy pigmentů

5.1.1 Karotenoidy

Karotenoidy byly nejprve izolovány Heinrichem Wilhelmem Ferdinandem Wackenroder (Wackenroder, 1831). Všechny karotenoidy jsou tetraterpenoidy (Kocher a Muller, 2011) a existuje více než 600 známých karotenoidů, které jsou rozděleny do dvou tříd: xanthophylly (které obsahují kyslík) a karoteny (které jsou čistě uhlovodíky a neobsahují

žádný kyslík). Mikrobiální produkce karotenoidů vykazuje snadné využití za použití nízkonákladových substrátů a bezpečnosti (Mata Gomez et al., 2014). Mikroorganismů produkujících karotenoidy je mnoho a zahrnují *Flavobacterium multivorum* (Bhosale a Bernstein, 2004), *Rhodobacter sphaeroides* (Chenet et al., 2006), *Sphingomonas* sp. (Silva et al., 2004), *Agrobacterium aurantiacum*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Gordonia jacobea* (Dufosse, 2006). Karotenoidy se používají jako vitamínové doplňky a hrají důležitou roli v ochraně před oxidačním stresem (DellaPenna a Pogson, 2006).

5.1.2 Melaniny

Melaniny jsou indolické polymery (Surwase et al., 2013) jako eumelaniny, femelaniny a alomelaniny (Banerjee et al., 2014). Melaniny se běžně vyskytují ve všech živých systémech a jejich přítomnost v téměř každém velkém taxonu naznačuje evoluční význam (Plonka a Grabačka, 2006). Produkce melaninu byla popsána u velkého počtu rozmanitých mikroorganismů, jako je *Vibrio cholerae*, *Shewanella colwelliana*, *Alteromonas nigrifaciens* (Soliev et al., 2011) a u mnoha druhů rodu *Streptomyces* (Manivasagan et al., 2013). Melanin poskytuje odolnost proti UV záření tím, že absorbuje široký rozsah vlnových délek a předchází fotodegradačnímu poškození buněk (Hill, 1992). Melanin také chrání před vysokými teplotami a chemickým namáháním. Melanin je proto značně používán v kosmetice, ochraně fotografií, krémů, brýlí a dokonce i k imobilizaci radioaktivního odpadu jako je uran. Má vlastnosti antiHIV (Plonka a Grabačka, 2006, Surwase et al., 2013).

5.1.3 Prodigiosin

Prodigiosin je červený pigment, který byl nejprve izolován z bakterie *Serratia marcescens* (Boger and Patel, 1987). Produkce prodigiosinu byla později popsána i u *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrus*, *Vibrio gazogenes* a *Alteromonas rubra* (Darshana Manonmani, 2015). Výskyt mikroorganismů produkujících prodigiosin je široký (Gandhi et al., 1976, Kim et al., 2007). Prodigiosin působí jako silná terapeutická molekula, má zejména imunosupresivní a protinádorový účinek. Prodigiosin také vykazuje insekticidní, antifungální, antibakteriální a antimalarickou aktivitu (Harris et al., 2004, Kamble a Hiwarale, 2012).

5.1.4 Violacein

Violacein je fialově zbarvený pigment, poprvé popsán z gramnegativní bakterie *Chromobacterium violaceum*. Na rozdíl od *Chromobacterium violaceum*, produkce violaceinu byla hlášena z různých mikroorganismů, jako je *Janthinobacterium lividum*, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Pseudoalteromonas tunicata*, a *Pseudoalteromonas ulvae*. Violacein vykazuje různé biologické aktivity, včetně antivirových, antibakteriálních, protinádorových a enzymových modulačních vlastností (Matz a kol., 2004, Duran et al., 2007, Soliev et al., 2011)

5.1.5 Riboflavin

Riboflavin, také nazývaný vitamín B₂, je pigment rozpustný ve vodě, který vykazuje silnou žlutozelenou fluorescenci. Ten byl nejprve izolován anglickým chemikem Alexanderem Wynter Blythem (Blyth, 1879). Struktura riboflavinu byla potvrzena Kuhnem a Weygandem; má dvě odlišné části sestávající z jednotky ribózy a struktury flavinů se třemi kruhy, známé jako lumichrom (Kuhn et al., 1933). Riboflavin je nezbytný vitamin, který je potřebný pro člověka v množství 1,1-1,3 mg denně. Riboflavin působí jako strukturální složka koenzymů flavin mononukleotidu a flavin adenin dinukleotidu. Oba koenzymy katalyzují neenzymatické oxidačně-redukční reakce tím, že fungují jako dehydrogenační nosiče vodíku v dopravním systému podílejícím se na produkci ATP. Riboflavin je používán již více než 30 let, např. jako součást terapie neonatální žloutenky. Souběžná léčba riboflavinem s beta blokátory ukázala zlepšení u migrénových bolestí hlavy (Kutsal and Ozbas, 1989; Feroz, 2010). Ukázalo se rovněž, že riboflavin v kombinaci s UV světlem je účinný při snižování škodlivých patogenů v krevních produktech (Goodrich et al., 2006).

5.1.6 Pyocyanin

Pyocyanin je modrý pigment produkovaný *Pseudomonas aeruginosa* (Hassan and Fridovich, 1980). Pyocyanin byl používán jako protimikrobní látka, neboť má antibakteriální a antifungální vlastnosti (Jayaseelan et al., 2014).

5.2 Aplikace pigmentů

5.2.1 Pigmenty v textilním průmyslu

Textilní průmysl využívá přibližně 1,3 milionu tun syntetických barviv a prekurzorů barviv ročně (Venilet al., 2013). Až 200 000 tun barviva se každoročně vylučuje s odpadními vodami během barvení a dokončovacích prací. Bohužel většina těchto barviv uniká konvenčním procesům čištění odpadních vod a přetrvává v životním prostředí v důsledku jejich vysoké stability vůči světlu, teplotám, vodě, detergentům, chemikáliím, mýdlům a dalším vlivům (Ogugbue a Sawidis, 2011). Je proto velký zájem na používání ekologicky šetrných barviv. Mikrobiální pigmenty jsou ekologicky šetrná barviva použitelná pro barvení textilních tkanin (Chadni et al., 2017). Mnoho mikrobiálních pigmentů již bylo odzkoušeno k použití pro barvení různých typů tkanin. Prodigiosin z *Vibrio* sp. může barvit vlnu, nylon, akryl a hedvábí. Při použití tamarindu jako mořidla může pigment od *Serratia marcescens* barvit až pět typů látek, včetně akrylové, polyesterové mikrovlákny, polyesteru, hedvábí a bavlny (Yusof, 2008). Kromě barvicího efektu vykazovaly mikrobiálně barvené textilie také antimikrobiální vlastnosti. Textilní tkanina barvená prodigiosiny, získanými z *Vibrio* sp., vykazovala antibakteriální aktivitu proti *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* (Alihosseini et al., 2008). Mikrobiální pigmenty tak mohou zvýšit tržní hodnotu tkaniva a mohou nahradit takové syntetické barvy, které jsou toxické pro lidstvo a přírodu.

5.2.2 Antimikrobiální činidla

Mikrobiální pigmenty slouží jako antimikrobiální činidla proti širokému spektru patogenů (Malik et al., 2012). Pigmenty, jako je pyocyanin a pyorubin získané z *Pseudomonas aeruginosa*, vykazují výraznou antibakteriální aktivitu proti *Citrobacter* sp. Pigmenty produkované *Micrococcus luteus* KF532949 vykazovaly slibnou mikrobiální aktivitu proti patogenům působícím záněty ran, jako je *Staphylococcus* sp., *Klebsiella* sp., a *Pseudomonas* sp. (Umadevi a Krishnaveni, 2013). Pigment získaný ze *Streptomyces hygroscopicus* dokonce vykazoval dobrou antimikrobiální aktivitu proti patogenům rezistentním vůči některým antibiotikům, jako jsou kmeny *Staphylococcus aureus* rezistentní vůči methylicinu a vankomycinu a kmeny *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* produkující p-laktamasu vůči *Klebsiella* sp. (Berlanga et al., 2000; Selvameenal et al., 2009).

5.2.3 Potravinářská barviva

Aby bylo jídlo přitažlivé, přidávají se buď syntetická, nebo přírodní barviva. V posledních dnech se výrobci potravin přesouvají ze syntetických do přírodních barviv kvůli negativním zdravotním důsledkům spojeným se syntetickými barvami (Aberoumand, 2011; Venil et al., 2013).

5.2.4 Antioxidanty

Mikrobiální pigmenty jako karotenoidy a naftachinony prokázaly antioxidační aktivitu (Tuli et al., 2015). Antioxidační aktivitu má taktéž karotenoid izolovaný z antarktické bakterie rodu *Pedobacter*. Pigment má silnou antioxidační kapacitu a chrání bakterii proti oxidačnímu poškození (CorreaLlanten et al., 2012).

5.2.5 Protinádorové látky

Mnoho mikrobiálních pigmentů má protinádorovou aktivitu, např. prodigiosin z *Pseudoalteromonas* sp. 1020R vykázal cytotoxicitu proti leukemickým buňkám U937 (Wang et al., 2012). Podobně melanin ze *Streptomyces glaucescens* NEAE-H ukázal protinádorovou aktivitu proti buněčné linii rakoviny kůže (El-Naggar a El-Ewasy, 2017).

5.2.6 Bioindikátory

Mikrobiální pigmenty se dají použít i jako bioindikátory. Fluorescenční pigmenty z bakterií mohou být použity pro kontrolu průběhu specifických reakcí. Klíčovým příkladem je fykoerythrin, který se používá k predikci rychlosti zachycování peroxyradikálů v lidské plazmě. Pigment nejprve vykazuje fluorescenci, tmavé skvrny se objevují tam, kde pigment reaguje s radikály (Delange a Glazer, 1989).

5.2.7 Chemická modifikace bakteriálních pigmentů

Pigmenty, vytvářené bakteriemi, nemusí být ve své přirozené formě optimální pro aplikaci, ale barviva produkovaná rody *Chromobacterium*, *Sarcina* a *Micrococcus* mohou být chemicky modifikována tak, aby byla např. rozpustná ve vodě (Heer, 2017).

6 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRODUKCI PIGMENTŮ

Existují dva typy produkce: Růst na pevném substrátu a v ponořeném (submerzním) stavu. Obecně se pro průmyslovou výrobu pigmentů používá submerzní kultivace. Při kultivaci na pevných substrátech dochází k produkci pigmentované biomasy na povrchu pevného substrátu. Tato technika má mnoho potenciálních výhod, včetně úspory odpadních vod a vyššího výnosu metabolitů, ale zabírá obrovské plochy. Na druhé straně mikroorganismy, kultivované aerobně v kapalném médiu za správného míchání, vykazují vyšší homogenitu růstu buněk a lze je na malé ploše pěstovat ve velkém objemu. Produkci pigmentů ovlivňuje mnoho parametrů jako zdroj uhlíku, zdroj dusíku, teplota, pH, rychlost provzdušňování atd. (Heer, 2017).

6.1 Teplota

Produkce mikrobiálních pigmentů je velmi závislá na typu mikroorganismu a teplota je hlavním faktorem pro produkci mikrobiálních pigmentů (Heer and Sharma, 2017).

6.2 pH

Dalším z nejdůležitějších faktorů pro produkci mikrobiálního pigmentu je pH. Je nutno brát v potaz, že změna pH z optimální hodnoty neovlivní jen produkční vlastnosti mikroorganismu, ale už i mírná změna pH může změnit barvu odstínu mikrobiálního pigmentu (Heer and Sharma, 2017).

6.3 Inkubační doba

Různá inkubační doba ovlivňuje růst mikrobiálního producenta a tím i tvorbu pigmentu; nejvíce pigmentu bývá produkováno v rozmezí 24 – 96 hodin kultivace (Heer and Sharma, 2017).

6.4 Zdroj uhlíku

Produkce pigmentu může být výrazně ovlivněna typem zdrojů uhlíku, jako je například glukosa, fruktosa, laktosa, maltosa, sacharosa. Zdroj uhlíku jako glukosa anebo její oligosacharidy jsou obvykle lepší pro růst mikrobiálního kmene i produkci pigmentů (Heer and Sharma, 2017).

6.5 Zdroj dusíku

Zdroje dusíku jsou také důležitým faktorem pro mikrobiální pigmenty, a to v silné závislosti na konkrétním druhu mikroorganismu (Heer and Sharma, 2017).

7 ROD *MICROCOCCUS*

Rod *Micrococcus* je zařazen do domény *Bacteria*, kmene *Actinobacteria*, třídy *Actinobacteria*, řádu *Actinomycetales*, čeledi *Micrococcaceae* a rodu *Micrococcus* (Sedláček, 2007).

Buňky rodu *Micrococcus* jsou sférické, vyskytující se po dvou, ve čtveřicích nebo v nepravidelných shlucích, ale ne v řetízcích. Barví se gram-pozitivně. Jsou nepohyblivé, nesporulující, striktně aerobní a mohou produkovat pigmenty. Jsou chemoorganotrofní s respiratorním metabolismem a z cukrů produkují malé nebo žádné množství kyselin. Rostou na běžných médiích a jsou mírně halotolerantní – rostou až při 5%NaCl. Jsou mezofilní, optimální růstová teplota je v rozmezí 25 až 37 °C. Primárně se vyskytují na kůži savců včetně člověka, dále se nacházejí v půdě, v ovzduší, ve vodě a v potravinách, převážně v masu. Obecně jsou považovány za nepatogenní (Sedláček, 2007).

Rod *Micrococcus* obsahuje řadu druhů, nejznámější jsou dva, a to druh *Micrococcus luteus* a *Micrococcus lylae*. *Micrococcus luteus* je žlutě pigmentující, vyskytující se na kůži savců a *Micrococcus lylae* je obvykle nepigmentující a vyskytující se též na kůži savců (Sedláček, 2007).

8 JINÉ BAKTERIE TVOŘÍCÍ MODRÝ A FIALOVÝ PIGMENT

8.1 *Streptomyces* sp.

Pigmenty rozpustné ve vodě nejsou u mikroorganismů úplně běžné, ale mají velký biotechnologický význam. Současný antagonismus vůči syntetickým barvám vyzval k velkému množství výzkumu potenciálních mikroorganismů poskytovat ve vodě rozpustné pigmenty, vhodné pro použití jako barviva pro potravinářský průmysl (Margalith, 1992).

Uvádí se např. izolace a identifikaci kmene *Streptomyces* sp. LS-1, který produkuje relativně velké množství ve vodě rozpustného, stabilního a netoxického pigmentu. Kmen LS-1 byl izolován ze vzorků odebraných z půdy v oblasti Nanjing v Číně. Kmen byl kultivován v médiu obsahující škrob 20 g/l, KNO_3 1 g/l, NaCl 0,5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, $\text{K}_2\text{HPO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g/l, při pH 7,4 – 7,6. Kmen byl kultivován jeden den při 30 °C, než byl přenesen do 250 ml baňky obsahující 100 ml média. Dále probíhala kultivace na orbitální třepačce při 3,3 Hz a 30 °C. Submerzní kultivace byla prováděna v automatickém fermentoru Vir-Tis 3L (LingLu, 2002).

Pro zkoumání, zda je produkce pigmentu ovlivněna různými zdroji dusíku a uhlíku, byly jako zdroj dusíku použity NH_4SO_3 , NH_4Cl a KNO_3 (0,1% w/w). S dusičnanem draselným jako hlavním zdrojem dusíku byl zkoumán vliv zdrojů uhlíku (glukosa, sacharosa a škrob), (LingLu, 2002). Kvantifikace pigmentů ve vhodných časových obdobích, kdy se odebíraly vzorky o objemu 10 – 20 ml k měření A_{590} supernatantu (α_{MAX} absorpčního spektra fermentační kapaliny), (Horinouchi a Beppu, 1984).

Bylo zjištěno, že kmen LS-1 je shodný s rodem *Streptomyces* a je blízký příbuzný s *S. indigocolor*. Byl prokázán vliv zdroje uhlíku a dusíku na produkci modrého pigmentu. Když byl zdrojem KNO_3 , pigment byl bohatě tvořen a akumulován. Za kultivace při přidání NH_4NO_3 nebo NH_4Cl nebyla pozorována žádná produkce pigmentu, což by mohlo znamenat, že syntéza pigmentu je inhibována amonným dusíkem. Glukosa byla nejlepším zdroje uhlíku, jako druhý nejlepší zdroj lze považovat sacharosu. Při submerzní kultivaci byla produkce pigmentu po dobu 45 hodin velmi slabá, poté však prudce vzrostla a dosáhla maxima po 4 dnech. Množství pigmentu ve 3 litrovém fermentoru bylo přibližně třikrát vyšší než v laboratorních baňkách a doba kultivace byla přibližně o 60 hodin kratší, což

autoři vysvětlili lepším provzdušňováním během tvorby pigmentu ve fermentoru (LingLu, 2002).

Autoři také zjistili, že pigment byl stabilnější za viditelného světla v alkalickém prostředí než v kyselém. Měření teplotní stability v rozmezí 20 – 100 °C ukázalo, že po 1 hodinové inkubaci při 100 °C 86 % pigmentu zůstává. Pigment produkovaný kmenem LS-1 byl strukturně velmi podobný aktinorhodinu, popsáném již dříve v publikaci Bystrykh et al., 1996. Když byly oba pigmenty pozorovány tenkovrstvou chromatografií, jejich retenční vlastnosti byly takřka identické.

Protože podobný výsledek byl získán i pomocí HPLC, považují autoři pigment produkovaný kmenem LS-1 za úzce strukturně blízký modrému pigmentu aktinorhodinu, který produkuje *S. coelicolor* (LingLu, 2002).

8.2 *Pantoea agglomerans*

Jednou z dalších bakterií, schopných produkovat tmavě modrý pigment, která byla izolována z prostředí a identifikována jako gramnegativní bakterie, je *Pantoea agglomerans*. Rovněž i u ní byla studována produkce pigmentu za různých podmínek, ovšem spíše z pohledu potenciálního využití pigmentace této bakterie coby indikátoru nesprávného skladování potravin. *Pantoea agglomerans* je gramnegativní tyčinka, pohyblivá, pozitivní na Voges-Proskauer test, katalázu, malonát, využití močoviny a arabinosy.

Nejprve byly studovány koncentrace organických složek pro přípravu agarových ploten. Organismus byl naočkován na agarové plotny s různými koncentracemi glukosy (5 až 20 g/l) a trypticko sojového bujonu (TSB, 2,5 až 20 g/l) a pH bylo upraveno na 6,8. Po inkubaci po dobu 14 hodin při 20 °C byla změřena barva agarových misek, jako index tvorby pigmentu. Bylo zjištěno, že kombinace 10 g/l TSB a 5 g/l glukosy generovaly nejvyšší hodnotu produkce pigmentu. Poté bylo zkoumáno pH a to v rozmezí mezi 5,6 až 7,6 a nejvyšší hodnota produkce pigmentu byla zjištěna při pH 6,4.

Dále byl zkoumán přídavek glycerolu a bylo zjištěno, že 10 g a 40 g na litr mírně zvýšilo produkci pigmentu ve srovnání s kontrolním vzorkem. Při 80 g a 160 g glycerolu byla produkce pigmentu zpožděna, a proto se koncentrace 40 g na litr se jevila jako optimální. Autoři rovněž zjistili, že na produkci pigmentu má vliv počáteční hustota buněk.

Zkoušené počáteční hodnoty hustoty buněk byly $10^{6,3}$ CFU/cm², $10^{7,2}$ CFU/cm², $10^{8,2}$ CFU/cm² a $10^{9,1}$ CFU/cm². Původně používaná hustota buněčné suspenze byla $10^{8,2}$ CFU/cm². Produkce pigmentu byla rychlejší při počátečních hodnotách mezi $10^{6,3}$ CFU/cm² a $10^{8,2}$ CFU/cm². Zajímavým pozorováním bylo, že žádný modrý pigment nebyl produkován při nejvyšší počáteční koncentraci $10^{9,1}$ CFU/cm², ale buňky během inkubace vyrostly žlutě.

Bylo také pozorováno, že produkce pigmentu začala v pozdní logaritmické fázi růstu pigmentu. Z hlediska produkce pigmentu při konstantních teplotách (mezi 8 °C a 20 °C) bylo zjištěno, že tvorba pigmentu nastává při teplotách 10 °C a více.

Na závěr autoři studovali některé vlastnosti pigmentu a zjistili, že je rozpustný ve vodě, ale ne v organických rozpouštědlech jako jsou chloroform, aceton nebo acetonitril. Když se však do rozpouštědla přidalo malé množství vody, tak se pigment rozpustil. Tím se tento pigment liší od ostatních mikrobiálních fialových a modrých pigmentů, jako je například violacein. Zajímavé je, že se barva pigmentu změnila dle hodnoty pH (na růžovou v kyselém roztoku), ale v alkalickém roztoku se nezměnila. Tyto vlastnosti pigmentu jsou podobné vlastnostem antokyanů, modrých pigmentů rostlin. Také bylo zjištěno, že studovaný modrý bakteriální pigment není stabilní ve vodě a modrá barva v něm postupně mění intenzitu (Fujikawa, 2010).

9 KULTURA CCM 4431 A JEJÍ PŮVOD

Existence gram pozitivních mikrokoků, tvořící fialové rozpustné barvivo, je známa již dlouho; dříve však byly označovány jako *Staphylococcus flavocyaneus* (Aaronson, 1955). Nicméně vědeckých prací o fialově pigmentujících mikrokocích je velmi málo a žádná se nevěnovala studiu podmínek produkce barviva.

Jsou k dispozici dvě staré vědecké práce, zabývající se taxonomickým zařazením takových koků. Tehdy nové uspořádání navrhli dva čeští vědci Kocur a Martinec (1963), kteří přeřadili fialově pigmentující koky do rodu *Micrococcus*, konkrétně do druhu *Micrococcus luteus* a tento návrh byl podpořen prací Rosypala, Kocura a Hoďáka, rovněž z roku 1963.

O řadu let později, v roce 1995, byla provedena rozsáhlá taxonomická revize všech bakterií, které byly do té doby řazeny do rodu *Micrococcus* (Stackebrandt et al., 1995). V rámci této revize byl ustanoven i nový druh *Micrococcus lylae*, velmi blízký druhu *Micrococcus luteus* (Stackebrandt et al., 1995).

V květnu roku 1994 byla ve Zlíně z ovzduší Janem Růžičkou získána kultura mikrokoka, produkující rozpustné fialové barvivo a v září stejného roku byla následně uložena do České sbírky mikroorganismů Brno (CCM). Tam byla podle svých biochemických a jiných vlastností později zařazena do druhu *Micrococcus lylae* a bylo jí přiděleno katalogové číslo CCM 4431.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

10 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo popsat produkci bakteriálních pigmentů, jejich rozdělení a aplikaci, typy bakteriálních pigmentů a faktory ovlivňující jejich produkci.

Cílem praktické části práce bylo zkoumání vlivu vnějších faktorů na produkci modrého pigmentu kulturou *Micrococcus lylae* CCM 4431. Pigmentu byl dán pracovní název lylein. Byl zjišťován charakter lyleinu při růstu kultury na pevném a tekutém kultivačním médiu, zjištění významu glukosy v živném médiu, produkce lyleinu v závislosti na době kultivace, otestování kultivačních teplot pro produkci lyleinu, ověření linearitu spektrofotometrického stanovení lyleinu, ověření možnosti zjednodušení přípravy TYA agarů s glukosou, ověření tvorby lyleinu při kultivaci na minerálních a obohacených agaroch a ověření růstu kultury na TYA agaru s glukosou v závislosti na pH.

11 MATERIÁL A METODIKA PRÁCE

V bakalářské práci byla použita kultura *Micrococcus lylae* CCM 4431 z České sbírky mikroorganismů Brno (CCM), která byla následně uchovávána v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické.

11.1 Kultivační média a přístrojové vybavení

11.1.1 Kultivační média

TYA agar (Tryptone yeast extract agar)

Při přípravě živné půdy byl použit TYA agar (HiMedia, Indie) a jeho konkrétní množství bylo smícháno s destilovanou vodou. Po dokonalém rozpuštění byl agar sterilizován v autoklávu při 125 °C při zvýšeném tlaku vodních par po dobu 25 minut. Po sterilizaci se agar ochladil na cca 60 °C a byl rozlit do připravených sterilních Petriho misek tak, aby vzniklá vrstva byla vhodná pro kultivace při konkrétním pokusu.

V mé praktické práci bylo využíváno dvou typů TYA agarů, a to TYA agar s glukosou (TG agar) nebo TYA agar bez glukosy. Pro přípravu TYA agaru bez glukosy bylo naváženo 2,1 g agaru a ten byl smíchán se 100 ml destilované vody. Pro přípravu TYA agaru s glukosou bylo naváženo 2,1 g agaru a ten byl smíchán s 90 ml destilované vody.

TYA agar s glukosou byl připravován dvěma způsoby. Prvním způsobem byla příprava, kdy se 10 ml roztoku 10% glukosy přidalo před sterilizací a druhý způsob, kdy se 10 ml sterilního 10% roztoku glukosy přidalo po sterilizaci. Koncentrace glukosy tak byla vždy 10 g/l. Složení základního TYA agaru je uvedeno v následující tabulce (tab. 4).

Tabulka 4 – Složení TYA agaru

Agar	12 g/l
Enzymatický hydrolyzát kaseinu	6 g/l
Prášek z kvasničného extraktu	3 g/l

Výsledné pH při 25 °C $7,2 \pm 0,2$

Minerální agar

Navážka minerálního agaru (MA) byla 1,9 g a byla rozpuštěna v 90 ml destilované vody. Minerální agar byl sterilizován při 125 °C po dobu 25 minut. Hodnota pH byla upravena v rozmezí hodnot 7,2 – 7,4. Složení minerálního agaru je uvedeno v následující tabulce (tab. 5).

Tabulka 5 – Složení minerálního agaru

K_2HPO_4	0,100 g
NH_4Cl	0,110 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,020 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 g
$CaCl_2$	0,002 g
Agar	1,600 g

Zásobní roztok stopových prvků

K některým pokusům byl využit zásobní roztok stopových prvků. Složení zásobního roztoku je uvedeno v následující tabulce (tab. 6).

Tabulka 6 – Složení zásobního roztoku stopových solí

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,043 g
H_3BO_3	0,057 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,043 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,037 g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,025 g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,040 g

Fyziologický roztok

K pokusům byl využíván fyziologický roztok, který byl připraven smícháním 8,5 g NaCl s 1000 ml destilované vody.

11.1.2 Přístrojové vybavení

Běžné laboratorní vybavení pro mikrobiologickou práci (zkumavky, odměrné válce, jednorázový plastový materiál), automatické pipety, pH metry, termostaty, inkubátory, centrifuga MR23i JOUAN, autoklávy, mikrobiologický laminární box II A – Telstar (Španělsko), UV-VIS spektrofotometr UNICAM UV 500, sterilní filtr s porozitou 0,2 μm Ahlstrom.

11.2 Zjištění charakteru lyleinu při růstu kultury na agarovém a v tekutém médiu

K pokusu byl použit tryptický bujon s kvasničným extraktem a glukosou (TG bujon). 2,1 g TYA agaru bylo smícháno s 90 ml destilované vody a po rozpuštění rozpustných složek byla směs přefiltrována přes papírový rychlofiltr. Poté roztok, který byl zbavený agaru, byl rozplněn po 18 ml do láhví o objemu 250 ml a byl sterilizován. Do láhví s TG bujonem bylo asepticky přidáno po 2 ml sterilního 10% roztoku glukosy a každá láhev byla zaočkována kulturou *M. lylae*4431. Kromě toho byly připraveny Petriho misky s TG agarem a v nich byly kovovou formou asepticky vyříznuty středové kruhy. Petriho misky byly masivně zaočkovány kulturou, avšak ne k okrajům agaru. Ve třech Petriho miskách byl vyříznut malý kruh (průměr 35 mm), do kterého bylo napipetováno 3 ml destilované vody a 150 μl 10% roztoku glukosy a ve třech dalších velký kruh (průměr 50 mm), do něžž bylo napipetováno 5 ml destilované vody a 250 μl 10% roztoku glukosy. Kultivace agarů i bujonů probíhala při 25 °C. Po 4 dnech bylo odebráno z láhví s TG bujonem do eppendorfků určité množství suspenze a buňky byly odstraněny centrifugací. Suspenze byla centrifugována po dobu 10 minut při 4 °C a 10 000 ot./min a supernatant byl přefiltrován. Z Petriho misek byly odebrány roztoky a přefiltrovány. Oba typy získaných roztoků s barvivem byly proměřeny při 200 – 800nm na UV – VIS spektrofotometru.

11.3 Zjištění významu glukosy v živném médiu

K tomuto pokusu byly využity kombinace TYA agaru, glukosy, sacharosy a glycerolu.

- a) TYA agar: 2,1 g základu +100 ml destilované vody. Sterilizace.
- b) TYA agar s glukosou: 2,1 g základu + 90 ml destilované vody, po sterilizaci přidáno 10 ml roztoku glukosy o koncentraci 10%.
- c) TYA agar se sacharosou: 2,1 g základu + 1 g bezvodé sacharosy + 100 ml destilované vody. Sterilizace.
- d) TYA agar s glycerolem: 2,1 g základu + 1 g glycerolu + 100 ml destilované vody. Sterilizace.

Po sterilizaci v autoklávu byl rozlit každý živný agar po 20 ml do Petriho misek (bylo využito sterilních válečků).

Byla připravena hustá suspenze kultury 4431 ve sterilním fyziologickém roztoku.

Na 4 misky z každého typu agaru byla naočkována kultura 4431 křížovým roztěrem s použitou připravenou suspenzí. Pro nanesení oválu (pecky) byla použita vždy stejná klička. Každá Petriho miska tak byla zaočkována přibližně stejným inokulem.

Kultivace misek probíhala při 30 °C s odečtem po 2-3-4-7 dnech.

11.4 Zjištění produkce lyleinu v průběhu kultivace

K tomuto pokusu byl použit TYA agar s glukosou 10 g/l.

Po sterilizaci v autoklávu byl živný agar rozlit po 50 ml do 8 Petriho misek za využití sterilního válečku. Byla připravena velmi hustá suspenze kultury 4431 ve sterilním fyziologickém roztoku. Asepticky byly vykrojeny středy agarů a byly vyjmuty. Agary byly naočkovány definovaným množstvím kultury (cca 0,5 cm od okraje výřezů). Do vykrojených středů bylo nepipetováno po 5 ml sterilní destilované vody s 250 µl 10% roztoku glukosy. Misky byly opatrně vloženy do termostatu na 30 °C. Po 24 hodinách kultivace byla odebrána sterilními špičkami kapalina a byl zjištěn její objem, následně byla kapalina centrifugována a byla změřena absorbance při vlnové délce 601 a 605 nm. Po každém odebrání bylo do středu opět napipetováno 5 ml sterilní destilované vody a 250 µl 10% roztoku glukosy. Postup byl opakován po 24 hodinách a v případě, že došlo k intenzivnímu zbarvení, bylo nutno před měření absorbance roztok definovaně zředit destilovanou vodou 1:1 nebo 1:2.

11.5 Ověření kultivačních teplot pro produkci lyleinu

K tomuto pokusu byl opět použit TYA agar s glukosou. Po sterilizaci v autoklávu byl živný agar rozlit po 20 ml do 10 Petriho misek za použití sterilních odměrných válečků.

Byla připravena hustá suspenze 4431 ve sterilním fyziologickém roztoku. Na 9 misek byla naočkována křížovým roztěrem připravená suspenze. Pro nanesení oválu byla použita vždy stejná klička. Každá Petriho miska byla zaočkována přibližně stejným inokulem. Kultivace misek probíhala při 25, 30 a 37 °C. Odečet misek probíhal průběžně a byl fotograficky dokumentován. Dokumentace probíhala po 3-4-7 dnech.

11.6 Ověření linearity spektrofotometrického stanovení lyleinu

TYA agar s glukosou byl rozlit po 50 ml do 4 Petriho misek. Středky agaru byly vykrojeny vykrajovátkem a bylo do nich nadávkováno 5 ml sterilní destilované vody s přídavkem 250 µl 10% roztoku glukosy. Misky byly inkubovány při 30 °C. Po 3 dnech kultivace byly misky prohlédnuty a byl z nich odebrán roztok barviva. Roztok barviva byl přefiltrován přes sterilní filtr s porozitou 0,2 µm do čisté zkumavky (koncentrát = vzorek K). Hypoteticky bylo uvažováno o koncentraci barviva ve vzorku K 100 mg/l. Ze vzorku „K“ byly do dalších 12 zkumavek připraveny vzorky číslo 1-12, které byly ředěny destilovanou vodou. Ředění vzorků je uvedeno v následující tabulce (tab. 7).

Tabulka 7 – Ředění vzorků

Vzorek	Ředění	Fiktivní koncentrace [mg/l]	Provedení ředění	
			Objem K	Objem vody [ml]
K	-	100,0	2,0 ml	-
1	2 : 1	66,7	1,0 ml	0,5
2	1 : 1	50,0	1,0 ml	1,0
3	1 : 2	33,3	1,0 ml	2,0
4	1 : 3	25,0	1,0 ml	3,0
5	1 : 4	20,0	0,5 ml	2,0
6	1 : 5	16,7	0,5 ml	2,5
7	1 : 7	12,5	0,5 ml	3,5
8	1 : 9	10,0	200,0 µl	1,8
9	1 : 12	7,7	200,0 µl	2,4
10	1 : 19	5,0	100,0 µl	1,9
11	1 : 39	2,5	100,0 µl	3,9
12	1 : 99	1,0	100,0 µl	9,9

Po přípravě vzorků 1-12 byla proměřena u vzorku číslo 4 spektrální křivka při 200 – 800nm a bylo tak zjištěno absorpční maximum při 599 nm. Následně byla sestavena křivka závislosti absorpce na fiktivní koncentraci.

11.7 Ověření možnosti zjednodušené přípravy TYA agarů s glukosou

K následujícímu pokusu byly použity 2 agary. První agar byl připraven klasickým způsobem: navážka TYA agarů 2,1 g s 90 ml destilované vody byla sterilizována v mikrovlnném (MW) sterilizátoru, a poté bylo sterilně přidáno 10 ml roztoku glukosy o koncentraci 10 %.

Druhý agar byl připraven zjednodušeným způsobem: k navážce TYA agaru 2,1 g s 90 ml destilované vody bylo přidáno 10 ml roztoku glukosy o koncentraci 10 %. Poté bylo sterilizováno v MW sterilizátoru. Po sterilizaci v MW sterilizátoru byl každý živný agar rozlit po 20 ml do 5 Petriho misek za pomoci sterilních odměrných válečků. Následně byla připravena hustá suspenze kultury 4431 ve sterilním fyziologickém roztoku. Na 3 misky z každého typu agaru bylo křížový roztěrem naočkovaná suspenze, která byla před použitím vždy promíchána. Pro nanesení oválu byla použita vždy stejná klička. Každá Petriho miska byla zaočkována přibližně stejným inokulem. Kultivace misek probíhala při 30 °C, odečet probíhal za 3-5 dní a vizuálně byla hodnocena míra růstu kultury a produkce barviva.

11.8 Ověření tvorby lyleinu při kultivaci na minerálních a obohacených agarech

K jednotlivým pokusům byly vyžity kombinace minerálního média s vitamíny, glukosou, kvasničným extraktem a tryptonem.

1. TYA agar s glukosou, 100 ml, připravený klasickým způsobem: navážka TYA agaru 2,1 g + 90 ml destilované vody
2. MA + glukosa, 100 ml, navážka MA agaru 1,9 g + 90 ml destilované vody
3. MA + glukosa + vitamíny, 100 ml, navážka MA agaru 1,9 g + 90 ml destilované vody (po sterilizaci bylo asepticky přidáno 0,5 ml MEM vitamínů)
4. MA + glukosa, trypton a vitamíny, 100 ml, navážka MA agaru 1,9 g + 0,6 g tryptonu + 90 ml destilované vody (po sterilizaci bylo asepticky přidáno 0,5 ml MEM vitamínů)
5. MA + glukosa, kvasničný extrakt a vitamíny, 100 ml, navážka MA agaru 1,9 g + 0,3 g kvasničného extraktu powder + 90 ml destilované vody (po sterilizaci bylo asepticky přidáno MEM vitamínů 0,5 ml)
6. MA + glukosa + trypton + kvasničný extrakt a vitamíny, 100 ml, navážka MA agaru 1,9 g + 0,6 g tryptonu + 0,3 g kvasničného extraktu powder + 90 ml destilované vody (po sterilizaci bylo asepticky přidáno MEM vitamínů 0,5 ml)

K minerálním médiím č. 2 – 6 byl přidán roztok stopových prvků o objemu 200 µl.

Po sterilizaci v autoklávu byly agary uchovávány v chladničce. Po rozvaření v mikrovlnce byly agary ponechány na vychladnutí na 60-70 °C. Poté bylo sterilně do agarů přidáno 3-6

po 0,5 ml MEM vitamínů a pak bylo do všech agarů sterilně přidáno 10 ml čerstvě přefiltrovaného roztoku glukosy o koncentraci 10 %. Agary byly dokonale promíchány a rozlity po 20 ml do 5 Petriho misek za využití sterilních odměrných válečků. Byla připravena hustá suspenze kultury 4431 ve sterilním fyziologickém roztoku. Na 3 misky z každého typu agarů byla kultura naočkována křížovým roztěrem. K očkování byla použita připravená suspenze, která byla vždy před použitím promíchána. Pro nanesení oválu byla použita vždy stejná klička. Každá Petriho miska byla naočkována přibližně stejným inokulem. Kultivace misek probíhala při 30 °C a odečet probíhal za 3-5-7 dní a vizuálně byla hodnocena míra růstu kultury a produkce barviva.

11.9 Ověření růstu kultury a tvorby lyleinu při kultivaci na TYA agarech s glukosou v rozpětí pH 5-10

K pokusu byly použity TYA agary s glukosou. Byl 7x navážen TYA agar po 2,1 g a do 6 z nich byla přidána po 80 ml destilovaná voda. Do sedmého bylo přidáno 90 ml destilované vody a tento agar sloužil jako kontrola. Po přidávku destilované vody byly navážky rozpuštěny a na pH metru upraveny u jednotlivých agarů na pH hodnoty 5,2; 6,2; 7,2; 8,2; 9,2 a 10,2. U jednotlivých dávek agarů byly zaznamenávány objemy přidaného roztoku NaOH nebo HCl. Po úpravě pH byly připravované agary doplněny o zbývající destilovanou vodou (10 ml, s odečtem objemu roztoku, použitého pro úpravu pH). Agary byly poté sterilizovány. Po sterilizaci byly agary další den rozvařeny v mikrovlnce a po mírném ochlazení bylo přidáno 10 ml roztoku glukosy do všech agarů. Agary byly rozlity po 20 ml na misky. Poté byla připravena hustá suspenze kultury 4431 ve sterilním fyziologickém roztoku. Na 3 misky z každého typu agarů byla naočkována křížovým roztěrem připravená suspenze, která byla před použitím promíchána. Pro nanesení oválu byla použita vždy stejná klička. Každá Petriho miska byla zaočkována přibližně stejným inokulem. Kultivace misek probíhala při 30 °C, růst byl odečítán po 3-5-7 dnech a vizuálně byla hodnocena míra růstu kultury a hlavně produkce barviva. V následující tabulce jsou uvedeny přídatky HCl a NaOH k úpravě pH agarů (tab. 8).

Tabulka 8 – Přídavky HCl a NaOH k úpravě pH agarů a přidavek vody při přípravě

Konečné pH	HCl[ml]	NaOH[ml]	H₂O [ml]
5,2	0,2	-	9,68
6,2	0,32	-	9,8
7,2	-	0,25	9,75
8,2	-	0,85	9,15
9,2	-	1,75	8,25
10,2		2,3	7,7

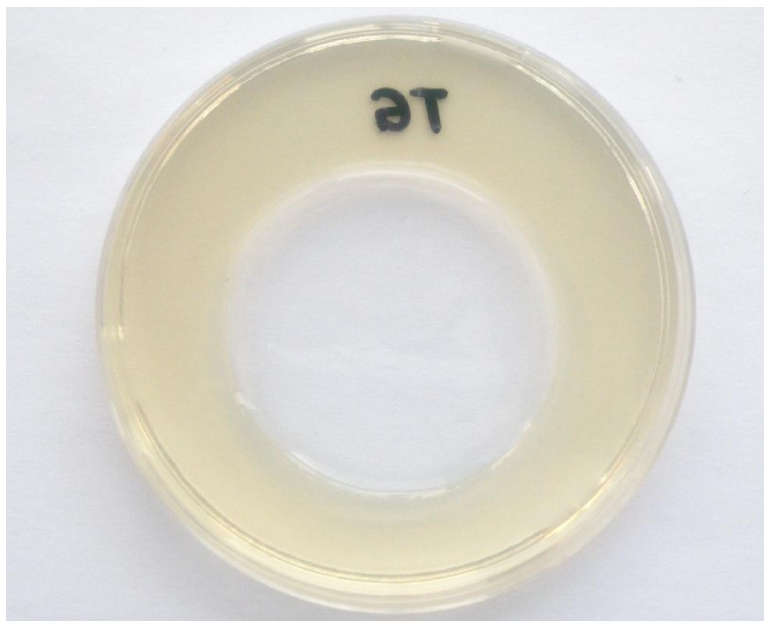
12 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem praktické části práce bylo zkoumání vlivu vnějších faktorů na produkci modrého pigmentu kulturou *Micrococcus lylae* CCM 4431. Byl zjišťován charakter pigmentu lyleinu při růstu kultury na pevném a tekutém kultivačním médiu, zjištění významu glukosy v živném médiu, produkce lyleinu v závislosti na době kultivace, otestování kultivačních teplot pro produkci lyleinu, ověření linearitě spektrofotometrického stanovení lyleinu. Dále ověření možnosti zjednodušení přípravy TYA agarů s glukosou, ověření tvorby lyleinu při kultivaci na minerálních a obohacených agaroch o glukosu, trypton, kvasničný extrakt, vitamíny, stopové prvky a na závěr ověření růstu kultury na TYA agaru s glukosou v závislosti na pH.

12.1 Zjištění charakteru lyleinu při růstu kultury na agarovém a v tekutém médiu

V pokusu byl sledován charakter růstu pigmentu při růstu kultury na pevném a v tekutém médiu. Jako pevné médium byl použit TG agar (= TYA agar s 10 g glukosy/l) a jako tekuté médium byl použit TG bujon, který byl s výjimkou agaru co do složení zcela identický. Roztoky byly po kultivaci proměřeny na UV-VIS spektrofotometru při 200 – 800nm. Výsledky byly zaznamenány fotodokumentací a pomocí grafu.

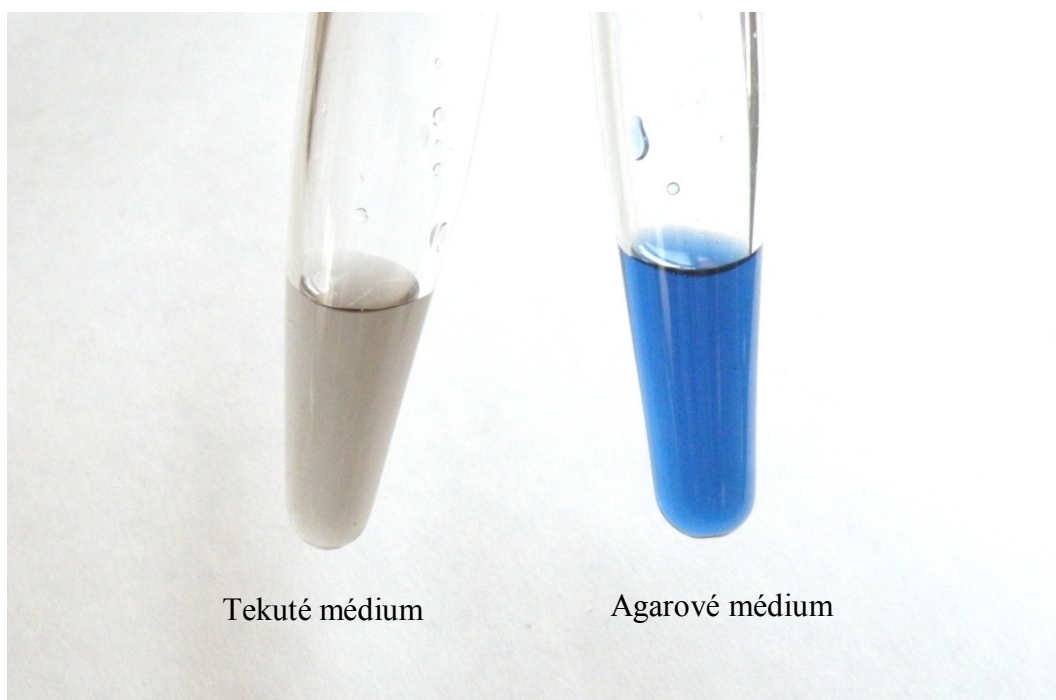
12.1.1 Charakter pigmentu po 3 dnech růstu kultury na agarovém a v tekutém médiu



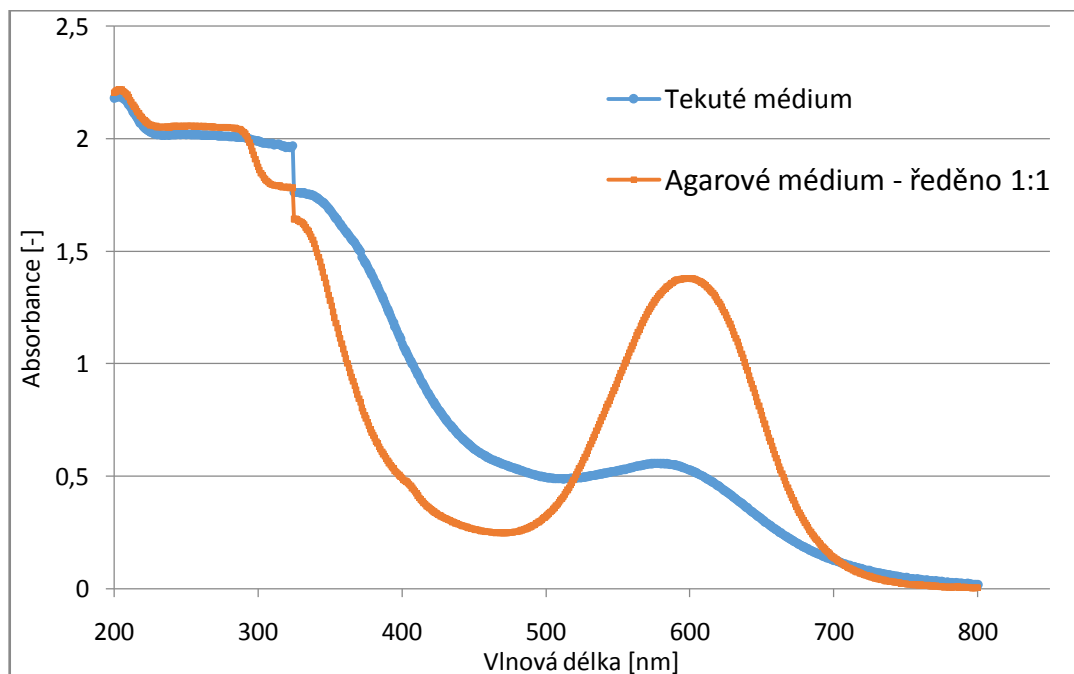
Obrázek 1 – TG agar, s vykrojeným středem o průměru 50 mm – zahájení kultivace



Obrázek 2 – Produkce pigmentu po 3 dnech na TG agaru s vykrojeným středem o průměru 35 mm



Obrázek 3 – Charakter pigmentu po 3 dnech růstu na agarovém a v tekutém médiu

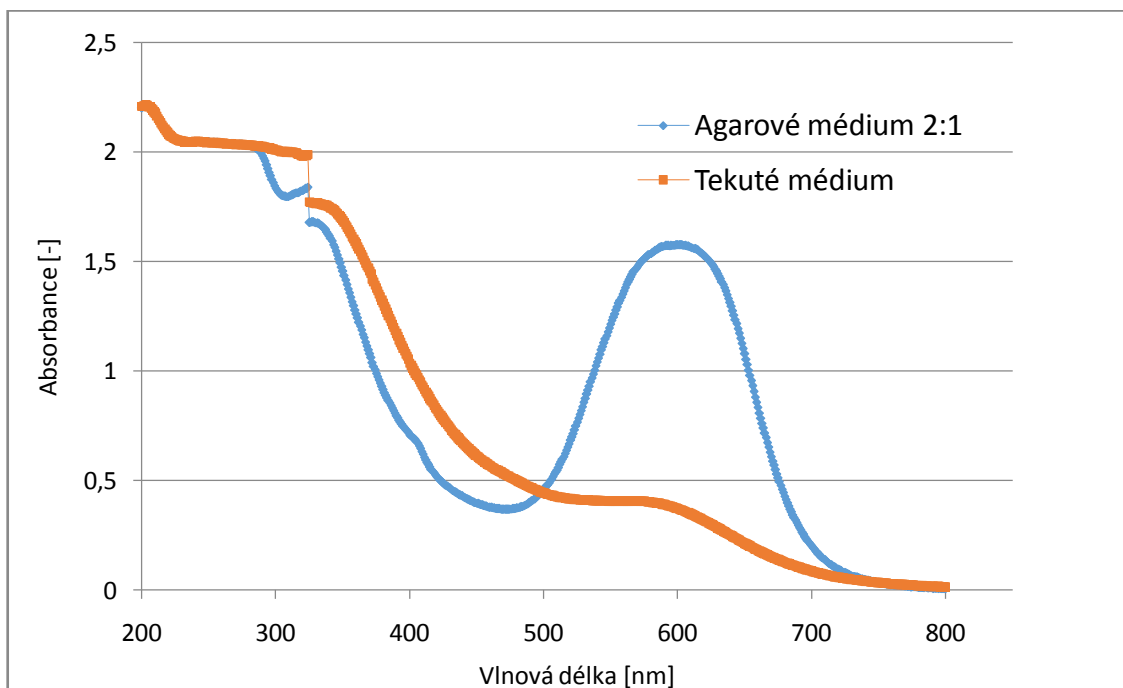


Obrázek 4 – Závislost absorbance na vlnové délce u pigmentu získaného kultivací v tekutém a agarovém médiu po 3 dnech kultivace

12.1.2 Charakter pigmentu po 5 dnech růstu kultury na agarovém a v tekutém médiu



Obrázek 5 – Charakter pigmentu po 5 dnech kultivace kmene na agarovém a v tekutém médiu



Obrázek 6 – Závislost absorbance na vlnové délce u pigmentu získaného kultivací v tekutém a agarovém médiu po 5 dnech kultivace

Na obrázku 3 je znázorněno srovnání získaného pigmentu po kultivaci v tekutém médiu a na pevném médiu po 3 dnech kultivace. Z obrázku 3 je patrné, že v tekutém médiu buď nebyl pigment produkován (na rozdíl od pevného média, kde došlo k sytě modrému zbarvení), nebo byl pigment buňkami v tekutém médiu následně modifikován tak, že pozbyl modrého zbarvení. Na obrázku 5 je obdobně znázorněno srovnání modrého pigmentu získaného v tekutém médiu, na pevném médiu po naředění 1 : 2 a na pevném médiu v neředěném stavu, po 5 dnech kultivace. Z obrázku 5 je také patrné, že po 5 dnech byla produkce modrého pigmentu výraznější než po 3 dnech, z toho důvodu byl pigment při měření absorbance naředěn 1 : 2.

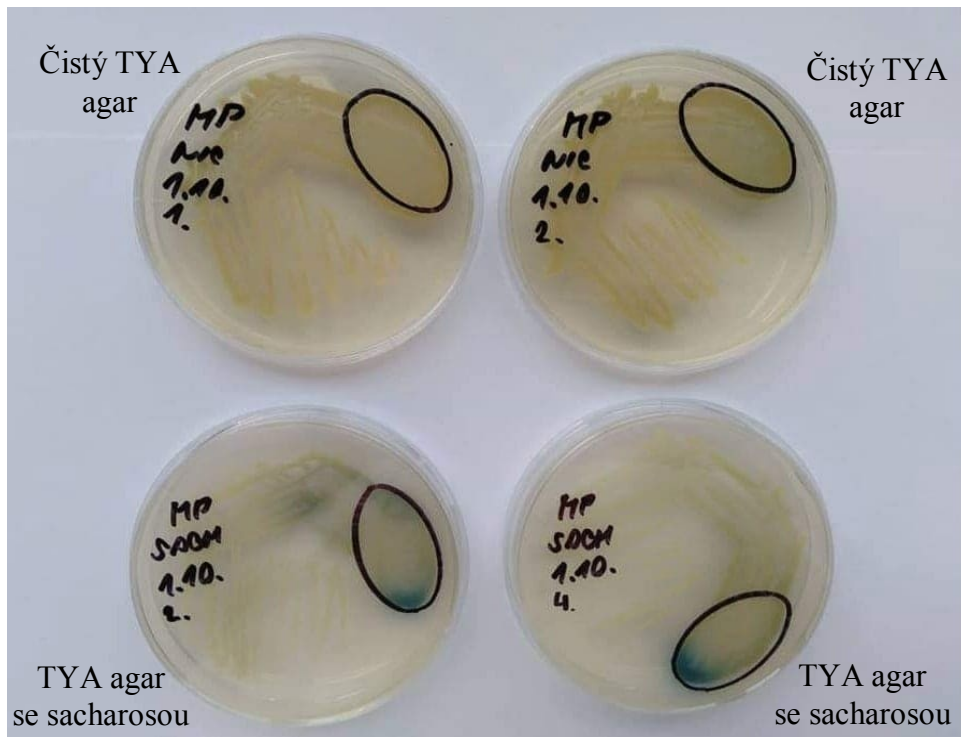
Roztoky byly proměřeny na spektrofotometru a byla sestavena závislost absorbance na vlnové délce. Jak je patrné z obrázku 4 - po kultivaci v tekutém médiu po 3 dnech kultivace byla zaznamenána maximální hodnota absorbance 0,5591 při vlnové délce 576 nm a po kultivaci na pevném médiu byla hodnota maximální absorbance 1,3803 při vlnové délce 598 nm. V tekutém médiu po 5 dnech kultivace nebylo možno odečíst maximální hodnotu absorbance a na pevném médiu byla i při ředění 1 : 2 zaznamenána maximální hodnota absorbance 1,577 při vlnové délce 600 nm, jak je patrné z obrázku 6.

Pokus ukázal, že produkce pigmentu výrazně modré barvy je silně závislá na oddělení produkováného pigmentu od buněk kultury, což v tekutém prostředí při promíchávání média, není možné. Toto je však možné zabezpečit kultivací na pevném agarovém médiu, kde vytvořený pigment difunduje od produkčních buněk agarovým médiem, je tak od nich oddělen a lze jej pak získat v nezměněné formě v roztoku, ve vyříznutém centru misek.

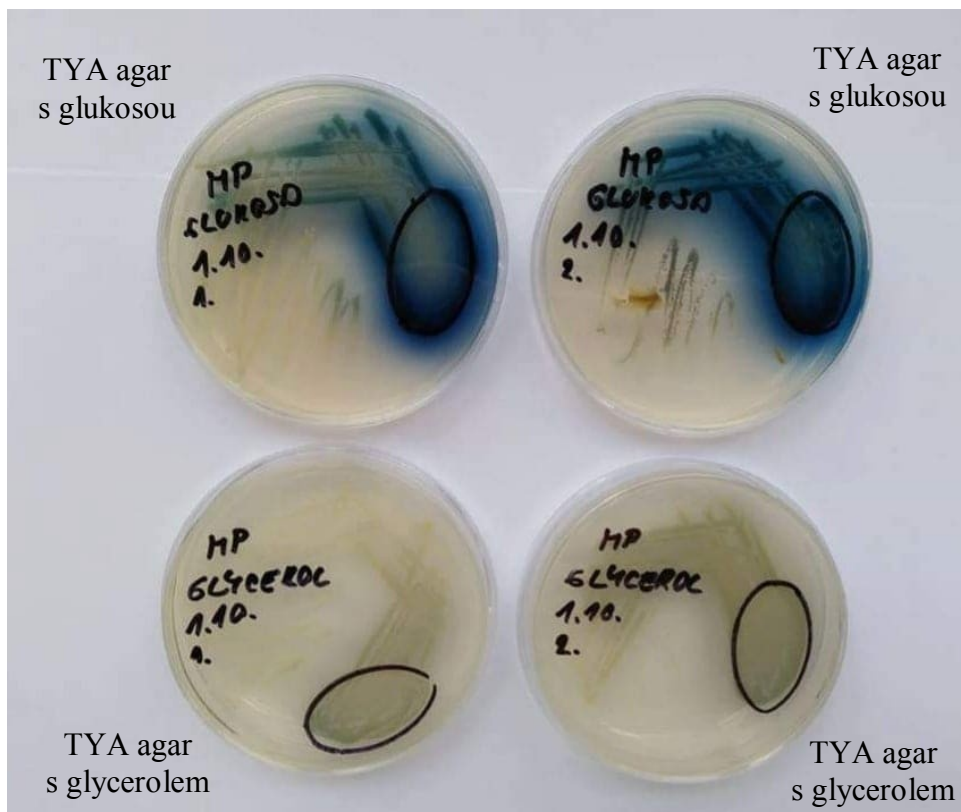
12.2 Zjištění významu glukosy v živném médiu

V pokusu byl sledován vliv glukosy, sacharosy a glycerolu v živném médiu na růst kultury a produkci pigmentu. Kultivace misek probíhala při 30 °C s odečtem po 2, 3, 4 a 7 dnech.

12.2.1 Vyhodnocení po 2 dnech kultivace

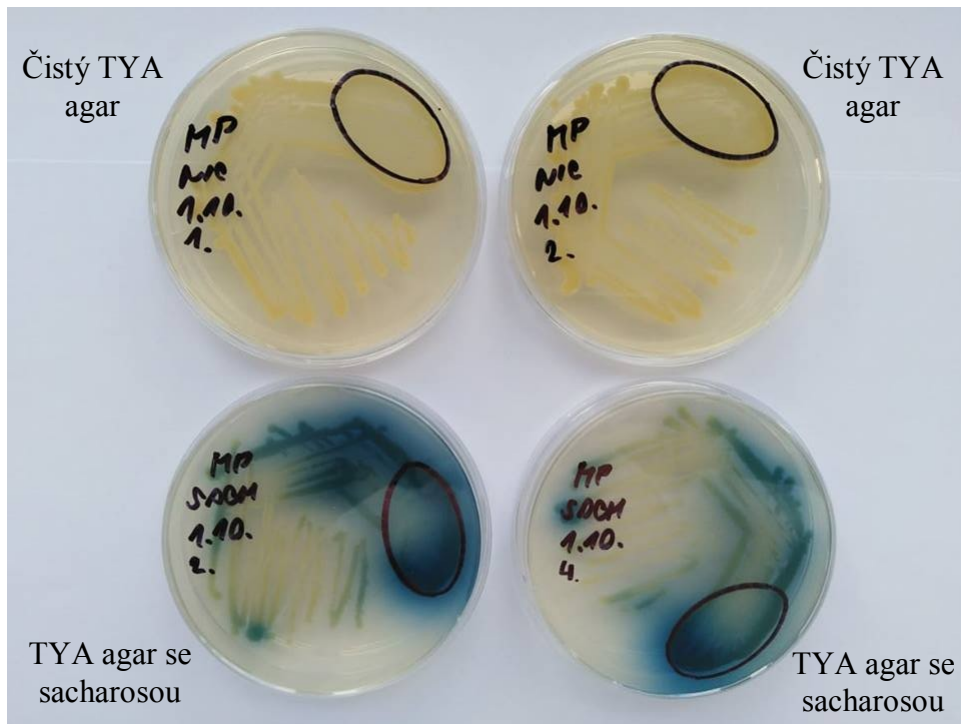


Obrázek 7 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou

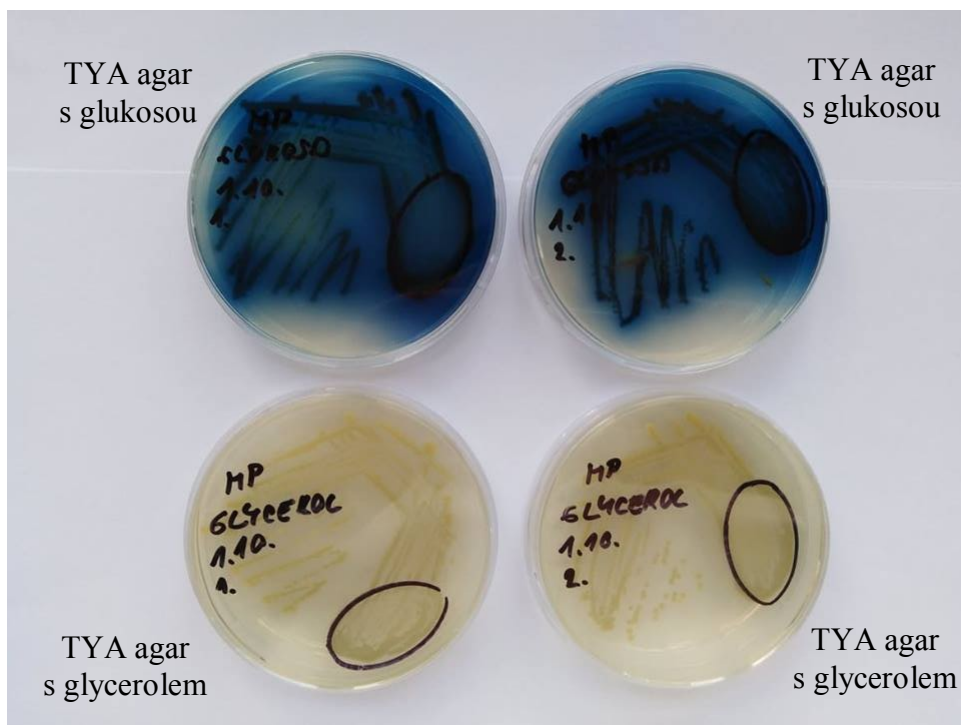


Obrázek 8 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem

12.2.2 Vyhodnocení po 3 dnech kultivace

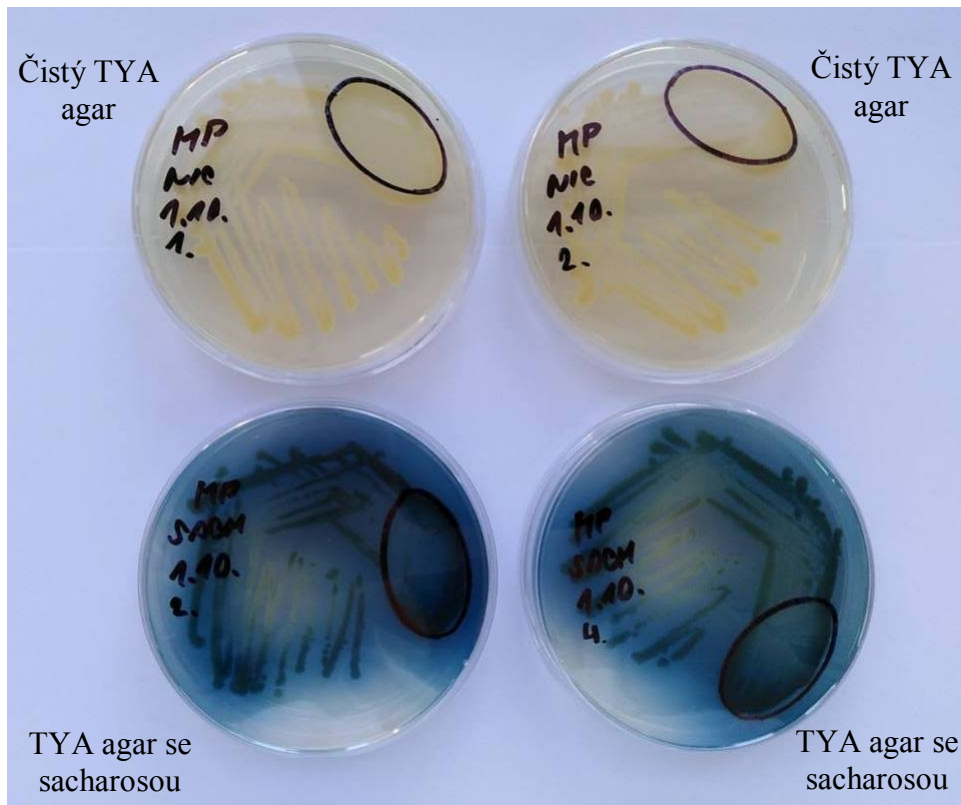


Obrázek 9 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou

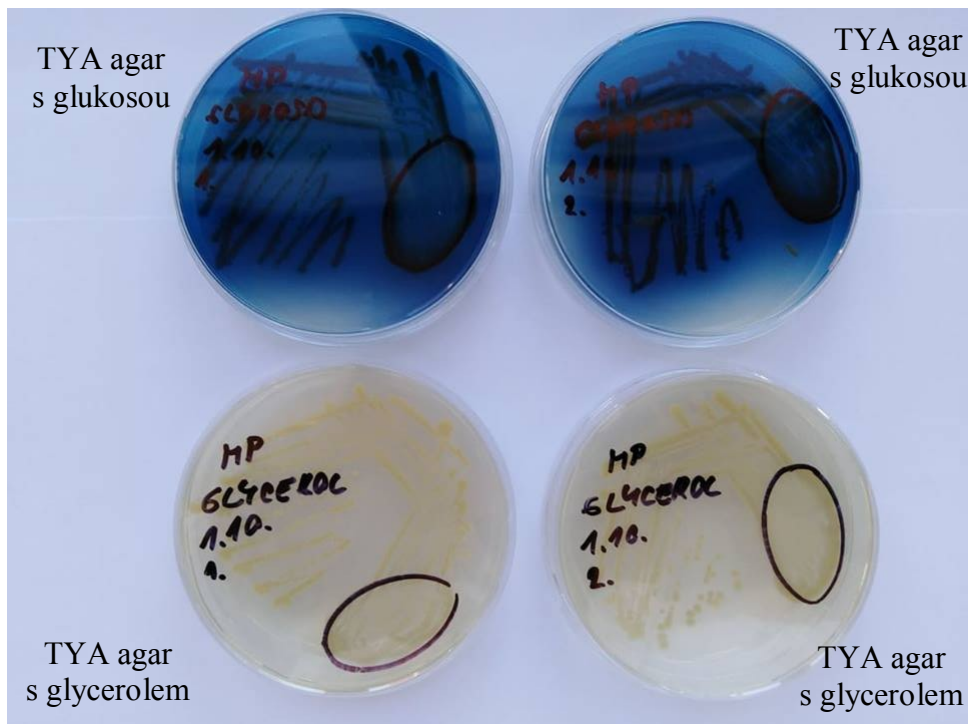


Obrázek 10 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem

12.2.3 Vyhodnocení po 4 dnech kultivace

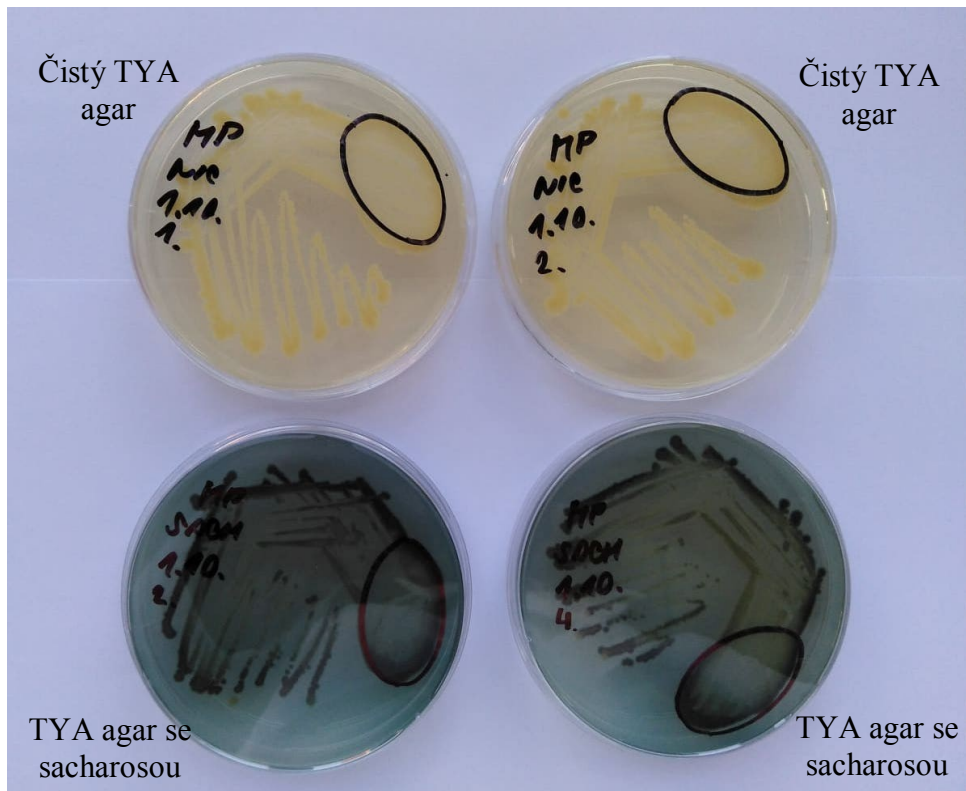


Obrázek 11 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou

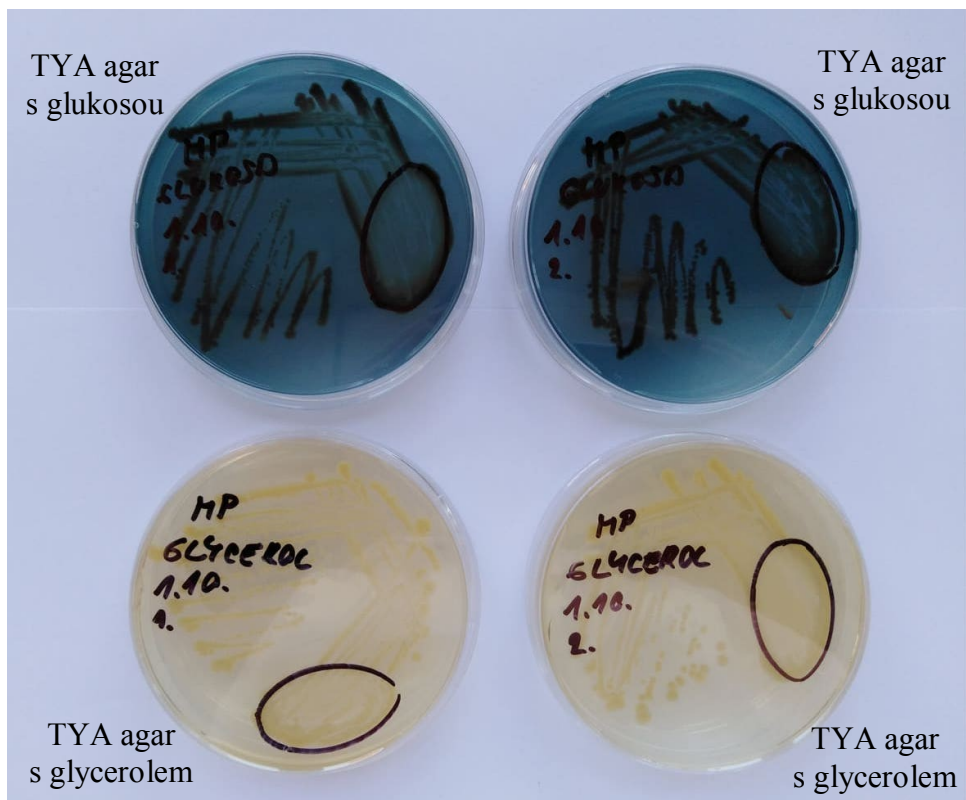


Obrázek 12 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem

12.2.4 Vyhodnocení po 7 dnech kultivace



Obrázek 13 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou



Obrázek 14 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem

Na obrázku 7-8 je znázorněn růst kultury a tvorba pigmentu po 2 dnech kultivace - na čistém TYA agaru a na agaru TYA s glycerolem se neprojevila žádná produkce pigmentu. Na TYA agaru se sacharosou se projevila tvorba pigmentu v malé míře na rozdíl od misek s TYA agarem s glukosou, kde byl pigment rozšířen i za hranicí inokula.

Na obrázku 9-10 je znázorněn růst kultury a tvorba pigmentu po 3 kultivace na čistém TYA agaru a na glycerolu se neprojevila žádná tvorba pigmentu. Rozšíření pigmentu na TYA agaru se sacharosou proběhlo i za hranici inokula. Na TYA agaru s glukosou se pigment rozšířil téměř po celé Petriho misce. Sytost modrého pigmentu byla více zřetelná na TYA agaru s glukosou než se sacharosou.

Na obrázku 11-12 je znázorněna situace po 4 dnech kultivace - na čistém TYA agaru a na glycerolu se neobjevil žádný pigment. Rozšíření pigmentu na TYA agaru se sacharosou bylo na celé na Petriho misce. To samé bylo pozorováno na TYA agaru s glukosou s tím rozdílem, že na misce s glukosou byla viditelně sytější modrá barva než na misce se sacharosou.

Na obrázku 13-14 jsou znázorněny misky po jednom týdnu kultivace - na čistém TYA agaru a na glycerolu se neprojevilo žádný pigment. Na TYA agaru se sacharosou modrý pigment začal degradovat a měnil odstín z modré barvy do šedé. Na rozdíl od misky s glukosou, kde modrý pigment měnil odstín jen mírně.

12.3 Zjištění produkce lyleinu v průběhu kultivace

V pokusu byla zjišťována produkce lyleinu v průběhu kultivace na TYA agaru s glukosou s cílem optimalizovat délku kultivace. Byly naočkovány misky s TG agarem a do vyříznutých středů byl napipetován roztok destilované vody a glukosy. Po 1, 2, 3, 5 a 6 dnech kultivace byl roztok ze středů misek asepticky odebrán, změřen jeho objem a byla proměřena absorbance roztoku při 601 a 605 nm. V případě intenzivního zbarvení byl roztok zředěn. Absorbance je uvedena v následujících tabulkách (tab. 9-14).

Tabulka 9 – Měřená absorbance po 1 dnu kultivace

1. den			
Vzorek	Odebraný objem [ml]	Absorbance při 601 nm [-]	Absorbance při 605 nm [-]
1	4,8	0,011	0,015
2	4,7	0,011	0,015
3	4,7	0,012	0,015
4	4,8	0,011	0,015
5	4,7	0,011	0,015
6	4,5	0,012	0,016

Tabulka 10 – Měřená absorbance po 2 dnech kultivace

2. den			
Vzorek	Odebraný objem [ml]	Absorbance při 601 nm [-]	Absorbance při 605 nm [-]
1	4,6	0,214	0,211
2	4,7	0,116	0,113
3	4,5	0,143	0,140
4	4,7	0,159	0,156
5	4,8	0,700	0,690
6	4,8	0,840	0,820

Tabulka 11 – Měřená absorbance po 3 dnech kultivace

3. den (ředění 1 : 2)			
Vzorek	Odebraný objem [ml]	Absorbance při 601 nm [-]	Absorbance při 605 nm [-]
1	4,6	0,563	0,574
2	4,7	0,496	0,506
3	4,8	0,565	0,576
4	4,8	0,514	0,525
5	4,8	0,382	0,394
6	4,7	0,371	0,383

Tabulka 12 – Měřená absorbance po 4 dnech kultivace

4. den (ředění 1 : 2)			
Vzorek	Odebraný objem [ml]	Absorbance při 601 nm [-]	Absorbance při 605 nm [-]
1	4,4	0,942	0,940
2	4,6	0,928	0,927
3	4,5	1,028	1,028
4	4,7	0,923	0,922
5	4,5	0,810	0,810
6	4,6	0,862	0,861

Tabulka 13 – Měřená absorbance po 5 dnech kultivace

5. den (ředění 1 : 2)			
Vzorek	Odebraný objem [ml]	Absorbance při 601 nm [-]	Absorbance při 605 nm [-]
1	4,7	0,948	0,946
2	4,9	0,922	0,921
3	4,9	0,995	0,993
4	4,8	0,916	0,916
5	4,9	0,887	0,887
6	4,8	0,872	0,872

Tabulka 14 – Měřená absorbance po 6 dnech kultivace

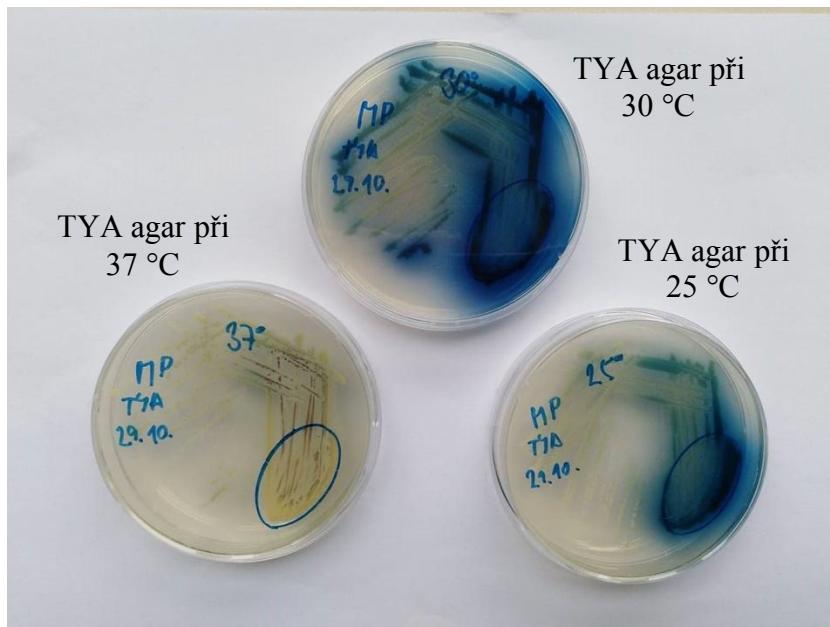
6. den (ředění 1 : 2)			
Vzorek	Odebraný objem [ml]	Absorbance při 601 nm [-]	Absorbance při 605 nm [-]
1	4,6	0,789	0,783
2	4,7	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	4,7	0,874	0,873
6	4,7	-	-

Z výsledků měření absorbance vyplývá, že se s dobou kultivace zvyšovala hodnota absorbance. Nebyly zaznamenány výrazné rozdíly mezi měřeními při vlnové délce 601 a 605 nm. Naměřená absorbance se pohybovala od prvního dne kultivace v hodnotách od 0,011 až po pátý den kultivace v hodnotách do 0,995. Po šestém dnu kultivace začala absorbance mírně klesat na hodnoty okolo 0,874; některé misky byly šestý den již kontaminovány a byly vyřazeny.

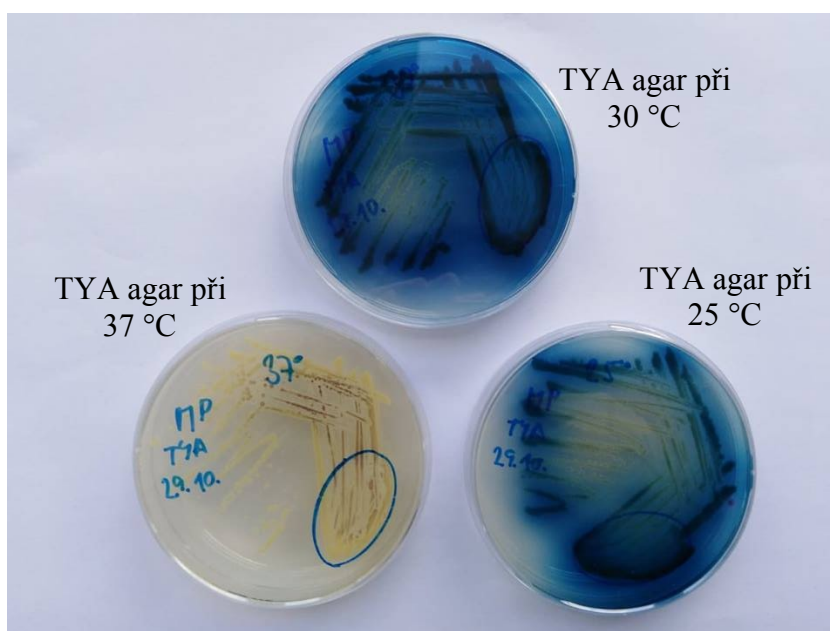
Pokus ukázal, že kultura je při kultivaci na TYA agaru s glukosou schopna produkovat značné množství pigmentu až do 5. dne kultivace.

12.4 Ověření kultivačních teplot pro produkci lyleinu

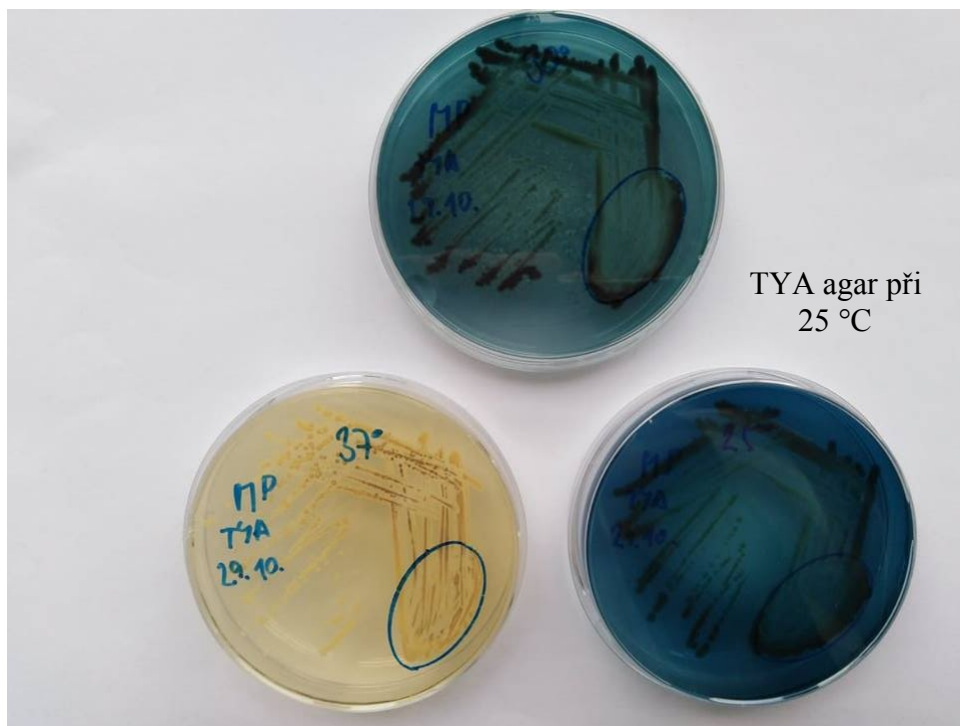
V pokusu byly ověřeny kultivační teploty pro produkci lyleinu na TYA agaru s glukosou (10 g/l). Kultivace probíhala při 25, 30 a 37 °C. Odečty probíhaly po 3, 4 a 7 dnech a jsou znázorněny na Ob. 15 – 17.



Obrázek 15 – Kultivace po 3 dnech při 25, 30 a 37 °C



Obrázek 16 – Kultivace po 4 dnech při 25, 30 a 37 °C



Obrázek 17 – Kultivace po 7 dnech při 25, 30 a 37 °C

Po kultivaci po 3 dnech bylo zjištěno, že produkce pigmentu je nejvýraznější na Petriho misce při teplotě 30 °C a rozšíření pigmentu bylo na více než polovině misky. Po kultivaci při 25 °C byl pigment rozšířen za hranici inokula a u kultivační teploty 37 °C nedošlo k žádné produkci pigmentu.

Po kultivaci po 4 dnech byl pigment rozšířen nejvíce na Petriho misce při 30 °C, byl rozšířen po celé misce. Při 25 °C byl pigment rozšířen zhruba z 80 %. Při 37 °C nedošlo k žádné tvorbě pigmentu.

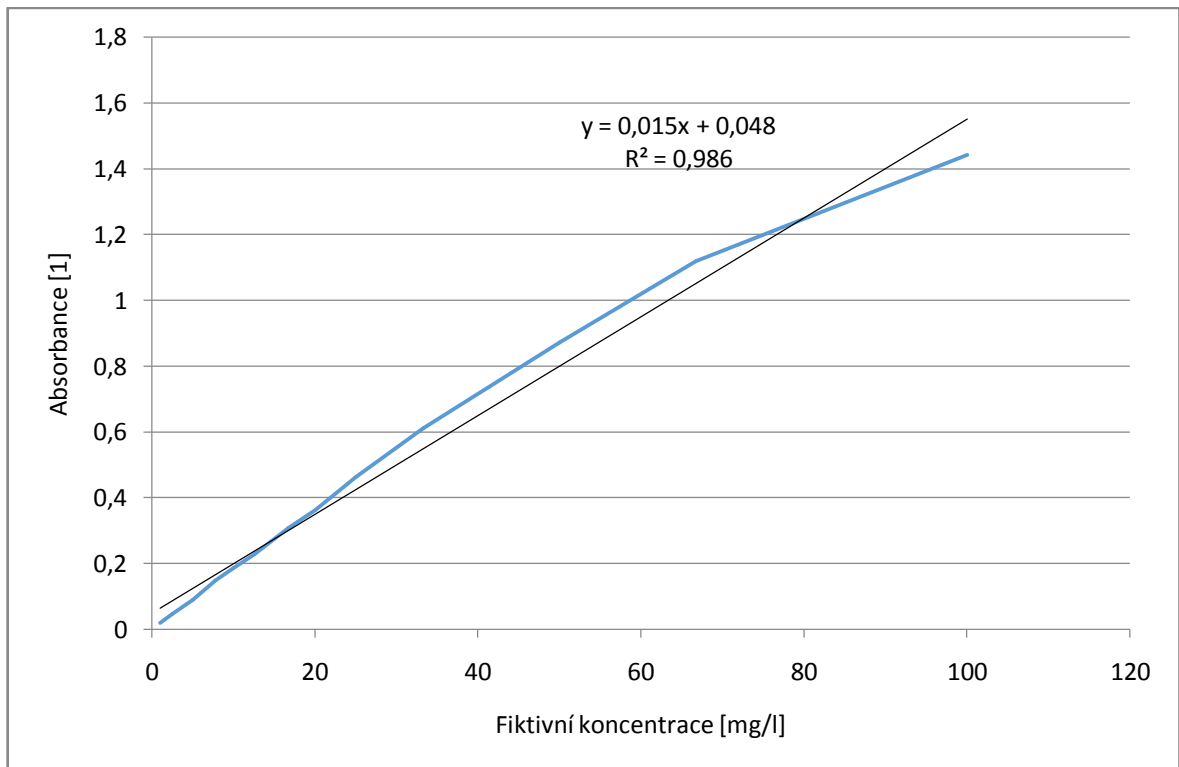
Po kultivaci po 7 dnech bylo zjištěno, že produkce pigmentu je nejvýraznější na misce při 25 °C, pigment byl rozšířen po celé misce. K výrazné produkci pigmentu docházelo také na misce při 30 °C, ovšem pigment již začal mírně degradovat a měnil svou barvu ze sytě modré na modrošedou. Při 37 °C k žádné tvorbě pigmentu nedošlo.

12.5 Ověření linearity spektrofotometrického stanovení pigmentu

V pokusu byla ověřována linearita spektrofotometrického stanovení pigmentu, po růstu kmene 4431 na TG agaru se středovými výřezy. Po získání roztoků pigmentu z centrů misek byla proměřena spektrální křivka u vzorku č. 4 při 200 – 800nm a bylo zjištěno absorpční maximum a při tomto maximu byly proměřeny všechny naředěné vzorky i neředěný vzorek „K“. Následně byla sestavena křivka závislosti absorbance na fiktivní koncentraci. V následující tabulce je uvedeno ředění vzorků a změřená absorbance (tab. 15).

Tabulka 15 – Ředění vzorků a naměřená absorbance

Vzorek	Ředění	Fiktivní koncentrace [mg/l]	Provedení ředění		Absorbance při 599 nm [-]	
			Objem K	Objem vody [ml]		
K	-	100,0	2,0 ml	-	1,442	1,442
1	2 : 1	66,7	1,0 ml	0,5	1,119	1,120
2	1 : 1	50,0	1,0 ml	1,0	0,873	0,873
3	1 : 2	33,3	1,0 ml	2,0	0,611	0,611
4	1 : 3	25,0	1,0 ml	3,0	0,462	0,463
5	1 : 4	20,0	0,5 ml	2,0	0,363	0,363
6	1 : 5	16,7	0,5 ml	2,5	0,308	0,307
7	1 : 7	12,5	0,5 ml	3,5	0,229	0,230
8	1 : 9	10,0	200,0 μ l	1,8	0,188	0,188
9	1 : 12	7,7	200,0 μ l	2,4	0,149	0,150
10	1 : 19	5,0	100,0 μ l	1,9	0,089	0,090
11	1 : 39	2,5	100,0 μ l	3,9	0,048	0,048
12	1 : 99	1,0	100,0 μ l	9,9	0,019	0,019



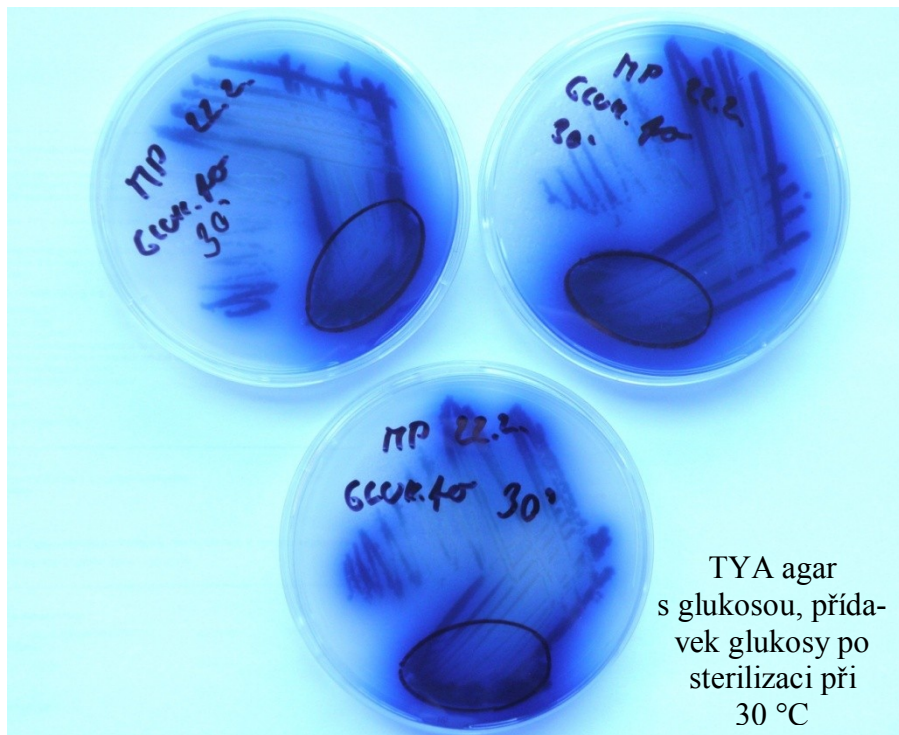
Obrázek 18 – Závislost absorbance na fiktivní koncentraci vzorku

Při proměření vzorku č. 4 bylo zjištěno, že absorpční maximum bylo při vlnové délce 599 nm. Z naměřených absorbancí všech vzorků byla sestavena křivka závislosti absorbance na fiktivní koncentraci. Z křivky vyplývá, že linearita případného spektrofotometrického stanovení lyeinu je nejlepší při absorbancích do 0,6, kde koeficient R^2 dosahuje hodnoty 0,9997; při vyšších hodnotách absorbance již tato není zcela přesně úměrná koncentraci látky.

12.6 Ověření možnosti zjednodušené přípravy živného agarů

V pokusu byla srovnávána příprava TG agarů zjednodušeným způsobem, kdy glukosa byla přidávána před sterilizací kultivačního média s metodou klasickou, kdy byla glukosa přidávána až po sterilizaci kultivačního média, a vliv na produkci pigmentu. Kultivace probíhaly při 30 °C a odečty byly provedeny po 3, 5 a 7 dnech kultivace.

12.6.1 Vyhodnocení přípravy TG agaru klasickým způsobem

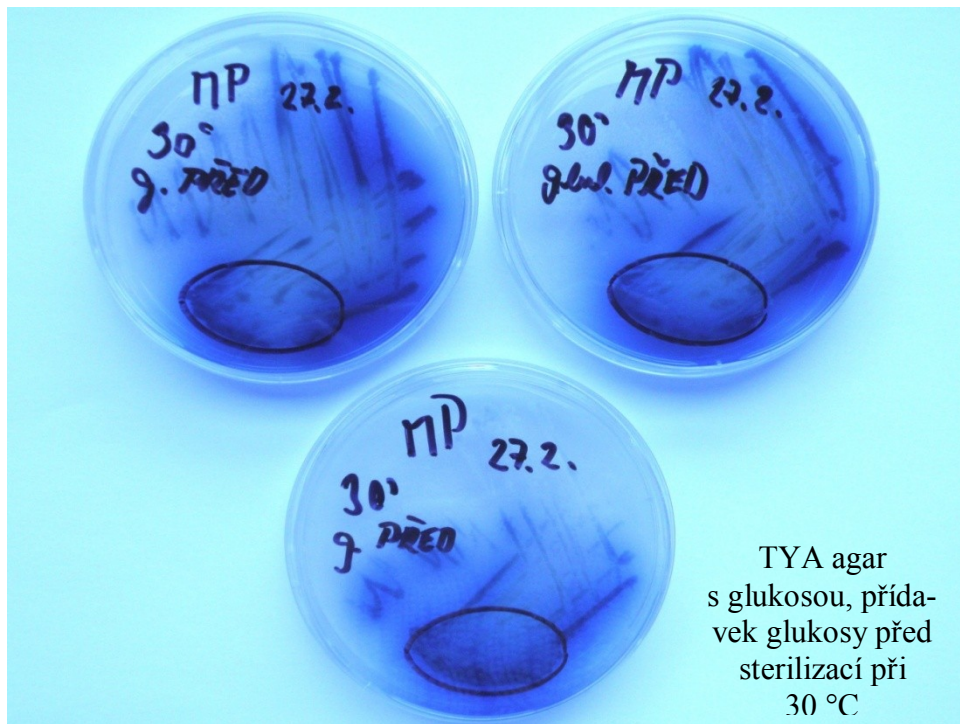


Obrázek 19 – Kultivace po 3 dnech

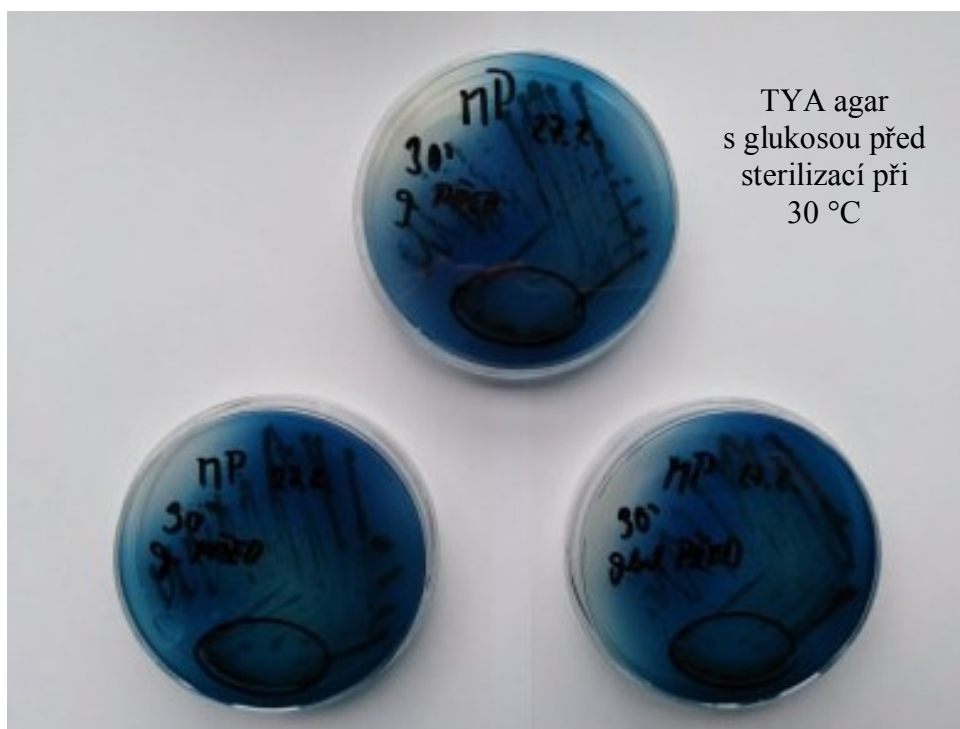


Obrázek 20 – Kultivace po 5 dnech

12.6.2 Vyhodnocení přípravy agarů zjednodušeným způsobem



Obrázek 21 – Kultivace po 3 dnech



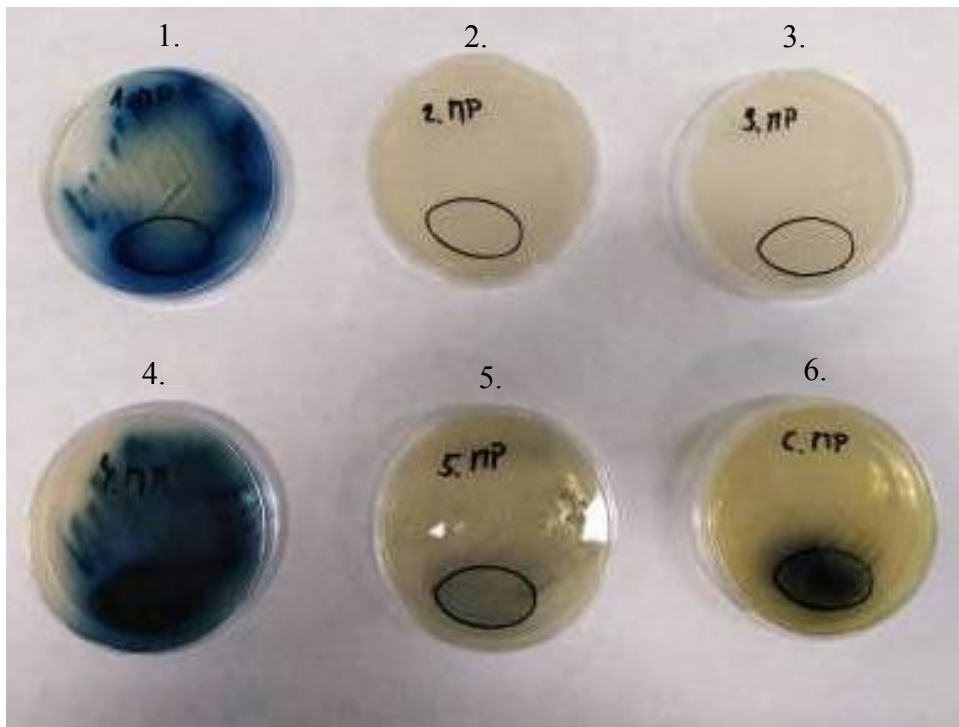
Obrázek 22 – Kultivace po 5 dnech

V tomto pokusu bylo zjištěno, že po kultivaci po 3 dnech na TYA agaru s glukosou připraveným klasickým způsobem se produkce pigmentu rozvinula po celé Petriho misce. Na miskách TYA agaru s glukosou připraveném zjednodušeným způsobem proběhlo rozšíření pigmentu téměř po celé misce. Výraznější produkce však nastala u TYA agaru s glukosou připraveným klasickým způsobem.

Po kultivaci po 5 dnech byl nárůst pigmentu výraznější než po 3 dnech, a to na obou způsobech přípravy TYA agaru s glukosou. Výraznější produkce pigmentu ovšem byla stále u způsobu přípravy klasickým způsobem.

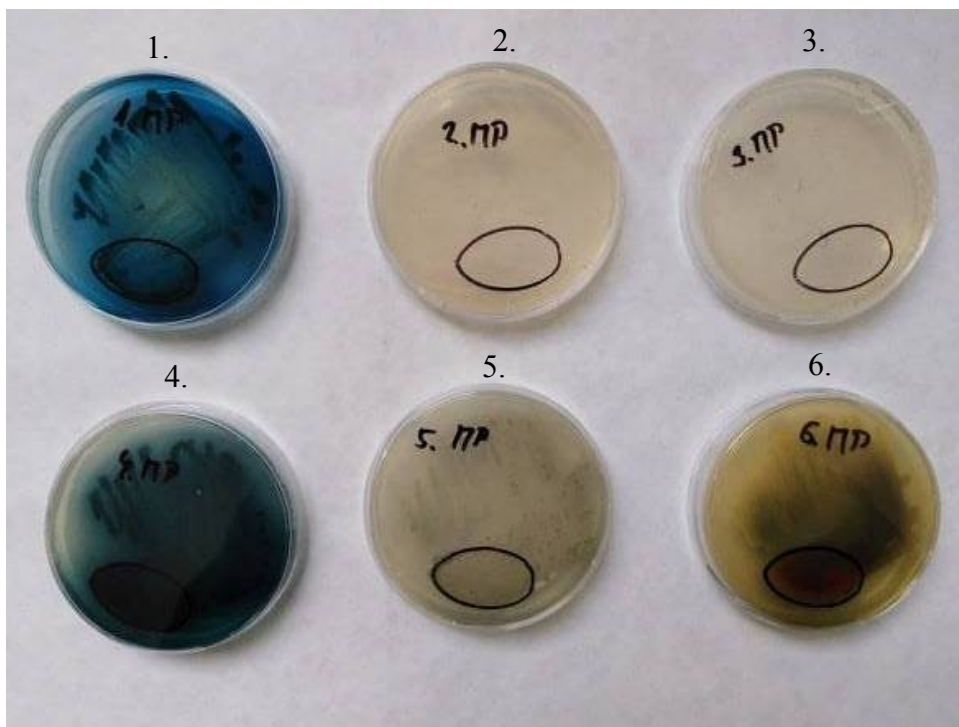
12.7 Ověření tvorby lyleinu při kultivaci na minerálních a obohacených médiích

V pokusu byla ověřována tvorba lyleinu při kultivaci na obohacených minerálních médiích. Kultivační média byla obohacována glukosou, vitamíny, tryptonem, stopovými prvky a kvasničným extraktem. Motivací bylo zjistit, která ze složek TYA agaru (trypton, kvasničný extrakt) je rozhodující pro produkci pigmentu a také to, zda je možné kulturu pěstovat na definovaně obohaceném minerálním agaru (MA). Kultivace probíhala při 30 °C a odečty byly provedeny po 3, 5 a 7 dnech.



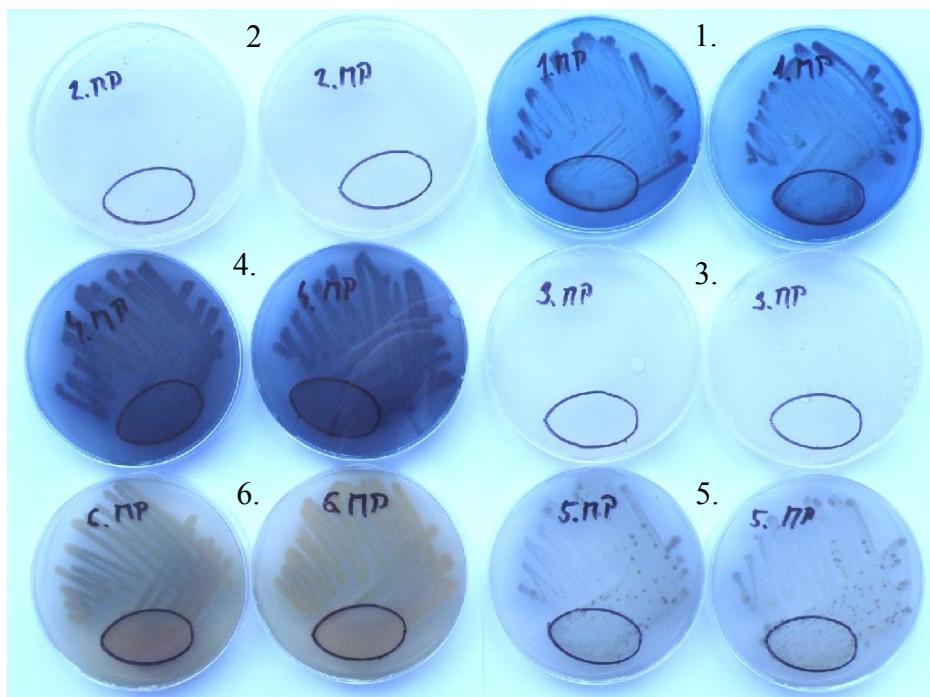
1. TYA agar s glukosou
2. MA s glukosou
3. MA s glukosou a vitamíny
4. MA s glukosou, tryptonem a vitamíny
5. MA s glukosou, kvasničným extraktem a vitamíny
6. MA s glukosou, tryptonem, kvasničným extraktem a vitamíny

Obrázek 23 – Kultivace po 3 dnech



1. TYA agar s glukosou
2. MA s glukosou
3. MA s glukosou a vitamíny
4. MA s glukosou, tryptonem a vitamíny
5. MA s glukosou, kvasničným extraktem a vitamíny
6. MA s glukosou, tryptonem, kvasničným extraktem a vitamíny

Obrázek 24 – Kultivace po 5 dnech



1. TYA agar s glukosou
2. MA s glukosou
3. MA s glukosou a vitamíny
4. MA s glukosou, tryptonem a vitamíny
5. MA s glukosou, kvasničním extraktem a vitamíny
6. MA s glukosou, tryptonem, kvasničním extraktem a vitamíny

Obrázek 25 – Kultivace po 7 dnech

Na TYA agaru s glukosou byl nárůst pigmentu po 3 dnech na 80% misky, po 5 a 7 dnech na celé misce.

Na minerálním médiu s glukosou a s glukosou a vitamíny nebyl žádný nárůst pigmentu ani po 3, 5 ani 7 dnech.

Na minerálním médiu s glukosou, tryptonem a vitamíny byl pozorován masivní nárůst pigmentu po 3 dnech kultivace. Po 5 dnech kultivace byl stejný nárůst pigmentu jak po 3 dnech kultivace a po 7 dnech kultivace byl nárůst pigmentu slabší.

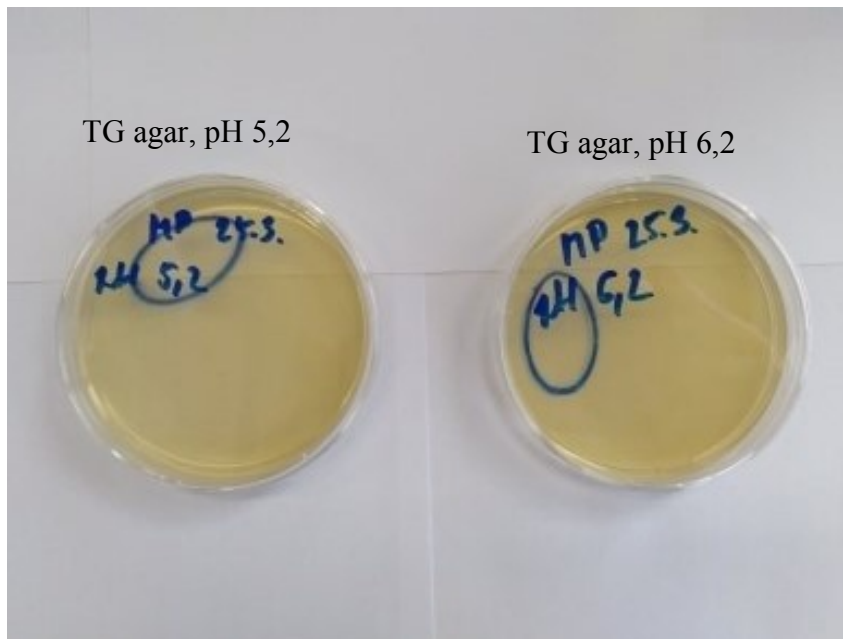
Na minerálním médiu s glukosou, kvasničním extraktem a vitamíny nebyl pozorován výrazný nárůst pigmentu po 3, 5 ani 7 dnech kultivace.

Na minerálním médiu s glukosou, tryptonem, kvasničním extraktem a vitamíny byl po 3 dnech nárůst pigmentu pouze v oblasti inokula. Po 5 dnech kultivace byl nárůst pigmentu cca na 60 % misky a po 7 dnech kultivace pigment začal degradovat.

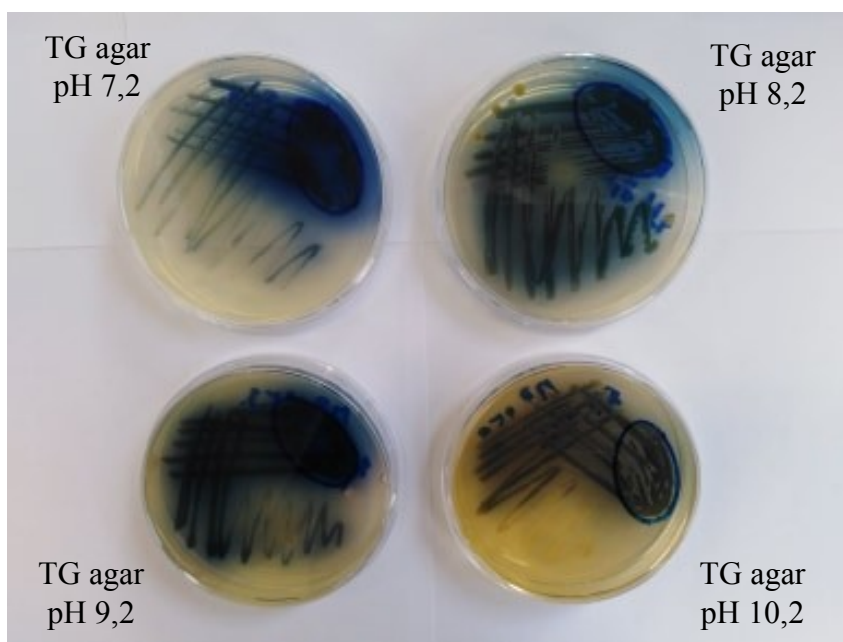
Z výsledků je vidět, že nejvýraznější tvorby pigmentu bylo dosaženo na standardním TG agaru a že pro tvorbu pigmentu má zásadní vliv přidavek tryptonu. Bez něj byla produkce pigmentu zanedbatelná či nulová.

12.8 Ověření růstu kultury a tvorby lyleinu při kultivaci na TYA agarech s glukosou v závislosti na pH

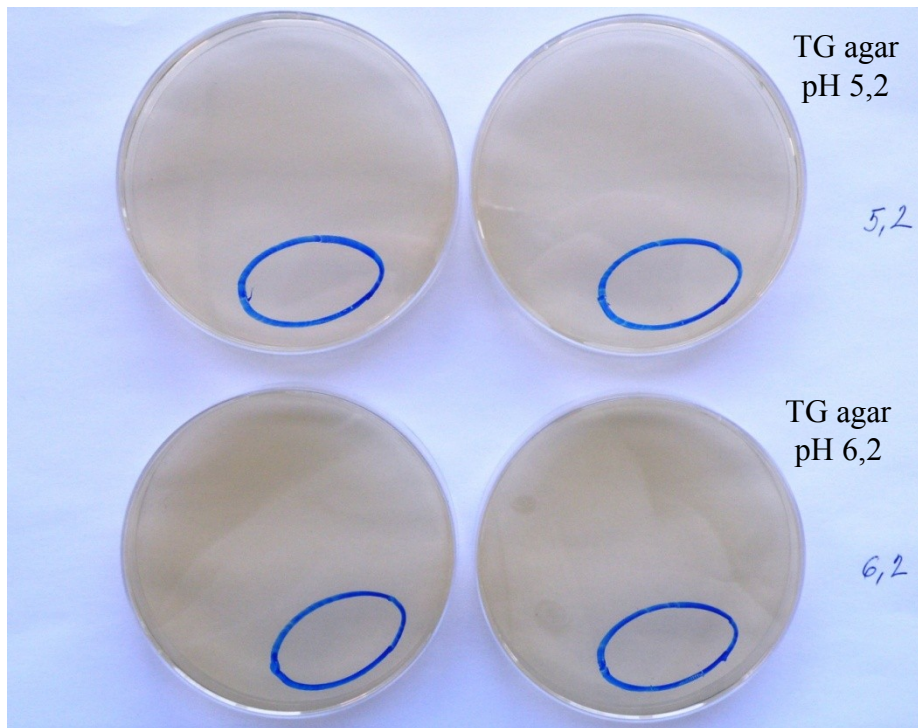
V pokusu byl ověřován růst kultury a tvorby lyleinu při kultivaci na TYA agaru s glukosou v závislosti na pH. Kultivace probíhala při 30 °C s odečtem po 3, 5 a 7 dnech.



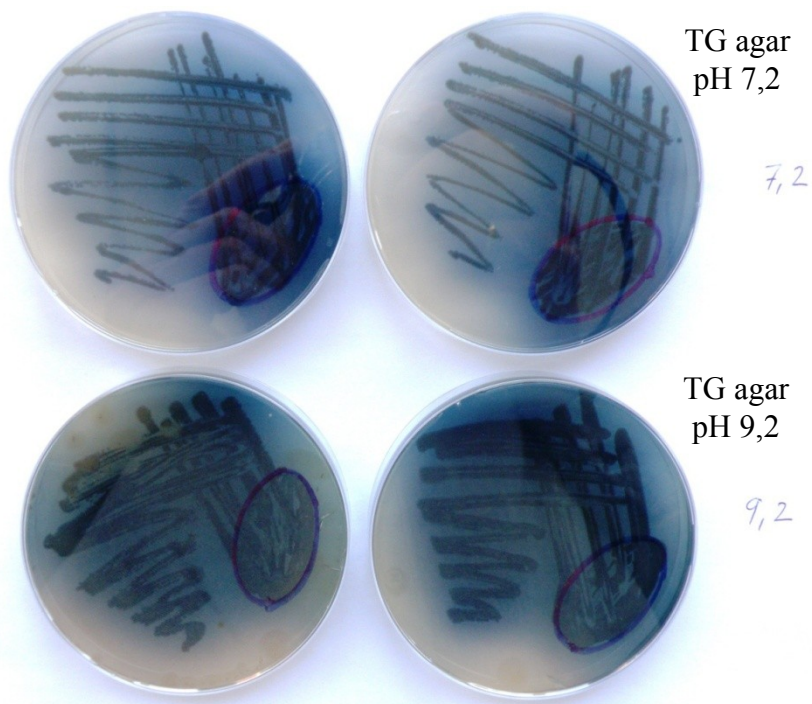
Obrázek 26 – Kultivace po 3 dnech při pH 5,2 a 6,2



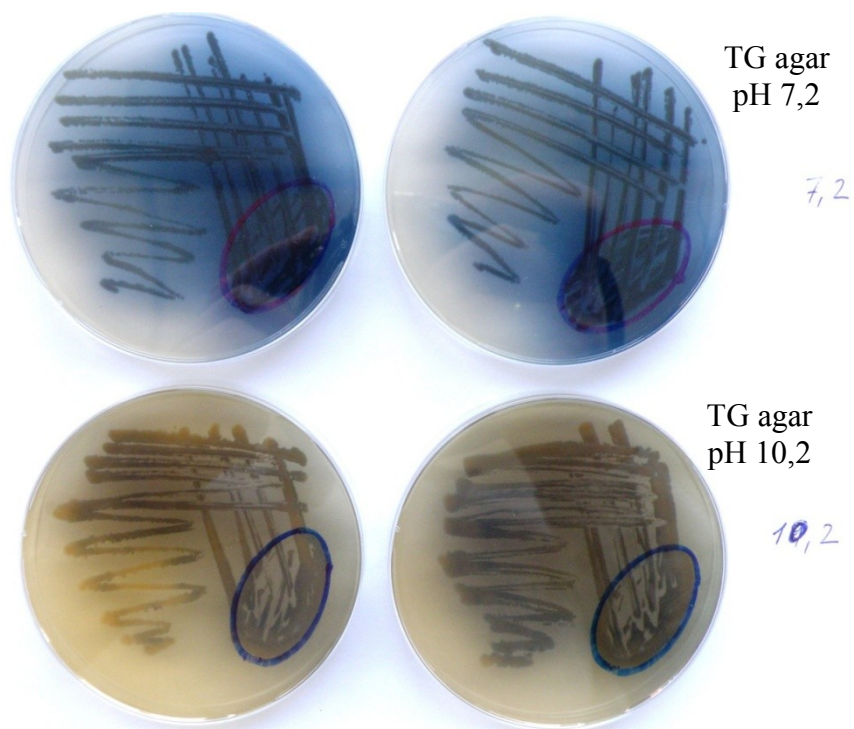
Obrázek 27 – Kultivace po 3 dnech při pH 7,2; 8,2; 9,2 a 10,2



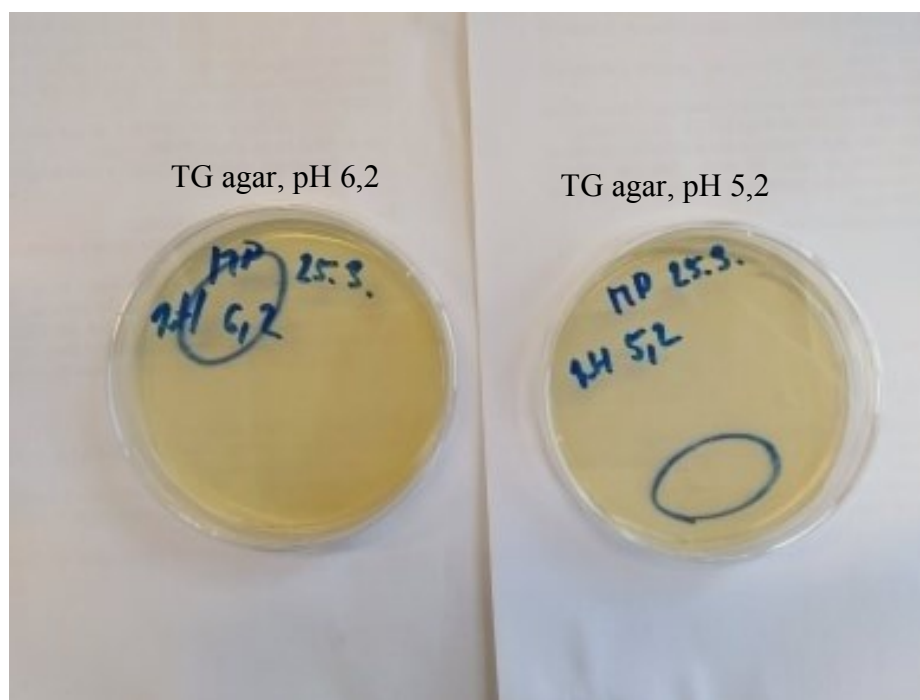
Obrázek 28 – Kultivace po 5 dnech při pH 5,2 a 6,2



Obrázek 29 – Kultivace po 5 dnech při pH 7,2 a 9,2



Obrázek 30 – Kultivace po 5 dnech při pH 7,2 a 10,2



Obrázek 31 – Kultivace po 7 dnech při pH 5,2 a 6,2



Obrázek 32 – Kultivace po 7 dnech při pH 7,2; 8,2; 9,2 a 10,2

Na miskách s TYA agarem s glukosou při pH 5,2 a 6,2 nebyla pozorována žádná produkce pigmentu po celou dobu pokusu a i samotný růst kultury byl silně inhibován.

Při pH 7,2 se pigment rozšířil cca na polovinu misky, a to po 3 dnech kultivace. Po 4 dnech kultivace se slabě pigment rozšířil po celé misce a po 7 dnech kultivace pigment začal slábnout a mírně degradovat.

Při pH 8,2 byly misky v průběhu pokusu kontaminovány, tudíž nebyly v pozdějších fázích hodnoceny. Při prvním hodnocení, po 3 dnech kultivace, však vykazovaly bohatou produkci pigmentu, srovnatelnou či lepší než u pH 7,2.

Při pH 9,2 po 3 dnech kultivace se pigment rozšířil téměř na 75 % misky a byl silně sytě zbarven. Po 5 dnech kultivace byl pigment rozšířen na celou miskou a po 7 dnech začal pigment degradovat.

Při pH 10,2 po 3 dnech kultivace se pigment slabě rozšířil na polovinu misky. Po 5 dnech kultivace nedocházelo k modrému zbarvení pigmentu. Po 7 dnech pigment zežloutl.

Celkově lze tento pokus uzavřít tak, že kultura je schopna produkce pigmentu v neutrální a překvapivě i v alkalické oblasti pH (kde i velmi dobře roste). Při hodnotách pH v alkalické oblasti je však nutné počítat s rychlejší degradací pigmentu - zřejmě vlivem alkalické hydrolýzy.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo ověření tvorby modrého pigmentu kulturou *Micrococcus lylae* CCM 4431 v závislosti na různých faktorech. Pigment byl pracovním názvem lyleinem.

Cílem prvního pokusu bylo zjištění charakteru pigmentu při růstu kultury na agarovém a v tekutém médiu. Na základě získaných výsledků lze tvrdit, že:

- v tekutém médiu nebyla zaznamenána produkce modrého pigmentu, neboť vytvořený pigment byl pravděpodobně buňkami přeměňován na nebarevný produkt,
- na pevném médiu byla zaznamenána výrazná produkce modrého pigmentu,
- roztok s obsahem pigmentu bylo možné získat kultivací kultury na pevných TYA agaroch s glukosou (s vykrojenými středy) a s nepipetovanou destilovanou vodou obsahující glukosu.

Cílem druhého pokusu bylo zjištění vlivu glukosy, sacharosy a glycerolu na produkci pigmentu. Na základě získaných výsledků lze tvrdit, že:

- na TYA agaru a na TYA agaru s glycerolem se neprojevila žádná tvorba pigmentu,
- na TYA agaru se sacharosou se projevila tvorba pigmentu v menší míře a na TYA agaru s glukosou byl pigment masivně vytvářen.

Cílem třetího pokusu bylo zjistit produkci lyleinu v průběhu kultivace. Na základě výsledků lze tvrdit, že:

- nejvýraznější produkce pigmentu bylo dosaženo od třetího do pátého dne kultivace, poté hodnoty začaly mírně klesat,
- maximální hodnoty absorbance získaných roztoků byly téměř identické - jak při vlnové délce 601 nm, tak 605 nm.

Cílem čtvrtého pokusu bylo ověření kultivačních teplot pro produkci lyleinu. Na základě výsledků lze tvrdit, že:

- produkce pigmentu při 37 °C nebyla pozorována po celou dobu pokusu,
- nejvyšší míra produkce pigmentu byla pozorována při kultivační teplotě 30 °C.

Cílem pátého pokusu bylo ověření linearitity při spektrofotometrickém stanovení pigmentu a na základě výsledků lze tvrdit, že:

- závislost absorbance na koncentraci je téměř lineární při hodnotách absorbancí do 0,6.

Cílem šestého pokusu bylo ověření možnosti zjednodušené přípravy živného agarů a z pokusů vyplynulo, že:

- vyšší produkce pigmentu nastává u klasického způsobu přípravy živného agarů, tedy s přidáním glukózy až po sterilizaci TYA agarů.

Cílem sedmého pokusu bylo ověření tvorby lyleinu při kultivaci na minerálních a obohacených médiích. Z výsledků vyplývá, že:

- na minerálním médiu s glukosou a s glukosou a vitamíny nebyla žádná produkce pigmentu zaznamenána po 3, 5 ani 7 dnech,
- bohatou tvorbou pigmentu se projevil standardní TYA agar s glukosou,
- nejvyšší produkce pigmentu se u minerálních agarů projevila na minerálním agaru s glukosou, tryptonem a vitamíny a současně bylo prokázáno, že trypton má zásadní význam pro tvorbu lyleinu.

Cílem osmého pokusu bylo ověření růstu kultury a tvorby lyleinu při kultivaci na TYA agaroch s glukosou v závislosti na pH. Z výsledků vyplývá, že:

- na miskách s TYA agarem s glukosou při pH 5,2 a 6,2 nebyla pozorována žádná tvorba pigmentu po celou dobu pokusu a jen nepatrný růst kultury,
- nejvyšší produkce pigmentu byla na miskách při pH 7,2 a 9,2 (misky s pH 8,2 byly kontaminovány), a krátkodobě i při pH 10,2; v alkalické oblasti pH však pigment po delší době kultivace degradoval.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aaronson, S. J. *gen. Microbiol.* (1963) 12, 147-155

M. Kocur and T. Martinec *J. gen. Microbiol.* (1963), 32, 185-188

S. Rosypal, M. Kocur and K. Hoďák *J. gen. Microbiol.* (1963), 32, 189-194

E. Stackebrandt, C. Koch, O. Gvozdiak and P. Schumann (1995) *International Journal of Systematic Bacteriology* p. 682-692

SEDLÁČEK, Ivo, *Taxonomie prokaryot.* Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0.

Aberoumand, A. (2011). A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World J. Dairy Food Sci.* 6, 71–78.

Walford, J. (ed.). (1980). "Historical development of food colouration," in *Developments in Food Colours*, (London: Applied Science publishers).

Downham, A., and Collins, P. (2000). Coloring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 5–22. doi: 10.1046/j.1365-2621.2000.00373.x

Babitha, S. (2009). "Microbial pigments," in *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, eds P. Singh-Nee Nigam and A. Pandey (Dordrecht: Springer), 147–162. doi: 10.1007/978-1-4020-9942-7_8

Manikprabhu, D., and Lingappa, K. (2013). γ Actinorhodin a natural and attorney source for synthetic dye to detect acid production of fungi. *Saudi J. BiolSci.* 20, 163–168. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.01.004

Arulselvi, I. P., Umamaheswari, S., Sharma, R. G., Kartik, C., and Jayakrishna, C. (2014). Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *J. Food. Process Technol.* 5:292. doi: 10.4172/2157-7110.1000292

Venil, C. K., Aruldass, C. A., Dufosse, L., Zakaria, Z. A., and Ahmad, W. A. (2014). Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry—an incisive evaluation. *RSC Adv.* 4, 39523–39529. doi: 10.1039/c4ra06162d

Venil, C. K., Zakaria, Z. A., and Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem.* 48, 1065–1079. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.006

Mapari, S. A. S., Thrane, U., and Meyer, A. S. (2010). Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol.* 28, 300–307. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.03.004

Zhu, H. H., Guo, J., Yao, Q., Yang, S. Z., Deng, M. R., Phuongle, T. B., et al. (2007). *Streptomyces vietnamensis* sp. nov., a streptomycete with violet blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1770–1774. doi: 10.1099/ijs.0.64774-0

Liu, M., Peng, F., Wang, Y., Zhang, K., Chen, G., and Fang, C. (2009). *Kineococcus xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1090–1093. doi: 10.1099/ijs.0.004168-0

Asker, D., Beppu, T., and Ueda, K. (2008). *Nubsellazeaxanthinifaciens* gen. nov., sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium of the family Sphingobacteriaceae isolated from freshwater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 601–606. doi: 10.1099/ijs.0.65493-0

Franks, A., Haywood, P., Holmstrom, C., Egan, S., Kjelleberg, S., and Kumar, N. (2005). Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudalteromonas tunicata*. *Molecules* 10, 1286–1291. doi: 10.3390/10101286

Nakamura, Y., Asada, C., and Sawada, T. (2003). Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 8, 37–40. doi: 10.1007/BF02932896

Manachini, P. L., Fortina, M. G., Parini, C., and Craveri, R. (1985). *Bacillusthermorubersp. nov., nom. rev., a red-pigmentedthermophilicbacterium*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 35, 493–496. doi: 10.1099/00207713-35-4-493

Asker, D., and Ohta, Y. (1999). Productionofcanthaxanthin by extremelyhalophilicbacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 617–621. doi: 10.1016/S1389-1723(00)87089-9

Deng, Z. S., Zhao, L. F., Xu, L., Kong, Z. Y., Zhao, P., Qin, W., et al. (2011). *Paracoccusphaerophysaesp. nov., a siderophore-producing, endophyticbacteriumisolatedfromrootnodulesofSphaerophysasalsula*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 665–669. doi: 10.1099/ijs.0.021071-0

Marroquin, A. S., and Zapata, M. (1954). Observations on the pigment of *Streptomycescoelicolor*. *Appl. Microbiol.* 2, 102–107.

Conn, H. J., and Jean, E. C. (1941). Valueofpigmentation in classifyingactinomycetes. *J. Bacteriol.* 42, 791–799.

Ahmad, W. A., Ahmad, W. Y. M., Zakaria, Z. A., and Yusof, N. Z. (2012). “Applicationofbacterialpigments as colorant,” in *ApplicationofBacterialPigments as Colorant: theMalaysianPerspective*, eds W. A. Ahmad, W. Y. M. Ahmad, Z. A. Zakaria, and N. Z. Yusof (Berlin: Springer), 57–74. doi: 10.1007/978-3-642-24520-6_4

Mondal, S. K., Samantaray, D. P., and Mishra, B. B. (2015). Optimizationof pigment production by a novel *Bacillus*sp. BBMRH isolatedfromcowdung. *J. PureAppl. Microbiol.* 9, 2321–2326.

Wang, H., Jiang, P., Lu, Y., Ruan, Z., Jiang, R., Xing, X. H., et al. (2009). Optimizationofcultureconditionsforviolaceinproduction by a newstrainof*Duganella*sp. B2. *Biochem. Eng. J.* 44, 119–124. doi: 10.1016/j.bej.2008.11.008

Wackenroder, H. (1831). Ueberdas Oleum radiceDauciaetherum, dasCarotin, den Carotenzuckerund den officinellensuccusDauci; so wieauchüberdasMannit, welches in dem Möhrensaftedurch einebesondere Art der Gahrunggebildetwird. GeigersMagazinPharmazie. 33, 144–172

Mata Gomez, L. C., Montanez, J. C., MendezZavala, A., and Aguilar, C. N. (2014). Biotechnologicalproductionofcarotenoids by yeasts: anoverview. Microb. Cell Fact. 13:12. doi: 10.1186/1475-2859-13-12

Bhosale, P., and Bernstein, P. S. (2004). β -Caroteneproduction by Flavobacteriummultivorum in the presence ofinorganicsalts and urea. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 31, 565–571. doi: 10.1007/s10295-004-0187-9

Chen, D., Han, Y., and Gu, Z. (2006). Applicationofstatisticalmethodology to theoptimizationoffermentative medium forcarotenoidsproduction by Rhodobactersphaeroides. ProcessBiochem. 41, 1773–1778. doi: 10.1016/j. proc-bio.2006.03.023

Silva, C., Cabral, J. M. S., and Keulen, F. V. (2004). Isolationof a β -totalcarotenoidsover-producingsoilbacterium, Sphingomonassp. Biotechnol. Lett. 26, 257–262. doi: 10.1023/B:BILE.0000013716.20116.dc

Dufosse, L. (2006). Microbialproductionof food grade pigments. Food Technol. Biotechnol. 44, 313–321.

DellaPenna, D., and Pogson, B. J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 711–738. doi: 10.1146/annurev. arplant.56.032604.144301

Surwase, S. N., Jadhav, S. B., Phugare, S. S., and Jadhav, J. P. (2013). Optimizationof melanin production by Brevundimonassp. SGJ using response surfacemethodology. 3 Biotech 3, 187–194. doi: 10.1007/s13205-012-0082-4

Banerjee, A., Supakar, S., and Banerjee, R. (2014). Melanin from the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter chroococcum*: a spectroscopic characterization. *PLoS ONE* 9:e84574. doi: 10.1371/journal.pone.0084574

Plonka, P. M., and Grabacka, M. (2006). Melanin synthesis in microorganisms—biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim. Pol.* 53, 429–443.

Soliev, A. B., Hosokawa, K., and Enomoto, K. (2011). Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011:670349. doi: 10.1155/2011/670349

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K., and Kim, S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: current status and future perspectives. *Microbiol. Res.* 168, 311–332. doi: 10.1016/j.micres.2013.02.002

Hill, H. Z. (1992). The function of melanin in six blind people examined in an elephant. *Bioessays* 14, 49–56. doi: 10.1002/bies.950140111

Boger, D. L., and Patel, M. (1987). Total synthesis of prodigiosin. *Tetrahedron Lett.* 28, 2499–2502. doi: 10.1021/jo00242a013

Darshan, N., and Manonmani, H. K. (2015). Prodigiosin and its potential applications. *J. Food. Sci. Technol.* 52, 5393–5407. doi: 10.1007/s13197-015-1740-4

Gandhi, N. M., Patell, J. R., Gandhi, J., De Souza, N. J., and Kohl, H. (1976). Prodigiosin metabolites of a marine *Pseudomonas* species. *Mar. Biol.* 34, 223–227. doi: 10.1007/BF00388799

Kim, D., Lee, J. S., Park, Y. K., Kim, J. F., Jeong, H., Oh, T. K., et al. (2007). Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahellachejuensis* KCTC 2396. *J. Appl. Microbiol.* 102, 937–944. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03172.x

Harris, A. K., Williamson, N. R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., et al. (2004). The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species and strain-dependent genome context variation. *Microbiology* 150, 3547–3560. doi: 10.1099/mic.0.27222-0

Kamble, K. D., and Hiwarale, V. D. (2012). Prodigiosin production from *Serratia marcescens* strains obtained from farm soil. *Int. J. Environ. Sci.* 3, 631–638. doi: 10.6088/ijes.2012030131061

Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S., et al. (2004). Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1593–1599. doi: 10.1128/AEM.70.3.1593-1599.2004

Duran, N., Justo, G. Z., Ferreira, C. V., Melo, P. S., Cordi, L., and Martins, D. (2007). Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 48, 127–133. doi: 10.1042/BA20070115

Blyth, A. W. (1879). The composition of cow's milk in health and disease. *J. Chem. Soc.* 35:530. doi: 10.1039/CT8793500530

Kuhn, R., Gyorgy, P., and Jauregg, T. W. (1933). Über eine neue Klasse von Naturfarbstoffen. *Eur. J. Inorg. Chem.* 66, 317–320. doi: 10.1002/cber.19330660244

Kutsal, T., and Ozbas, M. T. (1989). "Microbial production of vitamin B2 (riboflavin)," in *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*, ed. E. J. Vandamme (Dordrecht: Springer), 149–166. doi: 10.1007/978-94-009-1111-6_10

Feroz, M. S. (2010). Optimization of Riboflavin Production by Fungi on Edible Oil Effluent. Master's thesis, Durban University of Technology, Durban.

Goodrich, R. P., Edrich, R. A., Li, J., and Seghatchian, J. (2006). The Mirasol PRT system for pathogen reduction of platelets and plasma: an overview of current status and future trends. *Transfus. Apher. Sci.* 35, 5–17. doi: 10.1016/j.transci.2006.01.007

Hassan, H. M., and Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J. Bacteriol.* 141, 156–163

Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., and Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 1159–1168. doi: 10.1007/s11274-013-1552-5

Ogugbue, C. J., and Sawidis, T. (2011). Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triaryl methane dyes by *Aeromonas hydrophila* isolated from industrial effluent. *Biotechnol. Res. Int.* 2011:967925. doi: 10.4061/2011/967925

Chadni, Z., Rahaman, M. H., Jerin, I., Hoque, K. M. F., and Reza, M. A. (2017). Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Mycology* 8, 48–57. doi: 10.1080/21501203.2017.1302013

Yusof, N. Z. (2008). Isolation and Application of Red Pigment from *Serratia marcescens*. B.Sc. thesis, Universiti Teknologi Malaysia, Johor Bahru.

Alihosseini, F., Ju, K. S., Lango, J., Hammock, B. D., and Sun, G. (2008). Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnol. Prog.* 24, 742–747. doi: 10.1021/bp070481r

Malik, K., Tokkas, J., and Goyal, S. (2012). Microbial pigments: a review. *Int. J. Microb. Res. Technol.* 1, 361–365

Umadevi, K., and Krishnaveni, M. (2013). Antibacterial activity of pigment produced from *Micrococcus luteus* KF532949. *Int. J. Chem. Anal. Sci.* 4, 149–152. doi: 10.1016/j.ijcas.2013.08.008

Berlanga, M., Ruiz, N., Hernandez-Borrell, J., Montero, T., and Vinas, M. (2000). Role of the outer membrane in the accumulation of quinolones by *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* 46, 716–722. doi: 10.1139/w00-052

Selvameenal, L., Radhakrishnan, M., and Balagurunathan, R. (2009). Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening. *Indian J. PharmSci.* 71, 499–504. doi: 10.4103/0250-474X.58174

Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., and Sharma, A. K. (2015). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *J. Food. Sci. Technol.* 52, 4669–4678. doi: 10.1007/s13197-014-1601-6

Correa Llantén, D. N., Amenabar, M. J., and Blamey, J. M. (2012). Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium. *J. Microbiol.* 50, 374–379. doi: 10.1007/s12275-012-2029-1

Wang, Y., Nakajima, A., Hosokawa, K., Soliev, A. B., Osaka, I., Arakawa, R., et al. (2012). Cytotoxic prodigiosin family pigments from *Pseudoalteromonas* sp. 1020R isolated from the Pacific coast of Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 1229–1232. doi: 10.1271/bbb.110984

El-Naggar, N. E., and El-Ewasy, S. M. (2017). Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Sci. Rep.* 14:42129. doi: 10.1038/srep42129

Delange, R. J., and Glazer, A. N. (1989). Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal. Biochem.* 177, 300–306. doi: 10.1016/0003-2697(89)90056-0

Colorful Bacteria, *Biotech Articles – Publish Biotechnology Articles or Press Release* [online]. Copyright 2017 biotecharticles.com. Dostupné z: <https://www.biotecharticles.com/Applications-Article/Colorful-Bacteria-612.html>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	Kolonie tvořící jednotky
FDA	Úřad pro potraviny a léčiva
MA	Minerální agar
MEM	Vitamíny – definovaná směs pro tkáňové kultury
MW	Mikrovlny
TYA	Tryptonyeastextract agar
TG	TYA agar s glukosou

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 – TG agar, s vykrojeným středem o průměru 50 mm</i>	<i>47</i>
<i>Obrázek 2 – Produkce pigmentu po 3 dnech na TG agaru o průměru 35 mm.....</i>	<i>47</i>
<i>Obrázek 3 – Charakter pigmentu po 3 dnech růstu na agarovém a v tekutém médiu</i>	<i>48</i>
<i>Obrázek 4 – Závislost absorpance na vlnové délce u pigmentu získaného kultivací v tekutém a agarovém médiu po 3 dnech kultivace.....</i>	<i>48</i>
<i>Obrázek 5 – Charakter pigmentu po 5 dnech na agarovém a v tekutém médiu</i>	<i>49</i>
<i>Obrázek 6 – Závislost absorpance na vlnové délce u pigmentu získaného kultivací v tekutém a agarovém médiu po 5 dnech kultivace.....</i>	<i>49</i>
<i>Obrázek 7 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou</i>	<i>51</i>
<i>Obrázek 8 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem</i>	<i>51</i>
<i>Obrázek 9 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou</i>	<i>52</i>
<i>Obrázek 10 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem</i>	<i>52</i>
<i>Obrázek 11 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou</i>	<i>53</i>
<i>Obrázek 12 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem</i>	<i>53</i>
<i>Obrázek 13 – Růst na TYA agaru čistém a se sacharosou</i>	<i>54</i>
<i>Obrázek 14 – Růst na TYA agaru s glukosou a glycerolem</i>	<i>54</i>
<i>Obrázek 15 – Kultivace po 3 dnech při 25, 30 a 37 °C.....</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 16 – Kultivace po 4 dnech při 25, 30 a 37 °C.....</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 17 – Kultivace po 7 dnech při 25, 30 a 37 °C.....</i>	<i>60</i>
<i>Obrázek 18 – Závislost absorpance na fiktivní koncentraci vzorku</i>	<i>62</i>
<i>Obrázek 19 – Kultivace po 3 dnech</i>	<i>63</i>
<i>Obrázek 20 – Kultivace po 5 dnech</i>	<i>63</i>
<i>Obrázek 21 – Kultivace po 3 dnech</i>	<i>64</i>
<i>Obrázek 22 – Kultivace po 5 dnech</i>	<i>64</i>
<i>Obrázek 23 – Kultivace po 3 dnech</i>	<i>66</i>
<i>Obrázek 24 – Kultivace po 5 dnech</i>	<i>66</i>
<i>Obrázek 25 – Kultivace po 7 dnech</i>	<i>67</i>
<i>Obrázek 26 – Kultivace po 3 dnech při pH 5,2 a 6,2</i>	<i>68</i>
<i>Obrázek 27 – Kultivace po 3 dnech při pH 7,2; 8,2; 9,2 a 10,2.....</i>	<i>68</i>
<i>Obrázek 28 – Kultivace po 5 dnech při pH 5,2 a 6,2</i>	<i>69</i>
<i>Obrázek 29 – Kultivace po 5 dnech při pH 7,2 a 9,2.....</i>	<i>69</i>
<i>Obrázek 30 – Kultivace po 5 dnech při pH 7,2 a 10,2</i>	<i>70</i>

<i>Obrázek 31 – Kultivace po 7 dnech při pH 5,2 a 6,2</i>	<i>70</i>
<i>Obrázek 32 – Kultivace po 7 dnech při pH 7,2; 8,2; 9,2 a 10,2</i>	<i>71</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 – Bakterie tvořící pigmenty a barviva a jejich potenciální aplikace</i>	19
<i>Tabulka 2 – Bakterie tvořící pigmenty a barviva</i>	20
<i>Tabulka 3 – Bakterie tvořící pigment a původ jejich izolace</i>	21
<i>Tabulka 4 – Složení TYA agaru</i>	37
<i>Tabulka 5 – Složení minerálního agaru</i>	38
<i>Tabulka 6 – Složení zásobního roztoku stopových solí</i>	38
<i>Tabulka 7 – Ředění vzorků</i>	42
<i>Tabulka 8 – Přídavky HCl a NaOH k úpravě pH agarů a přídavek vody při přípravě</i>	45
<i>Tabulka 9 – Měřená absorbance po 1 dnu kultivace</i>	56
<i>Tabulka 10 – Měřená absorbance po 2 dnech kultivace</i>	56
<i>Tabulka 11 – Měřená absorbance po 3 dnech kultivace</i>	57
<i>Tabulka 12 – Měřená absorbance po 4 dnech kultivace</i>	57
<i>Tabulka 13 – Měřená absorbance po 5 dnech kultivace</i>	58
<i>Tabulka 14 – Měřená absorbance po 6 dnech kultivace</i>	58
<i>Tabulka 15 – Ředění vzorků a naměřená absorbance</i>	61

