

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING

ÚSTAV FYZIKÁLNÍHO INŽENÝRSTVÍ

INSTITUTE OF PHYSICAL ENGINEERING

**STUDIUM VLIVU TOXICKÝCH A NUTRIČNÍCH PRVKŮ NA
METABOLISMUS BUNĚK POMOCÍ KOMBINACE
RAMANOVY SPEKTROSKOPIE A SPEKTROSKOPIE
LASEREM BUZENÉHO PLAZMATU**

STUDY OF INFLUENCE OF TOXICAL AND NUTRITIONAL ELEMENTS ON CELL METABOLISM USING
COMBINATION OF RAMAN SPECTROSCOPY AND LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martin Mazura

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. David Prochazka, Ph.D.

BRNO 2016

Zadání diplomové práce

Ústav: Ústav fyzikálního inženýrství
Student: **Bc. Martin Mazura**
Studijní program: Aplikované vědy v inženýrství
Studijní obor: Fyzikální inženýrství a nanotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. David Prochazka, Ph.D.**
Akademický rok: 2015/16

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma diplomové práce:

Studium vlivu toxických a nutričních prvků na metabolismus buněk pomocí kombinace Ramanovy spektroskopie a spektroskopie laserem buzeného plazmatu

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Základním cílem práce bude seznámit se s vlastnostmi bakterie produkující biopolymery a ve spolupráci s biologym navrhnout experiment při kterém bude sledována metabolická odezva na změnu koncentrace nutričních a toxických prvků.

Cíle diplomové práce:

Cílem práce bude sledovat vliv nutričních a toxických prvků na metabolismus bakterie produkující biopolymery. K tomuto účelu se využije kombinace dvou technik - metoda spektroskopie laserem buzeného plazmatu pro sledování online prvkového složení živného roztoku a bakterií a Ramanova spektroskopie pro sledování produkce biopolymerů.

Seznam literatury:

- M. Sovago, E.-J. Buis, M. Sandtke, Nanoparticle detection in aqueous solutions using Raman and Laser Induced Breakdown Spectroscopy, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 87 (2013) 182-187.
- D.A. Cremers, L.J. Radziemski, Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, (2013) 426.
- E. Smith, G. Dent, Modern Raman spectroscopy: a practical approach, John Wiley & Sons, 2013.

Termín odevzdání diplomové práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2015/16

V Brně, dne

L. S.

prof. RNDr. Tomáš Šíkola, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan fakulty

Abstrakt

V této práci je studováno online rozlišení šesti kmenů bakterií pomocí multivariační analýzy dat (MVDA). Jako nejvhodnější technika byla zvolena analýza hlavních komponent (*Principal component analysis*, PCA). K chemické analýze bakterií byly použity dvě různé analytické metody – Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) a Ramanova spektroskopie. Pro co nejlepší rozlišení jednotlivých kmenů bakterií byla získaná data z obou metod vyhodnocována zvlášť i dohromady. Pro společné vyhodnocení byla data separátně škálována od nuly do jedné a následně zařazena za sebe. Takto vznikl soubor dat nesoucí informaci z obou metod. U jednotlivých kmenů bakterií byl navíc studován i vliv doby kultivace.

Bylo zjištěno, že pomocí Ramanovy spektroskopie je možné rozlišit dva kmeny bakterií a pomocí metody LIBS dokonce čtyři. Kombinací obou metod bylo dosaženo úplného rozdělení všech šesti kmenů do samostatných shluků. Pomocí vah jednotlivých vlnových délek první hlavní komponenty (PC1) bylo zjištěno, že největší přínos pro třídění bakterií u metody LIBS nenese rozdíl jejich prvkového složení, ale matriční efekt ovlivňující spektrum. Vliv doby kultivace byl sledován pouze metodou LIBS. Na základě měření provedených s odstupem 24 hodin bylo možné pozorovat změnu u čtyř kmenů bakterií.

Z výsledků této práce lze usuzovat, že kombinace Ramanovy spektroskopie a metody LIBS je díky komplementárním informacím vhodná pro rychlé rozlišení jednotlivých kmenů a druhů bakterií. Navíc bylo zjištěno, že pomocí metody LIBS je u některých kmenů bakterií možné stanovit změny vzniklé délkou kultivace.

Klíčová slova

LIBS, Ramanova spektroskopie, analýza hlavních komponent, bakterie, *Staphylococcus*

Abstract

In this work on-line discrimination of six bacteria strains by means of the Multivariate discrimination analysis (MVDA) is presented. Principal components analysis (PCA) was selected as most suitable technique. Two analytical methods – Laser-Induced breakdown spectroscopy (LIBS) and Raman spectroscopy were equipped for chemical analysis of bacteria strains. In order to obtain the best possible bacteria strains differentiation, the data from both methods was analyzed in two ways separately and together. The data from both measurements was normalized separately and afterwards combined in one data frame for simultaneous analysis. This data frame contained information from both analytical methods. Moreover an influence of cultivation period for each bacteria strain was studied.

It was determined that Raman spectroscopy is able to discriminate two bacteria strains and LIBS even four bacteria strains. Using combination of both methods the complete discrimination was achieved. From information of first principal component it was determined that most valuable information in LIBS data is not included in different elemental composition but rather in influence of matrix effect. Solely the LIBS was utilized for studying the effect of cultivation period. It was possible to observe transformation of four bacteria strains within 24 hours.

Based on results of this work it is possible to assume that combination of Raman spectroscopy and LIBS, because of the complementary information, is suitable for fast discrimination of

different bacteria species and strains. Moreover it was determined that LIBS is able to observe the transformation caused by cultivation period.

Key words

LIBS, Raman spectroscopy, principal components analysis, bacteria, Staphylococcus

MAZURA, M. *Studium vlivu toxických a nutričních prvků na metabolismus buněk pomocí kombinace Ramanovy spektroskopie a spektroskopie laserem buzeného plazmatu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2016. 48 s. Vedoucí diplomové práce Ing. David Prochazka, Ph.D..

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Davida Procházky, Ph.D. a uvedl všechny zdroje, které jsem v práci použil.

V Brně dne 27. května 2016

Bc. Martin Mazura

Rád bych poděkoval Ing. Davidu Prochazkovi, Ph.D. za trpělivé vedení a cenné rady při psaní diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Kataríně Mlynárikové a Mgr. Otu Samkovi, Dr. za přípravu vzorků a pomoc při měření. V neposlední řadě chci poděkovat přítelkyni za korekturu textu a především rodičům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

Obsah

OBSAH	1
ÚVOD	3
1 TEORETICKÁ ČÁST	5
1.1 LIBS.....	5
1.1.1 <i>Stručný popis metody</i>	5
1.1.2 <i>Vznik a vlastnosti plazmatu</i>	6
1.1.3 <i>Analýza spektra</i>	10
1.1.4 <i>Matriční efekt</i>	11
1.2 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	12
1.2.1 <i>Stručný popis Ramanovy spektroskopie</i>	12
1.2.2 <i>Rozptyl a absorpce záření</i>	12
1.2.3 <i>Elektronová konfigurace a Hookův zákon</i>	14
1.2.4 <i>Vibrace molekul</i>	16
1.2.5 <i>Analýza Ramanovského spektra</i>	19
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
2.1 BAKTERIE	20
2.1.1 <i>Stafylokoky</i>	20
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	20
2.2 POPIS APARATURY	21
2.2.1 <i>LIBS</i>	21
2.2.2 <i>Ramanova spektroskopie</i>	24
2.3 METODIKA MĚŘENÍ.....	24
2.3.1 <i>Ramanova spektroskopie</i>	24
2.3.2 <i>LIBS</i>	24
2.3.3 <i>Škálování spektra</i>	25
2.3.4 <i>Analýza hlavních komponent</i>	26
3 VÝSLEDKY	28
3.1 LIBS.....	28
3.1.1 <i>Příprava měření</i>	28
3.1.2 <i>Analýza spektra</i>	30
3.1.3 <i>Třídění pomocí PCA</i>	32
3.2 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	37
3.2.1 <i>Analýza spektra</i>	37
3.2.2 <i>Třídění pomocí PCA</i>	39
3.3 SPOLEČNÁ ANALÝZA DAT	39
4 ZÁVĚR	41
5 LITERATURA	42
DODATEK A: SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	46
DODATEK B: SEZNAM POUŽITÝCH ZNAČEK A ZKRATEK	48

Úvod

Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (LIBS) se začala rozvíjet v 60. letech minulého století, tedy ihned po vzniku prvního laseru v roce 1960 [1]. Ovšem největší vývoj této metody začal až v 21. století. O tom vypovídá počet vydaných vědeckých článků zabývajících se touto metodou. Zatímco do roku 1975 jich bylo méně než 100, v roce 1995 už více než 600 a v roce 2010 bylo publikováno přes 5000 článků [1].

Mezi největší výhody LIBS patří rychlost analýzy a možnost měření *in situ* na neupravených vzorcích. Další výhodou je schopnost měření na větší vzdálenosti, což například umožňuje provádět prvkovou analýzu v životu nebezpečném prostředí. Tato metoda je schopna měřit vzorky v pevném, kapalném i plynném skupenství. Experimenty lze provádět ve vakuu, v zemské, dokonce i v mimozemské atmosféře, jak ukazuje použití metody LIBS při misi na Mars [2]. Mezi nevýhody patří nižší přesnost měření a horší limit detekce ve srovnání s některými dalšími metodami.

Proces nepružného Ramanova rozptylu předpověděl v roce 1923 rakouský teoretický fyzik Adolf Smekal [3]. Poprvé však tento jev pozorovali Raman a Krishnan roku 1928 [4]. Na kvantově mechanickém vysvětlení Ramanova rozptylu se také podílel brněnský rodák Georg Placzek [5]. I přes původní nadšení z objevu Ramanova jevu zůstaly experimentální možnosti velmi limitovány nízkou intenzitou nepružného rozptylu. Až první lasery dokázaly eliminovat tuto nevýhodu a obnovit zájem o Ramanovu spektroskopii.

Dnes je již Ramanova spektroskopie mocná analytická technika zaměřená na určení chemického složení zkoumaného vzorku. Tato metoda může zkoumat látky všech skupenství a různých tvarů (např. mikročástice, vrstvy, ...). Stejně jako u metody LIBS, Ramanova spektroskopie umožňuje měření na větší vzdálenosti. Schopnost zkoumání neupravených vzorků, třeba i za sklem, rozšiřuje možnosti metody. Největšími nevýhodami jsou degradace vzorků během měření a fluorescence. Ovšem tyto problémy se s vývojem metody postupně redukuje [6].

Pomocí metody LIBS zjišťujeme prvkové složení vzorku a Ramanova spektroskopie nám dává informaci o molekulární a strukturní charakteristice vzorku. Kombinací obou metod jsme schopni lépe určit složení zkoumané látky.

Podobná instrumentace, jež se používá u obou metod, jako by předurčovala budoucí spojení metody LIBS a Ramanovy spektroskopie do jediného systému. Propojením obou metod se zabývalo již několik týmů. Skupina Marka Hoehse [7] vytvořila sestavu Ramanovy spektroskopie a LIBSu. Tuto sestavu využila k mapování povrchu a hloubkové analýze heterogenních vzorků. Sharma a kol. [8] vyvinuli vlastní sestavu pro dálkovou fokusaci k měření geologických vzorků. Sovago a kol. [9] použili obě metody k detekci nanočástic ve vodném roztoku. O užitečnosti a výhodnosti také svědčí plánovaná kombinace obou metod na další marsovské misi v roce 2020, kde by měla sloužit jako zařízení pro organickou, mineralogickou a prvkovou analýzu půdy [10].

Obě metody se také dají úspěšně použít pro zkoumání biologických vzorků včetně bakterií, např. [11-14]. Tým Oty Samka [15] ukázal, že samotná Ramanova spektroskopie je vhodná ke zkoumání jednotlivých druhů stafylokoka a v porovnání s biologickými metodami (separační metody, hlavně pulzní gelová elektroforéza) vyniká především v rychlosti měření.

Původním cílem této práce bylo využití kombinace výše zmíněných metod pro studium vlivu toxických a nutričních prvků na metabolismus buněk produkujících biopolymery. S ohledem

na komplexnost tohoto výzkumu však v průběhu práce byly cíle upraveny tak, aby lépe odpovídaly aktuálním potřebám biologů.

Prvním úkolem diplomové práce tak bylo zjistit, zdali je možné pomocí metody LIBS a Ramanovy spektroskopie odlišit jednotlivé kmeny bakterií. Kombinace obou metod by měla lépe odlišit jednotlivé kmeny *Escherichie coli* a stafylokoků. Dalším cílem bude zkoumat bakterie za různých podmínek.

K rozlišení byla použita analýza hlavních komponent (PCA). Jedná se o jednu z metod vícerozměrné variační analýzy, jejímž cílem je především snížení dimenze dat bez velké ztráty informace [16]. Tuto metodu úspěšně aplikoval Marek Hoehse a kol. [17] k rozlišení různých druhů inkoustů.

1 Teoretická část

1.1 LIBS

1.1.1 Stručný popis metody

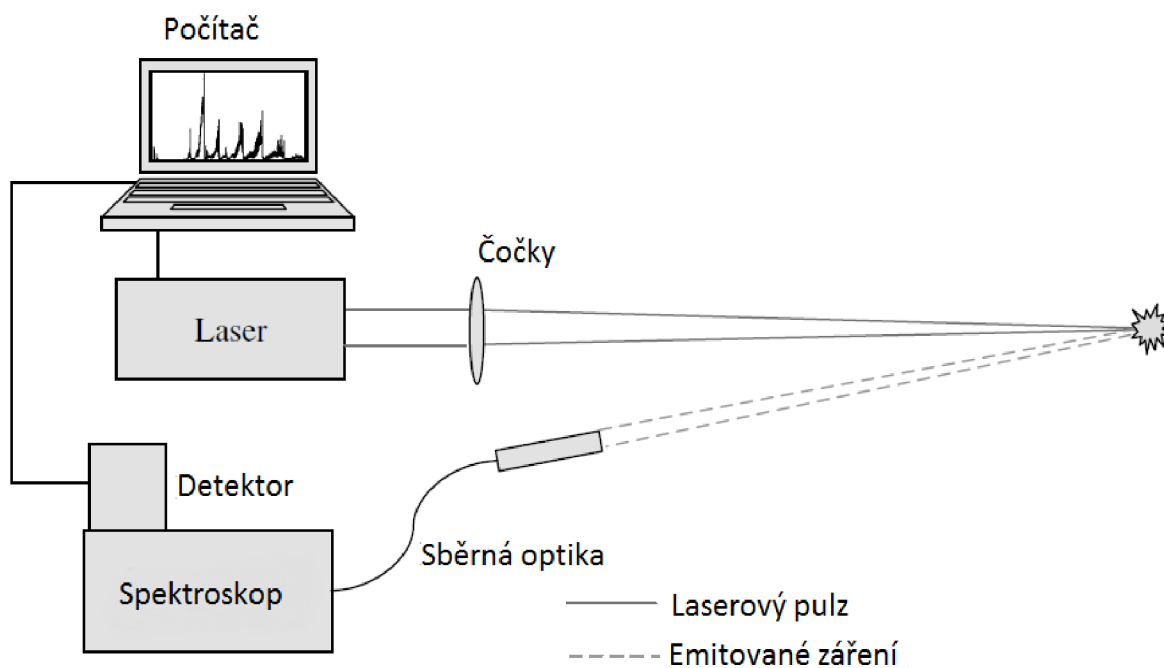
Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (Laser-Induced breakdown spectroscopy, LIBS) je jedna z metod atomové emisní spektroskopie (AES). Občas také bývá nazývána LIPS (Laser-induced plasma spectroscopy) nebo LSS (Laser spark spectroscopy). Teoretický základ a příklady použití spektroskopie laserem buzeného plazmatu jsou detailně popsány v řadě publikací, např. [18-21]. Zde je uveden pouze základní princip metody nezbytný pro pochopení celé práce.

LIBS využívá vysoce výkonný laserový svazek, který při dopadu na vzorek ablatuje část materiálu. Dochází k jeho odpaření a vzniká plazma. To v sobě obsahuje mimo jiné excitované atomy a ionty vzorku. Během chladnutí plazmatu (po ukončení laserového pulzu) přecházejí prvky z vyšších energetických hladin do nižších, přitom se uvolňuje energie ve formě fotonu. Jelikož jsou pro každý prvek tyto přechody jedinečné, jsou i vlnové délky emitovaných fotonů unikátní. Což nám umožňuje přesné určení prvkového složení vzorku ze záření plazmatu.

1.1.1.1 Obecné přístrojové vybavení

V praxi se nejčastěji využívá pevnolátkových pulzních laserů (energie pulzu v rozmezí jednotek až stovek mJ) s délkou pulzu v řádu nanosekund [19]. Pomocí speciální optiky (zrcadlové nebo čočkové) je potom laserový svazek zaostřen na povrch vzorku. V místě dopadu svazku typicky dosahuje intenzit řádově GW/cm^2 . Část záření plazmatu je pomocí sběrné optiky zachycena a přivedena do spektrometru. Spektrometr rozdělí emitované světlo na jednotlivé vlnové délky, následně tento signál zachytí detektor (např. CCD čip). Nakonec se výsledky zpracují a zobrazí pomocí počítače.

Schéma obecného přístrojového vybavení je zobrazeno na obr. 1.



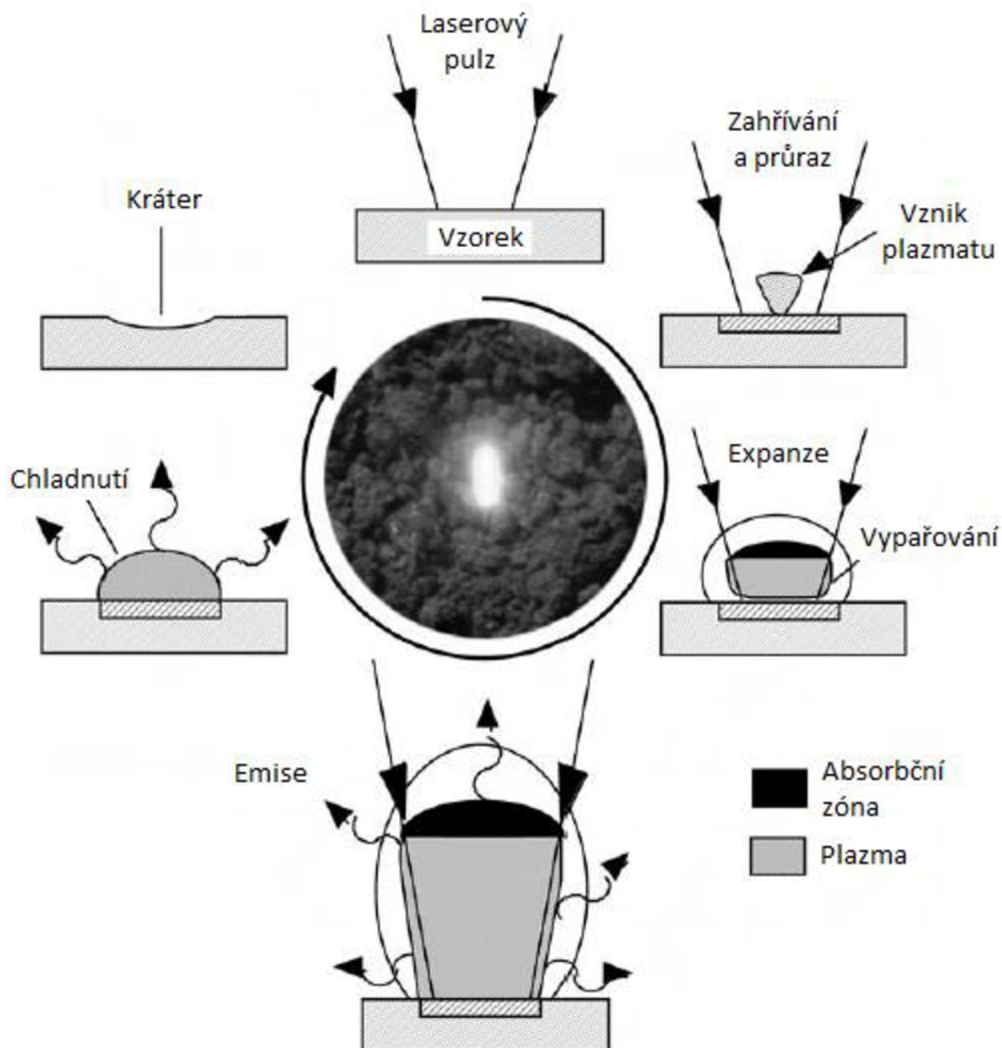
Obr. 1: Obecné přístrojové vybavení metody LIBS. Převzato a upraveno z [22].

1.1.2 Vznik a vlastnosti plazmatu

Plazma je lokální seskupení atomů, iontů, molekul a volných elektronů. Celkově je plazma elektricky neutrální a vykazuje kolektivní chování částic. Plazma je charakterizováno několika parametry, jako například: stupeň ionizace, teplota plazmatu a elektronová hustota. Plazma pozorované u metody LIBS je většinou slabě ionizované. U slabě ionizovaných plazmat je poměr elektronů k ostatním částicím menší než 10 % [19].

Celý proces vzniku plazmatu je zahájen dopadem laserového pulzu na vzorek. Volné elektrony jsou urychlovány laserovým pulzem. S rostoucí energií elektronů dochází ke srážkám s neutrálními částicemi, což produkuje ionty a další elektrony, které nadále urychlují laserový pulz. Tento jev se nazývá lavinová ionizace.

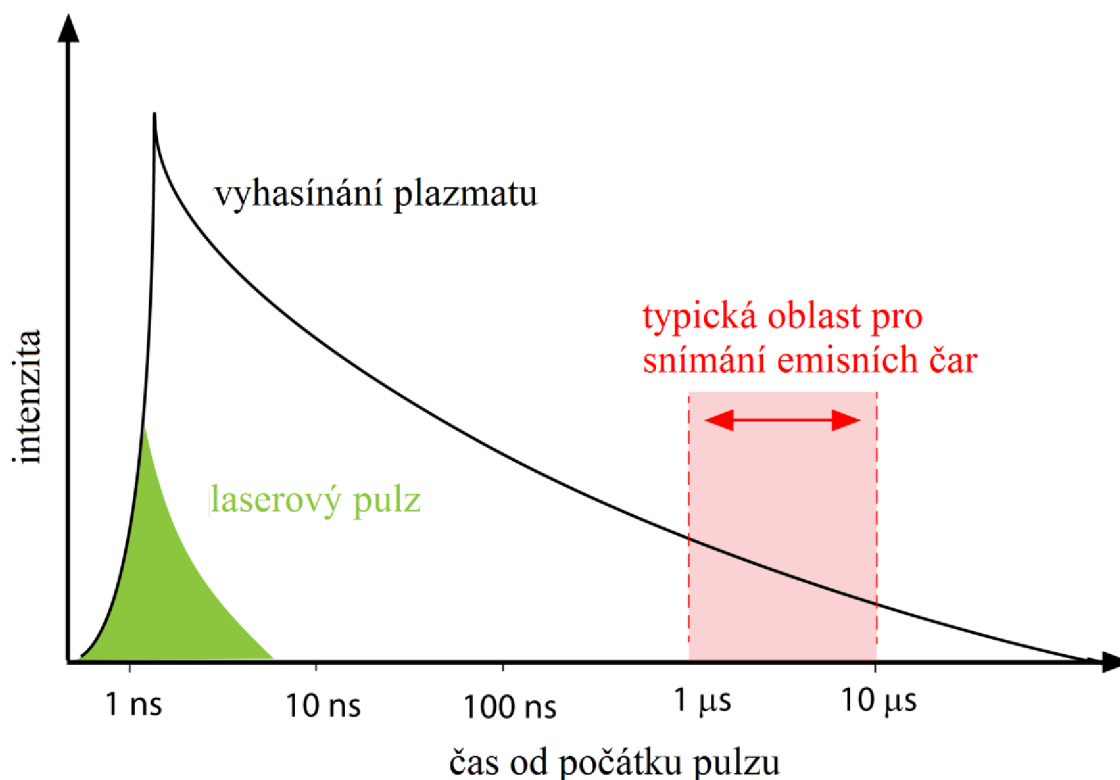
Plazma expanduje do všech směrů od místa dopadu pulzu, ovšem nejrychleji směruje proti fokusační optice, protože plazma absorbuje energii právě z tohoto směru. Z toho důvodu má plazma hruškovitý tvar. Vznikající plazma dosahuje rychlosti 10^5 m/s, což je doprovázeno dobře slyšitelnou rázovou vlnou [20]. Životní cyklus laserem indukovaného plazmatu znázorňuje obr. 2.



Obr. 2: Životní cyklus LIBS plazmatu. Převzato a upraveno z [20].

Zpočátku je ionizace plazmatu vysoká. V této fázi převažuje kontinuální záření, které je hlavně způsobeno brzdným zářením (bremsstrahlung) a procesem rekombinace. Brzdným zářením označujeme fotony vzniklé srážkami mezi elektrony. Procesem rekombinace označujeme jev, při kterém je volný elektron zachycen iontem. Přebytková energie je uvolněna za vzniku fotonu. Procesem rekombinace vznikají neutrální atomy a později i molekuly.

Kontinuální záření vyhasíná rychleji než záření spektrálních čar. Přibližně po mikrosekundě po dopadu laseru se poměr signálu k šumu výrazně zlepší a atomové čáry jsou mnohem ostřejší. Vývoj plazmatu a vhodný interval pro záznam spektrálních čar ukazuje obr. 3.



Obr. 3: Vývoj plazmatu a vhodný interval pro záznam spektra. Převzato z [21].

Cílem metody LIBS je vytvořit opticky tenké plazma, které je v termodynamické rovnováze a jehož prvkové složení je stejné jako složení zkoumaného vzorku. Většinou jsou ale tyto podmínky splněny pouze částečně.

1.1.2.1 Teplota a termodynamická rovnováha

Pokud v plazmatu existuje termodynamická rovnováha, poté se vlastnosti plazmatu (populace energetických stavů, kinetická energie částic atd.) dají popsat pomocí teploty. Ve skutečnosti nelze dosáhnout termodynamické rovnováhy. Z plazmatu totiž uniká energie, zejména ve formě fotonů. Abychom byli schopni charakterizovat plazma, musíme zavést aproximaci v podobě lokální termodynamické rovnováhy.

Aproximace vyžaduje termodynamickou rovnováhu alespoň v malé oblasti plazmatu. Tyto oblasti se však mohou od sebe lehce lišit [19]. Dále v plazmatu musí převažovat kolizní procesy před zářivými procesy. Poté se energie unikající z plazmatu ve formě fotonů může zanedbat [20].

Požadavek, aby atomové a iontové stavy byly zaplňovány a uvolňovány hlavně elektronovými kolizemi, vyžaduje dostatečnou elektronovou hustotu. Spodní limit elektronové hustoty n_e (cm^{-3}) udává McWhirterovo kritérium [19, 20, 23]:

$$n_e \geq 1.6 \times 10^{12} T^{1/2} (\Delta E)^3, \quad (1.1)$$

kde ΔE (eV) je energie prvního stavu nad základním stavem, T (K) je teplota plazmatu. Toto kritérium je nezbytnou podmínkou lokální termodynamické rovnováhy.

Zavedení pojmu lokální termodynamická rovnováha představuje komplexní problém podrobně popsany v řadě publikací [19, 20, 23, 24, 25]

1.1.2.2 Spektrální čáry a čárové profily

Ve spektrálních čarách je obsaženo velké množství informací o parametrech plazmatu. Například intenzita, šířka a posun čar určují teplotu plazmatu a elektronovou hustotu. Dominantní rozšiřující mechanismus zase ovlivňuje tvar čáry.

Podle druhého Bohrova postulátu by zářivým přechodem z vyššího energiového stavu E_j do nižšího energiového stavu E_i měl atom vyzářit foton o frekvenci [26]:

$$\nu_{ji} = (E_j - E_i)/h, \quad (1.2)$$

kde h je Planckova konstanta. Tato spektrální čára však není nekonečně tenká. Na její rozšíření má vliv celá řada příčin.

Šířkou čáry nazýváme šířku intervalu frekvencí $2\delta\nu$ nebo interval vlnových délek $2\delta\lambda$, kterým odpovídá pokles hodnoty intenzity $I(\nu)$ na hodnotu $I_0(\nu)/2$, kde I_0 je maximální hodnota intenzity čáry [26].

Dopplerovské rozšíření je důsledek tepelného pohybu zářících částic. Toto rozšíření vede na gaussovský tvar čáry. Dopplerovské rozšíření závisí pouze na absolutní teplotě T a molové hmotnosti m_m . Pro dopplerovskou šířku čáry platí [19, 26]:

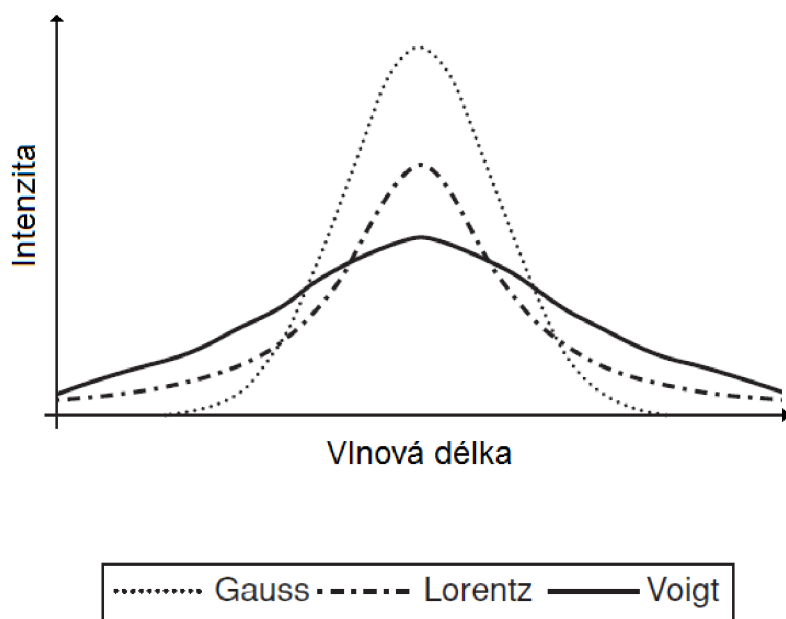
$$2\delta\lambda_D = \frac{2\lambda_0}{c} \sqrt{\frac{2RT \ln 2}{m_m}}, \quad (1.3)$$

kde R je plynová konstanta, c je rychlost světla a λ_0 je vlnová délka maxima čáry.

Lorentzovský tvar čáry vzniká přirozeným rozšířením a jako důsledek srážek zářících částic s okolními částicemi. Přirozené rozšíření je dáno neurčitostí polohy energiových hladin.

Často mají oba tvary srovnatelnou velikost. Výsledný tvar vzniklý konvolucí Gaussova profilu a Lorentzova profilu se nazývá Voigtův profil. Porovnání Gaussova a Lorentzova profilu a jejich konvoluce je zobrazeno na obr. 4.

Srážka zářícího atomu s okolními nabitými částicemi vyústí ve Starkovo rozšíření. Jedná se o rozštěpení a posunutí energiových hladin zářícího atomu vlivem elektrického pole, což se projeví rozšířením spektrální čáry. Starkovo rozšíření dominuje v plazmatu s vysokou elektronovou hustotou.



Obr. 4: Znárodnění Gaussova, Lorentzova a Voightova profilu. Převzato a upraveno z [22].

Pokud se v plazmatu vyskytuje vyšší koncentrace stejných atomů, nastává situace, kdy vyzářený foton jednoho atomu je zachycen dalším atomem. Tento jev nazýváme rezonanční absorpce a rovněž přispívá k rozšíření spektrální čáry. Schéma rezonanční absorpce znázorňuje obr. 5 (kapitola 1.1.2.3 Optická hustota).

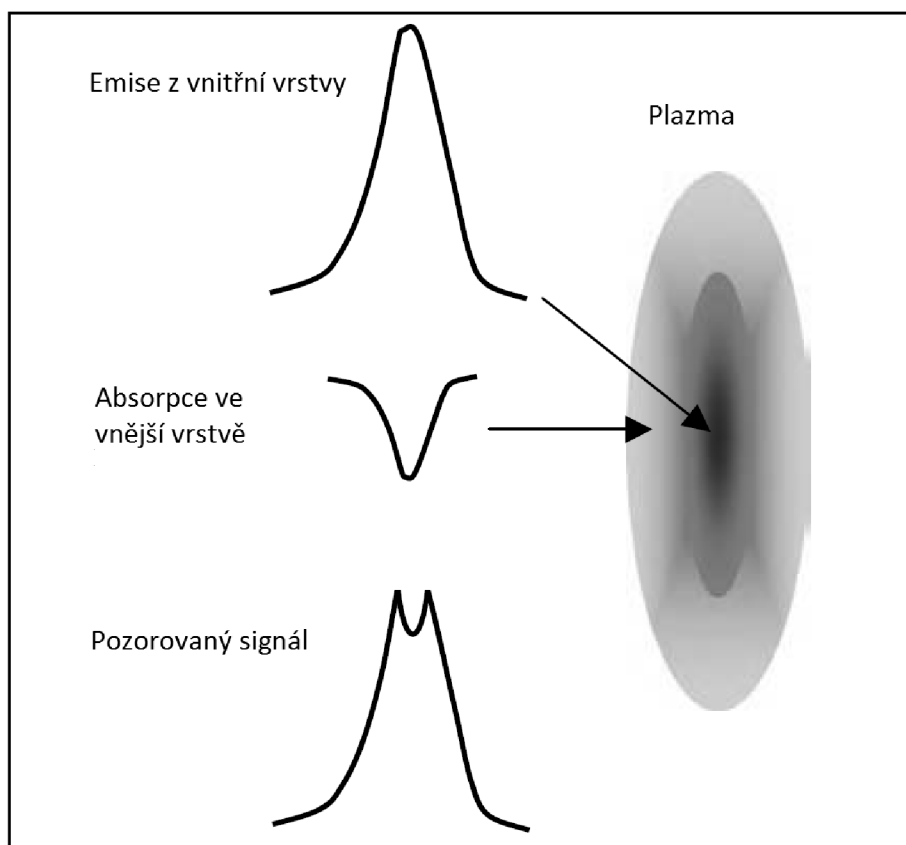
1.1.2.3 Optická hustota

Plazma nazveme opticky tenké, jestliže emitované záření opustí plazma bez výrazné absorpce či rozptylu.

Existují dva relativně jednoduché způsoby, jak zjistit optickou hustotu plazmatu.

Zprvé, spektrální čáry prvků mají známý poměr relativních intenzit. Pokud se objeví zvýšená absorpce, pak pozorovaná intenzita je nižší než předpokládaná intenzita čáry.

Dalším jevem, který značí vyšší absorpci je zploštění nejintenzivnějších spektrálních čar. V extrémních případech může dojít i k propadu spektrální čáry (rezonanční absorpce), viz obr. 5.



Obr. 5: Schéma vzniku rezonanční absorpce. Převzato a upraveno z [22].

1.1.3 Analýza spektra

Základem LIBS experimentu je emisní spektrum, které obsahuje informaci o prvkovém složení měřeného vzorku. Důležitá je znalost polohy a intenzity emisních čar. Další poznatky můžeme získat i z šířky čáry, a také z jejího časového vývoje.

Analýza spektra může být kvalitativní i kvantitativní. Kvalitativní analýza se zabývá určováním přítomnosti jednotlivých prvků ve vzorku. Kvantitativní analýza zjišťuje množství daného prvku ve vzorku.

1.1.3.1 Kvalitativní analýza

Každý prvek má své charakteristické spektrum. Jedná se o jednoznačný „otisk prstu“, který se pokoušíme v naměřeném spektru objevit. Pokud naměříme „složitě“ spektrum, je i identifikace prvků obtížná. K úplnému a správnému rozluštění spekter je zapotřebí určitá dávka znalostí, zkušeností a citu. Při posuzování složitých spekter je vhodné brát v úvahu následující rady [19]:

1. *Jistá znalost vzorku:*

Vždy je jednodušší, pokud víme, které prvky můžeme očekávat. Velice obtížně se určují nečekané stopové prvky, jejichž spektrální čáry jsou blízko vlnových délek nejintenzivnějších čar hlavních prvků.

2. *Relativní intenzity čar z tabulky vlnových délek:*

Tabulka vlnových délek nám může pomoci při identifikaci spektrálních čar. Avšak musíme vzít v úvahu, že relativní intenzita závisí na zdroji a současné tabulky vlnových délek zpravidla nejsou vytvořeny pomocí laseru.

3. *Ionizace prvku:*

Předpokládejme, že se ve vzorku nalézají dva stejně zastoupené prvky, jejichž čáry vzájemně interferují. Jestliže jedna patří neutrální částici a druhá dvakrát či třikrát ionizované částici, pak to je s největší pravděpodobností spektrální čára neutrální částice.

4. *Podmínky měření:*

Jisté experimentální podmínky mohou pomoci při určování prvků. Například na vzduchu je pozorováno záření Fe (I) a Fe (II) s ionizačním potenciálem Fe (I) 7,87 eV, ale ve vakuu lze také naměřit Fe (III) s ionizačním potenciálem 16,18 eV.

5. *Pozorování výrazných čar:*

Mnoho prvků má několik výrazných spektrálních čar. Pokud se v naměřeném spektru jedna objeví, pak by tam ostatní měly být také.

1.1.3.2 Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza začíná měřením standardů o dané koncentraci zkoumaného prvku. Intenzity vybrané čáry v závislosti na koncentraci látky se poté vynesou do grafu a vytvoří se kalibrační křivka. Naměřená intenzita čáry ze spektra neznámého vzorku se srovná s kalibrační křivkou a určí se koncentrace zkoumaného prvku v neznámém vzorku.

Kalibrace je velmi citlivá na experimentální podmínky. Proto při měření neznámého vzorku je nutné experiment provést při stejných podmínkách jako při přípravě kalibrační křivky.

Některé parametry měření však nemohou být jednoduše zopakovány, jako jsou například vlastnosti a příprava vzorku. Fyzikální a chemické vlastnosti vzorku mají velmi velký vliv na kvantitativní data. A právě jedna z největších předností metody LIBS, kterou je možnost měření na neupravených vzorcích, je jednou z největších překážek u kvantitativní analýzy.

1.1.4 Matriční efekt

Jako u jiných analytických metod i měření pomocí metody LIBS ovlivňuje matriční efekt. Totiž fyzické vlastnosti a složení vzorku mají vliv na intenzitu spektrální čáry zkoumaného prvku.

Přípravou vzorku je možné do určité míry matričnímu efektu předejít, tím však metoda LIBS přichází o jednu ze svých výhod [20].

Matriční jev můžeme rozdělit na dva typy: fyzikální a chemický.

Fyzikální matriční efekt závisí na fyzikálních vlastnostech vzorku a projevuje se během ablační fáze. Vlastnosti, jako je např. tepelná kapacita, skupenské teplo varu, termální vodivost, absorpce atd., mají vliv na množství ablatovaného prvku a na vlastnosti plazmatu.

Chemický matriční efekt pozorujeme, když přítomnost jednoho prvku ovlivní emisi jiného prvku. Tento jev může zkomplikovat kvantitativní analýzu, pokud nevíme, zda a jaký na sebe mají prvky vliv.

V určitých případech je možné matričního efektu využít, např. v případech, kdy se rozlišují vzorky s velmi blízkým prvkovým složením, ale rozdílnou maticí.

1.2 Ramanova spektroskopie

1.2.1 Stručný popis Ramanovy spektroskopie

Ramanova spektroskopie a infračervená absorpce jsou základní spektroskopické metody používané k detekci vibrací molekul. Obě metody jsou široce využitelné k získání informací o chemické struktuře. Pomocí těchto metod jsme schopni identifikovat rozdílné látky na základě jejich charakteristického spektra. Ramanovou spektroskopií se zabývá řada publikací, např. [6, 27, 28]

Během interakce světla s látkou může nastat jeden z těchto tří případů [6]:

1. Foton projde látkou beze změny.
2. Pokud energie dopadajícího fotonu odpovídá rozdílu mezi základním energiovým stavem molekuly a vyšším excitovaným stavem, může dojít k absorpci fotonu a excitaci molekuly. Tato změna se detekuje pomocí metod patřících do skupiny absorpční spektroskopie, kam spadá již zmíněná infračervená absorpce.
3. Další možností je, že foton interaguje s molekulou a rozptýlí se o ni. V tomto případě nemusí odpovídat energie fotonu rozdílu dvou energiových hladin molekuly. Rozptýlené fotony mohou být detekovány pod různým úhlem od dopadajícího světelného svazku. Efektivita rozptylu fotonu závisí na čtvrté mocnině frekvence. Ramanova spektroskopie je nejvýznamnější metodou z této kategorie k detekci molekul.

Ramanova spektroskopie využívá monochromatické záření k osvětlení vzorku a pozoruje rozptýlené záření o rozdílné frekvenci. Změna energie rozptýlených fotonů odpovídá energii nutné k vybuzení vibrací molekul. Tato energie je unikátní pro každou molekulu a na základě této znalosti lze ze spektra jednotlivé molekuly rozeznat.

1.2.2 Rozptyl a absorpce záření

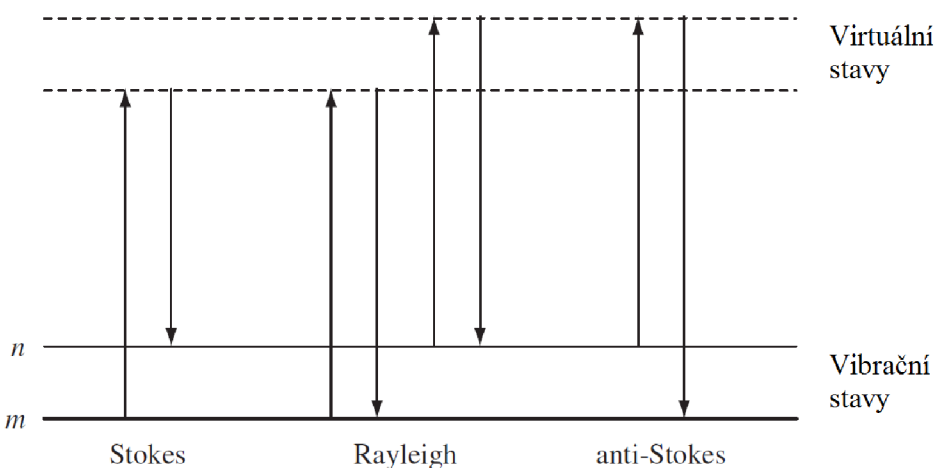
Pokud dojde k rozptylu záření na elektronech, pak rozptýlené fotony budou vykazovat velmi malou změnu frekvence, jelikož elektrony jsou v porovnání s atomy lehké. Tento rozptyl lze brát jako pružný rozptyl a nazývá se Rayleighovo rozptyl.

Dojde-li během rozptylu ke změně vibrací molekuly, energie je buď převedena z dopadajícího fotonu molekule, nebo z molekuly rozptýlenému fotonu. V tomto případě se jedná o nepružný rozptyl a nazývá se Ramanův rozptyl. Je to slabý proces, protože pouze jeden foton z 10^6 - 10^8 fotonů je takto rozptýlen.

Obrázek 6 ukazuje základní procesy, jež mohou nastat během rozptylu. Při pokojové teplotě většina molekul setrvává v nejnižším energiovém vibračním stavu. Pokud taková molekula interaguje s procházejícím fotonem, foton způsobí polarizaci elektronů a vybudí je do vyššího energiového stavu. Tato interakce může být považována jako vznik krátkodobé formace

fotonu a elektronů molekuly. Výsledkem je vysoko energiová forma molekuly s rozdílnou elektronovou geometrií, ale bez velké změny v pohybu jader.

Tento stav nazýváme virtuálním stavem molekuly, neboť žádný normální energiový stav nedokáže popsat tuto elektronovou konfiguraci. Navíc energie tohoto stavu a rozložení elektronů přímo závisí na frekvenci světelného zdroje. Virtuální stavy jsou nestabilní a okamžitě dochází k uvolnění rozptýleného fotonu.



Obr. 6: Znárodnění Stokesova, Rayleigha a anti-Stokesova rozptylu. Převzato a upraveno z [6].

Rayleigha proces je nejintenzivnější, protože většina fotonů se takto rozptyluje. Nedochozí k přenosu energie, tudíž rozptýlený foton má stejnou energii jako foton dopadající.

Proces Ramanova rozptylu začíná na nejnižší vibrační hladině m . Pokračuje absorpcí části energie molekulou a povýšení do vyššího vibračního stavu (n). Tento jev se nazývá Stokesův rozptyl.

Vlivem termální energie se mohou některé molekuly nacházet ve vyšším vibračním stavu (n). Rozptyl, který vede k přechodu molekuly ze stavu n do nejnižšího stavu m , se nazývá anti-Stokesův rozptyl.

Relativní intenzita těchto dvou procesů je dána populací jednotlivých stavů molekuly. Populaci jednotlivých stavů lze zjistit pomocí Boltzmannova vztahu [6],

$$\frac{N_n}{N_m} = \frac{g_n}{g_m} \exp \left[\frac{-(E_n - E_m)}{kT} \right] \quad (1.4)$$

N_n je počet molekul v excitované vibrační hladině (n),

N_m je počet molekul v základní vibrační hladině (m),

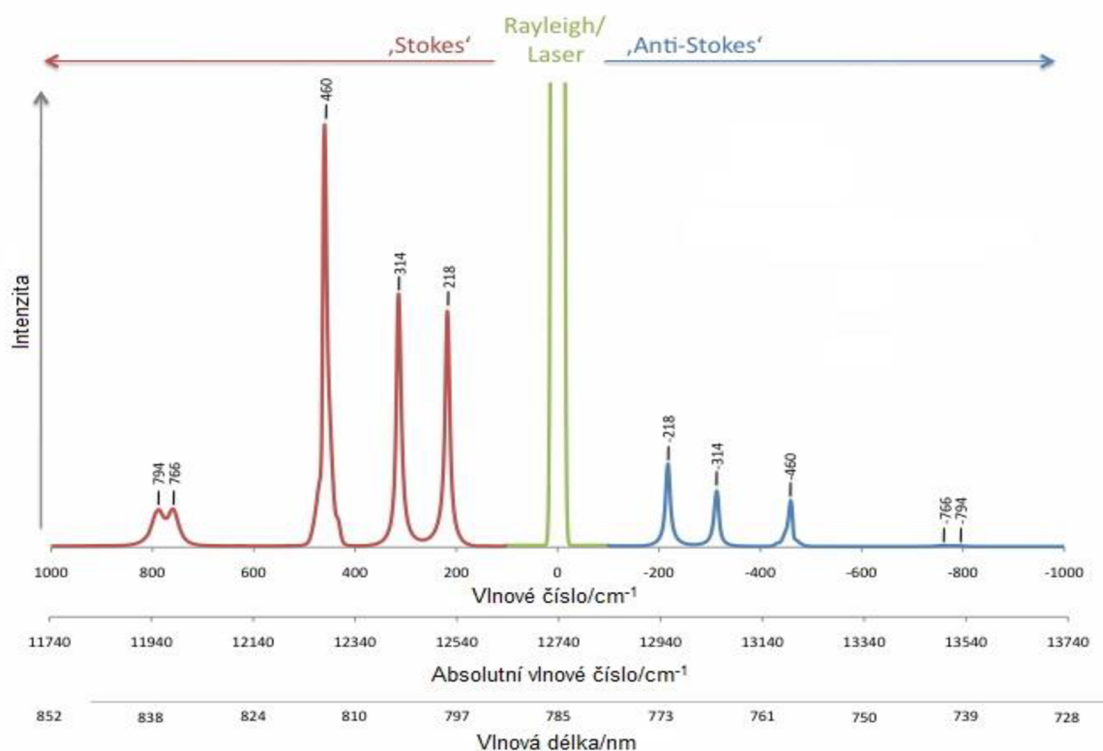
g je degenerace stavů n a m ,

$E_n - E_m$ je rozdíl energií mezi vibračními stavy,

k je Boltzmannova konstanta,

T je teplota.

Při pokojové teplotě bude zaplnění vyšších vibračních stavů nízké. To je důvod, proč je anti-Stokesův rozptyl slabší ve srovnání se Stokesovým rozptylem. Příklad naměřeného spektra je ukázán na obr. 7.



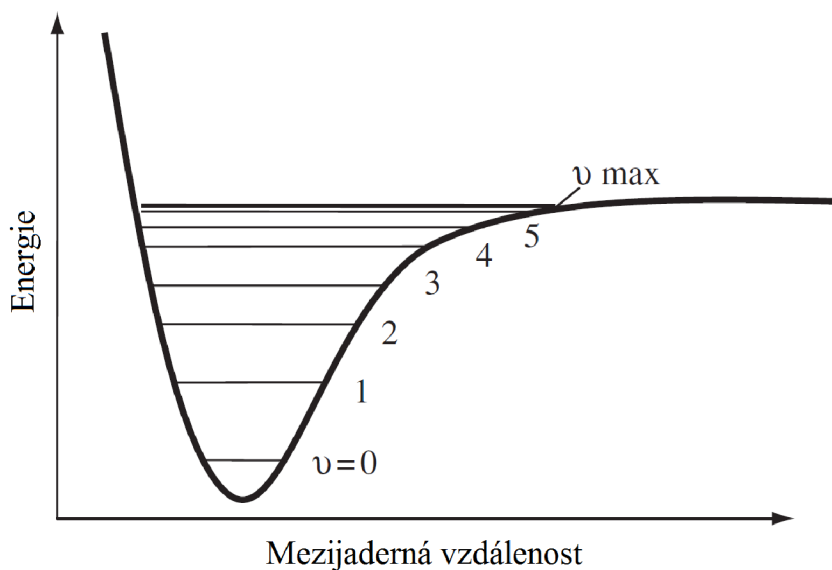
Obr. 7: Porovnání signálu Stokesova a anti-Stokesova rozptylu. Převzato a upraveno z [29].

Obvykle v Ramanově spektroskopii využíváme rozptýlené fotony s nižší energií, tedy Stokesův rozptyl. Někdy je ovšem vhodné použít anti-Stokesův rozptyl, například pokud se chceme vyhnout signálu vzniklému fluorescencí. Rozdíl v intenzitách Stokesova rozptylu a anti-Stokesova rozptylu může posloužit k výpočtu teploty.

Na obrázku 6 lze také ilustrovat rozdíl mezi infračervenou absorpcí a Ramanovým rozptylem. Jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole, infračervená absorpce zahrnuje přímou excitaci molekuly ze stavu m do stavu n fotonem o energii, která odpovídá rozdílu těchto dvou stavů. Kdežto Ramanova spektroskopie používá mnohem vyšší energii dopadajícího záření a měří rozdíl dopadajícího a rozptýleného fotonu.

1.2.3 Elektronová konfigurace a Hookův zákon

Každá molekula obsahuje mnoho vibračních a rotačních stavů. Na obrázku 8 je znázorněna Morseho křivka, jež popisuje přibližný průběh základního energetického stavu molekuly v závislosti na vzdálenosti jader.



Obr. 8: Průběh základního energiového stavu molekuly v závislosti na vzdálenosti jader.
Převzato a upraveno z [6].

Jsou-li jádra daleko od sebe, chovají se jako volné atomy. Když se k sobě dostatečně přiblíží, vznikne mezi nimi vazba. Mezijaderná vzdálenost, ve které má molekula minimální energii, se nazývá vazebná délka. Ne všechny energie jsou dostupné, jelikož molekula vibruje. Proto do tohoto modelu musíme přidat vibrační stavy, které jsou kvantovány.

První hladina ($v = 0$) je základní vibrační stav, ve kterém molekula nevibruje. Druhé hladiny ($v = 1$) molekula dosáhne, pokud absorbuje kvantum energie a dojde k vibracím. Energiové rozdíly mezi vyššími hladinami jsou přibližně (ale ne přesně) stejné jako kvantum energie při přechodu ze stavu 0 do stavu 1. K přechodům přes několik kvantových stavů dochází v Ramanově spektroskopii výjimečně a jsou velmi slabé.

Pro úplnost bychom měli ještě přidat rotační stavy, ty mají menší energii než vibrační hladiny, a pro přehlednost je do grafu nezavádíme.

Jelikož Ramanův rozptyl je rychlá událost ve srovnání s pohybem jader, nedochází během rozptylu ke změně mezijaderné vzdálenosti, viz obr. 8. Můžeme tedy jednotlivé hladiny kreslit jako horizontální čáry, energiové přechody mezi nimi pomocí vertikálních čar (jak je to znázorněno na obr. 6) a ostatní vlastnosti Morseho křivky zanedbáme.

Tvar Morseho křivky je složitý pro výpočet energie jednotlivých hladin. Pro zjednodušení výpočtu se používá harmonická aproximace. Dojde k nahrazení Morseho křivky parabolou vypočtenou pro dvouatomovou molekulu za předpokladu, že se jedná o kmitání dvou těles na pružině.

S tímto přístupem můžeme použít Hookův zákon. Vztah mezi frekvencí $\tilde{\nu}$ (v jednotkách cm^{-1}), hmotností kmitajících atomů M_A a M_B a silovou konstantou vazby dvouatomové molekuly K určíme takto [6, 30]:

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{K}{\mu}}, \quad (1.5)$$

kde c je rychlost světla a μ je redukovaná hmotnost atomů definovaná takto:

$$\mu = \frac{M_A M_B}{M_A + M_B}. \quad (1.6)$$

Tyto vztahy nám poskytnou jednoduchý odhad frekvencí jednotlivých dvouatomových molekul. Čím lehčí atomy budou, tím vyšší bude i jejich frekvence kmitání. Například molekula C-H vibruje kolem 3000 cm^{-1} a C-I vibruje pod 500 cm^{-1} [6]. S rostoucí pevností vazby poroste také frekvence.

1.2.4 Vibrace molekul

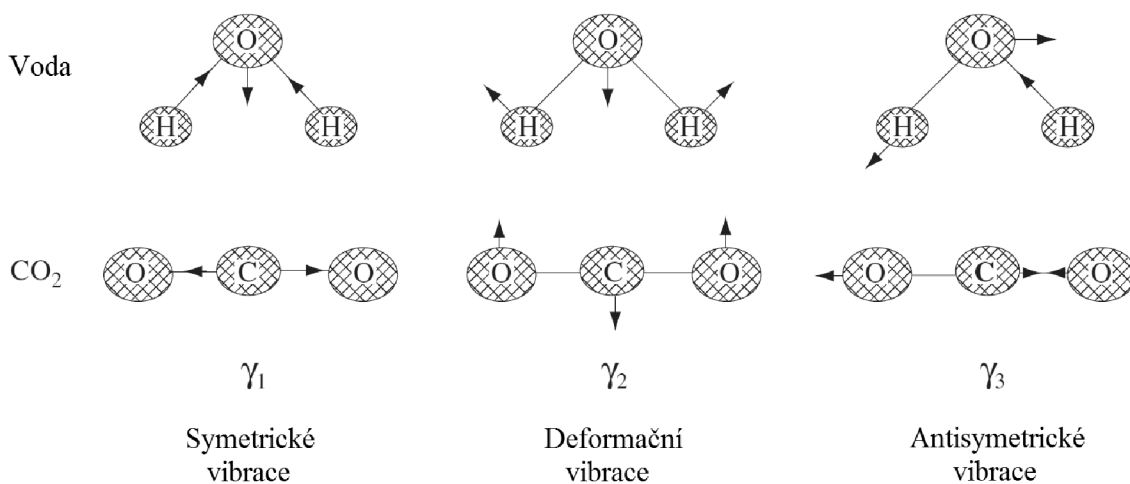
Intenzivní Ramanovský rozptyl pozorujeme u vibrací, které způsobuje polarizace elektronů kolem molekuly. Obvykle to jsou symetrické vibrace, jež dávají největší rozptyl. Naproti tomu nejintenzivnější infračervená absorpce je způsobena změnou dipólu, a to se nejvíce projevuje u antisymetrických vibrací.

Speciální případ nastává u středově symetrických molekul, u kterých nemohou být aktivní zároveň Ramanův rozptyl a infračervená absorpce.

Pokud nedojde ke změně energie elektronů v molekule (např. excitací), může být vibrační energie molekuly rozdělena na různé „stupně volnosti“. Tři stupně volnosti popisují translační pohyb molekuly a tři rotační (s výjimkou lineárních molekul, které mají pouze dva stupně volnosti rotace). Pokud N udává počet atomů v molekule, poté počet celkových možných vibrací je $3N - 6$ pro všechny molekuly kromě lineárních. Lineární molekuly mají $3N - 5$ možných vibrací.

Pro dvouatomové molekuly to znamená, že mají pouze jednu možnou vibraci. Například pro molekulu O-O dochází pouze k napínání vazby. Tato vibrace mění polarizaci molekuly, ale neindukuje změnu dipólu. Z tohoto důvodu kyslíkový plyn poskytuje pouze Ramanův rozptyl.

Třiatomové molekuly mají tři mody vibrací. Dělíme je na symetrické, antisymetrické a deformační vibrace. Obrázek 9 zobrazuje tyto tři druhy vibrací pro molekulu vody a oxidu uhličitého. V třiatomových molekulách symetrické vibrace zapříčiňují velkou změnu polarizace, proto převažuje Ramanův rozptyl. Deformační vibrace zase způsobují dipólovou změnu, tedy převažuje infračervená absorpce.



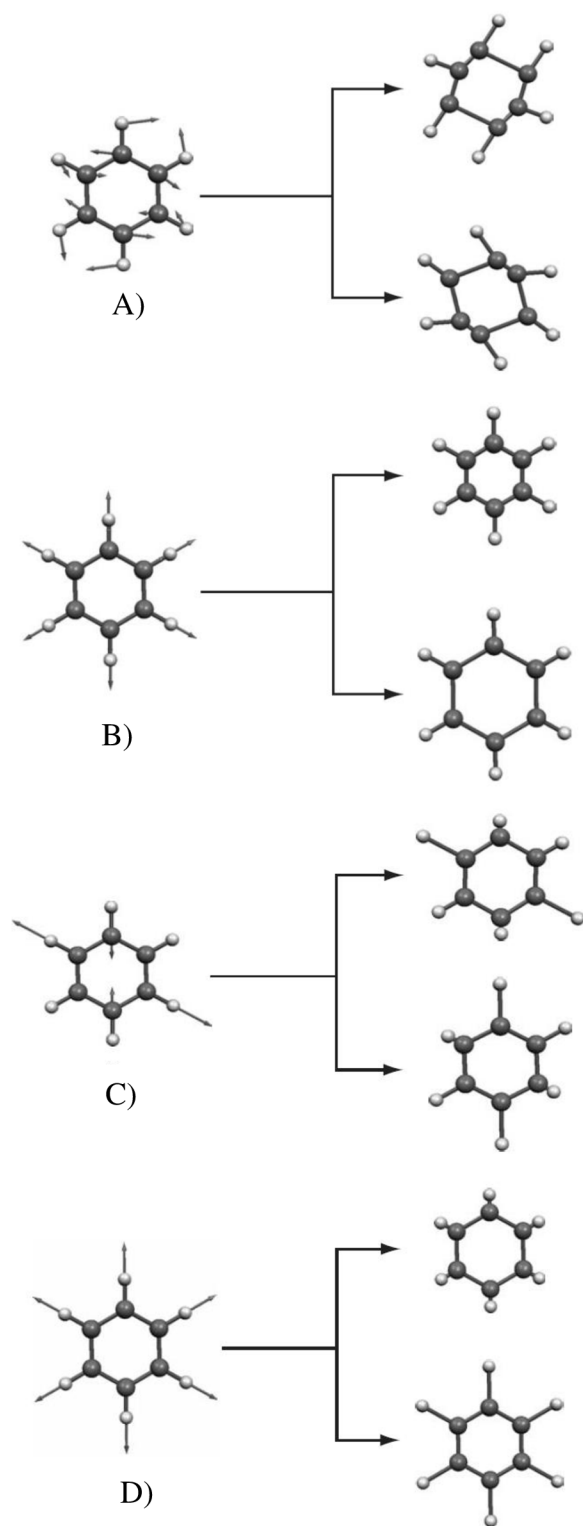
Obr. 9: Znárodnění vibrací na molekulách vody a CO₂. Převzato a upraveno z [6].

1.2.4.1 Skupinové vibrace

Také musíme brát v úvahu skupinové vibrace předtím, než přiřadíme všechny naměřené vibrace k spektrálním čarám. Dvě a více vazeb vzájemně blízké polohou i energií spolu mohou interagovat. Výsledkem je vibrace skupiny atomů, kterou pozorujeme v naměřeném spektru. Vhodný příklad je skupina CH₂. O této skupině spíše řekneme, že má symetrické a antisymetrické vibrace, než abychom hovořili o dvou nezávislých vibracích CH vazby.

Na druhou stranu je možné zabývat se vazbami jednotlivě. A to buď v případě, kdy dochází k velkým rozdílům v energii vibrací vazeb, nebo když jsou atomy v molekule dostatečně separovány. Příkladem takového přístupu je molekula CH₃Br. C-H vazby musí být brány jako skupina CH₃. Kdežto vibrace vazby C-Br jsou nezávislé na skupině CH₃.

Obrázek 10 znázorňuje vibrace benzenu. Vlevo se nachází molekula v rovnovážném stavu s naznačenými pohyby atomů. Vpravo jsou ukázány extrémní polohy tohoto pohybu.



Obr. 10: Vybrané ukázky vibrací benzenu. A) Vibrace kolem 1600 cm^{-1} . B) Symetrické „dýchání“ benzenu v oblasti kolem 1000 cm^{-1} . C a D) Dvě C-H vibrace kolem 3000 cm^{-1} . Převzato a upraveno z [6].

1.2.5 Analýza Ramanovského spektra

Ramanova spektra nejsou na první pohled závislá na chemickém složení a skupenství vzorku. Ze spektra nelze zřetelně poznat, zda se jedná o pevnou, kapalnou, či plynnou látku, ale různá skupenství ovlivňují intenzitu spektra. Obecně platí, že krystalické pevné látky mívají intenzivnější spektrum, zatímco plynné látky a kapaliny slabší spektrum. Tlak, orientace krystalové mřížky a čistota vzorku mohou také ovlivnit tvar spektra, ale změna je většinou nepatrná. Spektrum je velmi citlivé na teplotu. Pásky jsou rozšířené převážně díky fluorescenci, vypálení vzorku, slabému rozlišení nebo zesílení slabých spekter pozadí (vody, skla).

Při vyhodnocování spektra musíme brát v úvahu vše, co víme o měřeném vzorku. Znalost skupenství, čistoty vzorku, způsob přípravy vzorku a vliv měřicích přístrojů umožní lépe interpretovat naměřená spektra.

K přiřazení jednotlivých čar k vibracím používají moderní laboratoře knihovny, ve kterých jsou kompletní spektra elektronicky uložena. Dnes již většina spektrometrů obsahuje software k rozlišení podobností a rozdílů mezi naměřeným spektrem a spektrem standardu. Díky tomu mohou být jednotlivé složky jednoduše identifikovány.

Další způsob identifikace je pomocí teoretických výpočtů použitím metody funkcionálu hustoty (DFT, density functional theory). Velkou výhodou je přesnější odhad povahy vibrací, a z toho přesnější určení molekulové struktury.

Přestože Ramanovu spektroskopii převážně spojujeme s kvalitativní analýzou, kvantitativní analýza je také možná. Kvantitativní analýza je založena na principu lineární superpozice. Ramanovské spektrum vzorku je rovno součtu vážených spekter jednotlivých komponent obsažených ve vzorku [30].

2 Experimentální část

2.1 Bakterie

Během experimentu se měřilo těchto šest bakterií:

1. *Escherichia coli*, CCM 3954
2. *Staphylococcus aureus*, CCM 4223
3. *Staphylococcus aureus*, CCM 4750 (MRSA-meticilin rezistentní)
4. *Staphylococcus aureus*, CCM 3953 (MSSA-meticilin sensitivní)
5. *Staphylococcus sciuri*
6. *Staphylococcus pseudointermedius*

První čtyři bakterie pocházejí z České sbírky mikroorganismů a poslední dvě jsou z Národní referenční laboratoře pro stafylokoky. Kmeny byly identifikovány pomocí metody maticí asistovaná laserová desorpce kombinovaná s hmotnostním spektrometrem a analyzátořem doby průletu (MALDI-TOF MS).

Bakterie se kultivovaly ze zmražených vzorků na Mikrobiologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u sv. Anny. Kultivace probíhala 24 hodin na agaru Mueller-Hinton při teplotě 37°C.

2.1.1 Stafylokoky

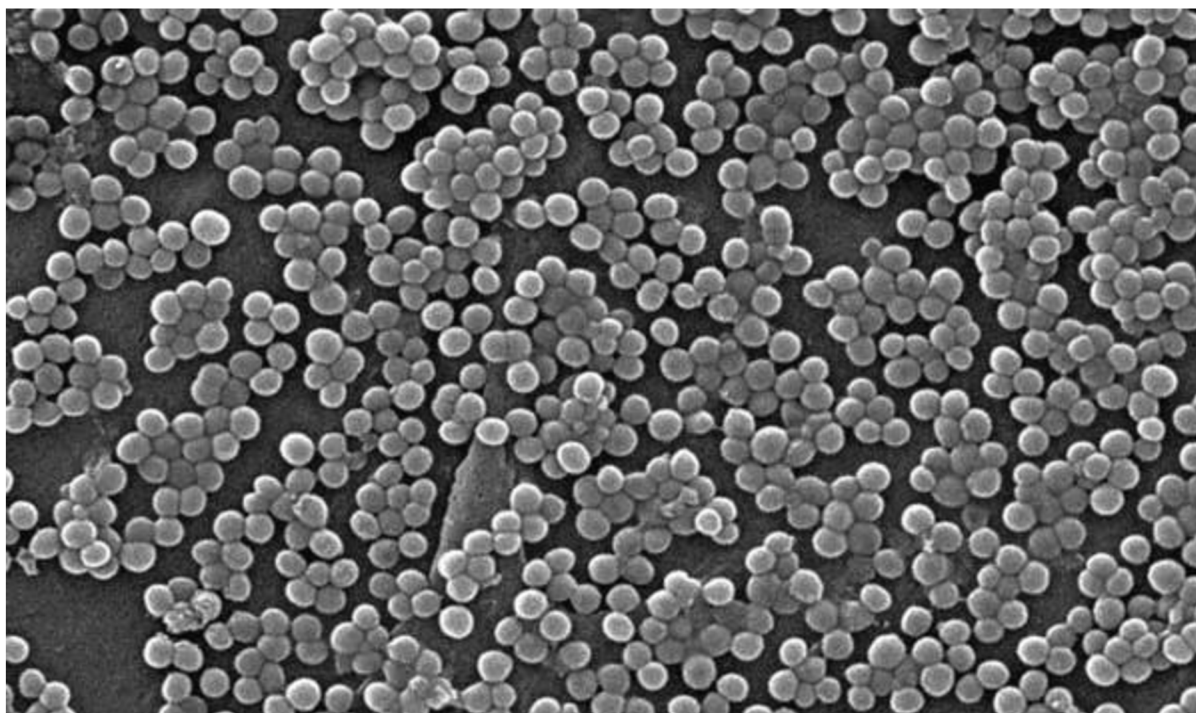
Stafylokoky jsou grampozitivní bakterie o velikosti kolem 1 µm. Koky stafylokoků se formují do tvaru charakteristických hroznů, viz obr. 11. Většina kmenů se u lidí vyskytuje na sliznici a na kůži [31].

Klinicky významným druhem je *Staphylococcus aureus*. Jedná se o koaguláza-pozitivního stafylokoka, který může způsobovat různá infekční onemocnění. Obzvláště odolné vůči léčbě jsou meticilin rezistentní kmeny.

Staphylococcus sciuri a *Staphylococcus pseudointermedius* na rozdíl od *Staphylococcus aureus* koagulázu neprodukuje.

2.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která se vyskytuje ve střevním traktu savců jako normální součást mikroflóry. Přesto některé kmeny mohou způsobovat infekci v lidské trávicí soustavě. Navíc *E. coli* je nejčastěji izolovaný patogen způsobující infekci močových cest [31].



Obr. 11: Obraz shluků meticilin rezistentního *Staphylococcus aureus*. Obraz byl pořízen pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu se zvětšením 4780x. Převzato a upraveno z [32].

2.2 Popis aparatury

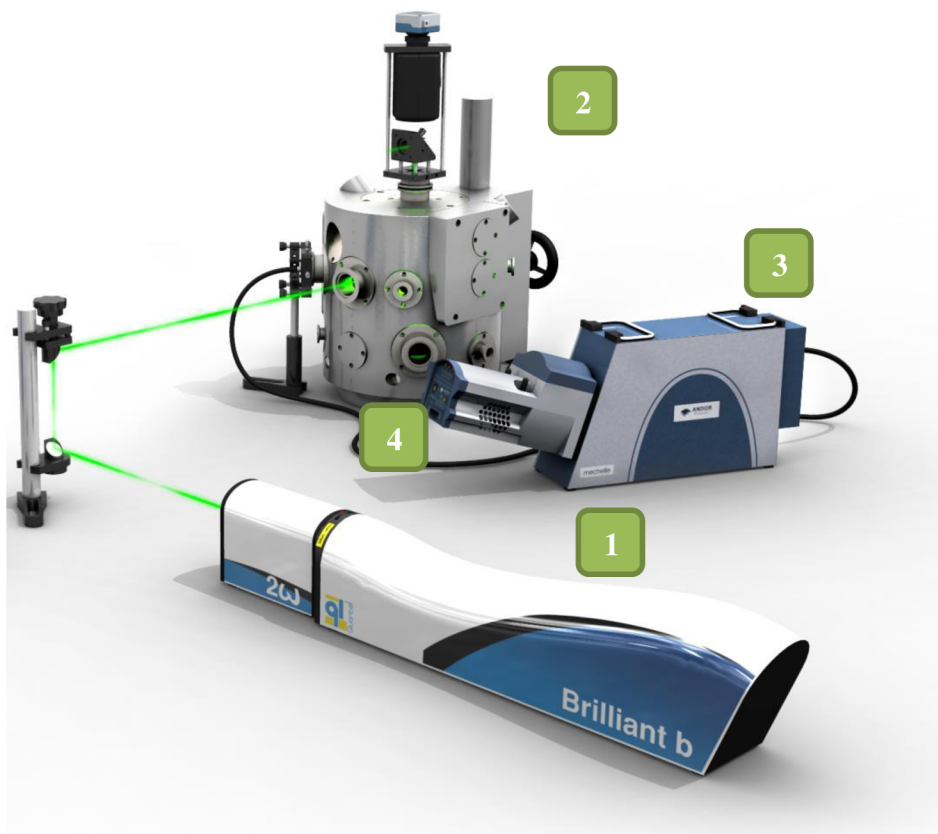
2.2.1 LIBS

Experimenty probíhaly na dvou přístrojích v laboratoři podskupiny Laserové spektroskopie na Ústavě fyzikálního inženýrství Fakulty strojního inženýrství na Vysokém učení technickém v Brně. Byly použity dvě aparatury, aby se určilo, která sestava se lépe hodí na měření bakterií. Při použití obou přístrojů je navíc možné použít dvě naměřená spektra a přispět k lepšímu rozlišení vzorků.

První sestava obsahuje pulzní laser Brilliant b (Quintel, FR), který pracuje na vlnové délce 1064 nm s délkou pulzu 4 ns. Laserový pulz je veden pomocí zrcadel do interakční LIBS komory. Následně se laserový pulz fokusuje na vzorek pomocí objektivu skládajícího se ze tří čoček (Sill Optics, DE) o ohniskové vzdálenosti 25 mm.

Záření vzniklého plazmatu je zachyceno achromatickým kolimačním systémem zrcadel CC52 (Andor, UK) a vedeno optickým kabelem ($\text{\O}40 \mu\text{m}$, Thorlabs, USA) do spektrometru typu echelle Mechelle 5000 (Andor, UK; rozsah vlnových délek: 200-975 nm, apertura: F/7, spektrální rozlišení: $6000 \lambda/\Delta\lambda$). Spektrálně rozlišené záření se zaznamená ICCD kamerou iStar 734i (Andor, UK; 1024 x 1024 pixelů, efektivní velikost pixelu $19,5 \times 19,5 \mu\text{m}$). Začátek a délku snímání spektra kontroluje pulzní generátor DG535 (Stanford Research System, US) a speciální elektronika vyvinutá v laboratoři LIBS. Všechny zmíněné zařízení jsou řízeny počítačem.

Obrázek 12 ukazuje schéma použité aparatury.



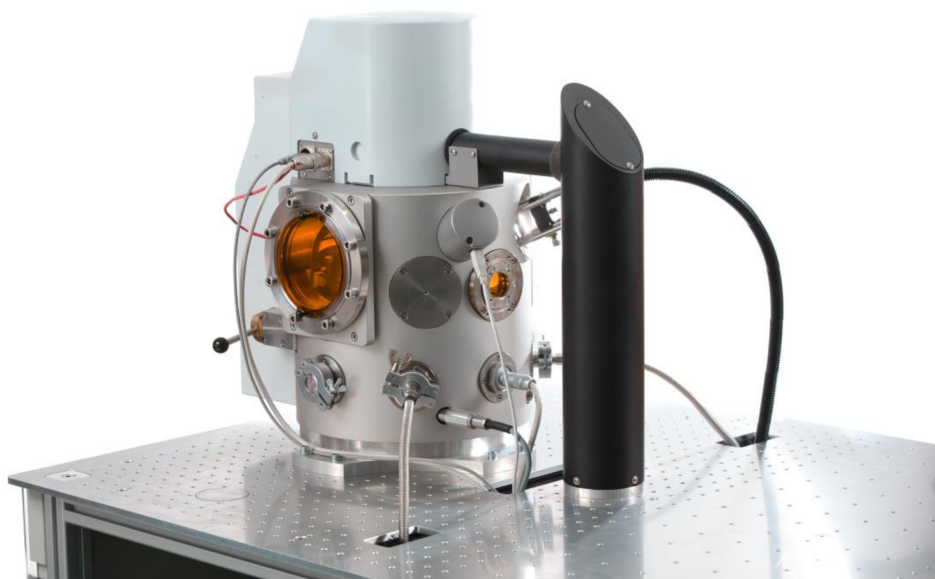
Obr. 12: Schéma měřicí aparatury. 1) excitační laser Quantell Brilliant B, 2) LIBS interakční komora, 3) spektrometr Andor Mechelle 5000, 4) ICCD kamera Andor iStar 734. Převzato a upraveno z [33].

Druhým systémem je komerčně dostupný přístroj Sci-Trace (Atom Trace, CZ) tvořený skříní, ve které se nacházejí přístroje a LIBS interakční komory, viz obr. 13 a 14. Vzduchotěsná komora je uchycena na optické lavici, jež se nachází na horní desce skříně. Jako zdroj laserového záření se používá pulzní Nd:YAG laser Quantel CFR-400 b (Quantel, FR) s frekvencí 20 Hz na vlnové délce 532 nm, s délkou pulzu 10 ns a průměrem laserového svazku 8 mm. Laserový svazek se zavádí do interakční komory sérií laserových zrcadel a je fokusovaný na vzorek pomocí objektivu skládajícího se ze tří čoček (Sill Optics, DE) o ohniskové vzdálenosti 32 mm.

Záření plazmatu je zachyceno kolimátorem, který se skládá z kombinace čoček (100 mm CaF₂ a 75 mm UVFS; Thorlabs, US), a vedeno do spektrometru typu echelle Emu-65 (Catalina Scientific, US). Spektrálně rozlišené záření se poté zaznamenává EMCCD kamerou Falcon blue (Raptor, IE). Synchronizaci laseru a kamery zabezpečuje pulzní generátor 9200 Sapphire (Quantum Composers, US).



Obr. 13: Fotka komerčního systému Sci-Trace (Atom Trace, CZ).



Obr. 14: Detail interakční LIBS komory systému Sci-Trace (Atom Trace, CZ).

2.2.2 Ramanova spektroskopie

Měření Ramanovy spektroskopie probíhalo na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky. Experimenty se prováděly na komerčně dostupném Ramanově mikroskopu *inVia* Reflex (Renishaw, UK), viz obr. 15.

K excitaci se používal diodový laser o vlnové délce 785 nm. Laserové záření bylo na vzorek fokusováno pomocí objektivu Leica 50x (NA 0,5). Stopa svazku na vzorku je ve tvaru obdélníku 3 x 10 μm . Rozptýlené záření je zachyceno optickou soustavou a přivedeno do spektrometru (oblast snímání spektra 600-1700 cm^{-1}).



Obr. 15: Fotka komerčního Ramanova mikroskopu *inVia* Reflex (Renishaw, UK). Převzato z [34].

2.3 Metodika měření

2.3.1 Ramanova spektroskopie

Po vypěstování se bakterie nejdříve měřily Ramanovou spektroskopií. Bakterie během měření zůstaly v Petriho misce. Každý vzorek se změřil desetkrát na různých místech. Perioda jednoho měření byla 15 s.

2.3.2 LIBS

Energie laserového pulzu byla nastavena na 50 mJ. Je známo, že se vrůstající intenzitou laserového pulzu dochází k potlačení matričního efektu. S ohledem na tento fakt byla zvolena minimální energie, při které vznikalo spektrum s dobře identifikovatelnými spektrálními čarami základních prvků. Záření plazmatu se začalo snímat 1,2 μs po dopadu laseru a snímání probíhalo po dobu 50 μs .

Během LIBS měření zůstaly bakterie opět v Petriho misce. Vybrala se oblast s vysokou koncentrací bakterií, viz obr. 16. Zde se vytvořila obdélníková síť 25 x 10 bodů a v každém bodě proběhlo jedno měření. Vzdálenost jednotlivých bodů byla 0,65 mm. Velikost ablačního

kráteru se pohybovala v závislosti na místě dopadu na vzorku v rozmezí 0,2 – 0,6 mm. Na obrázku 14 můžeme vidět, že na některých místech vzorku se neměřily vypěstované bakterie, ale jenom samotný agar. Spektrum agaru však bylo možné od spektra bakterií odlišit a z výsledků odfiltrovat (viz kapitola 3.1.1 Příprava měření).

Těchto 250 spekter se seřadilo podle totální emisivity od nejintenzivnějšího po nejméně intenzivní tak, že se sečetly intenzity přes všechny vlnové délky. Jedná se o jeden z běžně používaných postupů při třídění spekter. Třídění umožnilo spektra agaru filtrovat a zkoumat pouze spektra bakterií.

Z naměřených dat byly odstraněny extrémní případy. Tato extrémní spektra mohla vzniknout chybou měření, nehomogenitou na vzorku, anebo se jedná o spektra agaru. Z těchto důvodů se vybralo padesát spekter a vždy se jednalo o padesáté až sté nejintenzivnější spektrum z 250 naměřených.



Obr. 16: Fotka vypěstovaných kolonií *Staphylococcus aureus*. 250 LIBS měření proběhlo na oblasti 16,25 x 6,5 mm.

2.3.3 Škálování spektra

Jelikož by spektra Ramanovy spektroskopie a metody LIBS měly mít v dalším zpracování stejnou váhu, bylo nutné spektra škálovat. Spektra jsem škáloval tak, aby minimum spektra mělo hodnotu 0 a maximum bylo rovno 1 dle vztahu:

$$y_i = \frac{x_i - \min x}{\max x - \min x}, \quad (2.1)$$

kde y_i i -tá transformovaná hodnota, x_i je i -tá původní hodnota a $\min x$, $\max x$ jsou minimální a maximální hodnoty zkoumaného spektra.

Škálováním spekter ztrácíme část informace. Škálování například znemožní kvantitativní analýzu, ta ale pro rozlišení vzorků není nezbytná. Navíc fluktuace intenzity jednotlivých spekter u jednoho vzorku je tak velká, že kvantitativní analýza není možná (viz obrázek 17, kapitola 3.1.1 Příprava měření). Mnohem důležitější je zachování poměrů čar ve spektru, které transformace neovlivní.

Škálování, úprava dat a vázání spekter do jedné matice proběhlo v programu RStudio [35]. Poté byly vzorky analyzovány metodou hlavních komponent.

2.3.4 Analýza hlavních komponent

Účelem metody hlavních komponent (PCA, principal component analysis) je redukce počtu znaků bez velké ztráty informace. Techniku lze popsat jako metodu lineární transformace původních znaků na nové, nekorelované proměnné nazvané hlavní komponenty [16].

Každá hlavní komponenta představuje lineární kombinaci původních znaků. Základní vlastností každé hlavní komponenty je její míra variability. Hlavní komponenty jsou seřazeny podle velikosti variability od největšího po nejmenší. Většinu informace o variabilitě původních dat obsahuje první hlavní komponenta, nejméně poslední. Má-li nějaký znak malou variabilitu, není schopen přispívat k rozlišení mezi objekty.

Tato technika je vhodná pro zobrazení vícerozměrných dat, protože namísto analýzy celého počtu znaků stačí vyšetřit pouze několik nekorelovaných hlavních komponent. Navíc předpokládáme, že nevyužité hlavní komponenty obsahují malé množství informace [16].

2.3.4.1 Princip metody analýzy hlavních komponent

PCA rozděluje zdrojovou matici X na *strukturu* (první hlavní komponenty) a *šum* (ostatní zbývající hlavní komponenty). Model hlavních komponent má pak tvar [16]

$$X = TP^T + E = \text{struktura dat} + \text{šum}. \quad (2.2)$$

Kde $X(n \times m)$ je zdrojová matice, která obsahuje n objektů (měření) a m znaků (relativní intenzita jednotlivých vlnových délek). T je matice komponentního skóre, P^T je transponovaná matice komponentních vah a E označuje matici reziduí.

Záměrem metody je nadále využívat jenom součin TP^T namísto původní matice X . Tímto oddělíme šum od struktury dat TP^T . Rovnici 2.2 lze rozepsat pro N hlavních komponent takto [16]:

$$X = t_1p_1^T + t_2p_2^T + \dots + t_Np_N^T + E. \quad (2.3)$$

Matice reziduí E ukazuje, jak dobře jsou objekty proloženy modelem. Váhová matice P informuje o vztahu mezi původními znaky m a hlavními komponentami.

Hlavní komponenty mají společný počátek, který odpovídá průměrnému objektu neboli těžišti celého shluku objektů. Souřadnice každého objektu na osách hlavních komponent nazýváme skóre. Projekce i -tého objektu na první hlavní komponentu $PC1$ značí skóre t_{i1} [16].

Jedním z nejdůležitějších grafů metody hlavních komponent je graf komponentního skóre. Jedná se o zobrazení dvou vektorů skóre vnesených v systému kartézských os v závislosti prvního na druhém. Vnesení vektorů skóre odpovídá vnesení objektů v prostoru hlavních komponent. Nejčastěji se využívá zobrazení závislosti skóre $PC1$ na skóre $PC2$. Což je pochopitelné, protože jde o dva směry, podél kterých vykazuje shluk objektů největší ($PC1$) a druhé největší ($PC2$) rozptýlení. Existuje ale řada úloh, kdy je konkrétní informace schovaná v řadě ostatních hlavních komponent.

Graf komponentního skóre se vykládá takto[16]:

- a) Objekty daleko od počátku jsou extrémny. Objekty nejbliže počátku jsou nejtýpější.

- b) Objekty blízko sebe si jsou podobné. Objekty daleko od sebe jsou si nepodobné.
- c) Objekty umístěné zřetelně v jednom shluku jsou si podobné a přitom nepodobné ostatním objektům. Dobře oddělené shluky prozrazují, že lze nalézt vlastní model pro samotný shluk. Jsou-li shluky blízko sebe, znamená to značnou podobnost objektů.
- d) V ideálním případě bývají objekty rozptýlené po celé ploše diagramu. V opačném případě je něco špatného v modelu, obvykle je přítomen silně odlehlý objekt.

Často se využívá i graf komponentních vah. Tento graf zobrazuje váhu jednotlivých znaků hlavní komponenty. Ukazuje, které znaky mají největší vliv na rozlišení objektů. Nám tento graf označí spektrální čáry (respektive odpovídající prvky), jejichž rozdílná intenzita má největší vliv na rozlišení dvou vzorků.

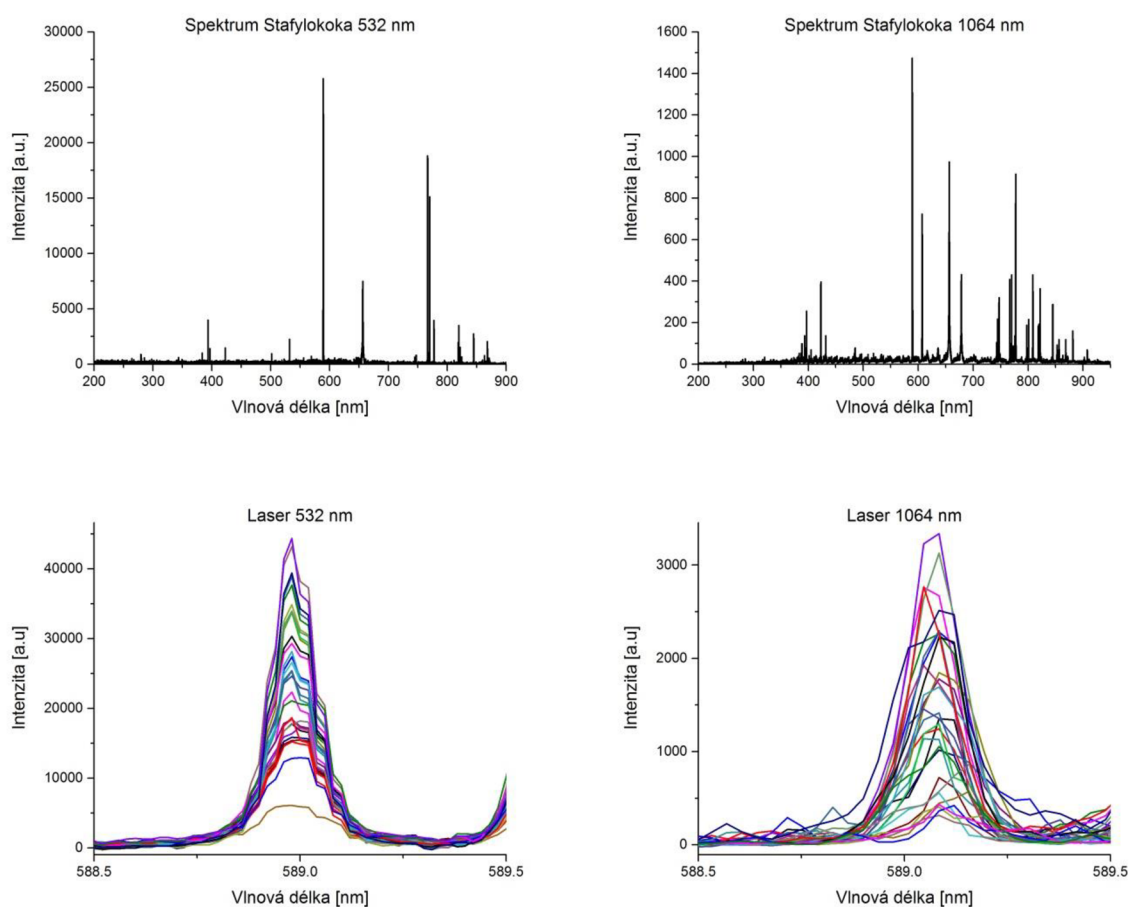
Oba grafy nám přinášejí cenné srovnání, jeden graf působí jako doplněk druhého. Kombinací obou získáme silný nástroj k rozlišení vzorků. Nejenže zjistíme, jak výrazně se vzorky liší, ale také určíme, čím se liší. Přitom vůbec nemusíme pracně porovnávat tisíce naměřených spekter.

3 Výsledky

3.1 LIBS

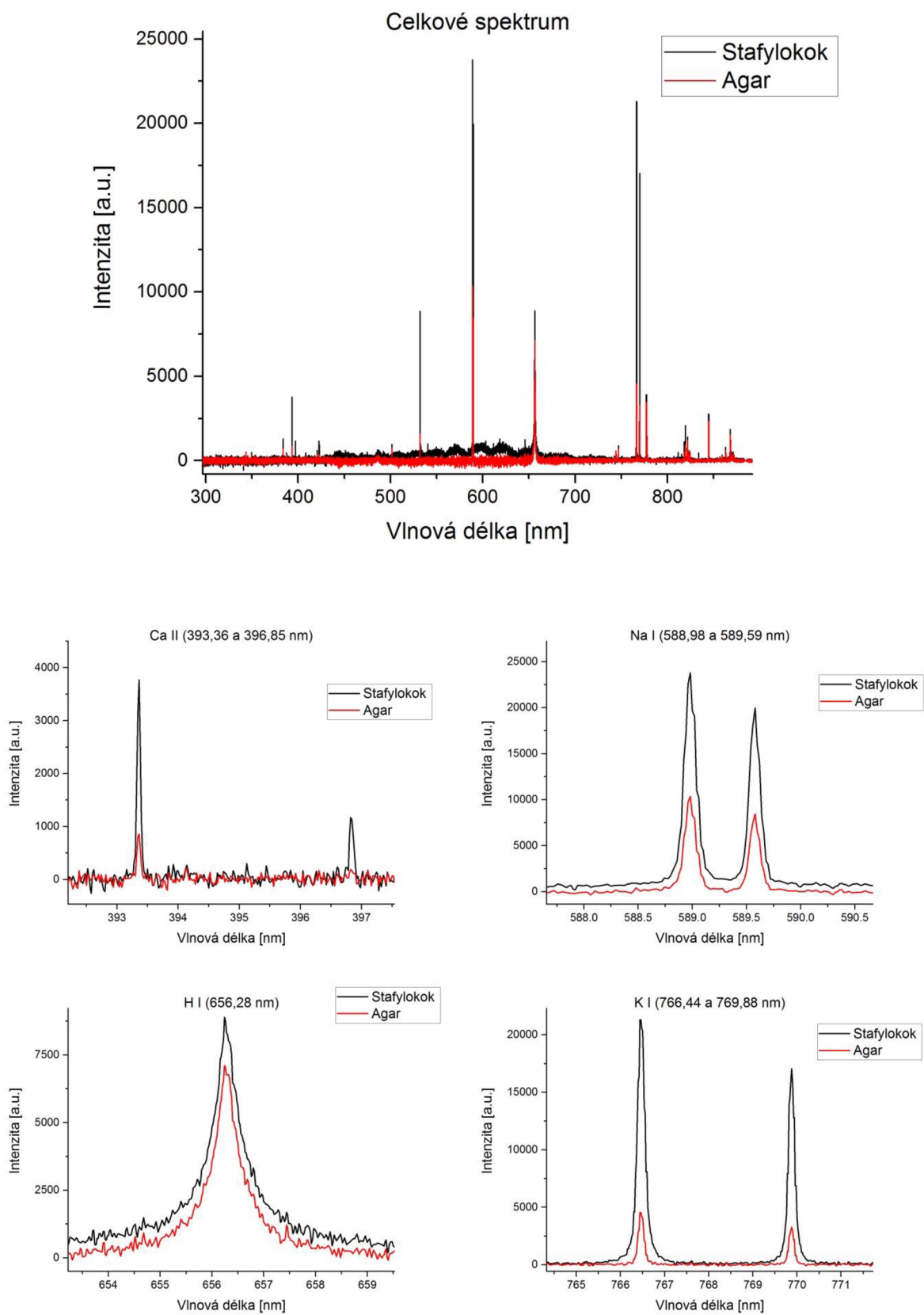
3.1.1 Příprava měření

Nejprve byla porovnána získaná spektra z obou LIBS zařízení (viz obr. 17). Porovnání je ukázáno na průměru třiceti spekter stafylokoku. Spektrum vytvořené na systému Sci-Trace s laserem o vlnové délce 532 nm je mnohem intenzivnější než spektrum naměřené pomocí sestavy s laserem o vlnové délce 1064 nm. Také je na obrázku 17 zobrazena fluktuace intenzity třiceti jednotlivých spekter na čáře Na I (588,98 nm). Pro další měření byla z důvodů lepších výsledků použita pouze sestava Sci-Trace.



Obr. 17: Porovnání naměřených spekter pomocí dvou LIBS aparatur. Horní obrázky ukazují průměrné spektrum stafylokoku vzniklé z třiceti měření. Dolní obrázky znázorňují fluktuaci třiceti spekter u čáry Na I (588,98 nm).

Dále se srovnávala spektra bakterií se spektrem samotného agarů, viz obr. 18. Znovu se porovnával průměr z 30 spekter bakterií s průměrem z 30 spekter agarů. Vidíme, že čáry základních prvků bakterií (Na, Ca, K) jsou mnohem intenzivnější než ve spektru agarů. Na druhou stranu, čára vodíku H I (656,28 nm) má přibližně stejnou intenzitu u obou spekter.



Obr. 18: Porovnání intenzity spektra stafylokoku a agaru. Dále jsou zobrazeny intenzity jednotlivých čar (Ca, Na, H, K).

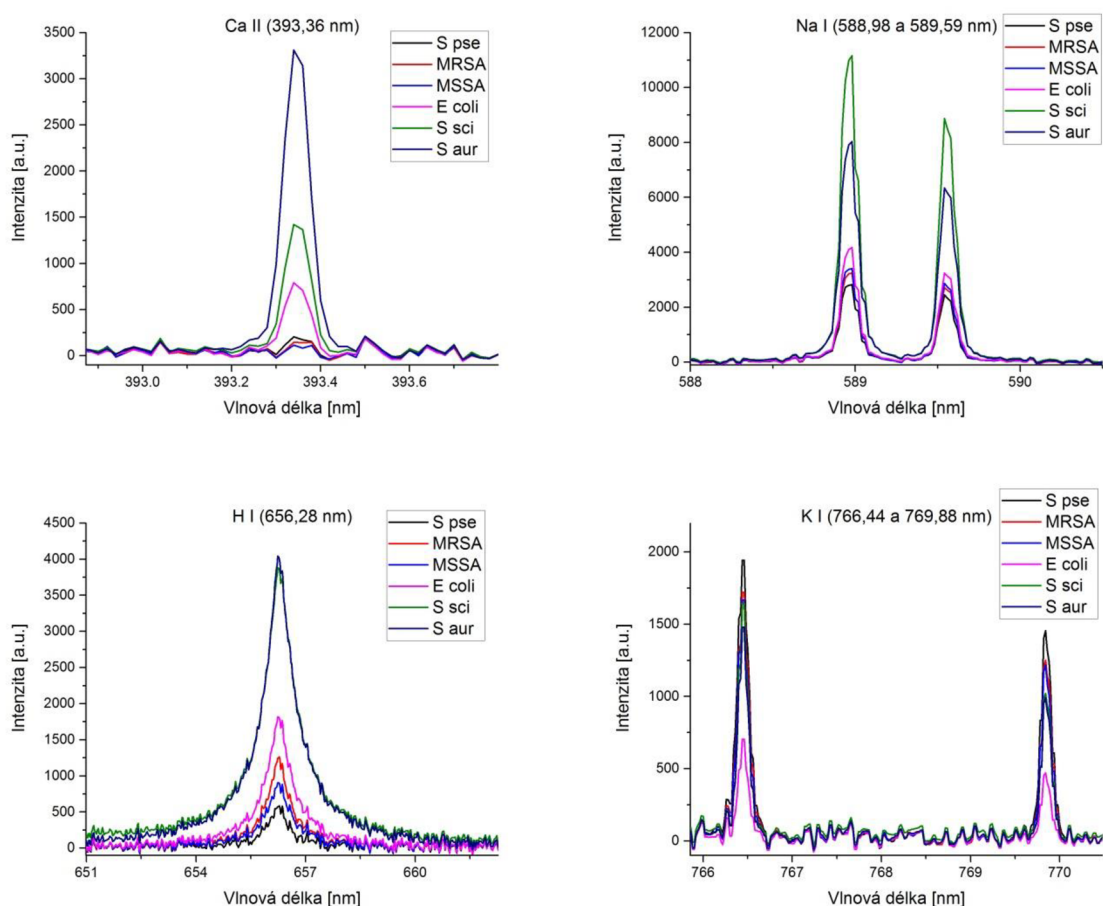
Rozdíl v intenzitě spekter bakterií a agaru umožní odfiltrovat spektra agaru od spekter bakterií.

3.1.2 Analýza spektra

V hlavním experimentu se měřilo šest vzorků bakterií (v závorce jsou uvedeny použité zkratky):

- | | |
|-------------------------------------|----------|
| 1. Escherichia coli, CCM 3954 | (E coli) |
| 2. Staphylococcus aureus, CCM 4223 | (S aur) |
| 3. Staphylococcus aureus, CCM 4750 | (MRSA) |
| 4. Staphylococcus aureus, CCM 3953 | (MSSA) |
| 5. Staphylococcus sciuri | (S sci) |
| 6. Staphylococcus pseudointermedius | (S pse) |

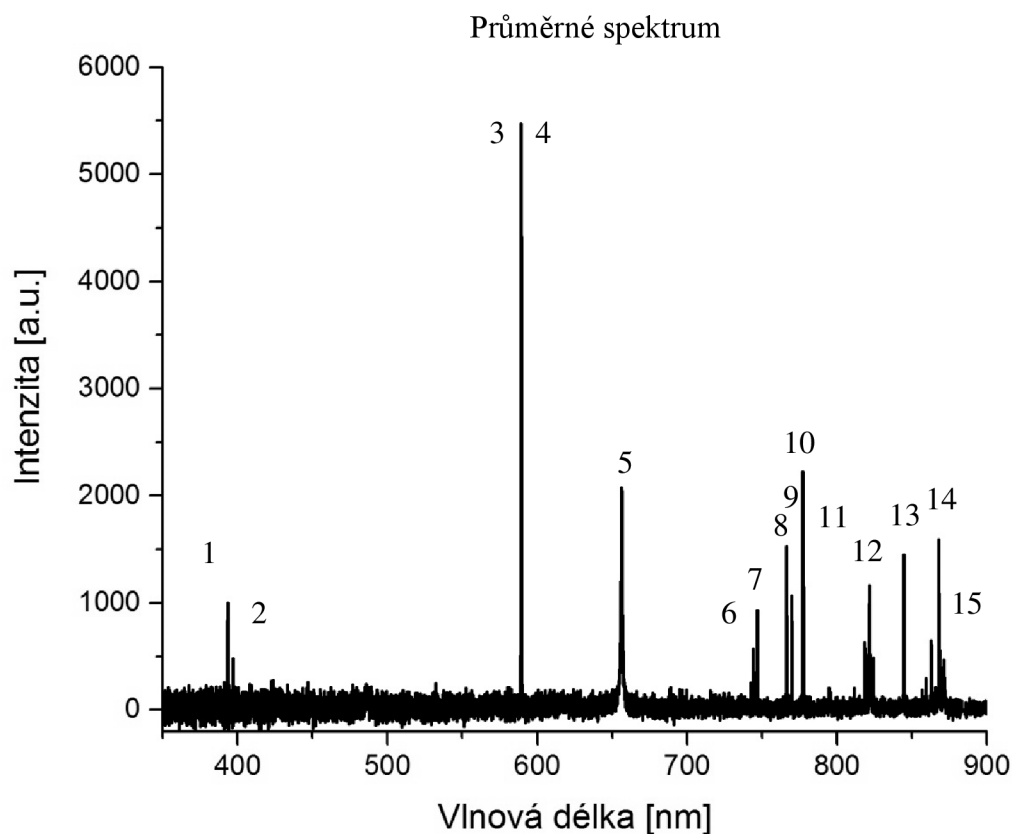
Na obrázku 19 lze vidět vybrané čáry měřených vzorků. Jedná se o průměr intenzit vzniklý z padesáti spekter (viz kapitola 2.3 Metodika měření). Průměrná spektra všech vzorků jsou si velmi podobná. Obsahují stejné spektrální čáry. To znamená, že vzorky mají stejné prvkové složení. Podle kvalitativní analýzy tedy jednotlivé bakterie není možné rozdělit. Nejintenzivnější čáry jsou vypsány v tabulce 1 a naznačeny v obrázku 20.



Obr. 19: Průměrná intenzita vybraných čar (Ca, Na, H, K) bakterií.

Tabulka 1: Nejintenzivnější čáry spektra a odpovídající prvky (I u prvku značí atomovou čáru a II spektrální čáru jednou ionizovaného prvku).

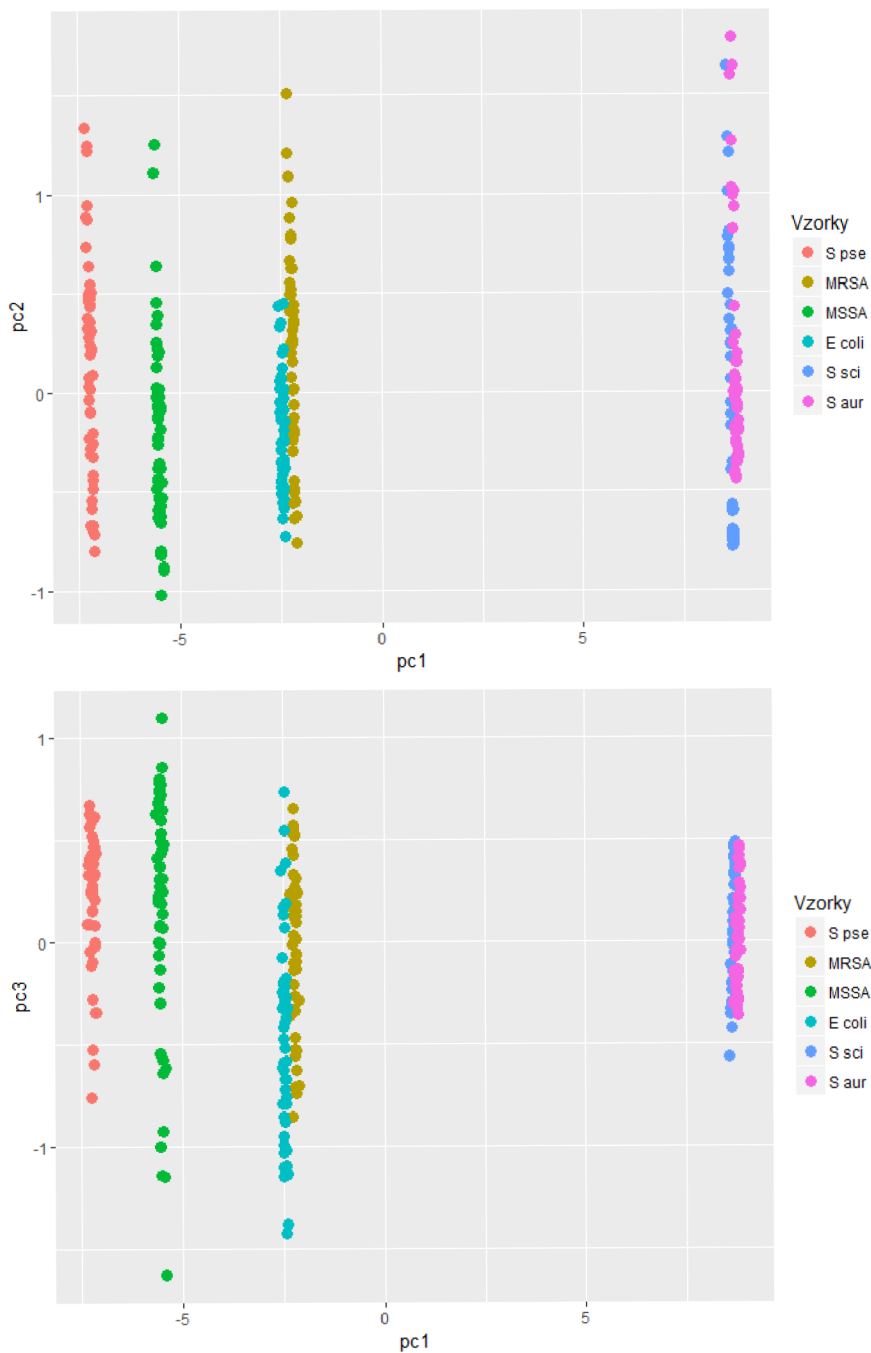
Číslo čáry	Naměřená vlnová délka [nm]	Odpovídající čára v NIST [36]	Prvek
1	393,34	393,366	Ca II
2	396,82	396,847	Ca II
3	588,98	588,995	Na I
4	589,54	589,592	Na I
5	656,24	656,279	H
6	744,24	744,229	N I
7	746,84	746,831	N I
8	766,46	766,490	K I
9	769,84	769,896	K I
10	777,18	777,194	O I
11	777,40	777,417	O I
12	821,64	821,634	N I
13	844,64	844,676	O I
14	868,02	868,028	N I
15	868,34	868,340	N I



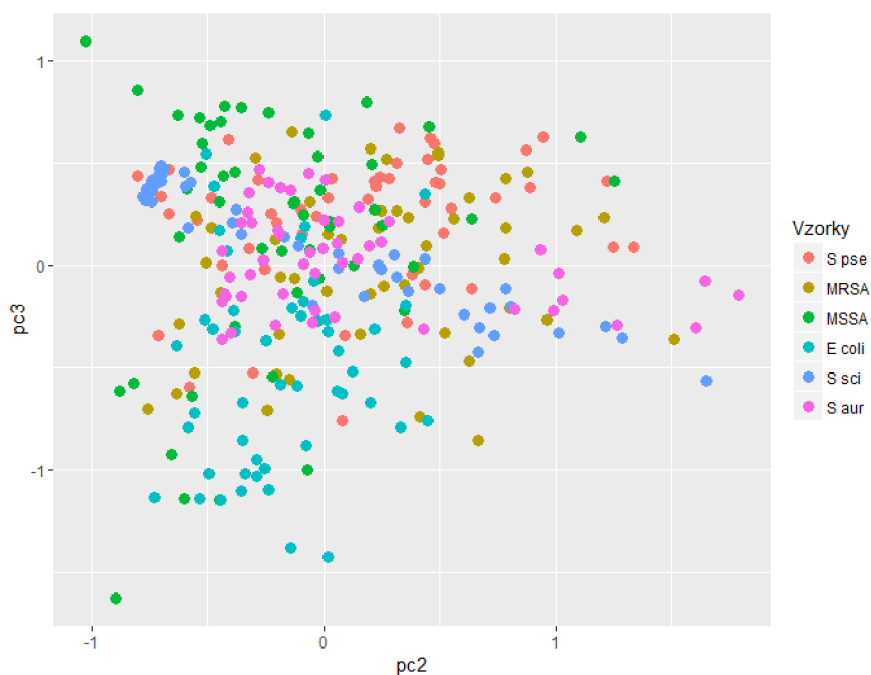
Obr. 20: Průměrné LIBS spektrum vzniklé z 50 naměřených spekter bakterií s vyznačenými spektrálními čarami.

3.1.3 Třídění pomocí PCA

Padesát škálovaných spekter (viz kapitola 2.3.3 Škálování spektra) od každého vzorku se analyzovalo metodou hlavních komponent. Obrázky 21 a 22 zobrazují vynesení jednotlivých spekter do prostoru první (PC1), druhé (PC2) a třetí (PC3) hlavní komponenty.



Obr. 21: Vynesení spekter do prostoru hlavních komponent. První graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2 a druhý ukazuje závislost skóre PC1 na PC3.



Obr. 22: Vynesení spekter do prostoru hlavních komponent. Graf ukazuje závislost skóre PC2 na PC3.

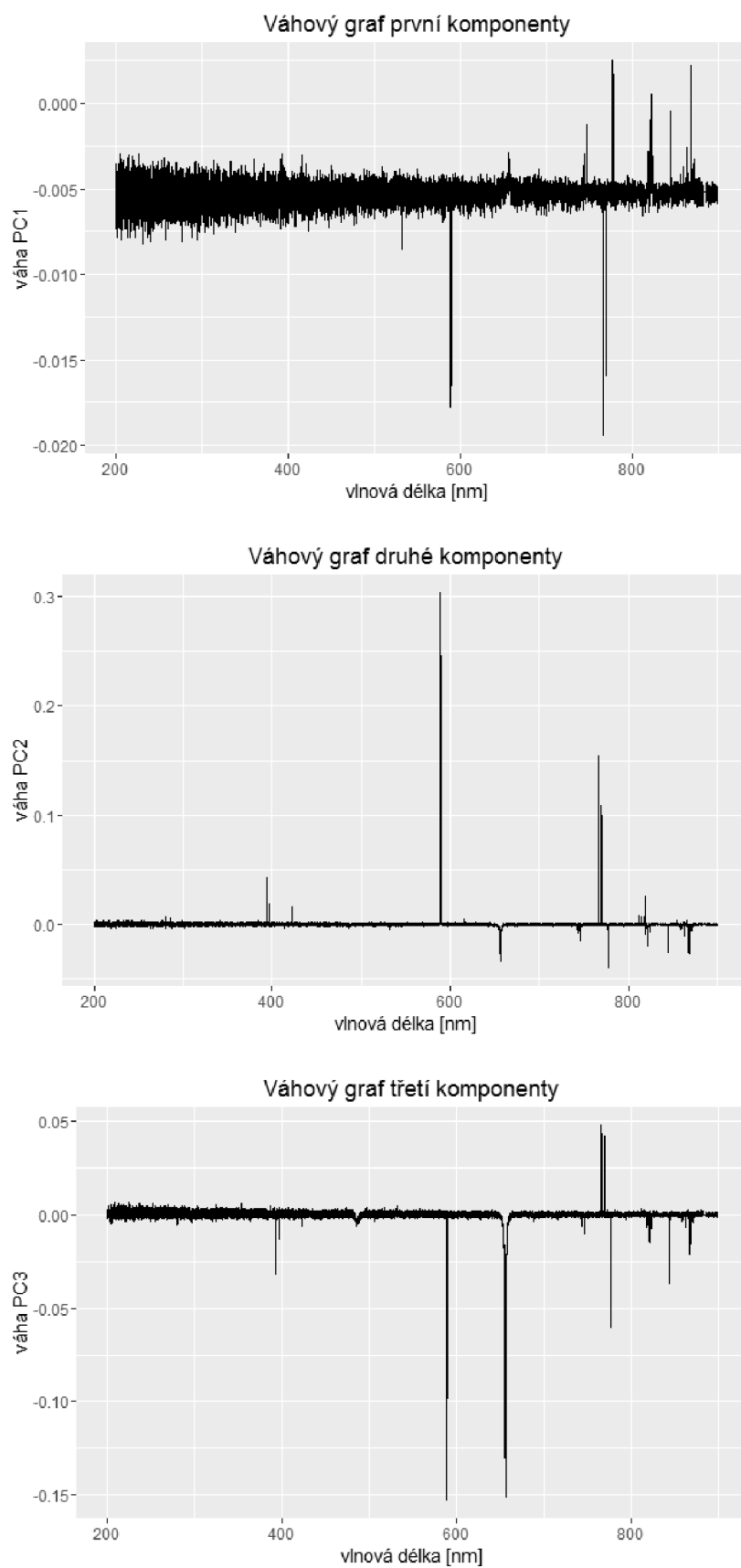
Míra variability první hlavní komponenty byla 24 %, kdežto u druhé a u třetí to byla jenom 2 %. To lze vidět i z grafu, že největší rozptyl je v první hlavní komponentě. Grafy závislosti PC1 na PC2 a PC1 na PC3 mají přibližně stejnou vypovídací hodnotu. PC2 na PC3 nedokáže rozlišit žádný kmen bakterií.

Na obrázku 23 jsou zobrazeny grafy komponentních vah. Lze určit, že rozptyl první hlavní komponenty je způsoben především změnou pozadí spekter. Kdežto v druhé a třetí komponentě mají největší váhu jednotlivé spektrální atomové čáry. Ty samy o sobě nedokáží rozlišit látky s velmi podobným prvkovým složením. Zato změna spektrálního pozadí, která je způsobena hlavně matričním efektem, už některé vzorky rozliší. Matriční efekt totiž ovlivňuje teplotu plazmatu a elektronovou hustotu plazmatu [37]. Obě tyto charakteristiky mají vliv na naměřené spektrum.

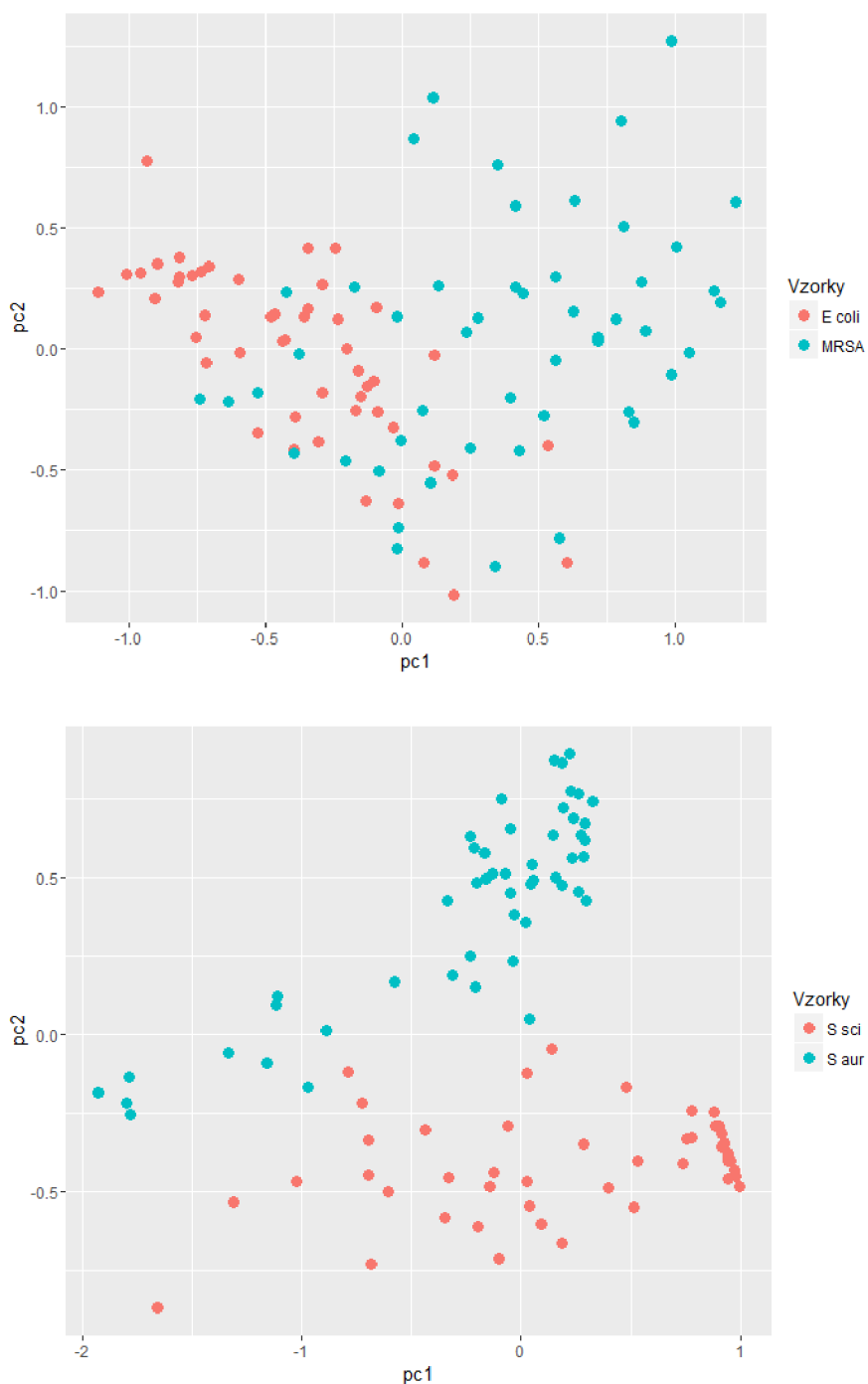
Z grafu závislosti PC1 na PC2 dokážeme rozlišit 4 shluky:

1. *Staphylococcus pseudintermedius*
2. MSSA
3. *E. coli* a MRSA
4. *Staphylococcus sciuri* a *Staphylococcus aureus*

Bliže se zanalyzuje třetí a čtvrtý shluk. Když se shluky budou analyzovat samostatně bez ostatních vzorků, pak dojde k přepočítání hlavních komponent a lepšímu rozlišení. Výsledek je patrný na obr. 24. Zatímco *Staphylococcus sciuri* a *Staphylococcus aureus* se po samostatné analýze dají rozeznat. *E. coli* a MRSA odlišit nelze.

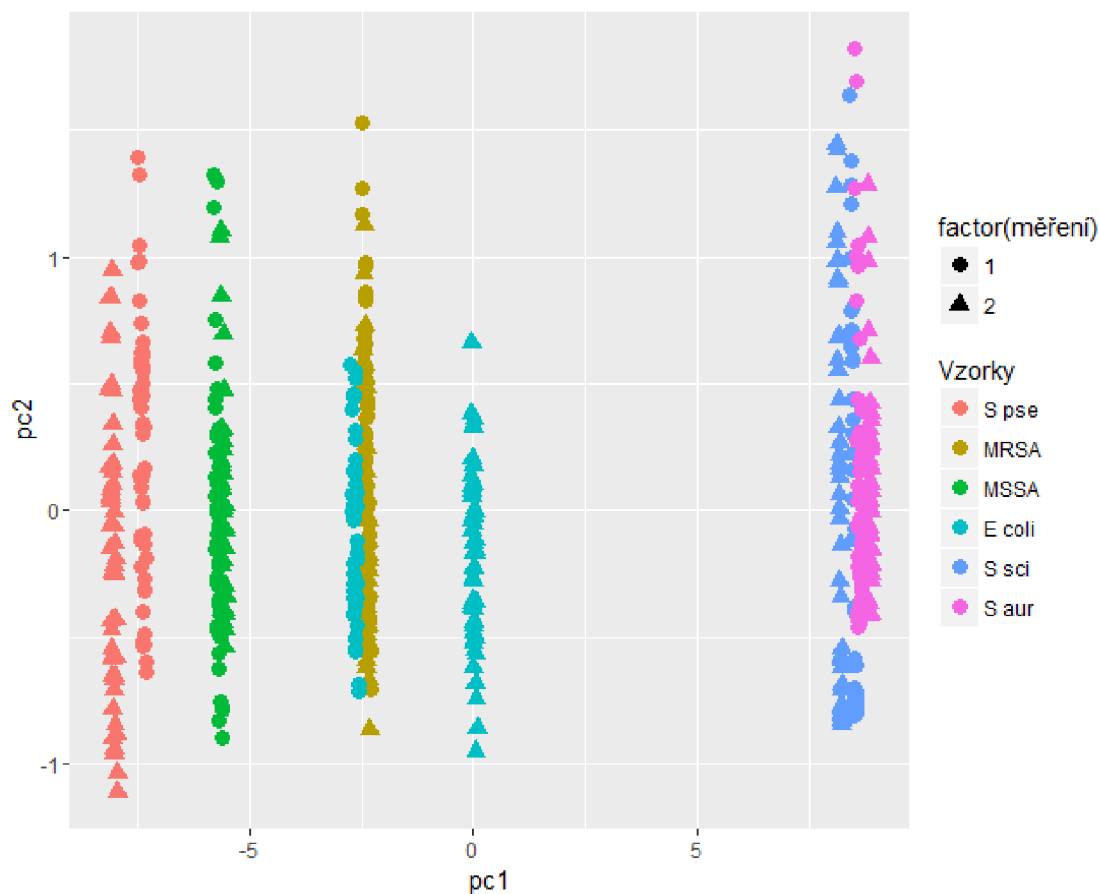


Obr. 23: Zobrazení komponentních vah u prvních tří hlavních komponent.



Obr. 24: První graf ukazuje analýzu pouze *E. coli* a MRSA a druhý graf zobrazuje analýzu *Staphylococcus pseudointermedius* a *Staphylococcus aureus*. Oba grafy ukazují závislost skóre PC1 na PC2.

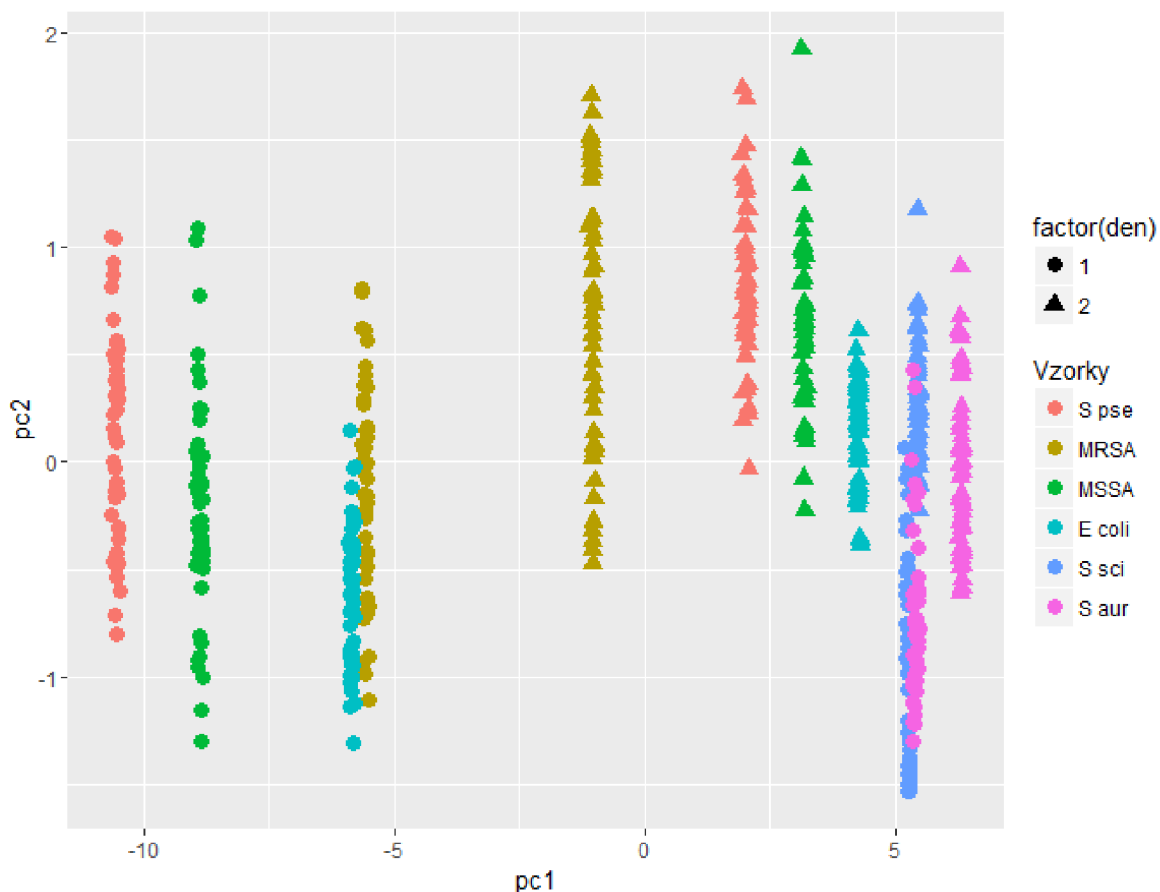
Aby byla zjištěna opakovatelnost a schopnost rozlišení bakterií, tak se zopakoval experiment za stejných podmínek ve stejné oblasti. Naměřená spektra z prvního a druhého experimentu se zpracovala najednou, viz obr. 25.



Obr. 25: Analýza spekter všech vzorků z prvního a druhého měření. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.

Spektra z druhého měření byla většinou zařazena ke spektrům z prvního měření. Výjimku tvoří *E. coli*. U tohoto vzorku byla kultivace bakterií tenká, proto při druhém měření mohla být její tloušťka výrazně jiná.

Druhý den bylo provedeno stejné měření všech vzorků (v jiné oblasti). Zjišťovalo se, zda dojde k rozeznatelné změně bakterií. Analýza experimentu je zobrazena na obrázku 26. Bakterie byly kultivovány při teplotě 22°C a změřeny 24 hodin po prvním experimentu.



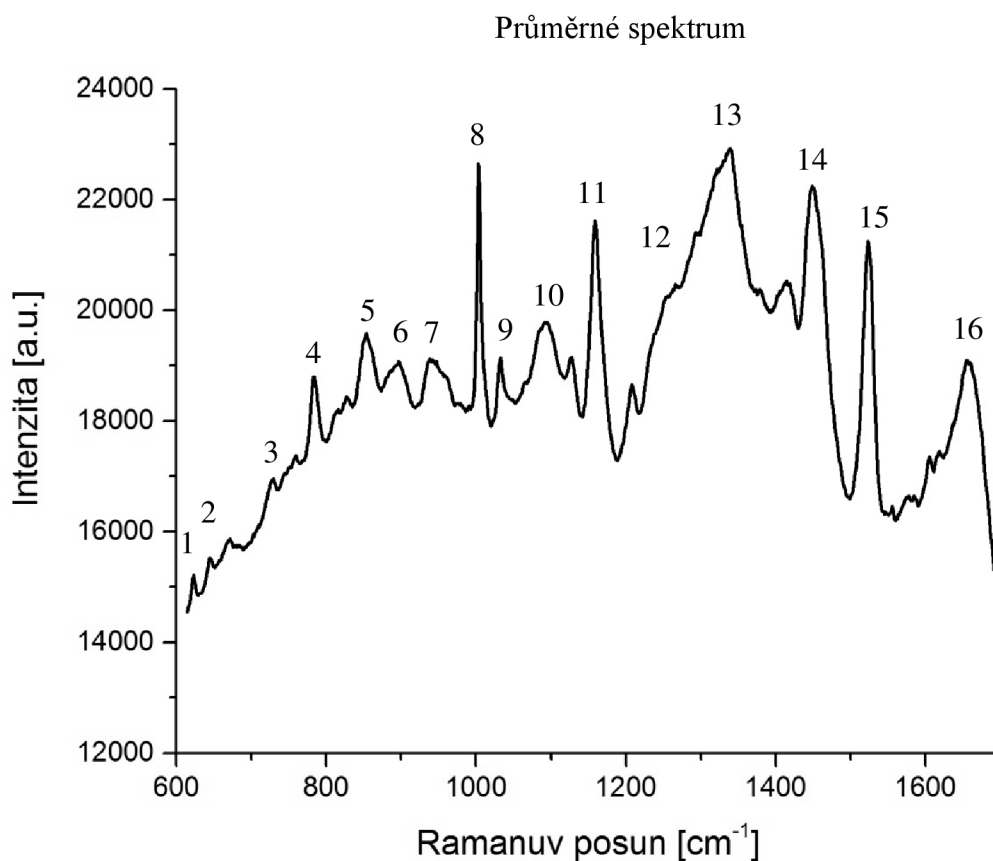
Obr. 26: Analýza spekter všech vzorků naměřených první a druhý den. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.

Na obrázku 26 můžeme vidět, jak se za 24 hodin bakterie změnily. Druhý den lze rozlišit *Staphylococcus pseudintermedius*, MSSA, *E. coli* a MRSA. *Staphylococcus sciuri* a *Staphylococcus aureus* se za jeden den příliš nezměnily, ale druhý den je již bylo možné od sebe odlišit. To může být způsobeno celou řadou faktorů, např. rozdílnou rychlostí kultivace jednotlivých kmenů.

3.2 Ramanova spektroskopie

3.2.1 Analýza spektra

Z každého kmenu bakterie se naměřilo deset spekter. Na obrázku 27 je zobrazeno průměrné spektrum vzniklé ze všech naměřených spekter. Zde jsou znázorněny vibrace chemických látek. Pozorované vibrace jsou také vypsány v tabulce 2.



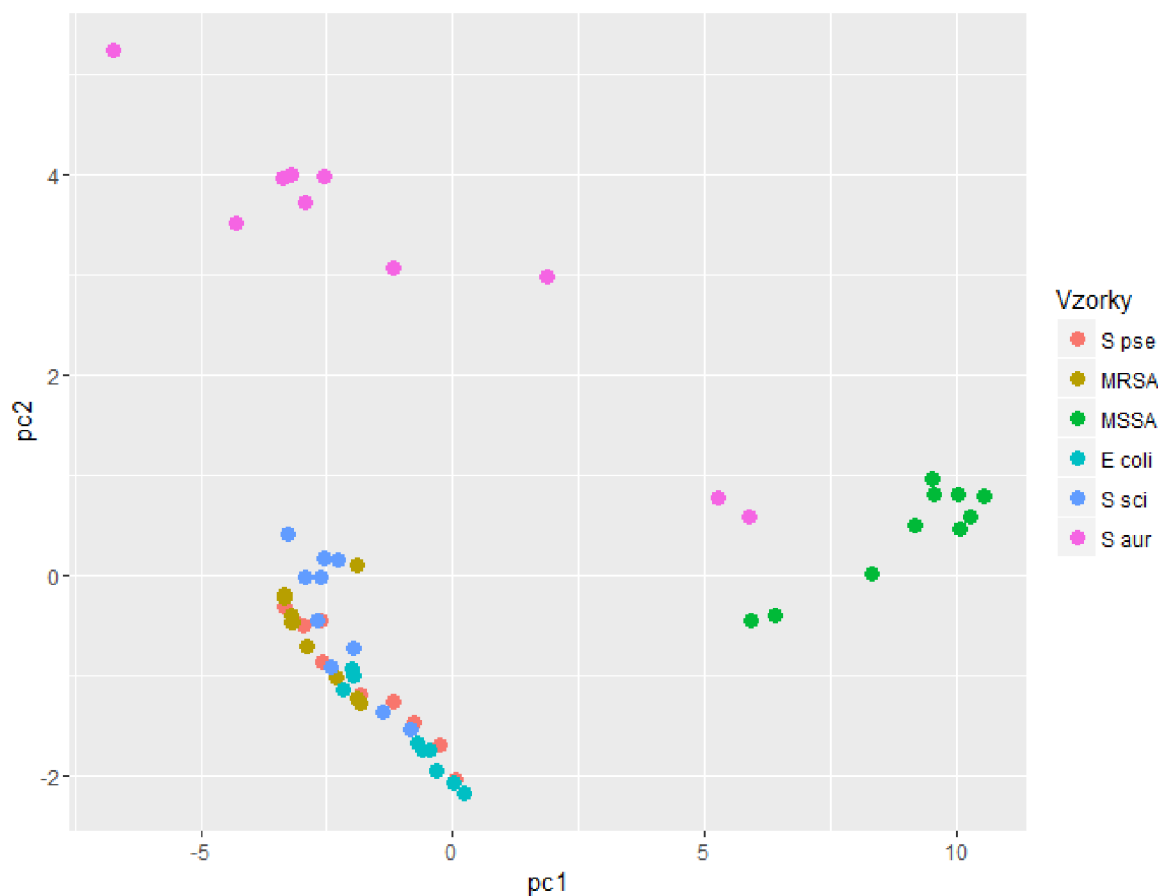
Obr. 27: Průměrné Ramanovo spektrum vzniklé ze všech naměřených spekter s vyznačenými čarami.

Tabulka 2: Přehled pozorovaných čar (pásů) a k nim přiřazená předpokládaná látka.

Číslo čáry	Vlnočet [cm ⁻¹]	Předpokládané vibrace [15]
1	620	Fenylalanin
2	643	Tyrosin
3	723	Adenin
4	782	DNA, RNA
5	853-855	Tyrosin
6	897	C-O-C vibrace
7	932	C-C vibrace
8	1002	C-C vibrace
9	1030	Fenylalanin
10	1060-1096	DNA, RNA, lipidy
11	1158	Proteiny
12	1220-1295	Amid III
13	1320-1340	DNA, RNA
14	1440-1460	CH ₂
15	1510-1570	Amid II
16	1640-1680	Amid I

3.2.2 Třídění pomocí PCA

Škálovaná Ramanova spektra se poté analyzovala metodou hlavních komponent. Závislost skóre PC1 na PC2 je zobrazena na obr. 28. Touto technikou lze rozlišit pouze Ramanova spektra MSSA a *Staphylococcus aureus*.

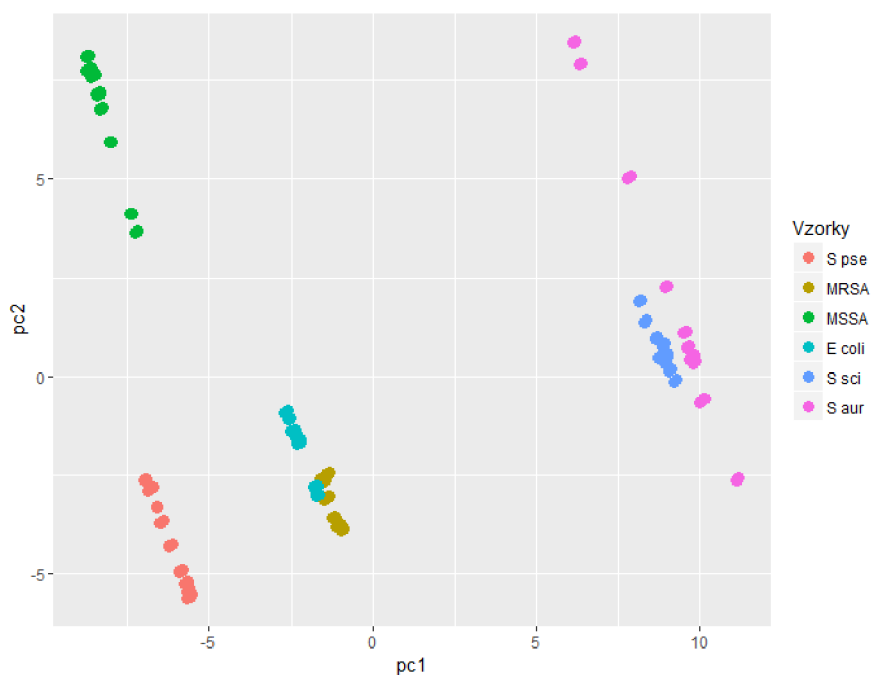


Obr. 28: Analýza Ramanových spekter pomocí PCA. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.

3.3 Společná analýza dat

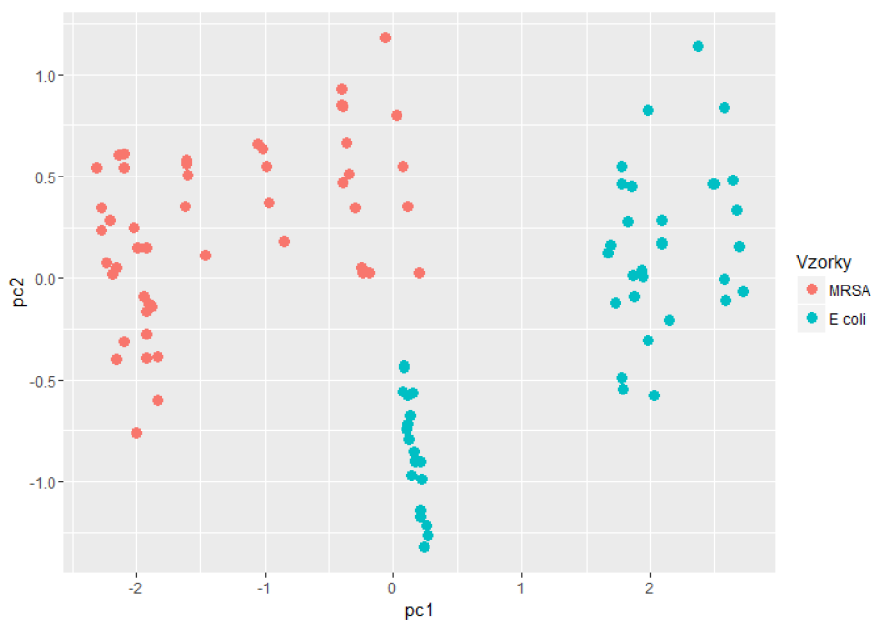
Ke společné analýze dat získaných pomocí dvou rozdílných metod je možné přistoupit různě. V této práci bylo využito postupu popsaného skupinou Marka Hoehse [17]. Vzalo se škálované spektrum z metody LIBS a za něj se zařadilo škálované spektrum z Ramanovy spektroskopie. Problém byl v tom, že bylo naměřeno 50 spekter metodou LIBS a k tomu 10 Ramanových spekter u každého vzorku. Proto se Ramanova spektra pětkrát duplikovala (takže jich bylo 50) a náhodně se přiřadily ke spektrům LIBSu.

Takto nově vytvořená spektra byla podrobena analýze hlavních komponent. Obrázek 29 znázorňuje závislost skóre PC1 na PC2.



Obr. 29: Společná analýza naměřených spekter pomocí PCA. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.

Na první pohled rozlišíme pět shluků. *E. coli* a MRSA se na obrázku 29 překrývají. Když se tyto dva vzorky analyzovaly samostatně, pak došlo k jejich oddělení, viz obr. 30. Kombinací obou metod tedy bylo dosaženo úplného rozdělení všech šesti kmenů bakterií do samostatných shluků.



Obr. 30: Analýza svázaných spekter *E. coli* a MRSA. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.

4 Závěr

Cílem této práce bylo ověřit analytické možnosti metody LIBS a Ramanovy spektroskopie pro rozlišení několika kmenů bakterií. Pomocí obou metod bylo změřeno šest různých kmenů bakterií (*Staphylococcus aureus*, meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*, meticilin sensitivní *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus pseudointermedius* a *Escherichia coli*).

Naměřená spektra byla roztržena technikou analýzy hlavních komponent. Bylo zjištěno, že pomocí Ramanovy spektroskopie je možné rozlišit dva kmeny bakterií (*Staphylococcus aureus* a meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*) a pomocí metody LIBS dokonce čtyři (*Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus aureus*, meticilin sensitivní *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus pseudointermedius*). Kombinací obou metod byly bakterie rozděleny do pěti diskrétních shluků. Ve společném shluku zůstaly *Escherichia coli* a meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Po samostatné analýze se podařilo rozlišit i tyto dva druhy.

Metodou LIBS byl také sledován vliv doby kultivace na vzorky bakterií. Na základě měření provedených s odstupem 24 hodin bylo možné pozorovat změnu u čtyř kmenů bakterií (*Staphylococcus pseudointermedius*, meticilin sensitivní *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a meticilin rezistentní *Staphylococcus aureus*), zbylé dvě bakterie zůstaly nezměněné (*Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus aureus*).

Charakter biologických vzorků vyžadoval, aby se bakterie vypěstované na Mikrobiologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u sv. Anny měřily ve stejný den na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky a v laboratoři LIBS na VUT v Brně. Především z nutnosti sladění pracovníků tří vědeckých institucí do jediného dne se nepodařilo dokončit měření bakterií v různém nutričním či toxickém prostředí do data odevzdání práce.

Identifikace bakterií pomocí Ramanovy spektroskopie a metody LIBS je teprve na počátku své cesty. Těmito metodami zatím nejsme schopni bakterie spolehlivě identifikovat. Z výsledků této práce lze ale usuzovat, že kombinace Ramanovy spektroskopie a metody LIBS je díky komplementárním informacím vhodná pro rychlé rozlišení jednotlivých kmenů a druhů bakterií. Navíc bylo zjištěno, že pomocí metody LIBS lze u některých kmenů bakterií rozeznat změny vzniklé délkou kultivace.

5 Literatura

- [1] RADZIEMSKI, Leon a David CREMERS. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2013, **87**, 3-10. DOI: 10.1016/j.sab.2013.05.013. ISSN 05848547. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S058485471300116X>
- [2] DYAR, M. Darby, Jonathan M. TUCKER, Seth HUMPHRIES, Samuel M. CLEGG, Roger C. WIENS a Melissa D. LANE. Strategies for Mars remote Laser-Induced Breakdown Spectroscopy analysis of sulfur in geological samples: a review of principles and applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2011, vol. 66, issue 1, s. 39-56. DOI: 10.1016/j.sab.2010.11.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854710003034>
- [3] SMEKAL, Adolf. Zur Quantentheorie der Dispersion. *Die Naturwissenschaften*. 1923, **11**(43), 873-875. DOI: 10.1007/BF01576902. ISSN 0028-1042. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01576902>
- [4] RAMAN, C. V. a K. S. KRISHNAN. A New Type of Secondary Radiation. *Nature*. 1928-3-31, **121**(3048), 501-502. DOI: 10.1038/121501c0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/121501c0>
- [5] PLACZEK, G. Intensität und Polarisation der Ramanschen Streustrahlung mehratomiger Moleküle. *Zeitschrift für Physik*. 1931, **70**(1-2), 84-103. DOI: 10.1007/BF01391032. ISSN 1434-6001. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01391032>
- [6] SMITH, Ewen. a Geoffrey. DENT. *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2005. ISBN 04-714-9794-0.
- [7] HOEHSE, Marek, David MORY, Stefan FLOREK, Friederike WERITZ, Igor GORNUSHKIN a Ulrich PANNE. A combined laser-induced breakdown and Raman spectroscopy Echelle system for elemental and molecular microanalysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2009, 64(11-12), 1219-1227. DOI: 10.1016/j.sab.2009.09.004. ISSN 05848547. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854709003164>
- [8] SHARMA, Shiv K., Anupam K. MISRA, Paul G. LUCEY, Rachel C.F. LENTZ, Igor GORNUSHKIN a Ulrich PANNE. A combined remote Raman and LIBS instrument for characterizing minerals with 532nm laser excitation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009, 73(3), 468-476. DOI: 10.1016/j.saa.2008.08.005. ISSN 13861425. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142508004514>
- [9] SOVAGO, Maria, Ernst-Jan BUIS a Marijn SANDTKE. Nanoparticle detection in aqueous solutions using Raman and Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2013, 87, 182-187. DOI: 10.1016/j.sab.2013.05.033. ISSN 05848547. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854713001572>

- [10] CLEGG, Samuel M., Roger WIENS, Anupam K. MISRA, et al. Planetary Geochemical Investigations Using Raman and Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2014, 68(9), 925-936. DOI: 10.1366/13-07386. ISSN 00037028. Dostupné také z: <http://asp.sagepub.com/lookup/doi/10.1366/13-07386>
- [11] NOTINGHER, Ioan, Roger WIENS, Anupam K. MISRA, et al. Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. *Sensors*. 2007, 7(8), 1343-1358. DOI: 10.3390/s7081343. ISSN 1424-8220. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/7/8/1343/>
- [12] SAMEK, O., P. ZEMÁNEK, A. JONÁŠ, et al. Characterization of oil-producing microalgae using Raman spectroscopy. *Laser Physics Letters*. 2011, 8(10), 701-709. DOI: 10.1002/lapl.201110060. ISSN 16122011. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1612-202X/8/701>
- [13] POŘÍZKA, P., D. PROCHAZKA, Z. PILÁT, et al. Application of laser-induced breakdown spectroscopy to the analysis of algal biomass for industrial biotechnology. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2012, 74-75(10), 169-176. DOI: 10.1016/j.sab.2012.06.014. ISSN 05848547. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854712001462>
- [14] KAISER, Jozef, Karel NOVOTNÝ, Madhavi Z. MARTIN, Aleš HRDLIČKA, Radomír MALINA, Martin HARTL, Vojtěch ADAM a René KIZEK. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy—Biological applications. *Surface Science Reports*. 2012, 67(11-12), 233-243. DOI: 10.1016/j.surfrep.2012.09.001. ISSN 01675729. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167572912000416>
- [15] SAMEK, O, H H TELLE, L G HARRIS, M BLOOMFIELD a D MACK. Raman spectroscopy for rapid discrimination of *Staphylococcus epidermidis* clones related to medical device-associated infections. *Laser Physics Letters*. 2008, 5(6), 465-470. DOI: 10.1002/lapl.200810011. ISSN 1612-2011. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/1612-202X/5/i=6/a=011?key=crossref.ea90a6db7af7c59aefd3952c8b63dbd7>
- [16] MELOUN, Milan, Jiří MILITKÝ a Martin HILL. Počítačová analýza vícerozměrných dat v příkladech. Praha: Academia, 2005. ISBN 80-200-1335-0.
- [17] HOEHSE, Marek, Andrea PAUL, Igor GORNUSHKIN a Ulrich PANNE. Multivariate classification of pigments and inks using combined Raman spectroscopy and LIBS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 402(4), 1443-1450. DOI: 10.1007/s00216-011-5287-6. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5287-6>
- [18] HAHN, David W. a Nicoló OMENETTO. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. *Applied Spectroscopy*. 2012, 66(4), 347-419. DOI: 10.1366/11-06574. ISSN 00037028. Dostupné také z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article>
- [19] DAVE CREMERS, Leon Radziemski. *Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy*. Second edition. Chichester: Wiley, 2013. ISBN 978-111-8567-371.

- [20] MIZIOLEK, Andrzej W, Vincenzo PALLESCHI a Israel SCHECHTER (eds.). *Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): fundamentals and applications*. New York: Cambridge University Press, 2006. ISBN 05-218-5274-9.
- [21] NOVOTNÝ, Karel, Jozef KAISER, Aleš HRDLIČKA, Radomír MALINA, Tomáš VÉMOLA, David PROHAZKA, Jan NOVOTNÝ and Viktor KANICKÝ. Spektrometrie laserem buzeného plazmatu. *Československý časopis pro fyziku*. 2010, vols. 4-5, pp. 280–285.
- [22] CREMERS, David A a Leon J RADZIEMSKI. *Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2006. ISBN 978-047-0092-996.
- [23] CRISTOFORETTI, G., A. DE GIACOMO, M. DELL'AGLIO, S. LEGNAIOLI, E. TOGNONI, V. PALLESCHI a N. OMENETTO. Local Thermodynamic Equilibrium in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Beyond the McWhirter criterion. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2010, **65**(1), 86-95. DOI: 10.1016/j.sab.2009.11.005. ISSN 05848547. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854709003541>
- [24] CAPITELLI, Mario, Francesco CAPITELLI a Alexander ELETSKII. Non-equilibrium and equilibrium problems in laser-induced plasmas. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2000, **55**(6), 559-574. DOI: 10.1016/S0584-8547(00)00168-3. ISSN 05848547. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854700001683>
- [25] THORNE, Anne P. *Spectrophysics*. 2nd ed. New York: Chapman and Hall, 1988. ISBN 04-122-7470-1.
- [26] LIŠKA, Miroslav. Speciální seminář (přednáška)
- [27] FERRARO, John R., Kazuo NAKAMOTO a Chris W. BROWN. *Introductory Raman spectroscopy*. 2nd ed. Boston: Academic Press, c2003. ISBN 01-225-4105-7.
- [28] CHALLA S. S. R. KUMAR, EDITOR., Challa S. S. R. Kumar, editor. *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*. Berlin: Springer Berlin, 2012. ISBN 978-364-2206-191.
- [29] *Raman.de* [online]. [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.raman.de/htmlEN/basics/intensityEng.html>
- [30] PELLETIER, M. J. Quantitative Analysis Using Raman Spectrometry. *Applied Spectroscopy*. 2003, **57**(1), 20-42. DOI: 10.1366/000370203321165133. ISSN 00037028. Dostupné také z: <http://asp.sagepub.com/lookup/doi/10.1366/000370203321165133>
- [31] MLYNÁRIKOVÁ, Katarína, Ota SAMEK, Silvie BERNATOVÁ, et al. Influence of Culture Media on Microbial Fingerprints Using Raman Spectroscopy. *Sensors*. 2015, **15**(12), 29635-29647. DOI: 10.3390/s151129635. ISSN 1424-8220. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/15/11/29635>
- [32] Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Skin and Soft Tissue Infections. *HIV Web Study* [online]. [cit. 2016-05-10]. Dostupné z:

<http://www.hivwebstudy.org/cases/dermatologic-manifestations/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa-skin-and-soft>

- [33] LIBS & DB LIBS aparatura. LIBS Lab, VUT Brno [online]. [cit. 2016-05-18]. Dostupné z: <http://libs.fme.vutbr.cz/index.php/laborato/stolni-libsdb-libs-aparatura>
- [34] Infrared and Raman Instrumentation. Miami University [online]. [cit. 2016-05-21]. Dostupné z: <http://www.units.miamioh.edu/mml/Instrumentation.htm>
- [35] RStudio [online]. Boston [cit. 2016-05-21]. Dostupné z: <https://www.rstudio.com/>
- [36] KRAMIDA, A., RALCHENKO, Yu., READER, J. and NIST ASD Team. NIST Atomic Spectra Database (version 5.1), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. [Online]. 2015 [cit. 22. 5. 2016] Dostupné z: <http://physics.nist.gov/asd>
- [36] KRAMIDA, A., RALCHENKO, Yu., READER, J. and NIST ASD Team. NIST Atomic Spectra Database (version 5.1), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD. [Online]. 2015 [cit. 22. 5. 2016] Dostupné z: <http://physics.nist.gov/asd>
- [37] GILON, N., J. EL-HADDAD, A. STANKOVA, W. LEI, Q. MA, V. MOTTO-ROS a J. YU. A matrix effect and accuracy evaluation for the determination of elements in milk powder LIBS and laser ablation/ICP-OES spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011, 401(9), 2681-2689. DOI: 10.1007/s00216-011-5079-z. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5079-z>

Dodatek A: seznam obrázků a tabulek

Obr. 1: Obecné přístrojové vybavení metody LIBS. Převezato a upraveno z [22].	5
Obr. 2: Životní cyklus LIBS plazmatu. Převezato a upraveno z [20].	6
Obr. 3: Vývoj plazmatu a vhodný interval pro záznam spektra. Převezato z [21].	7
Obr. 4: Znázornění Gaussova, Lorentzova a Voightova profilu. Převezato a upraveno z [22].	9
Obr. 5: Schéma vzniku rezonanční absorpce. Převezato a upraveno z [22].	10
Obr. 6: Znázornění Stokesova, Rayleigha a anti-Stokesova rozptylu. Převezato a upraveno z [6].	13
Obr. 7: Porovnání signálu Stokesova a anti-Stokesova rozptylu. Převezato a upraveno z [29].	14
Obr. 8: Průběh základního energiového stavu molekuly v závislosti na vzdálenosti jader.	15
Obr. 9: Znázornění vibrací na molekulách vody a CO ₂ . Převezato a upraveno z [6].	17
Obr. 10: Vybrané ukázky vibrací benzenu. A) Vibrace kolem 1600 cm ⁻¹ . B) Symetrické „dýchání“ benzenu v oblasti kolem 1000 cm ⁻¹ . C a D) Dvě C-H vibrace kolem 3000 cm ⁻¹ . Převezato a upraveno z [6].	18
Obr. 11: Obrázek shluků meticilin rezistentního <i>Staphylococcus aureus</i> . Obrázek byl pořízen pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu se zvětšením 4780x. Převezato a upraveno z [32].	21
Obr. 12: Schéma měřicí aparatury. 1) excitační laser Quantell Brilliant B, 2) LIBS interakční komora, 3) spektrometr Andor Mechelle 5000, 4) ICCD kamera Andor iStar 734. Převezato a upraveno z [33].	22
Obr. 13: Fotka komerčního systému Sci-Trace (Atom Trace, CZ).	23
Obr. 14: Detail interakční LIBS komory systému Sci-Trace (Atom Trace, CZ).	23
Obr. 15: Fotka komerčního Ramanova mikroskopu <i>inVia</i> Reflex (Renishaw, UK). Převezato z [34].	24
Obr. 16: Fotka vypěstovaných kolonií <i>Staphylococcus aureus</i> . 250 LIBS měření proběhlo na oblasti 16,25 x 6,5 mm.	25
Obr. 17: Porovnání naměřených spekter pomocí dvou LIBS aparatur. Horní obrázky ukazují průměrné spektrum stafylokoku vzniklé z třiceti měření. Dolní obrázky znázorňují fluktuaci třiceti spekter u čáry Na I (588,98 nm).	28
Obr. 18: Porovnání intenzity spektra stafylokoku a agaru. Dále jsou zobrazeny intenzity jednotlivých čar (Ca, Na, H, K).	29
Obr. 19: Průměrná intenzita vybraných čar (Ca, Na, H, K) bakterií.	30
Obr. 20: Průměrné LIBS spektrum vzniklé z 50 naměřených spekter bakterií s vyznačenými spektrálními čarami.	31
Obr. 21: Vynesení spekter do prostoru hlavních komponent. První graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2 a druhý ukazuje závislost skóre PC1 na PC3.	32
Obr. 22: Vynesení spekter do prostoru hlavních komponent. Graf ukazuje závislost skóre PC2 na PC3.	33
Obr. 23: Zobrazení komponentních vah u prvních tří hlavních komponent.	34
Obr. 24: První graf ukazuje analýzu pouze <i>E. coli</i> a MRSA a druhý graf zobrazuje analýzu <i>Staphylococcus pseudointermedius</i> a <i>Staphylococcus aureus</i> . Oba grafy ukazují závislost skóre PC1 na PC2.	35
Obr. 25: Analýza spekter všech vzorků z prvního a druhého měření. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.	36
Obr. 26: Analýza spekter všech vzorků naměřených první a druhý den. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.	37
Obr. 27: Průměrné Ramanovo spektrum vzniklé ze všech naměřených spekter s vyznačenými čarami.	38
Obr. 28: Analýza Ramanových spekter pomocí PCA. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.	39

Obr. 29: Společná analýza naměřených spekter pomocí PCA. Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.....	40
Obr. 30: Analýza svázaných spekter E coli a MRSA .Graf ukazuje závislost skóre PC1 na PC2.	40
Tabulka 1: Nejintenzivnější čáry spektra a odpovídající prvky (I u prvku značí atomovou čáru a II spektrální čáru jednou ionizovaného prvku).	31
Tabulka 2: Přehled pozorovaných čar (pásů) a k nim přiřazená předpokládaná látka.	38

Dodatek B: seznam použitých značek a zkratek

E	energie prvního stavu
T	teplota plazmatu
n_e	elektronová hustota
E_j	energie vyššího energiového stavu
E_i	energie nižšího energiového stavu
ν	frekvence
λ	vlnová délka
h	Planckova konstanta
$2\delta\nu$	šířka intervalu frekvencí
$2\delta\lambda$	šířka intervalu vlnových délek
I	intenzita
R	plynová konstanta
c	rychlost světla
m_m	molová hmotnost
N_n	počet molekul v excitované vibrační hladině
N_m	počet molekul v základní vibrační hladině
g	degenerace stavů
E_n	energie excitovaného vibračního stavu
E_m	energie základního vibračního stavu
k	Boltzmannova konstanta,
$\tilde{\nu}$	frekvence (cm^{-1})
M	hmotnost
π	Ludolfovo číslo
K	silová konstanta
μ	redukovaná hmotnost atomů
X	zdrojová matice
T	matice komponentního skóre
P^T	transponovaná matice komponentních vah
E	matice reziduí
PC	hlavní komponenta

LIBS	Spektroskopie laserem buzeného plazmatu (Laser-Induced breakdown spectroscopy)
AES	Atomová emisní spektroskopie
LIPS	Laser-induced plasma spectroscopy
LSS	Laser spark spectroscopy
DFT	funkcionál hustoty (density functional theory)
MALDI-TOF MS	Matricí asistovaná laserová desorpce kombinovaná s hmotnostním spektrometrem a analyzátozem doby průletu
PCA	Analýza hlavních komponent (principal component analysis)
E coli	Escherichia coli, CCM 3954
S aur	Staphylococcus aureus, CCM 4223
MRSA	Staphylococcus aureus, CCM 4750
MSSA	Staphylococcus aureus, CCM 3953
S sci	Staphylococcus sciuri
S pse	Staphylococcus pseudintermedius