

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2023

Bc. Paula Večeríková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ OPTICKÝCH A MIKROFLUIDNÍCH TECHNIK K ANALÝZE A SEPARACI MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK

USE OF OPTICAL AND MICROFLUIDIC TECHNIQUES FOR ANALYSIS AND SEPARATION OF MICROBIAL
CELLS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Paula Večeríková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Ota Samek, Dr.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1905/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Paula Večeríková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie bioaktivních látek
Vedoucí práce: **Mgr. Ota Samek, Dr.**

Název diplomové práce:

Využití optických a mikrofluidních technik k analýze a separaci mikrobiálních buněk

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma využití Ramanovy spektroskopie a příbuzných technik k analýze buněk
2. Literární rešerše na téma mikrofluidní techniky pro separaci buněk
3. Analýza vybraných prokaryotických pigmentovaných kultur pomocí Ramanovy spektroskopie a Ramanovy pinzety
4. Ověření možnosti separace mikrobiálních buněk pomocí mikrofluidních technik.

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

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

Bc. Paula Večeríková
studentka

Mgr. Ota Samek, Dr.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

Abstrakt

Predkladaná diplomová práca sa zaoberá predovšetkým Ramanovou spektroskopiou a jej prepojeniami s mikrofluidnými technikami spolu s potenciálne biotechnologicky zaujímavými produktmi bakteriálnych kmeňov *Janthinobacterium lividum* a *Azotobacter vinelandii*. Metódy použité v tejto práci boli zvolené pre ich nedeštruktívnu povahu, ktorá umožňuje rýchlu analýzu buniek a ich porovnanie s plynovou chromatografiou. Po analýze je možné bunky ďalej kultivovať, prípadne pripraviť generáciu s nadmernou produkciou vybraného metabolitu.

Janthinobacterium lividum je bakteriálny kmeň produkujúci pigment - violaceín, ktorý má značný biotechnologický potenciál ako liečivo, antioxidant, fluorescenčná sonda či farbivo. Schopnosť rozlíšiť bunky produkujúce a neprodukujúce violaceín môže mať preto široké uplatnenie v diagnostike a identifikácii. V experimentálnej časti boli zamerané spektrá troch kmeňov, na základe ktorých bol vybraný zástupca *Janthinobacterium lividum* CCM 160, ktorý bol analyzovaný využitím Ramanovskej pinzety spolu s *Cupriavidus necator* H16. Vyhodnotením pomocou analýzy hlavných komponentov bola zistená rozlíšiteľnosť pigmentovaných kultúr od nepigmentovaných a bol vybraný potenciálny triediaci marker $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$ (príslušný pre violaceín) pre ďalšie merania.

Biotechnologický potenciál kmeňa *Azotobacter vinelandii* spočíva v schopnosti fixovať dusík z atmosféry, produkovať alginát a polyhydroxybutyrát. Experimentálna časť práce sa zameriava na identifikáciu Ramanových spektier piatich kmeňov a alginátov extrahovaných z nich. Polyhydroxybutyrát (PHB) je biologicky odbúrateľný polymér nahrádzajúci petrochemické plasty. Pre výrobu PHB je *Azotobacter vinelandii* adeptom pre komerčnú výrobu, ktorý ako jeden z mála vyrába PHB priamo zo vzdušného dusíka, čo môže viesť k zníženiu výrobných nákladov a tým aj vyššiemu zastúpeniu rozložiteľných plastov na trhu. Najvyššia odpoveď pre PHB v Ramanových spektrách bola nameraná u *Azotobacter vinelandii* DSM 720 a naopak najnižšia u *Azotobacter vinelandii* DSM 85. Kvantitatívne informácie pre porovnanie boli získané z plynovej chromatografie, ktoré potvrdili merania z Ramanovej spektroskopie. Vyhodnotením nameraných Ramanových spektier čistých alginátov je možné predpokladať, že sa jedná o heteropolymérne frakcie, keďže v spektrách bol detegovaný prejav rôznych monomérov. V závislosti od zloženia podjednotiek sa menia vlastnosti alginátu, preto je potrebné poznať zloženie pre jeho úpravu pre ďalšie využitie v medicíne alebo potravinárstve.

Z piatich kmeňov *Azotobacter vinelandii* boli vybraní producenti s najvyšším a najnižším obsahom PHB, ktorí boli následne analyzovaní pomocou Ramanovej pinzety. Vyhodnotením pomocou analýzy hlavných komponentov bola zistená rozlíšiteľnosť týchto kmeňov a možnosť ich následného oddelenia využitím triediaceho parametra ($1\ 060\ \text{cm}^{-1}$).

Kľúčové slová

Ramanova spektroskopia, Ramanovská pinzeta, optická pinzeta, mikrofluidné techniky, violaceín, polyhydroxyalkanoáty, alginát, *Azotobacter vinelandii*, *Janthinobacterium lividum*

Abstract

The presented diploma thesis primarily focuses on Raman spectroscopy and its connections to microfluidic techniques, along with potentially biotechnologically interesting products of bacterial strains *Janthinobacterium lividum* and *Azotobacter vinelandii*. The methods were chosen for their non-destructive nature, which allows for rapid cell analysis and comparison with gas chromatography. After analysis, cells can be further cultivated or a generation with excessive production of a selected metabolite can be prepared.

Janthinobacterium lividum is a bacterial strain that produces the pigment violacein, which has significant biotechnological potential as a drug, antioxidant, fluorescent probe, or dye. The ability to distinguish between cells producing and not producing violacein can have wide applications in diagnosis and identification. In the experimental part, the spectra of three strains were measured, based on which *Janthinobacterium lividum* CCM 160 was selected for analysis using Raman tweezers, along with *Cupriavidus necator* H16. By evaluating with principal component analysis, the distinguishability of pigmented cultures from non-pigmented ones was determined, and a potential sorting marker of $1\ 140\ \text{cm}^{-1}$ (corresponding to violacein) was selected for further measurements.

The biotechnological potential of the *Azotobacter vinelandii* strain lies in its ability to fix nitrogen from the atmosphere, produce alginate, and polyhydroxybutyrate. The experimental part of the thesis focuses on identifying Raman spectra of five strains and the extracted alginates from them. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biodegradable polymer that replaces petrochemical plastics. For PHB production, *Azotobacter vinelandii* is an adept for commercial production, as it is one of the few that produces PHB directly from atmospheric nitrogen, which can lead to reduced production costs and thus higher representation of degradable plastics in the market. The highest response for PHB in Raman spectra was measured for *Azotobacter vinelandii* DSM 720 and the lowest for *Azotobacter vinelandii* DSM 85. Quantitative information for comparison was obtained from gas chromatography, which confirmed the measurements from Raman spectroscopy. By evaluating the measured Raman spectra of pure alginates, it is possible to assume that they are heteropolymeric fractions, as the spectra showed the expression of various monomers. Depending on the composition of subunits, the properties of alginate change, so it is necessary to know the composition for its adjustment for further use in medicine or the food industry.

From the five *Azotobacter vinelandii* strains, producers with the highest and lowest PHB content were selected, which were subsequently analysed using Raman tweezers. By evaluating with principal component analysis, the distinguishability of these strains and their separability using the sorting parameter of $1\ 060\ \text{cm}^{-1}$ was determined.

Keywords

Raman spectroscopy, Raman tweezers, Optical tweezers, microfluidic techniques, violacein, polyhydroxyalkanoates, alginate, *Azotobacter vinelandii*, *Janthinobacterium lividum*

VEČERÍKOVÁ, Paula. *Využití optických a mikrofluidních technik k analýze a separaci mikrobiálních buněk*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/148927>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce .

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

podpis študenta

POĎAKOVANIE:

Rada by som poďakovala Mgr. Otovi Samkovi Dr. za možnosť spolupracovať s Ústavom prístrojové techniky v Brne a za jeho odborné vedenie práce, pri ktorej meraní som mala príležitosť stráviť čas s výnimočnými odborníkmi a obetavými, trpezlivými a inšpiratívnymi ľuďmi. Poďakovanie tiež patrí mojej konzultantke Ing. Diane Černayovej za skvelý odborný a ľudský prístup. Rovnako veľká vďaka patrí aj mojim najbližším, ktorý mi boli psychickou podporou počas celého štúdia.

OBSAH

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | ÚVOD | 5 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ | 7 |
| 2.1 | Ramanova spektroskopia | 7 |
| 2.1.1 | Princíp Ramanovej spektroskopie..... | 7 |
| 2.1.2 | Ramanovo spektrum | 8 |
| 2.1.3 | Využitie Ramanovej spektroskopie pri analýze buniek..... | 9 |
| 2.2 | Techniky príbuzné Ramanovej spektroskopii..... | 10 |
| 2.3 | Mikrofluidné techniky | 11 |
| 2.3.1 | Optická pinzeta | 12 |
| 2.3.2 | Ramanov sorter | 12 |
| 2.3.3 | Využitie mikrofluidných techník pre separáciu buniek | 13 |
| 2.4 | Bakteriálne kmene vybrané pre meranie..... | 13 |
| 2.4.1 | <i>Janthinobacterium lividum</i> | 13 |
| 2.4.2 | <i>Azotobacter vinelandii</i> | 14 |
| 2.5 | Látky produkované vybranými kmeňmi | 15 |
| 2.5.1 | Violaceín | 15 |
| 2.5.2 | Alginát..... | 15 |
| 2.5.3 | Polyfosfát | 16 |
| 2.5.4 | Polyhydroxyalkanoáty | 17 |
| 2.6 | Súčasný stav problematiky | 20 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 22 |
| 3.1 | Použité baktérie, chemikálie, prístroje a materiál pri meraní | 22 |
| 3.1.1 | Baktérie | 22 |
| 3.1.2 | Chemikálie | 22 |
| 3.1.3 | Prístroje | 22 |
| 3.2 | Kultivácia baktérií..... | 25 |
| 3.2.1 | Príprava inokula | 25 |
| 3.2.2 | Príprava produkčného média | 25 |
| 3.3 | Použité metódy..... | 26 |
| 3.3.1 | Gravimetrické stanovenie biomasy a alginátu | 26 |
| 3.3.2 | Spektrofotometrické stanovenie violaceínu | 27 |
| 3.3.3 | Plynová chromatografia | 27 |
| 3.3.4 | Ramanova spektroskopia | 27 |
| 3.3.5 | Ramanova spektroskopia v kombinácii s optickou pinzetou | 29 |
| 4 | VÝSLEDKY MERANÍ A DISKUSIA | 31 |
| 4.1 | Vyhodnotenie gravimetrického stanovenia..... | 31 |
| 4.2 | Vyhodnotenie stanovenia violaceínu | 32 |
| 4.3 | Vyhodnotenie plynovej chromatografie | 32 |
| 4.4 | Vyhodnotenie Ramanovej spektroskopie | 33 |
| 4.5 | Vyhodnotenie Ramanovej spektroskopie v kombinácii s optickou pinzetou | 39 |
| 4.5.1 | Vyhodnotenie analýzy hlavných komponentov | 42 |
| 5 | ZÁVER..... | 46 |
| 6 | ZOZNAM LITERÁRNYCH ZDROJOV | 48 |
| 7 | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV | 55 |

1 ÚVOD

V modernom svete čelíme rôznym ekologickým problémom spojeným so zvyšujúcou sa populáciou a súčasnými environmentálnymi praktikami. Aktuálne dochádzka ku rýchlo rastúcej spotrebe zdrojov a súčasne narastajúcej produkcii odpadov, čo vedie k znižovaniu kvality životného prostredia a vyčerpaniu neobnoviteľných zdrojov, čo má dopad na ekosystémy, zdravie ľudí a ekonomiku [1].

Myslieť udržateľnejšie znamená prijať opatrenia na zníženie environmentálneho zaťaženia. Príkladom toho je využívanie obnoviteľných zdrojov ako alternatívy k fosílnym palivám, náhrady plastov petrochemického priemyslu, či zlepšenie kvality ovzdušia, pôdy a vody. V súčasnosti sú intenzívne študované biodegradabilné resp. rozložiteľné plasty, medzi ktoré patria polyhydroxyalkanoáty (PHA) ako potenciálna náhrada fosílnych palív, ktorá by mohla viesť ku zníženiu emisnej stopy a zníženiu množstva odpadu. Na druhej strane je produkcia tzv. bioplastov zaťažená vysokou cenou, spojenou s vyšším nárokom na pôdu pre pestovanie rastlín, spojených s ich produkciou. Zároveň sú niektoré druhy biodegradabilných plastov menej odolné a problematika recyklácie je komplexnejšia. Aplikácia polyhydroxyalkanoátov v biotechnologickom procese je preto spojená s komerčnými požiadavkami na cenu, výťažnosť, prípadne využitie vedľajších produktov výroby PHA určených pre výrobu bioplastov [2].

Ponúkajúca sa možnosť je *Azotobacter vinelandii*, ktorý sa javí po ekologickej stránke ako všestranný kandidát, keďže má schopnosť produkovať PHA a súčasne je schopný fixovať dusík, zo vzduchu, čo vedie k zníženiu výrobných nákladov, keďže nie je potrebné pridávať dusík do kultivačných médií. Uplatnenie schopnosti fixácie dusíku je možné aj v oblasti hnojenia pôdy, kde vedie ku zvýšeniu kvality úrodnej pôdy, ktorá súvisí s výťažnosťou pestovaných rastlín [3].

Okrem toho má schopnosť produkovať alginát, ktorý má široké využitie v potravinárskom a farmaceutickom priemysle ako emulgátor, stabilizátor a zahusťovadlo. Produkcia alginátu bakteriálnym kmeňom sa rovnako považuje za obnoviteľný a udržateľný zdroj, čo by mohlo priniesť množstvo výhod pre životné prostredie. Súčasnne je možné *Azotobacter vinelandii* kultivovať na odpadných vodách, čím by došlo ku zníženiu ich znečistenia a zároveň zisku prospešných zlúčenín pre poľnohospodárstvo. Rovnako využitie odpadných zdrojov ako vstupných surovín vedie k zníženiu výrobných nákladov [4]. Ku akumulácii PHA dochádza tiež u *Janthinobacterium lividum*, ktorý sa vyznačuje produkciou violaceínu. Pigment má značný biotechnologický potenciál v oblasti medicíny, kde je možné ho použiť ako liečivo, antioxidant alebo farbivo. Violaceín môže byť použitý ako fluorescenčná sonda na vizualizáciu membrán a mitochondrií v biomedicíne, čo umožňuje diagnostiku chorôb a štúdium buniek. Schopnosť rozlíšiť bunky produkujúce a neprodukujúce violaceín môže byť preto využitá na presné identifikovanie mikroorganizmov, sledovanie zmien v populácii a hľadanie nových aplikácií pre tento pigment [5].

Táto práca sa zameriava na päť kmeňov *Azotobacter vinelandii*, ktoré sú predpokladanými producentmi PHA, alginátu a polyfosfátu. Jedná sa o kmene *Azotobacter vinelandii* DSM 720, DSM 13 529, DSM 85, DSM 87 a DSM 576, ktorých Ramanovské spektrá poskytnú po identifikácii jednotlivých Ramanovských pásov kvalitatívnu informáciu o obsahu predpokladaných produktov. Kvalitatívna a kvantitatívna informácia o obsahu PHB je výsledkom plynovej chromatografie. Práca sa tiež zameriava na možnosť triedenia baktérií s nižším obsahom PHB od tých s vyšším obsahom na základe vhodne zvoleného triediaceho parametra vybraného z nameraných Ramanových spektier použitím Ramanovej pinzety.

Práca sa tiež zameriava na identifikáciu Ramanových spektier troch bakteriálnych kmeňov *Janthinobacterium lividum* CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308, ktoré poskytujú kvalitatívnu informáciu o obsahu violaceínu a PHB. Kvantitatívna informácia o obsahu violaceínu je výsledkom spektrofotometrickej metódy a obsah PHB je výsledkom plynovej chromatografie. Práca sa sústreďuje na triedenie baktérií produkujúcich violaceín (*Janthinobacterium lividum*

CCM 160) od neproducentov (*Cupriavidus necator* H16 CCM 428). Triedenie Ramanovskou pinzetou je založené na vhodne zvolenom triediacom parametri určenom na základe nameraných Ramanových spektier.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Ramanova spektroskopia

Ramanova spektroskopia je laserová technológia spadajúca ku analytickým metódam. Výhoda spočíva v použití Ramanovej spektroskopie ako neinvazívnej, nedeštruktívnej a dokonca bezkontaktnej monitorovacej metódy v rade biomedicínskych oborov. Základom metódy je nepružný rozptyl svetla na molekulách analyzovanej vzorky, ktorý umožňuje získať informácie o jej štruktúre a bol objavený indickým lekárom Chandrasekharom Venkatom Ramanom. Vzhľadom na citlivosť metódy sa Ramanova spektroskopia prvýkrát použila k odhaleniu molekulárnych štruktúr čistých chemikálií a dodnes sa používa na charakterizáciu a identifikáciu chemických zložiek a tuhých látok [5, 6].

Výstupom z analýzy je Ramanovské spektrum, zvyčajne vynášané v Ramanovských posunoch (*Raman shift*) v jednotke [cm^{-1}], ktoré sú vzťahnuté ku vlnovej dĺžke svetla, ktorým je ramanovský rozptyl excitovaný. Pre každú molekulu alebo mikroorganizmus je unikátny ramanovský odtlačok (*fingerprint*), ktorý tvorí Ramanovské spektrum v oblasti od 400 cm^{-1} do 1800 cm^{-1} . Vyhodnotenie tejto oblasti je podkladom napríklad pre identifikáciu jednotlivých mikroorganizmov. Využitie má v oblasti analýzy polysacharidov (napr. alginát), polyesterových skupín (napr. polyhydroxyalkanoátov) a mnoho ďalších. Porovnaním vhodne zvoleného parametra (píky pri konkrétnych vlnôčtoch) je možné selektovanie mikroorganizmov[6].

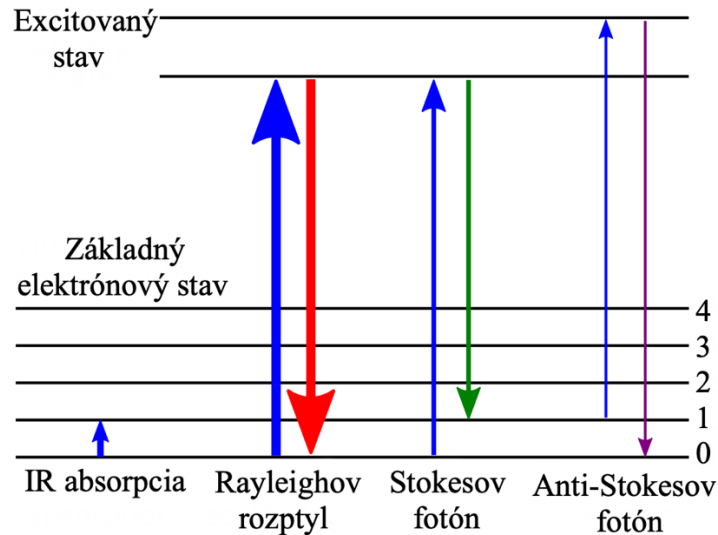
2.1.1 Princíp Ramanovej spektroskopie

Princípom Ramanovej spektroskopie je meranie rozptýleného žiarenia, ktoré vzniká interakciou monochromatického žiarenia vo viditeľnej až blízkej infračervenej oblasti so vzorkou [8]. Po dopadnutí žiarenia na hmotu dochádza ku rozptylu, absorpcií alebo opätovnému vyžiareniu žiarenia. Rozlišujú sa dva typy rozptylu podľa frekvencie [9].

Elastický rozptyl označovaný aj ako Rayleighov rozptyl je jav, pri ktorom pri interakcii svetla s molekulami je svetlo rozptýlené s rovnakou energiou ako má dopadajúce svetlo. Energia dopadajúceho a rozptýleného svetla sa zhoduje [10].

Neelastický rozptyl označovaný ako Ramanov jav. Pri interakcii svetla s molekulami vzorky má malá časť, približne 1 z 10^6 rozptýleného svetla inú energiu/frekvenciu. Ku nepružnému dôsledku dochádza interakciou svetla s hmotou, kedy nastáva prenos energie medzi svetlom a látkou [9].

Pojem Stokesov posun sa používa aj v Ramanovej spektroskopii, kde opisuje, či má Ramanovo rozptýlené žiarenie nižšiu alebo vyššiu energiu ako Rayleighovo rozptýlené žiarenie. Malá časť energie z rozptýleného žiarenia buď časť svojej energie odovzdala hmotě (Stokesovo žiarenie) teda sa jedná o žiarenie s nižšou energiou, alebo naopak, po interakcii s hmotou má vyššiu energiu (Anti-Stokesovo žiarenie). Prehľad žiarení je uvedený na obrázku (*Obrázok 1*) [10].



Obrázok 1 Ramanov rozptyl [11]

Pri Stokesovom Ramanovom rozptyle získava molekula kvantum vibračnej energie z fotónu počas procesu rozptylu a Stokesovo žiarenie má preto väčšiu vlnovú dĺžku ako dopadajúce žiarenie. Pri Anti-Stokesovom Ramanovom rozptyle nastáva opak, keď molekula počas procesu rozptylu stráca kvantum vibračnej energie a Anti-Stokesovo žiarenie má preto kratšiu vlnovú dĺžku ako dopadajúce žiarenie. Ramanove vrcholy sú charakterizované ich posunom vlnočtu smerom od dopadajúceho žiarenia, pričom Stokesove vrcholy majú kladný posun vlnočtu a Anti-Stokesove posuny sú záporné [12].

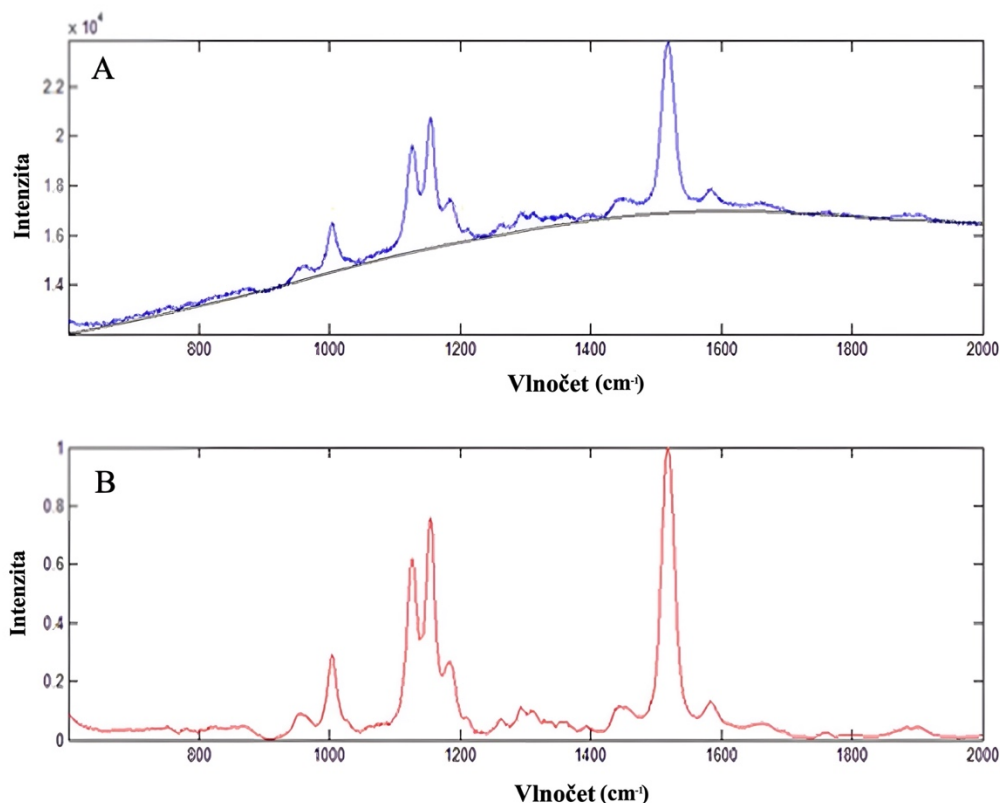
Ramanov jav poskytuje informáciu o štruktúre molekuly a jej interakcií s jej okolím a inými molekulami. Vzor Ramanových línií je charakteristický pre konkrétny druh molekúl a jeho intenzita je úmerná počtu rozptýlených molekúl v dráhe svetla. Ramanovské spektrá sa teda používajú v kvalitatívnej aj kvantitatívnej analýze [9].

2.1.2 Ramanovo spektrum

Ramanovské aktívne vibrácie sú podmienené zmenou polarizovateľnosti molekúl. Typicky sa jedná o nepolárne časti molekúl, dôsledkom čoho sú v Ramanovom spektre zreteľnejšie prejavované pásy vibrácií nepolárnych väzieb, ktorých polarizovateľnosť je pri vibrácií výrazne zmenená. Výška alebo plocha pásov charakterizuje intenzitu Ramanových pásov pri kvantitatívnej analýze. Každý vrchol následne zodpovedá špecifickej molekulárnej väzbe vibrácií [13].

Doba snímania spektier závisí od rôznych podmienok ako napríklad vzorkovania, použitého Ramanovho spektrometru či požadovanej spektrálnej kvality. Typicky je Ramanovo spektrum namerané v priebehu niekoľkých sekúnd [14].

Po nameraní spektier a pred samotným vyhodnotením je potrebné namerané Ramanovské spektrá upravovať. V prípade mikroorganizmov sa v spektrách prejavuje relatívne vysoké fluorescenčné pozadie. Ku odstráneniu sú využívané špeciálne matematické postupy na spracovanie meraného signálu. Medzi najčastejšie používané postupy sa radí Rolling-Circle Filter (RCF) a analýza hlavných komponentov (PCA). Príklad Ramanovho spektra baktérie pred procesom úpravy a po je uvedený na obrázku (Obrázok 2) [15].



Obrázok 2 Porovnanie bakteriálneho Ramanovho spektra pred úpravou (A) a po odčítaní pozadia a normalizácií (B) [15]

RCF je spektrálny filter s rotujúcim kruhom. Metóda odstraňuje fluorescenčné pozadie na predpoklade rozdielnej pološírky Ramanových čiar. Pri vhodne zvolenom polomere kruhu dôjde k odčítaniu pozadia od spektier, zatiaľ čo Ramanove čiary zostanú nezmenené [16]. Filter s rotujúcim kruhom bol použitý na úpravu nameraných spektier napríklad vo výskumoch zameraných na identifikáciu stafylokokov [17], či analýzu bunkových biopolymérov na čajovníkoch infikovaných plesňou [18].

PCA je matematická štatistická metóda, ktorá slúži k zníženiu dimenzie dát s čo najmenšou stratou informácií. Takýmto postupom je možné ďalej analyzovať štatistický problém v podpriestore s menšou dimenziou. Metóda sa pri vyhodnocovaní Ramanovských spektier využíva v rôznych oblastiach [19]. Napríklad na preskúmanie účinku použitých antimikrobiálnych ošetrení na trvanlivosť hovädzieho mäsa [20]. Zjednodušenie prehľadu bakteriálnych kmeňov obsiahnutých v rôznych vzorkách materského mlieka [21] alebo na identifikáciu metabolitov v moči u športovcov, čo následne umožňuje posúdenie a kontrolu fyziologickej účinnosti [22].

2.1.3 Využitie Ramanovej spektroskopie pri analýze buniek

Mnoho aplikácií Ramanovej spektroskopie vychádza z nedeštruktívnej povahy metódy, malej spotreby analyzovanej vzorky a jej nenáročnej prípravy a nízkej časovej náročnosti. Široké uplatnenie nachádza Ramanova spektroskopia vo výskume zameranom na diagnostiku. Rýchla identifikácia bakteriálnych patogénov a profilovanie rezistencie na antibiotiká by uľahčila presnú stratégiu liečby infekčných chorôb. V súčasnej dobe boli skonštruované viaceré referenčné databázy, ktoré by výrazne uľahčili identifikáciu [23].

Uplatnenie Ramanovej spektroskopie je sľubným nástrojom pri testovaní sterility. Detekcia kontaminantov v liekových produktoch je namáhavý a pomalý proces využívajúci kultivácie vo farmaceutickom priemysle. Využitie Ramanovej spektroskopie a modelu čiastočnej diskriminačnej analýzy najmenších štvorcov (PLS-DA) vykazuje skvelú výkonnosť na rozlíšenie vzoriek s bakteriálnymi kontaminantmi. Využitím vzoriek obohatených o bakteriálne spóry bola dosiahnutá presnosť detekcie 99 %. Využitie tejto metódy v kontrole kvality vo farmaceutickom priemysle má preto veľký potenciál [24].

Rovnako sa Ramanova spektroskopia uplatňuje pri modernej medicíne, napr. v onkológii, kde je potrebné rýchle rozlíšenie medzi zdravým a rakovinovým tkanivom. Metódou Ramanovej spektroskopie s analýzou hlavných komponentov (PCA) *A.A. Kowalska, M. Czaplicka a kol.* rozlíšili nádorové vzorky mozgu od zdravých s presnosťou 96 % [25].

Nie len samotné bunky ale aj ich produkty ako napr. exopolysacharidy sú analyzované pomocou Ramanovej spektroskopie, ktorá umožňuje ich delenie vďaka vhodným markrom napr. rozdeliť polysacharidy na glukány a fruktány. Rozdelenie, analýza a identifikácia otvára cestu pre komplexnú analýzu uhlíkov v prostredí *in vitro* [26].

2.2 Techniky príbuzné Ramanovej spektroskopii

Ku alternatívnym technikám Ramanovej spektroskopie patria napríklad rezonančná Ramanova spektroskopia, povrchom zosilnená Ramanova spektroskopia, časovo rozlíšená Ramanova spektroskopia a Ramanova mikroskopia [27].

Rezonančná Ramanova (RR) spektroskopia je technika, pri ktorej energia dopadajúceho fotónu je blízka elektrónovému prechodu skúmanej zlúčeniny alebo materiálu. Frekvenčná koincidencia, alebo inak rezonancia môže viesť k značne zvýšenej intenzite Ramanovho efektu o 2 až 4 rady, čo vedie ku ľahčeniu štúdia chemických zlúčenín prítomných v nízkych koncentráciách [28]. Využitie rezonančnej Ramanovej spektroskopie je užitočné v oblasti veľkých biomolekúl s chromoformi, ako napríklad hemoglobínu alebo proteínov [29] a v materiálnej vede [30].

Rezonančná hyper-Ramanova spektroskopia je variáciou rezonančnej Ramanovej spektroskopie. Cieľom je dosiahnuť excitáciu na určitú energetickú hladinu v cieľovej molekule vzorky javom známym ako dvojfotónová absorpcia. Pri tomto jave sú absorbované dva fotóny súčasne do molekuly. Pri uvoľnení molekuly z excitovaného stavu do stavu základného sa emituje iba jeden fotón. Jedná sa o typ fluorescencie [31].

Povrchom zosilnená Ramanova spektroskopia (SERS) je metóda výrazne zosilňujúca Ramanov rozptyl v dôsledku interakcie viditeľného žiarenia s nanoštruktúrami plasmonických kovov s molekulami lokalizovanými na ich povrchu. Na vhodný kovový substrát (najčastejšie obsahujúci zlaté alebo strieborné nanočastice) sa absorbujú skúmané molekuly. Ku následnému zosilneniu Ramanovho rozptylu prispieva elektromagnetický (rezonančné vybudenie povrchových plasmónov v kove) a chemický jav (prenos náboja medzi absorbátom a povrchom kovu) [32]. Uplatnenie má pri určovaní rôznych biochemicky dôležitých druhoch od jednoduchých vodíkových kationov až po zložité špecifické fragmenty DNA. V medicínskych aplikáciách je SERS široko využívaná k analýze biologických vzoriek zahŕňajúcich DNA, RNA, markery rakoviny, baktérie, vírusy, gény, lieky a iné biomolekuly [33].

Ramanova mikroskopia je kombináciou Ramanovej spektroskopie s mikroskopickými metódami. Príkladom je hrotom zosilnená Ramanova spektroskopia (TERS), využívajúca mikroskopiu atomárnych síl so špeciálnym AFM hrotom, ktorý umožňuje zisk informácií zo štruktúr na nanometrovej úrovni, v kombinácii s chemicky citlivou povrchovo zosilnenou Ramanovou spektroskopiou (SERS) [34] a využíva sa na štúdium vedeckých problémov v biológii, fotovoltaike, katalýze, polovodičoch, uhlíkových nanorúrkach, či graféne [34].

Časovo rozlíšená Ramanova spektroskopia (TRRS) umožňuje študovanie mikroskopických procesov prebiehajúcich krátky časový úsek. Laserovým pulzom je materiál vyvedený z termodynamickej rovnováhy a nastáva excitovaný stav. Zisk Ramanovho spektra excitovaných molekúl môže byť po použití rovnakého alebo iného laserového zdroja. V závislosti na tom sa jedná o jednofarebnú alebo dvojfarebnú pulznú Ramanovu spektroskopiu [35]. Inštrumentácia je vhodná pre meranie delenia štiepnej kvasinkovej bunky, relaxáciu štruktúry prechodného deoxyhemoglobínu, či vnútornú konverziu β -karoténu [35].

Koherentná anti-Stokesova Ramanova spektroskopia (CARS) je druh Ramanovej spektroskopie založený na nelineárnej konverzii dvoch laserových lúčov na koherentný, laseru podobný Ramanov lúč vysokej intenzity v anti-Stokesovej oblasti. Technika teda zahŕňa dva lasery, jeden s pevnou frekvenciou a druhý laditeľný na nižšiu frekvenciu. Emisia ja často o mnoho rádov vyššia ako normálny Ramanov rozptyl a vzhľadom na koherentný a Anti-Stokesov charakter žiarenia je metóda veľmi užitočná na získanie Ramanových spektier fluorescenčných vzoriek, plynov vo výbojoch, plazmy alebo spaľovania [27]. Ako medicínska zobrazovacia technika je CARS schopný zobrazovať celé orgány v subcelulárnom rozlíšení v reálnom čase [36].

Často zmieňovanou technikou pri Ramanovej spektroskopii je infračervená spektroskopia, keďže poskytuje informácie o vibračných prechodoch v molekule. Metódy sú označované za komplementárne, čo vyplýva už z princípu metódy. Zatiaľ čo v Ramanovej spektroskopii ide o nepružný rozptyl, v infračervenej spektroskopii je využívaná absorpcia žiarenia. Informácie získané využitím infračervenej spektroskopie sú založené na zmene dipólového momentu, kdežto v Ramanovej spektroskopii sú vibrácie aktívne len pri zmene polarizovateľnosti molekuly behom vibrácie. Z toho vyplýva, že konkrétne vibrácie môžu byť aktívne v oboch spektroskopických, v žiadnej alebo iba v jednej z nich. Pre stredovo súmerné molekuly platí princíp exklúzie, čiže vibrácie sú aktívne v Ramanovej spektroskopii a inaktívne v infračervenej spektroskopii alebo naopak [37].

2.3 Mikrofluidné techniky

Mikrofluidika je technológia manipulácie tekutín na mikroskopickej úrovni v priestorovo obmedzených štruktúrach o veľkosti v rádoch mikrometrov ako napr. mikrokanáliky, mikrokomory či mikrokapiláry. Mikrofluidný čip je sada mikrokanálov vyleptaných alebo vylisovaných do materiálu ako napríklad sklo, kremík alebo polymér ako polydimethylsiloxan (PDMS). Mikrokanály tvoriace mikrofluidný čip sú navzájom spojené, aby sa dosiahli požadované vlastnosti [38]. Motiváciou v mikrofluidnom výskume je vývoj zariadení lab-on-chip (LOC). Jedná sa o bioanalytické zariadenia v mikromerítke s vysokou efektívnosťou pre súčasnú analýzu veľkého množstva biologicky dôležitých molekúl. Potenciál týchto zariadení je v mikrozariadeniach v diagnostike, vývoji liečiv a zavádzaní nových farmaceutík. Výhoda metódy spočíva v zlepšení prevedenia, rýchlosti a výkonnosti, redukcii ceny, nízkej spotrebe chemikálií a možnosti paralelnej a integrovanej analýzy [39].

Mikrofluidné systémy typicky transportujú, miešajú, separujú alebo inak spracúvajú tekutiny. Rôzne aplikácie využívajú pasívnu kontrolu nad tekutinami pomocou kapilárnych síl vo forme prvkov modifikujúcich kapilárny tok. V niektorých aplikáciách sa na riadený transport média používajú externé ovládacie prostriedky [40].

Mikrofluidné techniky možno rozdeliť podľa druhov fluidných tokov medzi základne skupiny: otvorená mikrofluidika, mikrofluidika s kontinuálnym prietokom, mikrofluidika na báze kvapiek, digitálna mikrofluidika, mikrofluidika na papierovej báze, na detekciu častíc a mikrofluidná magnetoforéza. Každá z týchto metód má pod sebou ďalšie asociované techniky [41].

2.3.1 Optická pinzeta

Optické zachytávanie je výkonný nástroj, ktorý využíva optické sily na udržanie častice o veľkosti od jednotiek nm až po desiatky μm v blízkosti ohniska tesne zaostreného laserového lúča v troch rozmeroch. Kombinácia Ramanovej spektroskopie s optickým zachytávaním ponúka nový stupeň priamej analýzy chemických zložiek mikroskopických častíc [41]. Kombinácia optickej pinzety a Ramanovej mikrospektroskopie je často označovaná ako Ramanovska pinzeta. Prvá experimentálne realizovaná optická pinzeta kombinujúca tieto dve techniky bola zostavená v roku 1984 [42]. Jeden fokusovaný laserový lúč sa využíva ako zdroj Ramanovho rozptylu a zároveň ako zdroj tvoriaci optickú pascu. Optické sily pôsobiace na objekt v Ramanovskej pinzete sa skladajú z rozptylovej sily, ktorá zabezpečuje akceleráciu objektu v smere šírenia optického zväzku a gradientovej sily, ktorá pôsobí v smere gradientu intenzity elektromagnetického poľa. V konštrukcii optickej pinzety pomocou silne fokusovaného zväzku je gradientná optická sila zodpovedná za 3D zachytávanie častice, čo vyžaduje, aby bola gradientná sila väčšia než sila rozptylová, čo bolo dosiahnuté fokusáciou optického zväzku mikroskopovým objektívom s vysokou numerickou apertúrou (NA)[42].

V poslednej dobe je Ramanovska pinzeta používaná v rôznych aplikáciách v bunkovej biológii ako nástroj na bezkontaktné a nedeštruktívne stanovenie vlastností živých buniek [43]. Tento prístup umožňuje detailnú analýzu jednotlivých buniek a mikroorganizmov, na rozdiel od komerčných zariadení, kde je spektrum výsledkom štatisticky veľkého počtu buniek. Bunky obsahujú komplexné zmesi biomolekúl, napríklad nukleové kyseliny, bielkoviny, cukry alebo tuky. Pre pochopenie metabolických procesov je potrebná identifikácia týchto molekúl v živej bunke, na ktorú je vhodná Ramanova spektroskopia. Jednou z vlastností Ramanovej spektroskopie je detekcia látok v malom množstve vzorky a zároveň použitím optického zariadenia poskytuje dostatočný čas pre získanie Ramanovských spektier práve v jednej bunke. Tieto schopnosti nachádzajú využitie nie len v bunkovej biológii ale aj napríklad pri štúdiu aerosólov a mikrovapiek, kde sa využíva absencia povrchového kontaktu a teda umožňuje vylúčiť všetky účinky vyvolané povrchom. Ďalším využitím optického chytania v kombinácii s Ramanovou spektroskopiou je stanovenie chemického zloženia plynovej atmosféry vo vnútri bubliny, alebo charakterizovať rozhranie kvapalina-plyn [42].

2.3.2 Ramanov sorter

Kombináciou analytického a triediaceho systému Ramanovej spektroskopie v mikrofluidnom prostredí s cieľom identifikovať a triediť biologické objekty vznikol Ramanov sorter. Jedná sa o možnú aplikáciu optickej pinzety, ktorý s mikrofluidnými čipmi dokáže rozlišovať Ramanovské odozvy a triediť jednotlivé bunky na jej základe. Technika je univerzálna a bezkontaktná. Nedeštruktívny charakter tejto optickej analýzy a manipulácie umožňuje oddeliť jednotlivé živé bunky podľa stanoveného triediaceho parametra v sterilnom prostredí a následnú kultiváciu vybraných buniek určených pre ďalšie experimenty. Ramanov sorter má potenciálne využitie v mnohých medicínskych, biotechnologických a biologických aplikáciách [43].

Výhodou Ramanovho sorteru je nenáročnosť prípravy vzorky, keďže samotná analýza vyžaduje len niekoľko desiatok buniek, čo umožňuje skrátiť čas analýzy vynechaním kultivácie mikroorganizmov, ktorá zvyčajne trvá 3 dni v závislosti na kultivovanom mikroorganizme. V prípade potreby kultivácie je výhodný tiež pre malé vzorky, kde nie je potrebné čakať na dokončenie kultivačného procesu (nesledujeme tvorbu žiadneho metabolitu tvoriaceho sa v stacionárnej a exponenciálnej fáze) a sorter tak môže byť použitý napríklad na monitorovanie potravín, diagnostiku infekcií alebo sledovanie biotechnologických procesov [44].

2.3.3 Využitie mikrofluidných techník pre separáciu buniek

Mikrofluidné techniky sú atraktívne pre oblasť molekulárnej diagnostiky a analýzy krvných vzoriek. Využitie je tiež v cytogenetike napríklad DNA mikročipy alebo proteínové mikročipy na detekciu proteínov [45].

Biočipy zahŕňajú aplikácie elektroforézy a kvapalinovej chromatografie pre proteíny a DNA, separáciu buniek (napríklad krvných), analýzu buniek, životaschopnosti a zachytávanie mikroorganizmov [46].

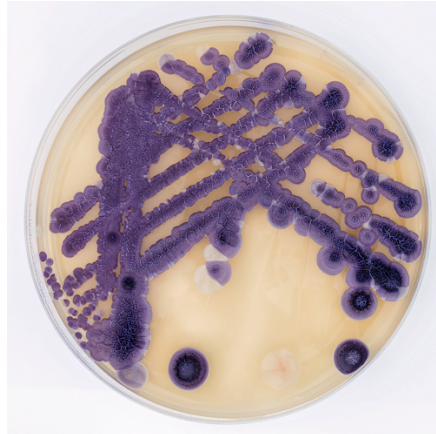
Kombináciou Ramanovej spektroskopie s optickým zachytávaním ponúka nový stupeň priamej analýzy chemických zložiek mikroskopických častíc. V súčasnosti je kľúčovým nástrojom pre bezkontaktnú manipuláciu so širokou škálou vzoriek. Optická pinzeta sa využíva na zachytenie živých buniek, či organel v reálnom čase na analýzu a identifikáciu bez imobilizácie alebo zavádzania biochemických farbív, či značiek [47]. Ďalším využitím optickej pinzety je napríklad štúdium vplyvu dĺžky kultivácie baktérie *Cupriavidus necator* H16 na produkciu polyhydroxybutyrátu v jednotlivých bunkách. Optimalizáciou kultivácie a produkcie PHB je možné výrazne prispieť k zlepšeniu technológie ekologickej recyklácie napríklad olejov na polyméry [48]. Optickú pinzetu je možné využiť aj pre analýzu eukaryotických buniek, napríklad na charakterizáciu štádia vývoja buniek a možnosť rozlíšiť štádium vývoja rakovinových a nerakovinových buniek [49].

Aplikácie Ramanovho sorteru sú prevažne v oblasti identifikácií baktérií, buniek a ich triedení. Ramanova spektroskopia má potenciál v spojení s optickou pinzetou identifikovať mikróby priamo z ľudských telesných tekutín a možné budúce využitie v diagnostickom procese na mieste starostlivosti [50]. Integrovaný mikroskopický systém môže poskytnúť užitočný nástroj pre pochopenie základných bunkových procesov a diagnostikovať bunkovú karcinogenézu [51].

2.4 Bakteriálne kmene vybrané pre meranie

2.4.1 *Janthinobacterium lividum*

Janthinobacterium je rod gramnegatívnych, pohyblivých, aeróbných pôdných saprofytických baktérií z druhu proteobacteria [52]. Jedná sa o tyčinky pozitívne na katalázu [53]. Kataláza je enzým katalyzujúci rozklad peroxidu vodíka na vodu a kyslík, čo zabezpečuje ochranu baktérie pred oxidačným stresom, umožňuje detoxikáciu prostredia a poskytuje zdroj energie pre metabolizmus. Rod produkuje purpurovo-fialový pigment violaceín, z ktorého latinského pomenovania janthinus nesie rod pomenovanie vid'. 2.5.1. Fialové zafarbenie je voľne pozorovateľné na kultúrach, vid'. *Obrázok 3*. Baktérie znášajú chlad, ultrafialové žiarenie a iné environmentálne stresory. Zároveň sú známe svojimi protiplesňovými účinkami. Izolujú sa z pôdných a vodných vzoriek, avšak môžu sa vyskytovať v morských biotopoch. *Janthinobacterium* je pre ľudí, zvieratá a rastliny nepatogénny. Rod má prítomné gény pre produkciu scl-PHA a mcl-PHA [54].

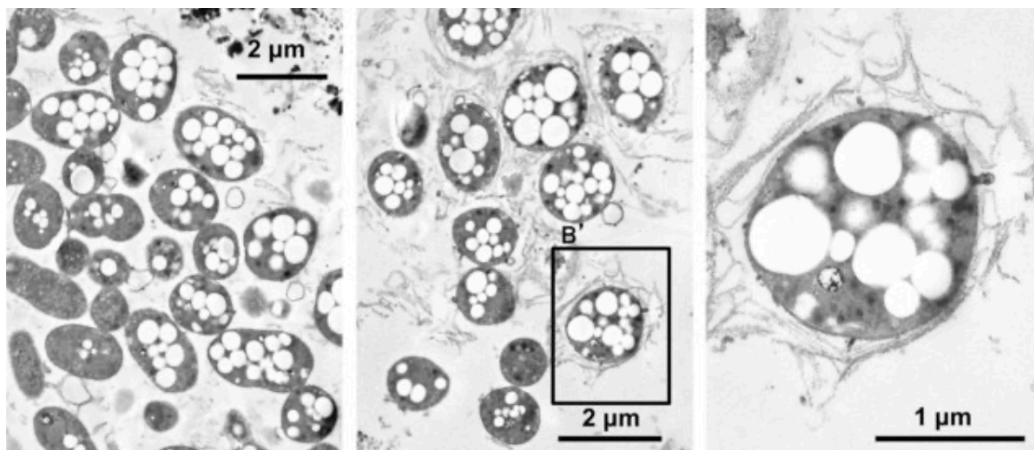


Obrázok 3 Kultúra *Janthinobacterium lividum* [55]

2.4.2 *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii je gramnegatívna baktéria a diazotrof a teda dokáže fixovať dusík pri aeróbnej kultivácii. V baktérii sa tvoria cysty odolné voči vysychaniu a ako zásobný polymér sú produkované polyhydroxyalkanoáty, vid' na *Obrázok 4*. Kmene divokého typu sú často pohyblivé a morfológia buniek je premenlivá od fyziologického stavu a podmienok rastu. Baktéria má tri verzie nitrogenáz s rôznymi kovmi v ich centrálnych kofaktoroch. Nitrogenázy sa môžu navzájom nahrádzať za neprítomnosti esenciálnych kovov a vplyvom rôznych teplôt tak, aby umožnili rast mikroorganizmu. Druh rastúci za prítomnosti menšieho množstva železa produkuje azotobaktín. Jedná sa o charakteristický neónovo zelený pigment [3].

Využitie *Azotobacter vinelandii* je možné aj v procese spracovania vedľajšieho produktu pri výrobe paliva a to glycerolu. *Azotobacter vinelandii* je možné využiť ako lacnú fermentačnú technológiu, vďaka možnosti viazať atmosférický dusík a recyklovať tak surový glycerol na funkčné biopolyméry. *Azotobacter vinelandii* vykazoval rast aj pri zriedení surového glycerolu bez akejkoľvek úpravy sterilizovanou vodou z vodovodu. Ku vyčerpaniu glycerolu dochádza do 48 hodín a za tvorby polyhydroxybutyrátu a alginátu. Blokováním dráhy syntézy alginátu je možné zvýšiť produkciu polyhydroxybutyrátu desaťnásobne [4].

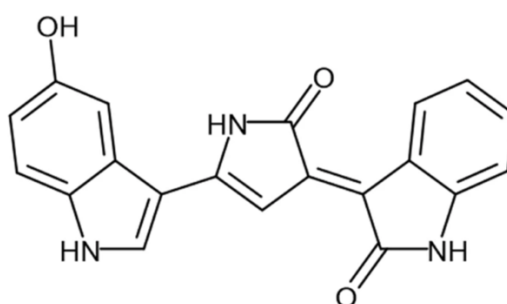


Obrázok 4 Zobrazenie z elektrónového mikroskopu baktérie *Azotobacter vinelandii* (sivá farba), v ktorých sa nachádzajú PHA granule (biela farba) [4]

2.5 Látky produkované vybranými kmeňmi

2.5.1 Violaceín

Baktérie *Janthinobacterium lividum* produkujú violaceín. Jedná sa o všestranný pigment, ktorý vykazuje rôzne biologické aktivity, vďaka ktorým má komerčné využitie v kozmetickom priemysle, medicíne a tkaninách [5]. Violaceín je prírodný vo vode rozpustný bis-indolový pigment (vid'. Obrázok 5) s antioxidantnými, protizápalovými, protiplesňovými, protivírusovými, protinádorovými a antibakteriálnymi vlastnosťami. V niekoľkých štúdiách o líniiach rakoviny hrubého čreva, prsníka, hlavy a krku sa preukázal antiproliferantný potenciál violaceínu. Produkcia pigmentu je odpoveďou na environmentálny stres v spojení s prežitím v nepriateľských podmienkach. Baktérie využívajú fialový pigment na ochranu pred inými mikroorganizmami [56].

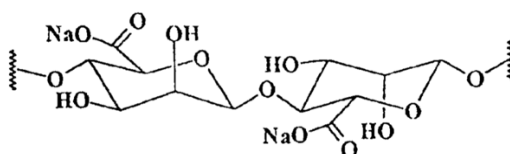


Obrázok 5 Chemická štruktúra violaceínu [57]

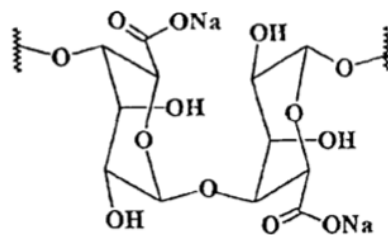
Violaceín je sekundárnym metabolitom zo skupiny alkaloidov tvorený tromi štruktúrnymi jednotkami a to 5-hydroxyindol, oxindol a 2-pyrrolidón. Široká škála biologických aktivít vzbudila záujem o pochopenie metabolizmu účinku s cieľom potencionálneho terapeutického využitia [57]. Violaceín je v súčasnosti skúmanou oblasťou aj z dôvodu vysokých nákladov pre konvenčný medicínsky výskum. Cieľom je vyvinúť nové a efektívne postupy pre zvýšenie efektivity a produktivity výťažkov tohto sekundárneho metabolitu, od ktorého sa očakáva zníženie nákladov a následne uplatnenie v medicínskom výskume [58].

2.5.2 Alginát

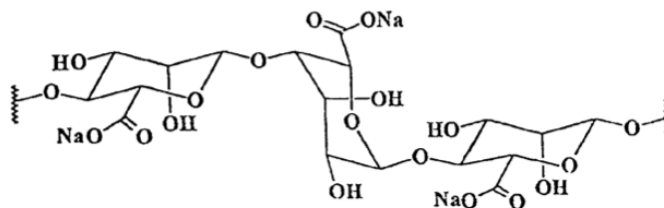
Kyselina alginová s kovmi ako je sodík či vápnik tvorí jej soli zvané algináty. Štruktúrne sa jedná o lineárny kopolymér tvorený monomérmi β -D-manuronovej (M) a α -L-guluronovej kyseliny (G) viazanými (1,4) glykozidovou väzbou. Usporiadanie monomérov môže byť homopolymérne do blokov MM (Obrázok 6) a GG (Obrázok 7), alebo do striedajúcich sa blokov M a G (Obrázok 8), kde pomer je závislý od zdroja alginátu [59].



Obrázok 6 Štruktúra M-M sekvencie [60]



Obrázok 7 Štruktúra G-G sekvencie [60]



Obrázok 8 Štruktúra M-G-M sekvencie [60]

Alginát je všeobecný pojem pre prirodzene sa vyskytujúce polysacharidy, ktoré sa súčasne extrahujú z morských rias. Jedná sa o komerčne zaujímavé látky, ktoré sa využívajú ako stabilizačné, zahusťovacie, gélotvorné alebo filmotvorné činidlá. Výskum použitia alginátov ako imobilizačných matric sa zameria prevažne na procesy v potravinárskom priemysle [60].

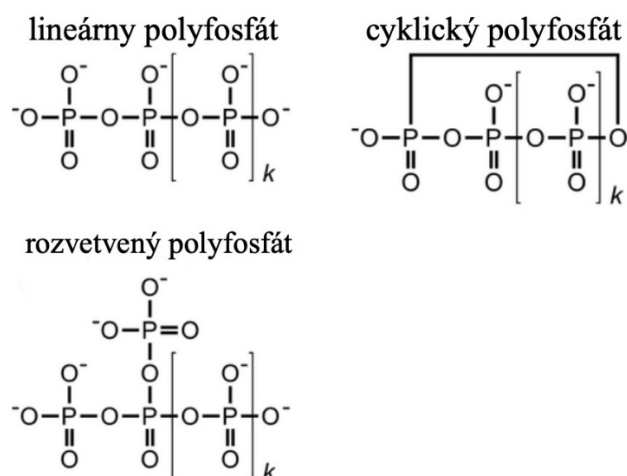
Z komerčného hľadiska je najdôležitejšou charakteristikou alginátov ich schopnosť vytvárať roztok a gél. Viskozita roztoku je určovaná vnútornou viskozitou, ktorá je závislá na molekulovej hmotnosti polyméru. Gélovacie vlastnosti alginátov súvisia s ich schopnosťou viazať množstvo dvojmocných alebo viacmocných kationov. Najvýznamnejšími zástupcami sú ióny vápnika, po ktorého pridaní prechádza alginát konformačnými zmenami. Takto vzniknutý gél sa používa v potravinárskom priemysle. Najpoužívanejšou formou je ľahko rozpustná sodná soľ. Jednou z častých aplikácií je použitie alginátu ako prímеси do zmrzliny, kde zabraňuje kryštalizácii a zmršťovaniu a poskytuje homogénny produkt. Slúži tiež ako stabilizátor, ktorý zabraňuje separácii napríklad pri horčici alebo dresingoch. Vďaka nízkemu kalorickému obsahu môže byť použitý ako plnidlo pri formulovaní hypokalorických produktov a teda nízkokalorických variantoch napríklad majonéz. Propylénglykoalginát slúži pri výrobe piva na zvýšenie úrovne peny. Vďaka schopnosti vytvárať tepelne stabilné gély sa používa v pekárenských výrobkoch, džemoch, mliečnych výrobkoch a rovnako aj v konzervách pre domáce zvieratá [60].

Bakteriálne algináty sú potenciálne zaujímavé pre farmaceutický a medicínsky priemysel, keďže je dosahované vysokého stupňa čistoty a charakterizované chemické zloženie [60].

2.5.3 Polyfosfát

Anorganický polyfosfát je polymér ortofosfátu a nachádza sa vo všetkých živých organizmoch. Polyfosfát existuje v troch molekulárnych štruktúrach: lineárnej, cyklickej (známy ako metafosfát) a rozvetvenej (známy ako ultrafosfát) vid'. Obrázok 9. Molekulárna štruktúra rozvetveného polyfosfátu je názorná, dĺžka bočného reťazca sa môže meniť. Počet monomérnych jednotiek (k) v štruktúre sa mení. V prípade lineárneho a rozvetveného polyfosfátu sa pohybuje od 0 do 1000 a pri cyklickom polyfosfáte je rozsah od 1 do 10. Každá P-podjednotka v polyfosfátovom reťazci má jeden silne kyslý vodík. Lineárny polyfosfát má jeden kyslý vodík na každom konci reťazca polyfosfátu [61].

Po rozpustení polyfosfátu vo vode sa rozvetvené reťazce stávajú nestabilné a spontánne rýchlo hydrolyzujú. Preto štúdium polyfosfátov v biologických vzorkách nezahŕňa túto formu polyfosfátu. V živých organizmoch je najbežnejšia lineárna konfigurácia polyfosfátov [61].



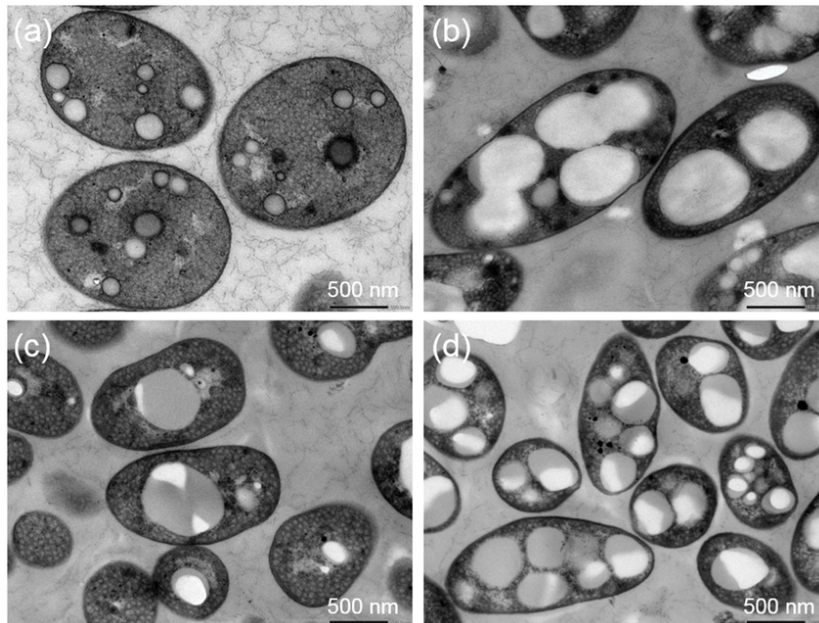
Obrázok 9 Molekulárne štruktúry polyfosfátov [61]

Mikroorganizmy využívajú molekuly polyfosfátu ako zdroj energie a fosfátu. Uplatnenie má však aj pri funkciách spojených s motilitou, virulenciou a génovou expresiou. Aplikácie polyfosfátov sú široké. Počínajúc odstraňovaním ťažkých kov až po priemyselné a biotechnologické využitie v oblasti potravinárskych prísad, enzýmových technológií a prísad do detergentov. Polyfosfát sa využíva aj v oblasti medicíny na doručovanie liekov a návrh terapeutických liekov [62].

Produkcia polyfosfátu v bunkách je obmedzená a pre biotechnologický pokrok je potrebné zvýšiť výnosy. To je možné prostredníctvom metabolických stratégií, klasickej akumuláčnej metódy, avšak obmedzene. Potenciálne riešenie ponúkajú možnosti ako kyslé pH, osmotický stres, obmedzenie živín, fosfátov a aminokyselín, či prítomnosť organických znečisťujúcich látok [62].

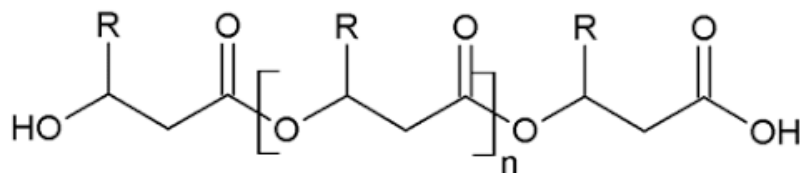
2.5.4 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty, označované PHA, sú biopolyestery a bioplasty. Z chemického hľadiska sa jedná o alifatické polyestery hydroxyalkanoátov [2]. PHA môže byť syntetizované viacerými spôsobmi, ako napríklad mikroorganizmami, či transgennými rastlinami. Mikroorganizmy produkujú PHA za účelom ukladania uhlíka a zvýšenia redoxného potenciálu [2]. Uhlík akumulujú vo forme intracelulárnych granulí na uchovávanie energie. Príklad ako vyzerajú granule PHA v baktériách pri zobrazení transmisným elektrónovým mikroskopom je zobrazený na obrázku (Obrázok 10) [63].



Obrázok 10 Fotka PHA granúl (biela a bledosivá farba na obrázku) v baktériách (tmavšia oblasť sivej farby na obrázku) z transmisného elektrónového mikroskopu s mierkou 500 nm [63].

Ku akumulácií dochádza za extrémnych podmienok, kedy sa PHA uchová v granulovanej forme o veľkosti od 0,2 do 0,5 μm v cytoplazme. Za extrémne podmienky sa považujú všetky hodnoty teploty, pH, tlaku a iné hodnoty odlišné od normálnych podmienok, čiže teploty v rozmedzí 20–25 $^{\circ}\text{C}$, neutrálneho pH (6–8), atmosférického tlaku a 20 % obsahu kyslíku v atmosfére. Granulovaná forma v cytoplazme je označovaná ako inklúzia, ktorá je vo vodnom prostredí nerozpustná. Jedná sa o opticky aktívne molekuly, v ktorých sa nachádzajú jednotky (*R*)-3-hydroxyalkánových kyselín, ktoré sú navzájom prepojené esterovou väzbou medzi hydroxylovou skupinou jedného monoméru a karboxylovou skupinou iného (Obrázok 11) [64]. Vo všeobecnom štruktúrnom vzorci polyhydroxyalkanoátov predstavuje substituent R alkylovú skupinu, ktorou môže byť napríklad vodík, metyl, etyl, propyl, pentyl a nonyl [65].



Obrázok 11 Všeobecná štruktúra PHA, kde R je alkylová skupina a n je v rozmedzí 100–30 000 [66]

Z monomérov sa tvorenia polyméry s vysokou molekulovou hmotnosťou, ktorá sa pohybuje v rozmedzí 200 až 3 000 kDa. Typ polyhydroxyalkanoátu a súvisiaca molekulová hmotnosť sú špecifické pre rôzne mikroorganizmy. Dôležitým faktorom je zdroj uhlíku a okolité podmienky, ako sú teplota, alebo pH [2].

Významnou vlastnosťou polyhydroxyalkanoátov je ich biologický charakter a súčasne podobnosť vlastnosťami syntetickým plastom. PHA sú preto označované ako zelené plasty a majú pozitívny environmentálny dopad, vďaka ich biokompatibilite a biologickej odbúrateľnosti. Produkcia PHA je možná z rôznych obnoviteľných zdrojov, akými sú napríklad sacharidy (konkrétne napríklad sacharóza, glukóza, maniokový škrob alebo trstinová melasa), či oxid uhličitý [66], kde ku produkcii dochádza v koncentrácií dusíka, fosforu, síry alebo kyslíka, pre optimalizáciu výťažkov PHA v priemysle. Pri zvyšovaní produkcie sú problémom náklady na zdroj uhlíku metabolizovaného rastlinami, preto je PHA produkované z obnoviteľných a lacných substrátov, ktorými sú rastlinné a živočíšne oleje aj z odpadových

tokov olejární, alebo tiež použité oleje z priemyslu [67]. Ďalšími zdrojmi sú odpady z výroby bionafty (glycerol, odpadné oleje), odpadné priemyselné vody obsahujúce organické látky ako napríklad papierne. Ich hlavné výhody tkvejú v ekonomickom a ekologickom hľadisku [7,8,9]. Ďalšou výhodou je, že ako jediné bioplasty sú celé produkované mikroorganizmami [66].

Klasifikácia polyhydroxyalkanoátov je možná na základe viacerých faktorov, napríklad podľa dĺžky reťazca alebo podľa biotechnologickej výroby. Delenie podľa dĺžky reťazca závisí od počtu uhlíkov vid' *Tabuľka 1* [65].

Tabuľka 1 Delenie PHA podľa dĺžky reťazca [65].

| Trieda PHA | | Počet uhlíkov |
|-------------------|---------------------------|----------------------|
| krátke | scl – short chain lenght | 3 až 5 atómov |
| stredné | mcl – medium chain lenght | 6 až 14 atómov |
| dlhé | lcl – long chain lenght | 15 alebo viac |

Technologická výroba rozdeľuje vzniknuté produkty na homopolyméry a heteropolyméry. Homopolyestery pozostávajú z jedného druhu monoméru. Zástupcami homopolymérov sú napríklad poly(3-hydroxybutyrát) alebo poly(3-hydroxyoctanoát). Heteropolyestery sú tvorené monomérmi s odlišnými základnými alebo postrannými reťazcami. Zástupcom heteropolymérov je napríklad P(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyhexanoát-co-3-hydroxyoctanoát). Heteropolyestery následne vytvárajú kopolyestery [65].

Celkovo identifikovaných bolo už viac ako 150 rôznych monomérov PHA. Nejedná sa však o finálny počet a práve z dôvodu chemickej a fyzikálnej modifikácie, alebo genetickou modifikáciou producentov PHA prirodzených molekúl PHA, sú získavané nové molekuly PHA s novými vlastnosťami [71]. Vo všeobecnosti sú najviac preskúmanými skupinami polyhydroxyalkanoátov homopolyméry s krátkym alebo stredne dlhým reťazcom, vďaka ich podobnosti s klasickými plastmi [72].

Vzhľadom nato, že polyhydroxyalkanoáty plnia zásobnú funkciu pre uhlík v bunke a teda sa jedná o látky zásobné, musí mikroorganizmus disponovať systémom, ktorý prevedie PHA opätovne na zdroj uhlíka. Jedná sa o proces časovo mnohonásobne pomalší ako pri syntéze PHA. Biodegradácia prebieha v aeróbnom a anaeróbnom prostredí. Bolo zistené, že najprirodzenejším prostredím pro biodegradáciu PHA je pôda. Prirodzená degradácia PHA začína fotodegradáciou a nasleduje metabolizácia mikroorganizmami [73].

Pôvodné využitie polyhydroxyalkanoátov prevažne na výrobu predmetov každodenného použitia sa za posledné desaťročia rozšírilo. Polyhydroxyalkanoáty nachádzajú široké uplatnenie vzhľadom na ich biologickú odbúrateľnosť a možnosť vytvárať bioplasty s touto vlastnosťou. Podstatnou výhodou je tiež termoplasticita a netoxicita, čím sú schopné konkurovať petrochemickým polymérom. Avšak dôležitým je rovnako uplatnenie v oblasti lekárskeho a farmaceutického priemyslu a to práve vďaka ich biologickej odbúrateľnosti, kde má najväčší potenciál homopolymer P(3HB) a kopolymér P(3HB-co-3HV). Polyméry by mohli byť využité na výrobu kardiovaskulárnych zariadení, napríklad srdcové chlopne, steny, alebo kardiovaskulárne náplasti. Uplatnenie je tiež v oblasti mikronosičov pre protinádorovú terapiu, nanosičov pre transport liekov a ich cielené uvoľňovanie. Zo skupiny mcl-PHA sa testujú nemodifikované formy za účelom nových scaffoldov pre tkanivové inžinierstvo, kde dosiahnutie lepšej kompatibility s ľudským tkanivom zabezpečuje napríklad hydroxyapatit, ktorý je substrátom pre kostné tkanivo, avšak kompatibilitu zvyšuje aj želatína, hodváb alebo kolagén. Využitie má PHA ako prekurzor pre syntézu liečiv, antibiotík alebo vitamínov. Príkladom je kyselina 3-hydroxyoktánová, ktorá má antimikrobiálne účinky [1,14,15].

Využitie nachádzajú taktiež v poľnohospodárstve, kde tvoria film so zavedenými herbicídmi, ktorý umožňuje ich postupné uvoľňovanie a vstrebanie do pôdy. Na túto aplikáciu sa používa kopolymér P(3HB-co-3HV), ktorý je rovnako zasiaty do pôdy spolu

s poľnohospodárskymi plodinami. Použitie PHA môže zvýšiť skladovateľnosť, účinnosť a spoľahlivosť komerčných očkovacích látok slúžiacich pre zvýšenie fixácie dusíka v rastlinách [76].

2.6 Súčasný stav problematiky

Ramanova spektroskopia je technika rýchlej mikrobiálnej detekcie a identifikácie. Medzi popredné výhody tejto metódy patrí vysoko špecifická povaha, vďaka čomu je využívaná v rôznych oblastiach [77]. Ramanovu spektroskopiu je možné využiť na identifikáciu mikróbov, detekciu určitých faktorov ako napríklad antimikrobiálnu rezistenciu, tvorbu biofilmu [50] či produkciu určitých chemických látok [78].

Pre Ramanovské spektrá baktérií sú typické pásy v určitých oblastiach, ktorým sú priradené rôzne väzby (Tabuľka 2).

Tabuľka 2 Prehľad priradených pásiem v bakteriálnych Ramanovských spektrách [79]

| pozícia Ramanovskej signatúry [cm^{-1}] | priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanovských spektrách |
|--|--|
| 1660 | vibrácie amidových skupín |
| 1242 | |
| 1001 | aminokyseliny |
| 1610 | phenylalanín a tyrosín |
| 1575 | nukleové kyseliny (prevažne adenín a guanín) |
| 2932 | väzba CH v skupinách CH_3 a CH_2 v bielkovinách, lipidoch, nukleových kyselinách a sacharidoch |

Bakteriálne kmene vybrané pre túto prácu majú predpoklad tvoriť polyhydroxyalkanoáty, algináty a polyfosfát [59].

Pri identifikácii polyhydroxyalkanoátov je dôležitá identifikácia vodíkovej väzby v štruktúre. Pri experimentoch monitorujúcich produkciu PHB u baktérií bol použitý kmeň *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB- 4. V experimente bolo zistené, že koncentrácia PHB priamo koreluje s pásmi v Ramanovom spektre v oblasti 1734 cm^{-1} . Signál v tejto oblasti je priradený vibráciám karbonylovej väzby $\text{C}=\text{O}$ [79]. Z toho dôvodu je Ramanova spektroskopia označovaná za rýchlu a vhodnú metódu pre monitorovanie PHB v baktériách [80] aj pre určenie jej formy (kryštalická alebo amorfná) [79]. Medzi ďalšie píky priradené prejavu PHB v spektrách patrí oblasť 357, 417, 600, 837, 1055, 1100 a 1455 cm^{-1} [80].

Ramanova spektroskopia umožňuje rozlíšiť heteropolymérne a homopolymérne frakcie kyseliny alginovej podľa charakteristických pásov (Tabuľka 3). Kyselina alginová je kopolymér kyseliny β -D-manuronickej (M) a α -L-guluronickej (G). Monoméry spojené (1,4) glykozidovou väzbou tvoria dve homopolymérne frakcie MM a GG a heteropolymérnu frakcie MG [81].

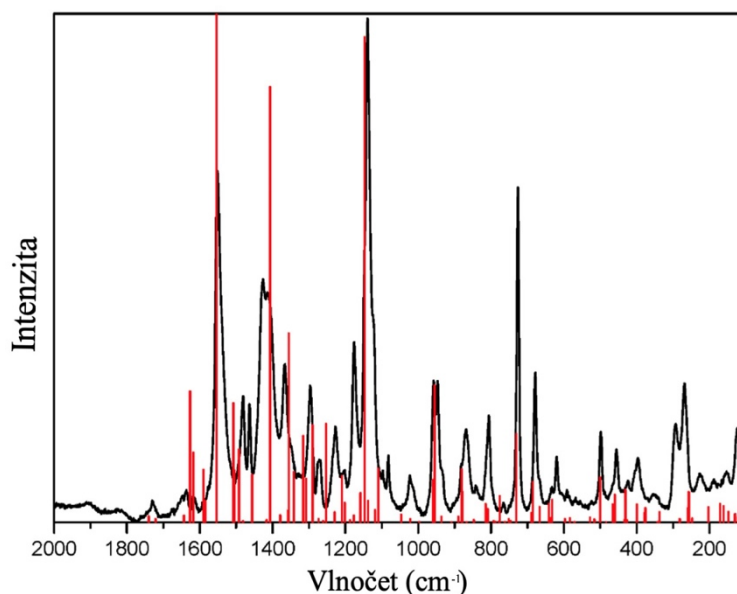
Tabuľka 3 Prehľad charakteristických pásov pre frakcie kyseliny alginovej [81]

| pozícia Ramanovskej signatúry [cm^{-1}] | priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanovských spektrách | Frakcie |
|--|--|-----------------|
| 946 | poly-D-mannuronát | Homopolymérne |
| 863 | | |
| 799 - 788 | | |
| 928 - 913 | poly-L-guluronátu | |
| 890 - 889 | | |
| 797 | | |
| 730 | MG | Heteropolymérne |

Heteropolymérne frakcie predstavujú dva charakteristické pásy, z nich intenzívnejší a dôležitejší je pás 730 cm^{-1} dôsledkom prstencového dýchacieho vibračného módu [81].

Ramanovo spektrum polyfosfátu pozostáva zo silného píku v oblasti $1145\text{--}1177 \text{ cm}^{-1}$ a slabšieho píku v oblasti $682\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$. V oblasti 738 a 1022 cm^{-1} sa nachádzajú Ramanovské pásy pre napínanie väzieb PO_2^- a P-O-P. Tieto vlnové dĺžky môžu byť posunuté s nárastom dĺžky reťazca [61].

Identifikáciou Ramanových spektier violaceínu sa zaoberal *Jehlička a kol.*, kde porovnávali prejavy violaceínu predpokladané výpočtom s nameranými spektrami (Obrázok 12). Ramanovo spektrum violaceínu pri 785 nm má výrazné píky v oblasti $269, 680, 728, 945\text{--}958, 1141, 1175, 1296, 1369, 1465$ a 1553 cm^{-1} . Výsledky ukazujú, že pri meraní bakteriálneho spektra *Chromobacterium violaceum* obsahujúceho violaceín je vhodnejšie použiť laser s excitačnou vlnovou dĺžkou 532 nm , naopak pri meraní extrahovaného violaceínu je vhodnejšie použitie lasera s excitačnou vlnovou dĺžkou 785 nm [82]



Obrázok 12 Namerané spektrum čistého violaceínu extrahovaného z *Chromobacterium violaceum* v porovnaní s vypočítanými vibračnými prejavmi (červené čiary) violaceínu v Ramanovom spektre meranom pri použití červeného lasera o vlnovej dĺžke 785 nm [82].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité baktérie, chemikálie, prístroje a materiál pri meraní

3.1.1 Baktérie

Pre experimentálnu časť diplomovej práce boli vybrané bakteriálne vzorky troch kmeňov a to *Azotobacter vinelandii* DSM 720, DSM 13 529, DSM 85, DSM 87 a DSM 576 pochádzajúcich z nemeckej zbierky mikroorganizmov a bunkových kultúr, *Janthinobacterium lividum* CCM 160, CCM 1888, CCM 3308 pochádzajúcich z českej zbierky mikroorganizmov rovnako ako *Cupriavidus necator* H16 CCM 428.

3.1.2 Chemikálie

| | |
|--|----------------|
| - CaCl ₂ · 2 H ₂ O | Lachema |
| - Etanol | Lachner |
| - Nutrient Broth w/1 % peptone | HiMedia, India |
| - Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | Lachner |
| - KH ₂ PO ₄ | Lachner |
| - MgSO ₄ · 7 H ₂ O | Lachner |
| - Glycerol | Lachema |
| - Chloroform | Lachner |
| - (NH ₄) ₂ SO ₄ | Lachner |
| - Beef Extract Powder | HiMedia, India |
| - Peptone, Bacteriological | HiMedia, India |
| - NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O | Lachner |
| - Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | Lachner |
| - Glukóza | Lachema |
| - Kvasinkový extrakt | HiMedia, India |
| - Metanol | Lachner |
| - 2-propanol | Lachner |
| - Kyselina sírová | Lachner |
| - Kyselina benzoová | Lachner |
| - Hydroxid sodný | Lachner |
| - Dekahydrát pyrofosforečnanu sodného | Sigma-Aldrich |
| - hexametafosfát sodný | Sigma-Aldrich |

3.1.3 Prístroje

- Laminárny box Aura mini, BioAir Instruments
- Predvážky Kern EW 620
- Analytické váhy Boeco
- Magnetická miešačka bez ohrevu technoKartell, (MERCİ s.r.o.)
- Temperovaná trepačka Heidolph unimax 1 010, Labicom s.r.o.
- Analytické váhy Boeco
- Vortex TK3S, Kartell spa
- Mikrocentrifúga Sigma 1-14
- Centrifúga Hettich Zentrifugen
- Ramanov mikroskop, Renishaw, inVia

- Plynový chromatograf s FID, (Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm)
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie
- Centrifuga vysokorychlostná chladená, Hermle Z 36 HK

3.1.3.1 Ramanov spektrometer Renishaw inVia

Merania všetkých bakteriálnych kmeňov boli uskutočnené na disperznom Ramanovom spektrometri Renishaw inVia (Obrázok 13). Spektrálny rozsah je od ultrafialovej oblasti po infračervenú a teda od 200 nm do 1 700 nm.

Prístroj disponuje súborom viacerých excitačných laserov s rôznymi vlnovými dĺžkami, z nich každý je vybavený optimalizovanou optickou dráhou pre excitáciu v oblasti viditeľného svetla (Vis), blízkej infračervenej oblasti (NIR) alebo infračervenej oblasti (IR), čo umožňuje dosiahnuť maximálny pomer signál/šum v Ramanovom spektre. Prepnutie medzi lasermi je riadené softwarom a prebieha automaticky. Excitačné lasery v spektroskope sú nasledovné:

- Diódový DPSS laser s vlnovou dĺžkou 532 nm, s maximálnym výkonom 50 mW, ktorý je chladený vzduchom a je vybavený zabudovaným plazma filtrom pre optimálne fungovanie.
- Diódový NIR laser s vlnovou dĺžkou 785 nm, s maximálnym výkonom 300 mW, ktorý je taktiež chladený vzduchom.

Prístroj je vybavený Rayleighovými hranolovými filtermi s hranou maximálne 100 cm^{-1} od excitačných línií laserov.

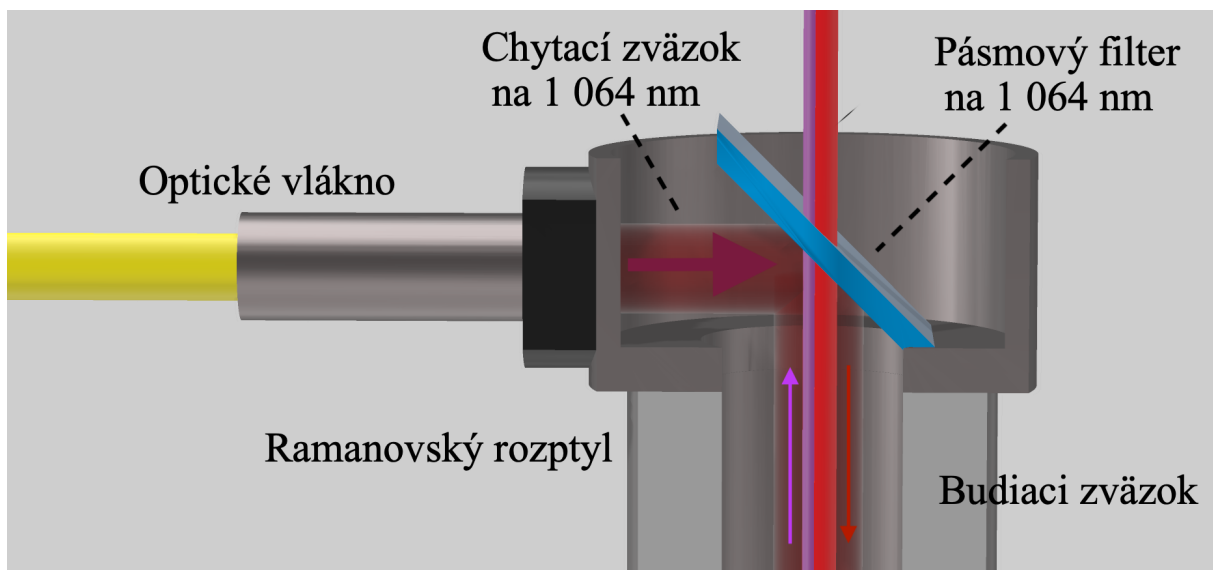
Spektroskop dosahuje spektrálne rozlíšenie vyššie než 1 cm^{-1} (FWHM – full width at half maximum), čiže je schopný rozlíšiť rozdiely vo frekvenciách Ramanových signálov s presnosťou lepšou než 1 cm^{-1} [83].



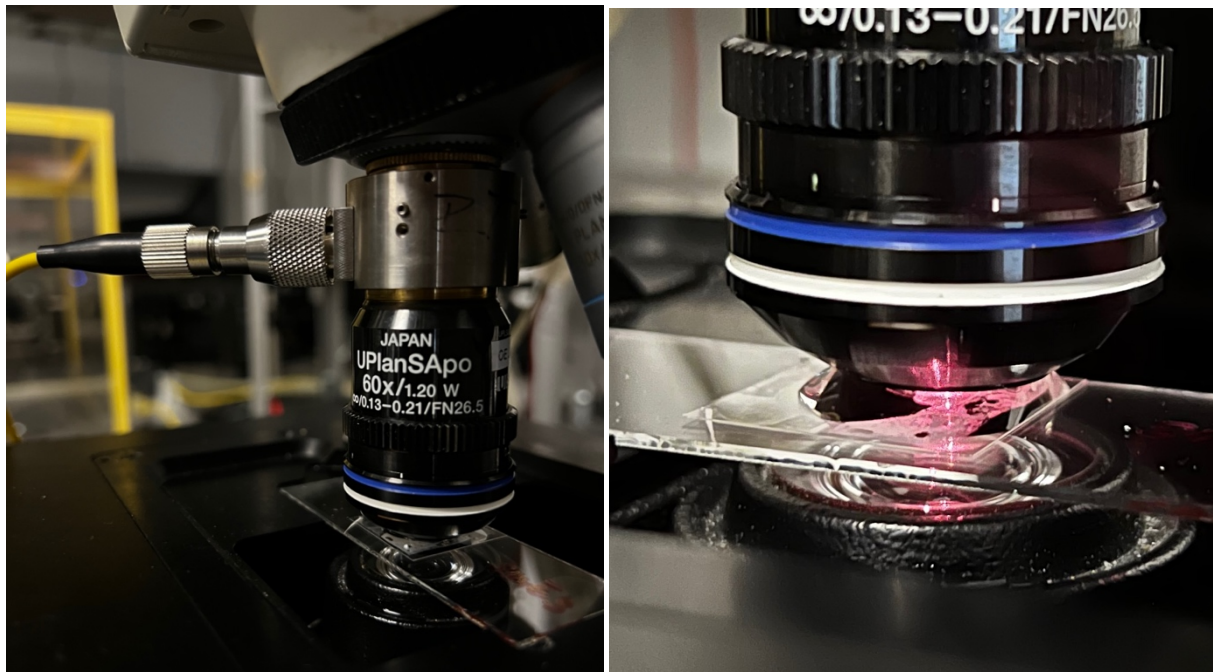
Obrázok 13 Ramanov spektroskop Renishaw inVia

3.1.3.2 Optická pinzeta

Experiment s využitím Ramanovskej pinzety bol realizovaný na aparátúre v laboratóriu Ústavu prístrojové techniky Akadémie vied Českej republiky. Ramanove spektrá študovaných bakteriálnych kultúr boli získané pomocou Ramanovskej pinzety založenej na komerčnom Ramanovom mikroskope Renishaw inVia (3.1.3.1). Bližšia schéma usporiadania zväzkov v optickej pinzete je uvedená na obrázku (Obrázok 14). Pre implementáciu optického zachytávania do mikroskopického systému bol vložený modul, ktorý umožňoval napojenie zachytávajúceho laserového lúča do optickej dráhy prístroja medzi telo mikroskopu a šošovku mikroskopu (Obrázok 15). Pre meranie bol použitý objektív Olympus UPLSAPO60XW (60X, NA 1.2, vodná imerzia)[84].



Obrázok 14 Schéma optickej pinzety



Obrázok 15 Experimentálne usporiadanie optickej pinzety a meranie vzorky v mikrokomôrke

3.2 Kultivácia baktérií

3.2.1 Príprava inokula

Pre bakteriálne kmene *Janthinobacterium lividum* CCM 1888, CCM 160 a *Cupriavidus necator* H16 bolo pripravené inokulačné médium, ktoré pozostávalo z komplexného média Nutrient Broth v koncentrácii 25 g/l. Bolo pripravených 50 ml média do 100 ml Erlenmeyerovej banky a následne boli všetky banky sterilizované po dobu 30 minút. Po ochladení na laboratórnu teplotu boli do inokulačného média zaočkované kultúry z kryoskúmaviek v objeme 0,75 ml v duplikátoch. Kultivácia prebehla pri optimálnej teplote 30 °C po dobu 24 hodín a trepaní pri 180 rpm.

Pre *Azotobacter vinelandii* bolo pripravené inokulačné médium (Tabuľka 4). Pripravených bolo 50 ml média do 100 ml Erlenmeyerovej banky a následne boli všetky banky sterilizované po dobu 30 minút. Glukóza bola sterilizovaná samostatne a pridaná dodatočne po sterilizácii a ochladení na laboratórnu teplotu v sterilných podmienkach laminárneho boxu. Do inokulačného média boli zaočkované kultúry z kryoskúmaviek v objeme 0,75 ml v duplikátoch. Kultivácia prebehla pri optimálnej teplote 30 °C po dobu 22 hodín a trepaní pri 180 rpm.

Tabuľka 4 Zloženie inokulačného média pre *Azotobacter vinelandii*

| Látka | Hmotnosť [g] | Objem [ml] |
|---|--------------|------------|
| Glukóza | 20,0 | |
| Kvasinkový extrakt | 6,0 | |
| Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | 2,5 | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,6 | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,3 | |
| Destilovaná voda | | 1 000 |

3.2.2 Príprava produkčného média

Pre *Janthinobacterium lividum* CCM 1888 a CCM 160 bolo pripravené produkčné médium (Tabuľka 5). Produkčné médium o objeme 100 ml v Erlenmeyerovej banke o objeme 250 ml bolo pripravené pre dve paralelné stanovenia a bolo sterilizované 30 minút. Bakteriálne kultúry boli po preočkovaní do produkčného média pri laboratórnej teplote po dobu 72 a 120 hodín a trepaní pri 180 rpm. Vzorka kultivovaná 72 hodín bola označená ako A a po dobu 120 hodín bola označená A+.

Tabuľka 5 Zloženie produkčného média pre *Janthinobacterium lividum* CCM 1888 a CCM 160

| Látka | Hmotnosť [g] | Objem [ml] |
|---|--------------|------------|
| Glycerol | 10,0 | |
| Beef Extract Powder | 3,0 | |
| Peptone | 5,0 | |
| NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O | 5,72 | |
| Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | 11,3 | |
| Destilovaná voda | | 1 000 |

Pre *Cupriavidus necator* H16 bolo pripravené produkčné médium (Tabuľka 6) o objeme 100 ml v Erlenmeyerovej banke (250 ml) v dvoch paralelných opakovaníach. Produkčné médium bolo vysterilizované, pričom zásobné roztoky stopových prvkov MES a fruktózy boli

sterilizované samostatne a následne pridané do produkčných médií pred zaočkovaním bakteriálnych kultúr. Do sterilizovaných produkčných médií bolo zaočkovaných 5 obj. % bakteriálnej kultúry z inokula.

Tabuľka 6 Zloženie produkčného média pre *Cupriavidus necator* H16

| Látka | Hmotnosť [g] | Objem [ml] |
|--|--------------|------------|
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3,0 | |
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 11,1 | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,2 | |
| Destilovaná voda | | 1 000 |
| MES | 20 | |
| Fruktóza | 100 | |

Roztok MES je roztok stopových prvkov. V roztoku MES sa na 1 l nachádza: 9,7 g FeCl₃ · 6 H₂O, 7,8 g CaCl₂ · 2 H₂O, 0,156 g CuSO₄ · 5 H₂O, 0,119 g CoCl₂ · 6 H₂O, 0,118 g NiCl₂ · 6 H₂O, 0,1 g ZnSO₄ · 7 H₂O a 1 000 ml 0,1 M HCl.

Bakteriálne kultúry boli po preočkovaní do produkčného média temperované na 30 °C po dobu 72 hodín a trepaní pri 180 rpm.

Do predom sterilovaného produkčného média pre *Azotobacter vinelandii* (Tabuľka 7), bolo naočkovaných 5 obj. % kultúry z inokula pre kmeň DSM 85 a 10 obj. % pre kmeň DSM 720 v duplikátoch, keďže došlo k menšiemu nárastu kultúry. Kultivácia prebehla pri optimálnej teplote 30 °C po dobu 96 hodín a trepaní pri 180 rpm.

Tabuľka 7 Zloženie produkčného média pre *Azotobacter vinelandii*

| Látka | Hmotnosť [g] | Objem [ml] |
|---|--------------|------------|
| Glukóza | 20,0 | |
| Kvasinkový extrakt | 6,0 | |
| Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | 2,0 | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,6 | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,3 | |
| CaCO ₃ | 1,0 | |
| Destilovaná voda | | 1 000 |

Zásobný roztok glukózy bol sterilizovaný samostatne a pridaný dodatočne po sterilizácii a ochladiení na laboratórnu teplotu v sterilných podmienkach laminárneho boxu.

3.3 Použité metódy

3.3.1 Gravimetrické stanovenie biomasy a alginátu

Pre gravimetrické stanovenie biomasy kmeňov *Azotobacter vinelandii*, *Janthinobacterium lividum* a *Cupriavidus necator* H16 boli pripravené vzorky o objeme 10 ml v skúmavkách v duplikátoch. Vzorky boli následne centrifugované po dobu 5 minút pri 6 000 rpm. Po odstredení bol supernatant odliaty zo vzoriek a bol odložený pre stanovenie alginátu v prípade *Azotobacter vinelandii*, keďže sa jedná o extracelulárny produkt a pri ostatných kmeňoch bol zliaty. Zakoncentrovaná biomasa bolo premytá 5 ml destilovanej vody, votexovaná a následne

boli vzorky opätovne vložené do centrifúgy na 5 minút pri otáčkach 6 000 rpm. Po odliati prebytočnej vody boli vzorky vysušené v sušiarňi pri 70 °C do konštantnej hmotnosti.

Pre gravimetrické stanovenie alginátu vo vzorkách kmeňov *Azotobacter vinelandii* boli vzorky supernatantu vychladené v chladničke a následne boli zrážané vychladeným etanolom o dvojnásobnom množstve. Po vyzrážaní alginátu boli vzorky centrifugované 10 minút pri 6 000 rpm a teplote 4 °C. Následne bolo odliaty supernatant a zakoncentrovaný alginát bol zmiešaný s 3 ml destilovanej vody a 6 ml etanolu. Vzorky boli vortexované a následne opäť centrifugované 10 minút pri 6 000 rpm a teplote 4 °C. Následne boli vzorky zliate a sušené v sušiarňi pri 70 °C do konštantnej hmotnosti.

3.3.2 Spektrofotometrické stanovenie violaceínu

Pre stanovenie violaceínu bol upravený postup z výskumu zameraného na koprodukcii PHB a violaceínu publikovaného výskumným tímom *Kumar a kol.*[85]. Pre spektrofotometrické stanovenie violaceínu bolo stočených 5 ml kultúry pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Následne bol pipetou odobraný supernatant. Extrakcia prebehla resuspendovaním peliet v 5 ml metanolu a následným stočením na centrifúge pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Supernatant bol odobraný do čistej skúmavky. V prípade zafarbenia peliet na fialovo aj po extrakcii bol proces extrakcie opakovaný a bola zaznamenávaná spotreba metanolu. Odobrané frakcie boli zliate do jednej vzorky a premerané na spektrofotometri. Meranie bolo uskutočnené voči blanku – metanolu pri vlnovej dĺžke 570 nm. Z kalibračnej krivky bola následne vypočítaná koncentrácia violaceínu vo vzorkách *Janthinobacterium lividum* CCM 160.

3.3.3 Plynová chromatografia

Pri príprave vzoriek pre GC- FID (plynový chromatograf s plameňovo ionizačným detektorom) bolo potrebné previesť 3-hydroxyalkánové kyseliny vo vzorkách naštiepením na polyméry a následne metylestery, ktoré sú detekovateľné a udávajú kvantitatívnu aj kvalitatívnu informáciu o obsahu PHB vo vzorkách.

Samotná príprava vzoriek prebehla navážením vysušenej biomasy v rozmedzí 8 až 10 mg do krimpovacích vialiek na analytických váhach a následným pridaním 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnútorného štandardu (pozostáva z 15 % kyseliny sírovej v metanole s obsahom 5 g/l kyseliny benzoovej slúžiacej ako vnútorný štandard). Vzorky boli zakrimpované a vložené do termobloku temperovaného na 94 °C po dobu 3 hodín. Po skončení esterifikácie boli vzorky vybrané, vychladené na laboratórnu teplotu a následne boli zneutralizované prevedením do skrutkovacích vialiek obsahujúcich 500 µl NaOH roztoku o koncentrácií 50 mM a očistené od polutantov premiešaním a extrakciou do vodnej fáze. Po rozdelení fáz bolo odpipetovaných 50 µl zo spodnej chloroformovej fáze obsahujúcej metylestery 3-hydroxyalkánových kyselín do malých skúmaviek obsahujúcich 900 µl propan-2-olu. Takto pripravené vzorky boli analyzované na plynovom chromatografe.

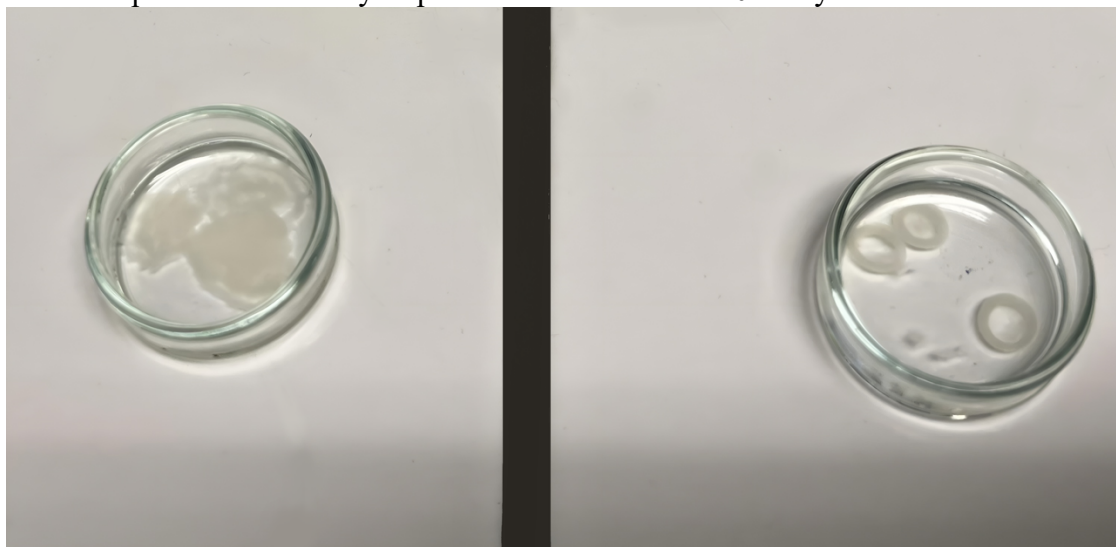
3.3.4 Ramanova spektroskopia

Meranie prebehlo na Ramanovom spektroskope Renishaw inVia. Pri všetkých vzorkách bol použitý červený laser o vlnovej dĺžke 785 nm v dôvodu najnižšieho fluorescenčného pozadia. Vzorky boli merané na CaF₂ skle, z dôvodu nižšieho fluorescenčného pozadia od skla. CaF₂ sklo slúžilo tiež na zníženie prejavu odrazeného od skla objektívu v nameraných spektrách pri nižšie koncentrovaných vzorkách. Spektrá boli merané využitím objektívu o zväčšení 20krát a 50krát. Rozsah pre všetky merania bol nastavený na 670 až 1770 cm⁻¹ a teda so stredom

v 1250 cm^{-1} . Následne boli vybrané spektrá s menším fluorescenčným pozadím pre jednotlivé kmene a vzorky. Príprava jednotlivých vzoriek pre meranie bola rôzna v závislosti od vlastností vzoriek.

3.3.4.1 Analýza *Azotobacter vinelandii*

Vzorky *Azotobacter vinelandii* boli kultivované v submerznej forme. Z dôvodu produkcie alginátu týmto kmeňom boli vzorky testované na schopnosť gélovatenia zmiešaním 2 ml kultúry a 3 ml 2 % CaCl_2 (Obrázok 16). Schopnosť tvoriť gél s vápenatými iónmi mali vzorky kultúr DSM 87, DSM 576 a DSM 13 521. Z týchto vzoriek bola odliata prebytočná voda. Takto pripravené vzorky gélu boli následne napipetované o objeme 2 μl a meranie bolo nastavené na 60 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané z 10 rôznych miest.



Obrázok 16 Príklad vzorky nevytvárajúcej gél (naľavo) a tvoriacej gél (napravo)

Tekuté vzorky všetkých kultúr *Azotobacter vinelandii* boli merané hneď po napipetovaní a meranie bolo nastavené na 120 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané z 5 rôznych miest. Následne po vysušení bolo meranie nastavené na 120 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané z 5 rôznych miest.

3.3.4.2 Analýza alginátu vo vzorkách *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii je kmeň produkujúci do extracelulárneho priestoru alginát, ktorého príprava pre meranie Ramanových spektier je uvedená v 3.3.1. Čistý vysušený alginát bol premiestnený na CaF_2 sklo, ktoré slúžilo na zníženie prejavu odrazeného od skla objektívu v nameraných spektrách, ktorého prejav by bol v prípade použitia skla príliš vysoký, keďže vzorky boli vo forme priesvitných tenkých šupiniek. Meranie bolo nastavené na 15 a 60 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané vždy z 5 rôznych miest. Pri 60 akumuláciách bol získaný signál vyšší.

3.3.4.3 Analýza polyfosfátov

Pri stanovení bakteriálnych fosfátov boli nakúpené komerčné polyfosfáty (hexametafosfát sodný a dekahydrát pyrofosforečnanu sodného). Meranie bolo nastavené na 15 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané vždy z 3 rôznych miest, keďže sa jednalo o čisté látky merania nebolo potrebné opakovať viackrát.

3.3.4.4 Analýza kmeňov *Janthinobacterium lividum* zo statickej kultivácie

Vzorky *Janthinobacterium lividum* CCM 160, CCM 1888 a CCM 3308 boli prvotne staticky kultivované na Petriho miskách pre overenie obsahu violaceínu a prejav v spektrách. Z toho dôvodu ich bolo potrebné previesť do 1 ml fosfátového tlmivého roztoku (PBS). Zloženie tlmivého roztoku na 1 000 ml bolo nasledovné: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g KH_2PO_4 a 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Z dôvodu nižšej koncentrácie vzoriek, bolo meranie vzoriek uskutočnené využitím červeného laseru po dobu 1 sekundy a 10 snímaní, aby nedošlo k spáleniu vzorky. Pri každej vzorke bolo meranie opakované 10krát.

3.3.4.5 Meranie bakteriálnych kultúr *Janthinobacterium lividum* a *Cupriavidus necator*

V ďalších meraniach boli použité vzorky *Janthinobacterium lividum* CCM 1888 a CCM 160 zo submerznej kultivácie a kultúry *Cupriavidus necator* H16. Tekuté vzorky všetkých kultúr boli napipetované o objeme 2 μl a merané hneď po napipetovaní v kvapalnej forme a následne po vysušení.

Meranie pre vzorky *Janthinobacterium lividum* CCM 1888 bolo nastavené na 60 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané vždy z 20 rôznych miest pri použití objektívu so zväčšením 50krát. Pri zväčšení 20krát bolo meranie nastavené na 15 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané vždy z 10 rôznych miest.

Meranie pre vzorky *Janthinobacterium lividum* CCM 160 kultivovanej submerzne s rozdielnou dobou kultivácie o 48 hodín bolo nastavené na 120 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané vždy z 10 rôznych miest pri použití objektívu so zväčšením 50krát.

Meranie pre vzorky *Cupriavidus necator* H16 bolo nastavené na 60 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané vždy z 20 rôznych miest pri použití objektívu so zväčšením 50krát. Pri zväčšení 20krát bolo meranie nastavené na 60 akumulácií po dobu 1 sekundy a spektrá boli namerané vždy z 6 rôznych miest.

Meranie spektier, ktoré slúžili na výber potencionálneho triediaceho parametra pre ďalšie merania s optickou pinzetou boli realizované pomocou objektívu so zväčšením 50krát a teda vyšším NA kvôli lepšej simulácii experimentu s optickou pinzetou, kedy sú vzorky merané s lepším rozlíšením v menšom objeme vzorky.

3.3.5 Ramanova spektroskopia v kombinácií s optickou pinzetou

Metóda bola zvolená na základe predpokladu oddeliteľnosti podľa zvoleného triediaceho parametra v prípade vzoriek *Azotobacter vinelandii* bol predpoklad oddeliteľnosti na obsah PHB, keďže bol na základe predchádzajúcich meraní vybraný kmeň s najvyšším a najnižším obsahom PHB. Druhá časť merania sa zmeriavala na možnosť oddeliteľnosti buniek na základe vhodne zvoleného triediaceho parametra obsahujúcich violaceín (*Janthinobacterium lividum* CCM 160) od buniek bez violaceínu (*Cupriavidus necator* H16).

Na triedenie boli pripravené vzorky *Azotobacter vinelandii* DSM 85 a DSM 720, ktoré boli po kultivácii napipetované o objeme 1 ml do 0,5 ml 30 % glycerolu do kryoskúmaviek a vzorky boli zamrazené. Rovnako boli pripravené vzorky na triedenie *Janthinobacterium lividum* CCM 160 (A+) a *Cupriavidus necator* H16.

Na prvotné meranie boli vzorky centrifugované 5 minút pri otáčkach 4 000 rpm pre odstránenie média s glycerolom. Zahustené vzorky boli napipetované do mikroskopu medzi podložné sklo a krycie sklo. Namerané boli samostatné kultúry *Janthinobacterium lividum*

CCM 160 a *Cupriavidus necator* H16 a ich zmesná kultúra, avšak pozadie od skla prejavujúce sa v nameraných spektrách bolo príliš vysoké.

Meranie pigmentovaných a nepigmentovaných kultúr bolo opakované po zmene za CaF₂ sklo, kde do predpripravenej cely (Obrázok 17) bola napipetovaná vzorka baktérií samostatne a následne zmesnej kultúry bez odstránenia glycerolu pomocou centrifúgy. Pre odstránenie glycerolu z bakteriálneho spektra boli namerané samotné spektrá 10 % glycerolu, ktoré boli následne odčítané od nameraných bakteriálnych spektier.

Meranie samostatných vzoriek *Azotobacter vinelandii* DSM 85, DSM 720 a zmesi bolo nastavené na 30 akumulácií po dobu 1 sekundy (celé meranie trvalo 15 minút). Rovnaké nastavenie bolo použité aj pri vzorkách *Janthinobacterium lividum* CCM 160 (A+) a *Cupriavidus necator* H16.



Obrázok 17 Vzorka kvapnutá na podložné sklo pred priložením krycieho skla

4 VÝSLEDKY MERANÍ A DISKUSIA

4.1 Vyhodnotenie gravimetrického stanovenia

Gravimetricky bol stanovený obsah biomasy a alginátu piatich kmeňov *Azotobacter vinelandii*. Z výsledkov je možné konštatovať, že schopnosť tvoriť gél nezávisí len na kvantite alginátu, alebo aj na jeho zložení, keďže najmenšia produkcia alginátu $0,3 \pm 0,1$ mg/ml bola stanovená vo vzorke kmeňu DSM 13 529, ktorá tvorila gél po pridaní vápenatých iónov. Na rozdiel od vzorky DSM 720, ktorá mala trojnásobne vyšší obsah alginátu a netvorila gél. Testy gélovania boli súčasťou prípravy vzoriek v kapitole 3.3.1. (Obrázok 16)

Pre meranie boli zvolené rôzne kmene *Azotobacter vinelandii* z dôvodu širšieho rozmedzia produkcie polyhydroxyalkanoátov, extracelulárneho sacharidu rôzneho zloženia a s tým súvisiacimi rôznymi typmi gélovania v závislosti na kvantite a kvalite alginátu. Najviac biomasy obsahoval kmeň DSM 87 ($9,5 \pm 0,1$ g/l) a naopak najmenej kmeň DSM 720 ($4,2 \pm 0,3$ g/l).

Pri stanovení alginátu vzorkou s najväčšou produkciou extracelulárneho polysacharidu bol kmeň DSM 87 o priemernej koncentrácii alginátu $2,1 \pm 0,8$ mg/ml. Z výsledkov je možné konštatovať, že schopnosť tvoriť gél nezávisí len na kvantite alginátu, alebo aj na jeho zložení, keďže najmenšia produkcia alginátu $0,3 \pm 0,1$ mg/ml bola stanovená vo vzorke kmeňu DSM 13 529, ktorá tvorila gél po pridaní vápenatých iónov. Na rozdiel od vzorky DSM 720, ktorá mala trojnásobne vyšší obsah alginátu a netvorila gél. Testy gélovania boli súčasťou prípravy vzoriek v kapitole 3.3.4.

Tabuľka 8 Gravimetrické stanovenie biomasy a alginátu kmeňov *Azotobacter vinelandii*

| Bakteriálny kmeň | Priemerná koncentrácia biomasy [g/l] | Odchýlka [g/l] | Priemerná koncentrácia alginátu [mg/ml] | Odchýlka [mg/ml] |
|------------------|--------------------------------------|----------------|---|------------------|
| DSM 720 | 4,2 | $\pm 0,3$ | 1,1 | $\pm 0,2$ |
| DSM 13 529 | 8,7 | $\pm 0,2$ | 0,3 | $\pm 0,1$ |
| DSM 85 | 7,4 | $\pm 1,3$ | 0,5 | $\pm 0,3$ |
| DSM 87 | 9,5 | $\pm 0,1$ | 2,1 | $\pm 0,8$ |
| DSM 576 | 9,6 | $\pm 0,4$ | 2,1 | $\pm 0,1$ |

Následne bol stanovený obsah biomasy gravimetricky vo vzorkách vybraných pre ďalšie meranie na Ramanovskej pinzete (Tabuľka 9). Rôzna koncentrácia biomasy vzoriek bola spôsobená rozličnosťou bakteriálnych druhov, rozličnými podmienky kultivácie (otáčkami, popr. teplotou) a súčasne rôzne zvolených kultivačných médiami. Tie boli optimalizované v prípade *Janthinobacterium lividum* CCM 160 tak, aby dochádzalo ku tvorbe violaceínu, v dôsledku čoho sa biomasa pohybuje v rozmedzí ± 2 g/l. V prípade kultivácie *Cupriavidus necator* H16 bolo použité optimálne médium pre tvorbu biomasy a PHB, čím bola dosiahnutá výrazne vyššia priemerná koncentrácia biomasy.

Tabuľka 9 Gravimetrické stanovenie biomasy

| Bakteriálny kmeň | Priemerná koncentrácia biomasy [g/l] | Odchýlka [g/l] |
|--|--------------------------------------|----------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> H16 | 7,57 | ± 0,04 |
| <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 A | 1,76 | ± 0,08 |
| <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 A+ | 1,92 | ± 0,01 |

4.2 Vyhodnotenie stanovenia violaceínu

Spektrofotometrické stanovenie violaceínu slúžilo ako porovnávacia metóda ku Ramanovej spektroskopii. Namerané absorbancie vzoriek boli dosadené do kalibračnej rovnice $A=0,0734 \cdot c$ (ziskanej rozpustením známeho množstva violaceínu v methanole) [85], z ktorej boli získané výsledné koncentrácie violaceínu vo vzorkách *Janthinobacterium lividum* CCM 160 kultivovaných 72 (vzorka A) a 120 (vzorka A+) hodín. Obsah violaceínu spektrofotometrickým stanovením bol preukázaný v oboch vzorkách, avšak vyšší obsah bol dosiahnutý po dlhšej kultivácii vo vzorke A+ (Tabuľka 10) a to takmer sedemnásobne. Výrazne vyššia pigmentácia vzoriek je viditeľná na obrázku (Obrázok 18).

Tabuľka 10 Koncentrácie violaceínu v jednotlivých vzorkách

| <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 | Absorbancia [-] | Priemerná koncentrácia violaceínu [mg/l] | Odchýlka [mg/l] |
|---|-----------------|--|-----------------|
| A | 0,16 | 1,1 | 0,1 |
| A+ | 1,07 | 7,3 | 0,3 |



Obrázok 18 Vzorky *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A (eppendorfka naľavo), A+ (eppendorfka napravo)

4.3 Vyhodnotenie plynovej chromatografie

Výsledkom plynovej chromatografie bolo stanovenie koncentrácie 3-hydroxybutyrátu v kmeňoch *Azotobacter vinelandii*, ktorá bola vypočítaná z kalibračnej rovnice závislosti vynesenej na nameraných pomeroch plôch pík analytu (3-hydroxybutyrát) a inertného štandardu (kyselina benzoová) na koncentrácií analytu (čistý 3-hydroxybutyrát).

Prehľad výsledkov uvádza *Tabuľka 11*. Najvyšší obsah 3-hydroxybutyrátu vyprodukoval kmeň DSM 720, ktorý obsahoval $32,6 \pm 7,4$ %. Naopak najmenšie percento PHB obsahoval kmeň DSM 85 a to $2,6 \pm 1,7$ %.

Tabuľka 11 Obsah PHB u kmeňov *Azotobacter vinelandii*

| Bakteriálny kmeň | PHB v biomase [%] | Odchýlka [%] |
|------------------|-------------------|--------------|
| DSM 720 | 32,6 | $\pm 7,4$ |
| DSM 13 529 | 16,2 | $\pm 6,0$ |
| DSM 87 | 19,3 | $\pm 2,2$ |
| DSM 576 | 14,0 | $\pm 0,8$ |
| DSM 85 | 2,6 | $\pm 1,7$ |

Janthinobacterium lividum CCM 160 je súčasne producentom violaceínu aj PHB. Z výsledkov vyplýva, že kmeň obsahoval v nezávislosti na dĺžke kultivácie príbuzné množstvo PHB a to priemerne $23,8 \pm 4,5$ %. V jednotlivých vzorkách bol vyšší obsah PHB pri kratšom čase kultivácie vo vzorke *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A (72 hodín) s obsahom $24,4 \pm 1,6$ %.

Tabuľka 12 uvádza výsledky plynovej chromatografie a potvrdzuje, že *Cupriavidus necator* H16 je producentom PHB. Rovnako uvádza obsah PHB v bunkách *Janthinobacterium lividum* CCM 160, ktoré sú nie len producentom violaceínu, ale aj producentom PHB. Z výsledkov vyplýva, že kmeň obsahoval v závislosti na dĺžke kultivácie podobné množstvo PHB a to priemerne $23,8 \pm 4,5$ %. V jednotlivých vzorkách bol vyšší obsah PHB pri kratšom čase kultivácie vo vzorke *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A a to 72 hodín s obsahom $24,4 \pm 2$ %.

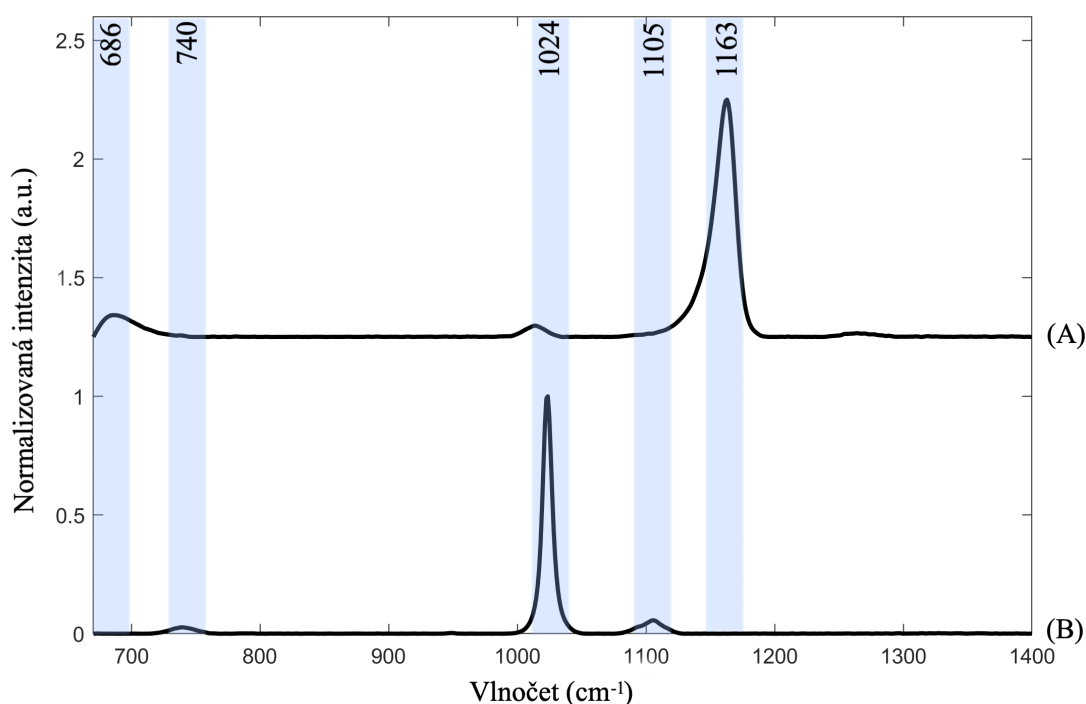
Tabuľka 12 Obsah PHB u vybraných kmeňov

| Bakteriálny kmeň | PHB v biomase [%] | Odchýlka [%] |
|---|-------------------|--------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> H16 | 62,4 | $\pm 31,3$ |
| <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 A | 24,4 | $\pm 1,6$ |
| <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 A+ | 23,5 | $\pm 5,4$ |
| <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 celkovo | 23,8 | $\pm 4,5$ |

4.4 Vyhodnotenie Ramanovej spektroskopie

Jednotlivé výsledné Ramanovské spektrá prezentované v práci sú výsledkom získania priemeru z nameraných spektier pre jednotlivé vzorky po aplikácií viacerých úprav. Namerané dáta boli upravené vyhladením spektier pomocou Savitzky-Golay algoritmu, ktorý bol nastavený na stupeň polynómu 2 a veľkosť segmentu 7. Následne bolo zo spektra odstránené fluorescenčné pozadie pomocou RCF (Rolling circle filter), kde bol nastavený rádius na 100 px (približne 100 cm^{-1}) a opakovanie 20krát. Následne boli spektrá normalizované na najvyšší pík z dôvodu prehľadnosti. Po prevedení úprav boli vybrané vhodné markery pre triedenie (*Tabuľka 19*, *Tabuľka 20*). Namerané spektrá, ktoré sa výrazne líšili od väčšiny nameraných spektier (tzv. *outliers*), boli vyradené z analýzy. Jednalo sa o príliš zašumené spektrá, ktoré vznikli v dôsledku nízkej koncentrácie meranej vzorky.

Namerané spektrálne pozície Ramanovských pásov čistých polyfosfátov (Obrázok 19) slúžili pre identifikáciu v spektre (Tabuľka 13) a ďalej budú slúžiť pre identifikáciu v bakteriálnych spektrách.



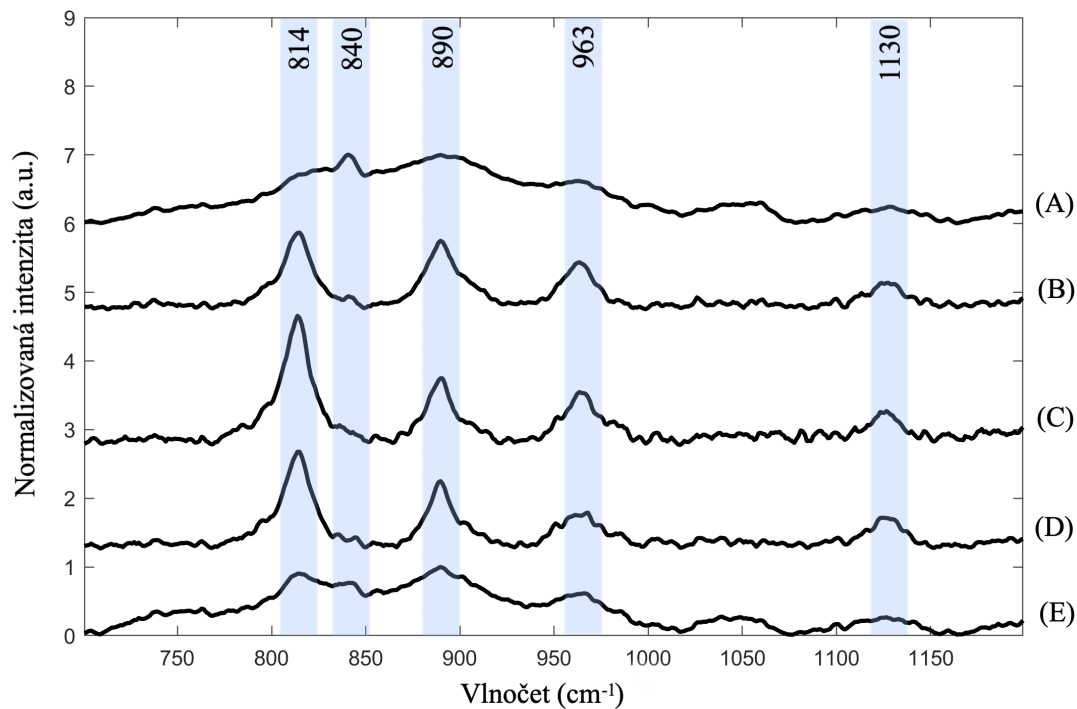
Obrázok 19 Ramanové spektrum hexametafosfátu sodného (A) a dekahydrát pyrofosforečnanu sodného (B)

Tabuľka 13 Prehľad spektrálnych pozícií čistých polyfosfátov slúžiacich ako zrovnávací štandard [61]

| pozícia Ramanovskej signatúry polyfosfátov [cm ⁻¹] | | priradenie pásiem v spektrách |
|--|-------------------------------------|--|
| hexametafosfát sodný | dekahydrát pyrofosforečnanu sodného | |
| 686 | | P-O-P v fosfát esterovej väzby |
| | 740 | v PO ₂ ⁻ a P-O-P |
| 1 024 | 1 024 | v PO ₂ ⁻ a P-O-P |
| | 1 105 | |
| 1 163 | | v PO ₂ ⁻ |

Legenda: ν označuje vibračné pohyby súmerne okolo rovnovážnej polohy, nazývané *stretching* (napínanie). δ označuje vibračné pohyby, kde sa atómy pohybujú v rovine okolo rovnovážnej polohy, nazývané *deformácia*.

Christ a kol. identifikovali píky príslušné pre polyfosfáty v živých organizmoch, ktoré boli identifikované tiež vo vyššie nameraných spektrách (Obrázok 19). V spektre dekahydrátu pyrofosforečnanu sodného bol navyše prejav v spektre na pozícií 1 105 cm⁻¹ [61].



Obrázok 20 Ramanovské spektrum alginátov získaných z kmeňov *Azotobacter vinelandii* DSM 85 (A), DSM 87 (B), DSM 576 (C), DSM 720 (D), DSM 13 529 (E) s vyznačenými pozíciami Ramanových signatúr dôležitých pri identifikácii alginátov a charakteru zloženia blokov alginátov

Tabuľka 14 Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovskej signatúry a ku nej priradených pásiem v Ramanových spektrách pre algináty získané z rôznych kmeňov *Azotobacter vinelandii* [81, 85]

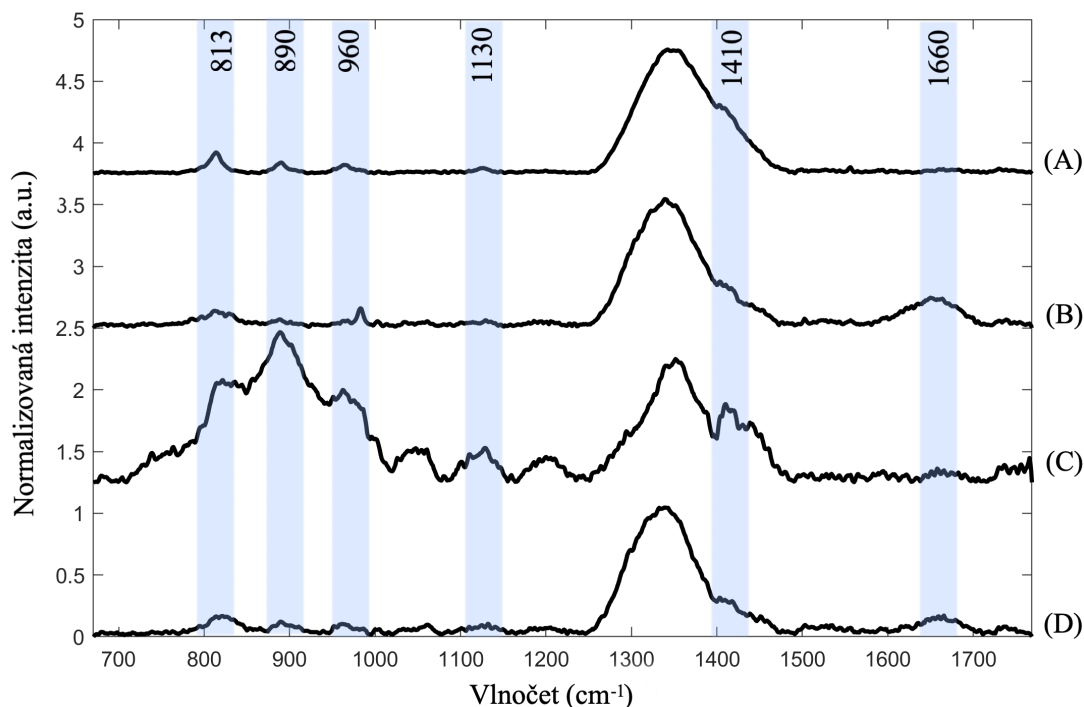
| pozícia Ramanovskej signatúry alginátov z <i>Azotobacter vinelandii</i> [cm ⁻¹] | | | | | priradenie pásiem v Ramanovských spektrách |
|--|---------------|----------------|----------------|------------------|---|
| DSM 85 (A) | DSM 87 (B) | DSM 576 (C) | DSM 720 (D) | DSM 13529 (E) | |
| | 814 | 814 | 814 | 814 | C–O–H, skeletal (ν C–C, ν C–O, δ C–C–H, δ C–C–O) |
| 840 | | | | 840 | režim ohybu C–C–O |
| | 890 | 890 | 890 | 890 | ν C–C–H, δ C–O–H, ν sym C–O–C (1,4 glykozidová väzba) |
| | 963 | 963 | 963 | 963 | GG δ C–C–H, δ C–OH. |
| | 1 130 | 1 130 | 1 130 | 1 130 | MG dýchací režim glykozidického kruhu |

Legenda: ν označuje vibračné pohyby súmerne okolo rovnovážnej polohy, nazývané *stretching* (napínanie). δ označuje vibračné pohyby, kde sa atómy pohybujú v rovine okolo rovnovážnej polohy, nazývané *deformácia*.

Tabuľka 14 prehľadne zhŕňa všetky analyzované píky patriace monomérnym jednotkám kyseliny alginovej v algináte extrahovanom zo supernatantu kmeňov *Azotobacter vinelandii* avšak namerané spektrá (Obrázok 20) boli zašumené z dôvodu tenkej vrstvy vzorky fluorescenciou, keďže priemerná koncentrácia alginátu vo vzorkách sa pohybovala do 2,1 % (Tabuľka 8). Z analýzy Ramanových spektier čistého alginátu vyplýva, že sa pravdepodobne

jednalo o heteropolymérne frakcie alginátu, ktoré sú častejšie. Keďže v spektrách boli pozíciám píkov priradené píky príslušné aj pre homopolymérne bloky aj pre heteropolymérne bloky súčasne. Vplyv na meranie môže mať aj rozklad analytu v dôsledku zahrievania laserom.

V štúdií *Campos-Vallette a kol.* zameranej na rozlíšenie monomérnych jednotiek alginátov bolo identifikovaných viac spektrálnych pozícií, z dôvodu vyššej citlivosti povrchovo zosilnenej Ramanovej spektroskopie (SERS) [81].



Obrázok 21 Ramanovské spektrum *Azotobacter vinelandii* DSM 576 v rôznych formách: extrahovaný alginát (A), kvapka (B), vysušená vzorka (C) a gél (D)

Pre všetky merané bakteriálne kmene boli merané vzorky v kvapalnej (B) a vysušenej podobe (C), pre zisk čo najčistejšieho spektra bez šumu. Vzorky *A. vinelandii* boli navyše merané vo forme gélu, pokiaľ ho tvorili s vápenatými iónmi (D). Z každého kmeňa bol extrahovaný čistý alginát, ktorý bol následne rovnako analyzovaný (A) (Tabuľka 15).

Tabuľka 15 Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovskej signatúry a ku nej priradených pásiem v bakteriálnych Ramanových spektrách pre *Azotobacter vinelandii* DSM 576 a ich prejav vo všetkých meraných formách [79, 80, 81]

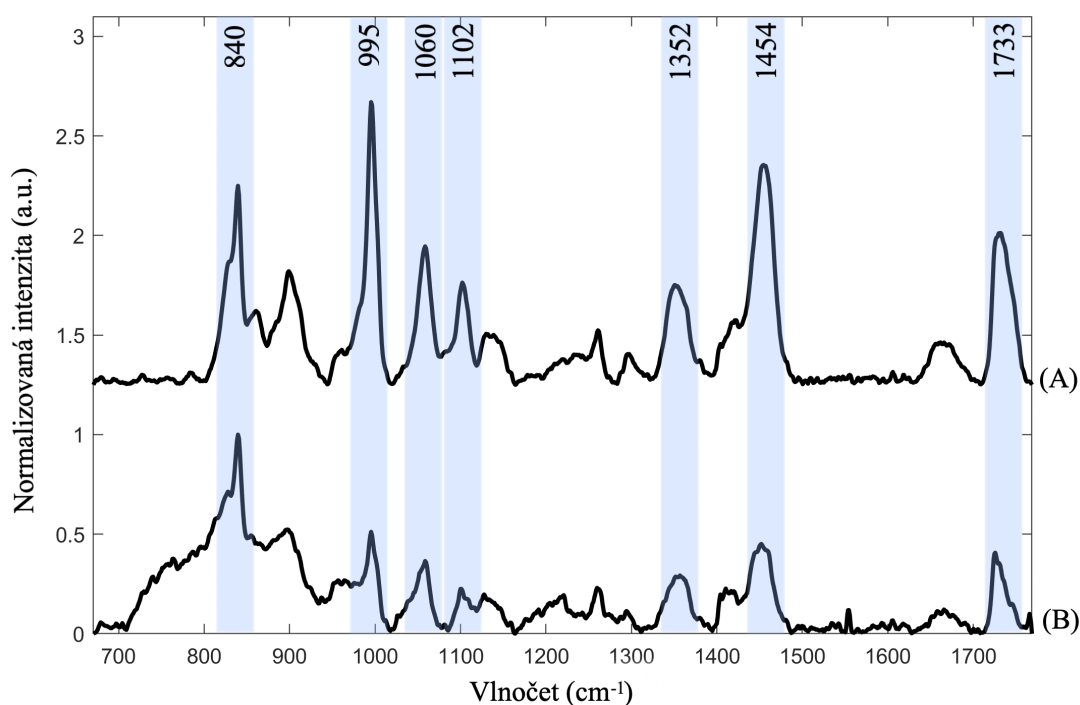
| pozícia Ramanovskej signatúry <i>Azotobacter vinelandii</i> DSM 576 [cm ⁻¹] | | | | priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanovských spektrách |
|--|---------------|---------------------------|------------|--|
| Alginát (A) | Kvapka (B) | Uschnutá kvapka (C) | Gél (D) | |
| | | 738 | | Polyfosfát (v PO ₂ - a P-O-P) |
| 813 | | 813 | 813 | C-O-H, skeletal (v C-C, v C-O, δ C-C-H, δ C-C-O) |
| 890 | 890 | 890 | 890 | GG monomérne jednotky alginátu |

| | | | |
|-------|-------|-------|--|
| | 925 | | GG monomérne jednotky alginátu |
| 960 | 960 | 960 | δ C–C–H, δ C–OH. |
| | | | MG |
| 1 060 | 1 054 | 1 060 | PHB, HB |
| 1 130 | 1 130 | 1 130 | dýchací režim glykozidického kruhu |
| | 1 410 | | COO ⁻ |
| 1 660 | 1 666 | 1 660 | amid I |

Legenda: ν označuje vibračné pohyby súmerne okolo rovnovážnej polohy, nazývané *stretching* (napínanie). δ označuje vibračné pohyby, kde sa atómy pohybujú v rovine okolo rovnovážnej polohy, nazývané *deformácia*.

Vo všetkých vzorkách bol pozorovaný prejav glukózy z produkčného média a to na pozíciách okolo 1 030, 1 130 na 1 350 cm^{-1} [87]. Navyše prejav v oblasti 1 340 cm^{-1} nie je možné identifikovať ako pík, keďže sa jedná o zvyšnú fluorescenciu skla. Prejav v pozícií 1 130 cm^{-1} je prejavom dýchacieho režimu glykozidického kruhu, ktorý je prítomný aj v štruktúre kyseliny alginovej, čiže prejav v píku môže byť súčasne prejavom oboch látok. Zároveň pri identifikácii polyfosfátu vo vzorkách bol viditeľnejší a identifikovaný menší z píkov nameraných vyššie, keďže vyšší z píkov sa nachádza v oblasti prejavu viacerých látok a obsah polyfosfátov v bunkách je nízky (desiatky až stovky mikromólov na gram biomasy). Pre presnejšie vyhodnotenie by bolo vhodné použiť dekonvolúciu spektier využívajúcu rôzne matematické nástroje a algoritmy. Z nameraných spektier vyplýva, že vysušené vzorky mali najčistejší Ramanov signál a teda je možné v ňom pozorovať prejav najväčšieho množstva látok (polyfosfáty, algináty, polyhydroxybutyrát, amidy,...).

Namerané spektrá *Cupriavidus necator* H16 vykazujú vysokú odozvu na obsah polyhydroxybutyrátu (PHB), čo zodpovedá dátam nameraným plynovou chromatografiou (4.3).



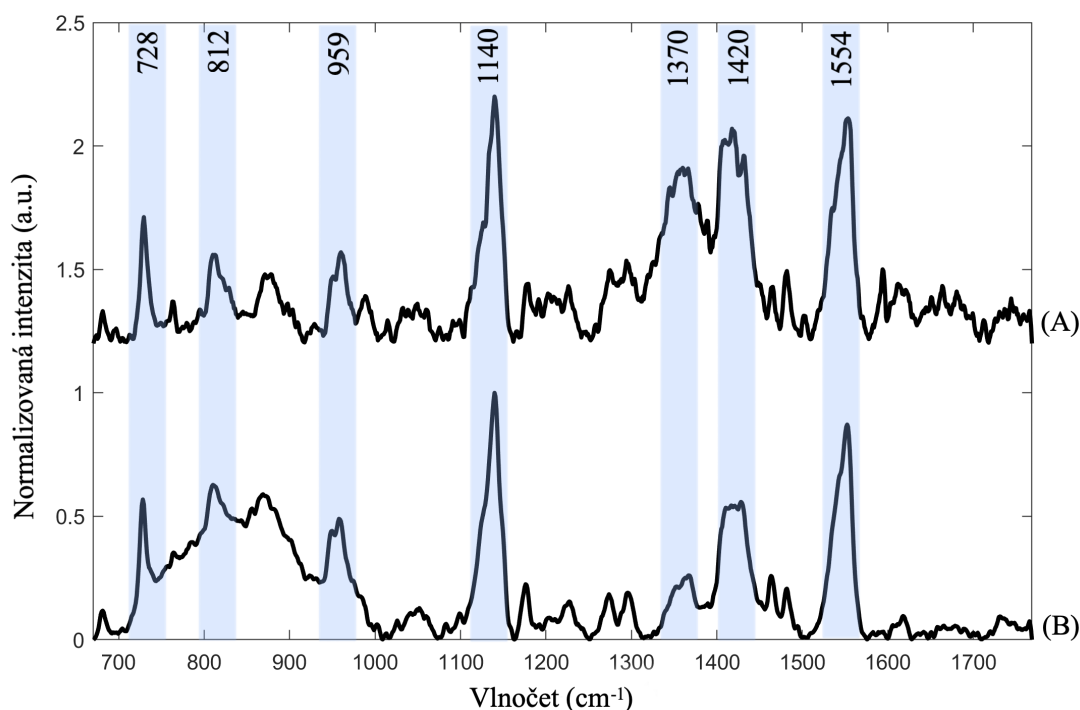
Obrázok 22 Priemerné Ramanovské spektrá *Cupriavidus necator* H16, v ktorom sú vyznačené pásy príslušné pre prejav PHB. Označenie (A) má vysušená vzorka, (B) je vzorka meraná ako kvapka.

Namerané spektrum (A) je zo suchej vzorky a (B) je kvapka rovnakej vzorky. Na spektrách je pozorovateľný rozdiel po odčítaní pozadia. Vo vzorke (B) (Obrázok 22) je vyšší prejav šumu, ktorý nebol odstránený pri úpravách spektier, prevažne v oblasti od 700 do 1 000 cm^{-1} . Keďže použitím parametrov nastavených na menší priemer rotujúceho kruhu pri RCF by došlo k odstráneniu píkov a teda znemožneniu identifikácie.

Tabuľka 16 Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovej signatúry a ku nej priradenie pásiem v Ramanových spektrách pre vzorku *Cupriavidus necator* H16 [80]

| pozícia Ramanovskej signatúry <i>Cupriavidus necator</i> H16 [cm^{-1}] | priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanovských spektrách |
|---|---|
| 840 | kryšt. marker, Tyr, PHB , HB |
| 899 | v (COC), HB, PHB |
| 995 | HB |
| 1 060 | PHB , HB |
| 1 102 | PHB , HB, $\nu(>\text{PO}_2^-)$ sym |
| 1 142 | $\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C-C})$ |
| 1 352 | PHB |
| 1 450 | CH_2 deformácia, lipidy, v ktorých je prejav PHA napr. PHB , HB |
| 1 667 | amid I |
| 1 733 | PHA |

Legenda: ν označuje vibračné pohyby súmerne okolo rovnovážnej polohy, nazývané *stretching* (napínanie). δ označuje vibračné pohyby, kde sa atómy pohybujú v rovine okolo rovnovážnej polohy, nazývané *deformácia*.



Obrázok 23 Priemerné Ramanovské spektrá *Janthinobacterium lividum* 160 A+, v ktorom sú vyznačené pásy príslušné pre prejav violaceínu a ostatných identifikovaných látok (Tabuľka 17). Označenie (A) je vysušená vzorka, (B) je kvapka.

Rovnako ako bolo uvedené v prípade *Cupriavidus necator* H16 jedná sa o namerané vzorky v kvapalnej forme a po uschnutí. V prípade vzorky (B) opätovne došlo k skresleniu spektra

z dôvodu neúplného odčítania pozadia. V rámci merania práce bola meraná aj vzorka *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A kultivovaná 72 hodín. V tomto spektre nebol pozorovaný prejav violaceínu.

Tabuľka 17 Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovej signatúry a ku nej priradenie pásiem v Ramanových spektrách pre vzorku *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A+ [82].

| pozícia Ramanovskej signatúry <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 A+ [cm ⁻¹] | priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanovských spektrách |
|---|---|
| 728 | violaceín aromatický kruh C-C CCC väzby |
| 812 | violaceín |
| 959 | violaceín |
| 1 140 | violaceín C-C napínanie |
| 1 370 | violaceín CNC napínanie |
| 1 420 | violaceín CNC napínanie |
| 1 554 | violaceín C=C jednotka v diketoalkene |

Legenda: v označuje vibračné pohyby súmerne okolo rovnovážnej polohy, nazývané *stretching* (napínanie).

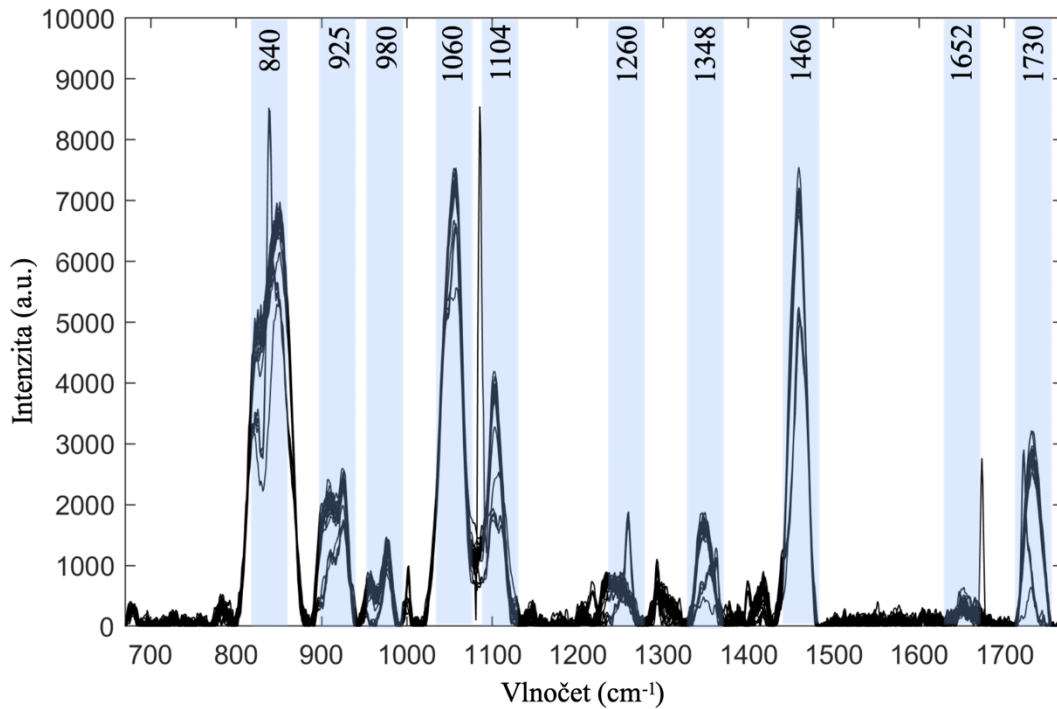
Tabuľka 17 prehľadne uvádza identifikované prejavy violaceínu vo vzorke *Janthinobacterium lividum* CCM 160 kultivovanej 120 hodín, ktorá preukázateľne obsahovala violaceín v nameraných spektrách vo vyššom množstve vzhľadom na vyšší signál v spektrách, ktorý v spektrách s kratšou dobou kultivácie nebol pozorovaný. Spektrofotometricky získané informácie o obsahu violaceínu vo vzorkách zodpovedajú výsledkom z Ramanovej spektroskopie (4.2.).

Prejav polyhydroxyalkanoátov nebol identifikovaný v spektre *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A+. Výsledky plynovej chromatografie však ukazujú, že obsah PHB bol v závislosti na čase kultivácie takmer nemenný (4.3). Rozdiel medzi metódami je spôsobený vysokým obsahom violaceínu a jeho prejavu v spektrách, ktorý má násobne vyššie intenzity ako prejav PHB a teda prejav PHB sa zdá v spektrách nižší. Rovnako má vplyv na výsledné spektrum aj normalizácia spektier (v tomto prípade na najvyšší pík spektra), v závislosti na ktorej sa pomery píkov môžu meniť. V prípade kvalitatívnej analýzy dochádza k nižšej/vyššej viditeľnosti niektorých píkov, avšak v prípade kvantitatívnej analýzy nie je takéto vyhodnocovanie nameraných dát vhodné.

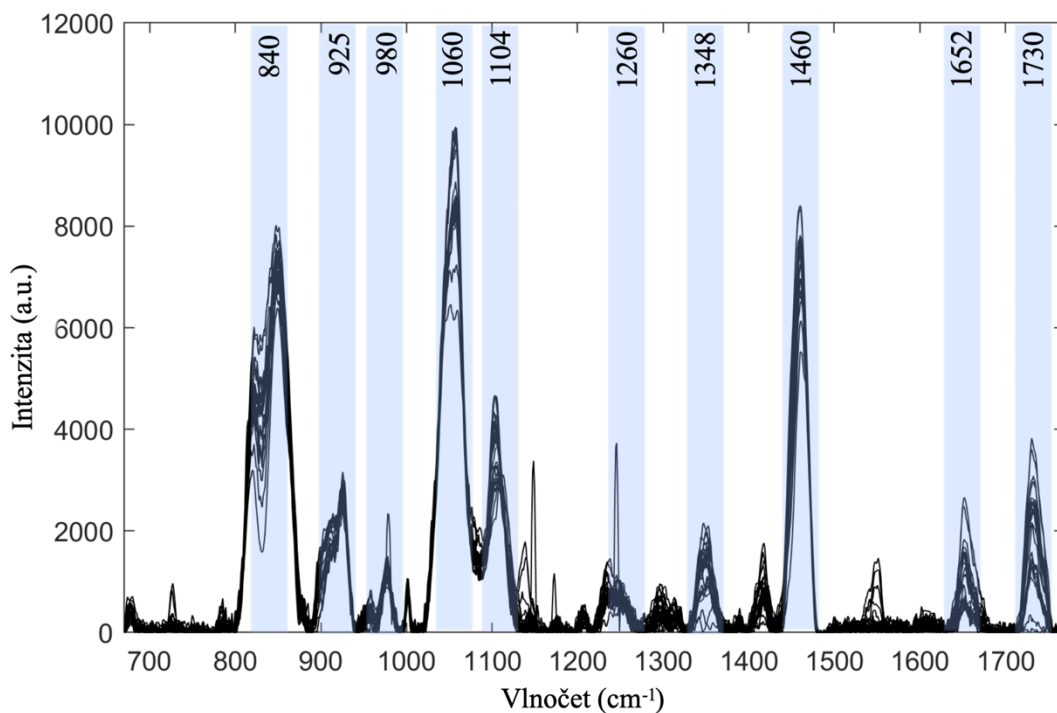
Z vyhodnotenia nameraných spektier *Cupriavidus necator* H16 (Tabuľka 16) a *Janthinobacterium lividum* CCM 160 (Tabuľka 17) predpokladáme ich oddeliteľnosť pomocou Ramanovskej pinzety podľa triediaceho parametra príslušného pre violaceín a to 1 140 a 1 554 cm⁻¹.

4.5 Vyhodnotenie Ramanovej spektroskopie v kombinácií s optickou pinzetou

Vyhodnotenie nameraných spektier Ramanovskou pinzetou spočívalo v spracovaní nameraných spektier, čo zahŕňa odstránenie šumu, prípadne normalizáciu intenzít a iné úpravy (4.4). Nasleduje identifikácia píkov, ktoré sú charakteristické pre vibrácie molekúl v zmesi buniek. Identifikácia píkov je dôležitá pri určovaní zloženia buniek a prebieha porovnaním nameraného spektra s referenčnými spektrami známych látok (Tabuľka 16, Tabuľka 17, Tabuľka 18). Posledným krokom bola štatistická analýza a teda konkrétne analýza hlavných komponentov, ktorá poskytuje informácie o variabilite zloženia buniek v zmesi a ich distribúcií (4.5.1).



Obrázok 24 Namerané Ramanovské spektrá *Azotobacter vinelandii* DSM 85 s vyznačenými identifikovanými pásmi (Tabuľka 18)



Obrázok 25 Namerané Ramanovské spektrá *Azotobacter vinelandii* DSM 720 s vyznačenými identifikovanými pásmi (Tabuľka 18)

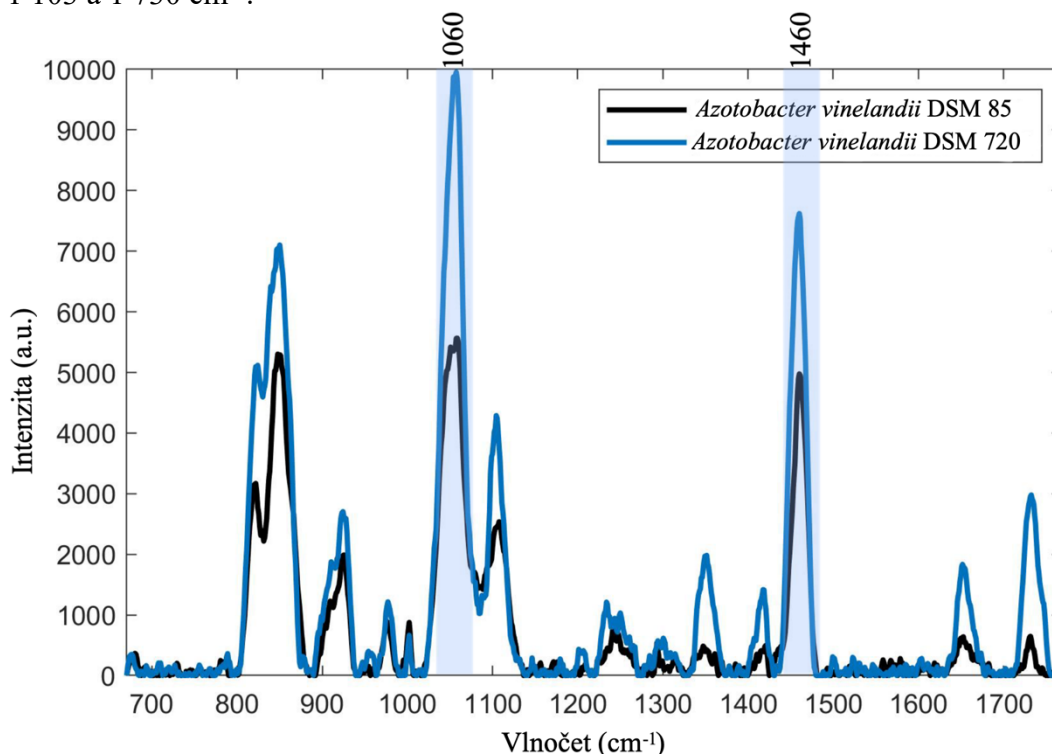
Spektrá *Azotobacter vinelandii* DSM 85 (Obrázok 24) a DSM 720 (Obrázok 25) boli spracované a následne identifikované vibrácie prejavujúce sa podľa pozície pík (Tabuľka 18). Uvedené spektrá neboli priemerované, pre lepšie zobrazenie variability jednotlivito nameraných spektrier, ktoré boli následne spracované pomocou analýzy hlavných komponentov.

Tabuľka 18 Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovej signatúry a ku nej priradenie pásiem v Ramanových spektrách pre vzorky *Azotobacter vinelandii* DSM 85 a DSM 720 [79, 80, 81]

| pozícia Ramanovskej signatúry <i>Azotobacter vinelandii</i> [cm ⁻¹] | | priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanovských spektrách |
|--|-----------|--|
| DSM 85 | DSM 720 | |
| 830 + 851 | 820 + 851 | tyrosinový dublet |
| 840 | 840 | kryšt. marker, PHB , HB a tyrosin |
| 925 | 925 | GG monoméne jednotky alginátu |
| 980 | 980 | fenylalanín- naťahovanie väzby C-N |
| 1 060 | 1 060 | PHB , HB |
| 1 103 | 1 104 | PHB , HB, $\nu(>PO_2^-)$ sym |
| 1 260 | | C-H v algináte |
| 1 347 | 1 348 | amid III |
| 1 459 | 1 459 | CH ₂ deformácia, lipidy, v ktorých je prejav PHA napr. PHB , HB |
| 1 653 | 1 652 | amid I |
| 1 730 | 1 730 | PHA |

Legenda: ν označuje vibračné pohyby súmerne okolo rovnovážnej polohy, nazývané *stretching* (napínanie).

Z vyhodnotených nameraných Ramanovských spektier vyplýva, že oba kmene *Azotobacter vinelandii* DSM 85 a DSM 720 obsahovali PHB. Vyššia odozva pre PHB bola nameraná pri kmeni *Azotobacter vinelandii* DSM 720, čo zodpovedá výsledkom z plynovej chromatografie (Tabuľka 11). Rozdiel pre odozvu PHB je najviac pozorovateľný v spektrách na píkoch 1 060, 1 460 cm⁻¹, ktoré sú vyznačené v grafe (Obrázok 26). Pre lepšie zobrazenie rozdielu intenzít jednotlivých pík, bolo vybrané reprezentatívne spektrum z jednotlivých kmeňov. Pozorovateľný rozdiel je tiež na identifikovaných píkoch príslušných pre PHB na 1 103 a 1 730 cm⁻¹.



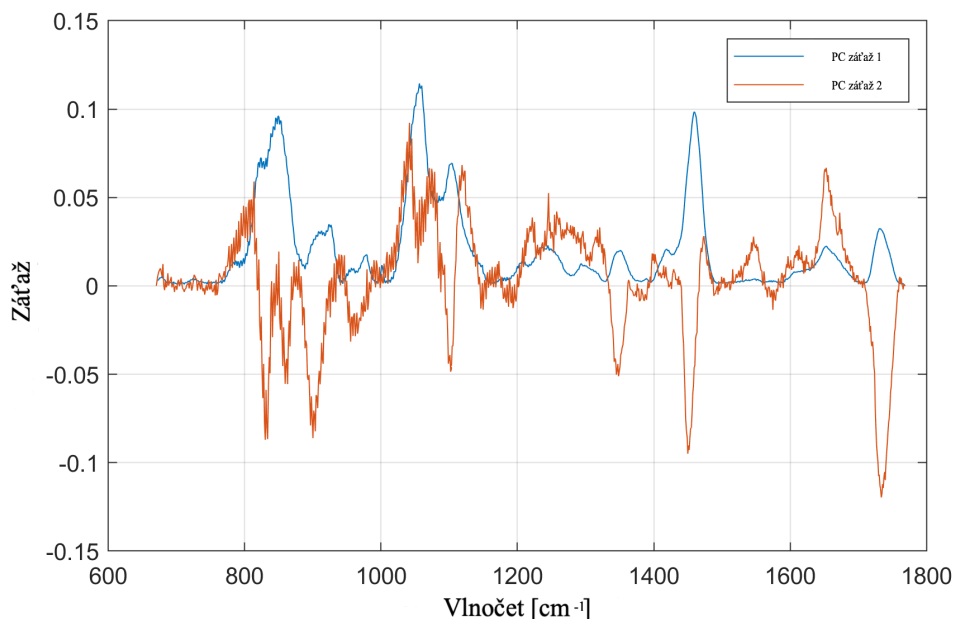
Obrázok 26 Porovnanie reprezentatívnych spektier kmeňov *Azotobacter vinelandii* DSM 85 A DSM 720

4.5.1 Vyhodnotenie analýzy hlavných komponentov

Analýza hlavných komponentov (PCA) je metóda spracovania dát, ktorá rieši problémy s vysokou dimenzionalitou dát jej redukciov. Výsledkom analýzy sú body predstavujúce jedno spektrum prípadne jednu bunku. PCA umožňuje zistiť podobnosť alebo odlišnosť daných bakteriálnych kmeňov, možnosť ich separácie alebo úspešnosť oddelenia na základe zvoleného triediaceho parametra.

Oblasť bodov je vymedzená Mehalanobisovou elipsou a predstavuje hranice 95 % merania. Čiže vo vnútri elipsy je umiestnených 95 % PC bodov jednej skupiny meraní, vďaka čomu sa používa na vizuálne hodnotenie podobnosti alebo odlišnosti medzi rôznymi vzorkami na základe umiestnenia vo výslednej grafickej reprezentácii.

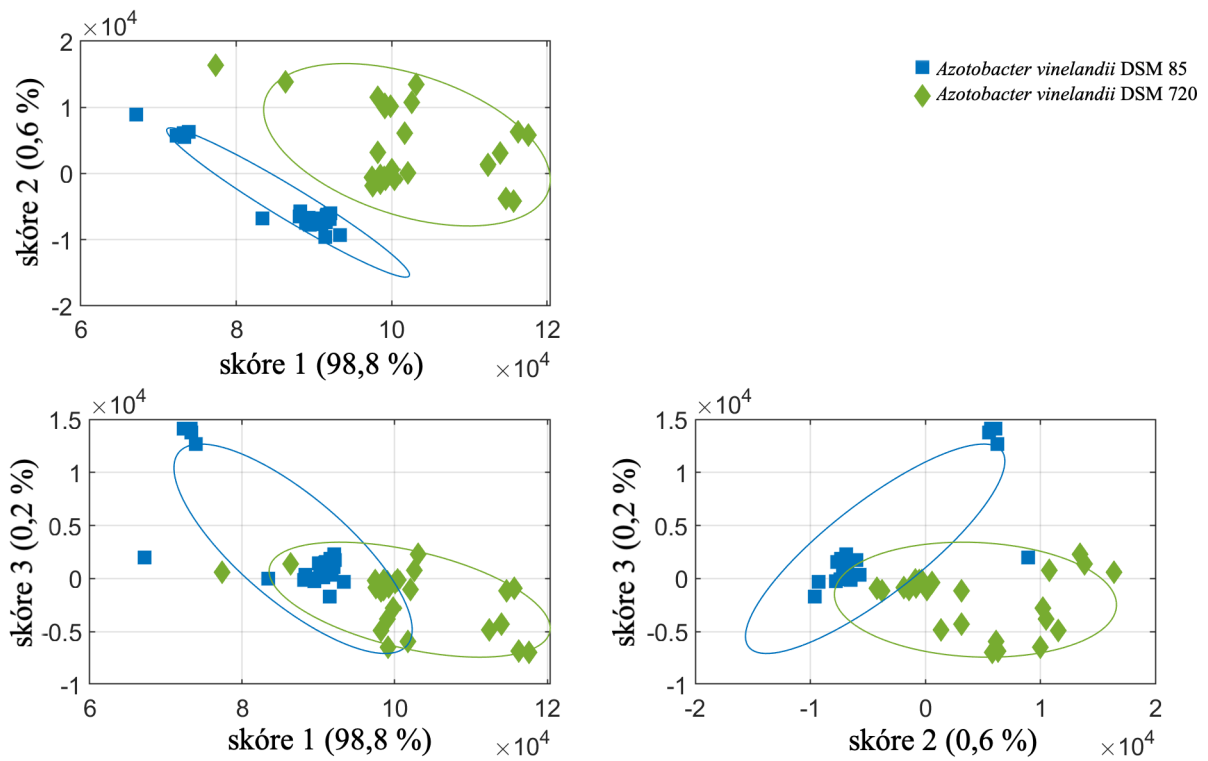
Obrázok 27 zobrazuje záťaže (tzn. *loadings*) pre analýzu hlavných komponentov, ktorej vrcholy predstavujú podiel na oddelení vzoriek. Píky v grafoch záťaží pre analýzu hlavných komponentov signalizujú miesta, kde je vysoká variácia. Kladné alebo záporné vysoké hodnoty naznačujú silný vzťah konkrétnej premennej k určitému hlavnému komponentu. Znamienko záťaže označuje pozitívnu/negatívnu koreláciu medzi premennou a hlavným komponentom [89].



Obrázok 27 Príslušný graf PCA záťaží pre vzorky *Azotobacter vinelandii* DSM 85 a DSM 720

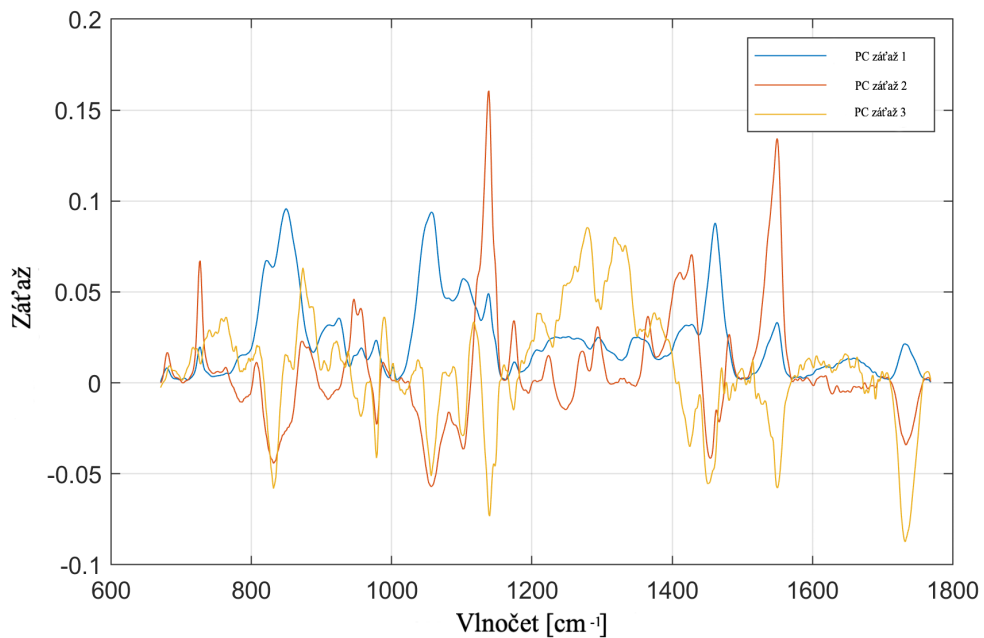
Grafické zobrazenie kombinácie prvých dvoch komponentov PCA (Obrázok 28) dvoch rôznych kmeňov *Azotobacter vinelandii* ukazuje na prvom grafe rozdiel v spektrách baktérií a teda poukazuje na oddeliteľnosť týchto dvoch kmeňov. Na druhých dvoch grafoch dochádza ku čiastočnému prekryvu Mehalanobisových elíps, čo naznačuje určitú mieru podobnosti medzi spektrálnymi charakteristikami baktérií z rôznych kmeňov, ale zároveň aj istý stupeň odlišnosti. Keďže sa jednalo o dva rôzne kmene *Azotobacter vinelandii* určitá miera podobnosti bola predpokladaná.

Percentuálne hodnoty uvedené v grafoch PCA označujú percento variácie vysvetlenej jednotlivými hlavnými komponentami. Napríklad hodnota pri skóre 1 (98,8 %) znamená, že prvý hlavný komponent vysvetľuje 98,8 % celkovej variancie dát.



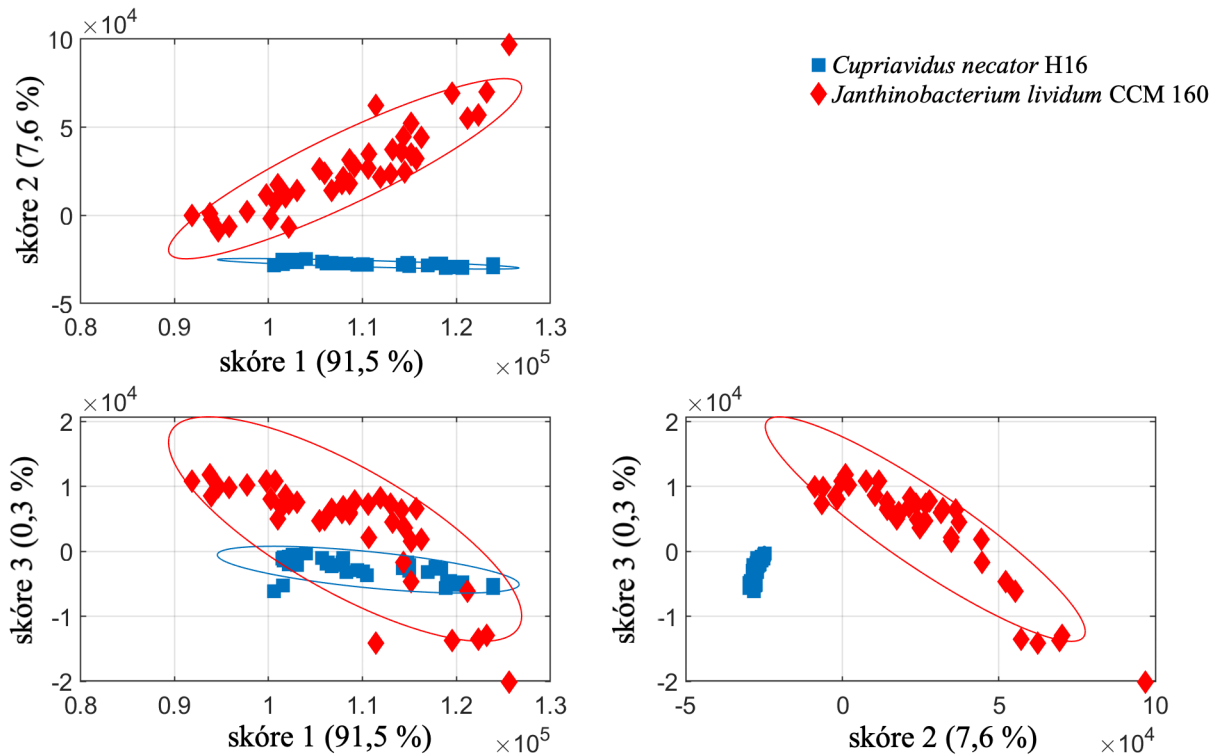
Obrázok 28 PCA *Azotobacter vinelandii* DSM 85 a DSM 720 získaná z nameraných spektier využitím Ramanovskej pinzety

Obrázok 29 zobrazuje PCA záťaže pre vzorky *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A+ a *Cupriavidus necator* H16.



Obrázok 29 Príslušný graf PCA záťaží pre vzorky *Janthinobacterium lividum* CCM 160 A+ a *Cupriavidus necator* H16

PCA kombinácia prvých troch komponentov (Obrázok 30) graficky zobrazuje dva rôzne kmene: *Janthinobacterium lividum* CCM 160 (A+) a *Cupriavidus necator* H16. Vykonanou analýzou bolo zistené, že kmene je možné od seba oddeliť, keďže na dvoch z troch grafov nedochádza ku žiadnemu prekryvu Mehalanobisových elíps, čo naznačuje, že v spektrách meraných baktérií sú výrazné rozdiely v Ramanovských signatúrach, čo značí odlišnosť v zložení a štruktúre. Čiastočný prekryv elíps v druhom grafe môže byť spôsobený niektorými spoločnými charakteristikami baktérií (napríklad prejav amínov, fenylalanínu, PHB atď. v oboch spektrách), avšak väčšina bodov (baktérií) je mimo prekryvu, čo zároveň značí odlišnosť v niektorých aspektoch.



Obrázok 30 PCA *Janthinobacterium lividum* CCM 160 a *Cupriavidus necator* H16 získaná z nameraných spektier využitím Ramanovskej pinzety

Na základe identifikácie spektier a príslušných grafov PCA zatiaľ bolo vybraných niekoľko Ramanových signatúr pre triedenie *Azotobacter vinelandii* DSM 85 a DSM 720 a to píky 1 060, 1 459, 1 730 cm^{-1} príslušné pre PHB, ktorých prejav sa nachádza v spektrách.

Pre triedenie *Janthinobacterium lividum* CCM 160 (A+) a *Cupriavidus necator* H16 boli vybrané Ramanovské signatúry 1 140 a 1 554 cm^{-1} príslušnými pre violaceín. Zvolené markery boli identifikované na čistom violaceíne a predstavujú dva najvýraznejšie prechody pre identifikáciu violaceínu [82].

Výber triediaceho parametra zohľadňoval intenzitu Ramanovskej signatúry a čo najnižšie prekryvanie s inými píkami (ľahkú oddeliteľnosť od iných Ramanových signatúr). Zároveň z grafov načítaných komponentov vyplýva, že na týchto píkoch je veľká variácia a teda tieto píky môžu slúžiť ako triediace markery.

Pre obe merania bol vynesene výsledok priemernej hodnoty intenzity pre jednotlivé pozície Ramanovskej signatúry (Tabuľka 19, Tabuľka 20) spolu so smerodajnou odchýlkou a relatívnou chybou merania.

Tabuľka 19 Intenzity Ramanových vibrácií v Ramanovských pikoch triedených pigmentovaných a nepigmentovaných baktérií

| | <i>Cupriavidus necator</i> H16 | | <i>Janthinobacterium lividum</i> CCM 160 | |
|---|--------------------------------|--------|--|--------|
| pozícia Ramanovskej signatúry (cm ⁻¹) | 1 554 | 1 140 | 1 554 | 1 140 |
| priemerná hodnota intenzity (a.u.) | 10 107 | 12 613 | 60 370 | 71 131 |
| smerodajná odchýlka (a.u.) | 700 | 994 | 12 256 | 14 602 |
| relatívna chyba (%) | 7 | 8 | 20 | 21 |

Tabuľka 20 Intenzity Ramanových vibrácií v Ramanovských pikoch triedených baktérií na základe obsahu PHB

| | <i>Azotobacter vinelandii</i> DSM 720 | | <i>Azotobacter vinelandii</i> DSM 85 | |
|---|---------------------------------------|--------|--------------------------------------|--------|
| pozícia Ramanovskej signatúry (cm ⁻¹) | 1 060 | 1 459 | 1 060 | 1 459 |
| priemerná hodnota intenzity (a.u.) | 32 528 | 30 530 | 23 435 | 22 894 |
| smerodajná odchýlka (a.u.) | 2 474 | 1 979 | 1 337 | 1 953 |
| relatívna chyba (%) | 8 | 6 | 6 | 9 |

Pre ďalšie triedenie kmeňov *Azotobacter vinelandii* na základe obsahu PHB by bol zvolený marker 1 060 cm⁻¹, ktorý u baktérie *Azotobacter vinelandii* DSM 720 mal hodnotu intenzity 32 528 ± 2 474 a.u. s relatívnou chybou 8 %. *Azotobacter vinelandii* DSM 85 však vykazuje nižšiu hodnotu intenzity a to 23 435 ± 1 337 a.u. s relatívnou chybou 9 %.

Pre triedenie nepigmentovaných a pigmentovaných kultúr s obsahom violaceínu by bol zvolený marker 1 140 cm⁻¹, ktorý vykazuje u baktérie *Janthinobacterium lividum* CCM 160 (A+) hodnotu 71 131 ± 14 602 a.u. s relatívnou chybou 21 %. *Cupriavidus necator* H16 vykazuje výrazne nižšiu priemernú intenzitu 12 613 ± 994 a.u. s relatívnou chybou 8 %.

5 ZÁVER

V časti diplomovej práce zameranej na päť kmeňov *Azotobacter vinelandii* bola stanovená gravimetricky priemerná koncentrácia biomasy vo vzorkách. Z produkčného média, do ktorého baktérie vylučujú alginát bola stanovená ich priemerná koncentrácia. Vzorkou obsahujúcou priemerne najviac alginátu bol kmeň DSM 87 o priemernej koncentrácii $2,1 \pm 0,8$ mg/ml a najmenšie množstvo $0,3 \pm 0,1$ mg/ml alginátu obsahovala vzorka DSM 13 529. Využitím plynovej chromatografie bol kvalitatívne aj kvantitatívne stanovený obsah polyhydroxybutyrátu vo vzorkách. Najvyšší obsah 3-hydroxybutyrátu vyprodukoval kmeň DSM 720, ktorý obsahoval $32,6 \pm 7,4$ %. Naopak najmenšie percento PHB obsahoval kmeň DSM 85 a to $2,6 \pm 1,7$ %. Na základe čoho boli tieto kmene vybrané pre meranie na Ramanovskej pinzete. Následnou analýzou nameraných výsledkov bola stanovená prípadná oddeliteľnosť týchto dvoch kmeňov na základe rozdielneho množstva polyhydroxybutyrátu.

V kmeňoch *A. vinelandii* bol predpokladaný obsah polyfosfátov, pre ktoré boli vybrané dva štandardy dekahydrát pyrofosforečnanu sodného a hexametafosfát sodný, ktoré boli následne merané pomocou Ramanovho spektroskopu. Pri identifikácii polyfosfátov v bakteriálnych spektrách boli pozorované píky s nízkymi intenzitami, keďže obsah polyfosfátov v baktériách bol nízky a v oblasti vyšších píkov dochádzalo ku interferenciám s píkami iných látok.

Azotobacter vinelandii je významným producentom alginátov, ktoré boli po extrakcii vysušené a merané pomocou Ramanovej spektroskopie. V spektrách boli identifikované pozície priradené glykozidickému kruhu v hlavnej štruktúre monomérov kyseliny alginovej. Pri identifikácii monomérnych jednotiek boli identifikované heteropolymérne jednotky a súčasne výrazné homopolymérne jednotky GG. Z analýzy teda vyplýva, že sa jednalo pravdepodobne o heteropolymérne frakcie alginátu, ktoré sú častejšie.

Pre všetky kmene bolo merané spektrum z kvapky, usušenej kvapky a z extrahovaného alginátu. V prípade tvorby gélu s vápenatými iónmi boli vzorky merané aj vo forme gélu. Najvyššia odozva bola získaná z vysušených vzoriek a následne z gélu. Porovnanie takto získaných spektier bolo ukázané na *Azotobacter vinelandii* DSM 576.

Z priemerných spektier *Azotobacter vinelandii* DSM 85 a DSM 720 bola vyššia odozva nameraná pri kmeni *Azotobacter vinelandii* DSM 720, čo zodpovedá výsledkom z plynovej chromatografie. V práci bola použitá Ramanovská pinzeta. Namerané spektrá boli po upravení analyzované pomocou analýzy hlavných komponentov. PCA zťažuje poukazovali na píky s vysokou variáciou, ktoré môžu slúžiť ako triediace markre. V prípade *Azotobacter vinelandii* sa jednalo o píky príslušné PHB a to $1\ 060\text{ cm}^{-1}$ a $1\ 459\text{ cm}^{-1}$. Týmto výberom by bolo potom možné vybrať generáciu so zvýšenou produkciou PHB. Výsledky porovnania hlavných komponentov, poukazujú na oddeliteľnosť týchto kmeňov, ale zároveň ukazujú aj ich podobnosť, ktorá je prirodzená, keďže sa jedna o rovnaký druh baktérií.

Rovnako v časti zameranej na pigmentované kultúry *Janthinobacterium lividum* CCM 160 a nepigmentovanú kultúru *Cupriavidus necator* H16 bola stanovená gravimetricky priemerná koncentrácia biomasy. Pri kmeni *Janthinobacterium lividum* CCM 160 produkujúcom fialový pigment violaceín bola stanovená spektrofotometricky jeho koncentrácia v dvoch vzorkách s rôznou dĺžkou kultivácie. Sedemnásobne vyšší obsah violaceínu bol vo vzorkách kultivovaných o 48 hodín dlhšie. Stanovený bol aj obsah polyhydroxybutyrátu vo vzorkách, ktorý tvoria oba kmene. *Cupriavidus necator* H16 je popredným producentom polyhydroxybutyrátu a dosahuje vysoké výťažky ($62,4 \pm 31,3$ %). *Janthinobacterium lividum* CCM 160 tvorí polyhydroxybutyrát v nižšom množstve a to priemerne $23,8 \pm 4,5$ %. Stanovenie prebehlo rovnako ako pri stanovení violaceínu na rovnakej vzorke s rozdielnym časom kultivácie. Výsledné hodnoty obsahu PHB v biomase sa však nijako výrazne nelíšili a teda je možné konštatovať, že doba kultivácie, medzi týmito dvomi časmi, nemá vplyv na zvýšenie produkciu PHB, keďže bunky si udržiavajú konštantné množstvo. Pri meraní vzoriek

na Ramanovom spektroskope získané spektrá *Janthinobacterium lividum* CCM 160 vykazovali silný signál pre violaceín, vďaka ktorému bol signál pre PHB pomerovo nižší a nebol identifikovaný v spektre.

Pre zistenie odlišnosti a následnej oddeliteľnosti bola využitá Ramanovská pinzeta a analýza hlavných komponentov. Vďaka PCA záťažiam boli vybrané píky s vysokou variáciou, ktoré boli následne vybrané ako možné triediace markre. Pre triedenie nepigmentovaných a pigmentovaných kultúr s obsahom violaceínu boli zvolené píky $1\,140\text{ cm}^{-1}$ a $1\,554\text{ cm}^{-1}$. Oddeliteľnosť buniek na základe obsahu violaceínu môže byť kľúčová v oblastiach používania violaceínu ako bakteriálnej fluorescenčnej značky.

6 ZOZNAM LITERÁRNYCH ZDROJOV

- [1] J. Smith, “Environmental challenges in the modern world: Impact on ecosystems, human health, and the economy,” *Journal of Environmental Science*, vol. 15, no. 2, pp. 45–56, 2022.
- [2] Z. A. Raza, S. Abid, and I. M. Banat, “Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications,” *Int Biodeterior Biodegradation*, vol. 126, pp. 45–56, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001.
- [3] J. D. Noar and J. M. Bruno-Bárcena, “Azotobacter vinelandii: the source of 100 years of discoveries and many more to come,” *Microbiology (N Y)*, vol. 164, no. 4, pp. 421–436, Apr. 2018, doi: 10.1099/mic.0.000643.
- [4] N. Yoshida, R. Takase, Y. Sugahara, Y. Nambu, and W. Hashimoto, “Direct production of polyhydroxybutyrate and alginate from crude glycerol by Azotobacter vinelandii using atmospheric nitrogen,” *Sci Rep*, vol. 12, no. 1, p. 8032, Dec. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-11728-1.
- [5] N. Durán *et al.*, “Advances in Chromobacterium violaceum and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review,” *Biotechnol Adv*, vol. 34, no. 5, pp. 1030–1045, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.06.003.
- [6] C. V. Raman and K. S. Krishan, “A New Type of Secondary Radiation,” *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501–502, Mar. 1928, doi: 10.1038/121501c0.
- [7] C.-C. Lin, “Review: Raman Spectroscopy—A Novel Tool for Noninvasive Analysis of Ocular Surface Fluid,” *J Med Biol Eng*, vol. 30, no. 6, p. 343, 2010, doi: 10.5405/jmbe.846.
- [8] Pavel Klouda, *Moderní analytické metody*, 2nd ed. Ostrava, 2003.
- [9] W. E. Smith, “Raman Scattering,” in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017, pp. 1–20. doi: 10.1002/0471238961.1801130103081809.a01.pub3.
- [10] S. Bashir and J. Liu, “Nanocharacterization,” in *Advanced Nanomaterials and their Applications in Renewable Energy*, Elsevier, 2015, pp. 117–180. doi: 10.1016/B978-0-12-801528-5.00003-8.
- [11] L. Záhorská, “Studium biotechnologicky významných mikroorganismů pomocí Ramanovy spektrofotometrie,” Diplomová práce, Vysoké učení technické v Brně, Brno, 2017.
- [12] S. J. Webb, “Laser-Raman spectroscopy of living cells,” *Phys Rep*, vol. 60, no. 4, pp. 201–224, Apr. 1980, doi: 10.1016/0370-1573(80)90149-0.
- [13] Irena Němcová, Ludmila Čermáková, and Petr Rychlovský, *Spektrometrické analytické metody*. Praha: Karolinum, 1997.
- [14] T. R. Watkins, G. S. Schajer, and M. J. Lance, “Residual Stress Measurements,” in *Comprehensive Materials Processing*, Elsevier, 2012, pp. 113–134. doi: 10.1016/B978-0-08-096532-1.00109-6.
- [15] K. Hamasha, “Raman spectroscopy for the microbiological characterization and identification of medically relevant bacteria,” Wayne State University, Detroit, MI, USA, 2011. Accessed: May 03, 2023. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/241841394_Raman_spectroscopy_for_the_microbiological_characterization_and_identification_of_medically_relevant_bacteria#fullTextFileContent
- [16] N. N. Brandt, O. O. Brovko, A. Y. Chikishev, and O. D. Paraschuk, “Optimization of the Rolling-Circle Filter for Raman Background Subtraction,”

- Appl Spectrosc*, vol. 60, no. 3, pp. 288–293, Mar. 2006, doi: 10.1366/000370206776342553.
- [17] K. Rebrošová *et al.*, “Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy,” *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 14846, Nov. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-13940-w.
- [18] A. Sanaeifar, D. Ye, X. Li, L. Luo, Y. Tang, and Y. He, “A Spatial-Temporal Analysis of Cellular Biopolymers on Leaf Blight-Infected Tea Plants Using Confocal Raman Microspectroscopy,” *Front Plant Sci*, vol. 13, Apr. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.846484.
- [19] F. ; P. R. Lamoš, *Pravdepodobnosť a matematická štatistika - Štatistické analýzy*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, Vydavateľstvo UK, 1998.
- [20] B. Alizadeh Behbahani, F. Tabatabaei Yazdi, F. Shahidi, S. A. Mortazavi, and M. Mohebbi, “Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil,” *Microb Pathog*, vol. 105, pp. 37–50, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.micpath.2017.02.013.
- [21] S.-W. Li *et al.*, “Bacterial Composition and Diversity in Breast Milk Samples from Mothers Living in Taiwan and Mainland China,” *Front Microbiol*, vol. 8, May 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00965.
- [22] L. P. Moreira, L. Silveira, M. T. T. Pacheco, A. G. da Silva, and D. D. F. M. Rocco, “Detecting urine metabolites related to training performance in swimming athletes by means of Raman spectroscopy and principal component analysis,” *J Photochem Photobiol B*, vol. 185, pp. 223–234, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.013.
- [23] L. Wang *et al.*, “Applications of Raman Spectroscopy in Bacterial Infections: Principles, Advantages, and Shortcomings,” *Front Microbiol*, vol. 12, Jul. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2021.683580.
- [24] R. A. Grosso *et al.*, “Detection of low numbers of bacterial cells in a pharmaceutical drug product using Raman spectroscopy and PLS-DA multivariate analysis,” *Analyst*, vol. 147, no. 15, pp. 3593–3603, 2022, doi: 10.1039/D2AN00683A.
- [25] A. A. Kowalska *et al.*, “Brain tumour homogenates analysed by surface-enhanced Raman spectroscopy: Discrimination among healthy and cancer cells,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 231, p. 117769, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.saa.2019.117769.
- [26] M. Tahir *et al.*, “Raman spectroscopy for the analysis of different exopolysaccharides produced by bacteria,” *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 237, p. 118408, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.saa.2020.118408.
- [27] W. M. Tolles, J. W. Nibler, J. R. McDonald, and A. B. Harvey, “A Review of the Theory and Application of Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS),” *Appl Spectrosc*, vol. 31, no. 4, pp. 253–271, Jul. 1977, doi: 10.1366/000370277774463625.
- [28] D. P. Strommen and K. Nakamoto, “Resonance raman spectroscopy,” *J Chem Educ*, vol. 54, no. 8, p. 474, Aug. 1977, doi: 10.1021/ed054p474.
- [29] P. R. Carey, “Resonance Raman Studies of Natural, Protein-Bound Chromophores,” in *Biochemical Applications of Raman and Resonance Raman Spectroscopies*, Elsevier, 1982, pp. 99–153. doi: 10.1016/B978-0-12-159650-7.50008-0.

- [30] F. Shao and R. Zenobi, "Tip-enhanced Raman spectroscopy: principles, practice, and applications to nanospectroscopic imaging of 2D materials," *Anal Bioanal Chem*, vol. 411, no. 1, pp. 37–61, Jan. 2019, doi: 10.1007/s00216-018-1392-0.
- [31] A. M. Kelley, "Hyper-Raman Scattering by Molecular Vibrations," *Annu Rev Phys Chem*, vol. 61, no. 1, pp. 41–61, Mar. 2010, doi: 10.1146/annurev.physchem.012809.103347.
- [32] X. X. Han, R. S. Rodriguez, C. L. Haynes, Y. Ozaki, and B. Zhao, "Surface-enhanced Raman spectroscopy," *Nature Reviews Methods Primers*, vol. 1, no. 1, p. 87, Jan. 2022, doi: 10.1038/s43586-021-00083-6.
- [33] A. Szaniawska and A. Kudelski, "Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering in Biochemical and Medical Analysis," *Front Chem*, vol. 9, May 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.664134.
- [34] N. Kumar, S. Mignuzzi, W. Su, and D. Roy, "Tip-enhanced Raman spectroscopy: principles and applications," *EPJ Tech Instrum*, vol. 2, no. 1, p. 9, Dec. 2015, doi: 10.1140/epjti/s40485-015-0019-5.
- [35] H. Hamaguchi and K. Iwata, "Time-Resolved Raman Spectroscopy," in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, 2017, pp. 463–468. doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12166-3.
- [36] C. L. Evans and X. S. Xie, "Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Chemical Imaging for Biology and Medicine," *Annual Review of Analytical Chemistry*, vol. 1, no. 1, pp. 883–909, Jul. 2008, doi: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.112754.
- [37] C. H. Brubaker, "Physical methods in inorganic chemistry (Drago, Russell)," *J Chem Educ*, vol. 43, no. 4, p. 222, Apr. 1966, doi: 10.1021/ed043p222.1.
- [38] S. Bernatová *et al.*, "Wavelength-Dependent Optical Force Aggregation of Gold Nanorods for SERS in a Microfluidic Chip," *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 123, no. 9, pp. 5608–5615, Mar. 2019, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b12493.
- [39] S. Preetam *et al.*, "Emergence of microfluidics for next generation biomedical devices," *Biosens Bioelectron X*, vol. 10, p. 100106, May 2022, doi: 10.1016/j.biosx.2022.100106.
- [40] J. Khandurina and A. Guttman, "Bioanalysis in microfluidic devices," *J Chromatogr A*, vol. 943, no. 2, pp. 159–183, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01451-0.
- [41] N. S. Ha, M. de Raad, L. Z. Han, A. Golini, C. J. Petzold, and T. R. Northen, "Faster, better, and cheaper: harnessing microfluidics and mass spectrometry for biotechnology," *RSC Chem Biol*, vol. 2, no. 5, pp. 1331–1351, 2021, doi: 10.1039/D1CB00112D.
- [42] A. Jonáš and P. Zemánek, "Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 24, pp. 4813–4851, Dec. 2008, doi: 10.1002/elps.200800484.
- [43] Z. Pilát, J. Ježek, J. Kaňka, and P. Zemánek, "Raman tweezers in microfluidic systems for analysis and sorting of living cells," D. L. Farkas, D. v. Nicolau, and R. C. Leif, Eds., Mar. 2014, p. 89471M. doi: 10.1117/12.2040631.
- [44] D. v Petrov, "Raman spectroscopy of optically trapped particles," *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, vol. 9, no. 8, pp. S139–S156, Aug. 2007, doi: 10.1088/1464-4258/9/8/S06.
- [45] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, Jul. 2006, doi: 10.1038/nature05058.

- [46] V. Chokkalingam *et al.*, “Probing cellular heterogeneity in cytokine-secreting immune cells using droplet-based microfluidics,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 24, p. 4740, 2013, doi: 10.1039/c3lc50945a.
- [47] C. Xie, C. Goodman, M. A. Dinno, and Y.-Q. Li, “Real-time Raman spectroscopy of optically trapped living cells and organelles,” *Opt Express*, vol. 12, no. 25, p. 6208, 2004, doi: 10.1364/OPEX.12.006208.
- [48] S. Bernatova, O. Samek, S. Obruca, M. Sery, P. Zemanek, and I. Marova, “Time evolution of trapped single cell microorganism,” Apr. 06, 2016. <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/9711/971104/Time-evolution-of-trapped-single-cell-microorganism/10.1117/12.2213264.short?SSO=1&tab=ArticleLinkCited> (accessed Apr. 25, 2023).
- [49] R. D. Snook, T. J. Harvey, E. Correia Faria, and P. Gardner, “Raman tweezers and their application to the study of singly trapped eukaryotic cells,” *Integr. Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 43–52, 2009, doi: 10.1039/B815253E.
- [50] K. Rebrosova, O. Samek, M. Kizovsky, S. Bernatova, V. Hola, and F. Ruzicka, “Raman Spectroscopy—A Novel Method for Identification and Characterization of Microbes on a Single-Cell Level in Clinical Settings,” *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, Apr. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.866463.
- [51] S. Feng *et al.*, “Single cell analysis using Laser Tweezers Raman Spectroscopy, Reflectance Confocal Imaging and Multiphoton Fluorescence Imaging,” in *Optics in the Life Sciences*, Washington, D.C.: OSA, 2015, p. OtT2E.4. doi: 10.1364/OTA.2015.OtT2E.4.
- [52] I. Sedláček *et al.*, “Classification of a Violacein-Producing Psychrophilic Group of Isolates Associated with Freshwater in Antarctica and Description of *Rugamonas violacea* sp. nov.,” *Microbiol Spectr*, vol. 9, no. 1, Sep. 2021, doi: 10.1128/Spectrum.00452-21.
- [53] F. S. Haack *et al.*, “Molecular Keys to the Janthinobacterium and Duganella spp. Interaction with the Plant Pathogen *Fusarium graminearum*,” *Front Microbiol*, vol. 7, Oct. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01668.
- [54] S. Ciesielski, D. Górniak, J. Możejko, A. Świątecki, J. Grzesiak, and M. Zdanowski, “The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates,” *Curr Microbiol*, vol. 69, no. 5, pp. 594–603, Nov. 2014, doi: 10.1007/s00284-014-0629-1.
- [55] Vladimír Pravda, “<https://www.flickr.com/photos/135413569@N08/26212836158/>,” Feb. 04, 2018.
- [56] B. Neron *et al.*, “Evaluation of the anti-proliferative activity of violacein, a natural pigment of bacterial origin, in urinary bladder cancer cell lines,” *Oncol Lett*, vol. 23, no. 4, p. 132, Feb. 2022, doi: 10.3892/ol.2022.13252.
- [57] F. A. Venegas *et al.*, “The Bacterial Product Violacein Exerts an Immunostimulatory Effect Via TLR8,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 13661, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50038-x.
- [58] S. Y. Choi, S. Lim, K. Yoon, J. I. Lee, and R. J. Mitchell, “Biotechnological Activities and Applications of Bacterial Pigments Violacein and Prodigiosin,” *J Biol Eng*, vol. 15, no. 1, p. 10, Dec. 2021, doi: 10.1186/s13036-021-00262-9.
- [59] M. Rinaudo, “Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials,” *Polym Int*, vol. 57, no. 3, pp. 397–430, Mar. 2008, doi: 10.1002/pi.2378.

- [60] F. Clementi, "Alginate Production by *Azotobacter Vinelandii*," *Crit Rev Biotechnol*, vol. 17, no. 4, pp. 327–361, Jan. 1997, doi: 10.3109/07388559709146618.
- [61] J. J. Christ, S. Willbold, and L. M. Blank, "Methods for the Analysis of Polyphosphate in the Life Sciences," *Anal Chem*, vol. 92, no. 6, pp. 4167–4176, Mar. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05144.
- [62] R. Morya, B. Tyagi, A. Sharma, and I. S. Thakur, "Production and applications of polyphosphate," in *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, Elsevier, 2021, pp. 283–307. doi: 10.1016/B978-0-12-821888-4.00001-0.
- [63] M. Higuchi-Takeuchi, K. Morisaki, K. Toyooka, and K. Numata, "Synthesis of High-Molecular-Weight Polyhydroxyalkanoates by Marine Photosynthetic Purple Bacteria," *PLoS One*, vol. 11, no. 8, p. e0160981, Aug. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0160981.
- [64] C.-Y. Loo and K. Sudesh, "Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties," *Malaysian Polymer Journal*, vol. 2, no. 2, pp. 31–57, 2007.
- [65] S. Khanna and A. K. Srivastava, "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates," *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 2, pp. 607–619, Feb. 2005, doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.053.
- [66] P. Večeriková, "Ramanova spektroskopie prokaryotních buněk," Bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Brno, 2021.
- [67] A. Surendran, M. Lakshmanan, J. Y. Chee, A. M. Sulaiman, D. van Thuoc, and K. Sudesh, "Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils?," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, Mar. 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00169.
- [68] Taniguchi I., Kagotani K., and Kimura Y, "Microbial production of poly(hydroxyalkanoate)s from waste edible oils," *Green Chemistry*, vol. 545, no. 5, 2003.
- [69] Pui-Ling Chan, Vincent Yu, Lam Wai, and Hoi-Fu Yu, "Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by pseudomonas aeruginosa with fatty acids and alternative carbon sources," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 132, pp. 933–941, 2006.
- [70] R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, and I. Radecka, "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates," *J Appl Microbiol*, vol. 102, no. 6, pp. 1437–1449, Jun. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x.
- [71] M. Zinn and R. Hany, "Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification," *Adv Eng Mater*, vol. 7, no. 5, pp. 408–411, May 2005, doi: 10.1002/adem.200500053.
- [72] J. Mozejko-Ciesielska, K. Szacherska, and P. Marciniak, "Pseudomonas Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates," *J Polym Environ*, vol. 27, no. 6, pp. 1151–1166, Jun. 2019, doi: 10.1007/s10924-019-01422-1.
- [73] J. P. Eubeler, M. Bernhard, and T. P. Knepper, "Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 29, no. 1, pp. 84–100, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.trac.2009.09.005.
- [74] J. Mozejko-Ciesielska and R. Kiewisz, "Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?," *Microbiol Res*, vol. 192, pp. 271–282, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.micres.2016.07.010.

- [75] R. A. J. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, and I. Radecka, "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates," *J Appl Microbiol*, vol. 102, no. 6, pp. 1437–1449, Jun. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x.
- [76] S. Philip, T. Keshavarz, and I. Roy, "Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications," *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 82, no. 3, pp. 233–247, Mar. 2007, doi: 10.1002/jctb.1667.
- [77] S. A. Stroala *et al.*, "Single bacteria identification by Raman spectroscopy," *J Biomed Opt*, vol. 19, no. 11, p. 111610, Jul. 2014, doi: 10.1117/1.JBO.19.11.111610.
- [78] T. Schmid, A. Messmer, B.-S. Yeo, W. Zhang, and R. Zenobi, "Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms II: tip-enhanced Raman spectroscopy of alginates," *Anal Bioanal Chem*, vol. 391, no. 5, pp. 1907–1916, Jul. 2008, doi: 10.1007/s00216-008-2101-1.
- [79] V. Ciobotă, E.-M. Burkhardt, W. Schumacher, P. Rösch, K. Küsel, and J. Popp, "The influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy," *Anal Bioanal Chem*, vol. 397, no. 7, pp. 2929–2937, Aug. 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3895-1.
- [80] J. De Gelder *et al.*, "Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy," *Anal Chem*, vol. 80, no. 6, pp. 2155–2160, Mar. 2008, doi: 10.1021/ac702185d.
- [81] M. M. Campos-Vallette *et al.*, "Characterization of sodium alginate and its block fractions by surface-enhanced Raman spectroscopy," *Journal of Raman Spectroscopy*, p. n/a-n/a, 2009, doi: 10.1002/jrs.2517.
- [82] J. Jehlička, H. G. M. Edwards, I. Němec, and A. Oren, "Raman spectroscopic study of the *Chromobacterium violaceum* pigment violacein using multiwavelength excitation and DFT calculations," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 151, pp. 459–467, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.saa.2015.06.051.
- [83] apply innovation RENISHAW, "inVia™ research-grade confocal Raman microscopes," 2021. <https://www.renishaw.com/en/invia-confocal-raman-microscope--6260> (accessed Apr. 25, 2023).
- [84] Z. Pilát *et al.*, "Analysis of Bacteriophage–Host Interaction by Raman Tweezers," *Anal Chem*, vol. 92, no. 18, pp. 12304–12311, Sep. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c01963.
- [85] V. Kumar, S. Darnal, S. Kumar, S. Kumar, and D. Singh, "Bioprocess for co-production of polyhydroxybutyrate and violacein using Himalayan bacterium *Iodobacter* sp. PCH194," *Bioresour Technol*, vol. 319, p. 124235, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.biortech.2020.124235.
- [86] T. Schmid, A. Messmer, B.-S. Yeo, W. Zhang, and R. Zenobi, "Towards chemical analysis of nanostructures in biofilms II: tip-enhanced Raman spectroscopy of alginates," *Anal Bioanal Chem*, vol. 391, no. 5, pp. 1907–1916, Jul. 2008, doi: 10.1007/s00216-008-2101-1.
- [87] J. Shao *et al.*, "In Vivo Blood Glucose Quantification Using Raman Spectroscopy," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e48127, Oct. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0048127.
- [88] J. J. Christ, S. Willbold, and L. M. Blank, "Methods for the Analysis of Polyphosphate in the Life Sciences," *Anal Chem*, vol. 92, no. 6, pp. 4167–4176, Mar. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05144.

- [89] Alboukadel Kassambara, *Practical Guide To Principal Component Methods in R*, 1st ed. 2017.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

| | |
|----------|---|
| % | percento |
| °C | stupeň Celzia |
| 3HB | 3-hydroxybutyrát |
| 3HV | 3-hydroxyvalerát |
| a.u. | arbitrary unit |
| C=O | karbonylová skupina |
| CARS | Koherentná anti-Stokesova Ramanova spektroskopia |
| cm | centimeter |
| Da | Dalton |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| G | kyselina α -L-guluronová |
| GC- FID | Plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom |
| IR | infračervená (oblasť) |
| lcl-PHA | long chain lenght- polyhydroxyalkanoáty s dlhým reťazcom |
| LOC | lab-on-chip |
| M | kyselina β -D-manuronová |
| mcl-PHA | medium chain lenght- polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom |
| MES | 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid |
| ml | mililiter |
| PBS | fosfátový tlmiaci roztok |
| PCA | principal component analysis- analýza hlavných komponentov |
| PDMS | polydimethylsiloxan |
| PHA | polyhydroxyalkanoáty |
| PHB | polyhydroxybutyrát |
| PLS-DA | model čiastočnej diskriminačnej analýzy najmenších štvorcov |
| RCF | (rolling-circle filter)- spektrálny filter s rotujúcim kruhom |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| rpm | otáčky za minútu |
| RR | Rezonančná Ramanova (spektroskopia) |
| scl-PHA | short chain lenght- polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom |
| SERS | Povrchom zosilnená Ramanova spektroskopia |
| SSAW | Standing surface acoustic wave (Triedenie pomocou akustických vln) |
| TERS | Hrotom zosilnená Ramanova spektroskopia |
| TRRS | Časovo rozlíšená Ramanova spektroskopia |
| väzba CH | väzba uhlík-vodík |