



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

RAMANOVA SPEKTROSKOPIE PROKARYOTNÍCH BUNĚK

RAMAN SPECTROSCOPY OF PROKARYOTIC CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Paula Večeríková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Ota Samek Dr.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1676/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Paula Večeríková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Mgr. Ota Samek Dr.**

Název bakalářské práce:

Ramanova spektroskopie prokaryotních buněk

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Proměření Ramanovských spekter vybraných termofilních producentů PHA
3. Využití Ramanovského sortéru k separaci PHA produkujících buněk

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

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

Paula Večeríková
student(ka)

Mgr. Ota Samek Dr.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Predkladaná bakalárska práca sa zaoberá Ramanovou spektroskopiou bakteriálnych buniek. Táto metóda sa ukazuje ako veľmi vhodná na sledovanie kultivačných podmienok týchto bakteriálnych kmeňov, pretože je vo svojej podstate nedeštruktívna a rýchla v porovnaní s plynovou chromatografiou. Vďaka nedeštruktívnemu charakteru je možné zmerané bunky ďalej kultivovať. Túto analytickú metódu je ďalej možné využiť k triedeniu a výberu jedincov so zvýšenou schopnosťou tvorby PHB. Týmto výberom by bolo potom možné vybrať generáciu tzv. superproducentov PHB. Polyhydroxybutyrát (PHB) patrí do skupiny polyhydroxyalkanoátov (PHA), ktoré slúžia ako náhrada plastov z petrochemického priemyslu, ktorých spotreba narastá obzvlášť v dobe pandémie. Súčasne biodegradabilné náhrady sú na báze škrobu, čím však dochádza ku odčerpávaniu nutričného materiálu pre ľudí a zvieratá. Táto bakalárska práca môže slúžiť ako podklad ku zníženiu ceny výroby PHB, keďže výsledky môžu byť použité pri kultivácii buniek ako senzor obsahu PHB v reakcii na kmeň baktérií. V experimentálnej časti práce boli premerané Ramanové spektrá vybraných baktérií, kde výsledok ukázal najväčšiu odozvu pre PHB u *Chelatococcus shambunathi* a najnižšiu u termofilný izolát BZ (*Paenibacillus sp.*). Kvantitatívna informácia o obsahu PHA v baktériách bola zistená plynovou chromatografiou, kde najvyšší obsah mala baktéria – *Chelatococcus shambunathi* a naopak najnižší *Termobacillus composti*. Predmetom druhej časti bolo oddelenie zmesi dvoch bakteriálnych kultúr produkujúcich a neprodukujúcich PHA. Výsledkom bol jednoznačný dôkaz, že zmes je oddeliteľná na základe intenzity vybraného triediaceho parametra.

ABSTRACT

The presented bachelor's thesis deals with the Raman spectroscopy of bacterial cells. This method proves to be very suitable for monitoring the culture conditions of these bacterial strains because it is essentially non-destructive and fast compared to gas chromatography. Due to its non-destructive nature, it is possible to further cultivate the measured cells. This analytical method can also be used to sort and select individual cells with increased ability to produce PHB. This would enable the possibility to select the generation of so-called PHB superproducers. Polyhydroxybutyrate (PHB) belongs to the group of polyhydroxyalkanoates (PHA), which serve as a substitute for plastics made in the petrochemical industry, whose consumption is increasing, especially during a pandemic. Current biodegradable substitutes are based on starch, which, in turn, depletes nutritional material for humans and animals. This bachelor thesis can serve as a basis outline for reducing the cost of PHB production, because Raman spectroscopy can be used in cell culture as a sensor of PHB content in response to a bacterial strain. In the experimental part of the work, the Raman spectra of selected bacteria were measured, where the result showed the greatest response to PHB in *Chelatococcus shambunathi* and the lowest in the thermophilic isolate BZ (*Paenibacillus sp.*). Quantitative information on the content of PHA in bacteria was obtained by gas chromatography, where the highest content was the bacteria - *Chelatococcus shambunathi* and the lowest *Termobacillus composti*. The subject of the second part was the separation of a mixture of PHA-producing and non-PHA-producing bacterial cultures. The result clearly proves that the mixture is separable based on the intensity of the selected sorting parameter.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty, Ramanova spektroskopia, Ramanovská pinzeta, optická pinzeta, termofilné baktérie, *Chelatococcus composti*, *Chelatococcus shambunathii*, *Aneurinibacillus sp.* H1

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, Raman spectroscopy, Raman tweezers, Optical tweezers, thermophilic bacteria, *Chelatococcus composti*, *Chelatococcus shambunathii*, *Aneurinibacillus sp.* H1

VEČERÍKOVÁ, Paula. *Ramanova spektroskopie prokaryotních buněk*. Brno, 2021.
Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131527>. Bakalářská práce.
Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie.
Vedoucí práce Mgr. Ota Samek Dr.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska 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:

Touto cestou by som sa chcela poďakovať môjmu vedúcemu bakalárskej práce Mgr. Otovi Samkovi Dr. za vedenie pri tvorbe práce a meraní, doc. Ing. Stanislavovi Obručovi PhD. za ústretovosť a mojej konzultantke Ing. Eve Slaninovej Ph.D. za pomoc v laboratóriu. Za rady pri spracovaní bakalárskej práce ďakujem Mgr. Martinovi Kizovskému. Taktiež by som rada poďakovala mojej rodine a najbližším, ktorí ma podporovali počas štúdia.

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 7 |
| 2 | TEORETICKÁ ČASŤ | 9 |
| 2.1 | Polyhydroxyalkanoáty | 9 |
| 2.1.1 | Rozdelenie | 9 |
| 2.1.2 | Fyzikálne a chemické vlastnosti polyhydroxyalkanoátov | 9 |
| 2.1.3 | Biosyntéza | 10 |
| 2.1.4 | Biodegradabilita polyhydroxyalkanoátov | 12 |
| 2.1.5 | Využitie polyhydroxyalkanoátov | 13 |
| 2.2 | Termofilné mikroorganizmy | 13 |
| 2.2.1 | Charakteristika | 13 |
| 2.2.2 | Rozdelenie a podmienky pre život | 13 |
| 2.3 | Vybrané baktérie pre meranie | 14 |
| 2.3.1 | <i>Chelatococcus composti</i> | 14 |
| 2.3.2 | <i>Chelatococcus shambunathii</i> | 14 |
| 2.3.3 | <i>Aneurinibacillus sp. H1</i> | 15 |
| 2.4 | Ramanova spektroskopia | 15 |
| 2.4.1 | Princíp | 15 |
| 2.4.2 | Vyhodnotenie spektier – odstránenie pozadia, analýza hlavných komponentov | 16 |
| 2.4.3 | Aplikácie Ramanovej spektroskopie | 16 |
| 2.4.4 | Optické chytanie v kombinácii s Ramanovou spektroskopiou | 17 |
| 2.4.5 | Ramanov sorter a jeho využitie | 17 |
| 3 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 18 |
| 3.1 | Použité baktérie, chemikálie, prístroje a materiál pri meraní | 18 |
| 3.1.1 | Baktérie | 18 |
| 3.1.2 | Chemikálie | 18 |
| 3.1.3 | Prístroje | 18 |
| 3.2 | Kultivácia baktérií | 20 |
| 3.2.1 | Príprava inkubačného média | 20 |
| 3.2.2 | Príprava inokula | 20 |
| 3.2.3 | Príprava produkčného média | 21 |
| 3.3 | Použité metódy | 22 |
| 3.3.1 | Spektrofotometrické a gravimetrické stanovenie biomasy | 22 |
| 3.3.2 | Plynová chromatografia | 22 |
| 3.3.3 | Ramanova spektroskopia v kombinácii s optickou pinzetou | 23 |
| 4 | VÝSLEDKY A DISKUSIA | 26 |
| 4.1 | Premeranie Ramanovských spektier vybraných termofilných producentov polyhydroxyalkanoátov | 26 |
| 4.1.1 | Vyhodnotenie spektrofotometrického a gravimetrického stanovenia biomasy | 26 |
| 4.1.2 | Vyhodnotenie plynovej chromatografie | 26 |
| 4.1.3 | Vyhodnotenie spektier nameraných na Ramanovom mikroskope Renishaw inVia | 27 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2 | Využitie Ramanovského sortéru k separácií buniek produkujúcich polyhydroxyalkanoáty | 30 |
| 4.2.1 | Vyhodnotenie plynovej chromatografie | 30 |
| 4.2.2 | Vyhodnotenie nameraných Ramanových spektier..... | 30 |
| 4.2.3 | Vyhodnotenie Ramanovho sorteru | 32 |
| 4.2.4 | Vyhodnotenie analýzy hlavných komponentov | 33 |
| 5 | ZÁVER | 36 |
| 6 | ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY | 38 |
| 7 | ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK | 43 |

1 ÚVOD

V každodennom živote čelíme mnohým vážnym témam týkajúcich sa budúcnosti našej planéty. Jednou z najhlavnejších je práve jej znečistenie a s tým spojená problematika plastov, vyrábaných petrochemickým priemyslom, využívaných v každodennom živote človeka. Plasty sú široko využívaným materiálom vďaka ich nízkej cene a dobrým materiálovým vlastnostiam vo všetkých odvetviach bežného života. Uplatnenie nachádzajú od najmenších predmetov v domácnosti cez odvetia akými je zdravotníctvo, kde je zvýšená potreba jednorazových výrobkov a ich obmedzenie nie je žiaduce, až po stavebníctvo, kde je vyžívaná práve ich dlhodobá degradabilita. Na jednej strane je výhodnou vlastnosťou plastov ich odolnosť voči okolitému prostrediu, čo využíva napríklad stavebný priemysel pri výrobe okien, protihlukových stien a striech vystavených poveternostným podmienkam, na druhej strane však ťažko riešiteľným problémom ich ťažká rozložiteľnosť. Likvidácia plastov je často uskutočňovaná ich dlhodobým skladovaním, čoho dôsledkom je znečisťovanie vody a pôdy, alebo jeho nedokonalým spaľovaním, čím dochádza ku znečisteniu ovzdušia. Riešenie tejto problematiky ponúkajú práve bioplasty, ktoré by svojimi vlastnosťami pripomínali bežne používané plasty avšak ich výhoda by spočívala v biodegradovateľnosti (rozložiteľnosti látky prírodným mechanizmom), s ktorou majú súčasne konvenčné plasty značný problém. V dnešnej dobe sú bioplasty najčastejšie vyrábané zo škrobu. Vstupnými surovinami sú v tomto prípade kukuričný škrob alebo repný cukor, ktoré však so sebou nesú morálny problém, a to možnosť ich využitia v podobe potravy pre tretinu populácie, ktorá trpí nutričnou podvýživou. Bioplasty vyrábané z polyhydroxyalkanoátov sú však v prostredí s vhodnými mikroorganizmami rozložiteľné v priebehu niekoľkých mesiacov a nevyužívajú ku svojej výrobe bežne konzumovateľné plodiny. Tieto mikroorganizmy najčastejšie nachádzame v odpadne z poľnohospodárskeho alebo potravinárskeho priemyslu [1].

Vhodnou alternatívou spĺňajúcou tieto požiadavky sú polyhydroxyalkanoáty, označované aj skratkou PHA. Jedná sa o látky produkované mikroorganizmami, pre ktoré sú zásobnou látkou uhlíku a energie. Výroba bioplastov je však v biotechnologickom priemysle spojená aj s komerčnými požiadavkami na výrobu, akými je napríklad nízka cena alebo vysoká výťažnosť. V tomto prípade je potrebné hľadiť na vhodný výber bakteriálneho kmeňa, ktorý je schopný produkovať čo najväčšie množstvo PHA, v čo najlepšej čistote a malej krehkosti a zároveň je potrebné hľadiť na čo najnižšie finančné nároky daných procesov [2]. Tu sa ako možnosť ponúkajú extremofilné baktérie, ktoré prežívajú v extrémnych fyzických a geochemických podmienkach. Z nich konkrétne termofilné baktérie, ktorých optimálna teplota rastu (50–64 °C) je vyššia než optimálna teplota rastu baktérií v okolí (laboratórna teplota), ktoré sú schopné kontaminovať vzorky. Vďaka vyššej teplote je potom možné znížiť náklady na sterilizáciu, keďže pri kultivácii termofilných baktérií pri vyšších teplotách dôjde ku odstráneniu vzdušných kontaminantov, ktorých optimálna teplota pre rast je v oblasti bežnej laboratórnej teploty. Keďže nie je potrebné zahrievanie pre sterilizáciu, nie je následne potrebné ani chladenie na laboratórnu teplotu pri kultivácii, čo predstavuje veľkú výhodu pre výrobné prevádzky. V súčasnej dobe je však cena výroby týchto plastov päťkrát vyššia než syntetických. Cieľom vedeckej práce v tejto oblasti je preto výber najvhodnejšieho kmeňa baktérií a kultivačných podmienok pre zvýšenie produkcie PHA a dosiahnutia čo najvyššej kvality daného produktu [3].

Táto práca sa zmeriava na sedem kmeňov termofilných baktérií, ktoré sú predpokladanými producentami PHA, z toho sú štyri termofilné izoláty. Konkrétne *Chelatococcus composti* DSM 101465, *Chelatococcus shambunathii* DSM 18167, *Aneurinibacillus sp. H1* CCM 8960, termofilný izolát BZ (*Paenibacillus sp.*), termofilný izolát M7 (*Bacillus shackbetorii*), izolát 34 a *Termobacillus composti* DSM18 247. Hlavnú časť predstavuje meranie Ramanových spektier vybraných termofilov, ktoré poskytnú kvalitatívnu informáciu o prítomnosti PHB v bunkách

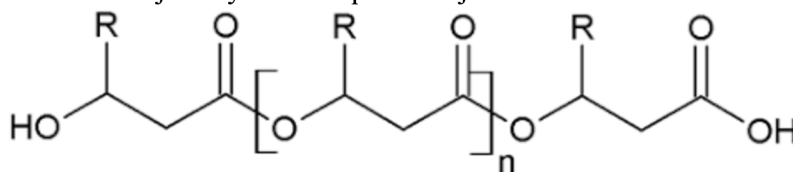
termofilov, identifikáciou spektrálnych pozícií Ramanovského pásu príslušiaceho PHB. Kvantitatívna informácia je výsledkom plynovej chromatografie.

Práca sa tiež zameriava na možnosť triedenia baktérií produkujúcich PHA od neproduktujúcich na základe vhodne zvoleného triediaceho parametra vybraného z nameraných Ramanových spektier. K tomuto výberu bakteriálnych buniek bola využitá Ramanovská pinzeta.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú alifatické polyestery hydroxyalkanoátov. V bunkách mikroorganizmov sa akumulujú ako intracelulárne granule na uchovávanie energie [2]. K tomuto 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 pH, teploty, tlaku a iné hodnoty odlišné od normálnych podmienok, čiže teploty v rozmedzí 20–25 $^{\circ}\text{C}$, neutrálneho pH (6–8), atmosferického tlaku a 20 % obsahu kyslíku v atmosfére. Granulovaná forma v cytoplazme je označovaná ako inklúzia a vo vodnom prostredí je nerozpustná. Jedná sa o opticky aktívne molekuly, v ktorých sa nachádzajú jednotky (*R*)-3-hydroxyalkánových kyselín. Všeobecná štruktúra polyhydroxyalkanoátu je zobrazená na obr. 1. Kde R je alkylová skupina a n je v rozmedzí 100–30 000. [4]



Obrázok 1: Všeobecná štruktúra PHA [5]

Z monomérov následne vznikajú polyméry, ktorých molekulová hmotnosť je vysoká – nachádza sa v rozmedzí 200 000 až 3 000 000 Da. Typ polyhydroxyalkanoátu a s ním súvisiaca molekulová hmotnosť je špecifická pre rôzne mikroorganizmy, ale rovnako závisí aj na zdroji uhlíku a okolitých podmienkach ako napríklad teplota alebo pH.

PHA sú zlúčeniny, ktoré majú napriek ich biologickému charakteru podobné vlastnosti syntetickým plastom. Nazývajú sa preto aj zelené plasty a majú pozitívny enviromentálny dopad, vďaka ich biokompatibilite a biologickej odbúrateľnosti [2]. Produkcia PHA je možná z rôznych obnoviteľných zdrojov, akými sú napríklad sacharidy (konkrétne napríklad sacharóza, glukóza, maniokový škrob alebo trstinová melasa), či oxid uhličitý [4]. Avšak ich najväčšou výhodou je, že ako jediné bioplasty sú celým produktom mikroorganizmov [3].

2.1.1 Rozdelenie

Deľba polyhydroxyalkanoátov je možná z viacerých hľadísk, ako napríklad dĺžky reťazca, alebo na základe biotechnologickej výroby. Pri technologickej výrobe rozlišujeme homopolyestery a heteropolyestery. Homopolyestery pozostávajú z jedného druhu monoméru. Zástupcom homopolymérov je napríklad poly(3-hydroxybutyrát), P(3HB), P(3HO) alebo poly(3-hydroxyoctanoát). Heteropolyestery sú tvorené monomérmi odlišných základných alebo postranných reťazcov. Zástupcom heteropolymérov je napríklad P(3HHx-co-3HO). Heteropolyestery následne vytvárajú kopolyestery. Polyhydroxyalkanoáty tvorené monomérmi odlišnými v postranných reťazcoch patria do skupiny terpolyesterov [1].

Delenie podľa dĺžky reťazca je potom nasledovne rozdelené podľa počtu uhlíkov v reťazci na krátke (scl – short chain length PHA, 3 až 5 atómov uhlíka), stredné (mcl – medium chain length PHA, 6 až 14 atómov uhlíka) a dlhé (lcl – long chain length PHA, 15 alebo viac atómov uhlíka) [1].

2.1.2 Fyzikálne a chemické vlastnosti polyhydroxyalkanoátov

Identifikovaných je celkovo viac ako 150 rôznych monomérov PHA, tento počet však stále narastá z dôvodu predstavovania nových typov PHA vďaka chemickej a fyzikálnej modifikácií

prirodzených molekúl PHA [6], alebo genetickou modifikáciou producentov PHA. Vo všeobecnosti sú najviac preskúmanými skupinami polyhydroxyalkanoátov homopolyméry s krátkym alebo stredne dlhým reťazcom. V *tabuľke č. 1* sú porovnané vlastnosti týchto dvoch skupín a uvedení hlavní zástupcovia týchto skupín [7].

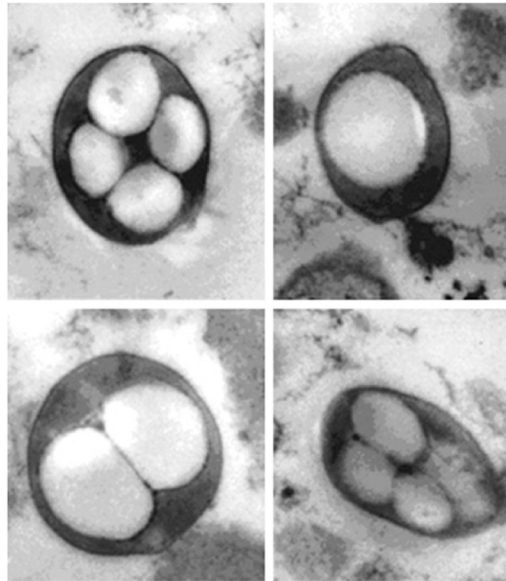
Tabuľka 1: Chemické a fyzikálne vlastnosti scl - PHA a mcl - PHA [7]

| vlastnosti | scl - PHA | mcl - PHA |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| Kryštalinita (%) | 80 | 40 |
| Bod topenia (°C) | 179 | 86 |
| Teplota skleneného prechodu (°C) | 4 | - 40 |
| Maximálne predĺženie (%) | 40 | 300 |
| Pevnosť v ťahu (Mpa) | 5 | 20 |
| Youngov modul (Gpa) | 3,5 | 1 – 2 |
| Hustota (g.cm ⁻³) | 1,25 | 1,05 |
| Odolnosť voči UV žiareniu | dobrá | dobrá |
| Odolnosť voči rozpúšťadlám | slabá | slabá |
| Biodegradabilita | dobrá | dobrá |
| Zástupcovia | 3-hydroxybutyrát, 3-hydroxyvalerát | 3-hydroxyhexanoát, 3-hydroxyoktanoát |

Svojimi vlastnosťami sú obe tieto skupiny podobné syntetickým formám plastu, akými sú napríklad polyetylén (PE) alebo polypropylén (PP) [8]. Pri polyhydroxyalkanoátoch s krátkym reťazcom dominuje termoplastický charakter (od určitej vyššej teploty je tento plast plastický čiže tvárny), kdežto pre polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom sú typické elastomerické vlastnosti. PHA sú netoxické a biodegradabilné, vďaka čomu nachádzajú podstatné uplatnenie vo farmaceutickom či potravinárskom priemysle [8].

2.1.3 Biosyntéza

Polyhydroxyalkanoáty sú produkované mnohými živými organizmami ako napríklad mikroorganizmami a transgénymi rastlinami. Prijateľné pre veľkovýrobu PHA sú rastliny a baktérie, avšak výťažky PHA z rastlinných buniek sú len veľmi nízke, nepresahujú 10 % hmotnosti. Je to spôsobené v dôsledku negatívneho vplyvu vyššej koncentrácie PHA na rast a vývoj rastliny. Na rozdiel od rastlín, v baktériách sú akumulované vysoké hladiny PHA a to až do 90 % hmotnosti v suchej bunkovej hmote. Výťažky nadobúdajú také vysoké hodnoty preto, že je to pre baktérie prirodzený spôsob ukladania uhlíka a teda energie. Ku hromadeniu takýchto polyesterov dochádza, keď baktéria vyčerpá zdroj dusíka, fosforu alebo kyslíka a počas toho má nadbytočné množstvo uhlíka. V bunkách baktérii vznikajú PHA vo forme granúl, keďže sú tieto látky nerozpustné vo vodnom prostredí. Na povrchu granúl sa nachádza vrstva proteínov. Na rozhraní granúl prevládajú proteíny triedy fazeíny, ktoré ovplyvňujú počet a veľkosť granúl PHA [9]. Príklad ako vyzerajú granule PHA v baktériách je zobrazená na *obrázku č. 2*.

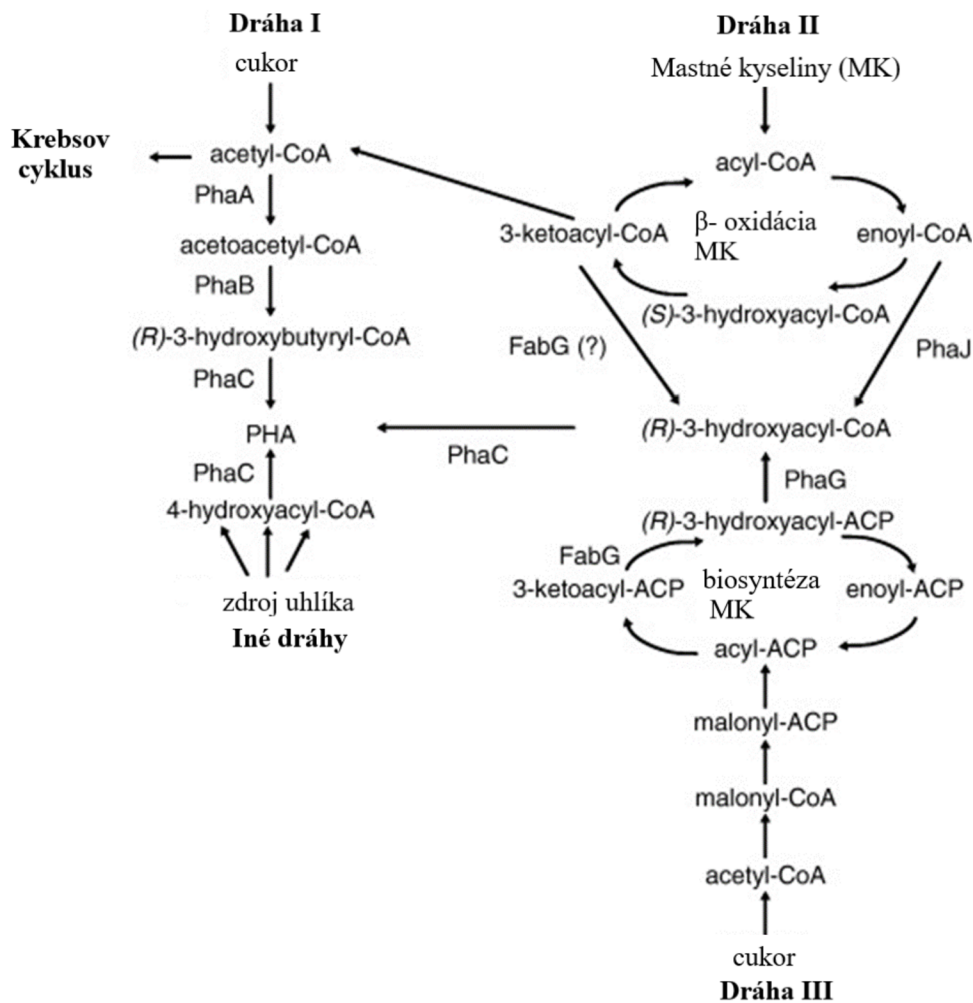


Obrázok 2: Fotka PHA granule (biela farba na obrázku) v baktérii (tmavšia oblasť na obrázku) z transmisného elektrónového mikroskopu [10].

Biosyntéza PHA granúl v bunke môže prebiehať rôzne. V závislosti na enzýme, ktorý katalyzuje vznik PHA, sú rozdelené metabolické dráhy syntézy PHA do troch skupín. Najznámejšia dráha je prvá, ktorá využíva ako zdroj uhlíka cukor. Kondenzáciou dvoch molekúl acetyl-CoA z Krebsovho cyklu z acetoacetylu- CoA vznikajú monoméne jednotky 3-hydroxybutyrátu (3HB). Acetoacetyl-CoA je redukovaný enzýmom Acetoacetyl CoA-reduktázou na 3-hydroxybutyryl-CoA. Následne enzým PHA syntáza katalyzuje cez esterifikáciu polymeráciu z 3-hydroxybutyryl-CoA na poly(3-hydroxybutyrát) [9].

β - oxidáciou mastných kyselín tvorí druhá dráha substrát, čiže 3-hydroxydecanoyl-CoA. Reakcia je katalyzovaná enzýmom transacylázou. Polymeráciou vzniká zo substrátu PHA [9].

Tretia dráha z uhlíkového zdroja ako napríklad fruktóza alebo glukóza vytvára monoméry PHA. Z β -oxidácie mastných kyselín vzniká intermediát (*R*)-3-hydroxyacyl, z ktorého transacyláciou vzniká CoA. Prehľad všetkých troch metabolických dráh je uvedený na obrázku č. 3 [9].



Obrázok 3: Metabolické dráhy syntézy PHA (*phaA* - β -ketothioláza, *phaB* - NADPH - dependentná acetoacetyl-CoA reduktáza, *phaC* - PHA syntáza, *phaG* - 3- hydroxyacyl-ACP:CoA transferáza, *phaJ* - (R)-enoyl-CoA hydratáza, *FabG* 3-ketoacyl-CoA reduktáza) [9].

2.1.4 Biodegradabilita polyhydroxyalkanoátov

Keďže polyhydroxyalkanoáty sú tvorené v mikroorganizmoch ako zásobné látky, v ktorých je viazaný uhlík, tak prirodzene vedú uhlík z PHA opätovne obnoviť. Kódovaná je pre tento účel intracelulárna PHA depolymeráza génom *phaZ*. Môže dochádzať aj ku extracelulárnej tvorbe PHA depolymerázy, ktorá slúži na rozkladanie PHA vo vonkajšom prostredí [2]. Ďalšími faktormi ovplyvňujúcimi rozklad PHA sú podmienky prostredia (napríklad teplota alebo pH), vlastnosti PHA, akými sú napríklad kryštalinita, rôzne využité prísady (napríklad valerát, alebo kombinovaním PHA s inými polymérmi, enzýmami a anorganickými materiálmi), alebo povrchová plocha PHA. Avšak je zrejmé, že všetky faktory ovplyvňujúce degradáciu spolu vzájomne súvisia. Kľúčové sú naprieč všetkému hlavne mikroorganizmy, ktoré vylučujú extracelulárnu depolymerázu PHA. Takéto mikroorganizmy sa nachádzajú v rôznych podmienkach. Napríklad v morskej vode je to baktéria *Comamonas testosteroni*, v pôde to je napríklad *Acidovorax faecilis*, v aktivovanom kale to sú *Alcaligenes faecalis* alebo *Pseudomonas*, v jazerách je zástupcom *Pseudomonas stutzeri*, dokonca v anaeróbnom kale to je *Ilybacter delafieldii*. Degradácia je pochopiteľne značne významný faktor pri určení využitia PHA v priemysle a pre životné prostredie [11].

2.1.5 Využitie polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty nachádzajú široké uplatnenie vzhľadom na ich biologickú odbúrateľnosť a možnosť vytvárať bioplasty s touto vlastnosťou. PHA zapadá do myšlienky zelenej ekonomiky a to vďaka potenciálu nahradiť výrobu plastov z fosílnych zdrojov. Avšak dôležitým je rovnako uplatnenie v oblasti lekárskeho a farmaceutického priemyslu a to práve vďaka ich biologickej odbúrateľnosti, čo je využívané pri stehoch, spojovacích materiáloch, skrútkách, či kostných náhradách v ortopédii [2]. Podstatné sú avšak v tejto oblasti aj kardiovaskulárne náplasti, alebo implantáty očných buniek, či náhrady kože. Pre farmáciu sú vhodnými nanonosičmi pre transport liekov a ich cielené uvoľňovanie. Využitie nachádzajú taktiež v poľnohospodárstve, kde tvoria film so zavedenými herbicídmi, ktorý umožňuje ich postupné uvoľňovanie a vstrebanie do pôdy [13].

2.2 Termofilné mikroorganizmy

2.2.1 Charakteristika

Jedným zo základných podmienok pre život je vhodná teplota prostredia, v ktorom sa mikroorganizmus nachádza. Kategória organizmov adaptovaných na život vo vysokých teplotných podmienkach sa nazýva termofilná. Termofilné mikroorganizmy často nachádzame v rôznych geotermálne vyhrievaných oblastiach, akými sú komposty, rašeliniská, či rôzne geotermálne pramene, ale taktiež aj v púštnych pieskoch, morských prepasliskách, odpadových vodách, či v jedle. Optimálna teplota pre rast týchto baktérií sa nachádza v rozmedzí od 55 do 80 °C (maximálna teplota pre rast je vyššia 50 °C pre všetky termofilné mikroorganizmy). Baktérie sú charakterizované taktiež podľa toho, či sú gram-pozitívne, či gram-negatívne, keďže sa od toho odlišuje charakter štruktúry bunkovej steny. Termofilné baktérie sa však hlavne vyznačujú ich špecifickým adaptačným mechanizmom, ktorý slúži na prežitie pri vysokých teplotách. Pod týmto adaptačným mechanizmom rozumieme napríklad membránové lipidy, ktoré obsahujú éterovú väzbu, sú nasýtené, majú vysokú molekulovú hmotnosť a sú vetvené. Taktiež dochádza k vysokej organizácii hydrofóbnych reakcii, zvýšenej odolnosti DNA vďaka enzýmu – reverznej gyráze a využitiu soľných mostíkov. Podstatná je tiež zvýšená koncentrácia párov G-C v nukleových kyslinách, ktoré sú viazané tromi vodíkovými väzbami, naproti párom A-T, ktorých vodíkové väzby sú len dve. A v neposlednom rade taktiež zabezpečenie resyntézy molekúl ATP a NAD, ktoré sa pri vysokých teplotách rozkladajú [12].

2.2.2 Rozdelenie a podmienky pre život

Termofilné mikroorganizmy je možné rozdeliť na základe rôznych kritérií. Jedným z delení je podľa teploty rastu. Mikroorganizmy, ktorých rast nastáva pri teplote 50–64 °C sa nazývajú termofilné. Extrémne termofilné sú mikroorganizmy rastúce pri teplote v rozmedzí 65–79 °C. Skupina nazývajúca hypertermofilná dokáže rásť pri teplotách vyšších ako 80 °C. Z fylogenetického hľadiska sú však termofilné mikroorganizmy radené do skupiny baktérie a hypertermofilné mikroorganizmy spadajú do skupiny archea. Termofili však môžeme rozdeliť aj podľa iných kritérií, napríklad na gram-pozitívne, či gram-negatívne. Na základe tvaru môžeme rozdeliť baktérie na špirálovité, valcovité, guľovité alebo termofilné [14].

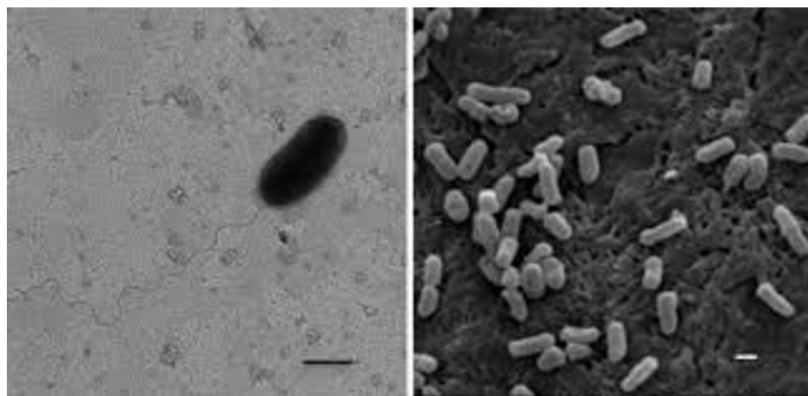
Ku príkladom termofilných mikroorganizmov, čiže baktérií patria napríklad rady *Thermotogales*, *Aquificales*, *Thermoanaerobacteriales*, *Sphingobacteriales*, *Dictyoglomales* a *Thermales*. Ku príkladom hypertermofilných mikroorganizmov, čiže archeí patria napríklad rady: *Sulfolobales*, *Thermoproteales*, *Desulfurococcales*, *Thermococcales* a *Archaeoglobales*.

Konkrétnym príkladom je napríklad baktéria *Thermus aquaticus*, ktorá je zdrojom tepelne odolného enzýmu Taq DNA polymerázy, využívanej v DNA amplifikačnej technike polymerázovej reťazovej reakcie [15]. Fotosyntetickou baktériou je napríklad *Chloroflexus aurantiacus*, ktorý pri kultivácii v tme má oranžovú farbu, avšak pri kultivácii na slnečnom svetle je tmavozelená [16].

2.3 Vybrané baktérie pre meranie

2.3.1 *Chelatococcus composti*

Baktéria *Chelatococcus composti* bola prvýkrát izolovaná z penicilínových fermentačných zvyškov húb pomocou kompostu z bravčového hnoja. Fylogenetickou analýzou na základe porovnání génových sekvencií 16S rRNA s baktériou *Chelatococcus daeguensis* bola zistená podobnosť na 98,9 %, s baktériou *Chelatococcus Sambhunathii*, s baktériou *Chelatococcus caeni* 98,4 % a s *Chelatococcus asccharovorans* 96,0 %. Na základe týchto zistení bola zaradená k rodu *Chelatococcus*. Bunky kmeňa PC-2T sú tyčinkovitého tvaru, ako je možné vidieť na obrázku č.4. Gramovo farbenie vykazuje negatívne výsledky. Baktéria sa pohybuje vďaka jednému polárnemu bičíku, ktorý je 0,8–1,0 µm široký a 1,8–2,8 µm dlhý. Kolónie baktérie sú kruhového tvaru, sú lesklé, hladké, stredne žlté a s priemerom 0,8–2 mm po naočkovaní na LB agar po dobu 2 dní pri 40 °C. Optimálna teplota pre rast baktérie je v rozmedzí 35–40 °C, avšak dokáže rásť v rozmedzí teplôt 20–60 °C. V testoch na katalázu je baktéria pozitívna, rovnako je pozitívna aj pri stanovení enzymatickej aktivity oxidázy a katalázy. Ku rastu dochádza v rozmedzí pH 5,5–10,0, avšak optimálna hodnota je 7,5–8. Podstatná je avšak aj prítomnosť vhodnej koncentrácie chloridu sodného (NaCl). Pri koncentráciách v rozmedzí 0–4 % chloridu sodného dochádza ku rastu baktérie *Chelatococcus composti*, avšak optimálna koncentrácia pre rast baktérie je 0–1 % [17].



Obrázok 4: Zobrazenie transmisióneho elektrónového mikrografu baktérie *Chelatococcus composti* [17]

2.3.2 *Chelatococcus shambunathii*

Bakteriálny kmeň TH4^T bol vďaka viacfázovej taxonomickej štúdiu zaradený do rodu *Chelatococcus*. Izolovaný bol prvýkrát z horúceho prameňa v Athamallik, Orisaa v Indii. Výskum bakteriálnych druhov z horúcich prameňov je dôležitý kvôli biochémii a extrémnym podmienkam, v ktorých sa tieto baktérie nachádzajú. Baktéria *Chelatococcus shambunathii* má tyčinkovitý tvar, ako je možné vidieť na obrázku č.5. Gramovo farbenie vykazuje negatívne výsledky. Je to baktéria vytvárajúca hladké kruhové kolónie, ktorých charakter je mukoidný. Baktéria dokáže rásť v podmienkach v rozsahu 20–50 °C, avšak ideálna je teplota medzi 37–42 °C. Prežiť dokáže v rozsahu pH 6–8,5, avšak optimum je medzi 7,5–8. Testy na katalázu a aktivitu oxidázy a katalázy sú pozitívne [18].



Obrázok 5: Elektronový mikrogram bunky baktérie TH4^T [18]

2.3.3 *Aneurinibacillus* sp. H1

Jedná sa o grampozitívnu baktériu, ktorá optimálne rastie pri teplote medzi 45 a 50 °C a je schopná produkovať rôzne polyméry scl-PHA s možnými variáciami zloženia monoméru. Jedná sa o mierne termofilnú baktériu. Výhodnou vlastnosťou baktérie je schopnosť syntetizovať kopolyméry a terpolyméry PHA, čo je vhodný predpoklad pre potencionálnu výrobu PHA v priemysle [19]. Rôzne zloženie monomérov ovplyvňuje následne fyzikálno-chemické vlastnosti materiálov. Pri nižšom zastúpení monomérov PHA v polymérom reťazci dochádza ku kvalitatívnej a kvantitatívnej zmene kryštalinity PHA, čo znamená, že sa zmení typ mriežky alebo stupeň kryštalinity. Rovnako sa dá vďaka vhodnej kompozícii monomérov meniť odolnosť materiálu pre tepelnú alebo enzymatickú degradáciu [21].

2.4 Ramanova spektroskopia

Ramanova spektroskopia je analytická metóda, ktorá na základe nepružného rozptylu svetla na atómoch alebo molekulách analyzovanej vzorky umožňuje získať informácie o jej štruktúre. Výstupom z analýzy je potom ramanovské spektrum. Toto spektrum je zvyčajne vynášané v Ramanovských posunoch (Raman shift) v jednotke [cm^{-1}], ktoré sú zvyčajne vzťahované 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 tiež pri selektovaní jedincov s vysokým obsahom PHB na základe vhodne zvoleného triediaceho parametra [20].

2.4.1 Princíp

Ramanova spektroskopia je rýchla nedeštruktívna metóda. Jej princíp spočíva v meraní rozptýleného žiarenia. Toto žiarenie vzniká interakciou monochromatického žiarenia so vzorkou [22].

Žiarenie dopadajúce na hmotu môže byť rozptýlené, absorbované a znovu vyžiarené. Rozptyly sú ďalej delené podľa frekvencie rozptylu na dva typy. Elastický rozptyl t.j. Rayleighov rozptyl je jav, pri ktorom pri interakcii svetla s molekulami sa svetlo rozptyľuje s rovnakou energiou ako má dopadajúce svetlo. Takto rozptýlené svetlo má zhodnú energiu ako svetlo dopadajúce. Malá časť, približne $1 \text{ z } 10^6$, rozptýleného svetla má inú energiu/ frekvenciu [23]. Takýto jav sa nazýva neelastický rozptyl alebo Ramanov jav, pomenovaný po Sirovi C.V. Ramanovi, ktorý prvý predpovedaný jav experimentálne overil [24]. Nepružný rozptyl je dôsledok interakcie svetla s hmotou, kedy dochádza k prenosu energie medzi svetlom a látkou.

Nasť môžu dve možnosti a to buď má rozptýlené svetlo energiu nižšiu – čiže hovoríme o Stokesovom žiarení, kde je časť energie svetla odovzdaná hmote, alebo druhá možnosť, kedy je energia rozptýleného žiarenia vyššia, čiže hmota odovzdala časť svojej energie žiareniu – čiže hovoríme o Antistokesovom žiarení. Ramanov jav dáva používateľovi informáciu o štruktúre molekuly a jej interakcií s inými molekulami v jej okolí [23].

Ramanovo spektrum je znázorňované ako závislosť intenzity rozptýleného žiarenia na Ramanovom posune [cm^{-1}] vzťahnuté k budiacej vlnovej dĺžke. Ramanov posun môžeme chápať ako energetický rozdiel medzi dopadajúcim, tj. laserovým svetlom a rozptýleným, tj. detekovaným svetlom [25]. Ramanov posun je potom mierou energie potrebnej ku zmene vibračného stavu molekuly a je nezávislý na vlnovej dĺžke lasera [26].

Ramanovské aktívne vibrácie sú podmienené zmenou polarizovateľnosti molekúl, čo je typické pre nepolárne časti molekúl, čoho dôsledkom sú v Ramanovom spektre výraznejšie prejavované pásy vibrácií nepolárnych väzieb, ktorých polarizovateľnosť je pri vibrácií výrazne zmenená. Intenzita Ramanových pásov je charakterizovaná ich výškou alebo plochou pri kvantitatívnej analýze [26].

2.4.2 Vyhodnotenie spektier – odstránenie pozadia, analýza hlavných komponentov

Jednou z komplikácií v analýze Ramanových spektier mikroorganizmov je prítomnosť relatívne vysokého fluorescenčného pozadia. To vyžaduje využitie špeciálnych matematických postupov na spracovanie meraného signálu. Jedným z takýchto postupov je Rolling- Circle Filter (RCF) – spektrálny filter s rotujúcim kruhom. Metóda je založená na rozdielnej pološírke Ramanových čiar a fluorescenčného pozadia. V jednoduchosti dôjde ku vytvoreniu kruhu, ktorý sa valí pod spektrom a odčíta fragmenty krivky, ktorých polomer zakrivenia je väčší ako r – polomer, ktorý je závislý na tvare pozadia. Pri určitom vhodnom polomere kruhu sa pozadie odčíta, zatiaľ čo Ramanove čiary zostanú nezmenené [27].

PCA – analýza hlavných komponentov je matematická štatistická metóda využívajúca ortogonálnu transformáciu na prevedenie prvkov množiny pozorovaní, kde je možnosť, že sú korelované, na prvky takej množiny, ktoré sú lineárne nekorelované. Následne sú označované ako hlavné komponenty. Pri analýze takýchto komponentov je následne zámerom nájsť takú množinu lineárnych kombinácií pôvodných premenných, ktorá zachová čo najviac pôvodných informácií, ale zároveň jej dimenzia bude menšia alebo nanajvyš rovná ako dimenzia pôvodnej množiny. Takýmto postupom je možné študovať štatistický problém v podpriestore s menšou dimenziou. Využitie ortogonálnej transformácie znamená, že je využívaná metóda, vďaka ktorej majú prvé hlavné komponenty najväčšiu variáciu (sú zoradené zostupne) spomedzi všetkých možných lineárnych kombinácií vektora pozorovaní [28]. Metóda slúži na rozlíšenie jednotlivých biomolekúl, druhov organizmov, kmeňov popr. Kmeňov s rôznymi vlastnosťami (napr. schopnosťou tvoriť biofilm) [29].

2.4.3 Aplikácie Ramanovej spektroskopie

Ramanova spektroskopia je aktuálne široko využívaná metóda, ktorá sa používa v rôznych priemyselných aplikáciách (napríklad pri procese kryštalizácie, identifikácie polymorfie, reakciách polymérov, chemických syntézach, či taktiež napríklad pri enzymatickej katalýze) [30, 31, 32]. Praktické uplatnenie nájdeme aj vo forenzných vedách, kde je využívaná pri analýze drog, farmaceutík (rýchla metóda na overenie kvality liekov s nedeštruktívnymi vlastnosťami), farbív alebo vlákien. Rovnako podstatná je následne aj v serológii, kde pomocou tejto metódy dochádza ku určaniu, či sa jedná o ľudskú alebo zvieraciu krv [33]. V oblasti mineralógie je používaná na identifikáciu minerálov [34]. Zaujímavou je taktiež oblasť štúdia

starnutia záznamových prostriedkov, kde je Ramanova spektroskopie využívaná na určenie, či dokumenty starli vplyvom tepelného alebo svetelného starnutia bez poškodenia vzorky, čím je účinnou metódou na zisťovanie pravosti dokumentov [35]. Ramanovu spektroskopiu je taktiež možné využiť na identifikáciu baktérií [36, 37], čo nachádza uplatnenie následne pri klinickej liečbe, ktorá sa pre jednotlivé druhy líši. Príkladom je identifikácia stafylokokov [38] alebo identifikácia schopnosti vytvárať biofilm u bakteriálnych a kvasinkových kmeňov [39]. Perspektívne sú tiež využitia tejto metódy v oblasti štúdia univerzálnej diagnostiky rakoviny už v počiatočnom štádiu [40].

2.4.4 Optické chytanie v kombinácii s Ramanovou spektroskopiou

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 Ramanova 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. V poslednej dobe je Ramanova pinzeta používaná v rôznych aplikáciách v bunkovej biológii ako nástroj na bezkontaktné a nedeštruktívne stanovenie vlastností živých buniek [43]. Biologické 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 spektroskopie. Vďaka jej schopnosti detekovať látky v malom množstve vzorky a zároveň použitím optického zariadenia poskytuje dostatočný čas pre získanie Ramanových spektier práve v jednej bunke. Tieto schopnosti nachádzajú využitie nie len v bunkovej biológii ale aj napríklad pri štúdiu aerosólov a mikrovkapiiek, 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].

2.4.5 Ramanov sorter a jeho využitie

Mikrobiálne bunky a ich enzýmové produkty sprostredkujú mnoho biologických procesov. Získ týchto buniek a produktov je však značne náročný, keďže sa jedná o bunky v pohybe (v dôsledku invázie zapríčinennej delením buniek, Brownovského pohybu v médiu alebo tokom v mikrofluidnom čípe), o mikrometrových rozmeroch a často ťažko kultivovateľné. Samotná kultivácia a testovanie bakteriálnych buniek môže zaberať až 3 dni (v závislosti od mikroorganizmu), k analýze pomocou Ramanovskej pinzety je však potrebné len niekoľko desiatok buniek, čo umožňuje značne skrátiť kultivačný proces. Ďalšia možná aplikácia Ramanovskej pinzety je Ramanovský sorter, ktorý v kombinácii s mikrofluidnými čípmi dokáže triediť jednotlivé bunky na základe Ramanovskej odozvy [42].

Využitie Ramanovho sorteru je prevažne v oblasti identifikácií baktérií a jednotlivých buniek a ich triedení. Využitím Ramanovho triedenia bola vysvetlená úloha morskej „mikrobiálnej tmavej hmoty“ v globálnom cykle uhlíka prostredníctvom kultivácie druhov *Synechococcus* spp. a *Pelagibacter* spp na aktivity fixácie a toku uhlíka *in situ*. Ramanovo triedenie a metagenomické sekvenovanie odhalilo baktérie viažuce uhlík v oceáne [44].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité baktérie, chemikálie, prístroje a materiál pri meraní

3.1.1 Baktérie

Pre prvú časť experimentálnej práce bolo vybraných sedem bakteriálnych vzoriek a to konkrétne *Chelatococcus composti* DSM 101465, *Chelatococcus shambunathii* DSM 18167, *Aneurinibacillus sp.* H1 CCM 8960, termofilný izolát BZ (*Paenibacillus sp.*), termofilný izolát M7 (*Bacillus shackbetorii*), izolát 34 a *Termobacillus composti* DSM18 247.

Pre druhú časť boli zvolené *Cupriavidus necator* H16 DSM428 a jeho mutant PHB-4 NCIMB 11599.

3.1.2 Chemikálie

- Nutrient Broth w/1% peptone (HiMedia,IND)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- KH_2PO_4 , Lachner
- NH_4Cl , Lachner
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- Fe(III)NH_4 -citrát, Fluka
- Yeast Extract Powder (HiMedia, IND)
- Glycerol, Lachema
- Chloroform, Lachner
- Roztok Tes II
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- ZnCl_2 , Lachner
- FeCl_3 , Lachner
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- $\text{MnCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- H_3BO_3 , Lachner
- EDTA, Lachner
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Lachema
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, Lachner
- HCl , Lachner
- NaOH , Lachner

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.
- Vortex TK3S, Kartell spa

- Centrifúga Hettich Zentrifugen
- Mikrocentrifúga Sigma 1-14
- Nanofotometr P 300, (Implen)
- Plynový chromatograf s FID, (Thermo Scientific, Trace 1300; kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm)
- Ramanov mikroskop, Renishaw, inVia
- Ramanov sorter
- Bežné laboratórne sklo a vybavenie

3.1.3.1 Ramanov spektrometer Renishaw inVia

V oboch častiach merania bol použitý disperzný Ramanov spektrometer Renishaw inVia, ktorý je zobrazený na obrázku č.6. Ktorého spektrálny rozsah je od UV po IR a to od 200 nm do 1 700 nm. Technická špecifikácia zariadenia je nasledovná:

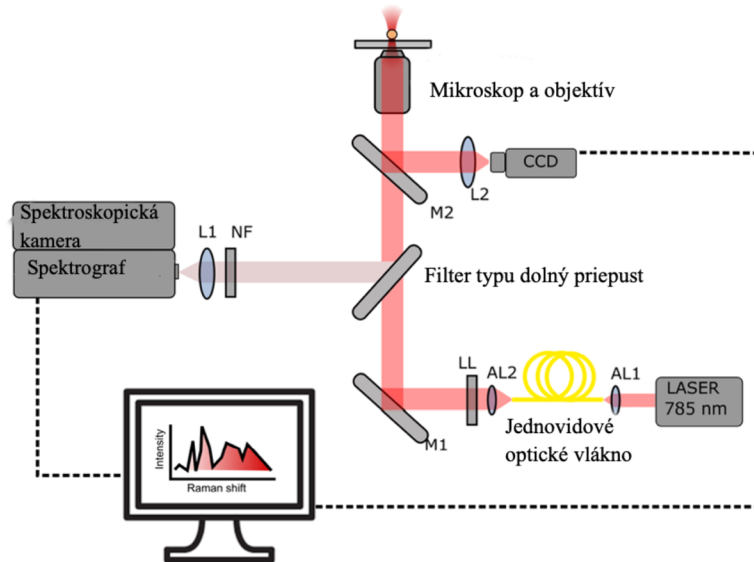
1. Prístroj má viacero excitačných laserov o rôznych vlnových dĺžkach, každý z nich má vlastnú optickú dráhu, ktorá je optimalizovaná pre VIS, NIR alebo IR excitáciu a teda dosiahnutie čo najlepšieho pomeru signál/šum v Ramanovom spektre. Prepínanie medzi lasermi je automatické pomocou softwaru. Excitačné lasery sú nasledovné:
 - 532 nm – diódový DPSS laser o maximálnom výkone 50 mW, laser je chladený vzduchom so zabudovaným plazma filtrom ,
 - 785 nm – diódový NIR laser o maximálnom výkone 300 mW, chladený vzduchom
2. Prístroj má pre excitačné lasery Rayleighové hranové filtre s hranou maximálne 100 cm^{-1} od excitačných línií laserov.
3. Spektrálne rozlíšenie prístroja je vyššie než 1 cm^{-1} (FWHM – full width at half maximum) [45].



Obrázok 6: Ramanov spektroskop využitý pre meranie Ramanovských spektier v experimentálnej časti.

3.1.3.2 Ramanov sorter

Ku triedeniu v Ramanovom sorteri (LTRS – Laser Tweezers Raman Spectroscopy [54]) dochádza na základe Ramanovských spektier z jednotlivých buniek. Ramanovým spektrom dochádza k odhaleniu určitej metabolickej funkcie, napríklad druh produkovaných olejov alebo fixovaný pomer oxidu uhličitého. Výhodou je však, že nedochádza ku zničeniu bunky. A na základe ramanovských signatúr dochádza ku triedeniu buniek v LTRS [42]. Na obrázku č. 7 je uvedená schéma aparatury Ramanovského sorteru.



Obrázok 7: Schéma aparatury Ramanovho sorteru, kde L_x je označenie šošoviek, M_x označenie zrkadiel, NF je notch filter

Pre budenie Ramanovho rozptylu a optické zachytenie je používaný jeden laserový lúč. Zorné pole Ramanovského mikroskopu bolo zobrazené pomocou štandardnej CCD kamery cez zrkadlo M2 a zaostrené šošovkou L2. Zorné pole mikroskopu bol približne 100 μm na 100 μm .

3.2 Kultivácia baktérií

3.2.1 Príprava inkubačného média

Inkubačné média pre bakteriálne kmene a termofilné izoláty boli pripravené využitím komplexného média Nutrient Broth, ktoré sa skladá z mäsového peptonu v koncentrácii 10 g/l, hovädzieho extraktu v koncentrácii 10 g/l a chloridu sodného v koncentrácii 5 g/l. Inkubačné média boli pripravené v objeme 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baniek v dvoch paralelných prevedeniach. Pripravené komplexné média boli sterilizované a následne temperované na temperovanej trepačke na 50 °C pri rýchlosti 180 rpm.

Inkubačné média pre druhú časť boli rovnako pripravené v objeme 50 ml do 100 ml Erlenmeyerových baniek v dvoch paralelných prevedeniach. Pripravené komplexné média boli sterilizované a následne vychladené na laboratórnu teplotu.

3.2.2 Príprava inokula

Inokulum pre termofilné baktérie a izoláty pre prvú časť bolo pripravené do Erlenmeyerových baniek s pripraveným inkubačným médiom. Baktérie boli následne zaočkované

z kryoskúmaviek do sterilného inkubačného média. Takto pripravené banky boli vložené do temperovanej trepačky pri 50 °C pri rýchlosti 180 rpm do ďalšieho dňa.

Inokulá pre druhú časť merania, čiže pre *Cupriavidus necator* H16 a pre jeho mutanta PHB-4, boli pripravené rovnakým spôsobom s rozdielom temperovanej teploty, ktorá bola 30 °C.

3.2.3 Príprava produkčného média

Pre všetky bakteriálne kmene z prvej časti bolo zvolené minerálne (chelatococové) médium. Minerálne médium bolo pripravené pre dve paralelné stanovenia pre jednotlivé baktérie do 100 ml Erlenmayerovej banky v objeme 50 ml. Rozdiel v zložení média bol pri baktérii *Termobacillus composti*, kde nebol použitý dihydrogén, keďže jeho pridaním by začalo dochádzať ku nežiadúcemu vzniku pufu, čím by bolo znemožnené upraviť pH na potrebnú hodnotu 9 a následne by došlo ku popukaniu baktérií. Pre všetky baktérie bolo pripravené minerálne médium so zložením uvedeným v tabuľke č.2.

Tabuľka 2: Zloženie minerálneho média

| Látka | Hmotnosť [g] | Objem [ml] |
|--|------------------|------------|
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 6,3 | |
| NH ₄ Cl | 0,7 | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,14 | |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 0,014 | |
| Fe (III) NH ₄ – citrát | 0,00084 | |
| KH ₂ PO ₄ | 0,9 (na 600 ml) | |
| Yest extract | 0,35 | |
| Tes II | | 0,7 |
| Destilovaná voda | | 700 |

TES II je roztok stopových prvkov, v ktorom sa na 1 000 ml destilovanej vody nachádza 50,00 g EDTA, 13,80 g FeCl₃ · 6 H₂O, 0,84 g ZnCl₂, 0,13 g CuCl₂ · 2 H₂O, 0,10 g CoCl₂ · 6 H₂O, 0,016 g MnCl₂ · 6 H₂O a 0,10 g H₃BO₃. Tento roztok bol do médií pridaný až po sterilizácii.

Pripravené produkčné média spolu s glycerolom o koncentracii 20 g/l pre baktérie *Aneurinibacillus sp.* H1 a *Termobacillus composti* boli sterilizované. V bankách pre *Termobacillus composti* bolo upravené pH na 8,99 pomocou hydroxidu sodného.

Následne boli bakteriálne inokulá preočkované do pripravených minerálnych medií a pre dosiahnutie biomasy s vysokým obsahom zdroja uhlíka boli do zmesi pridané sacharidy a to nasledovne podľa tabuľky č.3.

Tabuľka 3: Prehľad pridaných substrátov

| Baktéria | Substrát | Koncentrácia [g/l] |
|----------------------------------|----------|--------------------|
| <i>Chelatococcus composti</i> | glukóza | 20 |
| <i>Chelatococcus shambunathi</i> | fruktóza | 20 |
| <i>Aneurinibacillus sp.</i> H1 | glycerol | 20 |
| <i>Paenibacillus sp.</i> BZ | glycerol | 20 |
| <i>Bacillus shackbetorii</i> M7 | glycerol | 20 |
| <i>Izolát 34</i> | glycerol | 20 |
| <i>Termobacillus composti</i> | glycerol | 20 |

Sterilizácia zásobných roztokov a roztoku TES II prebehla samostatne. Do jednotlivých pripravených medií boli pridané potrebné látky a následne prebehlo zaočkovanie príslušných baktérií z inokulá v množstve 5 obj. % v sterilných podmienkach laminárneho boxu. Následne

boli média kultivované na temperovaných trepačkách pri stabilnej teplote 50 °C 72 hodín a 180 rpm.

Pre druhú časť a teda baktérie *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutant PHB-4 bolo pripravené produkčné médium so zložením uvedeným v *tabuľke č.4*. Médium bolo pripravené o objeme 100 ml do 250 ml Erlenmayerových baniek v paralelnom prevedení. Do jednotlivých médií bolo očkovaných 5 obj. % kultúry.

Tabuľka 4: Zloženie produkčného média

| Látka | Hmotnosť [g] | Objem [ml] |
|--|--------------|------------|
| Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O | 5,55 | |
| KH ₂ PO ₄ | 0,51 | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,1 | |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,5 | |
| MES | | 0,1 |
| Destilovaná voda | | 500 |
| Fruktóza (400 g/l) | | 5 |

Roztok MES je roztok stopových prvkov, ktorý mal koncentráciu 40 g/100 ml. V roztoku MES sa na 1 000 ml 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.

3.3 Použité metódy

3.3.1 Spektrofotometrické a gravimetrické stanovenie biomasy

Pre gravimetrické stanovenie boli pripravené pre jednotlivé vzorky po 3 skúmavky obsahujúce 10 ml vzorky. Tieto vzorky boli následne centrifugované pri 6 000 rpm po dobu 5 minút. Po stočení bol odliaty supernatant a následne priliatých 10 ml destilovanej vody na premytie vzorky premiešanej na vortexe. Vzorky boli následne opätovne v centrifúge po dobu 5 minút pri 6 000 otáčkach. Vzorky boli vysušené pri 70 °C do konštantnej hmotnosti. Takto vysušené biomasy boli následne zvážené pre stanovenie koncentrácie baktérií vo vzorke.

Spektrofotometrické stanovenie obsahu biomasy vo vzorke sa nevyznačuje vysokou presnosťou. Z toho dôvodu bolo to meranie využité pre orientačný charakter zistenia obsahu biomasy vo vzorkách pomocou zrovnania. Intenzita zákalu na spektrofotometri bola meraná pri vlnovej dĺžke 630 nm voči blanku, ktorý predstavovala destilovaná voda. Pre meranie bolo potrebné vzorky nariediť do 1 ml kvety. Vzorky boli merané v kvete s optickou dráhou dlhou 1 cm.

3.3.2 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia udáva kvalitatívnu aj kvantitatívnu pre stanovenie polyhydroxyalkanoátov vo vysušenej biomase. Pre toto meranie bol využitý plynový chromatograf s plameňovo ionizačným detektorom, ktorý je schopný merať metylestery, ktoré boli získané z 3-hydroxyalkánových kyselín získaných naštiepením polymérov. Princípom metódy je kyslo katalyzovaná hydrolýza polyesteru a nasledujúca transesterifikácia vzniknutých monomérnych jednotiek.

3.3.2.1 *Príprava vzoriek*

Príprava vzoriek pre GC-FID analýzu prebehla pripravením navážok vzoriek v rozmedzí 8–10 mg do krimpovacích vialiek na analytických váhach. Následne pre esterifikáciu bolo pridaných 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnútorného štandardu zloženého z 15 % kyseliny sírovej, 5 mg/ml kyseliny benzoovej doplnenej metanolom. Vialky boli zazátkované a vložené do termobloku, kde prebiehala po dobu 3 hodín pri teplote 94 °C esterifikácia. Následne boli vialky vybrané a ponechané na vychladnutie pri laboratórnej teplote. Po ochladení boli vialky odzátované a prevedené do skutkovacích vialiek s 0,5 ml 50 mM roztoku NaOH, ktorý slúžil na neutralizáciu kyseliny sírovej. Premiešaním roztokov došlo ku extrakcii polutantov analytu do vodnej fáze. Následne prebehlo rozdelenie a ustálenie fáz, vďaka čomu mohlo byť odpipetovaných 50 µl chloroformovej fázy do nových vialiek obsahujúcich 0,9 ml isopropylalkoholu. Táto fáza sa nachádzala pod vodnou fázou a obsahovala metylestery 3-hydroxyalkánových kyselín. Takto pripravené vzorky boli následne analyzované na plynovom chromatografe s FID detektorom.

3.3.2.2 *Príprava vzoriek pre Ramanovu spektroskopiu*

Jednotlivé bunečné kultúry boli kultivované podľa postupu vyššie. Následne boli skoncentrované vzorky stočené na centrifúge pri 6 000 otáčkach po dobu 5 minút napipetované, na sklo z fluoridu vápenatého, z dôvodu potlačenia fluorescenčného pozadia od skla na 785 nm. Pre každú kultúru boli napipetované tri vzorky kvapky po 2 mikrolitre okrem *Aneurinibacillus sp.* H1, kde boli vzorky pipetované po 3 mikrolitre.

3.3.3 **Ramanova spektroskopia v kombinácií s optickou pinzetou**

Ako už bolo popísané v predchádzajúcej časti – Ramanovska pinzeta je analytický nástroj, ktorý využíva optické sily ku zachyteniu objektu a súčasne je zachytený objekt analyzovaný pomocou svojej Ramanovskej odozvy [46]. Optické sily pôsobiace na objekt môžeme rozdeliť do dvoch zložiek a to na silu *rozptylovú* a *gradientnú* [46]. *Rozptylová* sila pôsobí v smere šírenia zväzku, čiže je zodpovedná za akceleráciu objektu v smere šírenia optického zväzku. *Gradientná* sila pôsobí v smere gradientu intenzity elektromagnetického poľa. Pri optickej pasci konštruovanej pomocou silne fokusovaného zväzku je gradientná optická sila zodpovedná za 3D zachytávanie častice. Ku konštrukcii optickej pinzety je teda nutné, aby gradientna sila bola väčšia než sila rozptylová [46]. To bolo dosiahnuté fokusáciou optického zväzku mikroskopovým objektívom s vysokou numerickou apertúrou (NA). Experiment bol nameraný na aparátúre postavenej v laboratóriu Ústavu prístrojové techniky Akadémie vied České republiky. Detaily aparatury sú uvedené na *obrázku č. 7*. Obrázok jednotlivej bunky zachytenej v Ramanovej pinzete je na *obrázku č. 8*.



Obrázok 8: Bunka zachytená v Ramanovej pinzete pri zornom poli 100 x 100 μm

3.3.3.1 Príprava vzoriek

Presný postup prípravy vzoriek bol uvedený vyššie v časti 3.2. Vzorky pre meranie na komerčnom Ramanovom spektrometre Renishaw boli zahustené a napipetované na CaF_2 sklo, na ktorom boli následne sušené v sušiarňi pri teplote 70°C do konštantnej hmotnosti. Vzorky pre meranie na Ramanovom sorteri boli pripravené do destilovanej vody. Takto pripravené vzorky boli ešte následne ďalej riedené demineralizovanou vodou vzhľadom na potrebu oddelenia jednotlivých buniek pri meraní.

3.3.3.2 Meranie na Renishaw in Via

Ramanova spektroskopia poskytuje informácie o intramolekulárnych a intermolekulárnych vibráciách. V tejto práci bola využitá pre kvalitatívnu analýzu.

Meranie termofilných baktérií bolo realizované s objektívom o zväčšení 20krát. Pri meraní baktérií *Cupriavidius necator* bol použitý objektív o zväčšení 50krát. Aj napriek rozdielnemu zväčšeniu objektívu bola laserová stopa dostatočne veľká, aby Ramanovské spektrum bolo odozvou mnohých baktérií a výsledné spektrum môžeme chápať ako odozvu mnohých bakteriálnych buniek. Na oba typy vzoriek (termofilné baktérie a *Cupriavidius necator*) bol použitý červený laser o vlnovej dĺžke 785 nm, ktorý bol vyhodnotený za najvhodnejší z dôvodu najnižšieho fluorescenčného pozadia (vzhľadom k možným laserovým zdrojom). Z každej vzorky kvapky boli namerané po 3 spektrá z rôznych miest, ako vidieť aj v tabuľke č. 5 pre každý bakteriálny kmeň boli pripravené 3 vzorky (tj. z každej vzorky bolo nameraných 9 spektier). Z dôvodu výrazného rozdielu niektorých spektier (tzv. outlier), boli niektoré spektrá vyradené z analýzy. K tomuto došlo zrejme z dôvodu nízkej koncentrácie vzorky a vzniknuté spektrá boli príliš zašumené.

Meranie druhej časti *Cupriavidius necator* H16 a jeho mutanta bolo realizované pomocou objektívu so zväčšením 50krát. Výber objektívu s väčším zväčšením (vyššie NA) lepšie simuloval experiment s optickou pinzetou, kedy meriame s lepším priestorovým rozlíšením, ale na výrazne nižšom objeme analyzovanej vzorky. Rovnako ako v prvej časti bol použitý červený laser o vlnovej dĺžke 785 nm. Pre obe merané kultúry bolo nameraných približne po 60 spektier avšak niektoré kvapky vzoriek *Cupriavidius necator* H16 a jeho mutanta, pripravené na CaF_2 sklo, mali príliš nízku koncentráciu a spektrá príliš zašumené. Z týchto dôvodov bolo opäť niekoľko spektier vyradených. Z ostatných spektier bol spravený priemer pre vyhodnotenie merania.

3.3.3.3 Ramanovská pinzeta

Analýza pomocou Ramanovskej pinzety je vykonávaná na jednotlivých bunkách, čiže objektoch s mikrometrovými rozmermi. Pre meranie bol využitý objektív Olympus UPLSAPO 100xOil, NA=1,4. V kontraste s komerčným zariadením, kde bolo spektrum snímané zo statisícov buniek. Spektrá z Ramanovskej pinzety tak ukazujú jednotlivé bunečné fingerprinty a teda vlastnosti jednotlivých mikroorganizmov, na rozdiel od Ramanovského spektrometru, ktorého výsledok je priemer mnohých buniek. Tento fakt umožňuje ďalšie možné využitie Ramanovskej pinzety a to je triedenie objektov na základe požadovaného parametra v spektre. Pre otestovanie funkčnosti takéhoto optického triedenia bola vytvorená zmes baktérií *Cupriavidus necator* obsahujúca dva kmene, kde jeden je producentom PHB a druhý nie je. Boli vybrané vhodné triediace parametre a to Ramanovská signatúra na 841 cm^{-1} (detaily o výbere triediaceho parametra sú uvedené v sekcii 4.2.2.).

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Premeranie Ramanovských spektier vybraných termofilných producentov polyhydroxyalkanoátov

4.1.1 Vyhodnotenie spektrofotometrického a gravimetrického stanovenia biomasy

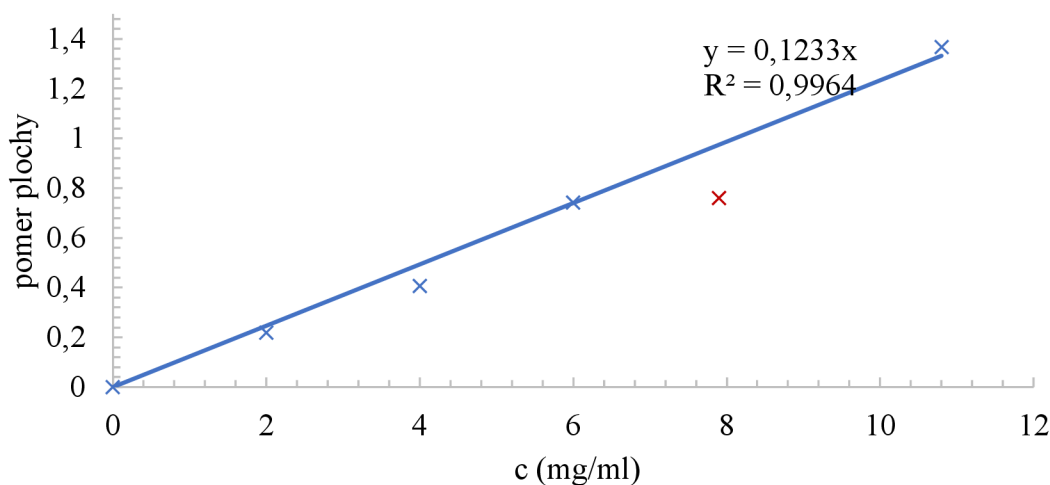
Výsledky tejto časti merania sú uvedené v *tabulke č. 5*, kde je uvedený prehľad nameraných hmotností biomás jednotlivých vzoriek, ich optická hustota. Najväčšiu optickú hustotu mali vzorky kmeňu *Chelatococcus shambunathi* a to $14,56 \pm 0,7$ a naopak najnižšiu mali vzorky kmeňu *Aneurinibacillus sp.* H1 a to $1,241 \pm 0,2$.

Tabulka 5: Prehľad nameraných hodnôt

| Mikroorganizmus | biomasa (g/l) | odchýlka (g/l) | OD | odchýlka |
|----------------------------------|---------------|----------------|-------|----------|
| <i>Aneurinibacillus sp.</i> H1 | 0,260 | 0,131 | 1,241 | 0,151 |
| <i>Chelatococcus composti</i> | 1,497 | 0,074 | 5,694 | 0,285 |
| <i>Termobacillus composti</i> | 0,300 | 0,070 | 3,016 | 0,151 |
| <i>Chelatococcus shambunathi</i> | 3,663 | 0,176 | 14,56 | 0,728 |
| <i>Paenibacillus sp.</i> BZ | 0,910 | 0,040 | 2,886 | 0,144 |
| <i>Bacillus shackbetorii</i> M7 | 1,763 | 0,771 | 5,382 | 0,269 |
| Izolát 34 | 2,287 | 0,790 | 3,146 | 0,157 |

4.1.2 Vyhodnotenie plynovej chromatografie

Pre výpočet hmotnosti PHA vo vzorkách bola využitá kalibračná krivka zostrojená na *grafe č. 1* a pre zistenie obsahu PHB bola využitá kalibračná rovnica $y = 0,0781442 \cdot x$. Kalibračné priamky boli zostrojené zo závislosti nameraných pomerov plôch pík analytu a interného štandardu na koncentrácií analytu. Meraný bod 4 bol vylúčený pre jeho prílišné odchylenie od ostatných meraných hodnôt.



Graf 1: Kalibračná závislosť pre výpočet obsahu PHB

Výsledné zastúpenie PHA, prípadne 3HB a 3HV v PHA v daných vzorkách je uvedené v *tabuľke č.6*. Najvyššie percento PHA obsahoval *Chelatococcus shambunathi*, ktorý mala 53 ± 3 % PHA v biomase. Naopak najnižšiu koncentráciou obsahoval bakteriálny kmeň *Termobacillus composti*, ktorý mala $0,1 \pm 0$ % PHA v biomase. Kmeňmi produkujúcimi 3-hydroxyvalerát boli *Aneurinibacillus sp. H1*, *Chelatococcus composti*, *Bacillus shackbetorii M7* a *izolát 34*.

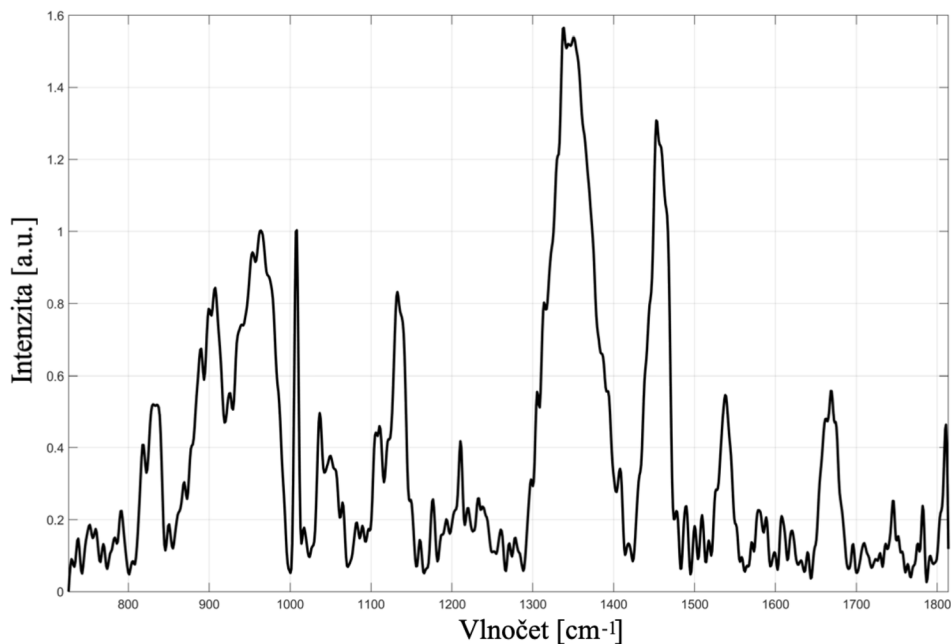
Tabuľka 6: Prehľad výsledkov plynovej chromatografie a obsahu 3HB (3-hydroxybutyrát) a 3HV (3-hydroxyvalerát) v biomasách.

| Mikroorganizmus | 3HB c (mg/ml) | 3HB odchýlka (mg/ml) | 3HV c (mg/ml) | 3HV odchýlka (mg/ml) | PHA v biomase (%) | odchýlka (%) | 3HB v PHA (%) |
|----------------------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|-------------------|--------------|---------------|
| <i>Aneurinibacillus sp. H1</i> | 1,88 | 0,00 | 0,03 | 0,00 | 26,13 | 0,00 | 98,66 |
| <i>Chelatococcus composti</i> | 1,39 | 0,25 | 0,03 | 0,02 | 16,83 | 3,12 | 98,36 |
| <i>Termobacillus composti</i> | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,10 | 0,00 | 100 |
| <i>Chelatococcus shambunathi</i> | 5,09 | 0,16 | 0,00 | 0,00 | 52,56 | 3,49 | 100 |
| <i>Paenibacillus sp. BZ</i> | 0,20 | 0,10 | 0,00 | 0,00 | 2,36 | 1,10 | 100 |
| <i>Bacillus shackbetorii M7</i> | 4,24 | 1,50 | 0,16 | 0,07 | 44,85 | 14,47 | 96,53 |
| <i>Izolát 34</i> | 2,06 | 1,44 | 0,03 | 0,00 | 20,40 | 13,47 | 97,44 |

4.1.3 Vyhodnotenie spektier nameraných na Ramanovom mikroskope Renishaw inVia

Namerané dáta boli spriemerované a boli vynesené spektrá do grafov. Vybrané boli dve spektrá a to *Paenibacillus sp. BZ* (viď. obrázok č. 8) a *Chelatococcus shambunathi*, (viď. obrázok č. 9) ako demonštrácia najväčšej zmeny v Ramanovom spektre odozvy PHB v pozícií Ramanovskej signatúry 1736 cm^{-1} .

Z obrázku č.9 je možné identifikovať spektrálne pozície Ramanovského pásu príslušiace PHB *Paenibacillus sp. BZ*, ktoré sú uvedené v *tabuľke č. 7*.

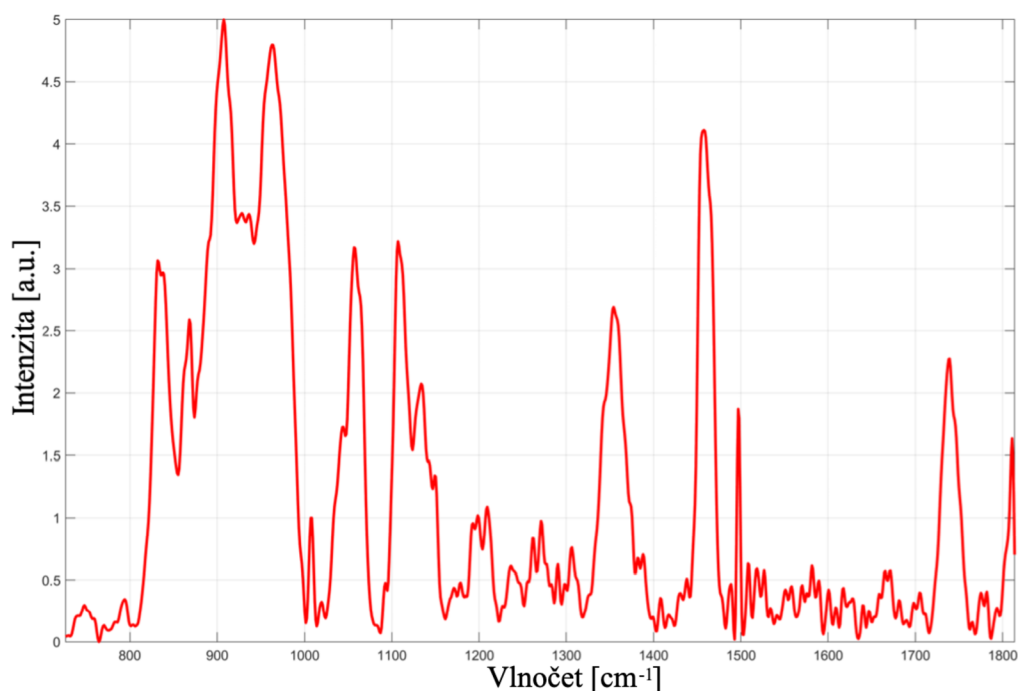


Obrázok 9: Priemerné spektrum *Paenibacillus sp. BZ* získané meraním na Ramanovom mikroskope Renishaw inVia

Tabuľka 7: Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovskej signatúry a ku nej priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanových spektrách s vyznačením prechodov pre PHB a uvedením monomérických jednotiek (HB) PHB pre *Paenibacillus sp. BZ* [47, 48, 52, 53].

| pozícia Ramanovskej signatúry [cm ⁻¹] | priradenie pásiem v bakteriálnych ramanových spektrách |
|---|---|
| 819 | RNA, A-tyt DNA |
| 832 | kryšt. marker, Tyr, PHB , HB |
| 899 | v (COC), HB, adenin |
| 964 | HB |
| 978 | =CH bend, HB |
| 1 007 | fenylalanín- natáhovanie väzby C-N |
| 1 057 | PHB , HB |
| 1 106 | PHB , HB, v(>PO ₂ ⁻) sym |
| 1 133 | v(C-N), v(C-C) |
| 1 211 | Amid III, Phe, Tro, C-C ₆ H ₅ |
| 1 352 | CH deformácia a CH ₃ symetrická deformácia |
| 1 453 | CH ₂ deformácia, PHB , HB-lipidy, v ktorých je prejav PHA |
| 1 666 | amid I, tymín ,guanín ,cytozín |
| 1 737 | PHB |

Z obrázku č.10 je možné identifikovať spektrálne pozície Ramanovského pásu príslušiace PHB *Chelatococcus shambunathi*, ktoré sú uvedené v tabuľke č. 8.



Obrázok 10: Priemerné spektrum *Chelatococcus shambunathi* získané meraním na Ramanovom mikroskope Renishaw inVia

Tabuľka 8: Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovskej signatúry a ku nej priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanových spektrách s vyznačením prechodov pre PHB a uvedením monomérnych jednotiek (HB) PHB pre *Chelatococcus shambunathi* [47, 48, 52, 53].

| pozícia Ramanovskej signatúry [cm ⁻¹] | priradenie pásiem v bakteriálnych ramanových spektrách |
|---|---|
| 832 | kryšt. marker, Tyr, PHB , HB |
| 907 | v (COC), HB |
| 965 | PHB |
| 1 006 | fenylalanín- naťahovanie väzby C-N |
| 1 058 | PHB , HB |
| 1 110 | PHB , HB, v(>PO ₂ ⁻) sym |
| 1 141 | v(C-N), v(C-C) |
| 1 354 | CH deformácia a CH ₃ symetrická deformácia, adenín, guanín |
| 1 458 | CH ₂ deformácia, PHB , HB-lipidy, v ktorých je prejav PHA |
| 1 500 | adenín |
| 1 738 | PHB |

4.2 Využitie Ramanovského sortéru k separácii buniek produkujúcich polyhydroxyalkanoáty

4.2.1 Vyhodnotenie plynovej chromatografie

V tabuľke č.9 sú uvedené navážky a optická hustota jednotlivých vzoriek. V merania jednoznačne vyplýva, že *Cupriavidus necator* H16 mal násobne vyššiu optickú hustotu ako jeho mutantný kmeň *Cupriavidus necator* PHB-4.

Tabuľka 9: Navážky a optická hustota

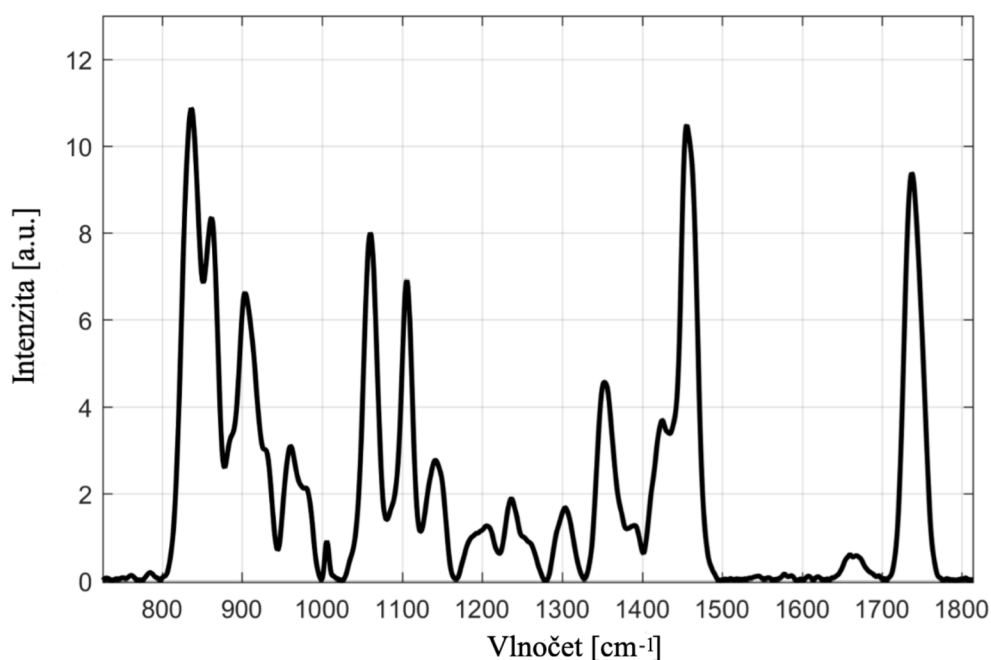
| Mikroorganizmus | biomasa (g/l) | odchýlka (g/l) | OD | odchýlka |
|--------------------------------|---------------|----------------|--------|----------|
| <i>Cupriavidus necator</i> H16 | 8,525 | 0,242 | 41,850 | 8,061 |
| Mutant PHB-4 | 1,303 | 0,036 | 3,075 | 0,672 |

Tabuľka 10: Výsledky plynovej chromatografie o obsahu 3HB (3-hydroxybutyrát) a PHA v biomase

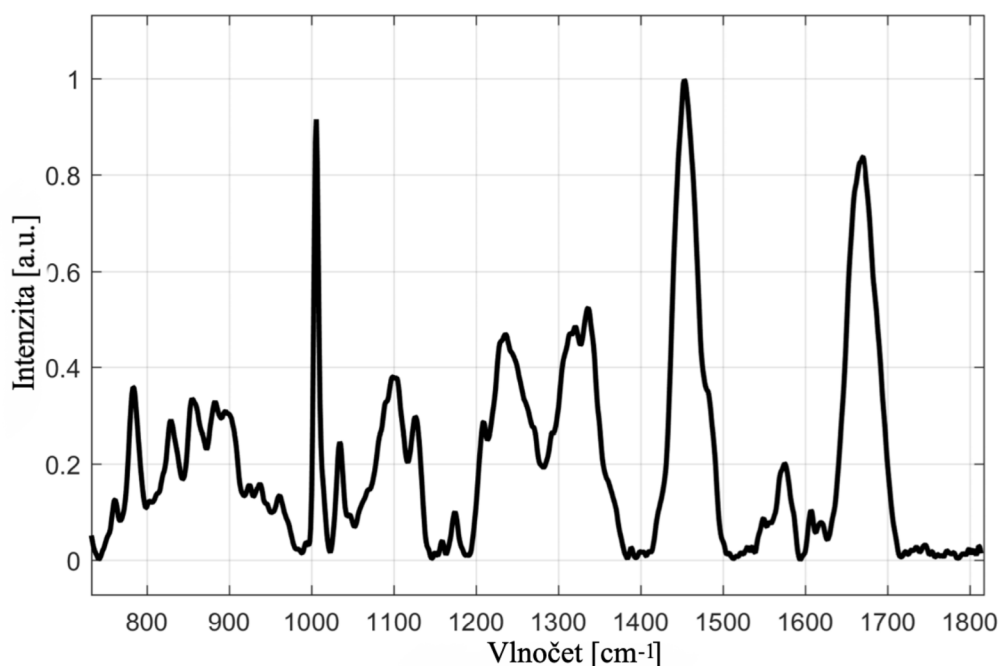
| Mikroorganizmus | 3HB c (mg/ml) | 3HB odchýlka (mg/ml) | PHA v biomase (%) | odchýlka (%) |
|--------------------------------|---------------|----------------------|-------------------|--------------|
| <i>Cupriavidus necator</i> H16 | 3,87 | 1,07 | 52,56 | 13,63 |
| Mutant PHB-4 | 0,03 | 0,01 | 0,30 | 0,14 |

Pre výpočet hmotnosti PHA vo vzorkách bola využitá kalibračná rovnica $y = 0,162413 \cdot x$. Kalibračné priamky boli zostrojené zo závislosti nameraných pomerov plôch pík analytu a interného štandardu na koncentrácií analytu. Z nameraných hodnôt jednoznačne vyplýva, že *Cupriavidus necator* H16 je producentom PHA, keďže jeho mutant ním nie je.

4.2.2 Vyhodnotenie nameraných Ramanových spektier



Obrázok 11: Priemerné Ramanovské spektrum *Cupriavidus necator* H16 namerané na Ramanovskej pinzete.



Obrázok 12: Priemerné Ramanovské spektrum *Cupriavidium necator* mutant namerané na Ramanovskej pinzete. V porovnaní s obr. 9 je jasne vidieť absenciu píkov príslušných pre PHB (841 cm^{-1} , $1\ 061\text{ cm}^{-1}$, $1\ 458\text{ cm}^{-1}$ a $1\ 736\text{ cm}^{-1}$)

Z obrázku č.11 je možné identifikovať spektrá *Cupriavidium necator* H16 ako pozície píku v spektre a z obrázku č.12 je možné identifikovať spektrá mutantu ako pozície píku v spektre uvedená v tabuľke č. 11.

Tabuľka 11: Prehľad spektrálnych pozícií Ramanovskej signatúry a ku nej priradenie pásiem v bakteriálnych Ramanových spektrách s vyznačením prechodov pre PHB a uvedením monomérických jednotiek (HB) PHB pre *Cupriavidium necator* H16 a mutantu [49,51,47, 48].

| pozícia Ramanovskej signatúry [cm^{-1}] | | priradenie pásiem v bakteriálnych ramanových spektrách |
|--|---------------|---|
| <i>Cupriavidium necator</i> H16 | mutant | |
| | 785 | - OPO väzba DNA/RNA |
| | 830 + 856 | tyrosínový dublet |
| 840 | | kryšt. marker, Tyr, PHB , HB |
| 904 | | v (COC), HB, PHB |
| 1 006 | 1 006 + 1 035 | fenylalanín- natáhovanie väzby C-N |
| 1 060 | | PHB , HB |
| 1 106 | | PHB , HB, $\nu(>\text{PO}_2^-)$ sym |
| 1 142 | | $\nu(\text{C-N})$, $\nu(\text{C-C})$ |
| 1 236 | 1 232 | amid III |
| | 1 337 | amid III |
| 1 455 | 1 453 | CH_2 deformácia, lipidy, v ktorých je prejav PHA napr. PHB , HB |
| | 1 668 | amid I |
| 1 737 | | PHA |

Namerané dáta na Ramanovom spektroskope boli upravené odstránením fluorescenčného pozadia pomocou RCF Rolling circle filter, kde bol nastavený radius na 500 px, čo predstavuje približne 500 cm^{-1} a opakovanie 20krát. Následne bolo spektrum vyhladené pomocou Savitzky-Golay algoritmom, kde bol použitý stupeň polynómu 2 a veľkosť segmentu 7 bodov. Následne bolo využité normovanie spektier, vďaka ktorému zvolením vhodnej vibrácie je výsledkom prehľadnejší graf, keďže normovaním dôjde pomerovo ku zmene veľkosti píkovo voči zvolenej vibrácii. Spektrá boli nanormované na vibráciu fenylalanínu na $1\,006\text{ cm}^{-1}$ [27], ktorý sme predpokladali, že bude pre všetky spektrá rovnaký a teda je vhodné ho zvoliť za jednotku. Po takto prevedených úpravách boli vybrané vhodné markery pre identifikáciu mutanta a to: 841 cm^{-1} , $1\,061\text{ cm}^{-1}$, $1\,458\text{ cm}^{-1}$ a $1\,736\text{ cm}^{-1}$. Tieto markery boli identifikované pri použití čistej substancie PHB a zastupujú štyri najvýraznejšie prechody pre identifikáciu PHB. Triediaci parameter bol vybraný na základe dvoch faktorov a to intenzity Ramanovskej signatúry a ľahkej oddeliteľnosti od iných Ramanovských signatúr (tzn. prekryvov píkovo). Vybraný pre ďalšie meranie bol triediaci parameter intenzity Ramanovského píku na 841 cm^{-1} [49, 51].

Triedenie buniek prebehlo na základe vybraného triediaceho parametera intenzity Ramanovského píku na 841 cm^{-1} [49, 51]. V *tabuľke č.12* je vyneseny výsledok priemernej hodnoty intenzity Ramanovských pásov 841 cm^{-1} , $1\,061\text{ cm}^{-1}$, $1\,458\text{ cm}^{-1}$ a $1\,736\text{ cm}^{-1}$, smerodajná odchýlka a relatívna chyba. Následne bol vybraný marker na 841 cm^{-1} , pre svoju vysokú intenzitu a vhodnú pozíciu v spektre. Ďalším možným markerom by mohol byť $1\,736\text{ cm}^{-1}$. Tento Ramanovský pik nebol následne vybraný, pretože spektrá z pinzety nemajú tento pik tak intenzívny ako 841 cm^{-1} . Dôvod tohto javu môže byť napr. klesajúca kvantová účinnosť CCD čipu v spektroskopickej kamere pre vyššie vlnové dĺžky (tj. vzdialenejšia oblasť spektra). Hodnoty v *tabuľke č. 9* boli získané odčítaním intenzity štyroch Ramanovských píkovo (pre každý kmeň) z 59 spektier pre *Cupriavidus necator* H16 a 56 spektier pre mutanta, z ktorých bol následne spravený priemer, smerodajná odchýlka a relatívna chyba. Tento marker má výsledne pre *Cupriavidus necator* H16 intenzitu $9,7 \pm 0,7$ a relatívnu chybu 7 %, mutant má intenzitu $0,2 \pm 0,2$ a.u. a relatívnu chybu 100 %.

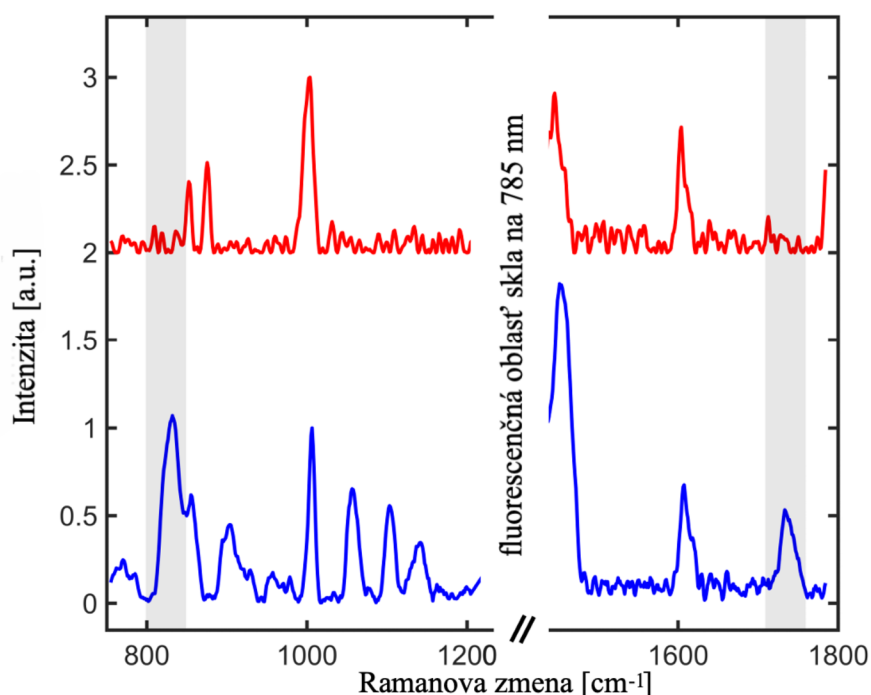
Tabuľka 12: Intenzity Ramanových vibrácií v Ramanovských píkoch Cupriavidus necator

| Pozícia Ramanovskej signatúry | <i>Cupriavidus necator</i> H16 | | | | mutant | | | |
|------------------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | 841 | 1 061 | 1 458 | 1 736 | 841 | 1 061 | 1 458 | 1 736 |
| priemerná hodnota intenzity (a.u.) | 9,7 | 7,7 | 10,1 | 9,0 | 0,2 | 0,1 | 1,0 | 0,04 |
| smerodajná odchýlka (a.u.) | 0,7 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 0,2 | 0,05 | 0,2 | 0,04 |
| relatívna chyba (%) | 7 | 6 | 5 | 6 | 100 | 40 | 20 | 100 |

4.2.3 Vyhodnotenie Ramanovho sorteru

Spektrá získané z Ramanovskej pinzety triedičky ukazujú jednoznačnú oddeliteľnosť *Cupriavidus necator* H16 od mutanta, vid' *obrázok č.13*. Podľa spektier z Ramanového sortru sa ukazuje, že intenzita píku na $1\,458\text{ cm}^{-1}$ je nevhodná pre delenie z dôvodu silného ovplyvnenia fluorescenčným pozadím od skla, ktoré sa nepodarilo odstrániť ani bežnými filtrovacími metódami, preto bolo nutné spektrálnu oblasť $1\,200\text{ - }1\,420\text{ cm}^{-1}$ odstrániť

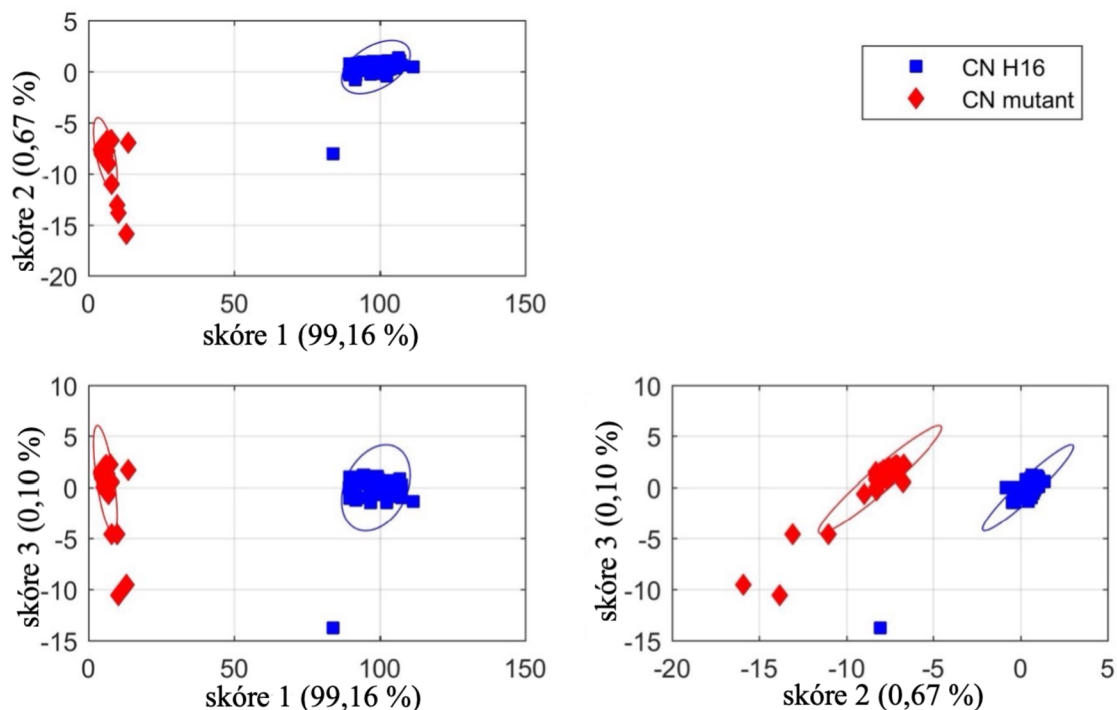
z analýzy. Výsledné spektra na *obrázku č.13* ukazujú, že sme schopní jednoznačne rozlíšiť bakteriálny kmeň produkujúci PHB od neproduktujúcich a najvhodnejšími triediacimi parametrami sú 841 cm^{-1} a $1\ 736\text{ cm}^{-1}$.



*Obrázok 13: Dve Ramanovské spektra zo zmesi, kde modrou farbou je opticky zachytený kmeň produkujúci PHB (*Cupriavidus necator* H16) a červenou farbou je zachytená baktéria kmeňu neproduktujúceho PHB (spektrum bolo posunuté v smere osi y).*

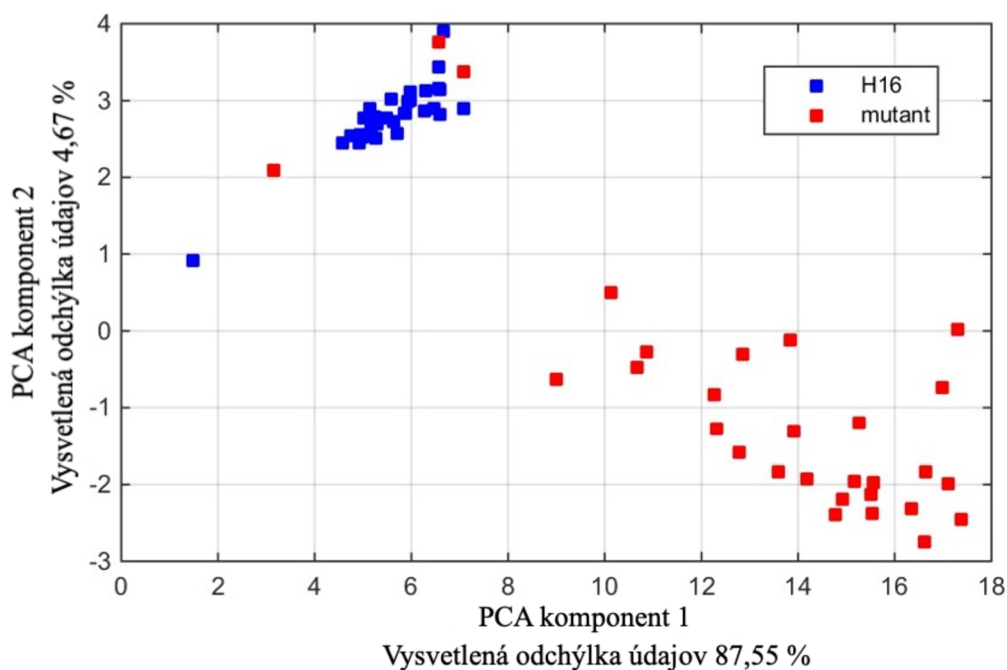
4.2.4 Vyhodnotenie analýzy hlavných komponentov

Pri spracovaní dát bola využitá analýza hlavných komponentov. Keďže analýza hlavných komponentov je metóda riešiacia dimenzionálne problémy, výsledkom tejto metódy je vznik bodov, kde každý bod predstavuje jedno spektrum resp. jednu bunku. Vďaka tejto analýze je možné zistiť podobnosť daných bakteriálnych kmeňov alebo ich oddeliteľnosť, alebo úspešnosť oddelenia na zvolenom triediacom faktore. Na *obrázku č.14* je grafické zobrazenie kombinácie prvých troch komponentov PCA ktorých výsledkom je zreteľné rozdelenie *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutanta. Oblasť bodov predstavujúcu jednotlivé meranie je ohraničená Mahalanobisovou elipsou, ktorá predstavuje hranice 95 % merania (tj. vo vnútri elipsy sa nachádza 95 % PC bodov jednej skupiny meraní).

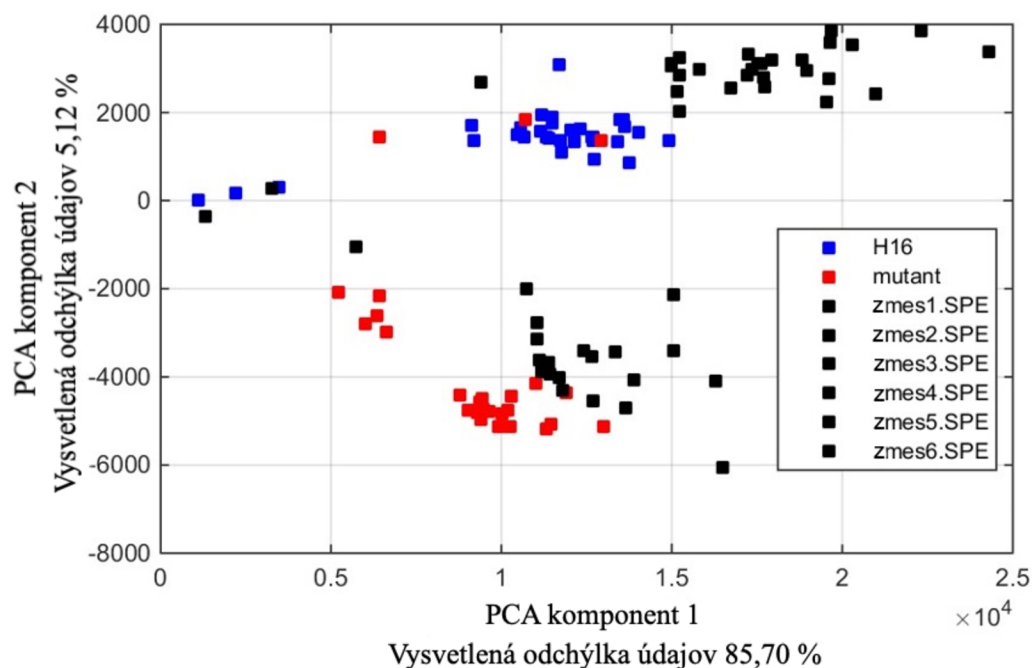


Obrázok 14: PCA *Cupriavidius necator* H16 a jeho mutanta získaná z nameraných spektier na Ramanovom spektroskope Renishaw in Via

Analyzovaný bol *Cupriavidius necator* H16 a mutant. Namerané boli datasety samostatne pre *Cupriavidius necator* H16, samostatne pre mutanta a následne pre zmes *Cupriavidius necator* H16 a mutanta. Takto vykonanou analýzou bolo zistené, že ide jednoznačne rozdeliť *Cupriavidius necator* H16 od mutanta, vid'. obrázok č.15. Vznik dvoch rôznych klastrov bol výsledkom PCA analýzy vykonanej na samostatnom *Cupriavidius necator* H16, mutantovi a zmesi vid'. obrázok č.16.



Obrázok 15: Výsledok PCA analýzy spektier získaných z Ramanovskej triedičky pre bakteriálne kmene *Cupriavidius necator* H16 a mutanta



Obrázok 16: Výsledok PCA analýzy spektier získaných z Ramanovskej triedičky pre samostatné bakteriálne kmene *Cupriavidius necator* H16, mutanta a pre ich zmes.

Bola vykonaná analýza zo zachytených baktérií *Cupriavidius necator* H16, mutanta a zmesi, jej výsledok je na obrázku č.16. Z predložených výsledkov môžeme jednoznačne konštatovať, že aj zmes buniek by bola pomocou PCA rozlíšiteľná. K rozlíšeniu pomocou PCA je nutná pomerne veľká skupina spektier z určených baktérií *Cupriavidius necator* H16 a mutanta. V porovnaní s PCA metódou je triedenie na základe parametru v spektrách výrazne jednoduchšia ako na čas, tak na objem vzorky (počet buniek).

5 ZÁVER

V prvej časti experimentálnej práce bolo kultivovaných sedem kmeňov baktérií. Spektrofotometricky bola stanovená ich optická hustota. Kvantitatívna informácia o obsahu polyhydroxyalkanoátov v jednotlivých kmeňoch bola stanovená pomocou plynovej chromatografie, kde bol stanovený presný percentuálny obsah PHA v bunkách a zastúpenie 3-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu. Kmeňom obsahujúcim najvyššie percento PHA bol *Chelatococcus shambunathi*, ktorý mal 53 ± 3 % PHA v biomase. Kmeňmi produkujúcimi 3-hydroxyvalerát boli *Aneurinibacillus sp. H1*, *Chelatococcus composti*, *Bacillus shackbetorii M7* a izolát 34. Množstvo 3-hydroxyvalerátu oproti 3-hydroxybutyrátu malo veľmi nízke hodnoty, keďže jeho maximálny obsah bol do 4 % z celkového obsahu PHA vyprodukovaného daným kmeňom.

Kvalitatívna analýza jednotlivých kmeňov bola vykonávaná na základe Ramanových spektier, ďalej boli identifikované Ramanovské píky po odstránení fluorescenčného pozadia, vyhladení spektier, spriemerovaní všetkých meraní a ich normalizácií na intenzitu vibrácie fenylalanínu, príslušnému dýchaniu fenylového kruhu na 1006 cm^{-1} . Najväčší rozdiel v produkcii PHB sme zaznamenali medzi dvomi kmeňmi a to *Paenibacillus sp BZ* a *Chelatococcus shambunathi*, ako demonštrácia najväčšej zmeny v Ramanovom spektre odozvy PHB v pozícii Ramanovskej signatúry 1736 cm^{-1} a ich spektrá boli identifikované.

Najvyššiu produkciu PHA v oboch metódach dosiahol *Chelatococcus shambunathi*. Plynová chromatografia preukázala, že obsahoval 53 ± 3 % PHA v biomase a rovnako mal najvyššiu odozvu PHB v Ramanovom spektre v pozícii Ramanovskej signatúry 1736 cm^{-1} . Najnižšiu produkciu $0,1 \pm 0$ % PHA v biomase dosiahol *Termobacillus composti*, avšak najnižšiu odozvu PHB v pozícii Ramanovskej signatúry 1736 cm^{-1} mal *Paenibacillus sp BZ*.

Keďže Ramanova spektroskopia poskytuje informácie o vnútornej štruktúre látok, v spektre bola pozorovateľná aj miera kryštalinity PHA v bakteriálnych bunkách. Kryštalizácia bola pozorovaná pri všetkých vybraných kmeňoch a prejavila sa v intenzite Ramanovských píkov v okolí 840 cm^{-1} .

Cieľom druhej časti experimentálnej činnosti bakalárskej práce bolo triedenie mikroorganizmov s rôznymi vlastnosťami na Ramanovej pinzete, na základe zmien v spektre. Na Ramanovskom mikrospektrometri (Renishaw inVia) bolo vybraných niekoľko Ramanovských signatúr vhodných ako triedacích parametrov a to píky: 841 cm^{-1} , 1061 cm^{-1} , 1458 cm^{-1} a 1736 cm^{-1} .

Po kultivácii buniek bola rovnako ako v prvej časti stanovená optická hustota kultúr a vykonaná kvantitatívna analýza pomocou plynovej chromatografie, ktorá potvrdzuje, že *Cupriavidus necator* H16 je producentom PHA, keďže obsahoval 53 ± 14 % PHA na biomasu. Naopak jeho mutant obsahoval len $0,3 \pm 0,1$ %. Kvalitatívna analýza a rovnako prípravné meranie pre zvolenie vhodného triediaceho parametra pre nasledovné meranie bolo vykonané pomocou Ramanovského mikrospektrometru Renishaw inVia. Následne sa ukázalo, že vhodným triediacim parametrom je Ramanovská signatúra na pozícii 841 cm^{-1} pre svoju intenzitu a jednoznačnú pozíciu v spektre.

Priemerná intenzita tohto markeru bola $9,7 \pm 0,7$ a.u., kde tento výsledok bol určený z 59 meraní. Tento triediaci parameter bol vybraný na základe intenzity Ramanovskej signatúry a ľahkej oddeliteľnosti od iných Ramanovských signatúr. Výsledky merania z Ramanovskej triedičky zo zmesi kultúr *Cupriavidus necator* H16 a mutantu v dostatočne rozriedenom vodnom prostredí jednoznačne ukázalo, že je možné rozdeliť producentov od neproducentov PHA na základe tohto parametra a toto bolo aj overené pomocou PCA analýzy. Na základe výsledkov merania je možné konštatovať, že jednotlivé bunky sa dajú triediť pomocou Ramanovskej odozvy. Táto práca ukazuje triedenie zmesi buniek *Cupriavidus necator* H16

a jeho mutanta pomocou vybraného parametru v Ramanovskom spektre. Týmto výberom by bolo potom možné vybrať generáciu tzv. superproducentov PHB.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607–619. doi:10.1016/j.procbio.2004.01.053
- [2] Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45–56. doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- [3] Chen, G.- (2010). *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- [4] Loo, C.-Y. & Sudesh, K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*. *Malaysian Polymer Journal*, 2(2), pp.31-57.
- [5] Kootstra, M., Elissen, H. & Hurman, S. (2017). PHA's (Polyhydroxyalkanoates): General information on structure and raw materials for their production. Adepot. Available at: <https://edepot.wur.nl/414011>.
- [6] Zinn, M., & Hany, R. (2005). Tailored Material Properties of Polyhydroxyalkanoates through Biosynthesis and Chemical Modification. *Advanced Engineering Materials*, 7(5), 408–411. doi:10.1002/adem.200500053
- [7] Mozejko-Ciesielska, J., Szacherska, K., & Marciniak, P. (2019). *Pseudomonas* Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*. doi:10.1007/s10924-019-01422-1
- [8] McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908. doi:10.3390/polym12122908
- [9] Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- [10] Danis, O., Ogan, A., Tatlican, P., Attar, A., Cakmakci, E., Mertoglu, B., & Birbir, M. (2015). Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery. *Extremophiles*, 19(2), 515–524. doi:10.1007/s00792-015-0735-4
- [11] Yean, O.S., Yee, C.J. & Kumar, S. (2017). Degradation of polyhydroxyalkanoate (PHA). , 10(2), pp.211-225.
- [12] Çulha, M., Adigüzel, A., Yazici, M. M., Kahraman, M., Slahin, F., & Güllüce, M. (2008). Characterization of Thermophilic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Applied Spectroscopy*, 62(11), 1226–1232. doi:10.1366/000370208786401545

- [13] Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(3), 233–247. doi:10.1002/jctb.1667
- [14] Zeikus, J. G. (1979). Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1(4), 243–252. doi:10.1016/0141-0229(79)90043-7
- [15] Brock TD; Freeze H (1969). "Thermus aquaticus, a Nonsporulating Extreme Thermophile". *J.Bacteriol.* 98 (1):28997. doi:10.1128/jb.98.1.289297.1969. PMC 249935. PM ID 5781580.
- [16] Pierson, B. K., & Castenholz, R. W. (1974). A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Archives of Microbiology*, 100(1), 5–24. doi:10.1007/bf00446302 .
- [17] Zhang, Z., Zhao, J., Dong, S., Duan, H., Yu, R., Liu, Y. a Wang, Ch. (2017). *Chelatococcus composti* sp. nov., isolated from penicillin fermentation fungi residue with pig manure co-compost. *Microbiology society*. 2017(67), 565-569. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.001651
- [18] Panday, D., & Das, S. K. (2009). *Chelatococcus sambhunathii* sp. nov., a moderately thermophilic alphaproteobacterium isolated from hot spring sediment. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*, 60(4), 861–865. doi:10.1099/ijms.0.013466-0
- [19] Sedlacek, P., Pernicova, I., Novackova, I., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., ... Obruca, S. (2020). Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–2. Material Study on the Produced Copolymers. *Polymers*, 12(6), 1298. doi:10.3390/polym12061298 .
- [20] Dendisová, M., Žvátora, P. & Matejka, P., RAMANOVA SPEKTROMETRIE. Vscht. Available at: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf> [Accessed July 22, 2021].
- [21] Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., ... Obruca, S. (2020). Introducing the Newly Isolated Bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an Auspicious Thermophilic Producer of Various Polyhydroxyalkanoates (PHA) Copolymers–1. Isolation and Characterization of the Bacterium. *Polymers*, 12(6), 1235. doi:10.3390/polym12061235
- [22] Klouda, P., (2003) *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-86369-07-2.
- [23] Smith, W. E. (2017). Raman Scattering. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1–20. doi:10.1002/0471238961.1801130103081809.a01.pub3
- [24] RAMAN, C. V., & KRISHNAN, K. S. (1928). A New Type of Secondary Radiation. *Nature*, 121(3048), 501–502. doi:10.1038/121501c0
- [25] Long, D. A. (2002). The Raman Effect. doi:10.1002/0470845767

- [26] Němcová, I.; Čermáková, L.; Rychlovský, P., (2004). *Spektrometrické analytické metody I*, Praha (str. 147)
- [27] Brandt, N. N., Brovko, O. O., Chikishev, A. Y., & Paraschuk, O. D. (2006). Optimization of the Rolling-Circle Filter for Raman Background Subtraction. *Applied Spectroscopy*, 60(3), 288–293. doi:10.1366/000370206776342553
- [28] Lamoš, F.; Potocký, R. (1998). *Pravdepodobnosť a matematická štatistika - Štatistické analýzy*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, Vydavateľstvo UK. 344 s. ISBN 80-223-1262-2. Kapitola Analýza hlavných komponentov.
- [29] Samek, O., Bernatová, S., Ježek, J., Šiler, M., Šerý, M., Krzyžánek, V., ... Ružicka, F. (2015). Identification of individual biofilm-forming bacterial cells using Raman tweezers. *Journal of Biomedical Optics*, 20(5), 051038. doi:10.1117/1.jbo.20.5.051038
- [30] Rantanen, J. (2007). Process analytical applications of Raman spectroscopy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(2), 171–177. doi:10.1211/jpp.59.2.0004
- [31] Simone, E., Saleemi, A. N., & Nagy, Z. K. (2014). Application of quantitative Raman spectroscopy for the monitoring of polymorphic transformation in crystallization processes using a good calibration practice procedure. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(4), 594–611. doi:10.1016/j.cherd.2013.11.004
- [32] Westley, C., Fisk, H., Xu, Y., Hollywood, K. A., Carnell, A. J., Micklefield, J., ... Goodacre, R. (2017). Real-Time Monitoring of Enzyme-Catalysed Reactions using Deep UV Resonance Raman Spectroscopy. *Chemistry - A European Journal*, 23(29), 6983–6987. doi:10.1002/chem.201701388
- [33] McLaughlin, G., Doty, K. C., & Lednev, I. K. (2014). Raman Spectroscopy of Blood for Species Identification. *Analytical Chemistry*, 86(23), 11628–11633. doi:10.1021/ac5026368
- [34] Haskin, L. A., Wang, A., Rockow, K. M., Jolliff, B. L., Korotev, R. L., & Viskupic, K. M. (1997). Raman spectroscopy for mineral identification and quantification for in situ planetary surface analysis: A point count method. *Journal of Geophysical Research: Planets*, 102(E8), 19293–19306. doi:10.1029/97je01694
- [35] Jankovičová, V., 2017. *Chémia a technológia pre život*. Bratislava: Slovenská chemická knižnica, 422 s. ISBN 978-80-89579-77-2. Dostupné také z: https://www.uiam.sk/~oravec/svk/e_zbornik_svk_2017.pdf
- [36] Strola, S. A., Baritoux, J.-C., Schultz, E., Simon, A. C., Allier, C., Espagnon, I., ... Dinten, J.-M. (2014). Single bacteria identification by Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 19(11), 111610. doi:10.1117/1.jbo.19.11.111610
- [37] Bernatová, S., Samek, O., Pilát, Z., Šerý, M., Ježek, J., Krzyžánek, V., ... Ružicka, F. (2012). Raman spectroscopy for bacterial identification and characterization. 18th Czech-Polish-Slovak Optical Conference on Wave and Quantum Aspects of Contemporary Optics. doi:10.1117/12.2010539

- [38] Rebrošová, K., Šiler, M., Samek, O., Růžička, F., Bernatová, S., Holá, V., ... Petráš, P. (2017). Rapid identification of staphylococci by Raman spectroscopy. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-13940-w
- [39] Rebrošová, K., Šiler, M., Samek, O., Růžička, F., Bernatová, S., Ježek, J., ... Holá, V. (2019). Identification of ability to form biofilm in *Candida parapsilosis* and *Staphylococcus epidermidis* by Raman spectroscopy. *Future Microbiology*. doi:10.2217/fmb-2018-0297
- [40] Ho, C.-S., Jean, N., Hogan, C. A., Blackmon, L., Jeffrey, S. S., Holodniy, M., ... Dionne, J. (2019). Rapid identification of pathogenic bacteria using Raman spectroscopy and deep learning. *Nature Communications*, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-12898-9
- [41] Xie, C., Goodman, C., Dinno, M. A., & Li, Y.-Q. (2004). Real-time Raman spectroscopy of optically trapped living cells and organelles. *Optics Express*, 12(25), 6208. doi:10.1364/opex.12.006208
- [42] Petrov, D. V. (2007). Raman spectroscopy of optically trapped particles. *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, 9(8), S139–S156. doi:10.1088/1464-4258/9/8/s06
- [43] Bernatova, S., Samek, O., Obruca, S., Sery, M., Zemanek, P., & Marova, I. (2016). Time evolution of trapped single cell microorganism. *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues IX*. doi:10.1117/12.2213264
- [44] Jing, X., Gou, H., Gong, Y., Su, X., Xu, L., Ji, Y., ... Huang, W. E. (2018). Raman-activated cell sorting and metagenomic sequencing revealing carbon-fixing bacteria in the ocean. *Environmental Microbiology*, 20(6), 2241–2255. doi:10.1111/1462-2920.14268
- [45] RENISHAW, apply innovation, (2018). *Raman spectroscopy explained* September., Available at: <https://resources.renishaw.com/en/details/brochure-invia-confocal-raman-microscope--110298>.
- [46] Jonáš, A., & Zemánek, P. (2008). Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis. *ELECTROPHORESIS*, 29(24), 4813–4851. doi:10.1002/elps.200800484
- [47] Notingher, I. (2007). Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. *Sensors*, 7(8), 1343–1358. doi:10.3390/s7081343
- [48] De Gelder, J., Willemse-Erix, D., Scholtes, M. J., Sanchez, J. I., Maquelin, K., Vandenabeele, P., ... De Vos, P. (2008). Monitoring Poly(3-hydroxybutyrate) Production in *Cupriavidus necator* DSM 428 (H16) with Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 80(6), 2155–2160. doi:10.1021/ac702185d
- [49] Samek, O., Obruča, S., Šiler, M., Sedláček, P., Benešová, P., Kučera, D., Márova, I., Ježek, J., Bernatová, S., & Zemánek, P. (2016). Quantitative Raman Spectroscopy Analysis of Polyhydroxyalkanoates Produced by *Cupriavidus necator* H16. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 16(11), 1808. <https://doi.org/10.3390/s16111808>

- [50] Butler, H. J., Ashton, L., Bird, B., Cinque, G., Curtis, K., Dorney, J., ... Martin, F. L. (2016). Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11(4), 664–687. doi:10.1038/nprot.2016.036
- [51] Tao, Z., Peng, L., Zhang, P., Li, Y.-Q., & Wang, G. (2016). Probing the Kinetic Anabolism of Poly-Beta-Hydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 Using Single-Cell Raman Spectroscopy. *Sensors*, 16(8), 1257. doi:10.3390/s16081257
- [52] Shipp, D. W., Sinjab, F., & Notingham, I. (2017). Raman spectroscopy: techniques and applications in the life sciences. *Advances in Optics and Photonics*, 9(2), 315. doi:10.1364/aop.9.000315
- [53] Furukawa, T., Sato, H., Murakami, R., Zhang, J., Noda, I., Ochiai, S., & Ozaki, Y. (2006). Raman microspectroscopy study of structure, dispersibility, and crystallinity of poly(hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends. *Polymer*, 47(9), 3132–3140. doi:10.1016/j.polymer.2006.03.010
- [54] Navas-Moreno, M., & Chan, J. W. (2018). Laser Tweezers Raman Microspectroscopy of Single Cells and Biological Particles. *Methods in Molecular Biology*, 219–257. doi:10.1007/978-1-4939-7680-5_13

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

3HB- 3-hydroxybutyrát
3HV- 3-hydroxyvalerát
CCD- (charge-coupled device)- žiarenie citlivé na elektrický náboj
DNA- deoxyribonukleová kyselina
DPSS- Diode-pumped solid-state laser- diódou čerpaný tuholátkový laser
FWHM- full width at half maximum
GC- FID- Plynová chromatografia s plameňovo ionizačným detektorom
HB- monoména jednotka PHB
IR- infračervená (oblasť)
LB- (Lysogeny Broth)- lyzogenézný vývar
lcl-PHA -long chain length- polyhydroxyalkanoáty s dlhým reťazcom
LTRS- Laser Treezers Raman Spectroscopy
mcl-PHA - medium chain length- polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhým reťazcom
MES- 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MM1- minerálne médium
NA- numerická apertúra
NIR- Near Infrared- blízka infračervená oblasť
PCA- analýza hlavných komponentov
PCA- principal component analysis- analýza hlavných komponentov
PE- polyetylén
PHA - polyhydroxyalkanoát
PHB- polyhydroxybutyrát
PP-polypropylén
RACS- Raman activated cell sorter
RACS- Raman activated cell sorter
RCF- (rolling-circle filter)- spektrálny filter s rotujúcim kruhom
RCF- rolling circle filter
RNA- ribonukleová kyselina
rRNA- ribozomálna ribonukleová kyselina
scl-PHA - short chain length- polyhydroxyalkanoáty s krátkym reťazcom
TES- roztok minerálnych prvkov
VIS- visible- viditeľný