



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 JAKO NÁSTROJ PRO
ANALÝZU MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK**

RAMAN SPECTROSCOPY AS A TOOL FOR ANALYSIS OF MICROBIAL CELLS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Petr Pokorný

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Dr. Ota Samek

BRNO 2018

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1311/2017
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Petr Pokorný**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Dr. Ota Samek**
Akademický rok: 2017/18

Název bakalářské práce:

Ramanova spektroskopie jako nástroj pro analýzu mikrobiálních buněk

Zadání bakalářské práce:

1. Rešerše na téma využití Ramanovy spektroskopie pro analýzu mikrobiálních buněk
2. Experimentální charakterizace halofilních bakterií pomocí Ramanovy spektroskopie

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2018

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

Petr Pokorný
student(ka)

Dr. Ota Samek
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zaměřuje na využití Ramanovy spektroskopie pro analýzu výskytu ektoinů a hydroxyektoinů v bakteriálním kmeni *Halomonas elongata*.

V teoretické části je zpracována charakteristika extrémofilů s bližším přihlédnutím na halofilní organismy a jedny z jejich hlavních osmolytů, ektoiny. Dále je popsána metoda Ramanovy spektroskopie a její využití. V experimentální části je rozebrána kultivace bakterie na různých kombinacích substrátu a koncentrace soli pro dosažení optimální produkce PHA a pro dosažení co největšího výtěžku biomasy pro analýzu Ramanovou spektroskopii. Nejlepším substrátem pro produkci PHA se ukázala být glukóza s koncentrací soli 30 g/l NaCl, kde procentuální zastoupení PHB v biomase činilo 30,5229 %. Ideálním substrátem pro největší množství biomasy byla sacharóza. Bakterie narostlá na sacharóze při třech koncentracích soli, 40, 70 a 100 g/l NaCl byla měřena pomocí Ramanovy spektroskopie pro porovnání spolu s bakteriemi *Halomonas salina* a *Halomonas organivorans*. Ramanova spektroskopie se však ukázala jako nedostatečně citlivá pro měření tohoto typu vzorku, tudíž jsme nebyli schopni změřit přítomnost ektoinů nebo hydroxyektoinů v buňkách.

Abstract

This bachelor thesis is focused on the use of Raman spectroscopy for analysis of ectoine and hydroxyectoine presence in bacterial strain *Halomonas elongata*.

Theoretical part compile characteristics of extremophiles with closer look on halophilic organisms and one of their main osmolytes, ectoines. Following by description of Raman spectroscopy method and its uses. Experimental part deals with cultivation of bacteria on different combinations of substrate and salt concentration in order to reach optimal production of PHA and for achieving the highest possible yield of biomass to be analysed by Raman spektroskopie. As the best substrate for PHA production turned out to be glucose along with salt concentration 30 g/l NaCl, where percentage representation of PHB makes 30,5229 %. As an ideal substrate for the highest yield of biomass proved to be sacharose. Bacteria that grew on sacharose with three different salt concentrations, 40, 70 and 100 g/l NaCl was measured along with *Halomonas salina* and *Halomonas organivorans* for comparison. Raman spectroscopy unfortunately turned out to be inadequate for measurement of this type of sample, thus we were not able to measure ectoine of hydroxyectoine presence in cells.

Klíčová slova

Halomonas elongata, Ramanova spektroskopie

Key words

Halomonas elongata, Raman spectroscopy

POKORNÝ, P. *Ramanova spektroskopie jako nástroj pro analýzu mikrobiálních buněk*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 39 s. Vedoucí bakalářské práce Dr. Ota Samek

Prohlášení

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

.....
...
Podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mojí bakalářské práce Dr. Otě Samkovi, doc. Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D., Ing. Ivě Pernicové a Ing. Danu Kučerovi za veškerou pomoc při práci v laboratoři, za veškeré rady a připomínky, ochotu, velkou míru trpělivosti a vstřícný

přístup. Dále bych též rád poděkoval celé své rodině a přátelům za jejich podporu při psaní bakalářské práce a během celého studia.

1)	ÚVOD
7	
2)TEORETICKÁ	ČÁST
8	
2.1) Extrémofilní organismy	8
2.1.1) Extrémofilní podmínky	8
2.1.2) Halofily	9
2.1.3) Rod <i>Halomonas</i>	9
2.1.4) Ektoiny	10
2.2) PHA – polyhydroxyalkanoáty	11
2.2.1) PHB – polyhydroxybutyrát	12
2.3) Vibrační spektroskopie	13
2.3.1) Interpretace vibračních spekter	13
2.3.2) Vibrace a rotace molekul	13
2.3.3) Polarizovatelnost molekul	14
2.4) Ramanova spektroskopie	14
2.4.1) Historie	14
2.4.2) Ramanův efekt	15
2.4.3) Teorie metody Ramanovy spektroskopie	15
2.4.4) Práce se vzorkem	16
2.4.5) Práce se spektry a jejich vyhodnocení	16
2.4.6) Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)	17
2.4.7) Koherentní anti-Stokesův Ramanův rozptyl (CARS)	17
2.4.8) Na hrotu zesílený Ramanův rozptyl (TERS)	18
2.4.9) Aplikace Ramanovy spektroskopie v praxi	18
2.4.10) Ramanova spektroskopie pro neinvazivní charakterizace mikrobiálních buněk	18
2.4.11) Rozlišení bakterií pomocí SERS	19
3)PRAKTICKÁ	ČÁST
19	
3.1) Použité mikroorganismy	19

3.2) Použité chemikálie	20
3.3) Použité přístrojové vybavení.....	20
3.4) Příprava kultur.....	21
3.5) Příprava inokula	21
3.5.1) Složení média B 54.....	21
3.5.2) Složení inokula	21
3.6) Příprava minerálního média	21
3.6.1) Složení minerálního média	22
3.6.2) Složení roztoku MES.....	22
3.7) Spektrofotometrické měření zákalu	22
3.8) Likvidace kultur	22
3.9) Stanovení koncentrace PHA v biomase	23
3.10) Polymerázová řetězová reakce – PCR	23
3.10.1) Směs pro PCR.....	24
3.11) Gelová elektroforéza	24
3.11.1) Složení chemikálií	25
3.12) Sekvenace.....	25
3.12.1) Chemikálie pro přečištění	25
3.13) Měření Ramanovou spektroskopií	26
4) VÝSLEDKY	A
27	DISKUZE
4.1) PCR a gelová elektroforéza.....	27
4.2) Optimalizace podmínek pro získání biomasy a produkci PHA	28
4.3) Měření Ramanovou spektroskopií	30
5)	ZÁVĚR
34	
6) POUŽITÁ	LITERATURA
35	

1) ÚVOD

Skrz proces evoluce se organismy dokázaly adaptovat na nepříznivé podmínky prostředí, ve kterém jsou schopny přežívat. Existuje určitá skupina mikroorganismů, které svou schopností adaptace předčily všechny ostatní. Dokáží totiž nejen přežít, ale i prosperovat v podmínkách, kde by se jakákoliv jiná forma života těžko udržela. Tyto mikroorganismy nazýváme extrémofily. V případě jedné konkrétní podskupiny extrémofilů, halofilů, lze jejich schopnost žít v prostředí s vysokým obsahem soli přisoudit osmolytům, které buňce pomáhají přežít extrémní stres. Pro analýzu těchto látek v buňce je možné použít několik metod, ale jedna z nejefektivnějších a nejrychlejších metod pro tento účel by mohla být Ramanova spektroskopie.

2) TEORETICKÁ ČÁST

2.1) Extrémofilní organismy

2.1.1) Extrémofilní podmínky

Většina mikroorganismů vyžaduje pro svůj život relativně mírné životní podmínky kupříkladu neutrální pH prostředí, teplotu v rozmezí 20 až 40 °C, tlak vzduchu okolo 1 atm a samozřejmě dostatečné množství vody, soli a živin. Toto však neplatí pro všechny mikroorganismy. Jsou také zástupci, zvaní též extrémofily, kteří dokáží přežít v podmínkách, kde bychom si život těžko dovedli představit, jako například v kyselých a termálních pramenech, solných jezerech, na pouštích nebo na dně oceánu. Extrémofily pro svůj život a rozmnožování vyžadují tyto extrémní podmínky jako je například vysoká koncentrace soli nebo teplota a jsou schopny přežít i v prostředí s malým množstvím živin, při působení toxických látek nebo dokonce i v oblastech se zvýšenou mírou radiace [1].

Dle extrémních podmínek, ve kterých jsou schopny mikroorganismy přežívat je dělíme do skupin, které jsou uvedeny v tabulce 1

Tabulka 1: Klasifikace a příklady extrémofilních mikroorganismů [1]

Extrémní veličina	Typ	Definice	Příklady
Teplota	Hypertermofily Termofily Mesofily Psychrofilny	Růst > 80 °C Růst 60 – 80 °C Růst 15 – 60 °C Růst < 15 °C	<i>Pyrolobus fumarii</i> <i>Synechococcus lividis</i> <i>Homo sapiens</i> <i>Psychrobacter</i>
Radiace			<i>Deinococcus radiodurans</i>
Tlak	Barofily	Vysoký tlak	

Vysychání	Xerofily	Tolerantní vůči nedostatku vody	<i>Arternia salina</i>
salinita	Halofily	Vysoký obsah solí (2 – 5 M NaCl)	<i>Halomonas elongata</i> <i>Halomonas salina</i> <i>Halomonas organivorans</i>
pH	Alkalofily Acidofily	pH > 9 Nízké pH	<i>Bacillus firmus</i> <i>Cyanidium caldarium</i>

2.1.2) Halofily

Halofilní mikroorganismy jsou skupinou mikroorganismů, jak je uvedeno v tabulce výše, s nároky na vysokou koncentraci soli v prostředí, která způsobuje vysoký osmotický tlak potřebný pro jejich růst. Na základě množství soli, které halofily vyžadují pro svůj optimální růst se dají rozdělit do dvou skupin, a to mírní a extrémní halofilové. Mírní halofilové mají optimální růst v přítomnosti 3-15 % (w/v) soli. Extrémní halofilové, jak vypovídá název, mají potřebu pro koncentraci soli ještě vyšší [2,3,4].

Schopnost přežít v prostředí s tak vysokou koncentrací soli je dána schopností udržet osmotickou rovnováhu [5]. Halofilové reagují na zvýšení osmotického tlaku akumulací osmoticky aktivních látek v cytosolu. Tyto látky chrání halofily před dehydratací a vysycháním cytoplazmy. Jedním z nejúčinnějších osmotik pro prokaryota je glycin betain [6]. Další takovou látkou jsou pak dále ektoiny nebo hydroxyektoiny, jejichž přítomnost v halofilech v této práci zkoumáme.

2.1.3) Rod *Halomonas*

Rod *Halomonas* se řadí do čeledi *Halomonadaceae*. Jedná se o gramnegativní krátké a také v určitých případech i pleomorfní tyčinky. Mohou být jak pohyblivé, tak nepohyblivé, přičemž ty pohyblivé využívají polárního bičíku. Kolonie rodu *Halomonas* bývají povětšinou buďto bílé nebo žluté. Mají též schopnost akumulovat PHB (Polyhydroxybutyrát) jako intracelulární rezervní produkt. Co se týče jejich optimálních podmínek pro růst je ideální rozmezí pH 5-10, teplota mezi 15-45 °C a koncentrace soli 0-20 % NaCl, v extrémních případech až 32,5 % NaCl [7].

2.1.3.1) *Halomonas elongata*

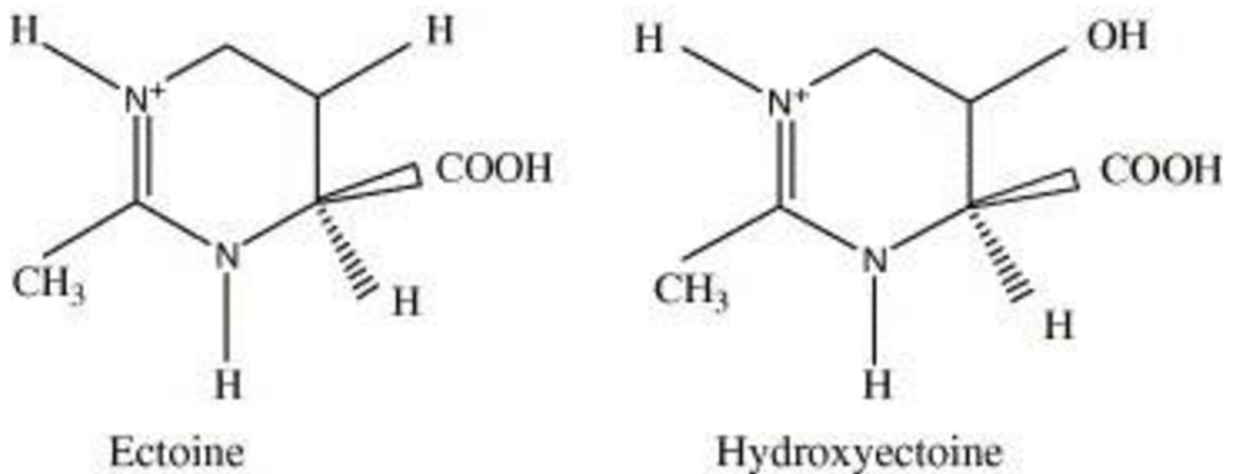
Halofilní γ -proteobakterie *Halomonas elongata* prosperuje v prostředí s vysokými koncentracemi soli tím, že je schopna syntetizovat a akumulovat ektoin. Hladina ektoinu je především regulována koncentrací soli ve vnějším prostředí, bohužel jeho celkový metabolismus a kontrola nebyly ještě úplně pochopeny. Krom své kritické úlohy pro adaptaci buňky prostředím vykazující vysokou salinitu může být ektoin použit jako stabilizátor enzymů a též jako jistá forma ochrany buněk v rámci péče o kůži a zdraví. Roční objem produkce ektoinů se pohybuje v řádu tun, přičemž se pro jeho výrobu využívá právě *Halomonas elongata* [8,9].

2.1.3.2) *Halomonas organivorans*

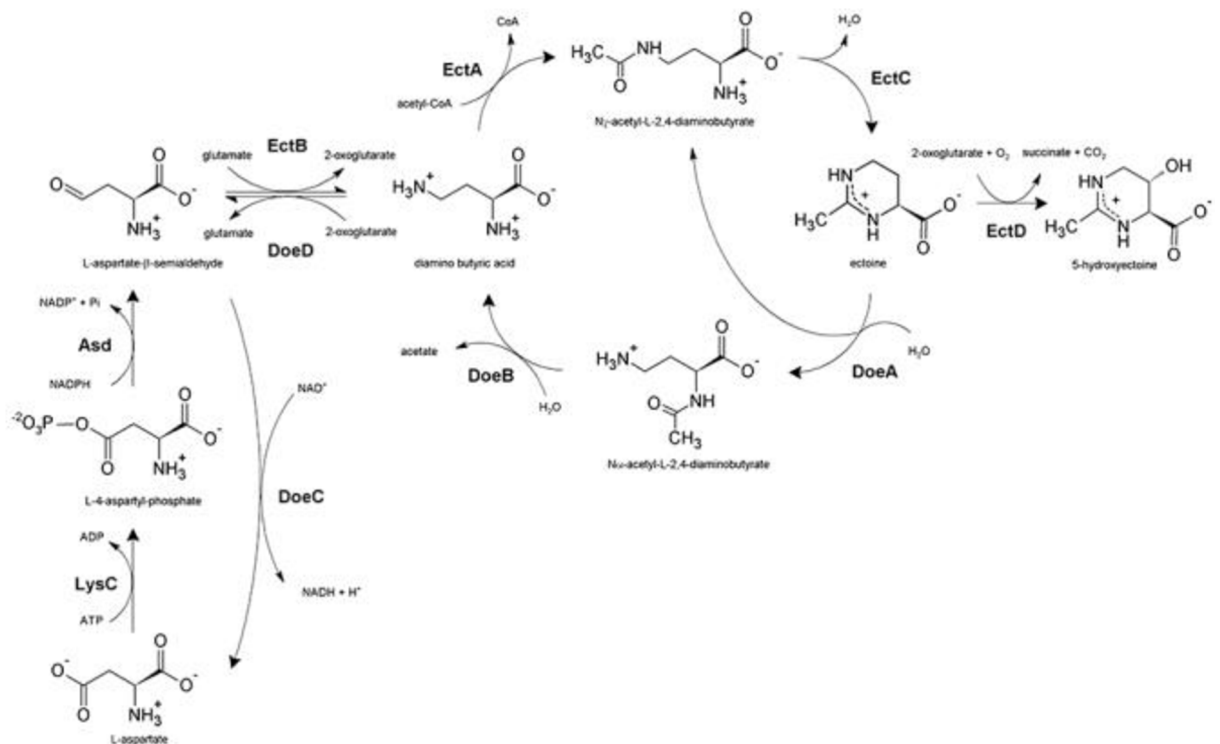
Buňky této bakterie jsou pohyblivé Gram-negativní tyčinky o rozměrech 2,0-3,0x1,0-1,2 μm. Jsou mírně halofilní a rostou ve velkém rozmezí koncentrací soli (1,5-30 %, w/v), přičemž růstové optimum se nachází v rozmezí 7,5-10 % (w/v) soli. Co se týče teploty, roste *Halomonas organivorans* v rozmezí teplot 15-45 °C, kdy jeho optimální teplota činí 37 °C. Bakterie roste v rozmezí pH 6,0 – 10,0 s optimální hodnotou pH 7,0 [10].

2.1.4) Ektoiny

Halomonas elongata syntetizuje ektoin (1,4,5,6-tetra-2-methyl-4-pyrimidkarboxylová kyselina) jako svůj hlavní osmolyt. Ektoin je syntetizován z aspartát-semialdehydu, centrálního meziprojektu v syntéze aminokyselin patřícího do aspartátové rodiny. Tvorba ektoinu se skládá ze tří enzymatických kroků. Jako první se aspartát-semialdehyd transaminuje na 2,4-diaminobutanovou kyselinu (DABA) s glutamátem jako donorem aminové skupiny. Transaminace je katalyzována DABA transaminázou (EctB). Poté je acetylová skupina transferována na DABA z acetyl-CoA pomocí DABA-N γ -acetyltransferázy (EctA) za účelem syntézy N γ -acetyl-L-2,4-diaminobutanové kyseliny. Nakonec ektoinová syntáza (EctC) katalyzuje cyklickou kondenzaci N γ -acetyl-L-2,4-diaminobutanové kyseliny, což vede ke tvorbě ektoinu. Při některých stresových situacích, jako je například zvýšená teplota, konvertuje *Halomonas elongata* určitou část ektoinu na 5-hydroxyektoin pomocí ektoin hydroxylázy (EctD) [11].



Obrázek 1: Ektoin a hydroxyektoin [12]



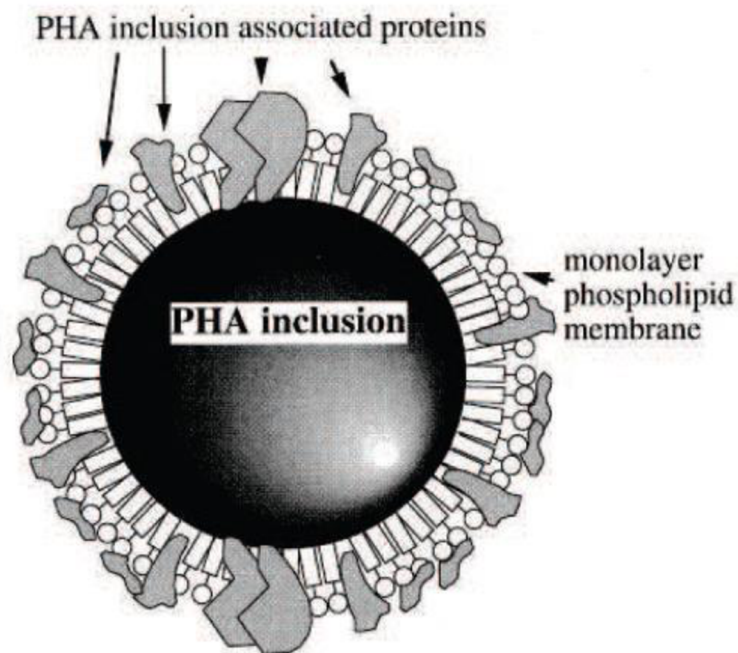
Obrázek 2: Metabolická dráha ektoinu v *H. elongata*. Zde je ukázána hydrolyzáza ektoinu, která vede přímo k $N\gamma$ - a $N\alpha$ -acetyl-L-2,4-diaminobutanové kyselině. LysC: aspartát-kináza; Asd: β -aspartát-semialdehyd-dehydrogenáza; EctB: transamináza L-2,4-diaminobutanové kyseliny; EctA: $N\gamma$ -acetyltransferáza L-2,4-diaminobutanové kyseliny; EctC: ektoin syntáza; EctD: ektoin hydroxyláza; DoeA: ektoin hydroláza; DoeB: deacetyláza $N\alpha$ -acetyl-L-2,4-diaminobutanové kyseliny; DoeD: transamináza L-2,4-diaminobutanové kyseliny; DoeC: aspartát-semialdehyd dehydrogenáza [11] Aby se mikroorganismy vyrovnaly s hyperosmotickými podmínkami produkují látky zvané osmolyty, mezi které patří právě ektoiny a jejich hydroxyderiváty. Jejich množství se může vyšplhat až k několika molům na litr, aniž by nějak narušily životní procesy buňky nebo proces skládání proteinů. Osmolyty díky tomu hrají velkou roli v procesu obnovy turgoru v podmínkách nízké vodní aktivity tím, že pracují proti výtoku vody z buněk [13].

V souvislosti s ektoiny a hydroxyektoiny je často používán výraz chemický chaperon. Chemické chaperony jsou organické osmolyty, které mají funkci stabilizátorů makromolekul. Ektoiny mají výborné stabilizační účinky na biologické molekuly, tj. proteiny, buněčné stěny, DNA i na celé buňky. Chrání proteiny před agregací, podporují jejich správné skládání v podmínkách, které v jiných případech vyvolávají denaturaci a jsou plně v souladu s buněčnou fyziologií. Díky těmto vlastnostem jsou ektoiny v průmyslu používány jako ochranné komponenty v oblasti produktů péče o zdraví a kosmetiky [14].

2.2) PHA – polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty jsou polyestery, které jsou produkovány mikroorganismy. Co se týče vlastností se velice podobají některým termoplastům. Co k nim však směřuje pozornost dnešních technologií je jejich rozložitelnost. Uvnitř buněk se polyhydroxyalkanoáty nachází ve formě cytoplazmatických inkluzí, jejichž velikost se pohybuje mezi 0,2 a 0,5 μm . Jejich velikost

i četnost se liší od druhu bakterie. Každá granule se skládá z PHA, proteinů a lipidů, kde povrch granule je tvořen vrstvou fosfolipidů a proteinů a uvnitř jádra se nachází polymer [15].

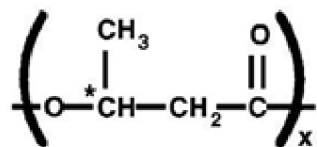


Obrázek 3: Struktura PHA granule [15]

2.2.1) PHB – polyhydroxybutyrát

Polyhydroxybutyrát je přírodní polyester 3-hydroxybutanové kyseliny patřící do skupiny SCL-PHA (short chain length polyhydroxyalkanoáty).

PHB je kompletně biodegradabilní, vysoce hydrofobický termoplastický polyester s teplotou tání ležící v intervalu od 170 do 180 °C a krystaličnost mezi 55 a 80 %. Jeho nevýhodou je křehkost, způsobená velkým množstvím krystalických center, což silně omezuje jeho průmyslové využití [16].



Obrázek 4: Obecná struktura PHB [16]

2.3) Vibrační spektroskopie

V dnešní době je takřka nezbytné mít co nejpřesnější informace o struktuře makromolekul, jejich funkcích a vztahu mezi nimi. Pro tento účel je používána jako experimentální metoda poskytující nám právě tyto informace, vibrační spektroskopie. Vibrační spektroskopie zkoumá molekulární vibrace prostřednictvím interakce molekuly se zářením, která vede k vibračním přechodům molekuly.

Jak v případě Ramanovy spektroskopie tak v případě té infračervené, se jedná o nedestruktivní metody, jejichž hlavním přínosem je možnost zisku vcelku podrobné strukturní informace, které se pomocí ostatních metod zjišťují buďto dost špatně anebo nejsou zjištěitelné vůbec.

Díky vibrační spektroskopii je možné studovat biologické látky přímo v jejich přirozeném prostředí, což jsou vodné roztoky. Sledovat lze kromě změn struktury zapříčiněné změnou fyzikálně-chemických parametrů jako například změnou teploty nebo pH, ale i samotnou dynamiku přechodů mezi strukturami. Z časového hlediska je použití Ramanova rozptylu i IČ daleko méně časově náročné než při použití například fluorescence nebo nukleární magnetické rezonance, což činí z vibrační spektroskopie ideální cestu studia dynamiky biologických procesů [17].

2.3.1) Interpretace vibračních spekter

Při interpretaci vibračních spekter dva zásadní problémy. Prvním z nich je přiřazení absorpčních a rozptylových pásů k jednotlivým normálním vibracím molekuly. Tím druhým je charakterizace normálních vibrací pomocí určení symetrie a spřažených vnitřních souřadnic. V rámci rozboru vibračních spekter je nutno analyzovat všechny normální vibrační mody. Pro tento účel je použita koncepce charakteristických vlnočtů funkčních skupin umožňující přiřazení pásů ke spektru. Nevýhoda metody je její náročnost na zvládnutí, vyžaduje totiž velkou zručnost ze strany člověka, který s ní pracuje. Spektrální pásy v oblasti mezi 4000 – 1500 cm^{-1} jsou ideální pro identifikaci funkčních skupin jak například -OH, C=O, N-H, CH atd. Oproti tomu pásy v oblasti 1500 – 400 cm^{-1} , takzvané oblasti „otisku palce“ (v ang. Fingerprint region). Neznámou analyzovanou látku lze následovně identifikovat za pomoci vyhledávacích programů a digitalizovaných infračervených spekter [18].

2.3.2) Vibrace a rotace molekul

Každý atom má tři stupně svobody, může se nezávisle hýbat po všech třech osách kartézské soustavy. Pokud n počet atomů tvoří molekulu, existuje $3n$ stupňů svobody. První tři stupně, translační, zahrnují pohyb všech atomů najednou stejným směrem paralelním s osami kartézské soustavy. Další trojice stupňů, stejně jako ta předchozí, nemění vzdálenost mezi atomy, popisují totiž rotace. Zbýlých $3n - 6$ stupňů zahrnují pohyby, které mění vzdálenosti mezi atomy, délky vazeb a velikost úhlů mezi nimi. Jelikož jsou tyto vazby elastické, nastávají periodické pohyby. Všechny vibrace ideální molekuly jsou důsledkem superpozice $3n - 6$ neinteragujících normálních vibrací. Nejjednodušší vibrující molekuly popisuje atom připevněný k velkému množství hmoty pomocí pružinky bez váhy.

Síla F nezbytná pro pohyb atomu určitým směrem x z rovnovážné polohy je úměrná silové konstantně f , mírou síly vazby. Takto zní Hookův zákon:

$$F = -f \cdot x$$

Negativní znaménko naznačuje, že je síla v opačném směru než prodloužení [19].

Absorpci kvanta infračerveného záření přechází molekula ze základního stavu do vyššího vibračního stavu. Takový přechod je většinou doprovázen excitací do některého z rotačních stavů. Navíc v oblasti nízkoenergetického záření vykazují některé molekuly přechod do čistě rotačních stavů, pokud nastane takový případ, mluvíme o takzvané vibračně-rotační spektroskopii. Vzhledem k tomu, kolik kvanta energie je zapotřebí k excitaci do vyšších vibračních stavů se většina molekul za normální teploty nachází v základním vibračním stavu. Aby mohla molekula přejít do vyššího stavu, je zapotřebí, aby molekula přijala energii skrz interakci se světelným zářením odpovídající rozdílu obou stavů. To nastává buďto při absorpci infračerveného záření vzorkem, infračervené spektroskopii nebo při Ramanově rozptylu [20].

2.3.3) Polarizovatelnost molekul

Ačkoliv infračervené i Ramanovo spektrum zahrnuje vibrační i rotační energetické pásy, nejsou duplikáty jeden druhého, spíše se navzájem doplňují. Je to proto, že intenzita spektrálních pásů na tom, jak efektivně je energie fotonu transferována do molekuly. [21]

Schopnost molekuly rozptylovat foton způsobuje právě její polarizovatelnost. Polarizovatelnost, označována jako α , reprezentuje schopnost aplikovaného elektrického pole, E , indukovat dipólový moment μ_{in} v atomu nebo molekule.

$$\mu_{in} = \alpha E$$

Například velké atomy jako je xenon mají silnou polarizovatelnost kvůli jejich elektronovým oblakům, vzdálených od xenonového jádra, které je relativně jednoduché zdeformovat elektrickým polem. Atomy helia, které jsou menší a kompaktnější, oproti tomu mají menší polarizovatelnost. Polarizovatelnost atomů je isotropická (tj. stejná ve všech směrech), zato polarizovatelnost molekul záleží na jejich symetrii. Kvůli tomu jsou polarizovatelnosti označovány pomocí kartézských souřadnic indikujících její směr. [22]

2.4) Ramanova spektroskopie

2.4.1) Historie

Indický fyzik Chandrasekhara V. Raman roku 1928 objevil a popsal kombinovaný rozptyl záření na hmotných objektech, díky čemuž obdržel roku 1930 Nobelovu cenu. C. V. Raman pro svůj experiment použil jako zdroj světelné záření, dalekohled jakožto sběrač paprsků a jako detektor použil vlastní oči kvůli nedostatečné úrovni vybavení v té době. S postupem času je ale byla technologie Ramanova spektrometru vylepšována. Zprvu byla pozornost směřována k vývoji lamp, sloužících jako excitační zdroj, které byly ale pro tento účel nevyhovující z důvodu jejich nedostatečné intenzity. Přelom přišel roku 1962, kdy se jako excitační zdroj začaly používat lasery [23].

2.4.2) Ramanův efekt

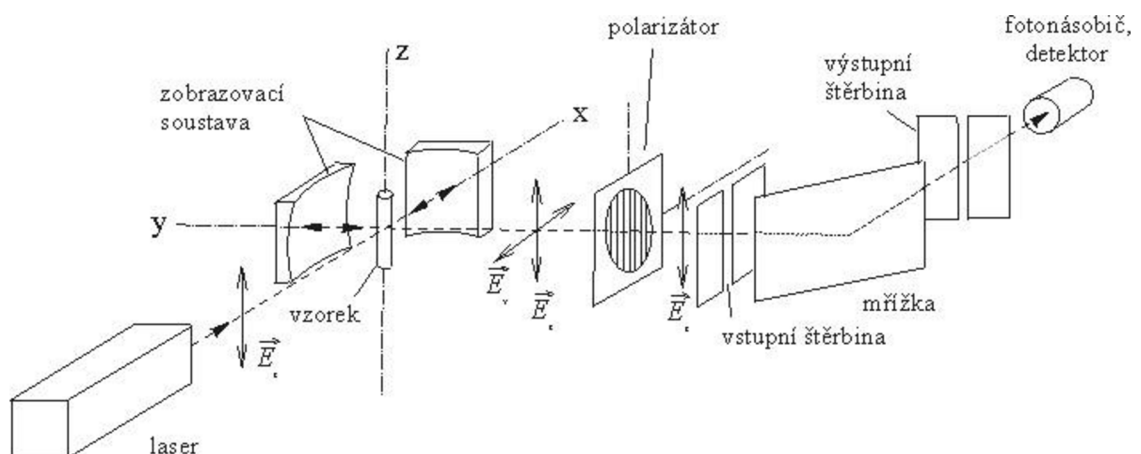
Když elektromagnetická radiace osvítlí molekulu, jsou tři možnosti, jak s energií bude naloženo. Energie může být transmitována, absorbována nebo rozptýlena. Při Tyndallově efektu je radiace rozptýlena částicemi jako je například kouř nebo mlha. Při Rayleighově rozptýlení molekuly rozptylují světlo, přičemž ani v případě Tyndallova nebo Rayleighova efektu nedochází ke změně vlnové délky. V roce 1928, C. V. Raman popsal další typ rozptylu dnes známý jako Ramanův efekt. Tento jev byl už teoreticky předpovězen Adolfem Smekalem už před úspěšnou experimentální demonstrací Ramanova efektu, proto je občas nazýván Smekal-Ramanovým efektem v německé literatuře. V Ramanově spektrometru je vzorek osvětlen intenzivním zdrojem monochromatického záření obvykle ve viditelné části světelného spektra. Většinou je frekvence záření mnohem větší než vibrační frekvence, ale nižší než frekvence elektronická. Na Rayleighův rozptyl může být nahlíženo jako na elastickou kolizi incidentního fotonu s molekulou, kde je výsledkem kolize zvýšení vibrační či rotační energie o hodnotu ΔE_m . Aby mohla být energie zachována, musí být energie rozptýleného fotonu $\Delta h\nu_s$ rozdílná od energie fotonu incidentního $\Delta h\nu_i$ o hodnotu rovnou ΔE_m .

$$\Delta h\nu_i - \Delta h\nu_s = \Delta E_m$$

Pokud molekula dostane energii, poté je ΔE_m kladné a ν_s je menší než ν_i , což vede k růstu Stokesových čar v Ramanově spektru. Tato terminologie má své kořeny ve Stokesově zákoně o fluorescenci, který říká, že fluorescentní záření vždy nastává při nižších frekvencích, než jsou frekvence excitačního záření. Pokud molekula energii ztratí, ΔE_m je poté záporné, ν_s je větší než ν_i , což vede k růstu anti-Stokesových čar v Ramanově spektru [21].

2.4.3) Teorie metody Ramanovy spektroskopie

Metoda založená na výše zmíněném Ramanově jevu je využitelná pro identifikaci látek, kvalitativní, kvantitativní i strukturní analýzu. Je obzvláště významná pro studium organických a anorganických látek (v oblasti geologie například bitumeny) a poskytuje možnost detailního studia složitých heterogenních směsí látek [24].



Obrázek 5: Zjednodušené schéma Ramanova spektrometru [25] Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.

2.4.4) Práce se vzorkem

Pomocí Ramanovy spektroskopie lze studovat plyny, kapaliny i pevné látky, přičemž u kapalin je jejich studium nejjednodušší.

Kapaliny lze umístit do držáků o vnějším průměru v řádu několika milimetrů. Pro mikro vzorky byly použity aluminizované kapiláry s objemem buněk okolo 0,04 μl [26].

Pevné látky lze měřit ve speciálních držácích umožňujících, aby byl pevný vzorek suspendován uprostřed laserového paprsku. V případě prášku je použita kapilára.

Pevné vzorky je možné též rozpustit v příslušných rozpouštědlech. Následně se s nimi zachází jak s kapalinami. Pro anorganické sloučeniny je ideálním rozpouštědlem voda, která v infračervené oblasti prakticky netransmituje. Výběr organického rozpouštědla závisí na jeho schopnosti rozpouštět, jeho Ramanově spektru a na možné interakci s rozpouštěnou látkou.

Byly popsány rotační vzorkovací systémy s frekvencí 0-3000 rpm pro vysoce absorbující kapaliny nebo roztoky a rotační zařízení pro barvené krystalické prášky [27,28].

Byly popsány i techniky skenování povrchu pro vysoce barevné krystaly. V této metodě je povrch skenován umístěním plátu rotačního refraktoru mezi vzorek a čočky použité pro zaměření laserového paprsku na povrch krystalu [29]

Ramanova spektra u plynů jsou měřena v plynových buňkách více odrazového typu při nastavitelném tlaku od milimetrů po atmosféry [21]

2.4.5) Práce se spektry a jejich vyhodnocení

Nasycené vazby (alkeny, alkyny, ...) dávají intenzivní Ramanovy pásy, a naopak vcelku slabé infračervené pásy v rozmezí od 1600 do 2300 cm^{-1} . Opačná situace platí pro polární vazby (dusík-vodík, hydroxylová skupina, ...) jejichž valenční vibrace nám dávají slabé Ramanovy pásy a také velice intenzivní pásy v infračerveném spektru. Pro karboxylové skupiny jsou pásy jak v Ramanově tak v infračerveném spektru intenzivní, totéž platí pro aromatické sloučeniny [30].

Obecně platí, že krystalické pevné látky mají intenzivnější spektrum oproti kapalinám nebo plynům. Co se týče tlaku, orientace krystalové mřížky nebo čistoty vzorku, ty nemají na spektrum téměř žádný vliv na rozdíl od teploty, na kterou je spektrum velice citlivé.

Je ideální mít co nejpodrobnější znalost o vzorku pro co nejpřesnější vyhodnocení spektra. Počítá se znalost čistoty vzorku, způsob jeho přípravy, vlivu měřících přístrojů a samozřejmě skupenství.

Pro jednodušší identifikaci vzorku a jeho vyhodnocení se v dnešní době používají knihovny, které obsahují kompletní spektra. Další možnost, jak identifikovat spektra je použití teoretických výpočtů pomocí metody funkcionálu hustoty (ang. Density functional theory). Výhoda použití této metody je v přesnějším odhadu povahy vibrací, čímž jsme schopni lépe určit molekulové struktury.

Ramanova spektroskopie je považována hlavně jako možnost kvalitativní analýzy. Kvantitativní analýza je ale také možná, a to na principu lineární superpozice. Ramanovo spektrum zkoumaného vzorku je rovné součtu vážených spekter jednotlivých komponent ve vzorku [31].

2.4.6 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Poprvé byla SERS (Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie) pozorována roku 1974 Fleischmanem a kol. Zesílený signál pocházel z pyridinu adsorbovaného na elektrochemicky zdrsňeném povrchu stříbrné elektrody. Ti však špatně stanovili hypotézu, že síla signálu byla úměrná zvětšení povrchu, na kterém pyridin adsorboval.

Následné studie vyvrátily tuto hypotézu a nahradily jí tvrzením, které přičítá zesílení signálu vybuzení povrchového plazmonu na kovovém povrchu [32].

Výhoda Ramanovy spektroskopie je v její rychlé a jednoduché chemické analýze. Na druhou stranu má velkou nevýhodu v její velice nízké intenzitě optického signálu. Tím pádem je potřeba tento signál zesílit. Jednou z možností je použití SERS, která využívá plasmonové nanostruktury pro zesílení Ramanova signálu.

Nejčastěji využívané plasmonové nanostruktury jsou kovové nanočástice s maximální velikostí v řádu stovek nanometrů. Tyto nanočástice uvolňují plasmonickou resonanci při jejich ozáření zářením o specifické vlnové délce. Tato resonance zesílí blízké elektromagnetické pole v okolí nanostruktur [33].

Největší využití pro SERS mají nanočástice ze zlata, stříbra nebo mědi. Využitelné jsou také alkalické kovy jako například lithium, sodík nebo draslík. Jejich velkou výhodou jsou výborné optické vlastnosti v oblasti viditelného světla a v blízké infračervené oblasti. Jelikož je výroba částic relativně jednoduchá, je možné pomocí změny parametrů měnit jejich tvar a rozměry podle potřeby.

Zlaté částice mají své hlavní využití v biomedicínských aplikacích díky jejich vynikající biokompatibilitě a jejich vazbě na řadu ligandů, protilátek a ostatních biologicky významných látek. Díky tomu lze poté provádět Ramanovu mikroskopii buněk a tkání, což má uplatnění v diagnostice například nádorových onemocnění [32].

2.4.7 Koherentní anti-Stokesův Ramanův rozptyl (CARS)

Koherentní anti-Stokesova Ramanova spektroskopie poskytuje velkou výhodu oproti standardní inkoherentní Ramanově spektroskopii. Výhody zahrnují 10^5 -násobné zlepšení efektivity konverze, spektrální a prostorové rozlišení oproti fluorescenci, nízkou průměrnou energii dopadu a nepotřebu použití monochromátoru [34].

Intenzita CARS signálu závisí na čtverci koncentrace analytu. CARS se také vyznačuje, jak je výše zmíněno, výbornou prostorovou i časovou rozlišovací schopností, což je využitelné při měření vibračních stavů molekul. Prostorové rozlišení je závislé na úhlu překryvu excitačních svazků a na průměru jejich stop. Rozlišení časové je závislé na frekvenci pulzů laserů (obvykle jsou využívány femto- a pikosekundové zdroje). Kritickým bodem je sfázování pulzů laserů.

Metoda je využitelná pro zkoumání biologických komponentů v prostředí, kde pro konvenční Ramanovu spektroskopii tvoří problém fluorescence. CARS je také ideální metodou k měření lokálních koncentrací látek. Například v případě plynné fáze je CARS využívána pro měření lokálních koncentrací a teplot během hoření, své využití má při měření koncentrace intracelulární vody uvnitř buňky, hydrodynamiky mikroorganismů atd. [34,35].

2.4.8) Na hrotu zesílený Ramanův rozptyl (TERS)

V běžném životě nastane situace, při které bouřkové mraky nesoucí elektrický náboj působí na předměty ve svém okolí. Přednost mají hlavně objekty s ostrou hranou nebo špičkou. Toto ostré zakončení vede ke koncentraci náboje v jeho blízkém okolí, což má za následek přenosu náboje, v tomto případě, mezi bouřkovým mrakem a hromosvodem.

Dalo by se říci, že na podobném principu je založena i TERS. V případě TERS je ale kovový hrot ozařován laserem o dané frekvenci. Odpovídá-li frekvence laseru plazmonové rezonanční frekvenci, budí na konci hrotu lokalizované plazmony, které se nacházejí okolo hrotu. Tento jev vytváří lokálně zesílené elektromagnetické pole vedoucí ke zvýšené intenzitě rozptýlených fotonů. Toto zvyšuje několikanásobně citlivost Ramanovy spektroskopie.

Tato metoda probíhá většinou v kombinaci s AFM (atomic force microscopy) metodou. Jako první dochází k charakterizaci, kdy je nalezena oblast, která je následně analyzována v Ramanově spektru. Jako další krok je ozáření hrotu laserem, je měřeno odražené záření a následně probíhá Ramanova analýza.

Je kladen též velký důraz na výrobu hrotů pro TERS, obzvláště na poloměr špičky hrotu, jelikož se jedná o rozhodující parametr pro zesílení elektromagnetického pole. Jako další důležité parametry je třeba uvést geometrii a hladkost hrotu. Použitý materiál je převážně zlato nebo stříbro kvůli jejich vlastnosti buzení plazmonů [33,36,37].

2.4.9) Aplikace Ramanovy spektroskopie v praxi

Analýza vzorku za pomoci vibrační spektroskopie je využitelná při mapování (mapping) nebo zobrazování (imaging). Mapování probíhá na principu postupného měření spektra přilehlých oblastí vzorku. Toho je možné dosáhnout za pomoci posuvu každé části vzorku do paprsku zaměřeného do mikroskopu, přičemž se celý proces opakuje do té doby, než jsou všechny oblasti vzorku proměřené. Zobrazování samo o sobě vyžaduje, na rozdíl od mappingu, aby byl vzorek zaměřován na detektor, kde se měří intenzita záření procházejícího všemi částmi vzorku. Tyto metody mají své využití například při sledování nádoru tlustého střeva nebo mozku, při skenování buněk v lidském těle nebo ve farmaceutickém průmyslu či v zemědělství [38,39]

2.4.10) Ramanova spektroskopie pro neinvazivní charakterizace mikrobiálních buněk

Ve studiích provedených na konci dvacátého století je ukázáno, že infračervená spektra mikroorganismů jsou vysoce specifické spektrální otisky, které lze použít k rychlému rozlišení a klasifikaci rozličných mikrobiálních druhů a kmenů, k charakterizaci jevů závislých na růstu a specifických reakcí buněk na léčiva.

Použité kmeny byly naočkovány na agarové misky za použití čtyřkvadrantových očkovacích vzorů. Kmeny *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Bacillus* a *Pseudomonas* byly kultivovány na CASO- (casein peptone/soy meal peptone) agarových miskách. Kmen *Streptococcus* byl kultivován na „Columbia blood“ agarových miskách. Všechny kmeny rostly po dobu 24 hodin při teplotě 37 ± 2 °C kromě kmenu *Pseudomonas*, který rostl při teplotě 30 ± 2 °C.

Pro Ramanovo měření bylo malé množství biomasy (10-60 µg suché hmotnosti) vyjmuto z povrchu agaru, následně bylo vysušeno a rozemleto. Malá část rozemletého materiálu byla převedena do skleněných kapilár pro Ramanovo měření.

Ve studii uváděné výše byl využíván spektrometr Bruker IFS 66 vybavený FRA-106 Ramanovým modulem a chlazeným Ge-diodovým detektorem. Excitační zdroj byl Nd³⁺-YAG laser (1064 nm).

Aby se minimalizovaly problémy spojené se základními posuny a zároveň se zlepšily rozlišení překrývajících pásů, byly vypočítány deriváty originálních infračervených a Ramanových spekter za použití Savitzky-Golayova filtru [40,41].

2.4.11) Rozlišení bakterií pomocí SERS

Ramanova spektroskopie se ukázala jako potenciálně účinná metoda pro určování organismů. I když je Ramanův efekt slabý (pouze jeden z 10^8 dopadajících fotonů je rozptýlen dle Ramanova jevu), lze ho zesílit (10^3 - 10^6 krát) pokud jsou molekuly připojeny nebo jsou mikroskopicky blízko ke zdrsňenému povrchu. Tato technika je známá jako „Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS).

V některých studiích byla SERS, za užití agregovaného koloidního roztoku stříbra, použita k analýze skupiny bakterií spojených s infekcí močového traktu. Získání jednoho spektra trvalo cca 10 sekund.

Výsledky studie ukázaly rozlišení bakterií na úrovni kmenů pro skupinu vzorků bakterie *Escherichia coli*, což bylo následně potvrzeno projekcí spekter do DFA (discriminant function analysis) a HCA (hierarchical cluster analysis) [42].

3) PRAKTICKÁ ČÁST

3.1) Použité mikroorganismy

Pro experimentální část byla vybrána bakterie *Halomonas elongata* CCM 3756^T, se kterou probíhaly veškeré kultivace. Pro porovnání při závěrečném měření na Ramanově spektroskopii byly použity ještě bakterie *Halomonas organivorans* 7142^T a *Halomonas salina* 4361^T. Všechny zmíněné bakterie byly pořízeny z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.2) Použité chemikálie

- Nutrient Broth (Himedia)
- Peptone (Himedia)
- Yeast Extract (Himedia)
- Agar Powder (Himedia)
- Spirit Blue Agar (Himedia)
- Tris-HCl pufr (5 mM, pH 8,5)
- Master mix One *Taq* Hot Start DNA polymerázy
- MgCl₂ · 6H₂O (Ing. Petr Švec, PENTA)
- Chloroform (VWR Chemicals)
- Laktóza (Lachner)
- Xylóza (SAFC)
- Glukóza (PENTA)
- Sacharóza (Lachner)
- Fruktóza (Lachner)
- Agaróza (SIGMA)
- Primery
- Vzorek DNA
- Destilovaná voda (sterilní)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- H₃BO₃
- EDTA
- TBE pufr
- Midori Green Advanced (DNA barvivo)
- KH₂PO₄ (LACHEMA)
- (NH₄)₂SO₄ (LACHEMA)
- Na₂HPO₄ (LACHEMA)
- MgSO₄ · 7H₂O (LACHEMA)
- Roztok stopových prvků (MES)

3.3) Použité přístrojové vybavení

- Ramanovský mikrospektrometr Renishaw In Via Reflex
- Analytické váhy (Boeco)
- Vortex TK3S (Techno Kartell)
- Spektrofotometr Helios δ (Unicam)
- Laminární box Aura mini (Bio Air Instruments)
- Temperovaná třepačka Heidolph Unimax 1010 (Labicom s.r.o.)

- Centrifuga U-32R (Boeco)
- Centrifuga Sigma (Sartorius)
- Termostat LS-35
- Gradientový Palm-cycler (Corbett Research)
- Zdroj napětí MP 300 V (Major science)
- UV-transluminátor (Major Science)
- Plynový chromatograf GC-FID, Hewlett Packard, Series II 5890
Kolona: DB-WAX 30 m by 0,25 mm
- Běžné laboratorní pomůcky a sklo

3.4) Příprava kultur

Pro tuto práci byla využita bakterie *Halomonas elongata*, jejíž výchozí ideální podmínky pro optimální růst byla koncentrace soli 30 g/l NaCl při teplotě 30 °C.

3.5) Příprava inokula

Prvním krokem byla příprava inokula, které obsahovalo Nutrient Broth o koncentraci 25 g/l, pro naše účely byl celkový objem inokula 50 ml, pro který bylo naváženo 1,25 g ± 50 mg Nutrient Broth. Jelikož další práce s inokulem probíhaly ve sterilním boxu, bylo nutné Erlenovy baňky obsahující inokula zašpuntovat, obalit alobalem a dát je na 40 minut sterilovat. Po vychladnutí inokula následovalo přidání kultury do inokula uvnitř sterilního boxu buďto z již narostlé kultury v roztoku pomocí pipety nebo z Petriho misky pomocí kličky. Poté se kultura v inokulu dala na míchačku při 176 rpm a nechala se 24 hodin růst.

3.5.1) Složení média B 54

· Nutrient Broth	25 g/l
· MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5 g/l
· NaCl	30 g/l

3.5.2) Složení inokula

· Pepton	15 g/l
· Extrakt z kvasnic	3 g/l
· NaCl	30 g/l
· Glukóza	1 g/l

3.6) Příprava minerálního média

Po 24 hodinách bylo potřeba narostlou kulturu přeočkovat do minerálního média (složení viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Velice důležité pro růst bakterií je zajištění veškerých živin, které bude bakterie potřebovat. V případě inokula k tomuto účelu sloužil Nutrient Broth, ale v případě minerálního média bylo nutno přidat cukr, jakožto zdroj uhlíku, konkrétně fruktózu a MES (roztok stopových prvků). Stejně jako u předchozího inokula bylo potřeba baňky s minerálním médiem nechat sterilovat v tlakových hrncích po dobu 40 minut, jelikož přeočkování též probíhalo ve sterilním boxu. Množství očkované kultury vždy odpovídal deseti procentům celkového objemu minerálního média, do kterého měl být

přeočkován, konkrétně v tomto případě bylo vždy očkováno 10 ml kultury do 100 ml minerálního média. Poté byla kultura dána na míchačku a nechána 72 růst.

3.6.1) Složení minerálního média

· KH_2PO_4	1,02 g/l
· $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3 g/l
· $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	11,1 g/l
· $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
· NaCl	30 g/l
· Glukóza	20 g/l
· Roztok stopových prvků (MES)	1 ml

3.6.2) Složení roztoku MES

· $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	9,7 g/l
· $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,8 g/l
· $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,156 g/l
· $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,119 g/l
· $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,118 g/l
· $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g/l
· 0,1 M HCl	1000 ml

3.7) Spektrofotometrické měření zákalu

Po ukončení kultivace bylo potřeba odebrat vzorek pro spektrofotometrické měření. Před samotným měřením bylo nutné vzorek zředit tak, aby se výsledná hodnota absorbance nacházela v intervalu od 0,100 do 0,900. Zředěný vzorek byl následně měřen při vlnové délce 630 nm proti destilované vodě. Pro účely spektrofotometrického měření zákalu byla použita kvjeta s délkou optické dráhy 1 cm.

3.8) Likvidace kultur

Poté, co byl změřen zákal při 630 nm na spektrofotometru, již nebyla kultura narostlá na minerálním médiu potřeba a mohli jsme se jí zbavit. Nejdříve bylo nutné změřit biomasu následujícím způsobem. Z celkového objemu narostlé kultury se odebralo 10 ml do dvou zkumavek. Zkumavky byly vloženy do centrifugy, kde byly centrifugovány při 6000 otáčkách za minutu po dobu pěti minut. Po vyjmutí zkumavek z centrifugy byl supernatant odlit a zůstala pouze biomasa usazená na dně zkumavky. Aby se biomasa opravdu zbavila supernatanu, bylo přidáno ještě 5 ml destilované vody, a aby se biomasa usazená na dně důkladně promíchala s vodou, dala se zkumavka zvortexovat na pár sekund. Následoval stejný postup jako předtím, zkumavky byly vloženy do centrifugy při stejných otáčkách po tu samou dobu. Supernatant se znovu odlil pryč a zůstala čistá biomasa. Do zkumavky se v konečném kroku přidalo maximálně 1 ml vody, znovu se zkumavka nechala zvortexovat a její obsah byl přelitý do dvou zkumavek Ependorf. Ty byly znovu vloženy do centrifugy a nechaly se zcentrifugovat stejně jako v předchozím postupu. Finální supernatant se odlil a zkumavky Ependorf s biomasou byly dány do sušárny při 60 °C, aby se z nich odstranila zbylá voda.

3.9) Stanovení koncentrace PHA v biomase

Celková koncentrace PHA v biomase byla stanovena za pomoci plynové chromatografie s FID detekcí. Množství použité biomasy se pohybovalo mezi 8 a 11 mg, které byly následně vloženy do předem označených vialek. Do vialek bylo dále přidáno 1 ml chloroformu a 0,8 ml vnitřního standardu 5 mg/ml kyseliny benzoové v roztoku 15 % kyseliny sírové v methanolu. Poté, co byly vialky naplněny veškerými potřebnými komponenty byly uzavřeny víčkem a následně vloženy do termostatu vyhřátého na teplotu 94 °C, kde byly ponechány 3 hodiny na esterifikaci.

Poté, co byla esterifikace ukončena, byly vialky vyjmuty z termostatu. Po určité době, během které vialky vychladly, byly vzorky převedeny do větších vialek. Do vialek se vzorkem bylo poté přidáno 0,5 ml 0,05 M NaOH. Obsah vialky byl důkladně protřepán, aby došlo k oddělení fází. Ze spodní chloroformové fáze bylo odpipetováno 0,05 ml do vialek s 0,950 ml chloroformu. Vialky byly znovu uzavřeny, označeny a vloženy do plynového chromatografu s plamenou ionizační detekcí (GC-FID) za účelem analýzy.

3.10) Polymerázová řetězová reakce – PCR

Polymerázová řetězová reakce, poprvé použita roku 1983 Karym Mullisem, se v dnešní době zařadila, díky své vysoké citlivosti, specifitě a rychlosti, mezi nejvíce používané techniky v molekulární biologii. Umožňuje až 10^6 násobné pomnožení úseku DNA během dvou až tří hodin. Polymerázová řetězová reakce umožňuje selektivní amplifikaci vybraného úseku DNA, kdy velikost amplifikovaného úseku DNA vymezují 2 oligonukleotidy (primery). [43,44]

V rámci této práce bylo cílem PCR amplifikace konkrétního místa bakteriální DNA a to fragmentu genu *phaC*, který kóduje PHA syntázu .

Z kultury na Petriho misce byly odebrány buňky pomocí kličky, které byly umístěny do zkumavky s 100 μ l pufru tris-HCl o koncentraci 5 mM a pH 8,5. Vzorek ve zkumavce byl zahříván na 90 °C po dobu 15 minut. Po zahřátí byl obsah zkumavky zcentrifugován při 10 000 rpm po dobu 10 minut. Pro účely PCR byly odebrány 2 μ l supernatantu, které byly přidány do směsi obsahující Master mix One Taq Hot Start DNA polymerázy, MgCl₂, jeden pár primerů pro *16SrRNA*, jeden pár primerů pro *phaC* a PCR vodu. Souběžně s přípravou směsi pro PCR byla připravena i negativní a pozitivní kontrola, kde pozitivní kontrola obsahovala vzorek DNA bakterie *Cupriavidus necator* H16, který byl připraven obdobně jako náš vzorek. Negativní kontrola byla směs pro PCR, kde místo 2 μ l vzorku DNA bylo přidáno stejné množství PCR vody. Samotné PCR bylo provedeno na Thermocycleru a čistota vzorku DNA byla následně spektrofotometricky změřena jako poměr A₂₆₀ k A₂₈₀ proti pufru.

Tabulka 2: Sekvence primerů

Velikost [bp]	Primer	Sekvence bazí	Teoretická teplota tání [°C]
---------------	--------	---------------	------------------------------

<i>16SrRNA</i>	1500	16S-F	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	54,6
		16S-R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	49,4
<i>phaC</i>	551	G-D	GTG CCG CCS YRS ATC AAC AAG T	62,7
		G ₁ R	GTT CCA GWA CAG SAK RTC GAA	54,5

Tabulka 3: Program PCR

krok	proces	teplota (°C)	čas (s)	počet cyklů
1	Denaturace	94	30	1
2	Denaturace	94	30	30
	Annealing	55	30	
	Syntéza	68	90	
3	Syntéza	68	300	1
		30	60	1

3.10.1) Směs pro PCR

- Master mix One *Taq* Hot Start DNA polymerázy 12,5 µl
- MgCl₂ 2,6 µl
- Primery pro 16SrRNA (16S-F, 16S-R) 2 x 1 µl
- Primery pro *phaC* (G-D, G₁R) 2 x 1 µl
- Vzorek DNA 2 µl
- PCR voda 3,9 µl

3.11) Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je založena na pohybu molekul, které jsou záporně nabity, uvnitř stejnosměrného elektrického pole směrem k anodě. Molekuly DNA se separují na základě rozdílných rychlostí pohybu v agarózovém gelu, kde je rychlost nepřímo úměrná velikosti molekuly. Jako nosič pro separaci nukleových kyselin je využívána agaróza a polyakrylamid, přičemž agaróza je připravována rozpuštěním práškové agarózy v pufru, který má své využití i jako elektrolyt. [45,46]

Gel pro elektroforézu byl připraven smícháním 2 g práškové agarózy se 100 ml 1x koncentrovaného TBE pufru připraveného zředěním 10x koncentrovaného TBE pufru destilovanou vodou v poměru 1:9. Roztok byl šestkrát povařen v mikrovlné troubě, kde byl var důkladně sledován kvůli možnému vypěnění kapaliny z baňky. Poté bylo do převařeného roztoku přidáno 6 µl barviva Midori Green. Roztok byl následně nalit do formy, kde do něj poté byly hřebínkem vytvořeny otvory pro aplikování 5 µl vzorku a 5 µl nanášecího pufru (bromfenylová modř). Díky modré barvě pufru bylo možné určit, zda-li jsme aplikovali vzorek správně do otvoru. Do jedné z jamek byl též aplikován kontrolní žebříček pro porovnání

velikosti vzorků. Po aplikaci všech potřebných komponent byl gel přelit 1x koncentrovaným TBE pufrem a došlo k zapojení elektrod. Gelová elektroforéza probíhala po dobu zhruba 50 minut pod napětím 90 mV, při kterém mezi elektrodami začaly vznikat bublinky indikující průchod proudem.

3.11.1) Složení chemikálií

10 x koncentrovaný TBE pufr:

· Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108 g/l
· H ₃ BO ₃	55 g/l
· EDTA	9,3 g/

Agarózový gel

· Agaróza	2 g
· 1 x koncentrovaný TBE pufr	100 ml
· Midori Green Advanced (DNA barvivo)	6 µl

Nanášecí pufr

· Bromfenylová modř	20 µg
· Glycerol	3 ml
· Destilovaná voda	7 ml

3.12) Sekvence

V případě sekvenace, či sekvenování, se jedná o biochemickou metodu pro zjištění pořadí nukleových bází (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) v sekvencích DNA.

Po provedení metody PCR a detekce gelovou elektroforézou byl vzorek bakterie *Halomonas elongata* přečištěn za pomoci Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit, kdy jako první byl vzorek smíchán s NTI pufrem v poměru 1:2. Vzorek s pufrem byl převeden do kolony s křemíkovou mikrofiltrační membránou a následně centrifugován po dobu 30 vteřin při 10000xg. Supernatant byl vylit a ke zbylému sedimentu byl přidán NT3 pufr, přičemž byla zkumavka znovu zcentrifugována za obdobných podmínek. Následovalo znovu vylití supernatantu a zkumavka se vzorkem byla inkubována v sušárně při teplotě 60 °C zhruba 4 minuty. Poté, co byla zkumavka vyjmuta ze sušárny proběhla znovu centrifugace při 10000xg zhruba 1 minutu. Vzorek byl poté převeden do čisté zkumavky, do které bylo přidán NE pufr, který se již určitou dobu inkuboval v sušárně při teplotě 60 °C. Vzorek s NE pufrem byl dále inkubován 4 minuty při též teplotě. Poté následovalo vyhodnocení vzorku pomocí SEQme s.r.o.

3.12.1) Chemikálie pro přečištění

· NTI pufr	80 µl
· NT3 pufr	700 µl

3.13) Měření Ramanovou spektroskopií

Experimenty byly realizovány na Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky.

Pro experiment byl použit přístroj Ramanovský mikrospektrometr Renishaw In Via Reflex s laserem o vlnové délce 785 nm, který analyzuje vzorky na principu tzv. fingerprint, což je spektrální oblast od 400 do 2000 cm^{-1} , která je unikátní pro každou biomolekulu a mikroorganismus.

Pro experiment byla narostlá kultura v baňce lehce promíchána pro rovnoměrné rozdělení bakterií v roztoku a následně bylo ve sterilním boxu odpipetováno 1 ml kultury do zkumavky Ependorf, která byla stočena na centrifuze při 8000 rpm po dobu 5 minut, následně byl odlit supernatant a vzorky byly uloženy do mrazáku.

Bylo použito celkem pět vzorků, *Halomonas elongata* narostlá na sacharóze při třech různých koncentracích soli 40, 70 a 100 g/l NaCl a pro porovnání *Halomonas salina* narostlá na fruktóze a *Halomonas organivorans*. Pro účely měření bylo použito sklíčko z CaF_2 , které postrádá šum, tudíž nezkrsluje výsledné spektrum.

Poté, co bylo sklíčko vloženo do přístroje bylo potřeba zaměřit v mikroskopu mezi krystaly NaCl místo s buňkou, na které byl následně fokusován laser. Samotné měření probíhalo velice rychle, kdy pár sekund po spuštění laseru už se tvořilo spektrum vzorku.

Jako první byly měřeny standardy, v tomto případě čistý ektoin a hydroxyektoin, poté bylo všech pět vzorků bakterií ve formě kapky o průměru cca 1 až 2 mm naneseny na sklíčko, vysušeny a vloženy pod laser v přístroji pro analýzu.

4) VÝSLEDKY A DISKUZE

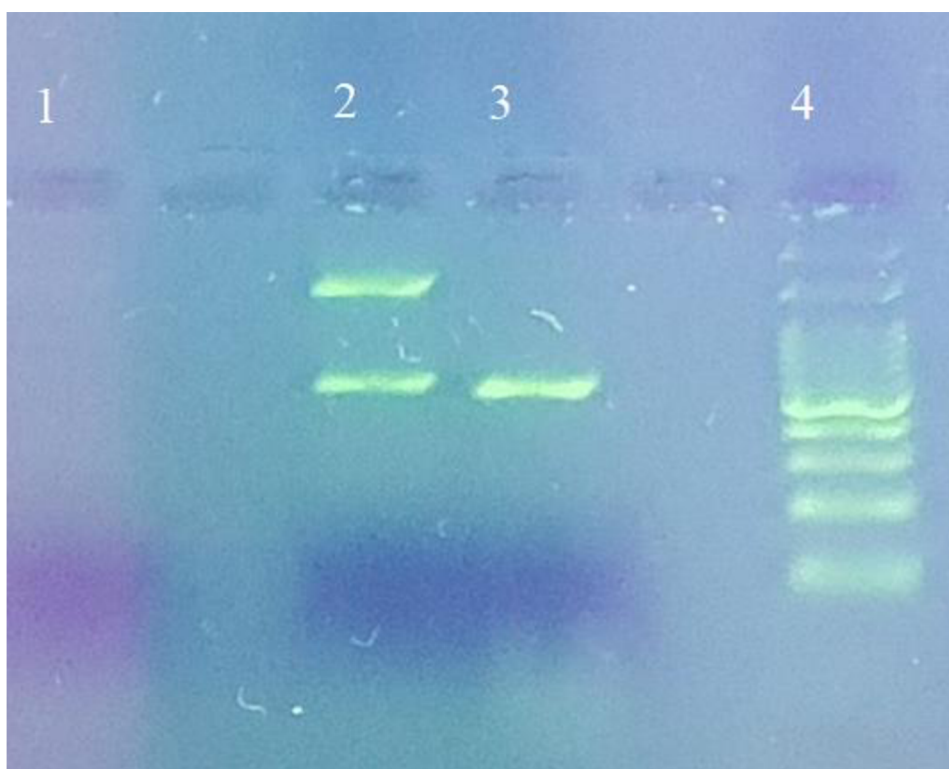
Cílem experimentální části byla analýza bakterie *Halomonas elongata* skrz Ramanovu spektroskopii za účelem důkazu přítomnosti ektoinů a hydroxyektoinů uvnitř bakteriální buňky.

V rámci toho byly pak testovány různé cukerné substráty a koncentrace soli za účelem získání co největšího množství biomasy pro analýzu. Za stejným účelem probíhaly i testy pro zjištění optimální kombinace koncentrace soli a typu substrátu pro co nejvyšší tvorbu PHA v bakteriální buňce.

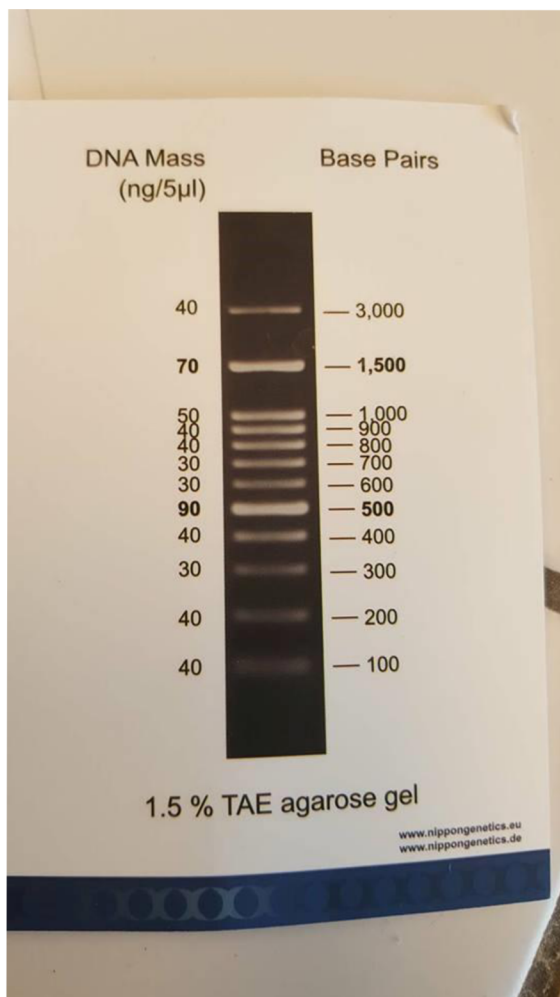
4.1) PCR a gelová elektroforéza

Cílem této metody byla amplifikace dvou genů, konkrétně gen 16SrRNA za prvé pro potvrzení bakteriální DNA a zadruhé pro taxonomické zařazení a gen *phaC* jako důkaz PHA-syntázy. Prvním úkolem bylo stanovení čistoty DNA ve vzorku pomocí poměru absorbancí (A_{260}/A_{280}). Výsledný poměr činil 1,924. Ten se nachází v intervalu $1,8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2$, z čehož lze usoudit, že DNA ve vzorku je čistá.

Výsledky PCR a následné gelové elektroforézy byly vizualizovány pomocí UV-transluminátoru a zachyceny na obrázku níže.



Obrázek 6: 1 – negativní kontrola, 2 – pozitivní kontrola, 3 – stanovovaný vzorek, 4 – žebříček



Obrázek 7: Žebříček pro PCR

Díky gelové elektroforéze bylo zjištěno že bakterie *Halomonas elongata* obsahuje gen *phaC*, tudíž je schopna syntézy PHA. Vzhledem k tomu, že je podle literárních zdrojů (jako velká část halofilů z rodu *Halomonas*) schopna produkce ektoinů, mohlo by být možné biotechnologicky využít *H. elongata* k současné produkci (tzv. ko-produkci) dvou hodnotných metabolitů – PHA a ektoinů [47].

4.2) Optimalizace podmínek pro získání biomasy a produkci PHA

Principem této části bylo určit, na jakém cukru a při jaké koncentraci soli roste naše bakteriální kultura *Halomonas elongata* nejlépe. Pro všechny cukry v tomto případě byla použita výchozí koncentrace NaCl 30 g/l

Tabulka 4: Množství biomasy a PHB dle typu substrátu; c_1 =koncentrace celkové biomasy v roztoku, c_2 =koncentrace PHB v biomase, w =procentuální koncentrace PHB v biomase

Substrát	PHB [mg]	c_1 [g/l]	w [%]	c_2 [g/l]
Xylóza	0,6765	1,53	8,199	0,126
Glukóza	2,7725	1,945	29,854	0,581
Sacharóza	1,6985	2,375	16,825	0,397
Fruktóza	1,9355	1,855	17,519	0,325
Galaktóza	0,1395	1,345	1,515	0,022
Laktóza	0,9195	1,735	8,428	0,146
Mannóza	2,244	2,19	20,238	0,444
Arabinóza	0	0,49	0	0

Dle Tabulky 3 je jasně patrné, že bakterie nejlépe roste na cukerném substrátu sacharóze. Ta také byla použita pro kultivaci *Halomonas elongata* pro analýzu na Ramanově spektroskopii. Nejméně kultura rostla na arabinóze, u které je vůči ostatním cukrům výtěžek biomasy téměř zanedbatelný, což bylo možné i vizuálně pozorovat, jelikož zákal roztoku kultury byl daleko menší než zákal kultur u zbylých cukrů.

Je též vidět, že největší množství PHB bylo naměřeno v kultuře narostlé na glukóze, přičemž i velice pěkný výsledek má manóza. Na arabinóze bohužel nebylo změřeno nic.

Tabulka 5: Množství biomasy a PHB dle koncentrace soli; c_1 =koncentrace celkové biomasy v roztoku, c_2 =koncentrace PHB v biomase, w =procentuální koncentrace PHB v biomase

Koncentrace soli	PHB [mg]	c_1 [g/l]	w [%]	c_2 [g/l]
20 g/l NaCl	0,7098	1,865	7,0589	0,13225
30 g/l NaCl	0,644	1,79	7,46275	0,13365
40 g/l NaCl	0,7715	1,88	7,79715	0,14645
60 g/l NaCl	0,8715	1,395	8,69375	0,1212
80 g/l NaCl	0,9435	1,515	9,15098	0,13865

Dle Tabulky 4 lze usuzovat, že bakterie *Halomonas elongata* roste nejlépe při koncentraci NaCl 20 a 40 g/l, což není tak vzdálené od výchozí koncentrace soli, se kterou byla většina kultivací prováděna.

Z výsledků je patrné, že se vzrůstající koncentrací soli souběžně narůstá i množství PHB v buňce, až na určité výkyvy. Celkově je však obsah polymeru v biomase velice nízký, podle našich výsledků se nezdá, že by *H. elongata* byla slibným producentem PHB.

4.3) Měření Ramanovou spektroskopií

Cílem analýzy Ramanovou spektroskopií bylo zjistit přítomnost osmolytů uvnitř buněk bakterie *Halomonas elongata*. V tomto případě se jednalo konkrétně o osmolyty ektoin a hydroxyektoin, které jsou zodpovědné za zvládání stresu kvůli vysoké koncentraci soli v prostředí. Ačkoliv dle veškeré teorie by výše zmíněná bakterie ektoiny nebo jejich hydroxyderiváty obsahovat měla, na Ramanově spektroskopii jsme bohužel nebyli schopni zaznamenat jakoukoliv jejich prezenci uvnitř buněk ani jednoho ze vzorků včetně vzorku bakterií *Halomonas salina* a *Halomonas organivorans*, které by logicky měly obsahovat ektoinů ještě více, jelikož na svůj růst vyžadují téměř trojnásobné množství soli v prostředí než *Halomonas elongata*.

Na obrázku 8 jsou spektra ektoinu a hydroxyektoinu jako čistých látek. Na obrázku 9 jsou pak Ramanova spektra buněk *Halomonas elongata* kultivovaná při různých koncentracích soli. Při porovnání spekter je patrné, že se ve spektrech buněk nepodařilo identifikovat ramanovské pásy odpovídající ektoinu nebo hydroxyektoinu.

V rámci jiného experimentu, též s *Halomonas elongata*, byly vzorky pro analýzu Ramanovou spektroskopií připravovány několika způsoby. Tento experiment dokazoval přítomnost nejen ektoinu a hydroxyektoin, ale i glycin betainu, který též plní funkci osmolytu v buňce. Byly použity úpravy fixací HgCl_2 , lyofilizovanou směsí metanol/chloroform/voda a lyofilizovaným extraktem kyseliny chloristé. U všech těchto úprav byla následně naměřena přítomnost všech osmolytů [41].

Jelikož naše vzorky nijak takto upraveny nebyly, dá se předpokládat, že právě příprava vzorku před analýzou hraje důležitou roli, kterou v příštích experimentech nesmíme podcenit.

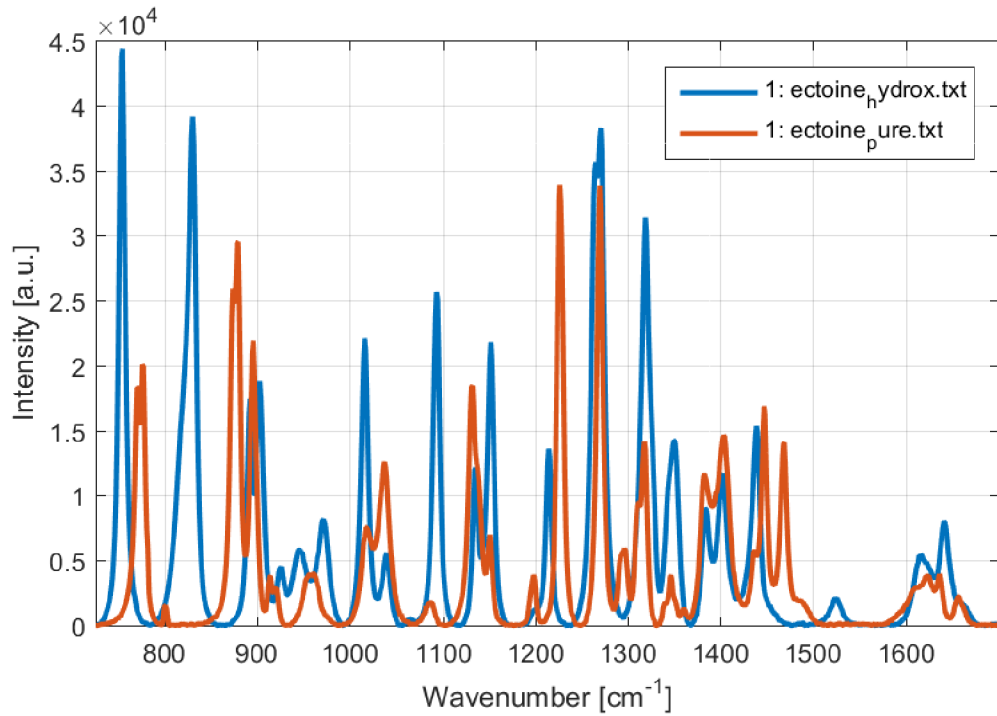
Tabulka 6: Ramanovské peaky ektoinu

vibrace peaku pro laser 785 nm	
1469	ν COO zwitterion
1444	$\delta(\text{CH}_2)$
1392	$\nu(\text{CN})$
1366	$\delta(\text{NH})$ zwitterion
1316	$\delta(\text{CH}_2)$
1280	$\delta(\text{CH}_2\text{-C})$
1215	$\delta(\text{CH}_2\text{-C})$
1207	-
1137	$\nu(\text{CNC})$
1072	-
1032	$\nu(\text{C-OH})$
999	-
944	$\delta(\text{CH}_3)$
910	$\delta(\text{CH}_3)$
893	-

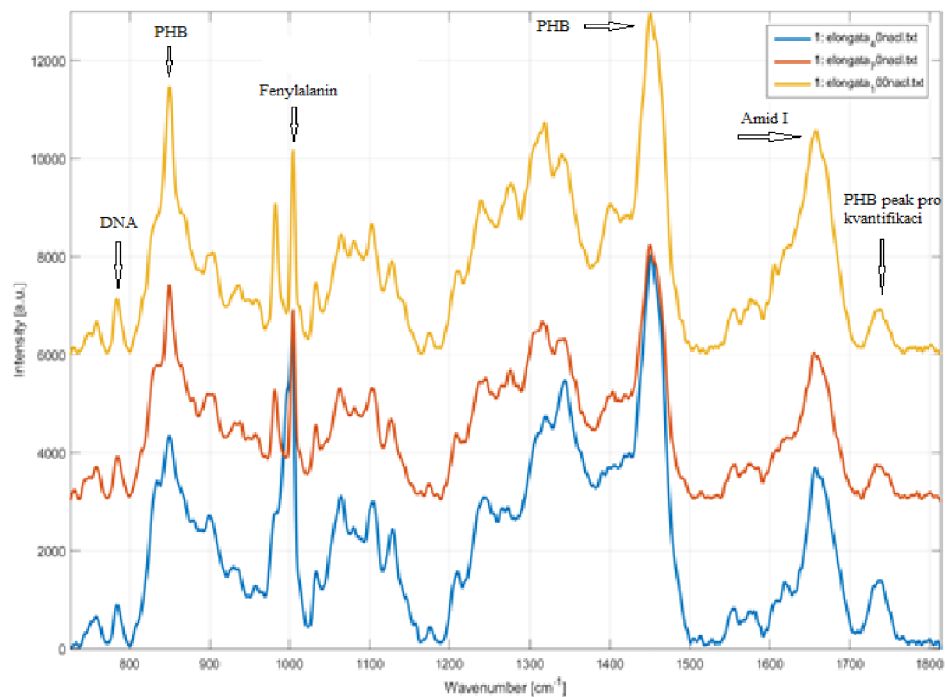
850	δ CCO
804	δ CCO

Tabulka 7: Ramanovské peaky pro hydroxyektoin

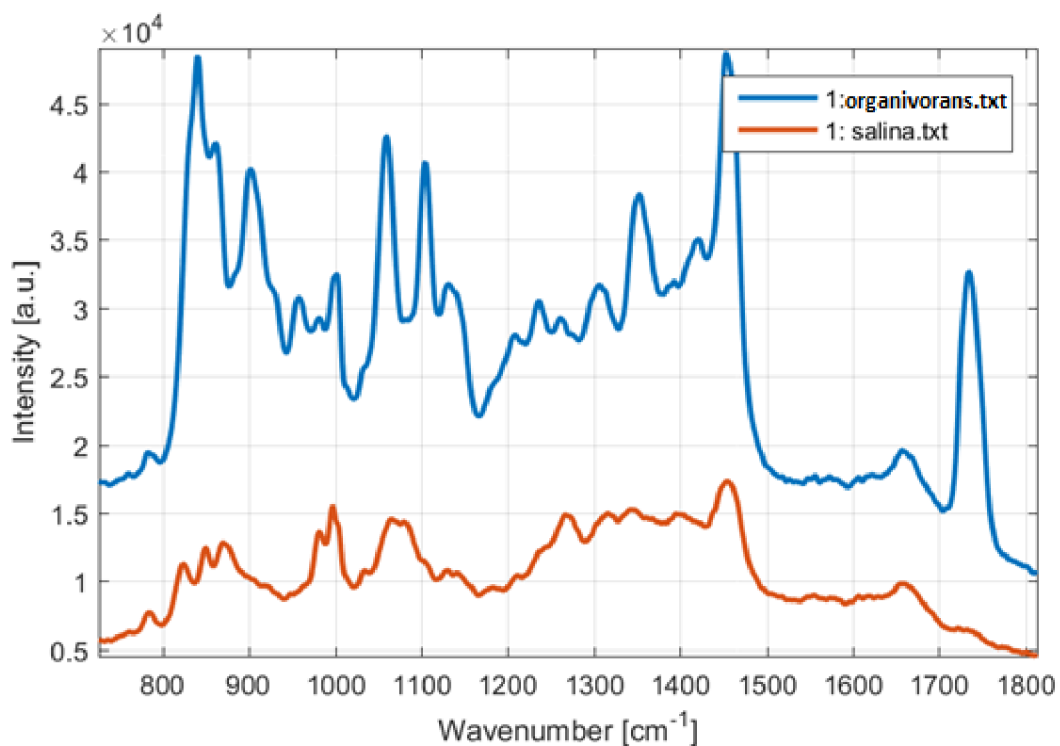
vibrace peaku pro laser 785 nm	
1640	$\nu_{as}(\text{CONH})$ amid
1613	$\nu_{as}(\text{CONH})$ amid
1524	-
1438	$\delta(\text{CH}_2)$
1401	$\nu(\text{NH})$
1383	$\nu(\text{CN})$
1349	$\delta(\text{CH}_2)$
1318	$\delta(\text{CH}_2)$
1263	$\delta(\text{CH}_2\text{-C})$
1213	$\delta(\text{CH}_2\text{-C})$
1151	δ COH
1134	ν CNC
1092	ν CO
1037	-
1014	ν C-OH
970	-
943	-
923	-
901	$\rho(\text{CH}_3)$
890	$\rho(\text{CH}_3)$
828	δ COO
751	δ COH



Obrázek 8: Graf Ramanova spektra pro ectoin a jeho hydroxyderivát



Obrázek 9: Graf Ramanova spektra pro *Halomonas elongata* při různých koncentracích NaCl, je patrné, že *H. elongata* produkuje PHB, i když ne v takové míře jako *H. organivorans* na obrázku 10, kde její peak pro kvantifikaci několikanásobně převyšuje zbylé analyzované bakterie



Obrázek 10: Graf Ramanova spektra pro kontrolní vzorky bakterií *Halomonas salina* a *Halomonas organivorans*, při porovnání se spektrem pro *Halomonas elongata* není vidět žádný razantní rozdíl až v případě *Halomonas organivorans* a peaku na vlnové délce 1750 nm, která odpovídá PHB, což indikuje velký potenciál *Halomonas organivorans* pro produkci PHB, bohužel ani u těchto bakterií se nám nepodařilo detekovat přítomnost ektoinu ani jeho hydroxyderivátu

5) ZÁVĚR

Bakalářská práce byla věnována použití Ramanovy spektroskopie jako nástroj pro analýzu bakteriálních buněk *Halomonas elongata*. Práce je rozdělena do dvou částí, a to teoretické a experimentální. Teoretická část rozebírá extrémofilní organismy s přihlédnutím na podskupinu halofilů a osmolyty zodpovědné za jejich schopnost žít v prostředí s vysokou koncentrací soli, dále pak nahlíží na vibrační spektroskopii, kde je věnována pozornost Ramanově spektroskopii, jejímu principu a možnostem využití.

V experimentální části byl rozebrán postup kultivace na inokulu a minerálním médiu. Bylo prokázáno skrz metodu PCR a gelovou elektroforézu přítomnost genů 16SrRNA a *phaC*, kde přítomnost genu *phaC* potvrzuje schopnost *Halomonas elongata* tvořit PHA. Vzhledem ke známe schopnosti *H. elongata* produkovat ektoiny je tedy teoreticky možné využít *H. elongata* ke ko-produkci ektoinů a PHA.

Dále byla rozebrána optimalizace kultivace kultury *Halomonas elongata* na různých cukerných substrátech a koncentracích soli za účelem co největšího výtěžku biomasy a co největšího množství PHB v biomase. Jako nejlepší substrát pro produkci biomasy se ukázala být sacharóza, přičemž koncentrace soli pro ten samý účel činila buďto 20 nebo 40 g/l NaCl. Pro optimální produkci PHB byla dle výsledků experimentu glukóza s koncentrací soli 80 g/l NaCl, přičemž je možné že při vyšších koncentracích soli by mohlo být množství PHB ještě vyšší.

Ramanova spektroskopie, měřená na Ramanovském mikrospektrometru Renishaw In Via Reflex, se ukázala být nedostatečně citlivý nástroj pro detekci ektoinů v bakteriálních buňkách, Pro zlepšení analýzy podobného typu bude vyžadována jiná úprava vzorku, kdy bude nutné buněčnou stěnu rozložit a přebytečné látky odstranit pomocí specifických organických rozpouštědel.

6) POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ROTHSCHILD, Lynn J., MANCINELLI, Rocco L. Life in extreme environments . Nature. 2005, vol. 409, s. 1092-1101.
- [2] GOO, Young A., ROACH, Jared, GLUSMAN, Gustavo, BALIGA, Nitin S., DEUTSCH, Kerry, et al. Low-pass sequencing for microbial comparative genomics. BMC genomics [online]. 2004, vol. 5, no. 1. [cit. 2009-05-01].
- [3] VAN DEN BURG, Bertus. Extremophiles as a source for novel enzymes. Current Opinion in Microbiology. 2003, vol. 6, no. 3, s. 213-218.
- [4] SCHWIBBERT, Karin, Alberto MARIN-SANGUINO, Irina BAGYAN, et al. A blueprint of ectoine metabolism from the genome of the industrial producer *Halomonas elongata* DSM 2581T. *Environmental Microbiology*. 2011 Aug 13(8), 1973–1994. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02336.x.
- [5] GARCÍA, María Teresa, Encarnación MELLADO, Juan Carlos OSTOS, Antonio VENTOSA a . *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004, 01/09/2004(54), 1723-1728. DOI: 10.1099/ijms.0.63114-0.
- [6] YIN, Jin, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances*[online]. 2015,33(7), 1433-1442 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.10.008. ISSN 07349750.
- [7] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80210-4207-0.
- [8] HUDSON, Bruce; HETHERINGTON, William; CRAMER, Stephen; CHABAY, Ilan; KLAUMINZER, Gary K. Resonance enhanced coherent anti-Stokes Raman scattering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, November 1976, vol. 73, no. 11, p. 37983802.
- [9] DANIS, Ozkan, Ayse OGAN, Pinar TATLICAN, Azade ATTAR, Emrah CAKMAKCI, Bulent MERTOGLU a Meral BIRBIR. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery. *Extremophiles* [online]. 2015,19(2), 515-524 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1007/s00792-015-0735-4. ISSN 1431-0651.
- [10] ZHANG, Chao. Improvement of the electromagnetic enhancement in Surface Enhanced Raman Spectroscopy : masters's thesis. Albuquerque : The University of New Mexico, 2007. p. 96
- [11] ZEMAN, Ellen J.; SCHATZ, George C. An Accurate Electromagnetic Theory Study of Surface Enhancement Factors for Ag, Au, Cu, Li, Na, Al, Ga, In, Zn, and Cd. *The Journal of Physical Chemistry*, 1987, vol. 91, no. 3, p. 634-643

- [12] KANAPATHIPILLAI, Mathumai; LENTZEN Georg, SIERKS Michael and PARK Chan Beum (2005), Ectoine and hydroxyectoine inhibit aggregation and neurotoxicity of Alzheimer's β -amyloid, *FEBS Letters*, 579, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.057
- [13] KUHLMANN, Anne U. a Erhard BREMER. Osmotically Regulated Synthesis of the Compatible Solute Ectoine in *Bacillus pasteurii* and Related *Bacillus* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 2002, (vol. 68 no. 2), 772-783. DOI: 10.1128/AEM.68.2.772-783.2002.
- [14] BECKER, Judith, Rudolf SCHÄFER, Michael KOHLSTEDT, Björn J HARDER, Nicole S BORCHERT, Nadine STÖVEKEN, Erhard BREMER a Christoph WITTMANN. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for production of the chemical chaperone ectoine. *Microbial Cell Factories*. 2013, **12**(110). DOI: 10.1186/1475-2859-12-110.
- [15] SUDESH, K., H. ABE a Y. DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, **25**(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6.
- [16] DOI, Y. a A. STEINBUHEL. Biopolymers, polyester I: Biological systems and biotechnological production. 2002. ISBN 35-273-0224-7.
- [17] Baumruk V.: Infračervená a Ramanova spektroskopie-Co nám mohou vibrace říct o (bio) molekulách, Praha: Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, Fyzikální ústav UK., 1997, 129.
- [18] Otyepková E., Kvítek L., Otyepka M., Panáček A.: Infračervená spektroskopie, 2004, poslední revize stránek 1.2. 2005, [cit. 2007-12-02] <http://fch.upol.cz/skripta/zfcm/ir/ir_theorie.htm>
- [19] John Wiley & Sons. Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications [online]. 2008. [cit. 2017-12-21].
- [20] MALOŇ, Petr a Jaroslav PODLAHA. Fyzikálně-chemické metody. Praha: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 1999. Organická chemie. ISBN 80-902130-9-x.
- [21] COLTHUP, Norman. Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy [online]. [cit. 2017-12-21].
- [22] D. Ball, *Spectroscopy* 16(2), 28-30 (2001)
- [23] FERRARO, John R., Kazuo NAKAMOTO a Chris W. BROWN. Introductory Raman spectroscopy. 2nd ed. Boston: Academic Press, c2003. ISBN 978-0-12-254105-6.
- [24] TŘEŠTÍKOVÁ, Ing. Liběna. Ramanova spektroskopie biologicky aktivních látek a protinádorových léčiv. ÚCHPBT, 2009. Diplomová práce. VUT v Brně, Fakulta chemická.
- [25] Obrázek URL: <http://skripta.dictor.net/obecna_min/o_65.php#> [cit. 2007-15-06].

- [26] BAILEY, Glen Franklin, Saima KINT a James R. SCHERER. A new Raman microsampling technique. *Analytical Chemistry*. 1967, , 1040-1044. DOI: 10.1021/ac60252a014.
- [27] KEIFER, W. *Raman Difference Spectroscopy with the Rotating Cell*. 1973, (27), 253-257. DOI: 10.1366/000370273774333452.
- [28] KEIFER, W. a H. J. BERNSTEIN. A Cell for Resonance Raman Excitation with Lasers in Liquids. *Journal of the Optical Society of America*. 1971, (25), 500-501.
- [29] KONINGSTEIN, J. A. a B. F. GÄCHTER. Surface-scanning technique for Raman spectroscopy of highly colored crystals. *Journal of the Optical Society of America*. 1973, (63), 892-893.
- [30] STUŽKA, Václav. *Instrumentální metody chemické analýzy*. Olomouc: Univerzita Palackého, 1976
- [31] PELLETIER, M. J. *Quantitative Analysis Using Raman Spectrometry*. *Applied Spectroscopy*. 2003, 57(1), 20-42. DOI: 10.1366/000370203321165133. ISSN 00037028.
- [32] MADĚRÁKOVÁ, Ing. Denisa, Ph.D. *Analýza biologicky významných látek*. *Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií*, 2008. Diplomová práce. VUT v Brně.
- [33] YI, K. J., X. N. HE, Y. S. ZHOU, W. XIONG a Y. F. LU. Tip-enhanced near-field Raman spectroscopy with a scanning tunneling microscope and side-illumination optics. *Review of Scientific Instruments* [online]. 2008, 79(7), 073706- [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.1063/1.2956977. ISSN 00346748.
- [34] ANKER, J. N. et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nature materials*, 7(6), 2008, pp. 442-453. DOI: 10.1038/nmat2162.
- [35] BEGLEY, R. F., A. B. HARVEY a R. L. BYER. Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy. *Appl. Phys. Lett.* 25, 387 (1974)
- [36] NOVOTNY, L. a B. HECHT. *Principles of nano-optics*. New York: Cambridge University Press, 2006. 539s. ISBN 978-0-521-83224-3.
- [37] HALLIDAY, D., R. RESNICK a J. WALKER, DUB, P. (ed.). *Fyzika. 2., přeprac. vyd.* Překlad Miroslav Černý. Brno: VUTIUM, c2013. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-4123-1.
- [38] AMER, Maher S. *Raman spectroscopy for soft matter applications*. Hoboken, N.J.: Wiley, c2009. ISBN 978-0-470-45383-4.
- [39] JORIO, A. *Raman spectroscopy in graphene related systems*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, c2011. ISBN 978-3-527-40811-5.
- [40] NAUMANN, D., S. KELLER, D. HELM, Ch. SCHULTZ a B. SCHRADER. *FT-IR Spectroscopy and FT-Raman Spectroscopy are powerful analytical tools for the non-*

invasive characterization of intact microbial cells. *Journal of Molecular Structure*. 1995, (347), 399-406.

- [41] JEHLIČKA, Jan, Aharon OREN a Petr VÍTEK. Use of Raman spectroscopy for identification of compatible solutes in halophilic bacteria. *Extremophiles*. **16**(3), 507-514. DOI: 10.1007/s00792-012-0450-3.
- [42] JARVIS, Roger M. a Royston GOODACRE. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 2004, 76, 40-47. DOI: 10.1021/ac034689c.
- [43] Čikoš Š., Koppel J., Kantíková M.: Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a daignostike. Košice: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 2001. 203 s. ISBN 80-968618-0-8.
- [44] Ruml T., Rumlová M., Pačes V.: Genové inženýrství. Praha: VŠCHT, 2002. 1. vydání. 270 s. ISBN 80-7080-499-8.
- [45] MICARD, D., M.L. SOBRIER, J.L. COUDERC a B. DASTUGUE. Purification of RNA-free plasmid DNA using alkaline extraction followed by ultrogel A2 column chromatography. *Analytical Biochemistry*. 1985, vol. 148, issue 1, s. 121-126. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90636-0.
- [46] LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, vol. 148, issue 62, s. -. DOI: 10.3791/3923.
- [47] CAI, Lei, Gulsimay AIBAIDULA, Xin-Ran DONG, Jin-Chun CHEN, Wei-Dong TIAN a Guo-Qiang CHEN. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microbial Cell Factories*. 2011, **10**(88). DOI: 10.1186/1475-2859-10-88.

7) POUŽITÉ ZKRATKY

rpm – rounds per minute (otáčky za minutu)

PCR – polymerázová reťazová reakce

PHA – polyhydroxyalkanoát

PHB – polyhydroxybutyrát

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

TBE – *tris*-borát-EDTA pufr

