

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Hana Váňová

VYUŽITÍ VIBRAČNÍ SPEKTROSKOPIE PRO STUDIUM
PIGMENTU VIOLACEINU

Application of vibrational spectroscopy in the study of
violacein pigment

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Ivan Němec, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 13. května 2015.

.....

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá studiem mikrobiálního pigmentu violaceinu v reálném vzorku lyofilizovaných mikroorganismů. Vzorek byl zkoumán pomocí metod vibrační spektroskopie se zaměřením na aplikovatelnost povrchem zesílené a rezonanční mikro – Ramanovy spektroskopie. K tomuto účelu bylo použito několika různých zesilujících systémů společně se sadou excitačních laserů emitujících ve viditelné oblasti spektra. Závěrem práce jsou vyhodnocení týkající se vhodnosti použití jednotlivých zesilujících systémů a excitačních vlnových délek pro úspěšnou identifikaci pigmentu violaceinu ve vzorku.

KLÍČOVÁ SLOVA

vibrační spektroskopie, povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, rezonanční Ramanova spektroskopie, violacein

ABSTRACT

This thesis deals with the study of microbial pigment violacein in the real sample of lyophilized microorganisms. The sample was investigated by using methods of vibrational spectroscopy with focusing on the applicability of surface enhanced and resonance micro-Raman spectroscopy. For this purpose several different systems for enhancing Raman intensity together with the set of excitation lasers emitting in the visible light region were used. The conclusion of this thesis are the recommendations connected with the appropriateness of using each amplifying systems and excitation wavelengths for the successful identification of violacein pigment in the sample.

KEYWORDS

vibrational spectroscopy, surface enhanced Raman spectroscopy, resonance Raman spectroscopy, violacein

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování zejména vedoucímu své diplomové práce, Doc. RNDr. Ivanu Němcovi, Ph.D., za cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost a trpělivost při konzultacích a vypracování této práce.

Dále bych také ráda poděkovala Prof. RNDr. Janu Jehličkovi, CSc. za poskytnutí vzorku lyofilizovaných mikroorganismů. Dík patří také RNDr. Ivaně Šloufové, Ph.D. a Bc. Veronice Sutrové za poskytnutí zesilujících systémů a za podnětné rady při řešení této problematiky.

Rovněž bych chtěla poděkovat svým rodičům a příteli za jejich podporu.

Obsah

1. Úvod.....	5
2. Teoretická část	6
2.1 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl	6
2.1.1 Zesilující substráty.....	8
2.2 Využití SERS v mikrobiologii	13
2.3 Violacein.....	15
2.4 Exobiologie	20
3. Experimentální část.....	22
3.1 Použité chemikálie	22
3.2 Přístroje.....	22
3.3 Postupy měření.....	23
3.3.1 Měření absorpčního elektronového spektra roztoku violaceinu	23
3.3.2 Měření hmotnostních spekter vzorku s obsahem violaceinu	23
3.3.3 Měření Ramanových a povrchem zesílených Ramanových spekter	23
3.3.4 Měření infračervených spekter.....	27
4. Výsledky a diskuze	28
4.1 Hmotnostní a absorpční elektronová spektra.....	28
4.1 Ramanova a infračervená spektra	28
4.2 Povrchem zesílená Ramanova spektra	32
5. Závěr	52
6. Literatura	55
7. Příloha	62

1. Úvod

Metody vibrační spektroskopie patří v současné době mezi hojně využívané analytické techniky, a to zejména díky výhodným vlastnostem, které umožňují jejich uplatnění ve velkém množství různých oblastí zájmu. Jedním z mnoha se stalo i využití těchto technik pro identifikaci mikroorganismů. Jejich studium je založeno na skutečnosti, že mikroorganismy patří mezi významné producenty specifických látek, na základě jejichž přítomnosti lze mikroorganismy od sebe odlišovat. Mezi takovéto látky můžeme mimo jiné zařadit i mikrobiální pigmenty, které zastávají v tělech mikroorganismů důležité funkce.

Je zřejmé, že mikroorganismy, jako živé matrice, kromě zmiňovaných pigmentů, obsahují ve svých tělech i další rozličné organické sloučeniny a buněčné struktury, které jsou ve velkém nadbytku. Kromě toho se většinou nevyskytují v přírodě samostatně, ale jsou svázány s okolním prostředím – například s horninami nebo minerály. Tyto skutečnosti vedou k vysoké komplexitě zkoumaného materiálu spojené s přítomností velkého množství interferujících látek, které mohou významně ovlivňovat výsledky prováděných analýz.

Metody Ramanovy spektroskopie se ve své základní formě nedají v takovémto případě úspěšně aplikovat. Měření je velmi často komplikováno fluorescencí zkoumaného materiálu nebo jsou vibrační projevy pigmentu překryty projevy ostatních látek. Jedinou možnou cestou pro získání reprezentativních výsledků je proto využití pokročilejších technik vibrační spektroskopie – tedy rezonanční a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, které jsou založeny na zvýšení intenzity Ramanova rozptylu. S jejich pomocí se lze vyvarovat nežádoucích vlivů prostředí a vzorky úspěšně analyzovat.

V rámci této diplomové práce byl komplexně zkoumán pigment violacein, který je nejčastěji označován jako ochranný filtr mikroorganismů před působením ultrafialového záření. K jeho studiu, v reálném vzorku lyofilizovaných mikroorganismů, bylo použito několika různých systémů určených pro zesílení Ramanova rozptylu. Současně byla použita sada excitačních laserů emitujících ve viditelné oblasti záření.

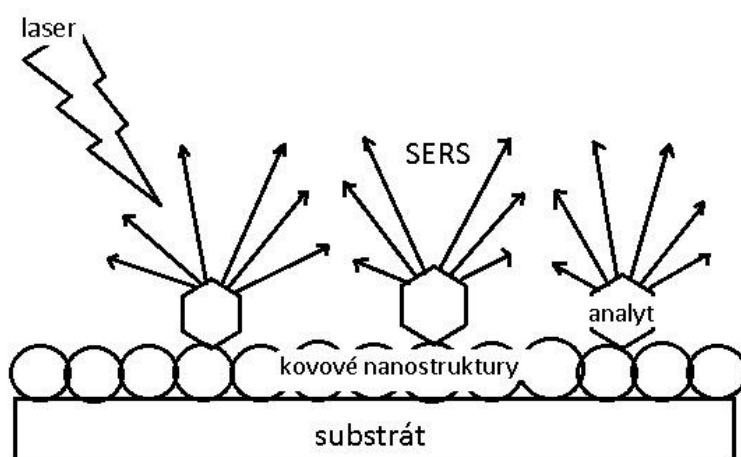
Hlavním cílem práce bylo posoudit a nalézt optimální zesilující systém a excitační vlnovou délku vhodnou pro analytické využití technik rezonanční a povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie pro studium pigmentu violaceinu v reálném vzorku.

2. Teoretická část

2.1 Povrchem zesílený Ramanův rozptyl

Metody založené na klasickém Ramanově rozptylu (RS – z angl. Raman Scattering), případně rezonančním Ramanově rozptylu (RRS – z angl. Resonance Raman Scattering) nacházejí díky svým výhodným vlastnostem (rychlost, jednoduchost, nedestruktivnost, minimální příprava vzorku) uplatnění v analýzách látek různých podstat a charakterů. V některých případech ale těchto výhod nemůže být s úspěchem využito. Takovýto stav může nastat, pokud jsou vibrační projevy studovaného vzorku komplikovány fluorescencí (zejména je běžná u barviv a pigmentů). Fluorescence se dá někdy potlačit změnou použité excitační vlnové délky, ale tento postup není aplikovatelný všeobecně. Proto je poté nutné přistoupit k použití pokročilejších technik, mezi které patří například povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS – z angl. Surface Enhanced Raman Scattering). Tato metoda tedy umožňuje nejen potlačit nežádoucí projevy fluorescence, ale zároveň díky zesílení Ramanova rozptylu (běžně v řádu 10^7) posouvá detekční limit metody k nižším koncentracím, výjimečně až na úroveň jedné molekuly.

S povrchem zesíleným Ramanovým rozptylem se setkáváme od roku 1974, kdy byl poprvé pozorován [1]. V této době však nebylo SERS spektrum pyridinu adsorbovaného na stříbrné elektrodě správně interpretováno. Následně byl v roce 1977 tento jev lépe pochopen [2, 3] a nazván povrchem zesíleným Ramanovým rozptylem. Princip povrchového zesílení je znázorněn na obr. 1.



Obr. 1 Schematické znázornění mechanismu povrchového zesílení Ramanova rozptylu.

Ačkoliv již není SERS žádnou novinkou, jeho přesný princip nebyl dosud zcela vysvětlen. Ve většině prací jsou uváděny dva mechanismy, díky kterým k zesílení Ramanova signálu dochází. Tím prvním a zároveň výraznějším je mechanismus elektromagnetický, bez jehož přítomnosti se nedá o SERSu hovořit. K celkovému zesílení přispívá v běžném stavu v rámci až šesti řádů. Podstatou elektromagnetického mechanismu je vznik tzv. povrchového plasmonu a s ním související lokalizované rezonance povrchového plasmonu (LSPR – z angl. Localized Surface Plasmon Resonance). Povrchový plasmon, neboli kolektivní oscilace volných elektronů kovového povrchu, vzniká při interakci excitačního záření s povrchem kovu. K jeho vzniku ale nedochází na hladkých površích. Proto je zásadní podmínkou pro jeho vznik specifický charakter těchto povrchů, tedy nehomogenita na nanometrové úrovni. O LSPR hovoříme tehdy, pokud se kolektivní oscilace valenčních elektronů kovu nachází v rezonanci s frekvencí dopadajícího nebo Ramanova rozptýleného záření. Pokud dochází k interakci elektromagnetického záření s povrchem kovu, může dojít k excitaci lokalizovaných povrchových plasmonů, což vede ke zvýšení elektromagnetického pole v blízkosti povrchu kovu. Tím dochází ke zvýšení intenzity Ramanova rozptylu [4].

V rámci elektromagnetického mechanismu není nutné, aby adsorbovaná molekula byla v přímém kontaktu s povrchem kovu, musí se však nacházet v jeho blízkosti. V takovémto případě má na intenzitu zesilujícího efektu vliv vzdálenost mezi povrchem kovu a adsorbovanou molekulou (celkové zesílení pro 1 molekulu klesá s r^{12} , pro monovrstvu molekul s r^{10} , kde r představuje vzdálenost od povrchu). Stejně tak má vliv i výběr vlnové délky excitačního záření a kovu v závislosti na vzniku LSPR [4].

Jak již bylo řečeno dříve, v rámci elektromagnetického mechanismu může v některých případech dojít k extrémnímu zesílení Ramanova rozptylu (řádově až 10^{15}). K takovému výraznému zesílení dochází na konkrétních místech – tzv. *hot spots* [5]. *Hot spots* vznikají mezi kovovými nanostrukturami, například mezi dvěma nanočásticemi. V těchto oblastech dochází k obrovskému zesílení elektromagnetického pole, což umožňuje detekci až na úrovni jednotlivých molekul (*single molecule SERS*) [6].

Druhý mechanismus podílející se na zesílení Ramanského signálu je mechanismus chemický. Ten vzniká nezávisle na elektromagnetickém mechanismu. Pokud ale působí

společně, jejich vliv je multiplikativní. Chemický mechanismus nepřispívá k zesílení v takové míře jako mechanismus elektromagnetický, pouze v rámci dvou až tří řádů. Zatímco díky elektromagnetickému mechanismu dochází k neselektivnímu zesílení signálu molekuly jako celku, u mechanismu chemického tomu tak není. Chemický mechanismus zahrnuje zejména vznik povrchového komplexu kovu a adsorbované molekuly, mezi kterými dochází k přenosu náboje navzájem [7, 8]. Podmínkou zde již není nerovnost povrchu, k tomuto mechanismu totiž dochází i na hladkých površích. Na základě této interakce jsou selektivně zesilovány jednotlivé vibrační módy molekuly, v závislosti na její orientaci vůči kovovému povrchu.

S chemickým mechanismem úzce souvisí tzv. rezonanční rozptyl. Ten se uplatní v případě, že bude použito excitační záření o vlnové délce blízké se k absorpčnímu maximu zkoumané látky. Rezonanční Ramanův rozptyl tedy souvisí pouze s danou molekulou. Pokud dojde ke spojení povrchového a rezonančního zesílení, budeme hovořit o povrchem zesíleném rezonančním Ramanově rozptylu (SERRS – z angl. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering).

2.1.1 Zesilující substráty

Základním předpokladem pro vyvolání SERSu je přítomnost zesilujících substrátů. Tedy struktur s nerovným (nehomogenním) povrchem. Nejčastěji používanými materiály jsou mincovní kovy (zlato, stříbro, měď). Dále také kovy alkalické, kovové slitiny [9] nebo například grafen [10, 11]. Přednostní využívání mincovních kovů (zejména stříbra a zlata) je dáno tím, že jejich rezonanční podmínka je splněna pro excitační vlnové linie ve viditelné oblasti – běžně používané pro Ramanovu spektroskopii. Stříbro a zlato jsou také nad měď upřednostňovány díky jejich vyšší chemické stabilitě.

S těmito SERS aktivními substráty se můžeme setkat ve dvou základních formách. Buď jako s nanočásticemi v koloidních roztocích nebo jako s pevnými substráty (nanostrukturami imobilizovanými na pevném povrchu).

Pevné substráty

Výhodou pevných substrátů je dobrá kontrolovatelnost cílových míst, ze kterých jsou záznamy získány. Zejména z hlediska využití extrémního zesílení Ramanova rozptylu v rámci tzv. *hot spots*. Dalšími výhodami je možnost dlouhodobého skladování, vysoká reprodukovatelnost zesilujícího faktoru a možnost využití při jiných technikách měření - např. v kombinaci s AFM (z angl. atomic force microscope) mikroskopem [12]. Nevýhodou je však vyšší náročnost přípravy a s ní související finanční požadavky a přístrojová vybavenost.

Přípravu pevných substrátů lze rozdělit do několika skupin – tzv. *top-down* techniky, *bottom-up* techniky a kombinace těchto obou dohromady. Techniky *top-down* („shora dolů“) vychází z přímé přípravy SERS substrátů. Například technika cíleného iontového svazku (Focus Ion Beam), která využívá vysoké energie svazku iontů. Díky takovéto vysoké energii je možno vrchní vrstvu kovového povrchu narušit a vytvořit rozličné struktury [13 – 15]. Dále se také můžeme setkat s technikou elektronové litografie [16, 17], která využívá k tvorbě nanostruktur na povrchu exponovaného materiálu svazku elektronů. Techniky *top-down* poskytují dobře kontrolovatelné uskupení těchto nanostruktur o různých tvarech a geometriích.

V porovnání s *top-down* technikami, *bottom-up* („ze spoda nahoru“) techniky nejsou tak finančně náročné a složité. Využívají chemické přípravy nanočástic a jejich schopnosti agregovat a vytvářet makroskopické útvary. Kromě klasické imobilizace kovových nanočástic na pevný povrch [18] je také možno využít tzv. *linker* (molekulu, která je jednou funkční skupinou vázána na pevný povrch a druhou na kovovou nanočástici) [19, 20]. Dále se také můžeme setkat s galvanickou výměnnou reakcí (Galvanic displacement reaction) [21]. Substráty připravené tímto postupem ale nejsou vhodné pro detekci malých molekul. Vyvinuty byly také metody, které pro dosažení nejlepších výsledků techniky *top-down* a *bottom-up* kombinují [22].

Disperze kovových nanočástic

Kovové nanočástice v koloidních roztocích jsou ale jako zesilující substráty používány nejčastěji – zejména díky jejich relativně snadné přípravě. Koloidní roztoky jsou obecně definovány jako disperzní soustavy, ve kterých jsou jemně rozptýleny částice v rozmezí velikostí 1 nm až 1000 nm. Měření prováděná v koloidních roztocích

mají také několik dalších výhod. Zejména se jedná o bezproblémové použití excitačních vlnových délek s vyšší energií a možnost použití vyšších výkonů laseru bez nebezpečí degradace vzorku.

V dnešní době existuje celá řada příprav koloidních nanočástic kovů. Jak již bylo zmíněno dříve, nejčastěji se můžeme setkat s koloidními roztoky stříbrných a zlatých nanočástic. Přípravy koloidních roztoků lze rozdělit na dvě základní skupiny. A to na postupy dispergační a kondenzační.

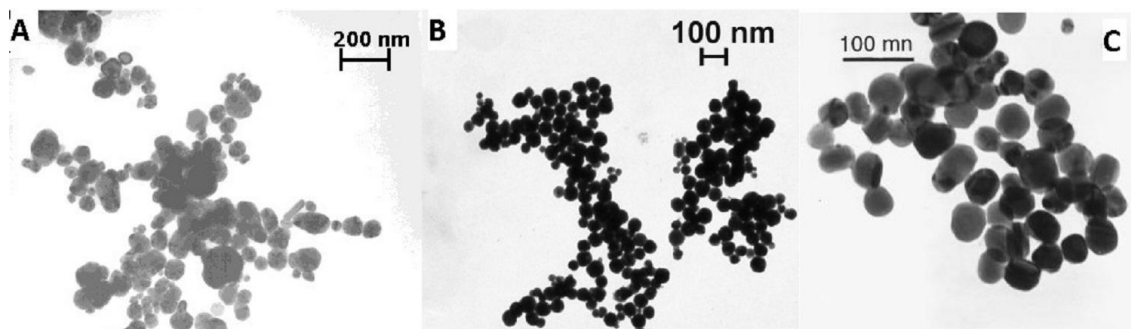
V rámci dispergačních metod jsou velké částice hrubě disperzních soustav rozptylovány na částice jemnější. Kromě metody laserové ablace nejsou však tyto metody příliš používány [23]. Laserová ablace je založena na interakci laserového paprsku se vzorkem. Díky této interakci jsou odpařeny a odštěpeny atomy, ionty a různé fragmenty z povrchu zkoumaného materiálu. Velkým kladem metody je neexistence kontaminantů a zbytkových činidel při vzniku kovových nanočástic.

Kondenzační metody jsou založeny na seskupování jednotlivých atomů do větších celků. Jsou tedy přesným opakem metod dispergačních. Můžeme se setkat s mnoha různými postupy vedoucími ke vzniku kovových nanočástic. Jejich tvorba pomocí fyzikálních procesů zahrnuje zejména ochlazování par kovů. Procesy chemické zahrnují redukce iontových sloučenin kovů anorganickými a organickými redukčními činidly, ultrazvukem, ultrafialovým zářením, γ zářením nebo také elektrolytickou redukcí.

Nejvýznamnější roli zde hraje právě redukce chemickými činidly v roztoku. V případě stříbrných nanočástic je rozpustná stříbrná sůl (nejčastěji dusičnan stříbrný nebo síran stříbrný) redukována na jednotlivé atomy stříbra. Ty se pak spojují do zárodků nové pevné fáze (při dostatečné síle redukčního činidla) a po dosažení kritické velikosti dávají vzniknout stabilním nanočásticím stříbra. Velikost a tvar nanočástic je závislý na použitém postupu přípravy. Obvykle se setkáváme s nanočásticemi kulovitého tvaru.

Nejčastěji používanými redukčními činidly pro přípravu stříbrných nanočástic z dusičnanu stříbrného jsou tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4) a citrát sodný. Pomocí NaBH_4 lze připravit stabilní žlutou disperzi s velmi malými nanočásticemi (5 – 20 nm). Pro ilustraci viz obr. 2. Jejich velikost je v souladu s maximem extinkce, které leží těsně pod 400 nm [24, 25]. Změnou poměru NaBH_4 a AgNO_3 lze do jisté míry

ovlivňovat velikost a povrchový náboj vznikajících nanočástic [26]. Stříbrné nanočástice připravené pomocí tetraboritanu sodného – tzv. *borohydridovou redukcí* nemusí být vždy kompatibilní se zkoumanými systémy. Tato nekompatibilita může být způsobena zejména díky tetrahydridoboritanovému aniontu (BH_4^-) adsorbovanému na jejich povrchu. Takto připravené nanočástice lze poté ještě znovu redukovat slabšími redukčními činidly (např. kyselinou askorbovou) za vzniku větších nanočástic o rozměrech až stovek nanometrů [27].



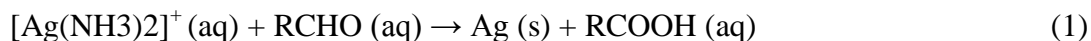
Obr. 2 TEM snímky nanočástic stříbra připravených A) redukcí pomocí hydrochlorid hydroxylaminu [29] B) Tollensovou metodou [31] C) redukcí pomocí NaBH_4 [27].

Druhým, velmi často používaným postupem pro přípravu stříbrných nanočástic je redukce dusičnanu stříbrného pomocí citrátového aniontu [28]. Takto vzniklé nanočástice jsou výrazně větší než nanočástice připravené *borohydridovou redukcí*. Jejich velikost se pohybuje mezi 30 a 120 nm. Maximum extinkce této disperze leží okolo 420 nm a její stabilita je menší než stabilita disperze vzniklé *borohydridovou redukcí*.

Mezi další používaná redukční činidla patří hydrochlorid hydroxylaminu – viz obr. 2 [29]. Redukční reakce probíhá v zásaditém prostředí (přítomnost NaOH). Nanočástice připravené tímto postupem mají velikost mezi 20 a 70 nm a maximum extinkce se nachází kolem 410 nm. Dosažené výsledky měření Ramanových spekter pomocí takto připravených nanočástic jsou srovnatelné jako při použití citrátu sodného. Výhodou je jednoduchost jejich přípravy při laboratorní teplotě.

Další variantou přípravy stříbrných nanočástic je redukce komplexního amonného kationtu $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ redukujícími cukry (glukosou, galaktosou, maltosou a laktosou) v zásaditém prostředí (viz obr. 2). Tento kationt vzniká v amoniakálním prostředí za přítomnosti dusičnanu sodného a hydroxidu sodného. Postup vychází z historické

Tollensovy přípravy stříbrného zrcátka. Základní rovnice popisující tuto přípravu viz Rovnice 1. V rámci tohoto postupu vznikají stabilní nanočástice, jejichž velikost se



pohybuje v rozmezí 25 až 400 nm. Velikost těchto nanočástic lze regulovat koncentrací amonného kationtu, koncentrací redukujících cukrů, změnou teploty nebo změnou pH. Maxima extinkce vzniklých nanočástic se pohybují v rozmezí 390 až 420 nm v závislosti na použitém redukčním činidle [30, 31]. V současné době někteří výrobci Ramanových spektrometrů dodávají komerční sady pro snadnou přípravu koloidních disperzí vycházející z Tollensovy reakce [32].

Také je možno se setkat i s mnoha dalšími redukčními činidly určenými pro přípravu stříbrných nanočástic. Například s vodíkem, peroxidem vodíku, hydrazinem, formaldehydem, EDTA atd. [33].

Kromě stříbrných nanočástic jsou běžně užívány i nanočástice zlata. Jejich disperze je připravována redukcí kyseliny tetrachlorozlatité (HAuCl_4). Redukčními činidly mohou být již zmiňovaný NaBH_4 nebo citrát sodný [6, 34]. V případě redukce pomocí NaBH_4 vznikají nanočástice o velikosti 20 až 70 nm s maximem extinkce při 535 nm. V případě redukce pomocí citrátu sodného vznikají nanočástice o velikosti 10 až 100 nm s maximem extinkce při 520 nm. Obě takto připravené disperze nanočástic mají červenou až vínovou barvu.

Kromě disperzí kovů používaných samostatně se můžeme také setkat s využíváním kombinovaných disperzí kovů. Existují studie, které se věnují disperzím tvořeným stříbrnými nanočásticemi pokrytými zlatem a zlatými nanočásticemi pokrytými stříbrem [88]. Tyto kombinované nanočástice se jeví jako výhodné pouze v případě zlatých nanočástic pokrytých stříbrem – z důvodu zvyšování míry zesílení zlatých nanočástic, jejichž zesilující faktor v případě samostatného používání nedosahuje takové míry jako v případě stříbrných nanočástic.

V disperzi nanočástic může po jisté době docházet k tvorbě shluků nanočástic. Pokud dojde k přiblížení jednotlivých nanočástic a převládnu přitažlivé síly nad odpudivými, může dojít k pevnému spojení primárních nanočástic a vytvoření agregátů. Tato agregace je pro SERS výhodná – vede k posunu maxima plasmonové rezonance, a tím

k výraznějšímu zesílení (dochází i k tvorbě *hot spots*). Proto jsou v některých případech do koloidního systému přidávána činidla, která tuto agregaci cíleně podporují. Jako tato agregační činidla jsou využívány chloristany, dusičnany, chloridy nebo například polylysin [35].

2.2 Využití SERS v mikrobiologii

Identifikovat bakterie a další mikroorganismy je mimo jiné důležitý úkol zejména v klinických laboratořích. Mnoho vážných a dokonce smrtelných zdravotních stavů je totiž způsobeno mikrobiálními infekcemi. Dodnes bylo vyvinuto mnoho metod pro identifikaci konkrétních mikroorganismů. Většina z nich je ale pomalá, nemohou být používány v podmínkách mimo laboratoř a obvykle vyžadují pokročilé znalosti uživatelů v oboru mikrobiologie. Pro tento účel se tedy jeví být vhodné techniky vibrační spektroskopie. Zejména tedy Ramanovy spektroskopie, jejíž záznamy (na rozdíl od záznamů získaných pomocí infračervené spektroskopie) nejsou komplikovány vibračními projevy vody – v biologických vzorcích všudypřítomné. Metody Ramanovy spektroskopie využívají jedinečnosti záznamů, které slouží k charakterizaci a rozlišení jednotlivých mikrobiálních vzorků a tím umožňují jejich identifikaci. Tato jedinečná identifikace je umožněna pouze díky produkci specifických látek – nejčastěji pigmentů. Bez ní bychom nebyli schopni mikroorganismy pomocí Ramanovy spektroskopie rozlišit, jejich vibrační projevy by byly téměř shodné. Nicméně hlavní nevýhodou této metody je nízká intenzita signálu daných složek biologických vzorků. Komplikující je navíc přítomnost biologických matic, které narušují získávání reprezentativních záznamů. Proto je v poslední době často metoda Ramanovy spektroskopie pro aplikace v mikrobiologii spojena s využitím zesilujících technik SERS, TERS, CARS (z angl. Coherent Anti - Stokes Raman scattering) nebo UVR (z angl. UV Resonance Raman Scattering) [36]. Tyto techniky úspěšně potlačí nežádoucí projevy biologických matic a díky zvýšení intenzity Ramanova rozptylu umožní detekovat ony specifické molekuly, které jsou ve vzorcích přítomny pouze v nízkých koncentracích.

Metoda SERS proto našla v oboru mikrobiologie dobré uplatnění. Právě ona může být v klinické praxi dobře aplikovatelná. Hlavně v případech, kdy je důležité určit přesný bakteriální druh, který je zodpovědný za danou infekci. Je tomu tak zejména

s ohledem na vznik rezistencí bakterií na podávaná antibiotika. Pokud tedy budeme znát konkrétního původce, můžeme se vyhnout užívání širokospektrálních látek a zaměřit se s léčbou na daný organismus [37, 38].

V této souvislosti může metoda SERS také sloužit k identifikaci bakteriálních patogenů, které jsou zodpovědné za sekundární oportunní infekce u vážně nemocných pacientů. V takto oslabeném imunitním systému jedinců již nemají úspěch ani cílená antibiotika. Proto je jedinou šancí pacientů nenechat sekundární infekční onemocnění plně propuknout a včas určit jeho původ. K tomuto účelu může tedy velmi spolehlivě sloužit metoda SERS využívaná například pro screening krve [39].

Jelikož patří mikroorganismy mezi významné producenty antibiotických látek, může být SERS použit i k monitorování procesů, na jejichž základě jsou antibiotika vytvářena. Do této oblasti patří například průmyslová výroba známých β -laktamových antibiotik – penicilinů. Tato antibiotika jsou produkována plísněmi rodu *Penicillium chrysogenum*. Pomocí metody SERS lze úspěšně rozlišit strukturně blízké látky vytvořené při fermentaci [40].

V potravinářském průmyslu našla metoda SERS také své využití. Může být využívána k detekci plísní, což úzce souvisí s kontrolou kvality potravin. Plísně produkují látky, které jsou při požití pro člověka toxické. Ačkoliv existují literární práce, které se zabývají touto problematikou, v reálné praxi zatím nenašly uplatnění. Můžeme se setkat se studiem aflatoxinů (výskyt zejména v arašídech) [41] nebo například ochratoxinu – A (výskyt zejména v kukuřici) [42].

Mezi další důležité aplikace metody SERS patří detekce biologických bojových látek. V takovém případě je přímo nezbytné zabránit kultivaci takovýchto látek a využít rychlý a bezpečný postup zkoumání. Můžeme si zde připomenout rok 2001 a s ním spojený výskyt bioteroristických útoků prováděných pomocí dopisů, které obsahovaly bakterii *Bacillus anthracis*. Zástupci tohoto druhu vynikají schopností odolávat extrémním klimatickým podmínkám, a proto jsou vhodným kandidátem pro tyto účely [43].

Z hlediska zkoumání samotných mikroorganismů může být SERS využit pro analýzu složení buněčné stěny mikroorganismů. Právě SERS je využíván pro detekci kofaktorů integrálních membránových proteinů. Jedná se zejména o flaviny, chinony, hemy a další chromofory, které poskytují Ramanský signál [44]. Povrchem zesílená Ramanova

spektroskopie může být také využívána k detekci mikrobiálních barviv a pigmentů (viz dále).

Je také nutné připomenout, že stříbro a zejména stříbrné nanočástice jsou známé pro svou antibakteriální aktivitu. Na pultech obchodů dnes běžně můžeme objevit textilie se stříbrnými vlákny. V oboru lékařství se setkáváme se stříbrnými baktericidními úpravami nástrojů, stříbrnými povlaky kloubních náhrad, obvazy impregnovanými sloučeninami stříbra nebo dentálními stříbrnými kompozity. Pokud tedy budeme studovat živé bakterie pomocí metody SERS a využívat nanočástice stříbra, je nutné zvažovat možné vlivy na jejich spektrální projevy. Bylo zjištěno, že je antibakteriální aktivita stříbrných nanočástic úzce spojena s jejich koncentrací, velikostí, tvarem a také stabilitou. Z hlediska velikosti roste antibakteriální efekt s poklesem velikosti nanočástic. V případě tvaru vykazují nejvyšší antibakteriální efekt nanočástice tvaru komolého trojbokého jehlanu [33]. V souvislosti s metodou SERS byly provedeny studie, které se zabývaly vlivem stříbrných a zlatých nanočástic na vzhled spekter daných mikroorganismů [45]. Bylo prokázáno, že přítomnost stříbrných nanočástic může způsobovat spektrální variabilitu zkoumaných mikroorganismů. Tato variabilita nebyla u používání zlatých nanočástic pozorována. Při studiu mikroorganismů pomocí metody SERS je tedy nutné brát tyto skutečnosti v potaz a měření jim přizpůsobit.

2.3 Violacein

S produkcí pigmentů se můžeme setkat u velkého množství živých organismů. Stejně, tak jako u rostlin nebo živočichů, plní vytvářené pigmenty u mikroorganismů konkrétní a důležité funkce. Mezi ně patří ochrana před ultrafialovým zářením [46], ochrana proti oxidantům [47], ochrana před klimatickými extrémami okolního prostředí [48], ochrana před antimikrobiálními látkami produkovanými jinými mikroorganismy [49], antimikrobiální aktivita vůči ostatním mikroorganismům [50], získávání živin (např. železa) [51], získání energie z fotosyntézy (zejména u sinic) [52] a mnoho dalších.

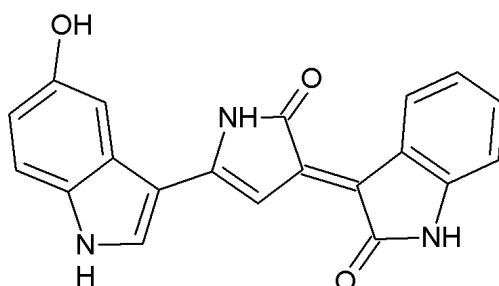
Protože barevnost jednotlivých druhů bakterií usnadňuje jejich rozeznávání, barvy jsou často používány v názvech těchto mikroorganismů. Dobrým příkladem je *Staphylococcus aureus* (zlatý z lat. *aureus*), *Staphylococcus alba* (bílý z lat. *alba*) nebo *Chromobacterium violaceum*, která vytváří fialový pigment. Tyto charakteristické rysy fenotypu neslouží pouze k přehledné nomenklatuře, ale jsou využívány zejména

v klinických laboratořích pro snadnou identifikaci infekčních patogenů. Díky nálezu hnědočerných zrněk v krvi a orgánech pacientů byla na konci 19. století objevena malárie. Francouzský lékař Charles Louis Alphonse Laveran získal za tento objev Nobelovu cenu [53].

V této práci se budeme blíže zajímat o pigment violacein (sumární vzorec $C_{20}H_{13}N_3O_3$). Již z názvu je patrné jeho fialové zabarvení. Je produkován velkým množstvím zástupců bakteriálních rodů. Nejvíce studovanými v souvislosti s violaceinem jsou bakterie druhu *Chromobacterium violaceum* (žijící v půdách a vodách subtropických a tropických oblastí) a *Janthinobacterium lividum* (nacházející se v půdách v chladných oblastech – např. na Aljašce) [54]. Barvivo violacein plní u svých producentů mnoho funkcí. Byla prokázána jeho vlastnost inhibovat růst dalších bakterií, zejména Gram pozitivních. Například bakterií rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Neisseria* nebo *Pseudomonas* [55]. Dále byly také studovány jeho fungicidní, protinádorové, antiparazitární, antivirové nebo antioxidační účinky [56 – 61]. V neposlední řadě byla studována jeho schopnost bránit organismus před působením ultrafialového záření [62]. Díky těmto výhodným vlastnostem je violacein používán ve farmaceutickém průmyslu, v kosmetickém průmyslu nebo v zemědělství. Pro svou barvu také pro barvení textilií [63 – 65] a náplně kuličkových per nebo zvýrazňovačů [65].

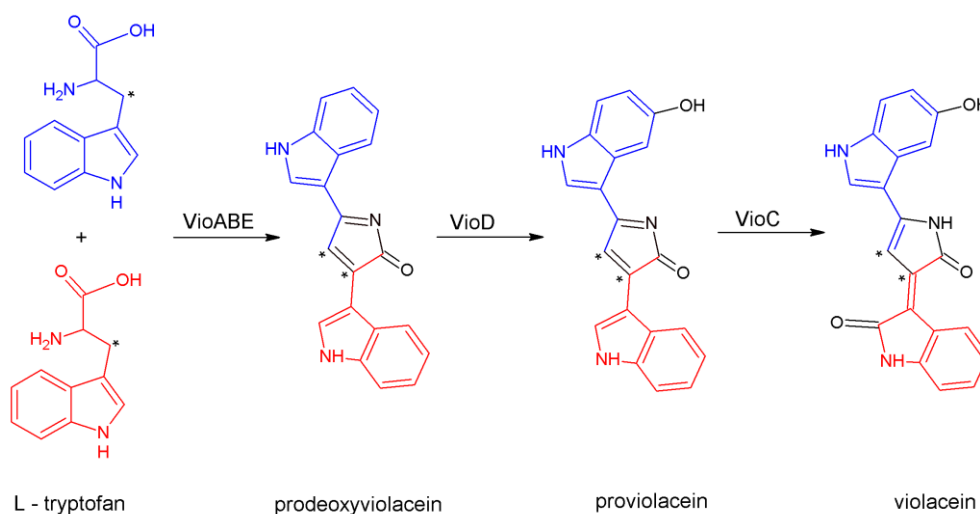
Violacein je dobře rozpustný v methanolu a acetonu a nerozpustný ve vodě a nepolárních organických rozpouštědlech. Vykazuje dobrou stabilitu v rozmezí hodnot pH 5 – 9. Absorpční maximum violaceinu ve viditelné oblasti spektra se nachází v rozmezí vlnových délek 550 – 570 nm v závislosti na použitém rozpouštědle. Violacein absorbuje záření také v ultrafialové oblasti spektra (absorpční maximum při 260 nm), což vysvětluje jeho možnou funkci při ochraně před tímto zářením. Při vystavení slunečnímu svitu může docházet k jeho pomalé degradaci [66].

Struktura violaceinu je odvozena od indolu (viz obr. 3). Violacein je tvořen třemi základními jednotkami. A to: 5 - *hydroxyindolem* a 2 - *oxoindolem* napojenými v poloze 5 - a 3 - na 2 - *pyrrolidin*.



Obr. 3 Strukturní vzorec violaceinu [67].

Zástupci bakterií *Chromobacterium violaceum* ve svých tělech biosyntetizují pigment violacein ze dvou molekul aminokyseliny *L* – *tryptofanu*. Violacein vzniká sledem reakcí, které jsou řízeny pěti enzymy (VioA - VioE) viz obr. 4. Flavoprotein

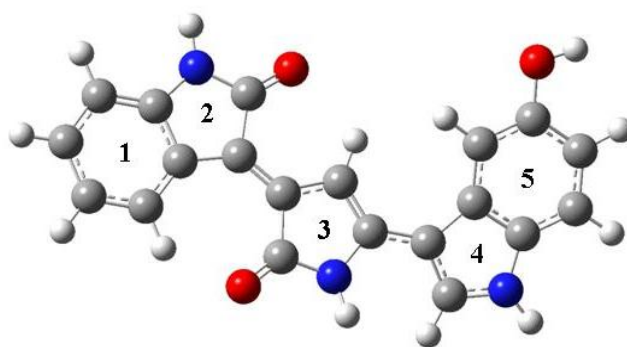


Obr. 4 Schéma vzniku molekuly violaceinu ze dvou molekul *L* – *tryptofanu* [67].

VioA a hemový protein VioB kooperují při dimerizaci a oxidaci *L* - *tryptofanu*. Přítomnost enzymu VioE brání vzniku nežádoucích vedlejších produktů a zajišťuje správné přeskupení intermediátu na prodeoxyviolacein. Na dalších dvou krocích se podílí flavin – dependentní oxygenasy VioC a VioD. První z enzymů nejprve katalyzuje hydroxylaci jednoho z indolových kruhů v pozici 5 za vzniku proviolaceinu. Druhý poté

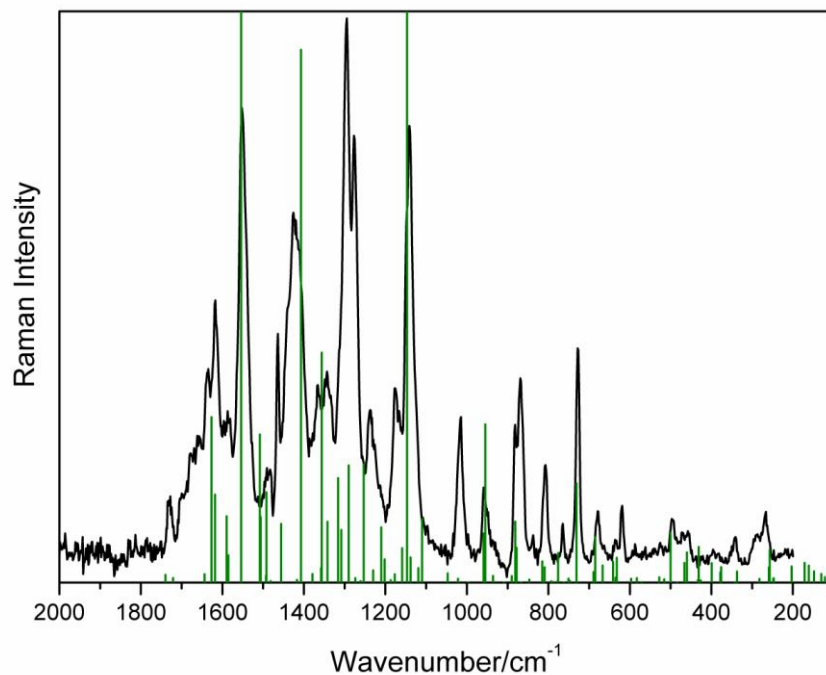
zajistí tvorbu 2 – oxoindolu na druhém indolovém kruhu a dokončí tak vznik violaceinu. Někdy ale může také dojít k přehození pořadí posledních dvou reakcí, tedy nejprve k oxygenaci prodeoxyviolaceinu a tím ke vzniku deoxyviolaceinu, který dál již nemůže být přeměněn na violacein. Kromě této enzymatické dráhy také může docházet k řadě bočních reakcí, které probíhají spontánně – bez nezbytné přítomnosti enzymů [67].

Na obr. 5 je zobrazen model molekuly violaceinu s číslováním jednotlivých kruhů [68]. Tento model je dále použit pro detailní popis vibračních projevů molekuly violaceinu – tab. 2.

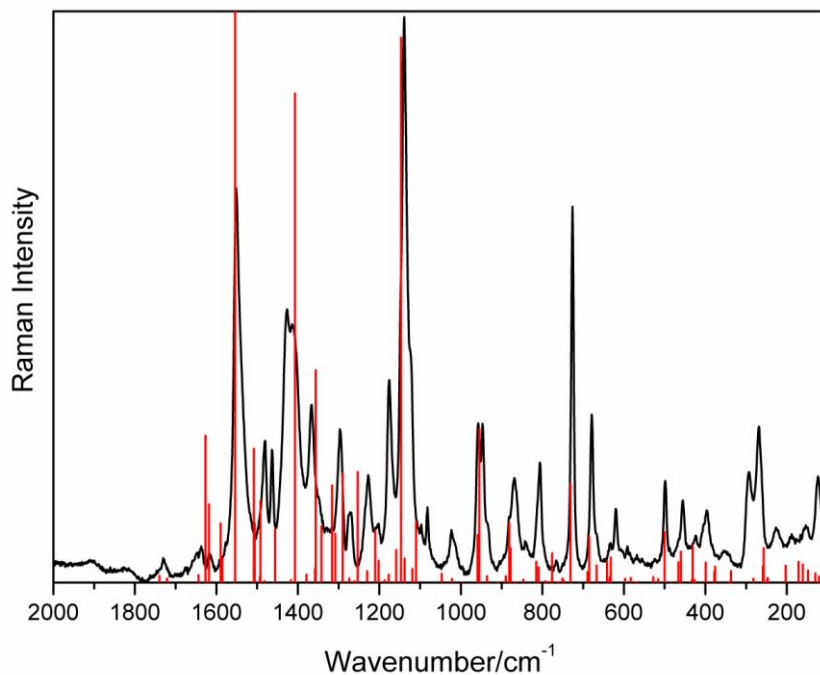


Obr. 5 Model molekuly violaceinu (B3LYP/6-311++G(d,p)) s číslováním jednotlivých kruhů. Šedá barva představuje atomy uhlíku, bílá barva představuje atomy vodíku, modrá barva představuje atomy dusíku a červená barva představuje atomy kyslíku [68].

Na následujících obrázcích (obr. 6 a 7) si můžeme prohlédnout porovnání kalkulovaných vibračních módů molekuly violaceinu a Ramanových spekter čistého violaceinu extrahovaného z *Chromobacterium violaceum* pro excitaci 514, 5 a 785 nm (převzato z [68]). Z obrázků je patrná velmi dobrá shoda mezi výpočty a spektry, zejména pro excitaci 785 nm. Tato spektra byla proto používána pro další srovnávání – viz kapitola Diskuze.



Obr. 6 Porovnání vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu a Ramanova spektra violaceinu extrahovaného z *Chromobacterium violaceum* (excitace 514,5 nm) - převzato z [68].



Obr. 7 Porovnání vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu a Ramanova spektra violaceinu extrahovaného z *Chromobacterium violaceum* (excitace 785 nm) - převzato z [68].

2.4 Exobiologie

Se studiem pigmentů a barviv v mikroorganismech souvisí, v dnešní době často diskutované, vědní odvětví zvané exobiologie (nebo také astrobiologie). Exobiologie se zabývá zkoumáním projevů současného či zaniklého života v naší sluneční soustavě. Nejvíce rozvinutým projektem jsou vesmírné mise zaměřující se na planetu Mars. Právě výběr planety Mars vychází z hypotézy, že obě planety (Země a Mars) vznikaly podobným způsobem. V ranných stádiích vývoje planety Mars na ní mohly panovat klimatické podmínky vhodné pro vznik života – stejně tak jako na Zemi. Později ale na Marsu nastaly obrovské změny klimatu, které by mohly přežít pouze organismy se schopností se na takovéto extrémní podmínky adaptovat. Tyto organismy by tedy mohly být analogické extremofilním organismům žijícím na naší planetě. Lze tedy předpokládat, že případné formy života na Marsu by musely překonávat extrémně nehostinné podmínky – jako jsou vysoké rozdíly teplot ($-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), vysoké dávky krátkovlnného ionizujícího UV záření, vysychání, vysokou salinitu, vliv toxicity kovů a atmosféry bez kyslíku. Takovéto organismy by si proto musely vyvinout specifické strategie pro přežití. Jako první krok průzkumu života na Marsu je proto nesmírně důležité nejprve studovat způsob přežití organismů v extrémních podmínkách na Zemi. Přežití je organismům v extrémních podmínkách umožněno zejména díky produkci specifických látek (např. karotenoidů, scytoneminu nebo trehalosy a mnoha dalších). Tyto látky chrání organismus před zářením, nedostatkem vody a osmotickým stresem. Proto je detekce těchto skupin organických molekul (pigmentů, aminokyselin, terpenoidů a neobvyklých uhlovodíků) rozhodující. Je také zřejmé, že ony organismy se budou nacházet na povrchu nebo pod povrchem hornin, minerálů nebo různých sedimentů v závislosti na produkci těchto tzv. biomarkerů a jejich funkcích.

Je jisté, že nelze očekávat vysoké koncentrace biomarkerů. Proto je nezbytné užití technik pro stopovou analýzu, které jsou zároveň vhodné pro použití v podmínkách mimo naši planetu. Pro tento účel se velmi dobře hodí Ramanovy spektrometry, jejichž miniaturizované verze dosahují srovnatelných výsledků jako přístroje používané v laboratoři. Přípravovaná NASA/ESA mise ExoMars bude zahrnovat soubor analytických metod, přičemž právě Ramanův spektrometr [69] umožní vědcům identifikovat specifické molekuly sloužící jako biomarkery na základě jejich jedinečných spektrálních projevů. Za biomarkery jsou považovány častěji než

jednotlivé molekuly skupiny strukturně podobných látek, které mají obdobné biochemické funkce. Za zmínku stojí např. soubor přibližně 400 známých karotenoidů, které jsou zapojeny do elektronového transportu a zastávají také ochranu před UV zářením [70].

Jak již bylo řečeno, prvním krokem k hledání možného života na Marsu je studium analogických organismů žijících v extrémních podmínkách na Zemi. Toto studium je důležité zejména z hlediska charakterizace geologických struktur, které mohou být organismy kolonizovány v život ohrožujících podmínkách. Na Zemi již bylo úspěšně provedeno velké množství měření v podmínkách, které se podobají podmínkám na Marsu. Předmětem zájmu se tedy staly extremofilní organismy žijící ve velmi suchých oblastech (poušť Atakama v Jižní Americe [71, 72], Antarktida [73, 74]) nebo v oblastech s extrémní salinitou (Eilat, Izrael [75, 76]). Také byla zkoumána přítomnost organismů v oblasti dopadu vesmírných těles (např. kráter Haughton na ostrově Devon v Kanadě) nebo v oblasti vzniklé vulkanickou činností (Špicberky). Vědci se zabývali i studiem fragmentu meteoritu z Marsu (Nakhla SNC Mars meteorit) [74].

Kromě předchozích studií bylo také prováděno testování vhodnosti přenosného Ramanova spektrometru pro použití v neobvyklých klimatických podmínkách. Pro měření bylo např. vybráno místo v Rakouských Alpách - 2860 m. n. m. (teplota -10°C až -15°C). Zde byly úspěšně zkoumány organické minerální látky, organické kyseliny a sloučeniny obsahující dusík [77, 78].

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Vzorek obsahující violacein [dle 68]

Methanol – CH₃OH, čistota ≥ 99,9 % (Sigma – Aldrich, USA)

Aceton – CH₃COCH₃, čistota 99,98 % (Lachner, ČR)

Souprava pro přípravu disperze koloidních nanočástic – NicCOLLOIDSilver (Nicolet CZ, ČR) [32]

Roztok koloidního stříbra (redukováno hydrochloridem hydroxylaminu) – dle [29, 25]

Roztok koloidního stříbra (redukováno tetrahydridoboritanem sodným) – dle [24, 79]

Roztok koloidního zlata (redukováno citrátem sodným) – dle [34]

3.2 Přístroje

Disperzní mikro-Ramanův spektrometr DXR Raman Microscope (Thermo Scientific, USA) vybavený excitačními lasery 445, 532, 633 (přesně 632,8) a 780 nm. Spektrometr byl řízen softwarem Omnic [80].

FT-Ramanův modul Nexus Nicolet připojený ke spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) vybavený excitačním laserem 1064 nm. Použit byl germaniový detektor chlazený kapalným dusíkem. Spektrometr byl řízen softwarem Omnic.

FTIR spektrometr Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA). Měření bylo provedeno pomocí techniky ATR na jednodrazovém ZnSe krystalu na mikropříslušenství InspectIR Plus (Spectra-Tech, USA). Použit byl MCT/A detektor chlazený kapalným dusíkem. Spektrometr byl řízen softwarem Omnic.

UV-Vis spektrofotometr Unicam UV340 (Thermo Spectronic, USA) řízený programem Vision 32

Hmotnostní spektrometr Esquire 3000 (Bruker, DEU) - LDI-MS

Hmotnostní spektrometr ULTRAFLEX TOF/TOF (Bruker, DEU) - ESI-MS, ESI-MS/MS

3.3 Postupy měření

3.3.1 Měření absorpčního elektronového spektra roztoku violaceinu

Absorpční elektronové spektrum extrahovaného violaceinu ve směsi acetonu a methanolu (objemový poměr 1:1) bylo změřeno na UV-Vis spektrofotometru s rozlišením 1 nm ve spektrálním rozsahu 330 až 950 nm.

3.3.2 Měření hmotnostních spekter vzorku s obsahem violaceinu

Pevný vzorek s obsahem violaceinu byl extrahován ve směsi acetonu a methanolu (1:1) a získaný roztok byl centrifugován. Analýza byla provedena v negativním módu pomocí technik LDI-MS, ESI-MS a následně i ESI-MS/MS.

3.3.3 Měření Ramanových a povrchem zesílených Ramanových spekter

Mikro-Ramanův spektrometr

Výkon excitačního laseru 445 nm se pohyboval v rozmezí 0,5 – 8 mW. Výkon excitačního laseru 532 nm se pohyboval v rozmezí 0,5 – 10 mW. Výkon excitačního laseru 633 nm se pohyboval v rozmezí 0,5 – 6 mW. Výkon excitačního laseru 780 nm se pohyboval v rozmezí 1 - 20 mW.

Pro všechna měření byly použity mřížky „Full-range“ s rozsahem vlnočtů 50 – 3500 cm^{-1} a spektrálním rozlišením $\leq 5 \text{ cm}^{-1}$. Pro excitační vlnovou délku 445 nm mřížka s počtem vrypů 1200/mm Pro excitační vlnovou délku 532 nm mřížka s počtem vrypů 900/mm Pro excitační vlnovou délku 633 nm mřížka s počtem vrypů 600/mm. Pro excitační vlnovou délku 780 nm mřížka s počtem vrypů 400/mm. Byla použita 50 μm štěrbina.

FT-Ramanův spektrometr

Měření bylo provedeno s využitím excitační vlnové délky 1064 nm v rozsahu vlnočtů 150 – 3700 cm^{-1} a spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} .

3.3.1.1 Měření Ramanových spekter

Měření pevného vzorku obsahujícího violacein a odpařeného extraktu violaceinu

Ramanova spektra pevných vzorků a odpařeného extraktu violaceinu byla získána pomocí mikro-Ramanova spektrometru a FT-Ramanova spektrometru.

V rámci měření mikro-Ramanovým spektrometrem byl použit objektivu se zvětšením 10x. Doba ozařování excitačním laserem byla 1 s a počet expozií 64. Na kovovou destičku jsem nanesla malé množství lyofilizovaného vzorku obsahujícího violacein a rozetřela kopistkou. Měření jsem provedla pomocí mikro-Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445, 532, 633 a 780 nm.

Dále byla část lyofilizovaného vzorku obsahujícího violacein přesypána do skleněné kyvety a změřena pomocí FT-Ramanova spektrometru s výkonem excitačního laseru 300 mW. Počet scanů byl 1024.

Poté jsem do mikrozkuhavky Eppendorf navázila 6,5 mg vzorku obsahujícího violacein. K tomuto množství jsem přidala 200 μ l roztoku methanolu a acetonu (1:1). Takto připravený slabě fialový roztok jsem vložila na 15 min. do ultrazvukové lázně. Dále jsem na sklíčko kápnula připravený roztok violaceinu a odpařila horkovzdušnou pistolí. Na stejné místo jsem takto opakovaně přidávala a odpařovala roztok violaceinu (celkem 7x). Dále byl tento vzorek změřen pomocí FT-Ramanova spektrometru a mikro-Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445, 532, 633, 780 a 1064 nm.

Měření extraktu violaceinu

Ramanova spektra extraktu violaceinu byla získána pomocí objektivu se zvětšením 10x. Doba ozařování excitačním laserem byla 2 s a počet expozií 64.

Roztok violaceinu (extrakt) jsem připravila postupem viz výše. Tento roztok jsem poté nasála do skleněné kapiláry a proměřila mikro-Ramanovým spektrometrem při excitačních vlnových délkách 445, 532, 633 a 780 nm.

3.3.1.2 Měření povrchem zesílených Ramanových spekter

Měření pomocí disperze nanočástic

Disperze stříbrných nanočástic

SERS/SERRS spektra extraktu vzorku s obsahem violaceinu byla získána pomocí objektivu se zvětšením 10x. Doba ozařování excitačním laserem zde byla 2 s a počet expozičních 128.

V první sadě měření jsem použila disperzi stříbrných nanočástic komerčně dostupné sady NicCOLLOIDSilver (dále jen *Ag koloid 1*). Tu jsem připravila dle popsaného postupu [81]. K *Ag koloidu 1* jsem přidala 50 µl roztoku vzorku obsahujícího violacein v methanolu a acetonu (1:1). Takto získaný roztok jsem nasála do skleněné kapiláry a pomocí mikro-Ramanova spektrometru jsem provedla měření při excitačních vlnových délkách 445, 532, 633 a 780 nm. Spektra byla získána z viditelných shluků nanočástic.

Ve druhé sadě měření jsem použila koloidní roztok stříbra redukovaný tetrahydridoboritanem sodným (dále jen *Ag koloid 2*) [24, 79]. Do mikrozkušavky Eppendorf jsem napipetovala 1 ml *Ag koloidu 2* a přidala 50 µl roztoku vzorku obsahujícího violacein v methanolu a acetonu (1:1). Tento roztok jsem nasála do kapiláry a měřila pomocí mikro-Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445, 532, 633 a 780 nm.

Ve třetí sadě měření jsem pracovala s koloidním roztokem stříbra redukovaným hydrochloridem hydroxylaminu (dále jen *Ag koloid 3*) [29, 25]. Do mikrozkušavky Eppendorf jsem napipetovala 1 ml *Ag koloidu 3* a přidala 50 µl roztoku vzorku obsahujícího violacein v methanolu a acetonu (1:1). Tento roztok jsem nasála do kapiláry a měřila pomocí mikro-Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445, 532, 633 a 780 nm.

Disperze zlatých nanočástic

SERS/SERRS spektra extraktu vzorku s obsahem violaceinu byla získána pomocí objektivu se zvětšením 10x. Doba ozařování excitačním laserem zde byla 2 s a počet expozic 128.

Do mikroskopu Eppendorf jsem napipetovala 1 ml koloidního roztoku zlata redukovaného citrátem sodným (dále jen *Au koloid*) [34] a přidala 50 μ l roztoku violaceinu ve směsi methanolu a acetonu (1:1). Tento roztok jsem nasála do kapiláry a měřila pomocí mikro-Ramanova spektrometru při excitačních vlnových délkách 445, 532, 633 a 780 nm. Záznamy byly vždy získány z viditelných shluků zlatých nanočástic. V případě excitačních vlnových délek 445 a 532 nm nebyla takto získaná spektra reprezentativní. Proto jsem pro tyto excitační vlnové délky měření provedla také s přísadkou 10 a 50 μ l 1M roztoku NaCl, který podporuje agregaci nanočástic.

Měření na pevném substrátu

Agregáty stříbrných nanočástic

Pro měření SERS/SERRS spekter pomocí agregátů stříbrných nanočástic byl pro excitační vlnovou délku 633 nm použit objektiv se zvětšením 10x. Doba ozařování byla 1 s a počet expozic 128. Pro ostatní vlnové délky byl použit objektiv se zvětšením 50x. Doba ozařování excitačním laserem pro vlnové délky 780 nm a 445 nm byla 2 s a počet expozic 128. Pro excitační vlnovou délku 532 nm byla doba ozařování 1 s a počet expozic 128.

Na agregát stříbrných nanočástic – redukováno hydrochloridem hydroxylaminu (dále jen *Ag agregát*) [82], umístěný na sklíčku, jsem kápnula roztok violaceinu v methanolu a acetonu (1:1). Po okamžitém zaschnutí kapky jsem prováděla měření pomocí mikro-Ramanova spektrometru z modrých míst na agregátech. Byly použity lasery s excitačními vlnovými délkami 445, 532, 633 a 780 nm.

Zlaté substráty

Pro měření SERS/SERRS pomocí zlatého substrátu byl použit objektiv se zvětšením 50x. Doba ozařování byla 2 s a počet expozičních 128.

Na sklíčko s nanosenými nanočásticemi zlata – vyrobené firmou Ocean Optics [83] (dále jen *Au substrát*), jsem do vyznačeného prostoru kápnula roztok violaceinu v methanolu a acetonu (1:1). Po zaschnutí kapky jsem provedla měření pomocí mikro-Ramanova spektrometru s použitím laseru s excitační vlnovou délkou 780 nm. Výběr excitační vlnové délky 780 nm byl proveden na základě doporučení výrobce. Spektra byla získána z modře zbarvených míst.

3.3.4 Měření infračervených spekter

Měření pomocí FTIR spektrometru technikou ATR bylo provedeno ve spektrálním rozsahu $650 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} . Počet scanů byl 128.

Nejprve bylo získáno infračervené spektrum pevného lyofilizovaného vzorku s obsahem violaceinu. Dále byl tento vzorek rozpuštěn ve směsi acetonu a methanolu (1:1) – postup viz výše. Poté jsem na sklíčku obaleném hliníkovou folií vytvořila důlek. Do tohoto důlku jsem kápnula připravený roztok violaceinu a odpařila horkovzdušnou pistolí. Do důlku jsem takto opakovaně přidávala a odpařovala roztok violaceinu (celkem 7x). Tento vzorek byl změřen na FTIR spektrometru.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Hmotnostní a absorpční elektronová spektra

Pro ověření přítomnosti pigmentu violaceinu ve vzorku lyofilizovaných mikroorganismů byl vzorek nejprve analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie (LDI-MS, ESI-MS a ESI-MS/MS). Získaná spektra viz obr. P1 a P2 (Příloha). Ve spektrech se objevuje kvazimolekulární pík m/z 342,2 (ESI-MS) a 342,143 (LDI-MS) odpovídající $[M-H]^-$. Tento pík koresponduje s relativní molekulovou hmotností violaceinu ($C_{20}H_{13}N_3O_3$), která je 343,34. Na obr. P1 (nahore) lze pozorovat kromě píku m/z 342,2 také pík m/z 326,2. Ten náleží deoxyviolaceinu ($C_{20}H_{12}N_3O_2$), který může vznikat jako vedlejší produkt při biosyntéze violaceinu. Píky s m/z 253 a 269 jsou přisuzovány fragmentům $C_{15}H_9O_4$ a $C_{15}H_9O_5$ [84]. Na P2 (dole - fragmentace m/z 342,2) se nacházejí intenzivní píky s m/z 298, 209,1 a 157,1, které jsou produktem iontové fragmentace. Tyto hodnoty se shodují s již dříve naměřenými [85].

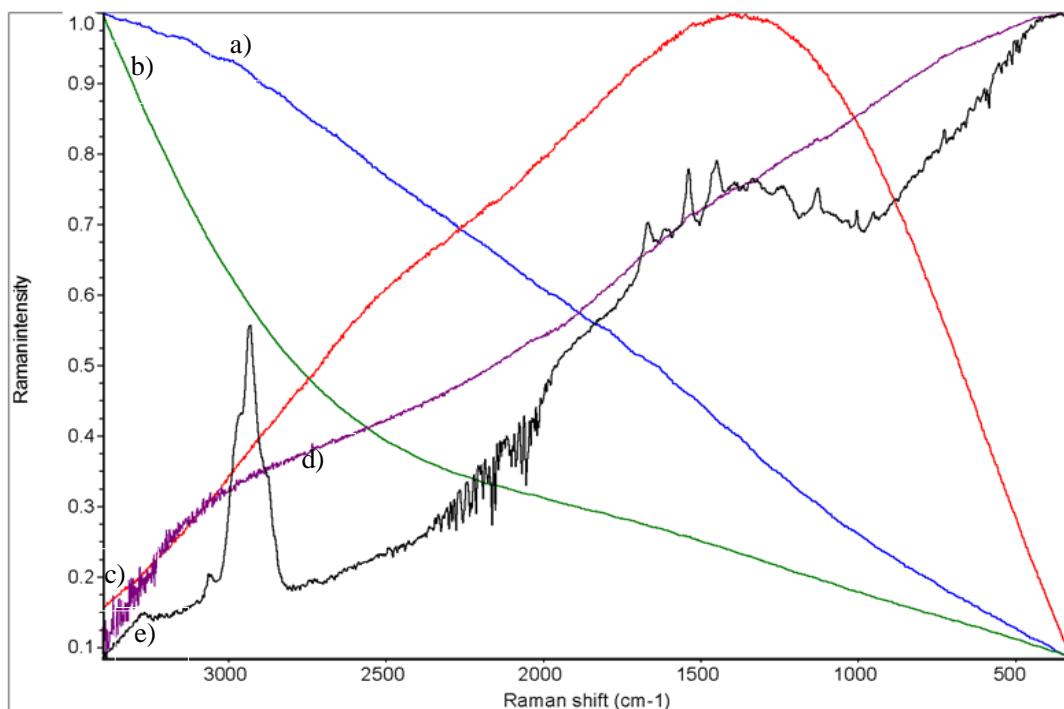
Dále bylo také změřeno absorpční elektronové spektrum roztoku (extraktu) violaceinu ve směsi acetonu a methanolu (1:1) viz P3 (Příloha). Absorpční maximum roztoku se nachází při 560 nm. Z tohoto zjištění vyplývá, že při použití excitačních laserů 532 a 633 nm se přibližujeme k absorpčnímu maximu roztoku violaceinu. Povrchem zesílená spektra získaná pomocí těchto excitačních vlnových délek lze nazývat rezonančními (tedy SERRS spektry).

4.1 Ramanova a infračervená spektra

Pevný vzorek obsahující violacein a vysušený extrakt tohoto vzorku byl studován pomocí FTIR spektrometru, FT-Ramanova spektrometru a mikro-Ramanova spektrometru. Poté byl pomocí mikro-Ramanova spektrometru měřen v kapiláře extrakt violaceinu ve směsi acetonu a methanolu.

Nejprve byla proměřena spektra pevného vzorku s obsahem violaceinu pomocí Ramanských spektrometrů. Měření bylo provedeno postupně při pěti excitačních vlnových délkách – viz obr. 8. Z obrázku je patrné, že reprezentativní záznam pevného vzorku se podařilo získat pouze pomocí excitační vlnové délky 1064 nm. V ostatních spektrech je možno pozorovat jen klesající základní linii. Při použití

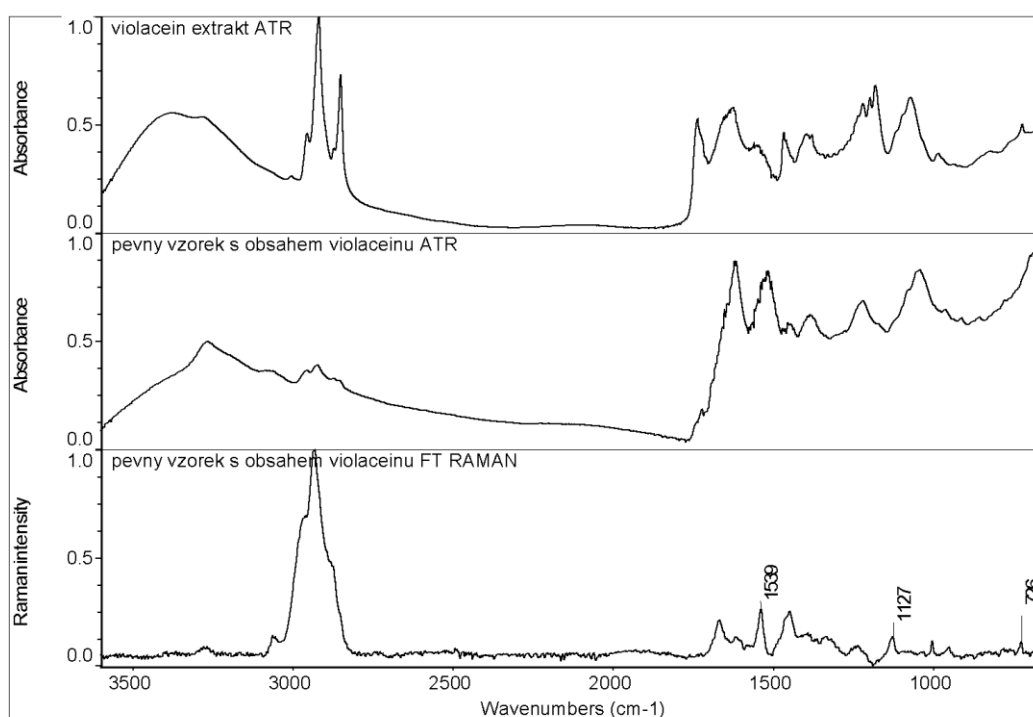
excitační vlnové délky 633 nm je záznam navíc komplikován fluorescencí s maximem při cca 1400 cm^{-1} .



Obr. 8 Porovnání Ramanových (RS, RRS) spekter pevného vzorku s obsahem violaceinu a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm e) excitace 1064 nm.

Jak je vidno na obr. 8 (případně obr. 9), záznamu získanému pomocí FT-Ramanova spektrometru dominují pásy valenčních C-H vibrací (2870 cm^{-1} až 2980 cm^{-1}) alifatických CH_2 a CH_3 skupin. Ve spektru také můžeme pozorovat další méně intenzivní pásy v oblasti 700 až 1700 cm^{-1} , z nichž většina náleží projevům bakteriálního buněčného skeletu. Z výskytu pásů s maximy při 1003 a 1668 cm^{-1} lze předpokládat přítomnost látek bílkovinné povahy. Existenci pásu s maximem při 1449 cm^{-1} můžeme spojit s přítomností látek bílkovinné, polysacharidové případně lipidické povahy [86]. Pouze z výskytu pásů s maximy při 726 (vw), 1127 (w) a 1539 cm^{-1} (w) lze usuzovat na přítomnost violaceinu (na základě porovnání se spektrem čistého violaceinu s excitací 785 nm – dle [68]), přičemž pás s maximem při 1127 cm^{-1} může náležet také vibračním projevům polysacharidů.

Pro kompletnost studia pevného vzorku bylo dále technikou ATR získáno i infračervené spektrum (viz obr. 9). V tomto spektru můžeme vidět široký pás s maximem cca při 3200 cm^{-1} , který náleží projevům valenčních O-H a N-H vibrací naznačujících na přítomnost látek polysacharidové a bílkovinné povahy. Ve spektru je dále možno pozorovat projevy valenčních C-H vibrací (2880 až 2970 cm^{-1}) a v oblasti 600 až 1800 cm^{-1} nalezneme několik dalších pásů, které lze také považovat za projevy bakteriálního buněčného skeletu. V této oblasti se vibračně projevují látky bílkovinné (pásky s maximy při 1043 , 1220 , 1386 , 1455 , 1515 a 1621 cm^{-1}), polysacharidové (pásky s maximy při 1043 , 1220 , 1386 a 1621 cm^{-1}) a lipidické povahy (pásky s maximy při 1220 , 1386 a 1455 cm^{-1}) [86]. V tomto spektru není možné nalézt žádné vibrační projevy, na jejichž základě by bylo možné uvažovat o přítomnosti violaceinu.



Obr. 9 Porovnání FT-Ramanova spektra a FTIR spektra vzorku s obsahem violaceinu spolu s FTIR spektrem odpařeného extraktu violaceinu. Základní linie byly upraveny. Označeny jsou pásy, ze kterých lze u pevných vzorků usuzovat na přítomnost violaceinu.

Vzorek s obsahem violaceinu byl poté extrahován směsí acetonu a methanolu (1:1), odpařen a znovu změřen pomocí FTIR spektrometru technikou ATR. Výsledek měření viz obr. 9. V záznamu je opět patrný široký pás v oblasti kolem 3300 cm^{-1} (projevy

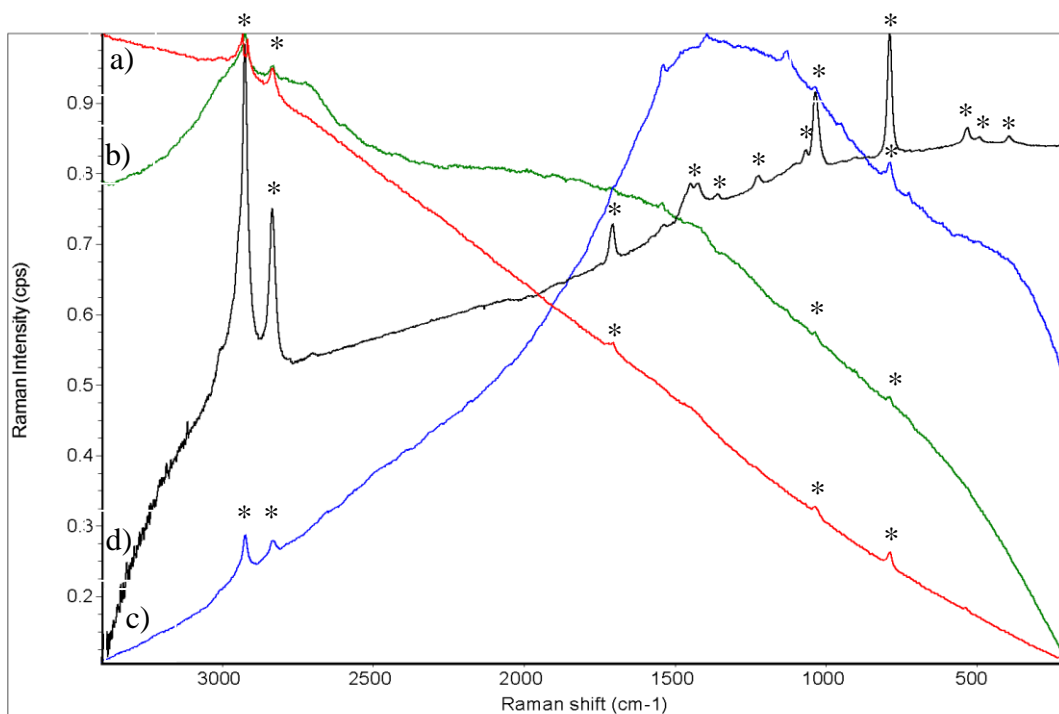
valenčních O-H a N-H vibrací polysacharidů a bílkovin). Dále můžeme pozorovat nárůst projevů valenčních vibrací C-H (2840 až 2970 cm^{-1}) a pásu s maximem při 1736 cm^{-1} , které vypovídají o přítomnosti látek lipidické povahy. Ve spektru můžeme také pozorovat další vibrační projevy bílkovin (pásky s maximy při 1073, 1396, 1467, 1560 a 1625 cm^{-1}), polysacharidů (pásky s maximy při 1073 a 1625 cm^{-1}) a lipidů (pásky s maximy při 722, 985, 1396 a 1467 cm^{-1})

Při srovnání tohoto spektra s vypočtenými vibračními módy violaceinu (viz obr. P4 – Příloha) by mohly být vibrační projevy ve spektru přisuzovány violaceinu, nicméně pravděpodobnější je považovat tyto projevy za projevy bakteriálního buněčného skeletu, který ve vzorku nad pigmentem violaceinem převládá.

Získané záznamy nelze pro identifikaci pigmentu violaceinu ve vzorku použít, proto jsem dále pokračovala měřením extraktu violaceinu ve skleněné kapiláře (viz obr. 10). Ve všech získaných spektrech podle očekávání dominovaly pásky rozpouštědla. V případě excitačních vlnových délek 532, 633 nm a 780 nm je však možné pozorovat i velmi slabý pás violaceinu (při vlnočtu kolem 1540 cm^{-1} (vw)). Při použití excitační linie 633 nm lze rozlišit i další velmi slabé pásky violaceinu (maxima při 1395 (vw) a 1128 cm^{-1} (vw)). Toto přiřazení je v souladu s vypočtenými vibračními módy violaceinu (viz obr. P5 – Příloha). Je nutné dodat, že sklo kapiláry při excitaci 780 nm vykazuje charakteristickou fluorescenci, a tím je značně komplikován průběh základní linie. Tento jev je ale možné úspěšně softwarově kompenzovat odečtením fluorescence samotné kapiláry.

Dále jsem také pomocí Ramanových spektrometrů studovala odpařený vzorek extraktu violaceinu (příprava viz výše). V rámci těchto měření bylo dosaženo obdobných výsledků jako při měření pevného vzorku s obsahem violaceinu – pigment nebylo možné ve vzorcích jednoznačně identifikovat.

Protože měření pevných vzorků, odpařených extraktů ani extraktů v kapiláře nepřinesla kýžené výsledky, zaměřila jsem dále se na studium vzorku violaceinu pomocí technik povrchem zesíleného Ramanova rozptylu.



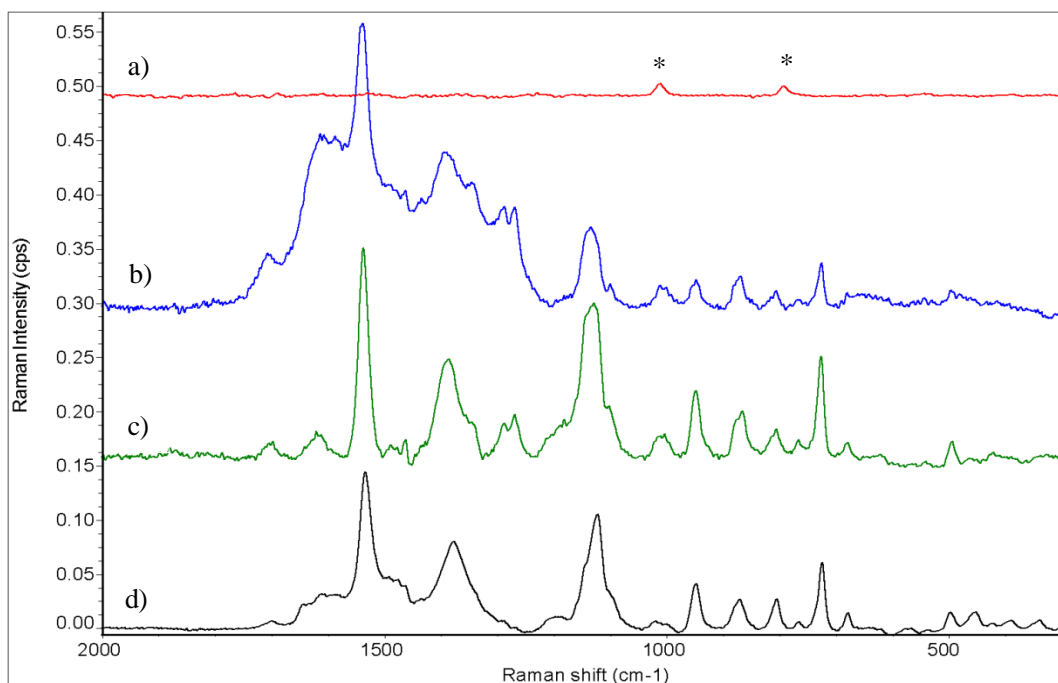
Obr. 10 Porovnání Ramanových (RS, RRS) spekter extraktu violaceinu a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm (po korekci fluorescence kapiláry). Hvězdičky označují pásy rozpouštědla.

4.2 Povrchem zesílená Ramanova spektra

Měření povrchem zesílených Ramanových spekter byla prováděna pomocí několika zesilujících médií - koloidních roztoků stříbrných a zlatých nanočástic, agregátů stříbrných nanočástic a zlatých substrátů. Při tvorbě obr. 11, 14, 16, 18, 19, 22 a 23 byly zachovány relativní intenzity pásů v jednotlivých spektrech.

V první sérii měření SERS/SERRS spekter vzorku s obsahem violaceinu byl používán *Ag koloid 1* (obr. 11). Záznamy byly pro všechny excitační linie získány v kapiláře přímo z viditelných shluků stříbrných nanočástic.

Při excitaci laserem vlnové délky 445 nm se ve spektru projevuje dvěma slabými pásy pouze rozpouštědlo. Ve spektru získaném pomocí excitační vlnové délky 532 nm se objevuje větší množství pásů v oblasti vlnočtů 500 cm^{-1} až 1700 cm^{-1} (s maximy při 726 (w), 807 (w), 870 (w), 949 (w), 1013 (w), 1101 (w), 1135 (m), 1270 (m), 1288 (m), 1346 (m), 1390 (s), 1539 (vs), 1588 (s), 1614 (s), 1708 cm^{-1} (w)). Tyto pásy jsou přítomny také ve spektru získaném pomocí excitačních vlnových délek 633 nm a 780 nm. Liší se pouze jejich relativní intenzity. To je dobře patrné například z přítomnosti dubletu s vlnočty 1270 a 1288 cm^{-1} , který je ve spektrech dobře rozlišitelný pouze při použití excitace 532 nebo 633 nm, nikoliv však při použití excitace 780 nm.

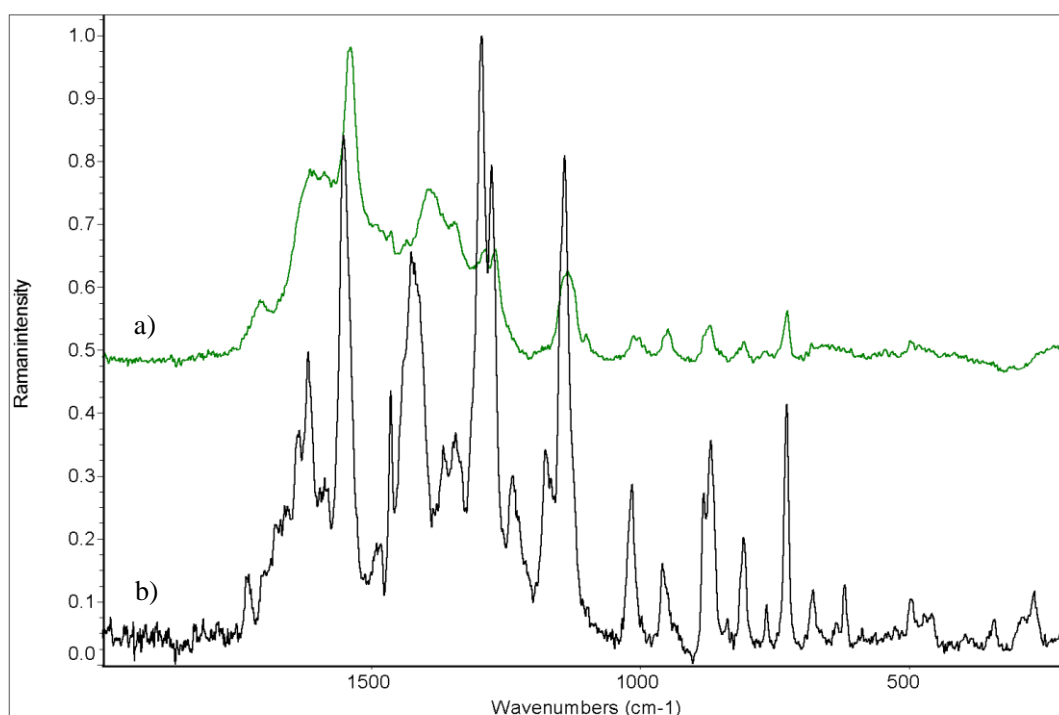


Obr. 11 Porovnání povrchem zesílených Ramanových (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu – *Ag koloid I* a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm (po korekci fluorescence kapiláry). Základní linie byly upraveny. Hvězdičky označují pásy rozpouštědla.

Nejllepší záznamy (z hlediska intenzit a rozlišení jednotlivých pásů) byly získány pomocí excitačních vlnových délek 532 a 633 nm, což lze vysvětlovat kombinací povrchového a rezonančního zesílení Ramanova rozptylu (tedy SERRS). Při použití excitace 532 nm je ve spektru v oblasti 1230 až 1750 cm^{-1} patrné nárůstající pozadí, což

je zřejmě důsledek přítomnosti grafitického uhlíku, vznikajícího při ozařování vzorku excitačním laserem o vyšším výkonu.

Pro posouzení vlivu povrchového zesílení na spektrální projevy violaceinu bylo provedeno srovnání naměřených SERS/SERRS spekter a Ramanových spekter čistého violaceinu (dle [68]) pro excitační vlnové délky 532 a 780 nm. Srovnání viz obr. 12 (532 nm) a obr. 13 (780 nm). Z obr. 12 je patrné, že celkový charakter převzatého a naměřeného spektra je obdobný. Převzaté Ramanovo spektrum je však lépe rozlišené a pásy jsou intenzivnější. Pokud se zaměříme na porovnání poloh jednotlivých pásů, lze konstatovat, že u pásů v oblasti 700 až 1050 cm^{-1} můžeme hovořit o velmi dobré shodě. V případě pásů nacházejících se v SERRS spektru v oblasti 1100 až 1750 cm^{-1} (konkrétně 1135 (m), 1270 (m), 1288 (m), 1346 (m), 1539 (vs), 1588 (s), 1614 (s), 1708 cm^{-1} (w)) došlo ke změnám poloh maxim těchto pásů - oproti pásům v převzatém Ramanově spektru i o více než 20 cm^{-1} (pás při 1588 cm^{-1}) směrem k nižším vlnočtům.

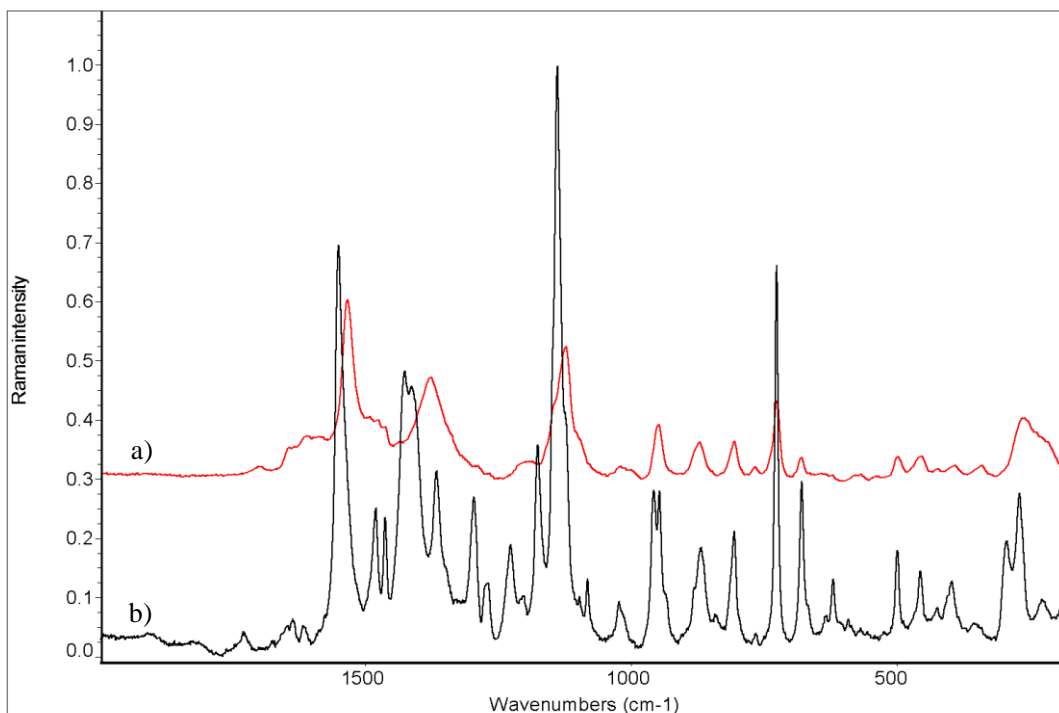


Obr. 12 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERRS spektra extraktu violaceinu a) SERRS *Ag koloid 1* (532 nm) b) čistý violacein 514 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

Také se objevil nový pás s maximem při 1390 cm^{-1} (s). Pro přehledné porovnání změn poloh maxim v SERS/SERRS spektrech extraktu violaceinu viz tab. 1 – dtto pro všechny další zesilující systémy.

Pro excitaci 633 nm byly pro porovnání použity vypočtené vibrační módy violaceinu (obr. P6 – Příloha). I v tomto případě je patrná značná shoda. Nicméně u většiny pásů v SERRS spektru v oblasti 850 až 1600 cm^{-1} (konkrétně s maximy při 867 (w), 949 (m), 1130 (s) a 1538 cm^{-1} (s)) můžeme pozorovat změny poloh maxim (maximálně o 17 cm^{-1} pro pás při 1130 cm^{-1}) k nižším vlnočtům. Nové maximum se objevilo při 1387 cm^{-1} (m).

Pokud porovnáme Ramanovo a SERS spektrum pro excitaci 780 nm (obr. 13), je z obrázku opět patrná celková podobnost spekter. Ramanovo spektrum je lépe rozlišené a jednotlivé pásy jsou intenzivnější. V oblasti 450 až 1050 cm^{-1} pozorujeme dobrou shodu v polohách jednotlivých pásů. Pás s maximem při 949 cm^{-1} není v SERS spektru rozštěpen, jako je tomu v Ramanově spektru. V oblasti 1100 až 1600 cm^{-1} nalezneme v SERS spektru pouze dva širší pásy (maxima při 1123 (s) a 1534 cm^{-1} (s)), u nichž

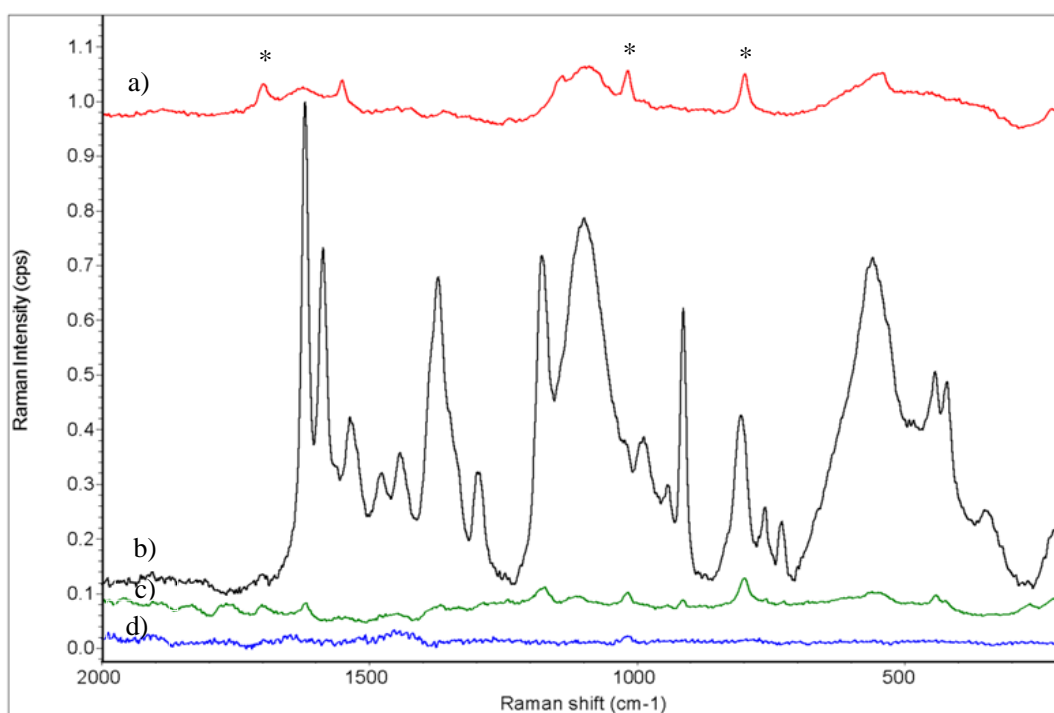


Obr. 13 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERS spektra extraktu violaceinu a) SERS Ag koloid 1 (780 nm - po korekci fluorescence kapiláry) b) čistý violacein 785 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

došlo ke změně poloh maxim v intervalu do 20 cm^{-1} směrem k nižším vlnočtům. Také se objevilo nové maximum při 1378 cm^{-1} (m).

Ve druhé sadě měření v kapiláře byl jako zesilující substrát použit *Ag koloid 2* (viz obr. 14). Shluky stříbrných nanočástic nebyly v tomto případě viditelné. Spektra byla tedy získána náhodně z roztoku v kapiláře.

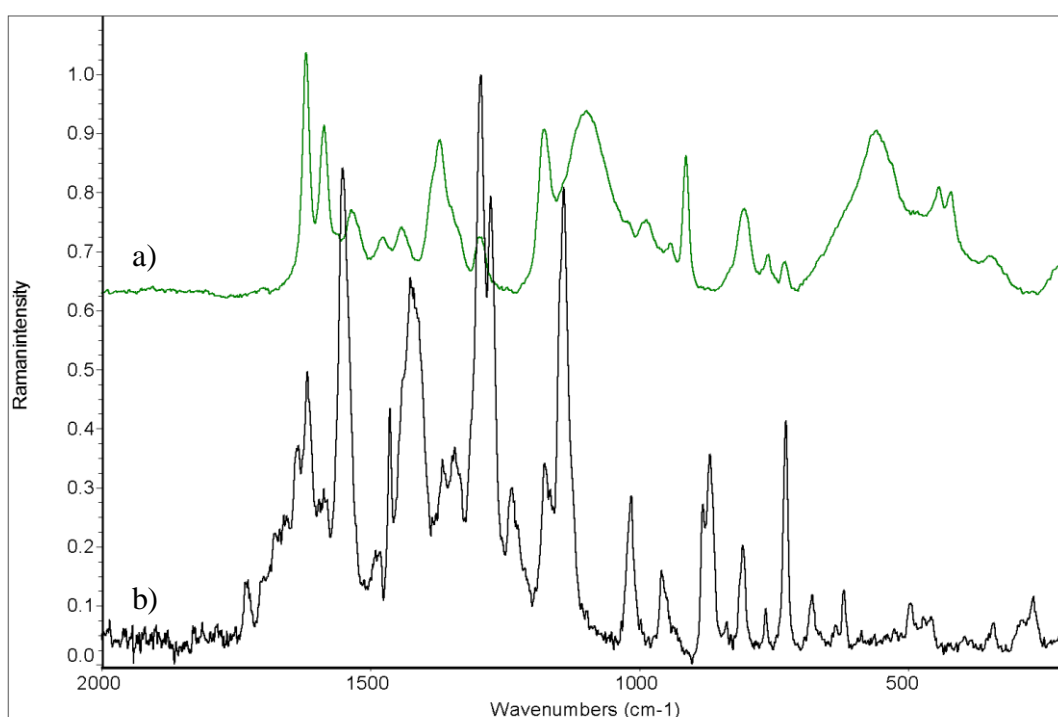
Záznamům získaným pomocí excitací 445, 633 a 780 nm dominují převážně pásy rozpouštědla, violacein se v nich vibračně nijak významně neprojevuje. Pouze v případě excitační vlnové délky 445 nm lze pozorovat jeden pás náležející violaceinu (maximum při 1551 cm^{-1} (w)), jehož přiřazení bylo provedeno na základě porovnání naměřeného SERS spektra a vypočtených vibračních módů violaceinu pro excitaci 445 nm (viz obr. P7 – Příloha). Intenzivní spektrum bylo ale naměřeno pomocí excitační vlnové délky 532 nm. V tomto spektru se nachází mnoho pásů v oblasti vlnočtů 400 cm^{-1} až 1650 cm^{-1} .



Obr. 14 Porovnání povrchem zesílených (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu *Ag koloid 2* a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm (po korekci fluorescence kapiláry). Základní linie byly upraveny. Hvězdičky označují pásy rozpouštědla.

Toto SERRS spektrum bylo také porovnáno s Ramanovým spektrem čistého violaceinu (dle [68]) - viz obr. 15. Z obrázku je patrné, že spektra nejsou ve velké

shodě. Celkový charakter SERRS spektra je odlišný od převzatého Ramanova spektra. V naměřeném SERRS spektru extraktu violaceinu se vyskytují dva široké pásy (s maximy při 559 (s) a 1099 cm^{-1} (s)), které v Ramanově spektru čistého violaceinu nenalezneme. Shodné polohy pásů pozorujeme pouze v případě pásů s maximy při 729 (w), 761 (w), 805 (m) a 1298 cm^{-1} (w), přičemž pás s maximem při 1298 cm^{-1} je v Ramanově spektru rozštěpen. Příčinu odlišného charakteru získaného záznamu není možné jednoznačně vysvětlit. S ohledem na tuto skutečnost nebyl systém *Ag koloidu 2* zařazen do srovnávací tabulky změn poloh maxim v SERS/SERRS spektrech extraktu violaceinu (tab. 1).

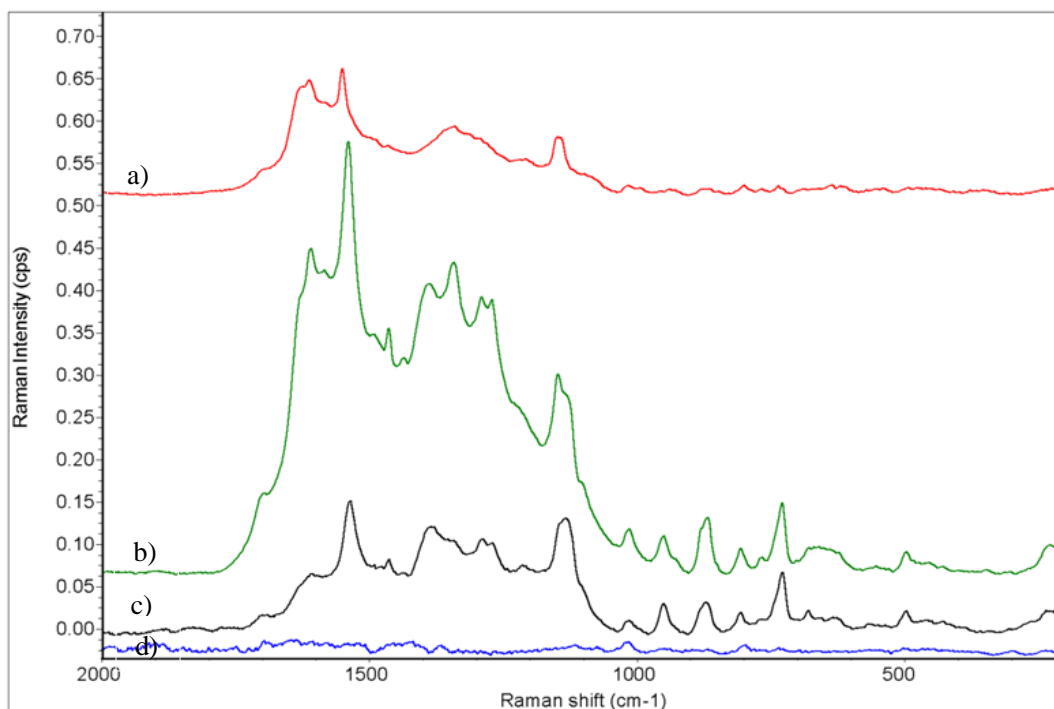


Obr. 15 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERRS spektra extraktu violaceinu a) SERRS *Ag koloid 2* (532 nm) b) čistý violacein 514 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

Třetí sada měření v kapiláře byla prováděna pomocí *Ag koloidu 3* (viz obr. 16). Záznamy byly opět pořízeny z náhodně vybraných míst v roztoku (shluky nanočástic nebyly viditelné).

Při použití excitačních vlnových délek 445, 532 a 633 nm byly získány záznamy podobného charakteru, jejichž pásy mají odlišné relativní intenzity. Spektrum získané

pomocí excitace 445 nm je nejméně rozlišené, pouze s několika pásy s maximy při 1613 (s), 1551 (s), 1341 (m), 1149 cm^{-1} (m). Spektrum získané pomocí excitace 532 nm je nejintenzivnější, s mnoha rozlišenými pásy v oblasti 450 až 1650 cm^{-1} (s maximy při 729 (w), 768 (w), 806 (vw), 868 (w), 950 (w), 1014 (w), 1148 (m), 1271 (s), 1290 (s), 1342 (s), 1388 (s), 1464 (m), 1539 (vs), 1583 (s), 1609 (s) a 1700 cm^{-1} (w)). V oblasti 1050 až 1750 cm^{-1} je patrný nárůst pozadí, který je zřejmě způsoben vznikem grafitického uhlíku. Při excitaci linií 633 nm jsou v záznamu přítomné pásy, které se shodují svými vlnočty s pásy v záznamu při 532 nm, ale jejich intenzity jsou výrazně nižší. Nejlepší záznamy byly tedy získány pomocí excitace 532 nm (případně 633 nm), což lze s největší pravděpodobností přisuzovat vlivu nejen povrchového, ale i rezonančního zesílení. V případě excitace 780 nm se violacein v záznamu vibračně neprojeví.

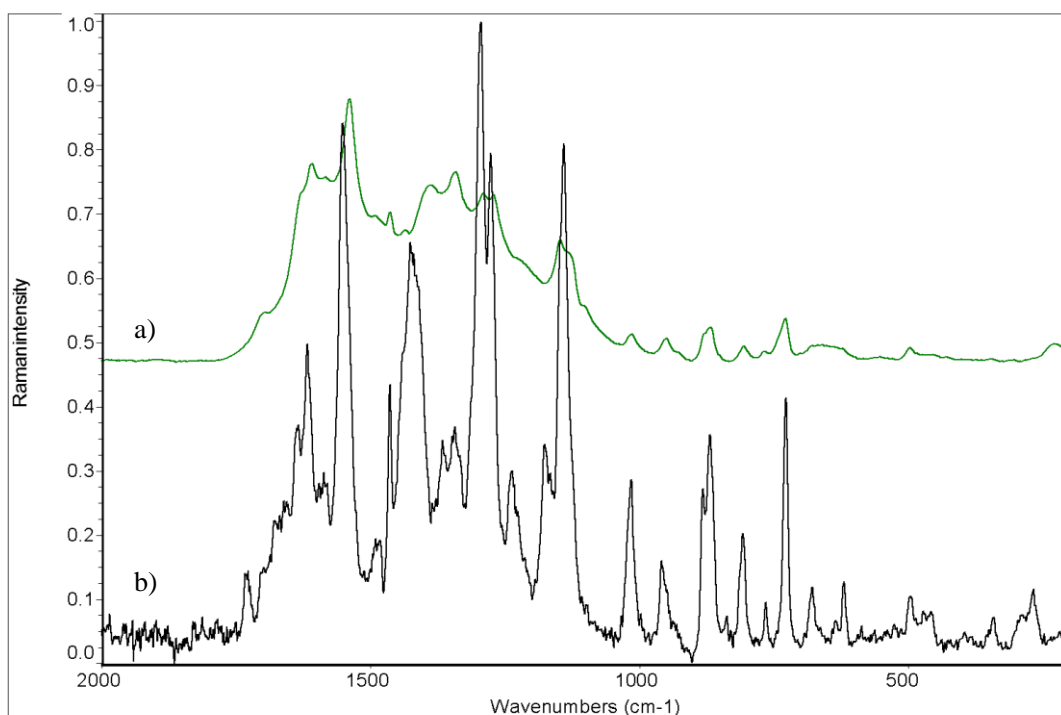


Obr. 16 Porovnání povrchem zesílených (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu – *Ag koloid 3* a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm (po korekci fluorescence kapiláry). Základní linie byly upraveny.

Pro posouzení vlivu povrchového zesílení na vzhled spekter bylo opět provedeno srovnání naměřeného SERS spektra při 445 nm s vypočtenými módy violaceinu (obr.

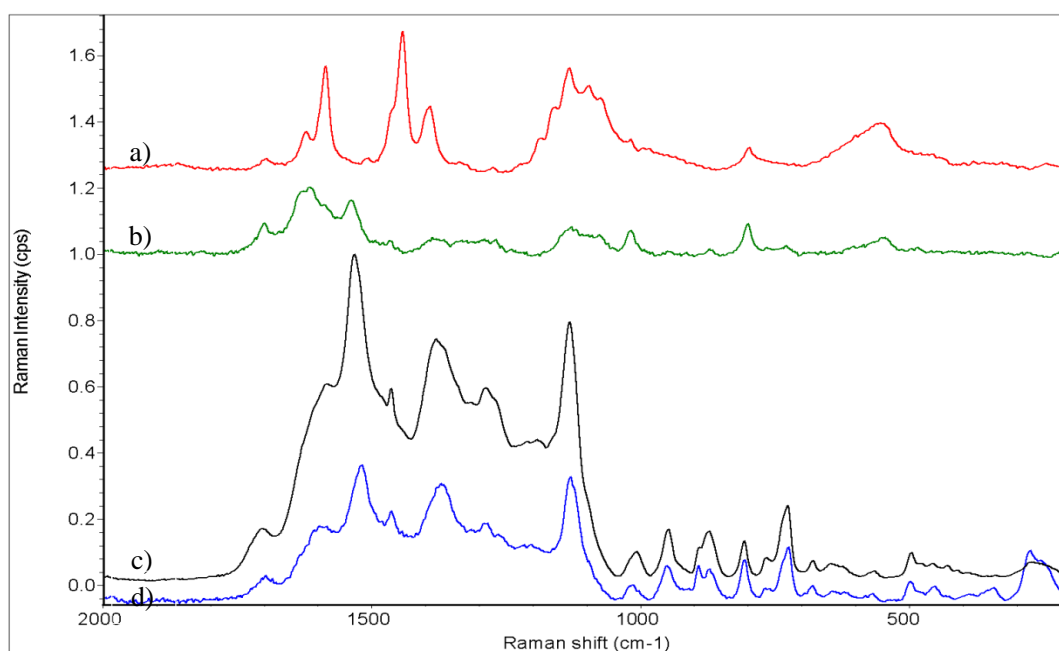
P8 – Příloha). Polohy pásů s maximy při 1149 (m), 1551 (s) a 1613 cm^{-1} (s) se proti polohám těchto pásů získaných výpočtem změnily pouze v rámci několika cm^{-1} směrem k nižším vlnočtům. Poloha pásu při 1341 cm^{-1} (m) se změnila v intervalu 10 až 20 cm^{-1} k nižším vlnočtům.

Pro excitaci 532 nm bylo provedeno porovnání SERRS spektra s převzatým Ramanovým spektrem čistého violaceinu (dle [68]) – viz obr. 17. Z obrázku je patrné, že pásy v převzatém Ramanově spektru jsou intenzivnější a lépe rozlišené. Pokud se zaměříme na polohy těchto pásů, tak v oblasti 490 až 1020 cm^{-1} můžeme hovořit o velmi dobré shodě. V případě pásů v oblasti 1100 až 1700 cm^{-1} (konkrétně s maximy při 1271 (s), 1290 (s), 1342 (s), 1539 (vs), 1609 (s) a 1700 cm^{-1} (w)) došlo ke změnám poloh maxim i o více než 20 cm^{-1} (pás při 1700 cm^{-1}) k nižším vlnočtům. Poloha maxima při 1148 cm^{-1} (m) se naopak změnila o 7 cm^{-1} k vyšším vlnočtům. Objevil se také nový pás s maximem při 1388 cm^{-1} (s).



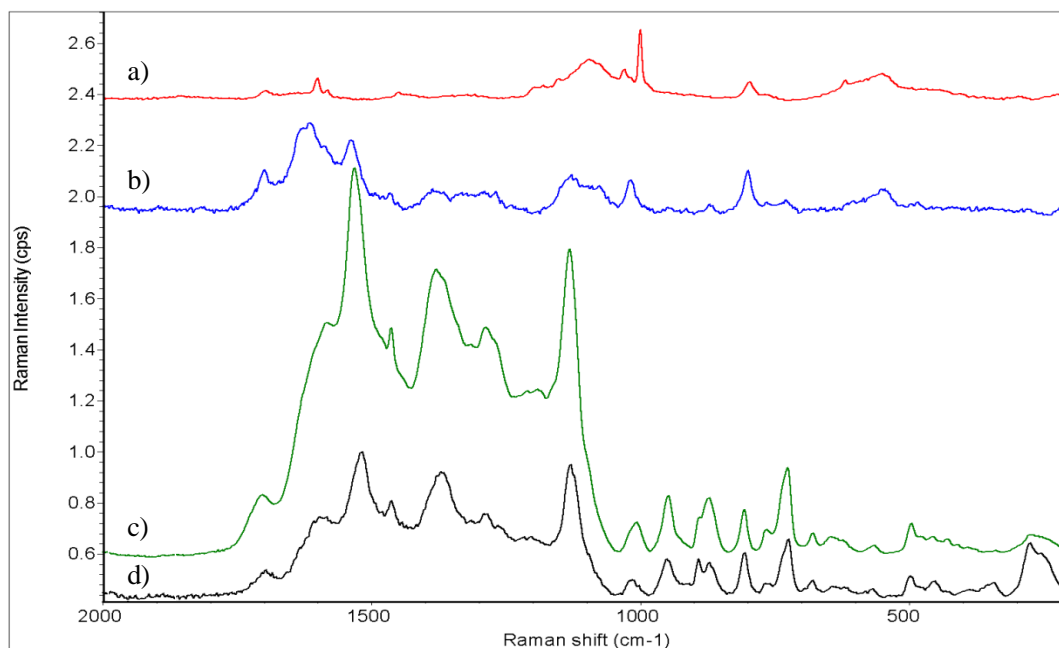
Obr. 17 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERRS spektra extraktu violaceinu a) SERS *Ag koloid 3* (532 nm) b) čistý violacein 514 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

V další sadě měření v kapiláře byla spektra měřena pomocí *Au koloidu* (obr. 18 a obr. 19). V těchto případech byly záznamy pořizovány z viditelných shluků zlatých nanočástic. Je nutné připomenout, že pro získání co nejkvalitnějších spekter bylo třeba při excitaci 445 nm a 532 nm přidat do roztoku nanočástic 1M NaCl pro podpoření jejich agregace. V případě excitační vlnové délky 445 nm se získané záznamy lišily v závislosti na přidaném objemu 1M NaCl. V prvním případě (obr. 18) ve spektru můžeme nalézt pásy s maximy při 554 (m), 798 (w), 1132 (s), 1391 (m), 1442 (s), 1586 (s) a 1623 cm^{-1} (m). V případě druhém (obr. 19) se v záznamu nacházejí pásy s maximy při 551 (w), 620 (w), 794 (w), 1001 (m), 1031 (w), 1098 (m), 1585 (w) a 1601 cm^{-1} (w). Je důležité zdůraznit, že při použití této excitační vlnové délky nelze získaná spektra nazývat povrchem zesílenými, a to z důvodu polohy maxima extinkce povrchového plasmonu zlatého koloidu, které se nachází cca při 520 cm^{-1} . Proto při jejich vzniku můžeme uvažovat pouze o případném zapojení zesílení rezonančního. Při užití excitační vlnové délky 532 nm se ve spektru objevují slabé pásy s maximy při 546 (w), 730 (vw), 766 (vw) 800 (w), 872 (vw), 1018 (w), 1128 (w), 1539 (m), 1616 (m) a 1700 cm^{-1} (w). Nejintenzivnější záznam byl získán pomocí excitační vlnové délky 633 nm, a to



Obr. 18 Porovnání povrchem zesílených (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu a RS spektra extraktu violaceinu – *Au koloid* a) excitace 445 nm **případ 1** (přídavek 10 μl 1M NaCl) b) excitace 532 nm (přídavek 10 μl 1M NaCl) c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm (po korekci fluorescence kapiláry). Základní linie byly upraveny.

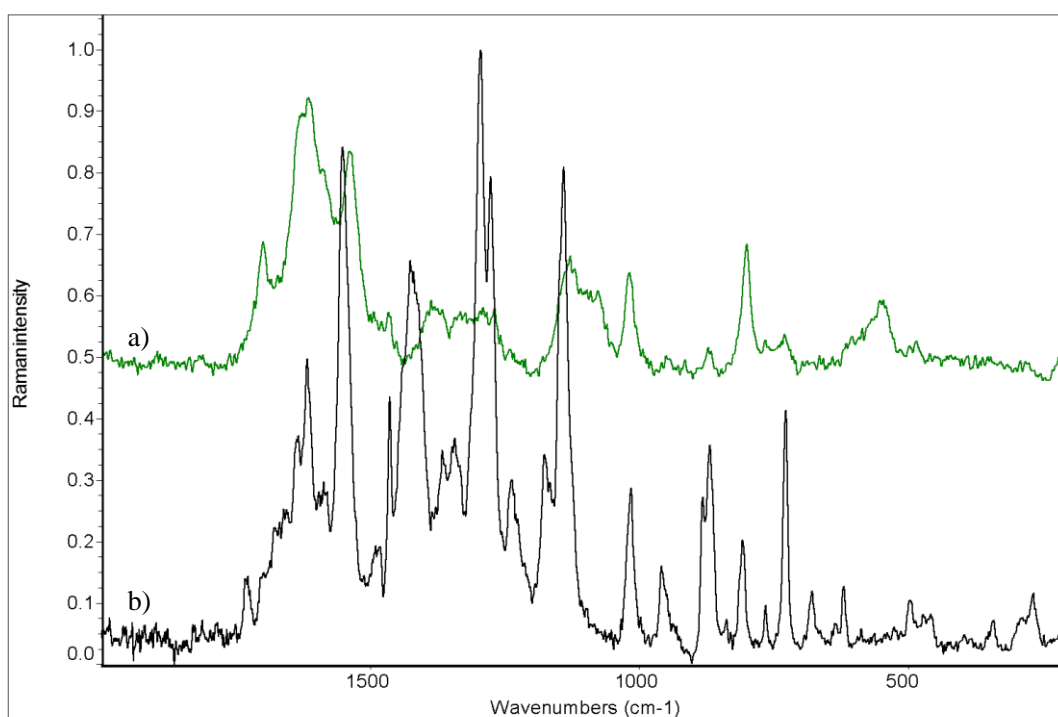
pravděpodobně díky vlivu povrchového a rezonančního zesílení. Ve spektru můžeme pozorovat mnoho dobře rozlišených pásů (konkrétně s vlnočty 496 (vw), 679 (vw), 726 (w), 807 (w), 872 (w), 948 (w), 1007 (w), 1132 (s), 1289 (m), 1380 (s), 1464 (m), 1532 (s), 1589 (m) a 1704 cm^{-1} (w)). V případě excitační vlnové délky 780 nm nalezneme ve spektru shodné pásy jako v případě excitace 633 nm, pouze s nižšími intenzitami.



Obr. 19 Porovnání povrchem zesílených (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu a RS spektra extraktu violaceinu – *Au koloid* a) excitace 445 nm **případ 2** (přídavek 50 μl 1M NaCl) b) excitace 532 nm (přídavek 10 μl 1M NaCl) c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm (po korekci fluorescence kapiláry). Základní linie byly upraveny.

Při porovnání RS spektra získaného pomocí excitace 445 nm s vypočtenými módy violaceinu (případ 1 viz obr. P9 – Příloha) můžeme pozorovat změnu polohy maxima nejintenzivnějšího pásu violaceinu (při 1586 cm^{-1} (s)) o více než 20 cm^{-1} k vyšším vlnočtům. Poloha pásu s maximem při 1132 cm^{-1} (s) se změnila o 15 cm^{-1} k nižším vlnočtům. Nová maxima se objevila při 1391 (m) a 1442 cm^{-1} (s). Při porovnání druhého RS spektra získaného pomocí excitace 445 nm (případ 2 obr. P10 – Příloha) nelze hovořit o shodě mezi naměřeným RS spektrem a vypočtenými vibračními módy violaceinu. Naměřené spektrum má překvapivě naprosto odlišný charakter.

Pro SERRS spektrum získané pomocí excitační vlnové délky 532 nm bylo provedeno srovnání s převzatým Ramanovým spektrem čistého violaceinu (dle [68]) – viz obr. 20. Pásky v Ramanově spektru jsou opět lépe rozlišené a intenzivnější než v zesíleném spektru. Z obrázku je patrná dobrá shoda v těchto spektrech v polohách pásků v oblasti 700 až 1050 cm^{-1} (maxima při 730 (vw), 766 (vw), 872 (vw), 1018 cm^{-1} (w)). Poloha pásky s maximem při 800 cm^{-1} (w) se změnila v intervalu do 10 cm^{-1} směrem k nižším vlnočtům. V oblasti 1100 až 1650 cm^{-1} nalezneme pásky s maximy při 1128 (w), 1539 (m), 1616 (m) a 1700 cm^{-1} (w), u nichž došlo ke změnám poloh směrem k nižším vlnočtům i o více než 20 cm^{-1} (pás při 1700 cm^{-1}).



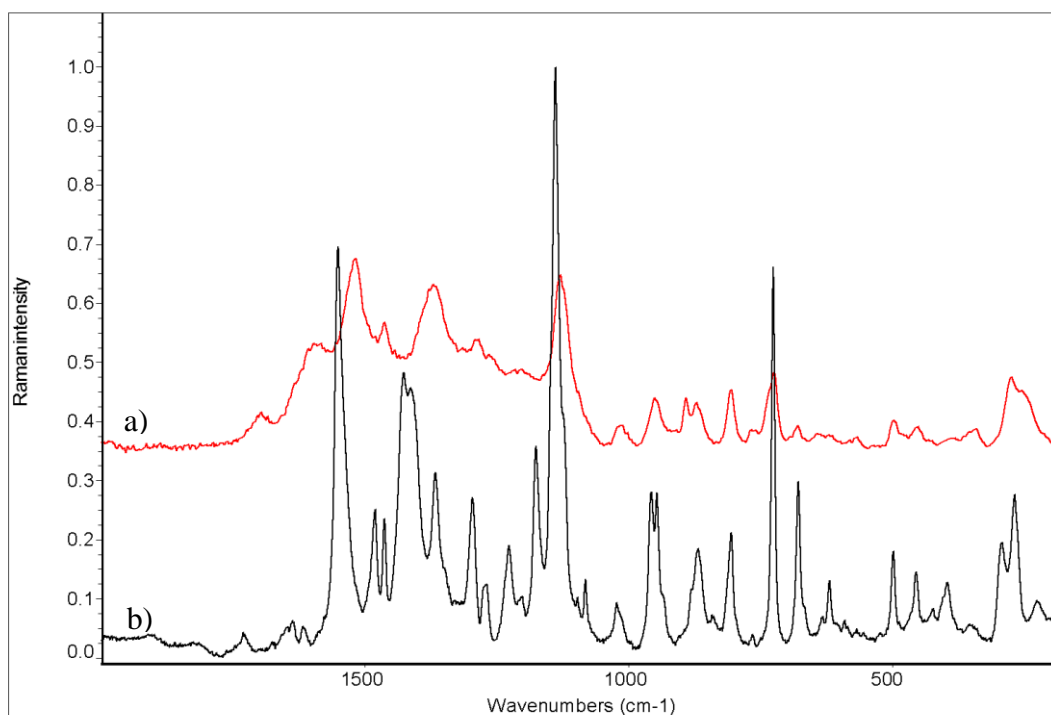
Obr. 20 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERRS spektra extraktu violaceinu a) SERRS *Au koloid* (532 nm) b) čistý violacein 514 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

Pokud budeme s vypočtenými módy violaceinu porovnávat SERRS spektrum získané pomocí excitace 633 nm (obr. P11 – Příloha), nalezneme v oblasti 700 až 950 cm^{-1} velmi dobrou shodu. Nicméně u některých pásků v oblasti 1100 až 1550 cm^{-1} (konkrétně s maximy při 1132 (s) a 1532 cm^{-1} (s)) se změnila polohy maxim i o více než

20 cm^{-1} (pás při 1532 cm^{-1}) k nižším vlnočtům. Také se objevil nový pás s maximem při 1380 cm^{-1} (s).

Pro excitaci 780 nm bylo provedeno srovnání s převzatým Ramanovým spektrem čistého violaceinu (dle [68]) - obr. 21. Výsledek je podobný jako v případě excitace 633 nm – v oblasti 250 až 1050 cm^{-1} nalezneme velmi dobrou shodu poloh všech pásů v naměřeném a převzatém spektru. V oblasti 1100 až 1700 cm^{-1} se však polohy těchto maxim - při 1130 (m), 1266 (w), 1292 (m), 1518 cm^{-1} (m) změnilo i o více než 20 cm^{-1} (pás při 1518 cm^{-1}) k nižším vlnočtům. Nové maximum se objevilo při 1371 cm^{-1} (m).

Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že nejkvalitnější záznam byl získán pomocí excitace 633 nm (pravděpodobně díky kombinaci povrchového a rezonančního zesílení).

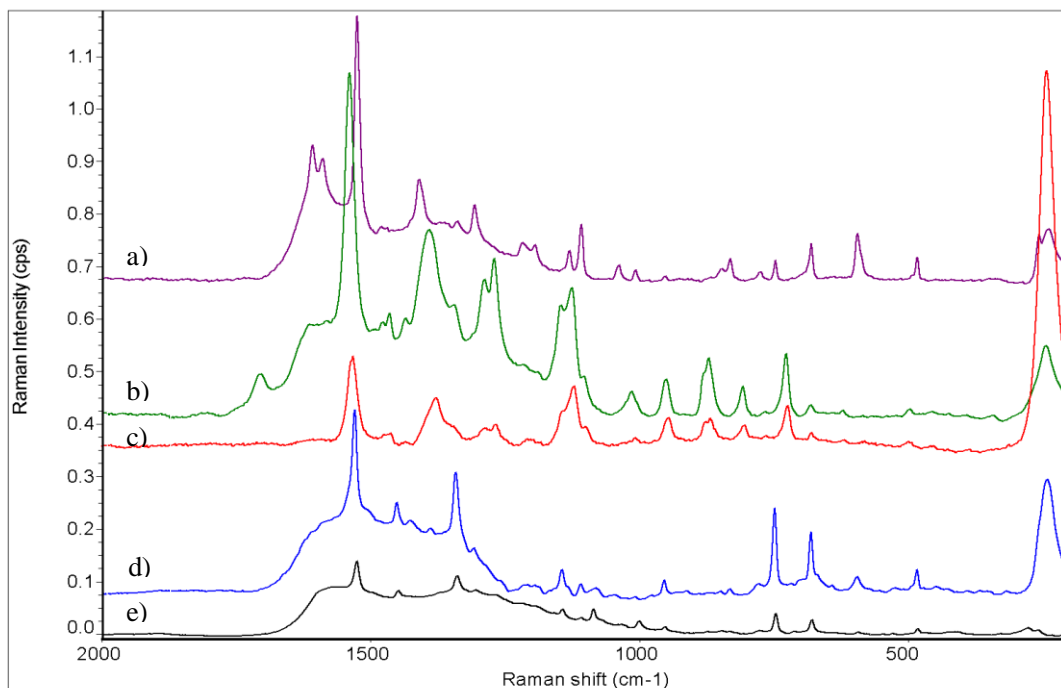


Obr. 21 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERS spektra extraktu violaceinu a) SERS *Au koloid* (780 nm - po korekci fluorescence kapiláry) b) čistý violacein 785 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

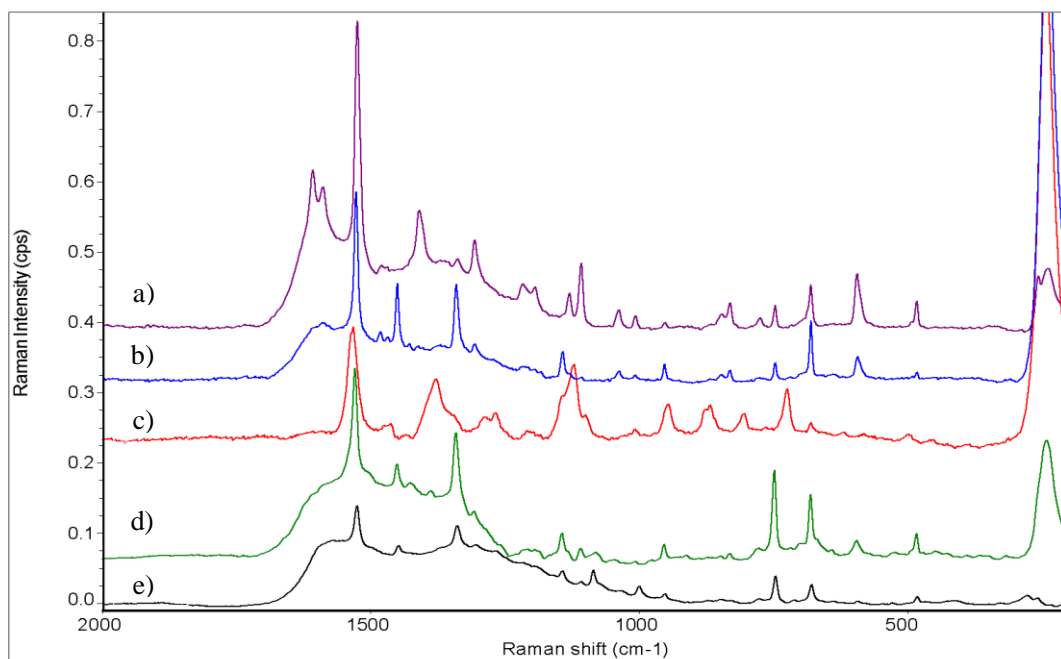
Další měření již nebyla prováděna v kapiláře, ale na agregátech stříbrných nanočástic (*Ag agregát*) nanesených na podložním sklíčku (viz obr. 22 a obr. 23).

Ve všech záznamech získaných pomocí *Ag agregátu* můžeme pozorovat velké množství dobře rozlišených pásů. Ve spektru získaném pomocí excitační vlnové délky 445 nm pozorujeme pásy s maximy při 483 (w), 594 (w), 680 (w), 747 (w), 775 (vw), 831 (w), 848 (w), 1007 (vw), 1038 (w), 1108 (w), 1130 (w), 1193 (w), 1217 (w), 1306 (m), 1339 (w), 1410 (m), 1525 (vs), 1589 (s) a 1608 cm^{-1} (s). Při použití excitační vlnové délky 532 nm bylo zajímavým zjištěním, že při měření z různých míst byly získány dva odlišné záznamy. Ty se lišily nejen intenzitami pásů, ale i jejich pozicemi. V případě 1 (obr. 22) ve spektru nalezneme pásy s maximy při 499 (vw), 624 (vw), 681 (vw), 727 (m), 807 (w), 871 (m), 950 (w), 1015 (w), 1102 (w), 1126 (s), 1146 (m), 1270 (s), 1288 (m), 1346 (m), 1392 (s), 1465 (m), 1478 (m), 1539 (vs) a 1704 cm^{-1} (w). Nejintenzivnější pás s maximem při 1539 cm^{-1} je proti těmto nejintenzivnějším pásům v ostatních spektrech viditelně posunut k vyšším vlnočtům (o 14 cm^{-1}). V případě 2 (obr. 23) pozorujeme v záznamu pásy s maximy při 483 (vw), 593 (w), 680 (w), 747 (vw), 831 (vw), 849 (vw), 953 (vw), 1008 (vw), 1037 (vw), 1130 (vw), 1142 (w), 1307 (w), 1341 (m), 1450 (m), 1469 (vw), 1482 (vw) a 1527 cm^{-1} (s). Záznam pořízený pomocí excitace 633 nm má stejný charakter jako záznam pořízený při 532 nm (případ 1). Intenzity pásů jsou zde ale nižší, pás s maximem při 1704 cm^{-1} (w) ve spektru zcela chybí. Většina pásů se oproti pásům získaným při excitaci 532 nm (případ 1) nachází u nižších vlnočtů (maximálně o 5 cm^{-1}). Při použití excitační vlnové délky 780 nm se získané spektrum velmi podobá (z pohledu poloh pásů) spektru získaném při 532 nm (případ 2). Relativní intenzity jednotlivých pásů jsou však různé. Pásy nacházející se v oblasti 480 až 960 cm^{-1} jsou také ve velmi dobré shodě s pásy ve spektru získaném při excitaci 445 nm. Spektrum získané pomocí excitační vlnové délky 445 nm má v oblasti 1000 až 1610 cm^{-1} odlišný vzhled od všech ostatních spekter.

Ve všech záznamech se kromě zmiňovaných pásů také objevuje intenzivní pás přibližně při 240 cm^{-1} , který demonstruje adsorpci chloridů na stříbrné nanočástice - jedná se o projev valenčních Ag-Cl vibrací [87]. Jak již bylo zmiňováno dříve, chloridy jsou do systému přidávány pro podpoření agregace stříbrných nanočástic.



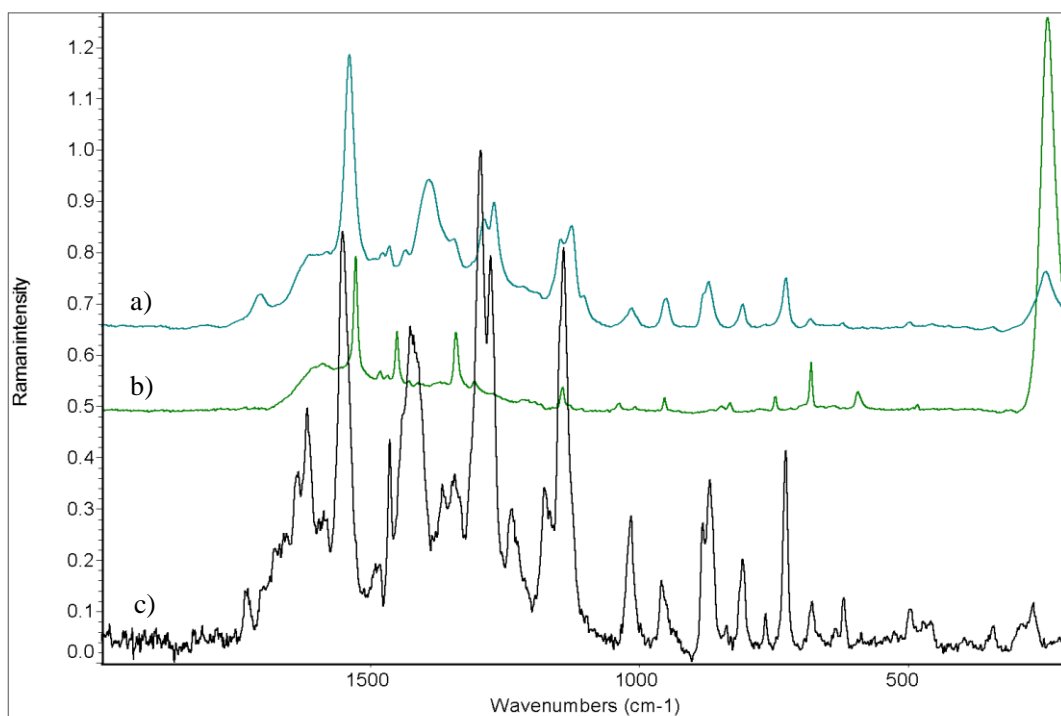
Obr. 22 Porovnání povrchem zesílených (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu – Ag agregát a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm **případ 1** c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm. Au substrát e) excitace 780 nm. Základní linie byly upraveny.



Obr. 23 Porovnání povrchem zesílených (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu – Ag agregát a) excitace 445 nm b) excitace 532 nm **případ 2** c) excitace 633 nm d) excitace 780 nm. Au substrát e) excitace 780 nm. Základní linie byly upraveny.

Při porovnání naměřeného SERS spektra s vypočtenými módy violaceinu pro excitaci 445 nm (obr. P12 – Příloha) pozorujeme shodu pouze v pozicích pásů s maximy při 680 (w), 1108 (w) a 1410 cm^{-1} (m). V případě nejintenzivnějšího pásu (při 1525 cm^{-1} (vs)) došlo ke změně polohy maxima o více než 20 cm^{-1} k nižším vlnočtům.

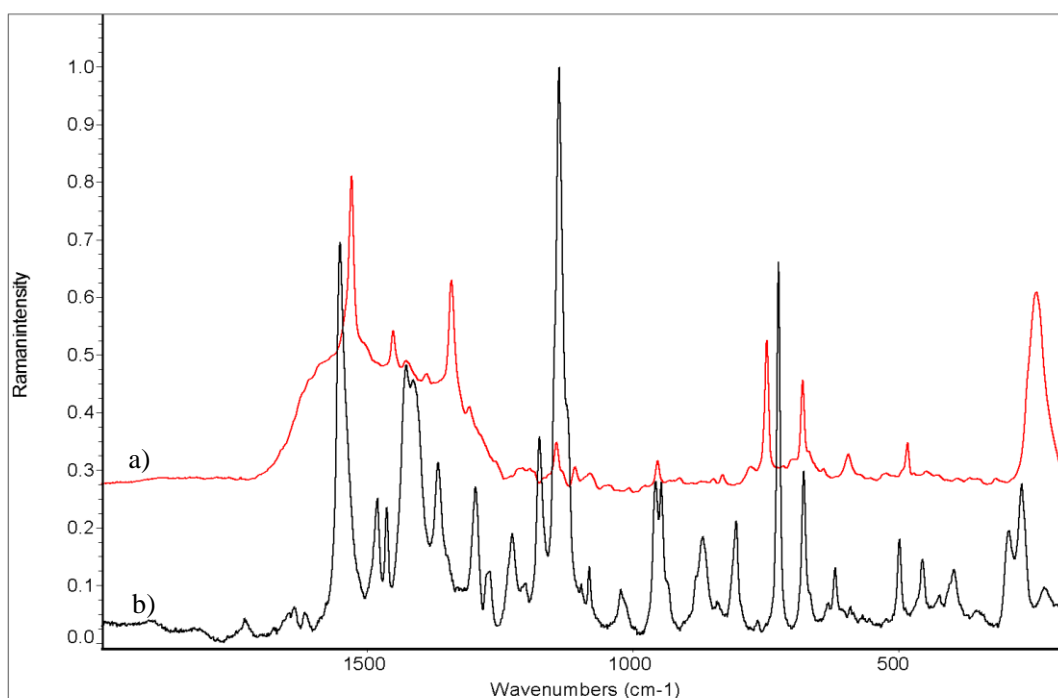
V případě excitace 532 bylo provedeno srovnání naměřených SERRS spekter s převzatým Ramanovým spektrem čistého violaceinu (dle [68]) - viz obr. 24. Z obrázku je zřejmé, že lepší shoda mezi naměřeným a převzatým spektrem nastává v případě 1. Zejména v oblasti 650 až 1050 cm^{-1} můžeme hovořit o velmi dobré shodě. U pásů v oblasti 1100 až 1750 cm^{-1} (konkrétně 1126 (s), 1146 (m), 1270 (s), 1288 (m), 1539 (vs) a 1704 cm^{-1} (w)) se změnila poloha maxim i o více než 20 cm^{-1} (pásy při 1146 a 1704 cm^{-1}) k nižším vlnočtům. Nové maximum se objevilo při 1392 cm^{-1} (s). V případě 2 nalezneme podobnost mezi naměřeným a převzatým spektrem pouze díky pásům s maximy při 680 (w) a 1142 cm^{-1} (w). Poloha maxima nejintenzivnějšího pásu při 1527 cm^{-1} (s) se změnila směrem k nižším vlnočtům (o více než 20 cm^{-1}).



Obr. 24 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERRS spektra extraktu violaceinu a) SERRS *Ag* agregát **případ 1** (532 nm) b) SERRS *Ag* agregát **případ 2** (532 nm) c) čistý violacein 514 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

Pokud porovnáme SERRS spektrum získané pomocí excitační vlnové délky 633 nm s vypočtenými vibračními módy violaceinu (obr P13 – Příloha) nalezneme mezi nimi velmi dobrou shodu. Polohy některých pásů se ale opět změnila směrem k nižším vlnočtům (konkrétně ty s maximy při 1122 (m) a 1533 cm^{-1} (s)) o více než 20 cm^{-1} . Při vlnočtu 1380 cm^{-1} (m) lze pozorovat nové maximum.

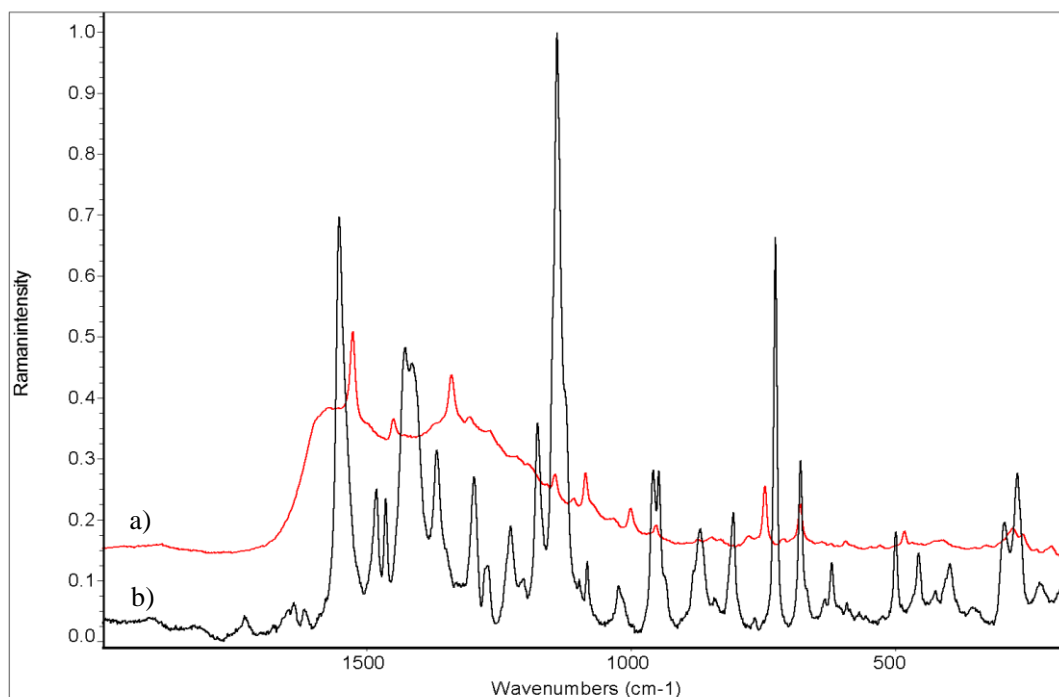
Pro excitační vlnovou délku 780 nm bylo SERS spektrum porovnáno s převzatým Ramanovým spektrem čistého violaceinu (dle [68]) - obr. 25. Polohy pásů se shodují u pásů s maximy při 681 (m), 954 (w) a 1427 cm^{-1} (m). Polohy pásů s maximy při 748 (m) a 1144 cm^{-1} (w) se v SERS spektru změnila i o více než 20 cm^{-1} (pás při 748 cm^{-1}) k vyšším vlnočtům, polohy pásů s maximy při 1342 (m) a 1529 cm^{-1} (s) se změnila o více než 20 cm^{-1} směrem k nižším vlnočtům. Nové maximum se objevilo při 1388 cm^{-1} (m).



Obr. 25 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERS spektra extraktu violaceinu a) SERS Ag agregát (780 nm) b) čistý violacein 785 nm (dle [68]). Základní linie byly upraveny.

Na závěr bylo také provedeno měření na zlatém substrátu firmy Ocean Optics (*Au substrát*). Při použití výrobcem doporučené excitační vlnové délky 780 nm se polohy

pásů shodují (v rámci několika cm^{-1}) s polohami pásů v záznamu získaném pomocí *Ag agregátu* (viz obr. 22). Tyto pásy jsou však intenzivnější při použití stříbrných agregátů. Porovnání SERS spektra získaného pomocí *Au substrátu* s převzatým spektrem čistého violaceinu (obr. 26) je obdobné jako u porovnání pro *Ag agregát* pro excitaci 780 nm. Jedinou odlišností je nepřítomnost pásu s maximem při 1388 cm^{-1} v záznamu získaném pomocí *Au substrátu*.



Obr. 26 Porovnání spektra čistého violaceinu a SERS spektra extraktu violaceinu a) SERS *Au substrát* (780 nm) b) čistý violacein 785 nm (dle [68]). Základní linie byla upravena.

Na základě dosažených výsledků je zřejmé, že k zesilování intenzity Ramanova rozptylu dochází zejména díky zapojení elektromagnetického mechanismu, který ovlivňuje celkový vzhled získaných spekter neselektivním zesilováním vibračních módů violaceinu. V získaných SERS/SERRS záznamech se často ale také setkáváme se změnami poloh maxim některých pásů violaceinu, zejména těch v oblasti 1100 až 1710 cm^{-1} , což může být přisuzováno zapojení také mechanismu chemického do zesílení intenzity Ramanova rozptylu. Tyto změny pravděpodobně demonstrují slabou

chemickou interakci, ke které může docházet mezi nanočásticemi kovu a molekulami violaceinu (možný vznik povrchového komplexu). Se změnami poloh maxim pásů violaceinu se můžeme setkat ve spektrech získaných pomocí všech zesilujících systémů, přičemž míra ovlivnění vzhledu spekter závisí na použitém zesilujícím médiu.

Ze získaných SERS/SERRS spekter je zřejmé, že jejich kvalita je výrazně ovlivněna nejen použitým zesilujícím systémem, ale i výběrem excitační vlnové délky. Právě excitační vlnová délka úzce souvisí s intenzitou samotného povrchového zesílení Ramanova rozptylu - díky rezonanci povrchového plasmonu, společně s dříve zmiňovaným rezonančním zesílením Ramanova rozptylu. Při měření byly použity stříbrné a zlaté zesilující systémy, jejichž maxima extinkce (tedy extinkce povrchového plasmonu) se nacházejí v různých oblastech spektra.

Maxima extinkce stříbrných koloidů (*Ag koloid 1-3*) se nachází přibližně při 400 nm. Dalo by se tedy předpokládat, že nejlepší záznamy budou získány pomocí excitace 445 nm. Na základě dosažených výsledků je ale zřejmé, že nejkvalitnější záznamy byly získány při použití excitace 532 nm (přičemž při excitaci 633 nm byly získané záznamy také kvalitní). Tyto skutečnosti lze vysvětlit posunem extinkce maxima stříbrných nanočástic k vyšším vlnovým délkám, který může být způsoben zejména agregací nanočástic a dále také možnou tvorbou povrchového komplexu nanočástic zesilujícího systému s adsorbovanou molekulou violaceinu. Při použití stříbrných koloidů tedy k zesílení Ramanova rozptylu pravděpodobně přispívá kromě povrchového zesílení také zesílení rezonanční, které hraje v těchto případech dominantní roli.

Maximum extinkce zlatého koloidu se nachází při přibližně 520 nm, vliv plasmonových rezonancí bychom proto přepokládali při použití vyšších excitačních vlnových délek než v případě stříbrných substrátů. Nejkvalitnější záznam byl získán při excitaci 633 nm (případně i při použití excitace 780 nm, kdy však je záznam méně intenzivní). V případě zlatého koloidu je tedy kvalita spekter ovlivněna plasmonovými rezonancemi výrazněji než v případě stříbrných koloidů. Při použití excitace 633 nm se pravděpodobně navíc zapojuje i rezonanční zesílení, což vede k získání nejlepších výsledků.

V případě agregátů stříbrných nanočástic se maximum velmi širokého extinkčního pásu povrchového plasmonu nachází přibližně při 530 nm, což koresponduje s možností

získat reprezentativní spektra při všech použitých excitačních vlnových délkách. Tyto záznamy mají dle použité excitace poněkud odlišný vzhled. Nej kvalitnější spektrum bylo získáno pomocí excitace 532 nm (případ 1), kdy můžeme uvažovat o zapojení plasmonové rezonance v kombinaci se zesílením rezonančním.

Tab. 1 Změny polohy maxim v SERS/SERRS spektrech extraktu violaceinu a RS spektru extraktu violaceinu (*Au koloid* excitace 445 nm). Hodnoty experimentu při 514, 5 a 785 nm a přiřazení pásů dle [68]. Zeleně označená maxima – změna do 10 cm⁻¹, modře označená maxima – změna 10 až 20 cm⁻¹, červeně označená maxima – změna nad 20 cm⁻¹.

Experiment 514,5/785 nm [cm ⁻¹]	zesilující systém	exp. 445 nm	exp. 532 nm	exp. 633 nm	exp. 780 nm	Přiřazení	
882/881	Ag koloid 1	x		867		(v+δ) ^{rg1-5} , δ CNH ^{rg2,3} , γ CCH ^{rg5}	
959/958				949		(v+δ) ^{rg1-5} , δ CCH ^{rg3,4,5} , δ CNH ^{rg3,4} , v C-O	
1141/1139			1135	1130	1123	δ CCH ^{rg3,5} , δ CNH ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3}	
1276/1269			1270			δ CCH ^{rg4,5} , δ CNH ^{rg3,4} , (v+δ) ^{rg3,4}	
1295/1297			1288			(v+δ) ^{rg4,5} , v C-O, δ CCH ^{rg3,4,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
1344/x			1346			δ CCH ^{rg3,4,5} , (v+δ) ^{rg3,4,5}	
x/1414			1390	1387	1378	(v+δ) ^{rg1-5} , δ CCH ^{rg1,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
1427/1427			1539	1538	1534	v C=C, (v+δ) ^{rg2,3} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg2,3}	
1552/1552			1588			(v+δ) ^{rg3,4} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg3,4} , v C=C	
1618/1613			1614			(v+δ) ^{rg1,2} , δ CCH ^{rg1} , δ CNH ^{rg2} , v C=C	
1636/1637			1708			v C=O ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3} , δ CNH ^{rg2,3}	
1730/1730							
1141/1139	Ag koloid 3	1149	1148	1148	x	δ CCH ^{rg3,5} , δ CNH ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3}	
1276/1269			1271	1271		δ CCH ^{rg4,5} , δ CNH ^{rg3,4} , (v+δ) ^{rg3,4}	
1295/1297			1290	1290		(v+δ) ^{rg4,5} , v C-O, δ CCH ^{rg3,4,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
1344/x		1341	1342	1342		δ CCH ^{rg3,4,5} , (v+δ) ^{rg3,4,5}	
x/1414			1388	1388		(v+δ) ^{rg1-5} , δ CCH ^{rg1,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
1427/1427			1540	1540		v C=C, (v+δ) ^{rg2,3} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg2,3}	
1552/1552		1551	1540	1540		(v+δ) ^{rg3,4} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg3,4} , v C=C	
1618/1613		1613	1609	1609		v C=O ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3} , δ CNH ^{rg2,3}	
1730/1730		1700	1700				
808/806	Au koloid		800			γ CCH ^{rg4}	
1141/1139		1132 ^a	1129	1132	1130	δ CCH ^{rg3,5} , δ CNH ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3}	
1276/1269					1266	δ CCH ^{rg4,5} , δ CNH ^{rg3,4} , (v+δ) ^{rg3,4}	
1295/1297					1292	(v+δ) ^{rg4,5} , v C-O, δ CCH ^{rg3,4,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
x/1414		1391 ^a		1380	1371	(v+δ) ^{rg1-5} , δ CCH ^{rg1,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
1427/1427		1442 ^a					
1552/1552		1586 ^a	1539	1532	1518	v C=C, (v+δ) ^{rg2,3} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg2,3}	
1618/1613			1616			(v+δ) ^{rg3,4} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg3,4} , v C=C	
1730/1730		1700			v C=O ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3} , δ CNH ^{rg2,3}		
727/726	Ag agregát				748	δ ^{rg1,2,3} , δ CNH ^{rg3}	
1141/1139			1126 ^a	1122	1144	δ CCH ^{rg3,5} , δ CNH ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3}	
1177/1176			1146 ^a			δ CCH ^{rg1,3,5} , δ COH	
1276/1269			1270 ^a			δ CCH ^{rg4,5} , δ CNH ^{rg3,4} , (v+δ) ^{rg3,4}	
1295/1297			1288 ^a			(v+δ) ^{rg4,5} , v C-O, δ CCH ^{rg3,4,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
1366/1367					1342	δ CCH ^{rg1,5} , δ CNH ^{rg2,3,4} , δ COH	
x/1414			1392 ^a	1379	1388	(v+δ) ^{rg1-5} , δ CCH ^{rg1,5} , δ CNH ^{rg2,3,4}	
1427/1427			1525	1539 ^a	1533	1529	v C=C, (v+δ) ^{rg2,3} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg2,3}
1552/1552			1527 ^b				
1730/1730		1704 ^a			v C=O ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3} , δ CNH ^{rg2,3}		
727/726	Au substrát	x	x	x	746	δ ^{rg1,2,3} , δ CNH ^{rg3}	
1141/1139					1143	δ CCH ^{rg3,5} , δ CNH ^{rg2,3} , (v+δ) ^{rg2,3}	
1366/1367					1339	δ CCH ^{rg1,5} , δ CNH ^{rg2,3,4} , δ COH	
1552/1552					1526	v C=C, (v+δ) ^{rg2,3} , δ CCH ^{rg3,4} , δ CNH ^{rg2,3}	

Popis symbolů: v – valenční vibrace, δ – deformační rovinné vibrace, γ – deformační mimorovinné vibrace, rg – označení kruhu, ^a případ 1, ^b případ 2

5. Závěr

V rámci diplomové práce byl detailně studován bakteriální pigment violacein ve vzorku lyofilizovaných mikroorganismů. K tomuto účelu byly nejprve využity metody infračervené a Ramanovy spektroskopie (s použitím velké škály excitačních vlnových délek). Ze získaných výsledků je zřejmé, že studium pigmentu violaceinu v surovém vzorku lyofilizovaných mikroorganismů, případně odpařeném extraktu violaceinu, pomocí infračervené a klasické Ramanovy spektroskopie není dostačující - pomocí těchto technik se nepodařilo jednoznačně potvrdit přítomnost violaceinu. To zejména proto, že violacein je v takovémto komplexním vzorku obsažen v nízkých koncentracích společně s převládajícím obsahem interferentů z bakteriálního buněčného skeletu. Dalším nežádoucím vlivem je fluorescence těchto látek, která komplikuje vyhodnocení Ramanových spekter.

Jedinou cestou pro jednoznačnou identifikaci violaceinu je tedy použití pokročilejší techniky – povrchem zesílené (rezonanční) Ramanovy spektroskopie, díky které je možné potlačit nežádoucí fluorescenci a zvýšit intenzitu Ramanova rozptylu zkoumaného pigmentu. Měření SERS/SERRS záznamů byla prováděna pomocí několika různých zesilujících systémů (stříbrných koloidů, zlatého koloidu, agregátů stříbrných nanočástic a komerčního zlatého substrátu) s použitím velké škály excitačních vlnových linií. Díky této vysoké variabilitě podmínek měření bylo možné komplexně sledovat chování pigmentu violaceinu v závislosti na použitém zesilujícím médiu a excitační vlnové délce. Na základě získaných výsledků můžeme uvažovat především o zapojení elektromagnetického mechanismu do zesilování intenzity Ramanova rozptylu, ale i o vzniku slabé chemické interakce mezi zkoumaným pigmentem a nanočásticemi kovů, což se projevuje častými změnami poloh maxim některých pásů. Pro přehledné porovnání těchto změn byla vytvořena tab. 1, která zahrnuje také přiřazení jednotlivých pásů. Z tabulky je patrné, že nejvíce spektrálních změn spojených s interakcí vzorku se zesilujícím systémem je možné pozorovat v oblasti valenčních a deformačních módů violaceinového skeletu. Tato skutečnost by mohla naznačovat, že podstata interakce nemá jednoznačně donor-akceptorový charakter a dochází spíše k redistribuci elektronové hustoty v molekule violaceinu, která je pravděpodobně doprovázena i její určitou distorzí. Na druhou stranu v případě excitace 532 nm je možné pozorovat i určité spektrální změny v oblasti charakteristické

pro projevy valenčních vibrací karbonylových skupin, které je možné spojovat s jejich potenciální slabou koordinací na atomy stříbra nebo zlata. Detailnější diskuze je však také znesnadněna nízkou intenzitou těchto pásů v Ramanově spektru. Zmiňované změny a s nimi související různorodost záznamů značně komplikuje pochopení a vysvětlení získaných výsledků. Před širším analytickým využitím SERS/SERRS spektroskopie je tedy nezbytně nutné detailně prostudovat spektrální projevy vzorku v závislosti na způsobu přípravy zesilujících systémů. Pro ilustraci variability získaných záznamů při použití excitace 532 nm viz obr. P14 (Příloha).

Pokud budeme vycházet z dosažených výsledků, můžeme formulovat obecná doporučení pro studium pigmentu violaceinu pomocí metody SERS/SERRS. Při možnosti výběru z různých excitačních vlnových délek je nejvhodnější použít takovou, v rámci které dochází ke kombinaci povrchového a rezonančního zesílení. Pro stříbrné zesilující substráty tedy excitaci 532 nm (případně 633 nm) a pro zlaté zesilující substráty excitaci 633 nm (případně 780 nm) – a to díky posunu maxima extinkce povrchového plasmonu k vyšším vlnovým délkám.

Na základě zkušeností s jednotlivými zesilujícími systémy lze také shrnout jejich vhodnost pro studium pigmentu violaceinu. Při tomto hodnocení je nutné vzít v potaz dva základní úhly pohledu – a to kvalitu získaných výsledků (z hlediska míry zesílení intenzity Ramanova rozptylu, shody se záznamy čisté látky a reprodukovatelnosti) a uživatelskou přívětivost jednotlivých systémů.

Kvalitní a reprodukovatelné výsledky byly získány pomocí systémů *Ag koloid 1*, *Ag koloid 3* a *Au koloid*. Tyto záznamy se ve velké míře přibližují (nejvíce systém *Ag koloid 3*) záznamům čisté látky.

Pomocí systému *Ag agregát* byly získány nejlépe rozlišené záznamy, ale nevýhoda tohoto systému tkví ve značné nehomogenitě substrátu, která způsobuje různorodost získaných výsledků v závislosti na konkrétním místě měření.

Systém komerčního *Au substrátu* poskytuje srovnatelné záznamy jako při použití *Ag agregátu* (pásky jsou pouze méně intenzivní). Výhodou tohoto substrátu je jeho homogenita. Velkou nevýhodou potom dlouhodobá nestabilita (dle doporučení výrobce lze tento systém používat pouze po dobu max. 1 měsíce od data výroby).

Pokud bychom tedy volili zesilující systém pouze na základě kvality získaných výsledků, nejlepším se jeví systém *Ag koloid 3*. Jeho zásadní nevýhodou je ale nutnost

samotný koloidní systém nejprve připravit, což může být v některých případech značně komplikující.

Pokud na systémy budeme pohlížet z hlediska jejich uživatelské přívětivosti, tedy nenáročnosti příprav před samotným měřením, jednoznačně nejsnazší je použití komerčně dostupných zesilujících systémů, které v případě *Ag koloidu 1* poskytují také velmi kvalitní a dobře reprodukovatelné výsledky. Tento systém je tedy dobrou volbou.

K výše zmiňovaným skutečnostem je tedy nutné přihlídnout při výběru zesilujícího systému v závislosti na typu studovaného vzorku.

6. Literatura

- [1] Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J.: Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters* **26**: 2, 163-166 (1974).
- [2] Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P.: Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **84**, 1-20 (1977).
- [3] Albrecht, M. G.; Creighton, J. A.: Anomalously intense Raman-spectra of pyridine at a silver electrode. *Journal of American Chemical Society* **99**: 15, 5212-5217 (1977).
- [4] Stiles, P. L.; Dieringer, J. A.; Shah, N. C.; Van Duyne, R. P.: Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry* **1**, 601-626 (2008).
- [5] Shiohara, A.; Wang, Y.; Liz-Marzán, L. M.: Recent approaches toward creation of hot spots for SERS detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **21**, 2-25 (2014).
- [6] Aroca, R. F.; Alvarez-Puebla R. A.; Pieczonka, N.; Sanchez-Cortez, S.; Garcia-Ramos, J. V.: Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science* **116**, 45 – 61 (2005).
- [7] Kambhampati, P.; Child, C. M.; Foster, M. C. and Campion, A.: On the chemical mechanism of surface enhanced Raman scattering: Experiment and theory. *Journal of Chemical Physics* **108**: 12, 5013-5026 (1998).
- [8] Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; et al.: Charge-transfer theory of surface enhanced Raman spectroscopy: Herzberg-Teller contributions. *Journal of Chemical Physics* **84**: 8, 4174-4180 (1986).
- [9] Van Duyne, R. P., et al., Atomic-force microscopy and surface enhanced Raman spectroscopy 1. Ag island films and Ag film over polymer nanosphere surfaces supported on glass. *Journal of Chemical Physics* **99**, 2101-2115 (1993).
- [10] Ling, X., et al.: Can graphene be used as a substrate for Raman enhancement? *Nano Letters*, **10**:2, 553-561 (2010).
- [11] Qiu, C.; et al.: Investigation of n-layer graphenes as a substrates for Raman enhancement of Crystal Violet. *Journal of Physical Chemistry C* **115**:20, 10019-10025 (2011).
- [12] Anderson, M. S.: Locally enhanced Raman spectroscopy with an atomic force microscope. *Applied Physics Letters* **76**, 3130- 3132(2000).
- [13] Brolo, A. G.; Arctander, E.; Gordon, R.; Leathem, B.; Kavanagh, K. L.: Nanohole-enhanced Raman scattering. *Nano Letters* **4**, 2015-2018 (2004).
- [14] Lin, Y. Y.; Liao, J. D.; Ju, Y. H.; Chang, C. W.; Shiau, A. L.: Focused ion beam-fabricated Au micro/nanostructures used as a surface enhanced Raman scattering-active

substrate for trace detection of molecules and influenza virus. *Nanotechnology* **22**: 18 (2011).

[15] Bahns, J. T.; Imre, A.; Vlasko-Vlasov, V. K.; et al.: Enhanced Raman scattering from focused surface plasmons. *Applied Physics Letters* **91** (2007).

[16] Wells, S. M.; Retterer, S. D.; Oran, J. M.; Sepaniak, M. J.: Controllable Nanofabrication of Aggregate-like Nanoparticle Substrates and Evaluation for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *ACS Nano* **3**:12, 3845–3853 (2009).

[17] Kahl, M.; Voges, E.; Kostrewa, S.; Viets, C.; Hill, W.: Periodically structured metallic substrates for SERS. *Sensors and Actuators B: Chemical* **51**, 285-291 (1998).

[18] Cheng, H. - W.; Huan, S. - Y.; Wu, H. - L.; Shen, G. - L.; Yu, R. - Q.: Surface enhanced Raman spectroscopic detection of a bacteria biomarker using gold nanoparticle immobilized substrates. *Analytical Chemistry* **81**:24, 9902-9912 (2009).

[19] Toderas, F.; Baia, M.; Baia, L.; Astilean, S.: Controlling gold nanoparticle assemblies for efficient surface-enhanced Raman scattering and localized surface plasmon resonance sensors. *Nanotechnology* **18** (2007).

[20] Muniz-Miranda, M.; Pergolese, B.; Bigotto, A.; Giusti, A.: Stable and efficient silver substrates for SERS spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* **314**, 540-544 (2007).

[21] Tian, C. F.; Liu, Z.; Jin, J. H.; et al.: Gold mesoflower arrays with sub-10 nm intraparticle gaps for highly sensitive and repeatable surface enhanced Raman spectroscopy. *Nanotechnology* **23**:16 (2012).

[22] Luo, S. - Ch.; Sivashanmugan, K.; Liao, J. - D.; Yao, Ch. - K.; Peng H. - Ch.: Nanofabricated SERS-active substrates for single-molecule to virus detection in vitro: A review. *Biosensors and Bioelectronics* **61**, 232-240 (2014).

[23] Lee, I.; Han, S. W.; Kim, K.: Simultaneous preparation of SERS-active metal colloids and plates by laser ablation. *Journal of Raman Spectroscopy* **32**, 947-952 (2001).

[24] Ahern, A. A.; Garrel, R. L.; In situ photoreduced silver-nitrate as a substrate for surface-enhanced Raman-spectroscopy. *Analytical Chemistry* **59**, 2813 – 2816 (1987).

[25] Larmour I. A., Faulds K., Graham D.: SERS activity and stability of the most frequently used silver colloids. *Journal of Raman Spectroscopy* **43**, 202 – 206 (2012).

[26] Cermakova, K.; Sestak, O.; Matejka, P.; Baumruk, V.; Vlckova, B.: Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectroscopy with borohydride reduced silver colloids – controlling adsorption of the scattering species by surface potential of silver colloid. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **58**, 2682-2694 (1993).

[27] Shirtcliffe, N.; Nickel, U.; Schneider, S.: Reproducible Preparation of Silver Sols with Small Particle Size Using Borohydride Reduction: For Use as Nuclei for Preparation of Larger Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **211**, 122-129 (1999).

- [28] Lee, P. C.; Meisel, D.: Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry* **86**, 3391-3395 (1982).
- [29] Leopold N., Lendl B. A.: A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride. *Journal of Physical Chemistry* **107**, 5273 – 5277 (2003).
- [30] Yin, Y.; Li, Z.; Zhong, Z.; Gates, B.; Xia, Y.; Venkateswaran, S.: Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *Journal of Materials Chemistry* **12**, 522-527 (2002).
- [31] Panáček, A.; Kvítek, L.; Pucek, R.; et al.: Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *Journal of Physical Chemistry B* **110**, 16248-16253 (2006).
- [32] <<http://www.nicoletcz.cz/niccolloidsilver/>> [cit. 3. 3. 2015]
- [33] RNDr. Kvítek, L., CSc.: Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra. Olomouc, 2008. Habilitační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta.
- [34] Lee, P. C., Meisel, D.: Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry* **86**, 3391-3395 (1982).
- [35] Sanchez-Cortes, S.; Garcia-Ramos, J. V.; Morcillo, G. J.: Morphological study of metal colloids employed as substrate in the SERS spectroscopy. *Journal of Colloid Interface Science* **167**, 428-436 (1994).
- [36] Ashton, L.; Lau, K.; Winder, C. L.; et al.: Raman spectroscopy: lighting up the future of microbial identification. *Future Microbiology* **6**, 991- 997 (2011).
- [37] Pahlow, S.; März, A.; Seise, B.; et al.: Bioanalytical application of surface- and tip-enhanced Raman spectroscopy. *Engineering in Life Sciences* **12**, 131-143 (2012).
- [38] Sengupta, A.; Mujacic, M.; James Davis, E.: Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 1379-1386 (2006).
- [39] Kahraman, M.; Yazici, M. M.; Sahin, F.; Bayrak, O. F.; Topcu, E.; Culha, M.: Towards single-microorganism detection using surface-enhanced Raman spectroscopy. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **87**, 763-770 (2007).
- [40] Clarke, S. J.; Littleford, R. E.; Smith, E.; Goodacre, R.: Rapid monitoring of antibiotics using Raman and surface enhanced Raman spectroscopy. *Analyst* **130**, 1019-1025 (2005).
- [41] Wu, X.; Gao, S.; Wang, J.; Wang, H.; Huang, Y.; Zhao, Y.: The surface-enhanced Raman spectra of aflatoxins: spectral analysis, density functional theory calculation, detection and differentiation. *Analyst* **137**, 4226–4234 (2012).

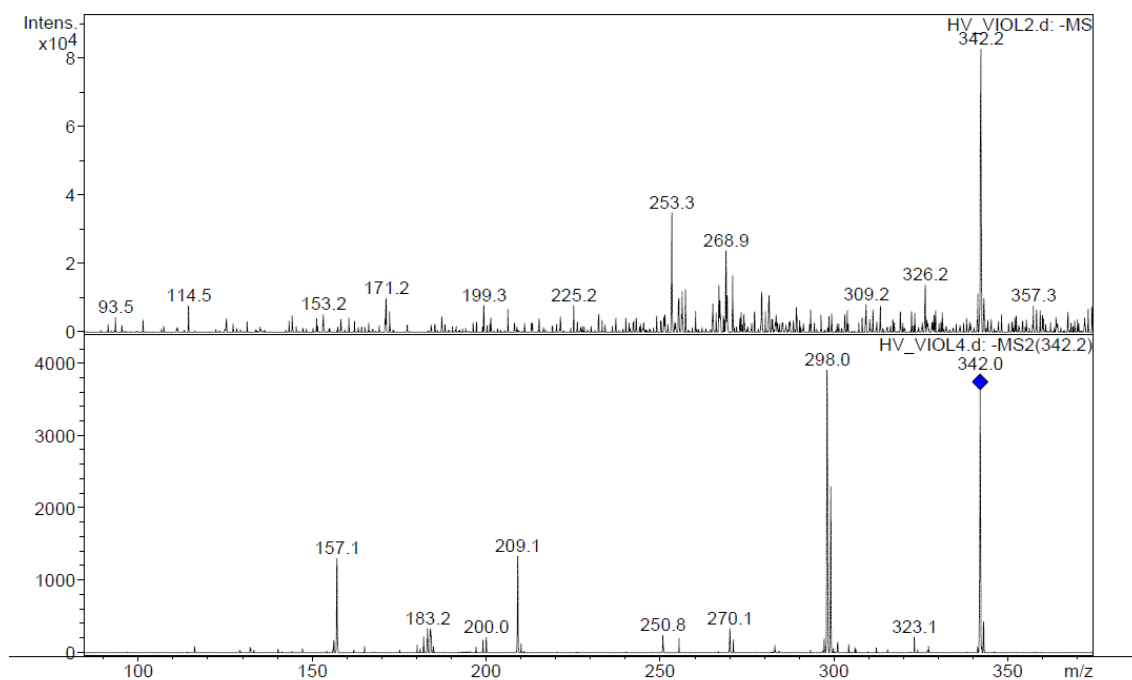
- [42] Galarreta, B. C.; Tabatabaei, M.; Guieu, V.; Peyrin, E.; Lagugne-Labarthe F.: Microfluidic channel with embedded SERS 2D platform for the aptamer detection of ochratoxin A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **405**, 1613–1621 (2013).
- [43] Zhang, X. Y.; Young, M. A.; Lyandres, O.; Van Duyne, R. P.: Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 4484–4489 (2005).
- [44] Carlson, H. K.; Iavarone, A. T.; Coates, J. D.: Surfaceomics and surface-enhanced Raman spectroscopy of environmental microbes: Matching cofactors with redox-active surface proteins. *Proteomics* **13**, 2761-2765 (2013).
- [45] Cui, L.; Chen, S.; Zhang, K.: Effect of toxicity of Ag nanoparticles on SERS spectral variance of bacteria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **137**, 1061-1066 (2015).
- [46] Wheeler, M; Guerrero - Plata, A; Rico, G; et al.: Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity* **68**, 3696 – 3703 (2000).
- [47] Liu, G. Y.; Essex, A; Buchanan, J. T.; et al.: *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 209 – 215 (2005).
- [48] Paolo, W. F. Jr.; Dadachova, E.; Mandal, P.; et al.: Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* (*Exophiala*) dermatitidis on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC Microbiology* **6** (2006).
- [49] van Duin, D.; Casadevall, A; Nosanchuk, J. D.: Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3394 – 3400 (2002).
- [50] Baron, S. S.; Rowe, J. J.: Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **20**, 814 – 820 (1981).
- [51] Chatfield, C. H.; Cianciotto, N. P.: The secreted pyomelanin pigment of *Legionella pneumophila* confers ferric reductase activity. *Infection and Immunity* **75**, 4062 – 4070 (2007).
- [52] Chew, A. G.; Bryant, D. A.: Chlorophyll biosynthesis in bacteria: the origins of structural and functional diversity. *Annual Review of Microbiology* **61**, 113 – 129 (2007).
- [53] Liu, G. Y.; Nizet, V.: Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology* **17**, 406 – 413 (2009).
- [54] Schloss, P. D.; Allen, H. K.; Klimowicz, A. K.; et al.: Psychrotrophic Strain of *Janthinobacterium lividum* from a Cold Alaskan Soil Produces Prodigiosin. *DNA and Cell Biology* **29**, 533-541 (2010).

- [55] Durán, N.; Menck, C. F. M.: Chromobacterium violaceum: A review of pharmacological and industrial perspectives. *Critical Reviews in Microbiology* **27**, 201 – 222 (2001).
- [56] Wei, C.; Weijun, Ch.; Shaofang, S.; et al.: Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. *Journal of Molecular Structure-Theochem* **817**, 1 – 4 (2007).
- [57] Konzen, M.; De Marco, D.; Cordova, C. A. S.; et al.: Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**, 8307 - 8313 (2006).
- [58] de Carvalho, D. D.; Costa, F. T. M.; Duran, N.; et al.: Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicology in vitro* **20**, 1514 - 1521 (2006).
- [59] Ferreira, C. V.; Bos, C. L.; Versteeg, H. H.; et al.: Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* **104**, 1459 – 1464 (2004).
- [60] Saraiva, V. S.; Marshall, J. C.; Cools - Lartigue, J.; et al.: et al. Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Research* **14**, 421–424 (2004).
- [61] Kodach, L. L.; Bos, C. L.; Duran, N.; et al.: Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt - mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **27**, 508–516 (2006).
- [62] Abboud, A. N.; Arment, A.:The Protective Effects of the Violacein Pigment Against UV-C Irradiation in Chromobacterium violaceum. *Ohio Journal of Science* **111**, 28- 32 (2013).
- [63] Duran, M.; Ponezi, A. N.; Faljoni - Alario, A.; et al.: Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Medicinal Chemistry Research* **21**, 1524 - 1532 (2012).
- [64] Antonisamy, P; Ignacimuthu, S.: Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from Chromobacterium violaceum. *Phytomedicine* **17**, 300 – 304 (2010).
- [65] Chidambaram Kulandaisamy, V.; Zainul Akmar, Z.; Wan Azlina, A.: Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry* **48**, 1065-1079 (2013).
- [66] Wan Azlina, A.; Nur Zulaikha, Y.; Nordiana, N.: Production and Characterization of Violacein by Locally Isolated Chromobacterium violaceum Grown in Agricultural Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **167**, 1220 – 1234 (2012).
- [67] Balibar, C. J.; Walsh, Ch. T.: In vitro biosynthesis of violacein from L - tryptophan by the enzymes VioA-E from Chromobacterium violaceum. *Biochemistry* **45**, 15444-15457 (2006).
- [68] Jehlička, J.; Edwards, H. G. M.; Němec, I.; Oren, A.: Raman spectroscopic study of the Chromobacterium violaceum pigment violacein using multiwavelength excitation and DFT calculations. *Spectrochimica Acta Part A* (v tisku).

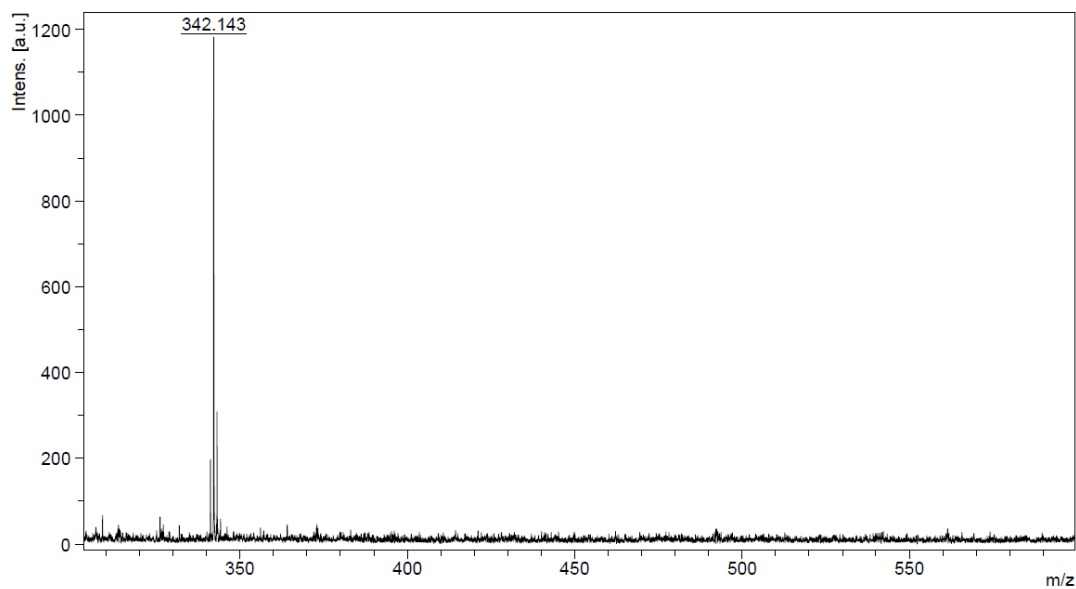
- [69] Edwards, H. G. M.; Hutchinson, I. B.; Ingley, R.; Parnell; et al.: Raman Spectroscopic Analysis of Geological and Biogeological Specimens of Relevance to the ExoMars Mission. *Astrobiology* **13**, 543 – 549 (2013).
- [70] Vandenabeele, P.; Jehlička, J.; Vitek, P.; Edwards, H. G. M.: On the definition of Raman spectroscopic detection limits for the analysis of biomarkers in solid matrices. *Planetary and Space Science* **62**, 48 – 54 (2012).
- [71] Vitek, P.; Jehlička, J.; Edwards, H. G. M.; Hutchinson, I. B.; Carmen Ascaso, C.; Wierchos, J.: The Miniaturized Raman System and Detection of Traces of Life in Halite from the Atacama Desert: Some Considerations for the Search for Life Signatures on Mars. *Astrobiology* **12**, 1095 – 1099 (2012).
- [72] Vitek, P.; Edwards, H. G. M.; Jehlička, J.; Ascaso, C.; de Los Rios, A.; Valea, S.; et al.: Microbial colonization of halite from the hyper - arid Atacama Desert studied by Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **368**, 3205–3221 (2010).
- [73] Villar, S. E. J.; Edwards, H. G. M.; Worland, M. R.: Comparative evaluation of Raman spectroscopy at different wavelengths for extremophile exemplars. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* **35**, 489–506 (2005).
- [74] Edwards, H. G. M.; Hutchinson, I. B.; et al.: The search for signatures of early life on Mars: Raman spectroscopy and the Exomars mission. *Spectroscopy Europe* **23**:1 (2011).
- [75] Jehlička, J.; Oren, A.: Raman spectroscopy in halophile research. *Frontiers in Microbiology* **4**, 1 – 7 (2013).
- [76] Jehlička, J.; Oren, A.: Use of a handheld Raman spectrometer for fast screening of microbial pigments in cultures of halophilic microorganisms and in microbial communities in hypersaline environments in nature. *Journal of Raman Spectroscopy* **44**, 1285–1291 (2013).
- [77] Culka, A.; Jehlička, J.; Vandenabeele, P.; Edwards, H. G. M.: The detection of biomarkers in evaporite matrices using a portable Raman instrument under Alpine conditions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **80**, 8 – 13 (2011).
- [78] Jehlička, J.; Edwards, H. G. M.; Culka, A.: Using portable Raman spectrometers for the identification of organic compounds at low temperatures and high altitudes: exobiological applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **368**, 3109–3125 (2010).
- [79] Vlčková, B.; Matějka, P.; Šimonová, J.; Čermáková, K.: Surface-enhanced resonance Raman-spectra of free-base 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin and its silver complex in systems with silver colloid – direct adsorption in comparison to adsorption via molecular spacer. *Journal of Physical Chemistry* **97**, 9717 – 9729 (1993).

- [80] Omnic 7.4.127, Thermo Nicolet Corporation Madison, WI, USA
- [81] Váňová, H.: Využití mikro – Ramanovy spektroskopie při analýze výtvarných děl. Praha, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- [82] Sutrová, V.; Šloufová, I.; Nevoralová, M.; Vlčková B.: SERS microRaman spectral probing of adsorbate-containing, liquid-overlayered nanosponge Ag aggregates assembled from fractal aggregates. *Journal of Raman Spectroscopy* (2015).
- [83] <<http://oceanoptics.com/product/sers/>> [cit. 10. 11. 2014]
- [84] Hakvåg, S.; Fjærvik, E.; Klinkenberg, G.; Borgos, S. E. F.; Josefsen, K. D.; Ellingsen, T. E.; Zotchev, S. B.: Violacein-Producing *Collimonas* sp. from the Sea Surface Microlayer of Coastal Waters in Trøndelag, Norway. *Marine Drugs* **7**, 576-588 (2009).
- [85] Wan Azlina, A.; Nur Zulaikha, Y.; Nordiana, N.; Zainul, A. Z.; Mohd, F. Z.: Production and Characterization of Violacein by Locally Isolated Chromobacterium violaceum Grown in Agricultural Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **167**, 1220-1234 (2012).
- [86] Socrates, G.: *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3rd ed., Wiley 2001.
- [87] Sánchez-Cortés, S.; García-Ramos, J. V.: Influence of coverage in the surface-enhanced Raman scattering of cytosine and its methyl derivatives on metal colloids: chloride and pH effects. *Surface Science* **473**, 133-142 (2001).
- [88] Rivas, L.; Sanchez-Cortes, S.; Garcia-Ramos, J. V.; Morcillo, G.: Mixed Silver/Gold Colloids: A Study of Their Formation, Morphology, and Surface-Enhanced Raman Activity. *Langmuir* **16**, 9722-9728 (2000).

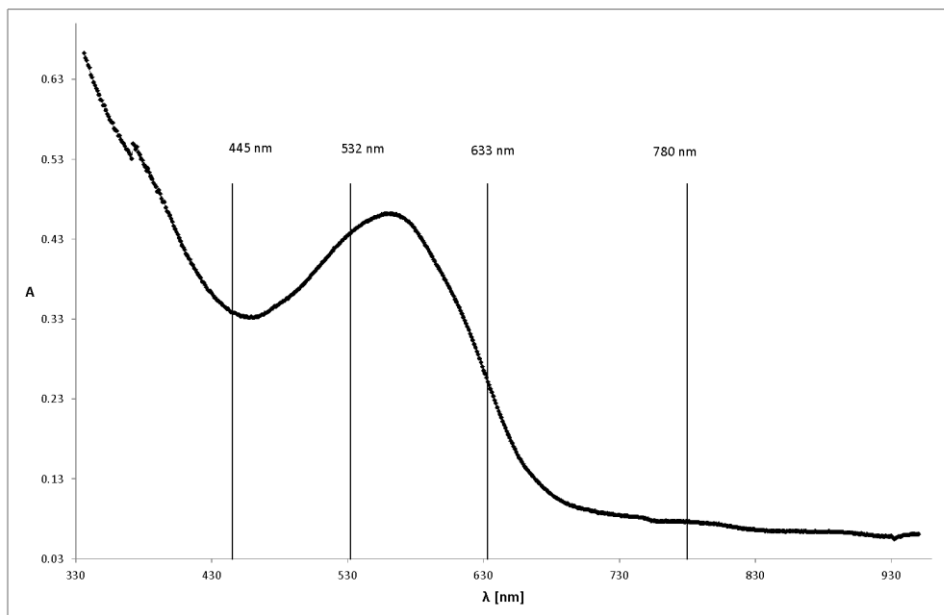
7. Příloha



Obr. P1 Nahoře ESI-MS spektrum vzorku s obsahem violaceinu. Dole ESI-MS/MS spektrum vzorku s obsahem violaceinu – fragmentace molekulárního iontu (m/z 342,0). Oboje negativní mód.

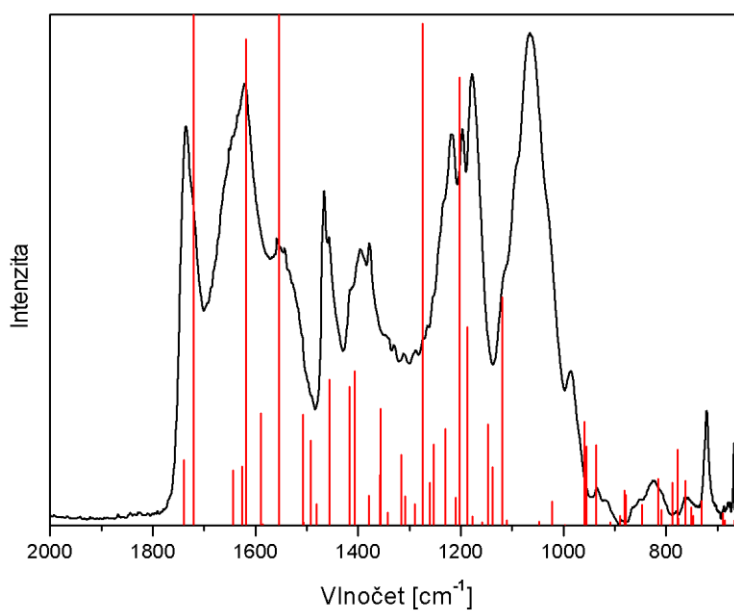


Obr. P2 LDI-MS spektrum vzorku s obsahem violaceinu (negativní mód).

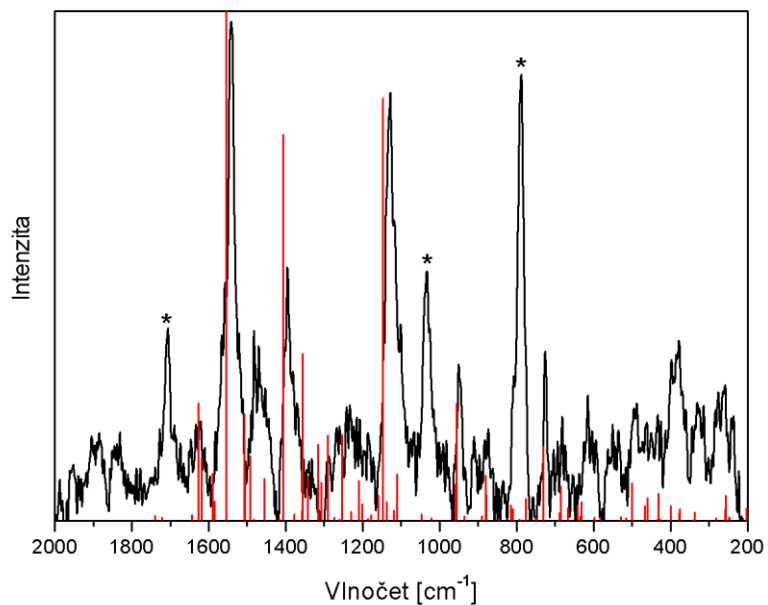


Obr. P3 Absorpční elektronové spektrum extraktu violaceinu ve směsi methanolu a acetonu (1:1) s použitými excitačními liniemi.

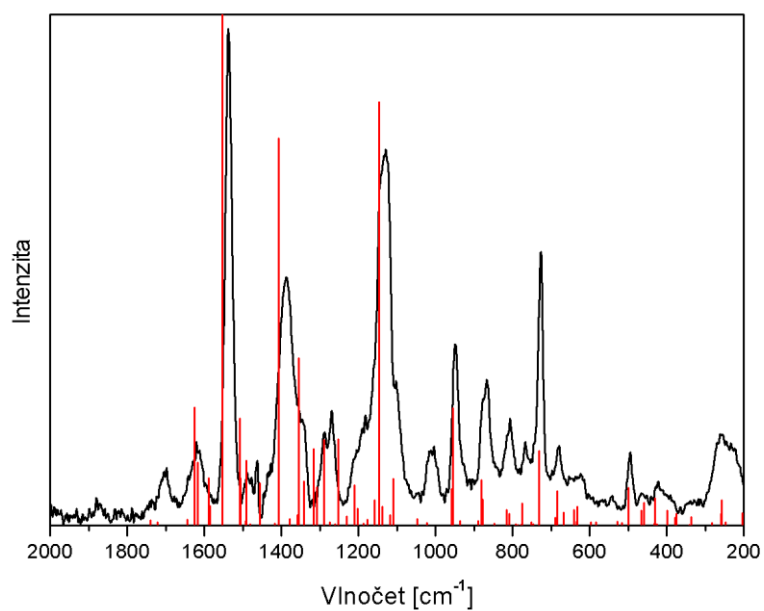
Pozn. Pro details výpočtů použitých v následujících obrázcích (obr. P4 – P13) viz [68].



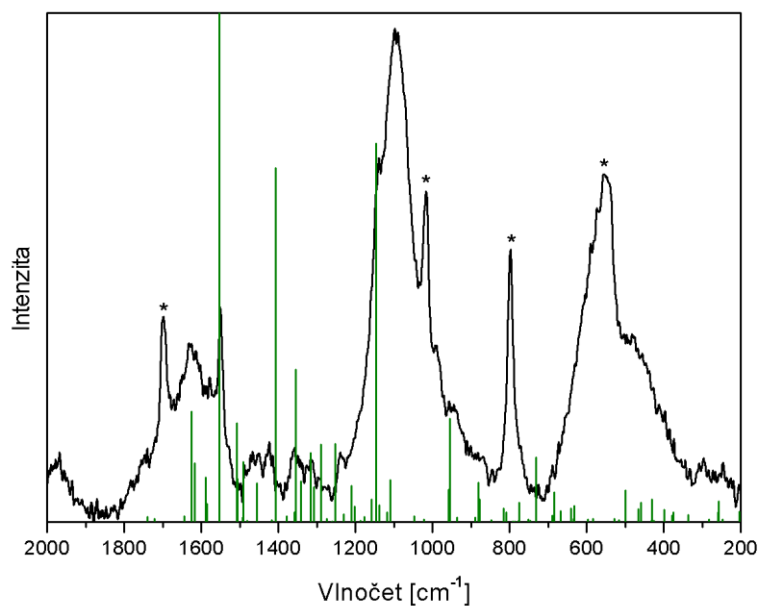
Obr. P4 Porovnání FTIR spektra odpařeného extraktu violaceinu a vypočtených vibračních módů pro molekulu violaceinu. Základní linie FTIR spektra byla upravena.



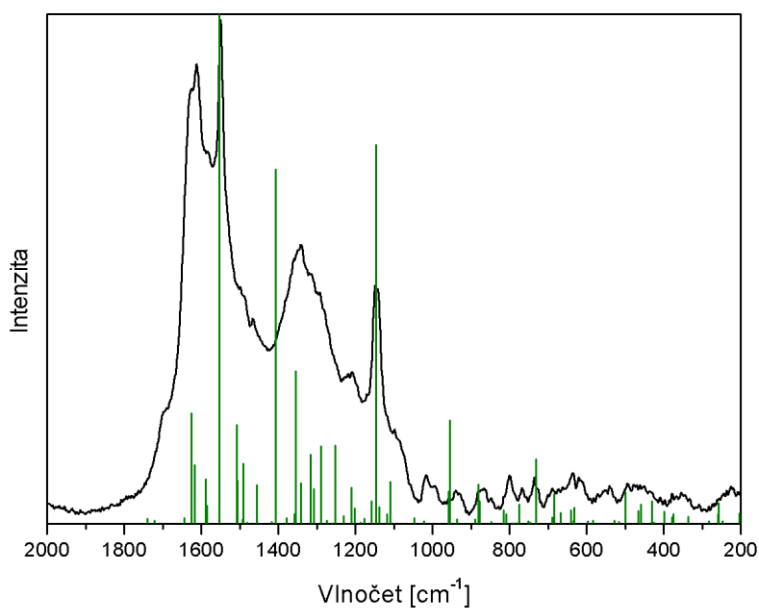
Obr. P5 Porovnání RS spektra extraktu violaceinu (excitace 633 nm) a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 633 nm. Hvězdičky označují pásy rozpouštědla. Základní linie RS spektra byla upravena.



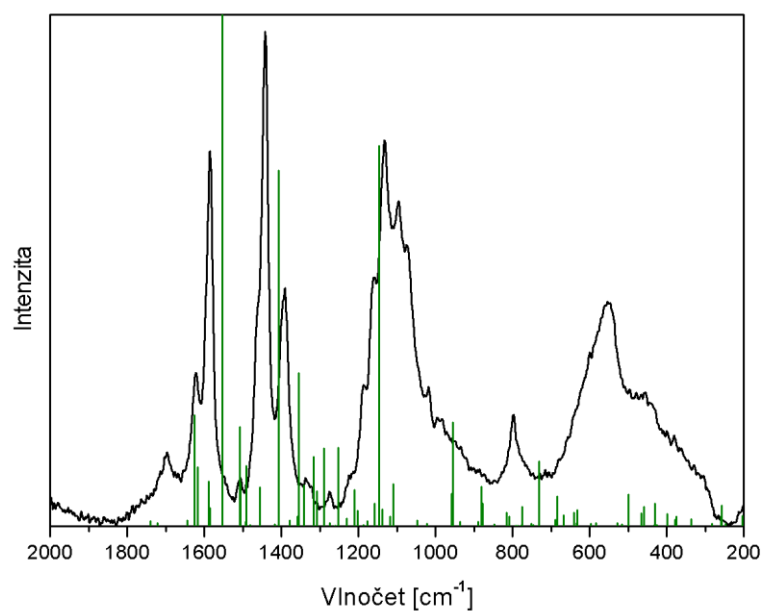
Obr. P6 Porovnání SERRS spektra extraktu violaceinu (excitace 633 nm) – *Ag koloid 1* a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 633 nm. Základní linie SERRS spektra byla upravena.



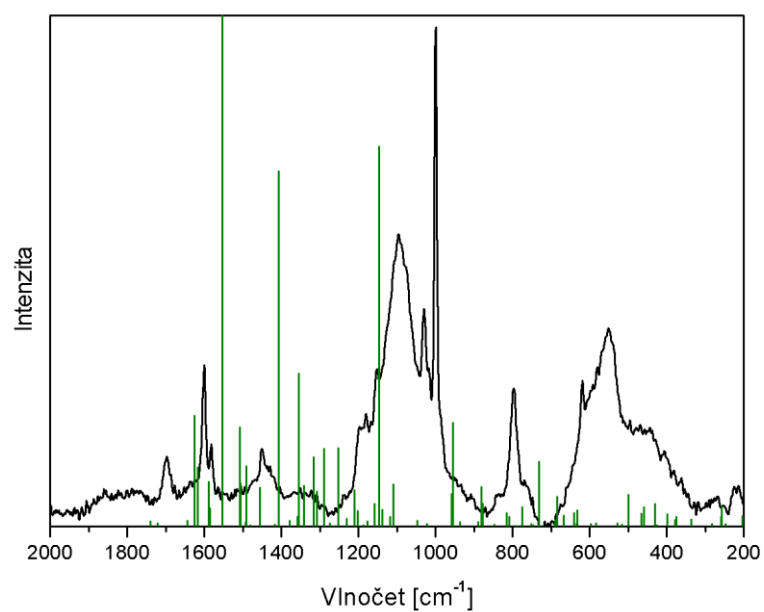
Obr. P7 Porovnání SERS spektra extraktu violaceinu (excitace 445 nm) – *Ag koloid 2* a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 445 nm. Základní linie SERS spektra byla upravena. Hvězdičky označují pásy rozpouštědla.



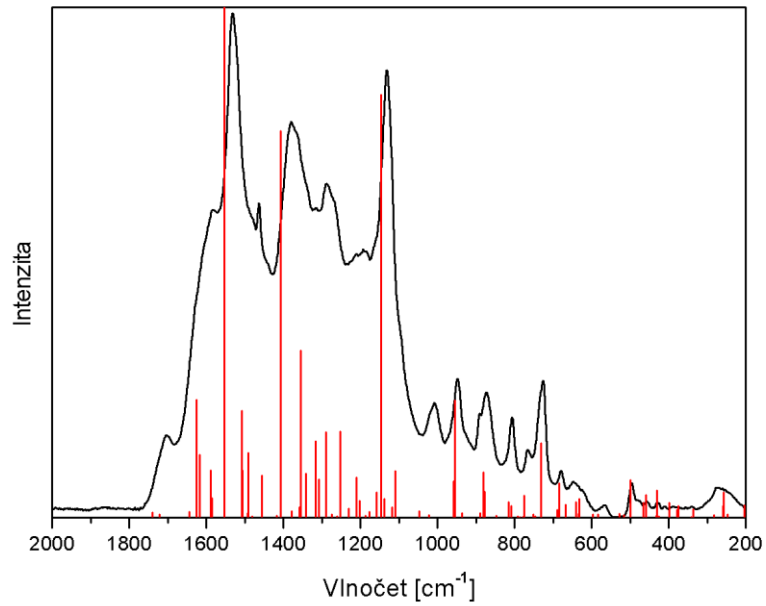
Obr. P8 Porovnání SERS spektra extraktu violaceinu (excitace 445 nm) – *Ag koloid 3* a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 445 nm. Základní linie SERS spektra byla upravena.



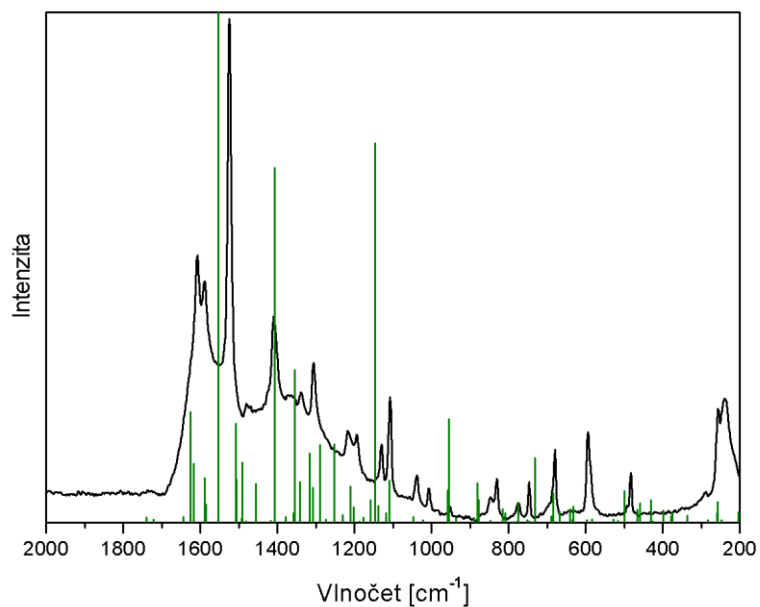
Obr. P9 Porovnání SERS spektra extraktu violaceinu (excitace 445 nm) – *Au koloid případ 1* a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 445 nm. Základní linie SERS spektra byla upravena.



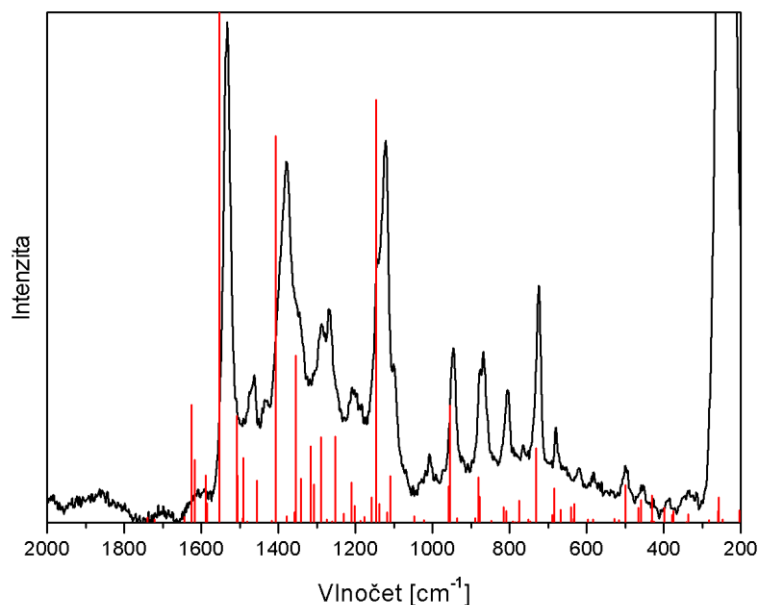
Obr. P10 Porovnání SERS spektra extraktu violaceinu (excitace 445 nm) – *Au koloid případ 2* a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 445 nm. Základní linie SERS spektra byla upravena.



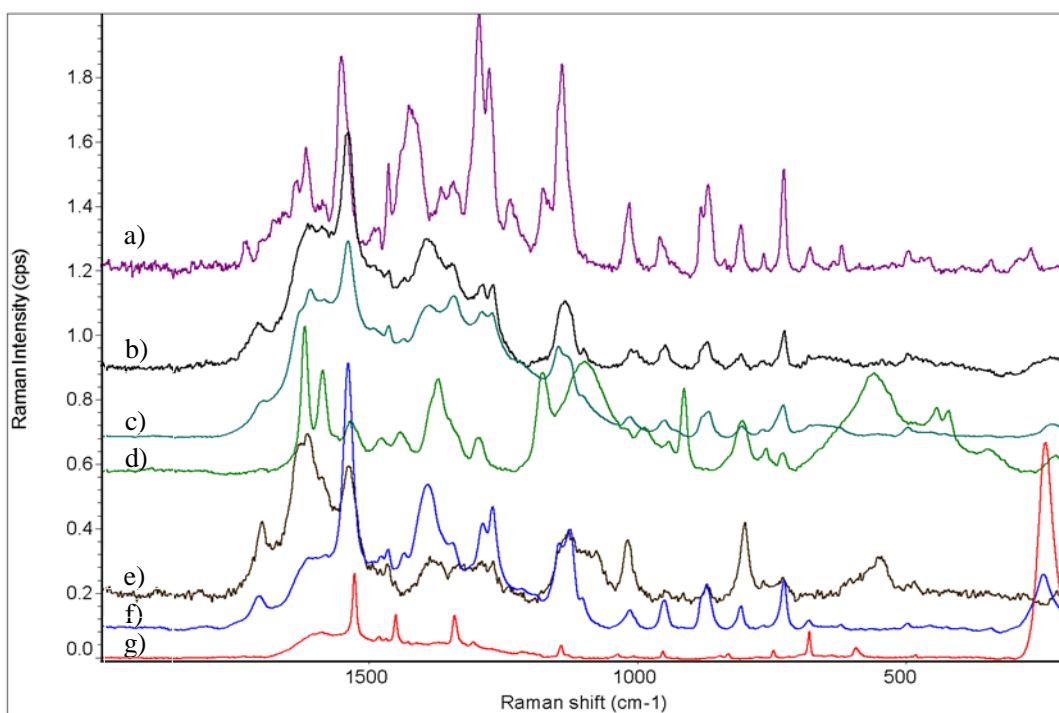
Obr. P11 Porovnání SERRS spektra extraktu violaceinu (excitace 633 nm) – *Au koloid* a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 633 nm. Základní linie SERRS spektra byla upravena.



Obr. P12 Porovnání SERS spektra extraktu violaceinu (excitace 445 nm) – *Ag agregát* a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 445 nm. Základní linie SERS spektra byla upravena.



Obr. P13 Porovnání SERS spektra extraktu violaceinu (excitace 633 nm) – *Ag* agregát a vypočtených vibračních módů molekuly violaceinu pro excitaci 633 nm. Základní linie SERS spektra byla upravena.



Obr. P14 Porovnání Ramanova spektra čistého violaceinu a povrchem zesílených (SERS, SERRS) spekter extraktu violaceinu – různé zesilující substráty (excitace 532 nm) a) čistý violacein b) *Ag* koloid 1 c) *Ag* koloid 3 d) *Ag* koloid 2 e) *Au* koloid f) *Ag* agregát 1 g) *Ag* agregát 2.

Tab. 2 Přiřazení hlavních vibračních pásů extraktu violaceinu získaného z *Chromobacterium violaceum* pro excitační vlnové délky 514, 5 nm a 785 nm (na základě výpočtu) - dle [68].

785 nm [cm ⁻¹]	514, 5 nm [cm ⁻¹]	Přiřazení
1730 w	1730 w	$\nu \text{C}=\text{O}^{\text{rg}2,3}, (\nu+\delta)^{\text{rg}2,3}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3}$
1646 vw	1678 vw	
1637 vw	1636 w	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1,2}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}1}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2}, \nu \text{C}=\text{C}$
1613 vw	1618 w	$(\nu+\delta)^{\text{rg}3,4}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}3,4}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3,4}, \nu \text{C}=\text{C}$
1552 s	1552 s	$\nu \text{C}=\text{C}, (\nu+\delta)^{\text{rg}2,3}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}3,4}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3}$
1481m	1485 w	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1,2}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}1}$
1463 m	1464 m	$(\nu+\delta)^{\text{rg}3,4,5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3,4}$
1427 m	1442 w, sh	
1414 m	1427 m	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1-5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}1,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3,4}$
1367 m	1366 w	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1-5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}1,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3,4}$
1297 m	1344 w	$\delta \text{CCH}^{\text{rg}1,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3,4}, \delta \text{COH}$
1269 w	1295 s	$\delta \text{CCH}^{\text{rg}3,4,5}, (\nu+\delta)^{\text{rg}3,4,5}$
1227 m	1276 s	$(\nu+\delta)^{\text{rg}4,5}, \nu \text{C}-\text{O}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}3,4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3,4}$
1202 w	1238 w	$\delta \text{CCH}^{\text{rg}4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3,4}, (\nu+\delta)^{\text{rg}3,4}$
1176 m	1177 w	$\delta \text{CCH}^{\text{rg}4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}4}, \delta \text{COH}, (\nu+\delta)^{\text{rg}4,5}$
1139 s	1149 s, sh	$\delta \text{CCH}^{\text{rg}1,3}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3}, \delta \text{COH}, (\nu+\delta)^{\text{rg}1,2}$
1123 m, sh	1141 s	$\delta \text{CCH}^{\text{rg}1,3,5}, \delta \text{COH}$
1098 vw		$\delta \text{CCH}^{\text{rg}3,4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}4}$
1082 w		$\delta \text{CCH}^{\text{rg}3,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3}, (\nu+\delta)^{\text{rg}2,3}$
1023 w		$\delta \text{CCH}^{\text{rg}1,3,4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3}, (\nu+\delta)^{\text{rg}4,5}$
958 m	1015 m	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}1}$
947 m	959 w	$(\nu+\delta)^{\text{rg}3,4,5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}3,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3,4}$
881 w, sh	882 w	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1-5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}3,4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3,4}, \nu \text{C}-\text{O}$
869 m	869 m	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1-5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}3,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3}, \nu \text{C}-\text{O}$
840 vw	838 vw	$(\nu+\delta)^{\text{rg}1-5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}2,3}, \gamma \text{CCH}^{\text{rg}5}$
806 m	808 w	$\gamma \text{CCH}^{\text{rg}5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}3}$
766 vw	765 w	$\gamma \text{CCH}^{\text{rg}3}$
726 s	727 m	$\gamma \text{CCH}^{\text{rg}4}$
679 m	678 w	$\delta^{\text{rg}4,5}, \delta \text{CCH}^{\text{rg}4,5}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3}$
633 vw	635 vw	$\delta^{\text{rg}1,2,3}, \delta \text{CNH}^{\text{rg}3}$
620 w	621 w	$\gamma^{\text{rg}3}, \gamma \text{CCH}^{\text{rg}4}$
591vw		$\delta^{\text{rg}3,4,5}$
499 m	497 w	$\delta^{\text{rg}1,2}, \gamma \text{CNH}^{\text{rg}3}$
456 m		$\gamma^{\text{rg}4,5}$
397 m		$\delta^{\text{rg}1,2}, \delta \text{C}=\text{CC}$
294 m		$\delta^{\text{rg}5}, \delta \text{CCC}$
269 m	266 w	$\gamma \text{CNH}^{\text{rg}2,3,4}$
227 w		$\gamma^{\text{rg}1,2,3,4,5}$
124 m		$\gamma^{\text{rg}1,2,3}, \delta \text{C}=\text{CC}$
		$\gamma^{\text{rg}1,2,3}, \gamma \text{CC}=\text{O}^{\text{rg}2}, \gamma \text{CNH}^{\text{rg}2}$

Popis symbolů: w – slabá intenzita, m – střední intenzita, s – silná intenzita, sh – raménko, ν – valenční vibrace, δ – deformační rovinné vibrace, γ - deformační mimorovinné vibrace, rg – označení kruhu