

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Geologie  
Studijní obor: Geologie



**Bc. Julie Novotná**

Ramanova spektrometrie karotenoidů vybraných mikroorganismů  
Raman spectrometry of carotenoids of selected microorganisms

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Prof. RNDr. Jan Jehlička, Dr.  
Konzultant: Mgr. Kateřina Osterrothová, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze, 11.8. 2014

Podpis

## **Poděkování**

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli, prof. Janu Jehličkovi, za vedení, podporu a pochopení. Také jsem mu vděčná za zvolení tématu diplomové práce, jelikož práce na tomto úkolu mi přinesla do života zajímavé zkušenosti. Děkuji celému „astrobiologickému“ týmu: doktorům Adamovi Culkovi a Petrovi Vítkovi a především doktorce Kateřině Osterrothové, za odborné rady a neutuchající pozitivní přístup.

Děkuji doc. Ivanu Němcovi, za umožněná a provedená měření FT Ramanovým spektrometrem. Děkuji prof. Aharonu Orenovi za poskytnutí studijního materiálu a za získání nových zkušeností o práci s mikrobiologickými vzorky na Hebrejské Univerzitě v Jeruzalémě. Mé díky patří i tamním laborantkám Rahel Elevi Barnavid a Lili Mana. Děkuji RNDr. Lindě Nedbalové za obstarání značného množství kultur řas a sinic, za podporu, přátelské jednání a zaučení v mikrobiologické laboratoři. Děkuji Ing. Jiřímu Kopeckému za provedení HPLC/UV-VIS analýzy a pomoci při jejím vyhodnocení. Za pomoc při vyhodnocení chromatogramů děkuji i RNDr. Michalu Koblížkovi.

Děkuji spolužačce, kamarádce Mgr. Lence Hruškové za podporu a motivování při studiu. Můj vděk patří celé mojí rodině za podporu a pomoc během studia.

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá možnostmi identifikace karotenoidů mikrobiálních kolonií pomocí Ramanovy spektroskopie. Cyanobacteria, Proteobacteria, Chlorophyta, Rhodophyta a další jsou kmeny, kterým náleží analyzované skupiny mikroorganismů. Kultivaci organismů v laboratorních podmínkách byla získána biomasa, která se často vyznačovala pestrými barvami. Ramanova spektra byla úspěšně získána měřením lyofilizované biomasy pomocí Ramanova disperzního mikrospektrometru s excitační vlnovou délkou 514,5 nm nebo pomocí FT Ramanova spektrometru (excitace 1064 nm). Získaná data jsou porovnána se spektry pigmentových extraktů. Spektra karotenoidů jsou typická diagnostickými pásy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$ , které jsou projevem C=C a C-C valenčních vibrací a C-CH<sub>3</sub> deformačních vibrací. Ramanova spektrometrie je doplněna kapalinovou chromatografií (HPLC/UV-VIS) extraktů, která umožňuje účinnou separaci jednotlivých pigmentů ze směsí a jejich následnou identifikaci pomocí UV-VIS analyzátoru. Na základě porovnání výsledků z obou metod je zhodnocena úspěšnost Ramanovy analýzy a její možnosti v detekci mikrobiálních karotenoidů. Vedle typických spekter získaných ze vzorků obsahujících  $\beta$  – karoten je zde prezentováno spektrum i méně častých pigmentů, jako je například sarcinaxantin. Ramanova spektra kolonií mikroorganismů akumulujících několik karotenoidů velice podobné struktury je nezbytné interpretovat se zvýšenou opatrností.

Klíčová slova: Ramanova spektrometrie, detekce karotenoidů, pigmenty, mikroorganismy

## **SUMMARY**

In this thesis Raman spectroscopy is evaluated as a tool of identification and discrimination of carotenoids from microbial biomass. Microorganisms, halophilic or nonhalophilic, belong to Cyanobacteria, Proteobacteria, Chlorophyta, Rhodophyta and to others. Biomass was cultivated under laboratory conditions and yielded varied colours. Raman spectra were recorded successfully from lyophilized biomass by excitation wavelength 514.5 nm (dispersive Raman microspectrometer) and 1064 nm (FT Raman spectrometer). Results were compared with Raman spectroscopic data from pigment extracts. Spectra of carotenoids are characterized by the main Raman bands  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  and  $\nu_3$  due to C=C stretching, C-C stretching and C-CH<sub>3</sub> deformation. HPLC/UV-VIS allows effective pigment separation from extracts and detection of separated pigments by UV-VIS analyzer. Assessment of Raman analysis and its potential to detect microbial carotenoids are discussed. Sarcinaxantin is an unusual carotenoid identified together with more common  $\beta$  – carotene. Raman spectroscopic results obtained on carotenoids recorded from colonies which accumulated more than one carotenoid need to be interpreted carefully.

Keywords: Raman spectrometry, detection of carotenoids, pigments, microorganisms

# Obsah

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2 PIGMENTY A JEJICH BIOLOGICKÁ FUNKCE</b> .....	<b>12</b>
2.1 Výskyt pigmentů v rámci kmenů z řad studovaných mikroorganismů .....	16
2.3 Detekce mikrobiálních pigmentů .....	17
<b>3 HALOFILOVÉ A JEJICH PROSTŘEDÍ</b> .....	<b>17</b>
3.1 Extrémně slané prostředí .....	17
3.2 Život ve slaném prostředí .....	18
3.3 Prokaryotní halofilové .....	19
3.4 Eukaryotní halofilové .....	20
<b>4 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE</b> .....	<b>21</b>
4.1 Spektroskopie obecně, vymezení Ramanovy metody .....	21
4.2 Ramanův rozptyl .....	21
4.3 Princip metody .....	22
4.4 Instrumentace a použití .....	23
<b>5 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE</b> .....	<b>25</b>
<b>6 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE MIKROORGANISMŮ A JEJICH PIGMENTŮ</b> .....	<b>25</b>
6.1 Vzhled spektra karotenoidů, rezonanční efekt .....	25
6.2 Analýza pigmentů halofilních kolonií .....	27
6.3 Analýza pigmentů nehalofilů .....	29
<b>7 PŘEHLED A TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ STUDOVANÝCH MIKROORGANISMŮ</b> .....	<b>31</b>
<b>8 METODIKA</b> .....	<b>34</b>
8.1 Kultivace mikroorganismů .....	<b>34</b>
8.1.1 Kultivace halofilů, příprava kultivačního média SL-11 .....	34
8.1.2 Kultivace nehalofilů .....	36
8.2 Příprava vzorků pro Ramanovskou a HPLC analýzu .....	36
8.3 Instrumentace a podmínky měření Ramanovské analýzy .....	37
8.3.1 měření za použití vlnové délky 514,5 nm .....	38
8.3.2 měření za použití vlnové délky 785 nm .....	38

8.3.3 měření za použití vlnové délky 1064 nm .....	38
8.4 Instrumentace a podmínky měření HPLC/UV-VIS analýzy .....	39
<b>9 VÝSLEDKY</b> .....	<b>39</b>
9.2 HPLC/UV-VIS analýza .....	59
<b>10 DISKUZE</b> .....	<b>61</b>
<b>11 ZÁVĚR</b> .....	<b>67</b>
<b>12 POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>68</b>

## Seznam obrázků

Obr. 1 Fylogenetický strom života podle Woes a kol. (1990). Zařazení všech buněčných životních forem na Zemi do tří domén: Bacteria, Archaea, Eucarya podle typu jejich rRNA. Toto rozdělení na molekulární úrovni odráží evoluci životních forem.

Obr. 2 Bakteriochlorofyl a.

Obr. 3 Fykocyanin.

Obr. 4  $\beta$ -karoten.

Obr. 5 Lutein.

Obr. 6 Rayleighova a Ramanovy linie. Červenou čarou je znázorněn 1. excitovaný stav.  $\nu_0, \nu_1, \nu_2$  jsou vibrační kvantová čísla.

Obr. 7 Schéma instrumentace Ramanovského mikrospektrometru (Tsai a kol., 2014). Laserový paprsek (modře) postupuje od zdroje směrem ke vzorku, CCD detektor zaznamenává Ramanův rozptyl.

Obr. 8 Kultivace v laboratoři. Fotografie zobrazuje barevnost napěstovaných kultur.

Obr. 9 Ramanovská spektra halofilních Archea – řád Halobacteriales. A *Haloarcula vallismortis*, B *Halorubrum sodomense*, C *Halobacterium* NRC1, D *Halobacterium* R1. Všechna spektra byla nahrána při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 1% (0,245 mW) a expirační době 10s po 10 akumulací. Vzorky byly obdrženy a měřeny ve formě lyofilizované buněčné pelety.

Obr. 10 Srovnání ramanovských spekter lyofilizované biomasy mikroorganismu *Haloarcula vallismortis* (černě) a pigmentového extraktu z této biomasy (červeně). Podmínky měření extraktů byly stejné jako měření lyofilizované biomasy halofilních archea (viz výše).

Obr. 11 Ramanovská spektra vybraných Cyanobacterií (sinic), řádu Synechococcales. A *Chamaesiphon polymorphus*, B *Chroococcus* sp. „zelený“, C *Chroococcus* sp. pozn.: červený. Excitační vlnová délka laseru FT Ramanova spektrometru je 1064 nm. Vzorky A, B byly pořízeny při síle laseru 0,7 W, spektrum C bylo pořízeno při síle 0,5 W. Počet akumulací 512.

Obr. 12 Ramanovské spektrum halofilní Cyanobacteria –*Oscillatoria limnetica*. Spektrum bylo nahráno při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 1% (0,245 mW) a expirační době 10s po 10 akumulací. Vzorek byl měřen ve formě lyofilizované buněčné pelety.

Obr. 13 Ramanovská spektra Cyanobacterií řádu Oscillatoriales. A *Oscillatoria sancta*, B *Phormidium* cf. *Subfuscum*. Excitační vlnová délka laseru 1064 nm. Spektrum A bylo pořízeno při síle laseru 0,3 W, B při síle 0,7 W.

Obr. 14 Ramanovská spektra bakteriálních kmenů – Proteobacteria, Bacteroidetes. A *Rhodospirillum rubrum*, B halofilní *Ectothiorhodospira marismortui*, C halofilní *Salinibacter* M31. Lyofilizované vzorky byly měřeny při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 1% (0,245 mW) a expirační



době 10s po 10 akumulací. Spektrum oblasti 1900 – 3200 nebylo pro bakterii *Ectothiorhodospira marismortui* pořízeno.

Obr. 15 Spektrum halotolerantní Actinobacterie *Micrococcus luteus*. Excitační vlnová délka laseru FT Ramanova spektrometru je 1064 nm. Spektrum bylo pořízeno při síle laseru 0,7 W a počet akumulací skenů 215.

Obr. 16 Ramanovské spektrum pigmentového extraktu z bakteriální biomasy *Micrococcus luteus*. Excitační vlnová délka měření – 514,5 nm, expirační doba 10s, akumulace 10x, síla laseru 1%.

Obr. 17 Ramanovská spektra mikroorganismů kmenu Ochrophyta. A *Diadlesmis gallica*, B *Botrydiopsis aplina*. Lyofilizované vzorky byly měřeny při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 0,5% (0,123 mW) a expirační době 5s po 10 akumulací.

Obr. 18 Ramanovská spektra A lyofilizované biomasy (černě), B pigmentového extraktu (červeně) mikroorganismu *Diadlesmis gallica*. Měření obou vzorků probíhalo při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 0,5% (0,123 mW) a expirační době 5s po 10 akumulací.

Obr. 19 Ramanovská spektra červených řas (kmen Rhodophyta). A *Balbiania investiens*, B *Porphyridium cruentum*. Spektra A, B byla pořízena při síle laseru 0,7 W.

Obr. 20 Ramanovské spektrum pigmentového extraktu z lyofilizované biomasy červené řasy *Balbiania investiens*. Excitační vlnová délka měření – 514,5 nm, expirační doba 10s, akumulace 10x, síla laseru 0,245 mW.

Obr. 21 Ramanovská spektra zelených řas (kmen Chlorophyta). A halofilní *Dunaliella parva*, B *Haematococcus pluvialis*. Excitační vlnová délka měření – 514,5 nm při síle laseru 0,245 mW, expirační doba 10s, akumulace 10x.

Obr. 22 Ramanovské spektrum lyofilizované biomasy zelené řasy *Haematococcus pluvialis* v rozsahu vlnočtu 1900 – 3200 cm<sup>-1</sup>.

Obr. 23 *Haematococcus pluvialis*.

Obr. 24 Chromatogram vzorku *Chamaesiphon polymorphus*.

Obr. 25 UV-VIS absorpční spektra *Chamaesiphon polymorphus*. RT je označení retenčního času, hodnota udána v minutách. UV-VIS spektra ukazují tvary peaků, která jsou typická pro daný pigment nebo skupinu, k níž náleží.

## Seznam tabulek

Tab. 1 Taxonomická hierarchie dle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Tab. 2 Taxonomická hierarchie dle algaebase.org.

Tab. 3 Kultivační podmínky jednotlivých mikroorganismů. Šedá pole značí kultury, jež byly kultivovány v laboratoři katedry ekologie, Viničná 7, Praha 2. Ostatní nebylo možné, nebo nebylo potřeba kultivovat.

Tab. 4 Hlavní diagnostické pásy halofilních Archaea, řádu Halobacteriales.

Tab. 5 Hlavní diagnostické pásy spekter extrahovaných pigmentů z lyofilizované biomasy halofilních Archaea.

Tab. 6 Spektrální pásy Cyanobacterií třídy Synechococcales.

Tab. 7 Spektrální pásy Cyanobacterií třídy Oscillatoriales.

Tab. 8 Hlavní Ramanovské pásy získané z lyofilizované biomasy kmenů Proteobacteria a Bacteroidetes.

Tab. 9 Hlavní diagnostické pásy bakterie *Micrococcus luteus*. Vlevo – lyofilizovaná biomasa, vpravo – pigmentový extrakt.

Tab. 10 Hlavní diagnostické pásy hnědých řas (Ochrophyta).

Tab. 11 Hlavní Ramanovské pásy mikroorganismu *Diadlesmis gallica*. Vlevo – lyofilizovaná biomasa, vpravo – pigmentový extrakt.

Tab. 12 Hlavní diagnostické pásy červených řas (Rhodophyta).

Tab. 13 Hlavní diagnostické pásy červené řasy *Balbiania investiens*. Vlevo – lyofilizovaná biomasa, vpravo – pigmentový extrakt.

Tab. 14 Hlavní diagnostické pásy zelených řas.

Tab. 15 Seznam pigmentů (pravý sloupec) zjištěných při HPLC analýze vybraných prokaryotních mikroorganismů (levý sloupec).

Tab. 16 Seznam pigmentů (pravý sloupec) zjištěných při HPLC analýze vybraných eukaryotních mikroorganismů (levý sloupec).

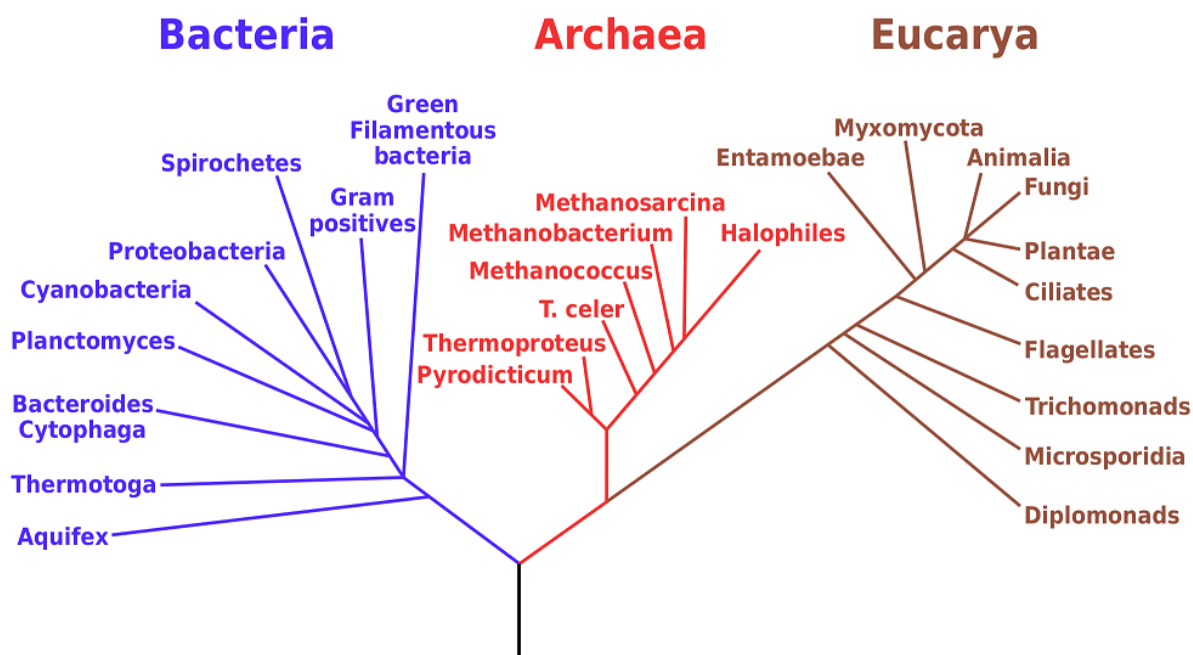
### **Seznam použitých zkratk:**

Bchl (bakteriochlorofyl), chl (chlorofyl), el.magn. (elektromagnetické záření), RT (Retention Time, retenční čas), vs (very strong, velmi silná, pozn.: velmi silná intenzita ramanovského pásu), s (strong, silná), m (medium, střední), w (weak, slabá), vw (very strong, velmi silná), br (broad, široký pás), sh (shoulder, raménko),  $\nu$  (valenční),  $\delta$  (deformační), FT (Fourierova Transformace), HPLC (High Performace Liquid Chromatography, Vysokoúčinná kapalinová chromatografie), TLC (Thin Layer Chromatography, Tenkovrstvá chromatografie) UV-VIS (UltraViolet Visible spectrophotometry)

## 1 ÚVOD

Na planetě Zemi existují různé ekosystémy, které jsou domovem rozličných forem života. Stále nalézáme nové druhy organismů, které následně systematicky zařazujeme. Vědci se snaží odkrýt tajemství původu a vývoje života na Zemi, a proto se musí zaměřit i na ostatní planety uvnitř sluneční soustavy i mimo ni. Rovněž se snaží najít mimozemská místa v naší sluneční soustavě, která by mohla hostit život či v minulosti byla nějakými životními formami obývána. Tímto se zabývá astrobiologická vědecká disciplína neboli exobiologie. Dosavadní poznání vesmíru směřuje k tomu, že na povrchu či pod povrchem sousední planety Mars by mohl existovat život takový, jaký ho známe na Zemi, popřípadě že takový život na Marsu existoval v minulosti. Existence vody ve formě ledu již byla na planetě Mars prokázána (Zarnecki, 2004). Ve vodním médiu se odehrávají veškeré biochemické reakce, voda je pro existenci života, jak ho známe, esenciální. Co je esencí životní formy, díky které se liší od neživých? Vědeckých definic živé formy je celá řada. Jednou z nejužívanějších je definice, která hodnotí jako živé – samostatné chemické systémy schopné Darwinovy evoluce.

Klíčové informace pro exobiologii poskytuje výzkum o podmínkách vzniku života na Zemi a počátcích jeho vývoje. Stromatolity staré 3,5 mld let nalezené v Australii, se zdají být formovány fosilními prokaryotními mikroorganismy – Archaea. Je to pravděpodobně nejstarší nalezený důkaz života na Zemi. Jednoduché životní formy, nalézáme ve třech doménách života, hlavních větví tzv. stromu života (viz obrázek 1). Mikroorganismy díky své vysoké adaptabilitě jsou na Zemi skutečně všudypřítomné. Prospívají i v „nehostinných“ podmínkách, které jsou podobné těm na Marsu či jiných vesmírných tělesech. Astrobiologie tím dává podnět pro zkoumání prostředí na Zemi pro životní formy zdánlivě nepříznivé. Taková prostředí nazýváme extrémní. Tento termín určuje prostředí pro člověka, zvěř a vyšší rostliny neobyvatelné, tedy pro většinu eukaryotů (Seckbach a kol., 2008). Výzkum v extrémních oblastech tzv. marsovských analogů, se zabývá přítomnými jednoduchými formami života či organickými stopami biologického původu, které tam zanechaly. Jak tyto formy v okolí rozpoznat či detekovat jejich fosilní pozůstatky v hornině patří mezi hlavní astrobiologická témata. Pokud je nebo byl život na exoplanetách, jak ho poznáme? Jsme schopni ho zaznamenat? Ramanův spektrometr by měl být součástí vybavení plánované mise ExoMars (r. 2018). Jejím úkolem bude hledání životních forem, či jejich pozůstatků na povrchu Rudé planety. Z toho důvodu v současné době mnohá vědecká pracoviště zkoumají možnosti detekce klíčových sloučenin organického původu, zvaných biomarkery, pomocí Ramanovy spektroskopie. Za biomarkery považujeme v rámci exobiologie takové látky, které jsou, nebo by mohly být důkazem existence životních forem v prostředí a to existujících současně či v minulosti. Takové sloučeniny by mohly být právě karotenoidy.



**Obr. 1** **Fylogenetický strom života podle Woes a kol. (1990).** Zařazení všech buněčných životních forem na Zemi do tří domén: Bacteria, Archaea, Eucarya podle typu jejich rRNA. Toto rozdělení na molekulární úrovni odráží evoluci životních forem.

Tato práce se zabývá detekcí mikroorganických pigmentů a rozpoznáním těchto biomarkerů pomocí laboratorního Ramanova mikrospektrometru. Profesor Jan Jehlička (Ústav geochemie, mineralogie a nerostných zdrojů, Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy v Praze), profesor Aharon Oren (Department of Plant and Environmental Science, The Hebrew University of Jerusalem, Israel) a Linda Nedbalová (Katedra ekologie, Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy v Praze) vybrali pro výzkum druhy mikroorganismů produkujících rozličné pigmenty. Panem Ing Jiřím Kopecským (Laboratoř řasových biotechnologií, Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky) byla umožněna měření doplňkovou metodou Vysokoučinné kapalinové chromatografie, která je nejvhodnější metodou pro identifikaci složek pigmentových směsí. Vybrané organismy zahrnují i skupinu halofilních extrémofilů, zástupců obyvatel prostředí extrémních podmínek, které představuje jeden z marsovských analogů. O tomto prostředí je pojednáváno v rešerši. Pro rozlišení ostatních zkoumaných organismů oproti těm halofilním, bývají tyto v textu označovány jako „nehalofilní“.

Úkolem této diplomové práce je posouzení schopnosti Ramanovy spektroskopie detekovat karotenoidy mikrobiálních kolonií, obývajících běžné i extrémní prostředí, uvážit její možnosti a limity.

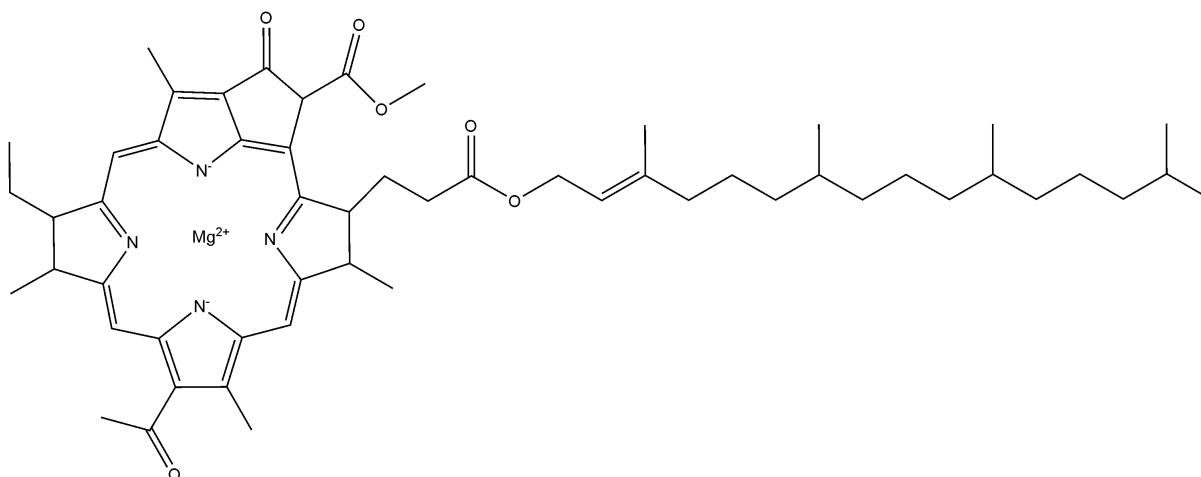
## 2 PIGMENTY A JEJICH BIOLOGICKÁ FUNKCE

Pigmenty jsou barevné chemické látky organického či anorganického původu. Organické molekuly způsobují barevnost tkání selektivní absorpcí světla. Nás zajímají právě tyto metabolity, kterými jsou

především karotenoidy, fykobilíny a chlorofyly. Jsou to fotosyntetické pigmenty, tzn., že jejich fyziologické funkce jsou: fotochemická přeměna energie v reakčním centru, zachycení fotonu a přenos energie (excitovaného elektronu) systémem světlo-sběrných antén do reakčního centra a ochrana fotosyntetického aparátu. Protekce je zapotřebí při vystavení vysokému stupni ozáření. Je-li rychlost produkce primární fotochemické reakce rychlejší než odebrání a zpracovávání jejích produktů reakčním centrem, dochází v buňce k nežádoucím reakcím. K eliminaci excitace dochází ve světlo-sběrných anténách pravděpodobně zhášecí schopností xantofylů. Karotenoidy odráží degradační účinky kyslíku, jelikož jiná barviva v určitém excitačním stavu s kyslíkem reagují (Šetlík a kol., 1998).

Fotosyntetické pigmenty jsou buď kruhové nebo otevřené (tetra)pyroly či isoprenoidy, neboli (bakterio)chlorofyly, fykobilíny či karotenoidy. Ukázky struktur vybraných pigmentů jsou umístěny v textu jako obrázky 2 – 6.

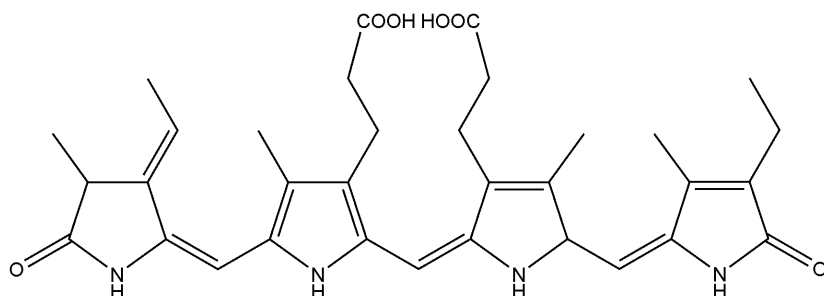
Chlorofyly řadíme mezi porfyríny. Chemickou strukturou jsou to tetrapyrolové kruhy s centrálně vázaným dvojmocným kationtem hořčíku, na něž je vázán fytol (lineární isoprenoidní řetězec). Díky fytolu se molekula stává nepolární. Chlorofyl a, b, c, d, e, f a bakteriochlorofyly a, b, c, d, e, g se od sebe liší počtem dvojných vazeb tetrapyrolového kruhu, substituenty na něj navázanými či přítomností fytolu. Absorbují modré a červené oblasti spektra a tak je vidíme jako zelené. Jejich absorpční maxima jsou ovlivněna i výslednou strukturou pigment-proteinových komplexů, které zaujímají v buňce, kde se chlorofyly vážou fytolovým řetězcem s proteiny v světlo-sběrné antény. Chlorofyl a tvoří fotochemická reakční centra (Šetlík a kol., 1998). Chlorofyl je u fotosyntetizujících anoxygenních prokaryotů zastoupen bakteriochlorofylem a či b (Oren, 2002).



**Obr. 2 Bakteriochlorofyl a.**

Fykobilíny mají lineární tetrapyrolovou strukturu (viz obr. 2.). Tvoří proteinové komplexy na povrchu membrány tylakoidů, přes kterou dodávají zachycenou energii do reakčního centra fotosystému. Tyto chromoproteiny tvoří různé útvary zvané fykobilisomy. Buňce slouží jako světlo-sběrné antény, které umožňují fotosyntézu i v podmínkách slabšího světla kombinací více různých pigmentů je

fotosyntetický organismus schopen využít energii světla z širší škály vlnových délek. Značný rozsah absorpčních maxim je dán rozmanitostí bílkovinné složky ve fykobiliproteinech (Šetlík a kol., 1998). Fykobilín je označení pro tu část fykobiliproteinu, která je odpovědná za barevnost, tj. chromator (Hoek a kol., 1995).



**Obr. 3 Fykocyanin.**

Karotenoidy z chemického hlediska rozdělujeme do dvou hlavních skupin:

uhlovodíkové karoteny a jejich kyslíkaté formy, xantofyly. Jsou to izoprenové sloučeniny, nejběžnější tetra-terpeny ( $C_{40}H_{60}$ ) nebo tetra-terpenoidy (pozn.: používá se označení C40) Izopren, sumární vzorec -  $C_5H_8$ , systematický název - 2-methyl-buta-1,3-dien, je konjugovaný polyen, který tvoří řadu biologicky důležitých molekul. Isoprenoidní struktury nalézáme ve všech buněčných typech (Kodíček).

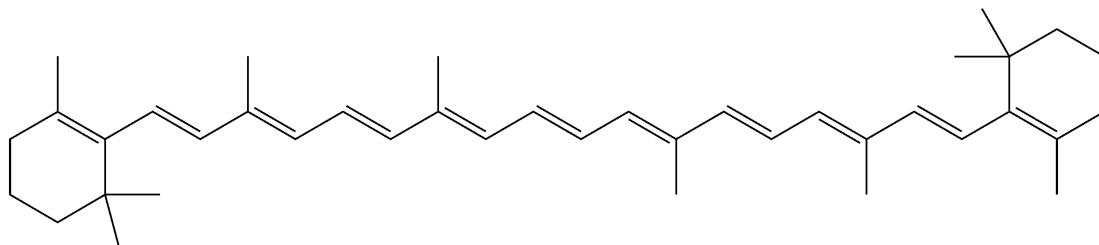
Konjugovaný buta-1,3-dien má jednoduchou C2-C3 vazbu (148 pm), která je o 5 pm kratší než analogická vazba (153 pm) butanu. Tato jednoduchá vazba obklopená dvojnými vazbami, získává částečně charakter dvojných vazeb, je kratší a pevnější, elektrony  $\pi$  jsou v molekulových orbitalech buta-1,3-dienů delokalizovány. Delokalizace elektronů snižuje celkovou energii molekuly a vede tak k její vyšší stabilitě (McMurry, 2004).

Nejjednodušším karotenem je acyklický uhlovodík - lykopen ( $C_{40}H_{56}$ ). Dalším C40 karotenem je např.  $\beta$ -karoten, který je důležitým provitaminem, tzn., že je prekurzorem vitamínu A v buňce.  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ -karoteny jsou odvozeny od lykopenu a mají stejný sumární vzorec  $C_{40}H_{56}$ . Alifatický řetězec karotenoidů bývá zakončen jedním či dvěma cykly, nejčastěji alicyklickými šestičlennými. Vyskytují se i benzenová jádra. B-karoten (viz obr. 4) je dicyklický karoten se symetrickými terminálními cykly,  $\alpha$ -karoten je takto nesymetrický (Kodíček).

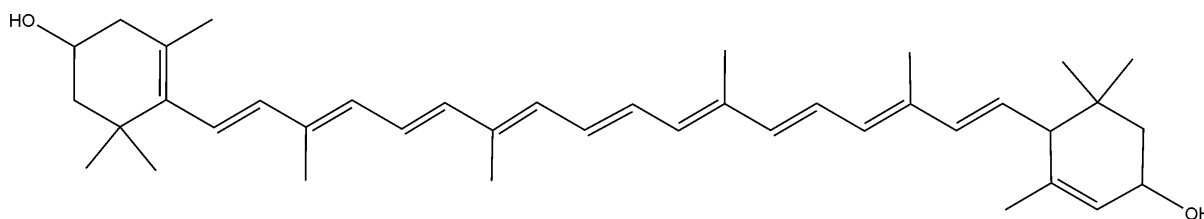
Kromě C40 struktur mikroorganismy akumulují také C30, C45 či C50 karotenoidy, především Archaea a Bacteria. Častým C50 karotenoidem je bakterioruberin, majoritní pigment halofilních Archaea (Oren, 2002).

Xantofyly obsahují kyslíkaté funkční skupiny, jako epoxidy, methoxyly, hydroxyly, aldehydy, karboxyly a oxoskupiny. Typickými xantofyly zelených řas jsou lutein – na obrázku 5 a zeaxantin. Jsou to deriváty  $\alpha$  a  $\beta$ -karotenu s dvěma hydroxylovými skupinami. Astaxantin, derivát  $\beta$ -karotenu obsahuje hydroxylové a keto skupiny. Diadinoxantin má 1 trojnou vazbu v izoprenovém řetězci. Zeaxantin v metabolických pochodech přechází ve violaxantin (Kodíček). Dalšími, možná méně známými jsou např. anteraxantin či C50 sarcinaxantin. Xantofyly jsou významná světlosběrná barviva

a regulátory excitace směřující z antény do reakčního centra fotosyntézy. Početné xantofyly u řas zastupují chlorofyl b. Fukoxantin a neoxantin se dvěma za sebou jdoucími dvojnými vazbami či diadinoxantin s trojnou vazbou v blízkosti terminálního kruhu (Kodíček). Zvláštní karotenoidy prokaryotních organismů jako spiriloxantin, rodovibrin či anhydrorodovibrin náleží rodinám *Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae* či *Ectothiorhodospirillaceae* (Oren, 2011a).



**Obr. 4  $\beta$ -karoten.**



**Obr. 5 Lutein.**

Karotenoidy se vyskytují hojně v živých organismech. V některých zvířatech, houbách, bakteriích, rostlinách i ve všech dalších fotosyntetizujících organismech. Biosyntéza karotenoidů probíhá jen v mikroorganismech a rostlinách, živočichové je přijímají z potravy. Řada z nich se fotosyntézy přímo účastní, nebo slouží jako zásobní látky (provitamin A). Primární karotenoidy jsou lokalizovány v chloroplastech a jsou pro fotosyntézu nezbytné. Sekundární nebo také druhotné karotenoidy, které nejsou lokalizovány v chloroplastech, mají v buňce odlišné funkce. Hlavní službu prokazují jako fotoprotektanty, tedy chrání buňku před nadměrným nebo pro ni škodlivým světelným zářením, a antioxidanty, tlumí reaktivní účinky kyslíku v buňce, který by tak mohl poškodit DNA. U mnohých druhů řas byla prokázána akumulace sekundárních karotenoidů v lipidních tělíčkách pod vlivem vnějších stresových podmínek (např.: Lemoine a Schoefs, 2010). Navíc podle Lemoine a Schoefs (2010) mohou sekundární karotenoidy sloužit buňce jako zásobárna uhlíku i energie. Stresové podmínky mohou být: změna teploty, salinity, snížení přísunu živin nebo zvýšení intenzity slunečního záření. Stejně tak jako všechny funkce, tak i mechanismy syntézy a akumulace těchto sekundárních pigmentů nejsou uniformní a u řady mikroorganismů jsou nadále předmětem zkoumání.

Vedle početných již zmíněných skupin fotosyntetických pigmentů existují zvláštní pigmenty, které slouží především prokaryotům, kterým se říká světlo-sběrné retinální proteiny. Jsou to pigmenty podobné rodopsinu, zrakovému proteinu očních sítnic obratlovců, hlavonožců i některých členovců.

Proteinem je bakterio-opsin, na který je kovalentně navázán chromofor, retinalový pigment, rodopsin. Funguje jako protonová pumpa dotovaná světlem, přečerpávající protony přes membránu (Lanyi, 2004). Purpurový bakteriorodopsin náleží druhům Archaea z rodiny Halobacteriaceae. Proteorodopsin a xantorodopsin (*Salinibacter*) jsou bakteriální pigmenty. Halorodopsin vyskytující se ve skupině druhů *Halobacterium* je chloridovou pumpou. Tvorba bakteriorodopsinu je navozena vysokou intenzitou slunečního záření a nízkým tlakem kyslíku. Jiné retinalové pigmenty mohou prokaryotům sloužit jako světelné senzory. Takovým se říká PYPs (Photoactive Yellow Proteins), žluté fotoaktivní proteiny (Oren, 2011). Halofilní Archaea produkují velké množství karotenoidů, z nichž největší podíl zabírá C50 bakterioruberin. Dále produkují  $\beta$ -karoten a lykopen. Retinal je produkován oxidativním rozpadem  $\beta$ -karotenu. (Oren, 2011).

Flexirubíny jsou pigmenty produkované jistými bakteriálními druhy kmene *Bacteroidetes* a dávají koloniím žlutou, oranžovou, růžovou či červenou barvu. Polyenový řetězec obsahuje 6 až 8 dvojných vazeb (Oren, 2011).

## 2.1 Výskyt pigmentů v rámci kmenů z řad studovaných mikroorganismů

Určitá pigmentace a její potenciál jsou dány druhovou příslušností. Projeví se danou měrou vlivem růstových podmínek a stářím kolonie (Oren, 2011a).

Kolonie Halobacteriales většiny druhů jsou zabarveny do červena díky bakterioruberinu, který obsahují. Odstíny kolonií jsou variabilní v barvách červené a růžové. Pigmenty bakterioruberinu se označují také jako karotenoidy C50. Podle Wu a kol. (1983) má tento charakteristický pigment kolonií těchto mikroorganismů, vyskytujících se v jejich přirozeném prostředí, ochrannou funkci před silným slunečním zářením, chrání buňky od fotooxidativního poškození (Systematic Prokaryota).

Cyanobakterie obecně obsahují řadu pigmentů: chlorofyl a,  $\beta$ -karoten, zeaxanthin, echinenon, kanthaxanthin, myxoxanthofyl a fykobiliproteiny. Většina všech pigmentů v buňce se koncentruje na vnější straně protoplastu, který se nazývá chromatoplasma. Chromatoplasma obsahuje volné tylakoidy, jejichž membrána obsahuje fotosyntetické pigmenty rozpustné v tucích. Fykobiliproteiny jsou připojeny k tylakoidům ve speciálních tělískách, zvaných fykobilisomy. Fykobiliproteiny mají funkci při fotosyntéze II.komplexu, jako lapač světelné energie, která je následně převedena ke chlorofylu a. Fotosystém II užívá vodu jako donor elektronů. Modré přídatné pigmenty, fykocyanin a allofykocyanin, dávají sinicím jejich modro-zelenou barvu. Fykoerytrin bývá také přítomen v minoritním množství.

Rhodophyta, triviálním názvem ruduchy, disponují chlorofylem a - b a c nejsou přítomny. Zelený chlorofyl je překryt červeným pigmentem fykoerytrinem. Dále jsou přítomny modré pigmenty, fykocyanin a allofykocyanin. Fykoerytrin se vyskytuje dokonce v pěti formách. Jejich píky v absorpčním spektru se od sebe navzájem liší a společně leží v zelené části absorpčního spektra (500-570 nm). Ostatní fykobily absorbují červené světlo, R a C-fykocyanin má píky na 615 a 620 nm, phycoyanin zaujímá pík na 650 nm. Fykoerytrin je obvykle dominantní a řasy tedy vidíme jako



červené. Fykobiliny jsou ve vodě rozpustné, snadno se tak po smrti buňky z chloroplastů vymývají a dříve rudá biomasa se stává zelenou. Kromě fykobilinů a chlorofylu a jsou přítomny karotenoidy, z nichž nejdůležitější jsou  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, lutein a zeaxanthin. Všechny pigmenty jsou lokalizovány v chloroplastech (Hoek a kol., 1995).

Chlorophyta, zelené řasy si zachovávají zelenou barvu díky tomu, že chlorofyl nebývá překryt akcesorickými pigmenty, ačkoliv karotenoidy a xantofyly jsou přítomny. Z xantofylů je nejdůležitější lutein, další jsou: violaxanthin, neoxanthin, antheraxanthin a zeaxanthin. Některé druhy (např. řasy rodu *Chlamydomonas*) mohou být červené, mají chlorofyl překryt tzv. haematochromem, který je směsí karotenoidů. Chloroplasty obsahují chlorofyl a i b, výskyt chlorofylu c byl u některých druhů potvrzen (u dvou) (Hoek a kol., 1995).

### 2.3 Detekce mikrobiálních pigmentů

Analýzu pigmentů na molekulární úrovni umožňuje řada technik: prvková analýza, hmotnostní spektrometrie, infračervená spektroskopie či nukleární magnetická rezonance. Pigmenty jsou barevné látky pohlcující částí světla, proto je ideální jejich učení na základě absorpčních spekter. Charakteristické znaky v takových spektrech jsou - absorpční maxima a ramena absorpčních pásů. Spektrofotometrie dosahuje nejlepších výsledků měřením separovaných pigmentů. Detekce pigmentu *in vivo* – tedy biomasy vyžaduje speciální příměsi, které eliminují vliv stínění ve spektrech způsobený přítomnými buněčnými komponenty. Proto je nejlepší pro analýzu pigmenty z biomasy extrahovat následně separovat pomocí HPLC. Jiná chromatografická metoda, která je schopna pigmenty separovat je tenkovrstvá chromatografie (TLC). Na vrstvě silikagelu ulpívají barevné skvrny a vzdálenost, kterou po ploše vlivem gravitace urazily je diagnostickým znakem látky. Nevýhodou této metody je nemožnost dalšího použití separovaných pigmentů. Pigmenty jsou molekuly citlivé na světlo a kyslík, proto pro získání co nejpřesnějších výsledků, je potřeba při manipulaci a přípravě vzorku tyto vlivy eliminovat. Pro extrakci pigmentů z buněk existuje řada protokolů (Oren, 2011a).

## 3 HALOFILOVÉ A JEJICH PROSTŘEDÍ

### 3.1 Extrémně slané prostředí

Hypersalinní prostředí lze rozdělit do dvou skupin na thalassohalinní a athalassohalinní, podle iontového složení. Thalassohalinní prostředí vzniká evaporací mořské vody a jeho iontové složení odpovídá nebo je velmi blízké iontovému složení oceánu, kde dominujícím kationtem je  $\text{Na}^+$  a anion  $\text{Cl}^-$  a dalším aniontem vysokých koncentrací je  $\text{SO}_4^{2-}$  (anion sulfátu). PH je téměř neutrální až lehce bazické. Při evaporaci mořské vody, dříve než dojde k nasycení  $\text{NaCl}$ , se vysráží některé minerály jako kalcit nebo aragonit ( $\text{CaCO}_3$ ) a gypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Iontové složení roztoku je tedy závislé

na precipitaci těchto minerálů (Oren, 2002). Dominující kationty jsou  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  a vysoké koncentrace  $CO_3^{2-}$  (karbonátu) a  $HCO_3^-$  (bikarbonátu) mohou způsobovat pH vyšší než 10. Mrtvé moře má pH lehce bazické a bivalentní kationty  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  dominují nad monovalentními  $Na^+$  a  $K^+$ . Iontové složení athalassohalinního prostředí je výrazně rozdílné od iontového složení mořské vody. V athalassohalinním roztoku jsou  $Cl^-$  a  $Br^-$  dominující anionty, oproti tomu  $SO_4^{2-}$  je přítomen jen v nízkých koncentracích (Oren, 2002).

Dvě největší slaná jezera jsou Velké solné (3900 km<sup>2</sup>) a Mrtvé moře (800 km<sup>2</sup>). Velké solné jezero, na západě Spojených Států Amerických, hloubka kolem 10m, teplota vody se pohybuje v ročních variacích od -5 až +35 °C, pH lehce kyselé (Watzman, 1997). Iontové složení odpovídá složení mořských solí, ačkoli jezero již nemá žádné spojení s oceánem. NaCl 86% - 90% z dotací sladké vody přitékající do jižní části jezera. V této jižní části se koncentrace solí pohybuje mezi 120 – 130 g/l, zatímco v severní části je salinita vyšší - 330 -350g/l (Oren, 2011). Mrtvé moře na středním východě je podstatně hlubší než Velké solné, má hloubku 340m. Je lehce bazické. Vzhledem k velikosti mají tyto jezera oproti malým hypersalinním nádržím stálé chemické složení i složení bioty, ačkoli v důsledku lidské činnosti se složení začalo měnit (DasSarma a Arora, 2001).

Hypersalinní alkalická sodná jezera téměř neobsahují bivalentní kationty vápníku a hořčíku, protože tyto kationty jsou jen velmi málo rozpustné v bazickém pH. Jezera mají dynamické sezónní variace v salinitě, teplotě i velikosti. Jejich zástupci jsou Natrun vádí v Egyptě, jezero Magadi v Keni a soustava jezer v USA - Great Basin (Mono, Owens, Searles, Big Soda) (MacDonald et al, 1900).

Pokud na pobřeží prosakuje mořská voda na povrch, mohou tak vznikat malé slané odpařovací nádrže. Na pobřeží Rudého moře to jsou např. Slunečné jezero, Ras Muhammad, jezero Sivash na pobřeží Černého moře, Žraločí zátoka v západní Australii. Odpařovací nádrže tohoto typu se nacházejí i v Antarktidě: Deep, Organic a Suribati (DasSarma a Arora, 2001). Dalším typem hypersalinního prostředí jsou podmořské evaporační depozity. Hlubokomořské bazény Rudého moře a Mexického zálivu jsou díky své vysoké hustotě relativně stabilní (DasSarma a DasSarma, 2006).

Kromě těchto přírodních slaných nádrží existují umělé krystalizační odpařovací nádrže, komerčně využívané pro produkci mořské soli. Takový krystalizační systém je soubor nádrží spojených kanály a trubky. Salinita nádrží se postupně zvyšuje až k poslední cílové, ve které se sráží halit. Před halitem se vysráží nejprve kalcit a aragonit, potom gypsum, jak již bylo zmíněno (DasSarma a Arora, 2001).

### **3.2 Život ve slaném prostředí**

Mnoho halotolerantních i halofilních druhů bylo izolováno ze slaných aridních půd, slaných ryb a ze slaných roztoků, kde probíhá fermentace - metabolické procesy fermentativních halofilů, jsou využívány k produkci fermentovaných pokrmů. Byly izolovány z listů rostlin, rostoucích ve slaných půdách, které vylučují soli na povrch svých listů (Oren, 2011). Dokonce byly izolovány z páry unikající z hydrotermálních žil. Halofilní archea byly přítomny ve vodě, kondenzované z páry na Kamčatce, Havaji, v Rusku a USA (Oren, 2011).

Solanky jsou zbarveny jasně červeně díky vysoké hustotě biomasy pigmentovaných mikroorganismů. Aerobní halofilní archebakterie druhu Halobacteriales jsou hlavní složkou mikrobiální biomasy v Mrtvém moři, v jezeře Magadi i v jiných přírodních solankách a krystalizačních nádržích. Eukaryotní organismy jsou přítomny v zastoupení jediného rodu Dunaliella. Tato zelená řasa je však nejčastějším zástupcem hypersalinní bioty a je hlavním či dokonce jediným primárním producentem v Mrtvém moři ale i v řadě dalších solanek (Oren, 2002). Ve vodách o koncentraci 1 M NaCl až 3,5 M NaCl mikrobiální populaci dominují fotosyntetické jednobuněčné a vláknité sinice, dále se vyskytují hojně zelené a purpurové sirmé i bezsirmé bakterie, řasy, houby a kvasinky. V anoxické zóně metanogenní, sulfát redukující aj. bakterie a archea. Ve vyšších koncentracích 3,5 M až 5,2 M (= úplné nasycení) dominují halofilní archea (DasSarma a DasSarma, 2006). Ekosystémy hypersalinních nádrží jsou chudé co do stupně biodiverzity, ale bohaté na hustotu populací přítomných druhů v důsledku nízké kompetice a počtu predátorů.

Slanost je limitujícím faktorem vodního prostředí. Nehalofilní organismy se optimálně vyvíjejí v prostředí s koncentrací soli pod 0,2 M (hovoříme o vápníku, ale dále se vyskytují i nezanedbatelné koncentrace soli hořčíku a draslíku). Halofilní organismy vyžadují pro svůj vývoj vyšší slanost a podle výše koncentrace NaCl, ve které se vyvíjejí nejlépe, se rozdělují do tří skupin (Ollivier a kol., 1994) na lehce halofilní 0,2 - 0,85 M, středně halofilní 0,85 – 3,4 M a extrémně halofilní 3,4 – 5,1 M. V přepočtu na procentuální podíl je to pro lehce halofilní 2 – 5 % NaCl, pro středně 5 – 20 % a extrémně halofilní 20 - 30% NaCl. Halotolerantní organismy mohou růst jak při vysoké salinitě, tak při nízké, neboli normální. Halofilní mikroorganismy jsou nalézány všude, kde byla nalezena zvýšená koncentrace solí. Jsou to hypersalinní jezera, slané půdy, slané potravinové produkty, těla rostlin, které vylučují soli na svůj povrch, mořské hlubiny i stará malířská plátna.

Vysoký osmotický tlak je důsledkem vysoké salinity. Buňky nehalofilních organismů neumí tento tlak vyvážit a buňka ztrácí vodu. Halofilové akumulují soli (KCl) uvnitř buňky v cytoplazmě a vyrovnávají se tak vysoké koncentraci NaCl v roztoku vně buňky. Nebo disponují speciálními osmoprotektanty, které udržují osmotickou rovnováhu. Tyto osmoprotektanty mohou být aminokyseliny (glycin, betain, ektoin), cukry (sacharosa), vícesytné alkoholy (DasSarma a DasSarma, 2006). Mnohé halofilní mikroorganismy jsou specificky adaptované na život v určitém typu solného roztoku a jejich růst není limitován pouze měrou totální salinity prostředí.

### 3.3 Prokaryotní halofilové

Halofilní Archaea, běžně nazývány haloarchea, jsou extrémní halofilové rostoucí nejlépe při 3,4-5 M NaCl, čímž zauímají nejvyšší příčky na stupnici halofilie. Hynou, pokud koncentrace NaCl klesne pod 1-1,5 M. Studie genotypů je významná s ohledem na evoluční postavení haloarchea a Archaea vůbec a jejich fyziologické schopnosti přežít, vyvíjet se a množit se v extrémně hypersalinním prostředí. Prvně získané úplné genomové informace z haloarchea byly pro *Halobacterium* sp. NRC-1 (DasSarma, 2004). Zajímavým rysem je purpurový specializovaný region buněčné membrány, obsahující chromoprotein, již zmíněný bakteriorodopsin, který může pokrývat více než 50% povrchu

buňky. Tvorba bakteriorodopsinu je navozena vysokou intenzitou slunečního záření a nízkým tlakem kyslíku. Halofilní Archaea produkují velké množství karotenoidů, z nichž největší podíl zabírá C-50 bakterioruberin. Dále produkují  $\beta$ -karoten a lykopen. Retinal je produkován oxidativním rozpadem  $\beta$ -karotenu.

Sinice tvoří podstatnou část mikrobiální biomasy hypersalinních jezer. *A. halophytica* toleruje pro růst škálu koncentrace od 2 do 5 M NaCl. K lyzi dochází až v destilované vodě. Tvoří svrchní hnědou vrstvu mikrobiální biomasy. Sinice rodu Oscillatoriales tvoří zelenou vrstvu hned pod tou hnědou. Vytvářejí heterocysty fixující dusík, rostou při 1-2,5 M NaCl (DasSarma a DasSarma, 2006).

Anaerobní osvětlenou vrstvu, pod výše zmíněnými vrstvami sinic, obývají fototrofní bakterie. Probíhá zde anoxygenní fotosyntéza mikroorganismů různých typů, kterými jsou zelené a purpurové sírné i bezsírné bakterie. Charakteristický pigment bakteriochlorofyl, je pro tyto fototrofy typický. Zelené sírné bakterie jsou lehce až středně halofilní a některé druhy jsou i lehce termofilní. Purpurové sírné rodu Ectothiorhodospira dominují v alkalických jezerech. Směrem ke dnu následuje zóna bakterií oxidujících síru, např. *Achromatium volutans* ze Slunečného jezera. Anaerobní bakterie a Archaea obývají spodní vrstvy mikrobiální biomasy a také sedimentují na dnech hypersalinních nádrží. Jsou to extrémně halofilní fermentativní anaerobové, z nichž *Halanaerobacter chitinivorans* fermentuje chitinové schránky korýšů, středně halofilní anaerobové jako např. *Orenia marismortui* fermentující uhlovodíky, nebo bakterie redukující sulfáty a homoacetonické bakterie. Mezi halofilní metanogenní archea patří např. *Methanohalophilus halophilus*, izolována z Velkého solného jezera. Aerobní a fakultativně anaerobní středně halofilní bakterie mají početné zástupce mezi rody Halomonas, Chromohalobacter, Bacillus, Pseudomonas, Flavobacterium a další. *Halomonas subglaciescola* byla izolována z jezera „Organic“ v Antarktidě pod vrstvou ledu (DasSarma a DasSarma, 2006).

### 3.4 Eukaryotní halofilové

Nejvíce druhů z halofilních zelených řas jsou středně halofilní. Extrémně halofilních, schopných růstu v saturovaném roztoku NaCl, je jen pár druhů, jako např. *Dunaliella salina*, *Asteromonas gracilit*. Druhy rodu *Dunaliella* jsou velmi běžné, hojné a jsou hlavním zdrojem potravy korýšů a hmyzích larev. Rozsivky jsou v hypersalinním prostředí běžně nacházeny, avšak ne v hojných počtech. Řada druhů kvasinek a vláknitých hub je dobře adaptována na hypersalinní podmínky jako halotolerantní a nejlépe rostou při neutrálním pH aerobních podmínek. *Hortaea werneckii* roste i při koncentracích NaCl rovných nasycení. Mnohé jednobuněčné eukaryotní organismy obývající hypersalinní prostředí, nebyly dosud popsány. V hypersalinních prostředích nežijí jen mikroorganismy, ale také mnohobuněčné makroorganismy, které se extrémním podmínkám dokázaly přizpůsobit. Typické jsou mouchy z hmyzích zástupců a garnát *Artemia franciscana* z korýšů, dále červy a vyšší rostliny. Nejrozličnější druhy ptáků obývají tato prostředí a nejviditelnějšími jsou růžoví plameňáci, kteří jsou dotováni růžovým pigmentem od již zmiňovaných mikroorganismů (DasSarma a DasSarma 2006).

### 4.1 Spektroskopie obecně, vymezení Ramanovy metody

Spektrální metody sledují interakci elektromagnetického záření s hmotou, při které dochází k výměně energie, která je provázána excitací nebo de-excitací atomů, molekul, iontů nebo jiných částic hmoty analytu. Na závěr této interakce dojde k emisi nebo absorpci elektromagnetického záření. Atomy, molekuly, ionty vyměňují svou energii v rámci určitých kvantových přechodů daných energetických hladin. Při absorpci elektromagnetického záření dojde k přechodu částice do kvantového stavu o vyšší energii. Při emisi záření dochází k deexcitaci částic a dojde ke kvantovému přechodu částice do nižší energetické hladiny. Tyto energie jsou: elektronová, vibrační, rotační, spinová (řazeno sestupně podle množství energetického kvanta mezi přechody). O druhu přechodů, ke kterým dojde, rozhoduje příslušná energie excitačních fotonů. Ramanova spektroskopie sleduje složitější jev interakce záření s hmotou. Je to metoda založená na rozptylu záření. Dalšími takovými metodami jsou např. turbidimetrie nebo nefelometrie. Infračervená (IR) spektroskopie je absorpční metoda. IR a Ramanova spektroskopie se mohou velice dobře doplňovat a v literatuře bývají často porovnávány.

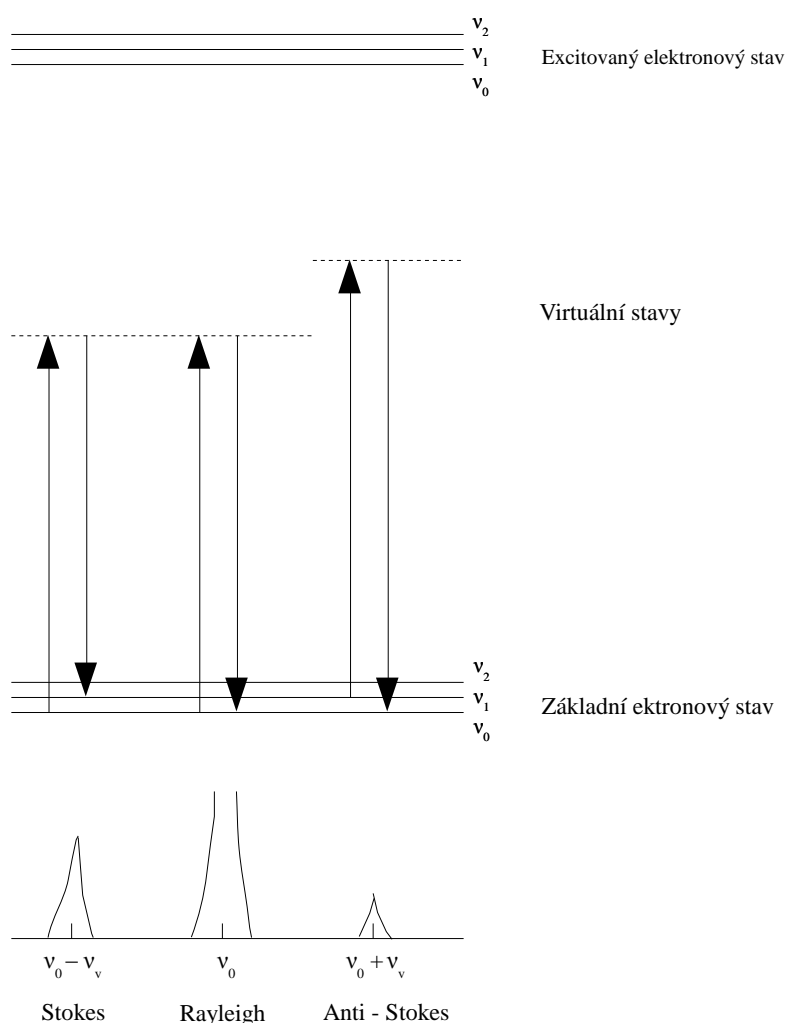
Ramanova spektroskopie je analytická metoda vibrační molekulové spektroskopie, studující přechody mezi vibračními stavy molekul v základním elektronovém stavu. Metoda byla pojmenována podle indického profesora fyziky Čandrašekhara Venkata Ramana, který obdržel r. 1930 Nobelovu cenu za popis tzv. Ramanova jevu. Roku 1928 Č. V. Raman a K. S. Krišnan popsali tento neelastický rozptyl. Ramanova spektroskopie se těší prudkého vývoje až o desítky let později, díky objevení laseru v r. 1960. Metoda slouží ke spektroskopickému popisu látek, ale i k jejich identifikaci. Primárně se používá ke kvalitativní analýze.

### 4.2 Ramanův rozptyl

Při interakci budícího paprsku se vzorkem dochází k elastickému a neelastickému rozptylu. Elastický, tzv. Rayleighův rozptyl nenesou analytickou informaci a není detekován. Jsou to vyzářené fotony se shodnou vlnovou délkou jako budící záření. Asi jen  $10^{-8}$  fotonů je neelasticky rozptýleno při výměně energie excitujícího záření se vzorkem a detekováno jako Ramanův rozptyl. Stokesovy fotony mají větší vlnovou délku než budící fotony a jsou vyzářeny, když excitovaný elektron z virtuální hladiny spadne do vyšší kvantové hladiny oproti základnímu stavu, ze kterého byl zářením vybuzen. Pokud byl elektron vybuzen z vyššího kvantového stavu a spadl do základního, vyzáří se Anti-Stokesovy fotony s menší vlnovou délkou <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>

Rotačně vibrační stavy molekuly jsou kvantovány a přechody mezi energetickými stavy se řídí zákonem zachování energie. Energetický rozdíl přechodu  $\Delta E$  mezi stavy před a po excitaci musí odpovídat energii emitovaného či pohlceného fotonu  $\Delta E = h\nu$  (<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 5.3.2013).

Při přechodu molekuly mezi jejími dvěma stacionárními vibračními stavy o energiích  $E_0$  a  $E$  dochází k vyzáření fotonu rozptýleného záření  $\nu_R$  ( $\nu_R$  je frekvence rozptýleného záření). Přechod způsobí foton interagujícího záření o frekvenci  $\nu_0 > |E_0 - E| / h$  ( $h$  – Planckova konstanta). Molekula, excitovaná fotonem o energii  $E_0 = h\nu_0$ , přechází na virtuální energetickou hladinu. Pokud se molekula navrátí do základního elektronového stavu a emituje foton o nezměněné energii  $E = h\nu_0$  jedná se o Rayleighův rozptyl. Molekula se z virtuální energetické hladiny vrací do 1. excitovaného vibračního stavu a emituje foton o nižší energii  $E = h(\nu_0 - \nu_v)$  při Stokesově rozptylu záření. Molekula nacházející se v 1. excitovaném vibračním stavu je budícím zářením přenesena na virtuální energetickou hladinu a navrací se do původního základního vibračního stavu, zatímco emituje foton o vyšší energii  $E = h(\nu_0 + \nu_v)$  oproti fotonu, který přijala (<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 5.3.2013). V takovém případě mluvíme o Anti – Stokesově rozptylu. Tyto tři typy přechodů jsou znázorněny na obrázku 1.



**Obr. 6** Rayleighova a Ramanovy linie. Červenou čarou je znázorněn 1. excitovaný stav.  $\nu_0$ ,  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  jsou vibrační kvantová čísla.

### 4.3 Princip metody

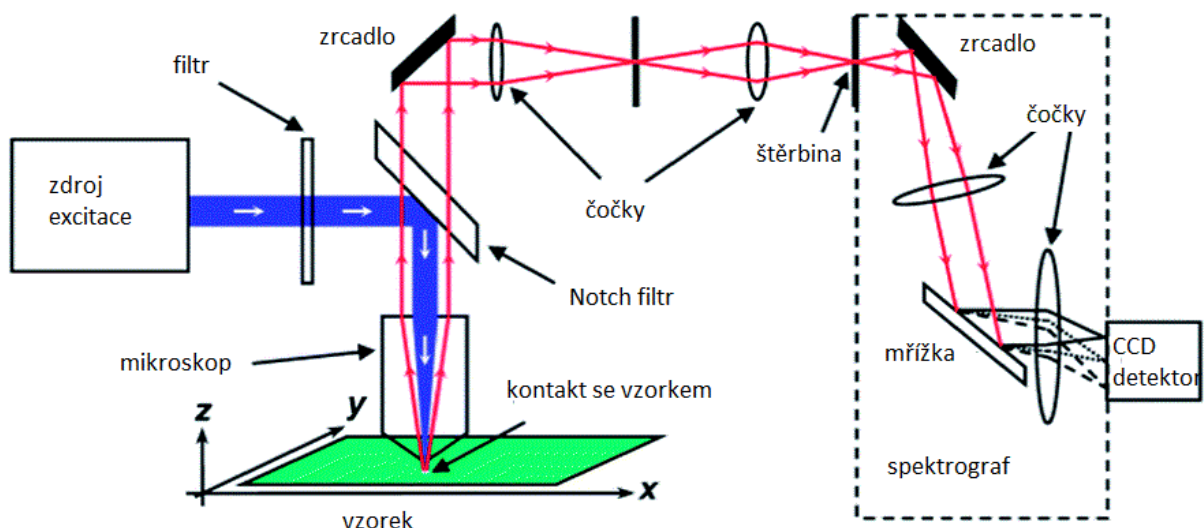
Při interakci excitujícího monochromatického záření (laser ve viditelné oblasti spektra nebo v blízké infračervené oblasti světla) s hmotou, detektor zaznamenává Ramanův rozptyl. Ty vibrace, které indikují změnu polarizovatelnosti molekuly, se projeví ve spektru. Polarizovatelnost je schopnost molekuly posunout elektrický náboj a tím deformovat elektronového obalu molekuly vlivem vnějšího elektrického pole. Závisí na vzdálenosti valenčních elektronů od jádra a na stupni delokalizace elektronů. Vztah  $\partial\alpha / \partial q \neq 0$  je základním výběrovým pravidlem metody a podmínkou vzniku ramanovského signálu ( $\alpha$  je polarizovatelnost,  $q$  je vnitřní souřadnice molekuly). Výběrová pravidla jsou dána pravděpodobností výskytu určitých přechodů, tzn., že všechny ostatní vibrace (přechody), ke kterým dojde při interakci záření – hmota nejsou tak četné a tudíž mají příliš nízkou intenzitu, takže detektor je nemůže zaznamenat (<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 10.11.2012).

Stokesovy linie a anti-Stokesovy linie značí Ramanův posun a tvoří Ramanovo spektrum. Jsou rozloženy kolem linie Rayleighova rozptylu. Tato linie by měla ve spektru nulovou hodnotu vlnočtu, kdyby nebyla odfiltrována. Anti-Stokesovy linie zabírají záporné hodnoty vlnočtů, Stokesovy linie kladné. Část fotonů může být absorbována elektronovými přeskoky a dochází tak k nežádoucí fluorescenci. Anti-Stokesova oblast se většinou nezaznamenává, protože poskytuje méně intenzivní pásy, je praktičtější tuto oblast odfiltrovat společně s Rayleighovou oblastí.

Spektrum je dáno spektrálními liniemi, neboli pásy a poskytuje informace o rotačně vibračních pohybech polyatomických částic. Poloha pásů se vztahuje k ose horizontální, sděluje nám informaci o kvalitativním charakteru analytu. Na horizontální ose jsou vyneseny hodnoty již zmíněného vlnočtu, který je rozdílem vlnočtu budícího a rozptýleného záření. Vlnočtet je převrácená hodnota vlnové délky  $\bar{\nu} = 1 / \lambda$  a udává se v jednotkách reciprokého centimetru -  $\text{cm}^{-1}$ . Hodnoty pásů na vertikální ose jsou bezrozměrné, značí relativní intenzitu analytu a je možné je využít ke kvantitativní analýze. Tvar pásů nám může naznačit formu látky. Míra intenzity pásů je úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti  $(\partial\alpha / \partial q)^2$ . Intenzivnější pásy produkují symetrické vibrace nebo vibrace ve fázi. Vícenásobné symetrické vazby (např.  $-N=N-$ ) projevují výrazně intenzivnější pásy oproti jednoduchým vazbám. Ve vztahu k IR spektroskopii platí zvláštní vylučovací pravidlo - molekula, která má středovou symetrii, se svou plně symetrickou vibrací projeví buď v IR nebo v Ramanově spektru, nikdy ne zároveň. Podle polohy pásů, Ramanova spektrometrie umožňuje odlišit od sebe symetricky substituované násobné vazby o nesymetricky substituovaných nebo konjugované alkeny od těch nekonjugovaných. Typ vibračního pohybu částic je dán jejich strukturou – hmotností a silou vazby. Spektrum je tzv. otiskem prstu měřené látky. Snadná a okamžitá identifikace látek je možná, pokud najdeme tentýž otisk v databázi dat, který byl pořízen za stejného fyzikálního stavu (<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 10.11.2012).

#### 4.4 Instrumentace a použití

Rozlišujeme dvě základní uspořádání instrumentace: disperzní spektrometry s monochromátorem nebo FT Raman – spektrometry s Fourierovou transformací.



**Obr. 7 Schéma instrumentace Ramanova mikrospektrometru (Tsai a kol., 2014).**

Laserový paprsek (modře) postupuje od zdroje směrem ke vzorku, který je umístěn na polohovacím zařízení. Pomocí filtru je jeho intenzita regulovatelná. Rozptýlené záření (červeně) postupuje od vzorku směrem k detektoru a je selektivně filtrováno (Notch filtr odstíní Rayleighův rozptyl) až postoupí k difrakční mřížce (obr. 7). CCD detektor (charge-coupled devices) zaznamenává Ramanův rozptyl. S vyšší intenzitou laseru se zvyšuje i poměr signál/šum, ale s riziky vzniku nežádoucích fotochemických či fotofyzikálních reakcí (<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 5.2.2014).

Na fokusovaném místě vzorku je stopa laseru u Ramanovy mikrospektroskopie v řádu mikrometrů. Speciální technikou mikrospektrometrie je mapování nebo „imaging“. Získáním dat z řady bodů ve směru os v ploše i v prostoru získáváme detailní informace o distribuci chemických látek uvnitř vzorku či jeho struktuře (<http://www.renishaw.com/en/what-raman-images-can-reveal--25802>, 5.2.2014).

Pro analýzu je důležitý výběr vlnové délky laseru, které jsou v oblasti vlnových délek od blízké infračervené až po ultrafialovou. Jeden stroj může disponovat více lasery, avšak ne všechny lasery by byly kompatibilní se stejnými typy filtrů a difrakční mřížkou (<http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/raman/method.php>, 5.2.2014)

FT spektrometry užívají interferometr a jednonábový detektor. Interferogram se pak převádí na spektrum pomocí Fourierovy transformace a místo optického mikroskopu se nachází vzorkovací prostor (<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 5.2.2014). Pro měření *in situ* se užívají jednoduchá a rychlá přenosná zařízení se zjednodušenou instrumentací.

Ramanova spektroskopie se užívá k analýze pevných, kapalných, plynných látek i k analýze povrchů a biomolekul, složitých polymerů či organismů ve vědních i komerčních oborech. K rychlé identifikaci slouží databáze spekter, která jsou jako otisk prstu určené látky. Biologické, geologické, lékařské, forenzní disciplíny či farmaceutický průmysl, gemologie, studie uhlíku a nanotechnologií. Získané spektrální pásy odpovídají jednoznačným molekulárním strukturám. Spektrometr navíc umožňuje studovat biologické látky v jejich přirozeném stavu, tj. bez přípravy vzorku a dokonce i v jejich



přirozeném prostředí. Ramanova spektrometrie nachází široké uplatnění také díky rozvoji v různé speciální techniky: povrchově zesílená - SERS, „imaging“, kombinování se skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) aj. i díky miniaturizaci přístroje pro měření *in situ* (<http://www.renishaw.com/en/applications--6259>, 5.2.2014).

## 5 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Chromatografie všeobecně je nejrozšířenější metoda, sloužící k separaci látek, která nyní umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu. Objevitelem principu chromatografie je ruský botanik Cvět. Tento princip, kterým je vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi 2 nebo více fázemi, zůstává stejný všem chromatografickým metodám, ačkoliv k separaci dochází rozličnými fyzikálně chemickými jevy. Dvoufázový systém, stacionární vs. mobilní fáze, poskytuje separaci na základě různé pohyblivosti složek vzorku v čase v tomto systému. Mobilní fáze unáší dělené látky skrze fázi stacionární. Při styku analytu s těmito fázemi dochází k interakcím, díky kterým pak dojde k vlastní separaci látek. Chromatografické metody by se nechaly rozlišit dle separačních mechanismů (např.: adsorpční, afinitní, iontově výměnné), ovšem některé mechanismy jsou složitější či kombinované. Základní klasifikace metod je dle skupenství fáze mobilní, tj. kapalinová či plynová, které se dále rozlišují na řadu dalších technik. (Analytická chemie 1987, Holzbecher Z., Churáček J. a kol.)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC (High Performance Liquid Chromatography), užívá k separaci látek kolonu, která je prostředím pro fázi stacionární, na které se analyty zachycují dle jejich různé afinity. Metoda je rychlá, vysoce citlivá a separované pigmenty chrání před degradací kyslíkem.

## 6 RAMANOVA SPEKTROSKOPIE MIKROORGANISMŮ A JEJICH PIGMENTŮ

### 6.1 Vzhled spektra karotenoidů, rezonanční efekt

Při prvním zblžném pohledu na vhodně získané Ramanovské spektrum vidíme výrazné Ramanovské pásy, které vystupují z baseline bez přítomnosti výrazného šumu a fluorescence. Pokud měříme minerály, široké pásy naznačují nízký stupeň krystalinity nebo látku amorfní (Jorge-Villar a kol., 2007). U organických látek nám vzhled pásů může vypovídat o jejich případné degradaci. Degradované molekuly neposkytují ostré charakteristické signály neporušených vazeb.

Intenzivní výrazné pásy ve spektru jsou poskytnuty takovými vibracemi atomů v molekule, při kterých biomolekuly absorbující elektromagnetické záření v oblasti viditelného světla, mohou poskytovat rezonanční Ramanovská spektra (Spiro, 1987). Atomy chromoforů zahrnují i takové pohyby, které po ozáření laserem o vhodně vybrané vlnové délce způsobují elektronové přechody, ty způsobují

rezonanční nabohacení vibračních módů ve spektru (Marshall a kol., 2007). Díky tomuto jevu je možné vibrační módy chromoforu odlišit od množství vibračních módů, které poskytuje biologická matrix. Rezonanční nabohacení může zvýraznit pásy chromoforů o 3 až 6 řádů a tím snižuje jejich měřitelnou koncentraci až na  $10^{-4}$  –  $10^{-6}$ . Podle Maguregui a kol. (2012) je Ramanova spektroskopie schopna identifikace a popisu potenciálních biomarkerů ve stopovém množství.

Abychom dosáhli rezonančního efektu, je třeba zvolit vhodnou vlnovou délku excitačního monochromatického záření. Pokud toto záření překrývá některý z absorpčních pásů (absorpčních maxim) analyzovaného chromoforu, dojde k rezonančnímu nabohacení viditelném v ramanovském spektru (Marshall a kol., 2007). Rezonančního ramanovského jevu v případě měření karotenoidů, které samy o sobě jsou rezonančními strukturami, lze tedy dosáhnout výběrem laseru o vhodné vlnové délce (Maguregui a kol., 2011) a laser o vlnové délce 514 nm je vhodným akcelerátorem tohoto jevu (Barnard a de Waal, 2006; Parker a kol., 1999). To, že můžeme získat rezonanční ramanovská spektra karotenoidů je dáno také tím, že tyto pigmenty nevykazují silnou fluorescenci, což je patrné z charakteru jejich absorpčních spekter (Marshall a kol., 2007).

V Ramanovských spektrech naměřeného  $\beta$ -karotenu můžeme na první pohled identifikovat tři hlavní pásy, které jsou projevem C=C a C-C valenčních vibrací a C-CH<sub>3</sub> deformačních vibrací. Jsou to vibrace funkčních skupin, které poskytly signál, který dokumentuje procesy Ramanova rozptylu. Intenzita pásů při vhodně zvolených podmínkách měření a pozorování může naznačovat koncentraci naměřené látky ve vzorku. Karotenoidy rozptylují fotony neelasticky a poskytují Ramanovský signál pozorovatelný ve spektru a to i tehdy pokud měříme vzorky směsí, obsahujících řadu dalších látek. Pigmenty v přírodních vzorcích poskytují nejlepší nebo také jedinečný Ramanovský signál těchto vzorků. To souvisí se zesílením signálů karotenoidů díky již zmiňovanému rezonančnímu efektu. To je užitečné především pro analýzu pigmentů *in situ*. Karotenoidy i ostatní pigmenty jsou v živých organismech součástí buněčné struktury, kde zaujímají svá místa v komplexech s jinými látkami, jako jsou proteiny, lipidy, celulóza. V dílčích buněčných strukturách jsou přesně orientovány a lokalizovány. Molekuly v těsném okolí pigmentů ovlivňují jejich chemické a fyzikální vlastnosti. Pozice pigmentů v buněčné struktuře a vazby v komplexech mohou mít vliv na spektroskopické vlastnosti karotenoidů (de Oliveira, 2010).

Karotenoidy byly touto technikou detekovány v hostitelských - komplexních maticích různého typu (rostlinné a živočišné tkáň, geologické matrix). Vlnočty pásů  $\nu_1$ (C=C) narůstá s prodlužující se délkou hlavního konjugovaného polyenového řetězce (Merlin, 1985) a byla prokázána lineární závislost mezi hodnotou vlnočtu pásu  $\nu_1$  a počtem konjugovaných C=C vazeb vybraných přírodních karotenoidů. To bylo prokázáno vhodně získanými spektry rezonančního Ramanova rozptylu (Withnall et al., 2003). Že je Ramanův posun  $\nu_1$  závislý na délce konjugovaného řetězce prokázalo několik prací (Thomas et al., 1990; Veronelli et al., 1995; Withnall et al., 2003; Schulz et al., 2005). Zjednodušeně řečeno, čím delší konjugovaný řetězec, tím tmavší barvu karotenoid má a zároveň tím vyšší hodnoty vlnočtu vibrace  $\nu_1$  v ramanovských spektrech nalézáme. Karotenoidy se ve spektrech projevují dvěma silnými pásy vibrací  $\nu_1$  (C=C) blízko 1515 cm a  $\nu_2$  (C-C) blízko 1157 cm (Jehlička a

kol., 2013b). Karotenoidy mají ve spektrech extrémně silný signál dokonce i v ne-rezonančním módu (Jehlička a kol., 2013b). Rezonanční nabohacení se projevuje nejvýznamněji na vibračních módech  $\nu_1$  (C=C) a  $\nu_2$  (C-C), zatímco u pásu  $\nu_3$  (C=CH) tento výrazný efekt nepozorujeme (Marshall a kol., 2007). Po porovnání spekter karotenoidů získaných za použití laserů 785 nm a 514 nm, Maguregui a kol. (2011) pozorují v případě laseru 514 nm nabohacení hlavních pásů (vibrační módy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$ ), ale i některých vedlejších pásů (slabé vibrační módy, overtóny, kombinační tóny). Díky tomu je možné snadněji určit analyzovaný karotenoid, ale i prostorovou konformaci izomeru (Maguregui a kol., 2011).

Konjugované systémy, střídání jednoduchých a násobných vazeb způsobují barevnost molekuly. Karotenoidy mají barevnost ve škále od žluté až po rudou a je dána především délkou hlavního řetězce, tj. počtem konjugovaných vazeb. Čím více konjugovaných dvojných vazeb, tím je barva sytější. Tento trend je viditelný i v ramanovských spektrech.

## 6.2 Analýza pigmentů halofilních kolonií

Marshall a kol. (2007) naměřili rezonanční Ramanovská spektra různých druhů halofilních Archaea (*Halobacterium salinarum* NRC-1, *Halococcus morrhuae*, *Natrinema pallidum*) při excitaci 514,5 nm. Jejich Ramanovská spektra se od sebe téměř nelišila, identifikovali přítomnost spektroskopicky shodných molekul. Výrazný velmi silný pás v  $1505\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenčním vibracím C=C, silný pás v  $1152\text{ cm}^{-1}$  odpovídá valenčním vibracím C-C a méně silný pás v  $1000\text{ cm}^{-1}$  deformační vibraci C=CH. Dále zaznamenali i slabší pásy v oblasti vlnočtů  $1450 - 1170\text{ cm}^{-1}$  a  $980 - 920\text{ cm}^{-1}$ . Dle úvahy (Thomas a kol., 1990 aj.) o poloze valenční vibrace  $\nu_1$  a počtu konjugovaných C=C vazeb, určili Marshall a kol. (2007) analyzovanou látku jako bakterioruberin. Bakteriorodopsin, jiný potencionální biomarker hypersalinního prostředí, měřili Marshall a kol. (2007) v podobě izolátu čisté látky z *Halobacterium salinarum*. Membránový chromoprotein vykazuje spektrum s více signály, oproti volným karotenoidům. Vibrační módy bakteriorodopsinu: C=C v regionu  $1600 - 1500\text{ cm}^{-1}$ , CCH ( $1400 - 1250$ ), C-C ( $1250 - 1100$ ) a mimo rovinná kývavá vibrace vodíku v regionu  $1000 - 700\text{ cm}^{-1}$  (Marshall a kol., 2006; Marshall a kol., 2007) s maximem  $\nu_1$   $1536\text{ cm}^{-1}$  při excitaci 514,5 nm tento pás indikuje 5 konjugovaných C=C vazeb molekuly. Další pásy  $\nu$ (C-C) a  $\delta$ (C=CH) v  $1199$  a  $1007\text{ cm}^{-1}$ . Pásy v oblasti regionu vlnočtů nad  $2000\text{ cm}^{-1}$  náleží overtónům a kombinačním tónům (Marshall a kol., 2007) (pozn.: hovoříme o analýze vybraných pigmentů pomocí excitační vlnové délky 488,0 a 514,5 nm). Marshall a kol. (2006) prezentují první ramanovskou studii halofilních Archaea a spektrum bakterioruberinu. Spektra bakterioruberinu a čistého izolátu bakteriorodopsinu získali měřením FT spektrometrem s excitační vlnovou délkou 1064 nm. Archaea *Halobacterium salinarum* se ve spektru o rozpětí vlnočtů  $50 - 3500\text{ cm}^{-1}$  projevila výraznými pásy 2960, 2930, 2850, 1526, 1150 a  $1000\text{ cm}^{-1}$  a ty jsou projevem bakterioruberinu. První tři pásy téměř splývají v jeden široký. Pás  $2960\text{ cm}^{-1}$  je připsán asymetrické vibraci proteinu  $\nu_{as}$  (CH<sub>3</sub>), 2930  $\nu_{as}$  (CH<sub>2</sub>) a 2850  $\nu_a$  (CH<sub>2</sub>). Dále publikují spektrum biopolymerů řas *Botryococcus braunii* a spektrum získané z prekambričké mikrofosilie *Tanarium conoideum*, které jsou součástí geobiologického materiálu, který ve viditelné části spektra

vykazuje fluorescenci, avšak použitím laseru 1064 nm je tento problém překonán (Marshall a kol., 2006).

Během procesu evaporizace v slaných nádržích, malé množství roztoku uvízne v krystalech i spolu s přítomnými mikroorganismy, které tak mohou zůstat zachovány v inkluzích třeba i miliony let (Schubert a kol., 2009). Přítomnost halitu nijak neovlivňuje ramanovská spektra pigmentů a díky vysokému rozlišení mikro-spektrometrů, je možné velmi dobře doložit přítomnost mikroorganismů uvnitř krystalů (Fendrihan a kol., 2009).

Fendrihan a kol. (2009) v laboratorních podmínkách simulovali prostředí evaporitů a podařilo se jim získat spektra 9 druhů extrémně halofilních archea (haloarchea) FT Ramanovým spektrometrem s užitím 1064 nm i disperzním mikro-spektrometrem s 514,5 nm excitační vlnové délky laseru. Popisují módy v široké spektrální škále od 300  $\text{cm}^{-1}$  až po 3250  $\text{cm}^{-1}$ .

Halofilové z uzavřenin v halitu prokazují spektrálně charakteristické pásy 1507, 1152, 1002  $\text{cm}^{-1}$ , typické pro karotenoid C50 – bakterioruberin. Přítomnost proteinů je doložena pásy v oblasti 2800 – 3100  $\text{cm}^{-1}$ , kde se projevují  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  a  $\text{C}=\text{C}-\text{H}$  (aromatické) valenční vibrace (Maquelin a kol., 2002), 1460  $\text{cm}^{-1}$  jsou projevem asymetrické deformace  $\text{CH}_3$  a nebo nůžkové vibrace  $\text{CH}_2$  (Fendrihan a kol., 2009).

Resonanční Ramanovská spektra s užitím 514,5 nm vykazují shodné charakteristické pásy bakterioruberinu, avšak přítomnost nitrobuněčných proteinů nelze prokázat, protože v oblasti spektra od 2150 do 2650  $\text{cm}^{-1}$  se objevují charakteristické overtóny a překryvy pásů (Fendrihan a kol., 2009), což zaznamenali i Okamoto a kol. (1994) a Withnall a kol. (2003). Směs karotenů C40 je charakterizována píky 1520, 1157 a 1008  $\text{cm}^{-1}$  (Schulz a kol., 2005). Fendrihan a kol. (2009) získali Ramanovská spektra užitím 514,5 nm. FT Ramanovým spektrometrem (laser - 1064 nm) naměřili také  $\beta$ -karoten s typickými pásy 1515, 1157, 1008  $\text{cm}^{-1}$  (De Gelder a kol., 2007; Fendrihan a kol., 2009; Schulz a kol., 2005).

Halofilní archea testovali i např. Fendrihan a kol. (2009), Jehlička a kol. (2013a). Ze získaných spekter konstatovali přítomnost bakterioruberinu, nezjistili však minoritní bakteriodopsin.

Jehlička a kol. (2013a) vůbec poprvé naměřili Ramanovské spektrum salinixantinu, C40 karotenoidu se 13 dvojnými vazbami v izoprenovém řetězci. Tento vzácný pigment produkuje extrémně halofilní bakterie *Salinibacter ruber*, jejíž buněčnou peletu měřili třemi excitačními vlnovými délkami (458; 514,5; 1064). Ukázaly se 3 nejsilnější signály ve shodných hodnotách vlnočtů: 1512 valenční vibrace  $\text{C}=\text{C}$ , 1155 a 1153 při 458nm valenční vibrace  $\text{C}-\text{C}$  a 1003 resp. 1001 připisovaná deformaci  $\text{C}=\text{CH}$ .

Ze vzorků pelety získané centrifugací vody krystalizační slané nádrže 301 (blízko Eilat, Izrael) lze po naměření Ramanovského spektra konstatovat, že bakterioruberin je v přítomné biotě majoritním pigmentem, zatímco minoritní salinixantin nebyl ve vzorku tamního společenství mikroorganismů detekován (Jehlička a kol., 2013a). Jehlička a kol. (2013a) dále prezentují Ramanovská spektra halofilních Archaea: *Halobacterium salinarum* NRC1, *Halobacterium salinarum* R1, *Halorubrum sodomense*, *Haloarcua vallismortis*, a jejich charakteristické signály (1506  $\text{cm}^{-1}$  připisovaný  $\text{C}=\text{C}$

valenčním vibracím,  $1152\text{ cm}^{-1}$  odpovídá C-C valenčním vibracím a  $1001\text{ cm}^{-1}$  pro C=CH deformace), které ukazují na přítomnost bakterioruberinu, jakožto převažujícího pigmentu. Jiný silný signál v  $1524\text{ cm}^{-1}$ , charakteristický pro C=C valenční vibrace karotenoidu, ukazuje na přítomnost jiného pigmentu v *Halobacterium salinarum* R1, který bude patrně podobný struktuře  $\beta$ -karotenu.

V odpařovacích slaných nádržích (střední slanosti – 150 až 200 g/l) vznikají několika centimetrové usazeniny akumulací minerálu gypsum, jež jsou obývány koloniemi halofilů, které tvoří specifická společenstva populací bakterií a cyanobakterií v horizontálních vrstvách evaporitu, která jsou na první pohled rozlišitelná díky své barevnosti. Žluto-oranžové a zelené polohy vrstev jsou obývány cyanobakteriemi akumulující echinenon, myxoxanthofyl a v zelené vrstvě navíc typicky fykocyanin a chlorofyl a. Červeno-purpurová poloha kolonií purpurových sirmých bakterií spiriloxantin a bakteriochlorofyl a (Oren a kol., 1995). Jehlička a Oren (2013) detekovali tyto barevné polohy přenosným Ramanovským spektrometrem vybaveným zeleným laserem - 532 nm. Oranžová vrstva poskytla pásy  $1513, 1153, 1005\text{ cm}^{-1}$ , naznačující přítomnost echinenonu. V červené poloze detekovali spiriloxantin či jemu podobné karotenoidy ( $1510, 1151, 1004\text{ cm}^{-1}$ ).

Hyperaridní poušť Atakama (Čile) je nejsušším místem planety Země. Extrémně nehostinné prostředí obývají endo-evaporitické mikroorganismy, fototrofové žijící v halitových krustách. Vitek a kol. (2010) tyto kolonie, především zelenavých populací sinic, a jejich pozůstatky na površích evaporitů, projevené okem patrnými tmavými šmouhami, detekovali pomocí Ramanovým mikrospektrometrem s diodovým laserem o excitační vlnové délce 785 nm. Endolitické kolonie i organické zbytky se ve spektru projeví typickými signály pigmentů. UV-protektivní scytonemin charakteristickými silnými pásy  $1595$  a  $1554\text{ cm}^{-1}$  (CCH vibrace) a  $1173\text{ cm}^{-1}$  projev vibrace konjugovaného uhlíkového řetězce (podle Edwards a kol., 2000). Byly zaznamenány středně až velmi slabé signály v 1638, 1586, 1468, 1369, 1281, 1236, 1049, 665  $\text{cm}^{-1}$ , které byly přisouzeny fykobilinům. Chlorofyl byl prokázán typickými pásy 1325, 915 a 745  $\text{cm}^{-1}$ . Přítomnost karotenoidů ( $\beta$ -karoten, zeaxantin či lutein) byla doprovázena pásy 1003, 1155 a širokým kolem 1915  $\text{cm}^{-1}$ , který tak vznikl pravděpodobně splynutím jednotlivých signálů více než jednoho karotenoidu. Vitek a kol. (2010) hodnotí Ramanovu spektroskopii jako vhodný nástroj detekce biomarkerů, které mikroorganismy po sobě zanechají v extrémně suchém prostředí halitu, jež obývají. Právě tyto biomolekuly jim umožňují přežít a prospívat v nehostinném prostředí.

### 6.3 Analýza pigmentů nehalofilů

Spektra čisté látky,  $\beta$ -karotenu, se silnými pásy v  $1513$  a  $1156\text{ cm}^{-1}$ , středním pásem v  $1008\text{ cm}^{-1}$  a slabými v 1584, 1353, 1270, 1211, 1190  $\text{cm}^{-1}$  byla získána Ramanovým spektrometrem s Fourierovou transformací při excitační vlnové délce 1064 nm (Alajtal a kol., 2011). Slabé pásy byly dobře zaznamenatelné při vyšším spektrálním rozlišení 4  $\text{cm}^{-1}$ . Získali spektra směsi polyaromatických uhlovodíků (pyren, antracen, naftalen) s  $\beta$ -karotenem. 5%  $\beta$ -karoten zůstává ve spektrech stále dobře patrný (Alajtal a kol., 2011). Podle Schaffer a kol. (1991) se charakteristický vibrační mód  $\beta$ -karotenu v1 přírodních vzorků nachází v regionu 1531 – 1515  $\text{cm}^{-1}$ . De Oliveira a kol. (2010) provedli analýzu

43 různých vzorků vybraných částí rostlinných těl obsahujících karotenoidy (především  $\beta$ -karoten). Měření přírodních vzorků bez přípravy byla provedena excitací 1064 nm FT Ramanovým spektrometrem. Získaná spektra se lišila v pozicích tří charakteristických pásů převážně v rozmezí: pro  $\nu_1$  (1515 – 1531),  $\nu_2$  (1151 – 1166),  $\nu_3$  (1000 – 1012)  $\text{cm}^{-1}$ .

Pro určení konkrétního karotenoidu je stěžejní pás  $\nu_1$ . Collins a kol. (2011) uvádějí  $\nu_1$  astaxantinu 1516,  $\beta$ -karotenu 1519 a luteinu 1523  $\text{cm}^{-1}$ . Spektra těchto čistých látek, rozpuštěných zvlášť v pyridinu, byla pořízena konfokálním Ramanovým mikrospektroskopem s excitační vlnovou délkou 532 nm. Pás  $\nu_1$  se svým charakteristickým ramanovským posunem tyto chromofory od sebe odlišuje, zatímco v dalších 2 charakteristických spektrálních signálech se navzájem významně neodlišují. Podle Collins a kol. (2001)  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$  astaxantinu 1516, 1157 a 1008  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -karotenu 1519, 1156 a 1007  $\text{cm}^{-1}$ , luteinu 1523, 1157 a 1006  $\text{cm}^{-1}$ . Jejich zajímavá studie distribuce karotenoidů v živých buňkách řasy *Haematococcus pluvialis* poprvé ukazuje, že konfokální Ramanova mikrospektroskopie s použitím multivariační analýzy umožňuje i lokalizaci odlišných chromoforů v prostoru živé buňky.

Kaczor a Baranska (2011) ve své práci zkoumali pomocí FT-Ramanovské spektroskopie při 1064 nm strukturní změny astaxantinu jednobuněčné řasy, *Haematococcus pluvialis*, vlivem termálního stresu. Monitoring prováděli na jednotlivých buňkách in situ a dále své výsledky srovnávali se strukturními modifikacemi astaxantinového standardu. V předcházející práci Kaczor a kol. (2011) dokázali, že strukturní rozdíl mezi syntetickou formou tohoto pigmentu a jeho přirozenou formou v buňkách mikroorganismu (*Haematococcus pluvialis*) je v ramanovo spektrech patrný posunem jejich charakteristických pásů v hodnotách vlnočtů. Tyto strukturní rozdíly připisují především vlivu bezprostředního okolí molekuly, tj. které chemické látky ji v buňce obklopují, a chemickým interakcím mezi astaxantinem s mastnými kyselinami. Vliv teplotních změn od -150 do +150 °C na obě molekuly, syntetického astaxantinu i mikroorganického metabolitu měřené řasy, je patrný ve změnách Ramanovského posunu i relativních intenzitách charakteristických pásů pro astaxantin. Ovšem trend vývoje změn není shodný, Kaczor a Baranska (2011) o tom předkládají vyčerpávající studii. Za pokojové teploty a excitační vlnové délce 1064nm, syntetický astaxantin se projevuje silnými charakteristickými pásy 1512  $\text{cm}^{-1}$  (C=C) a 1157 (C-C), zatímco *Haematococcus pluvialis* se liší v C=C - 1520 a některých slabších signálech.

Jorge-Villar a kol. (2007) prováděli spektroskopické analýzy vrstev travertinu jezera Troll, Svalbard, Špicberky. Tento marsovský analog poskytl vzorky různého stáří s barevným vrstvením do růžova, do zelena, do žluta, do hněda a do čistě i špinavě bíla, patrně zbarvených přítomností pigmentovaných mikroorganických kolonií. Ačkoli nebyly nalezeny morfologické fosilní zbytky, Ramanova detekce biomarkerů prokázala přítomnost biomolekul - biomarkerů a doložila, že analyzované pigmenty nebyly degradovány vůbec nebo jen málo. Barevné vrstvy analyzovali excitačními vlnovými délkami 785 nm i 514 nm a dospěli k identifikaci karotenu, chlorofylu, chlorofylu podobné organické látky a scytoneminu. Ramanova spektra tytéž látky, scytoneminu, se lišila použitím odlišných excitačních vlnových délek, 785 a 514 nm. Nejvýraznější rozdíly se jeví v relativních intenzitách charakteristických pásů a jejich posunu v rámci regionu vlnočtů, např. nejsilnější pás při 785 nm

v  $1590\text{ cm}^{-1}$  se při měření s  $514\text{ nm}$  posunul na  $1599\text{ cm}^{-1}$  a objevil se „jeho“ velmi silný shoulder (překryv) na  $1591\text{ cm}^{-1}$ . Identifikace takových sloučenin je zvláště zkomplikována přítomností jiných sloučenin, které se také projeví ve spektroskopické analýze a způsobují překryvy specifických Ramanovských pásů nebo interferencí. Chlorofyl a jemu strukturně podobnou látku identifikovali Jorge-Villar a kol. (2007) aplikací laseru o vlnové délce  $785\text{ nm}$ , pomocí  $514\text{ nm}$  se chlorofyl nikdy nepodařilo detekovat. Astaxantin přiřadili ke spektru s hlavními pásy  $1508, 1154, 1005\text{ cm}^{-1}$ . Dále detekovali  $\beta$ -karoten,  $1515, 1155, 1003$ , a pásy  $1522, 1157$  a  $1007\text{ cm}^{-1}$  jsou charakteristické pro lutein či jeho izomer zeaxantin.

Bakteriochlorofyl a je hlavním primárním pigmentem purpurových bakterií, sloužící jim k fotosyntéze. Avšak buňce může sloužit i k jiným účelům. V buněčných chromatoforech zaujímá pozice v proteinových komplexech a i jejich absorpční spektra ukazují, že pigmentová stadia *in vivo* nejsou stálá. Z toho vyplývá, že Ramanovská spektra takových pigmentů přírodních vzorků by se měla navzájem lišit. Hayashi a kol. (1983) porovnávali Ramanova spektra chromatoforů vybraných druhů purpurových bakterií (např.: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospseudomonas palustris*) lišících se v absorpčních maximech. Ramanovská spektra (excitační vlnová délka laseru  $363,8\text{ nm}$ ) se mírně lišila vzorek od vzorku. Silný pás byl naměřen kolem  $1610\text{ cm}^{-1}$  a další pásy v regionech  $1670-40, 1530-20, 1350, 1285, 1115$  a  $1060\text{ cm}^{-1}$ . Významné rozdíly, posuny Ramanovských pásů ve spektru, byly zaznamenány v regionu  $1650 - 1620\text{ cm}^{-1}$ , signál vibrace karbonylové skupiny ( $\text{C}=\text{O}$ ), jsou odrazem lišícího se blízkého okolí bakteriochlorofylu (bchl), se kterým bchl tvoří komplexy v chromatoforech (Hayashi a kol., 1983).

Dva typy flexirubínu detekovali Jehlička a kol. (2013b) v bakteriální biomase pomocí Ramanovy spektroskopie. Kolonie bakterií *Flavobacterium johnsoniae* a *Flexibacter elegans* byly analyzovány v lyofilizovaném stavu. Analyzovány byly také buněčné extrakty. Výsledky poskytly mikrospektrometry vybavené lasery o třech vlnových délkách ( $514,5; 785$  a  $844\text{ nm}$ ). Jehlička a kol. (2013b) dokázali, že Ramanova spektroskopie je metodou, která je schopna flexirubíny v bakteriální biomase identifikovat a také je odlišit od přítomných karotenoidů. Dále Jehlička a kol. (2013b) ve své práci uvádí seznam ramanovských pásů vybraných karotenoidů, měřených ve formě čisté látky (standardu). Měření neoxantinu a myxoxanthofylu byla úspěšná pomocí laseru o excitační vlnové délce  $457\text{ nm}$ . Astaxantinu, zeaxantinu, luteinu, fukoxantinu, kanthaxantinu a echinenonu pomocí laserového svazku o  $514,5\text{ nm}$ .

## 7 PŘEHLED A TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ STUDOVANÝCH MIKROORGANISMŮ

V tabulkách 2 a 3 jsou jednotlivé druhy zařazeny v taxonomickém systému. Celkem bylo studováno 20 druhů mikroorganismů. V tab. 2 jsou prokaryotní mikroorganismy a v tab. 3 eukaryotní (algaebase.com, 3.10.2012).

**Tab. 1 Taxonomická hierarchie dle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Madigan a kol., 2012)**

Doména	Kmen	Třída	Řád	Čeleď	Druh
Archaea	Euryarcheota	Halobacteria	Halobacteriales	Halobacteriaceae	<i>Haloarcula vallismortis</i> Gonzales, Gutiérrez et Ramirez 1978; ATCC 29715
					<i>Halobacterium</i> NRC1 *; ATCC 700922
					<i>Halobacterium</i> R1 *; DSM 671
					<i>Halorubrum sodomense</i> Oren 1983; ATCC 33755
Bacteria	Cyanobacteria	Cyanophyceae	Synechococcales	Chamaesiphonaceae	<i>Chamaesiphon polymorphus</i> Geitler 1925; CCALA 37
					<i>Chroococcus</i> sp.; CCALA 701 (pozn.: zelený)
					<i>Chroococcus</i> sp.; CCALA 702 (pozn.: červený)
			Oscillatoriales	Oscillatoriaceae	<i>Oscillatoria limnetica</i> Lemmermann 1900
					<i>Oscillatoria sancta</i> Kützing ex Gomont 1892; CCALA 135
			Oscillatoriales	Phormidiaceae	<i>Phormidium cf. subfuscum</i> Kützing ex Gomont 1892; CCALA 154
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	<i>Rhodospirillum rubrum</i> (Esmarch 1887) Molisch 1907; DSMZ 107
		Gammaproteobacteria	Chromatiales	Ectothiorhodospiraceae	<i>Ectothiorhodospira marismortui</i> Oren 1990; DSM 4180
	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i> Cohn 1872; ATCC 4698
	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Crenotrichaceae	<i>Salinibacter ruber</i> M31; DSM 13855

\* *Halobacterium salinarum* opr. (Harrison a Kennedy 1922) Elazari-Volcani 19



**Tab. 2 Taxonomická hierarchie dle algaebase.org.**

Doména	Říše	Kmen	Třída	Čeď	Druh
Eukarya	Chromista	Ochrophyta	Bacillariophytaceae	Diadesmidaceae	<i>Diadesmis gallica</i> Smith 1857; CCALA 766
			Xanthophyceae	Botrydiopsisidaceae	<i>Botrydiopsis alpina</i> Vischer 1945; CCALA 217
	Plantae	Rhodophyta	Florideophyceae	Balbaniaceae	<i>Balbiania investiens</i> (Lenormand ex Kützing) Sirodot 1876; SAG 50.93
			Rhodophytaceae	Porphyridaiceae	<i>Porphyridium cruentum</i> Nägeli 1849; CCALA 415
		Chlorophyta	Chlorophyceae	Dunaliellaceae	<i>Dunaliella parva</i> Lerche 1937
				Haematococcaceae	<i>Haematococcus pluvialis</i> Flotow 1844; CCALA 357

## 8 METODIKA

### 8.1 Kultivace mikroorganismů

Kultury byly pořízeny ze sbírek: Culture Collection of Autotrophic Organisms (CCALA) Botanického Ústavu Akademie Věd ČR v Třeboni; Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) Liebnižského ústavu; American Type Culture Collection (ATCC); Sammlung von Algenkulturen Göttingen (SAG) univerzity v německém Goettingenu.

**Tab. 3 Kultivační podmínky jednotlivých mikroorganismů. Šedá pole značí kultury, jež byly kultivovány v laboratoři katedry ekologie, Viničná 7, Praha 2. Ostatní nebylo možné nebo nebylo potřeba kultivovat.**

Druh	Kultivační podmínky (bujóny)
<i>Balbiania investiens</i>	WC médium; <a href="http://www.straininfo.net/strains/822176/browser">http://www.straininfo.net/strains/822176/browser</a>
<i>Botrydiopsis alpina</i>	BBM médium; Bold, 1949
<i>Diadismis gallica</i>	BBM médium; Bold, 1949
<i>Dunaliella parva</i>	SL-11
<i>Ectothiorhodospira marismortui</i>	Oren a kol., 1989
<i>Haloarcula vallismortis</i>	Oren a kol., 1996
<i>Halobacterium</i> NRC1	Oren a kol., 1996
<i>Halobacterium</i> R1	Oren a kol., 1996
<i>Halobacterium sodomense</i>	Oren, 1983
<i>Haematococcus pluvialis</i>	BBM médium; Bold, 1949
<i>Chamaesiphon polymorphus</i>	BBM médium; Bold, 1949
<i>Chroococcus</i> sp. (pozn.: zelený)	BBM médium; Bold, 1949
<i>Chroococcus</i> sp. (pozn.: červený)	BBM médium; Bold, 1949
<i>Micrococcus luteus</i>	<a href="http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/E6FA2163B72E4DCD880719A2612F2C92.ashx">http://www.lgcstandards-atcc.org/~media/E6FA2163B72E4DCD880719A2612F2C92.ashx</a>
<i>Oscillatoria limnetica</i>	SL-11
<i>Oscillatoria sancta</i>	BBM médium; Bold, 1949
<i>Phormidium</i> cf. <i>Subfuscum</i>	BBM médium; Bold, 1949
<i>Porphyridium cruentum</i>	Porphyridium médium; Brody a Emerson, 1959
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Rhodospirillaceae médium 27; <a href="http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium27.pdf">http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium27.pdf</a>
<i>Salinibacter ruber</i> M31	Antón a kol., 2002

#### 8.1.1 Kultivace halofilů, příprava kultivačního média SL-11

Kultury *Dunaliella parva* a *Oscillatoria limnetica* – inokulum na agaru a v tekutém médiu, byly věnovány panem profesorem Aharonem Orenem (Hebrew University of Jerusalem). Jejich kultivace probíhala v médiu SL-11, dokud biomasa nenarostla do potřebného množství (viz obr. 2).

### SL-11:

Makroprvky:

56,3g NaCl

1,34g KCl

11,02g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

13,84g MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

Zvlášť připravit a přimíchat před sterilizací do roztoku výše: 2,9g/100ml (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)

→ doplnit H<sub>2</sub>O na 800ml

0,6g/1l Fe citrát + 0,6g/1l kyselina citrónová

→ z toho 10ml do 1l media

Mikroprvky - následujících 6 roztoků – každý - 1ml do 1l media:

3,6g/l CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O

7,5g/l MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O

150g/l NaNO<sub>3</sub>

3,6g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,1g/l Na . EDTA

2g/l NaCO<sub>3</sub>

Mikroprvky A5 → 1ml na 1l media:

0,22g/l Na molybdenan

1,18g/l ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O

2,86g/l MnCl<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O

0,07g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0,2g/l CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O

Mícháme na magnetické mírně teplé plotně v erlenmayerově baňce o objemu 2l. Kyselost vyvážíme pomocí HCl a KBr na pH 7 a můžeme sterilovat v autoklávu. Po vychladnutí plníme do menších (100ml) sterilizovaných baněk a sterilní pipetou přeneseme inokulum. Naočkované baňky byly umístěny na teplé slunečné místo (na okně) a po 2 týdnech byl okem patrný nárůst biomasy.

Pozn.: biomasu halofilních Archaea poskytl prof. Oren v lyofilizovaném stavu, tj. ve stavu již připraveného k měření.

### 8.1.2 Kultivace nehalofilů

Kultivované nehalofilní mikroorganismy byly vybrány dle očekávání přítomnosti rozličných pigmentů. Linda Nedbalová zvolila jednotlivé kmeny a jejich kultury mi zprostředkovala především z Třeboňské sbírky. Přípravu všech kultivačních médií zde neuvádím, neboť se jedná o běžná média a jejich recepty jsou dostupné na webových stránkách distributorů kultur. Často používané BBM médium (Bold's Basal Medium) je základní médium pro kultivaci terestrických řas a sinic. Výčet kultivovaných kultur s přiřazenými kultivačními médii je uveden v následující tabulce (Tab. 1). Po dvou 2 až 6 týdnech bylo dostatek biomasy, která byla sklizena a připravena pro měření.



**Obr. 8 Kultivace v laboratoři. Fotografie zobrazuje barevnost napěstovaných kultur.**

### 8.2 Příprava vzorků pro Ramanovskou a HPLC analýzu

- 1) Centrifugace biomasy pro ramanovské měření živých kultur. Po centrifugaci vzorku byla biomasa přenesena do plastových eppendorf mikro-zkumavek o objemu 1,5 ml. Vzorky byly znovu centrifugovány, aby byla odstraněna přebytečná voda.
- 2) Lyofilizace biomasy pro spektroskopické měření měření a uchování v mrazicím boxu pro možnost opakovaného měření. Pro lyofilizaci byly vzorky připraveny stejným postupem jako v prvním případě. Lyofilizace je sublimační vysušení, které zajistí konzervaci vzorku a probíhá v lyofilizátoru.

- 3) Extrakce pigmentů z biomasy a příprava vzorků pro měření: Karotenoidy se z biomasy běžně extrahují organickými rozpouštědly. Nejběžněji užívaným polárním rozpouštědlem je aceton. Běžně se používá také metanol nebo jiný alkohol s krátkým uhlíkovým řetězcem. Nejvíce používanými nepolárními rozpouštědly jsou uhlovodíky jako hexan a cyklohexan. Běžně se rozpouštědla kombinují (Oren, 2011). Podle Barnavid a kol. (2007) byla provedena extrakce v temnu za pomoci přidaného metanolu a acetonu v objemovém poměru 1:1. Biomasa s rozpouštědly byla takto ponechána ve skleněných zkumavkách v temnu po dobu 2 hodin a následně zcentrifugována (4000 RPM, 20min.) pro oddělení buněk od pigmentem zbarvené tekutiny. Pigmentový extrakt byl zhuštěn vysoušením bezvodým dusíkem do malého objemu pár kapek. V eppendorf zkumavkách z temného skla byly vzorky připraveny k okamžitému měření.
- 4) Extrakce pigmentů pro HPLC analýzu probíhala v MBÚ AV ČR, Opatovický Mlýn, Třeboň. Pro analýzu jsme měli k dispozici v mrazicím boxu uchovávané lyofilizované vzorky v plastových eppendorff zkumavkách. Vzorky o průměrném objemu 0,5 ml bylo nutno dále zpracovat. Buněčnou stěnu jsme rozbili, tak že jsme jednotlivé vzorky třeli s mořským pískem a acetonem v třecí misce. Pro separaci jsme ve skleněných zkumavkách centrifugovali při 4000 RPM po dobu 10 min. Separovanou tekutinu jsme slili a usazený, stále lehce pigmentem zbarvený písek, jsme zalili acetonem a protřepali na vortexu a následně aplikovali separaci v centrifuze pro získání zbylého pigmentu.
- 5) Finální příprava vzorků pro Ramanovskou spektroskopickou analýzu:
  - vzorky I.typu (živé kultury) byly nanosen za pokojové teploty na podložní sklíčko a jedním nebo dvěma tahy „špachtlí“ rozetřen; vzorky I.typu byly využity především pro počáteční „screening“
  - vzorky II.typu (lyofilizované) – byly před měřením přeneseny z mrazničky do lednice, aby při nanesení na podložní sklíčko měly teplotu kolem 4°C
  - vzorky III.typu (extrakty) – malé množství tekutiny po kapkách bylo nanášeno do vypuklé aluminiové destičky, po vyschnutí se mohlo měřit

### 8.3 Instrumentace a podmínky měření Ramanovské analýzy

Laboratorní mikrospektrometr Renishaw In Via Reflex vybavený CCD detektorem a dvěma excitačními paprsky. Argonový zelený laser o vlnové délce 514,5 nm s maximálním výkonem 20 mW (tj. 100%) a diodový červený laser o vlnové délce 785 nm s maximálním výkonem 300 mW. Přístroj umožňuje celou řadu nastavení pro vytvoření co možná nejideálnějších podmínek měření daného vzorku. Z nejdůležitějších se jedná o nastavení počtu měření, doby jednotlivých měření a intenzitu laseru. U každého měření je možné vybrat si libovolnou spektrální oblast z intervalu 150-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Pro kalibraci byly použity diamantové, silikonové a polystyrenové standarty. K

spektrometru připojený mikroskop disponuje čtyřmi objektivy s maximálně stonásobným přiblížením.

Ramanovská spektra byla pořízena pomocí laboratorních přístrojů: mikro-spektrometrem Renishaw In Via Reflex vybaveným CCD detektorem a pracujícím se dvěma excitačními paprsky a spektrometrem s Fourierovou transformací FT Raman Nexus. Laboratorní měření mikro-spektrometrem byla provedena panem prof. Jehličkou (PřF UK, ÚGMNZ). Měření FT spektrometrem provedl pan doc. Ivan Němec (PřF UK, katedra anorganické chemie).

Vzorky byly přednostně měřeny excitačním laserem o vlnové délce 514,5 nm. Pokud bylo měření neúspěšné, přistoupilo se k užití laseru o 785 nm a následně se měřilo excitací 1064 nm.

#### 8.3.1 měření za použití vlnové délky 514,5 nm

Laboratorní mikrospektrometr Renishaw In Via Reflex užitím vlnové délky excitačního paprsku ( $\lambda$ ) 514,5 nm (zelený argonový laser) poskytl Ramanovská spektra při stanovených podmínkách

- parametry měření I.řádu (tj. spektrální oblast v intervalu 200-2000  $\text{cm}^{-1}$ ): expirační doba 20s, intenzita laseru 0,5 – 1%, akumulace 5 – 15x, rozlišení 2  $\text{cm}^{-1}$
- parametry měření II.řádu (tj. spektrální oblast v intervalu 1900-3200  $\text{cm}^{-1}$ ): expirační doba 20s, intenzita laseru 1 - 5%, akumulace 5 – 15x, rozlišení 2  $\text{cm}^{-1}$
- pro předběžná měření byly využity vzorky I.typu, dále byly analyzovány vzorky II.a některé i III.typu
- měření jednoho vzorku bylo provedeno 4x na různých místech analytu nebo podle potřeby i vícekrát.

#### 8.3.2 měření za použití vlnové délky 785 nm

Laboratorní mikrospektrometr In Via Renishaw Reflex za užití vlnové délky excitačního paprsku 785 nm (červený diodový laser) neposkytl žádná Ramanovská spektra při stanovených podmínkách: objektiv 50x ?

- Parametry měření a finální úprava vzorků byly stejné jako při použití excitačního paprsku ( $\lambda$ ) 514,5 nm

#### 8.3.3 měření za použití vlnové délky 1064 nm

Měření provedl pan doc. Ivan Němec (PřF UK, katedra anorganické chemie). Nicolet 6700 FTIR spektrometr vybavený FT Raman Nexus s NG –YAG laserem o vlnové délce 1064 nm

- parametry měření jediného řádu v intervalu 0 až 4000  $\text{cm}^{-1}$ : intenzita laseru 0,3 – 0,7 W, počet akumulací 215
- pouze vzorky II.typu, tj. v lyofilizovaném stavu
- měření jednoho vzorku bylo provedeno 3x se změnou intenzity laseru: 0,3; 0,5 a 0,7 W

Spektra ukládaná ve formátu SPC byla následně analyzována v programu GRAMS AI (Version 8.0, Thermo electron corporation). Pro vyhodnocení výsledků, které jsou zde prezentovány, pak bylo vybráno pouze jedno nejzdařilejší spektrum ke každému vzorku.

#### **8.4 Instrumentace a podmínky měření HPLC/UV-VIS analýzy**

Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) systému Agilent 1100 Series – Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) poskytla separaci jednotlivých pigmentů, které byly detekovány pomocí UV-VIS fotometrickým detektorem s diodovým polem (Agilent DAD 61315B).

Na termostatové (35°) koloně Phenomex Luna 3 $\mu$  C8 (2) 100 Omgstremu s dvousložkovým systémem rozpouštědel (70% metanol + 30% octan amonný, 100% metanol) byly pigmenty rozděleny podle upravené metody dle Van Heukel a Thomas (2001).

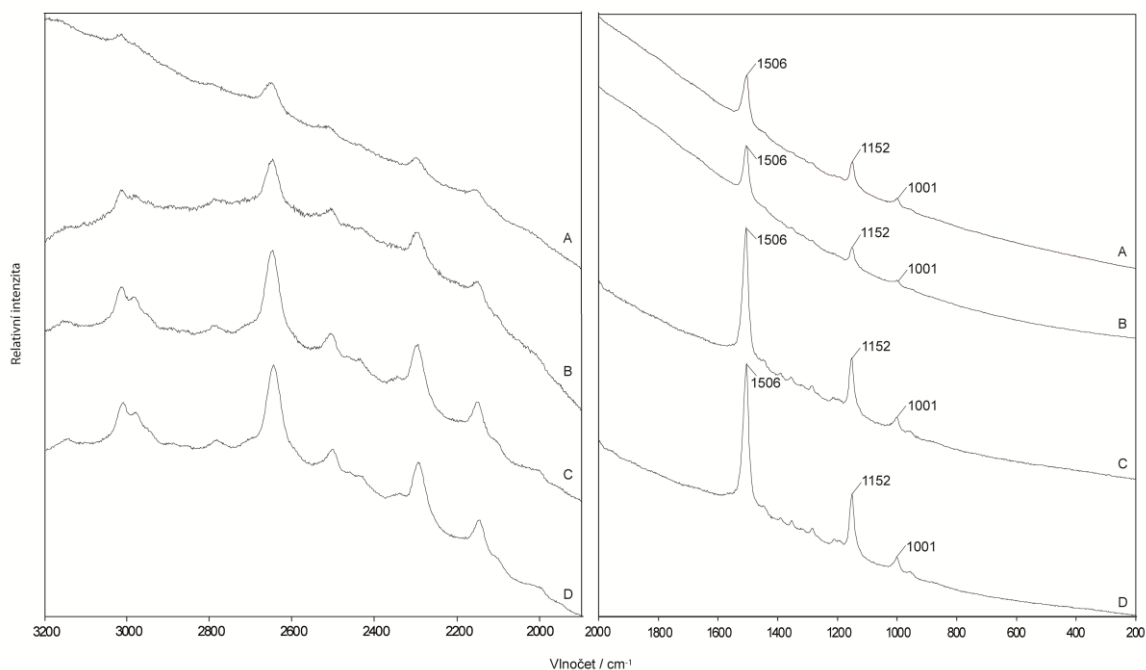
Data byla zpracována v programu Agilent ChemStation (32) při nastavení absorbance na 440 nm. Zobrazení při této absorbanci odhaluje peaky chlorofylu,  $\beta$ -karotenu i sekundárních karotenoidů.

Měření bylo provedeno panem Ing. Jiřím Kopeckým v MBÚ AV ČR, pracoviště Opatovický Mlýn, sektor fototrofních mikroorganismů, Třeboň.

## **9 VÝSLEDKY**

Výsledková část zahrnuje 2 podkapitoly, Ramanovskou analýzu a HPLC/UV-VIS analýzu. Výsledky měření, ramanovská spektra a chromatogramy, jsou řazeny podle taxonomické hierarchie, dle níž jsou analyzované organismy rozříděny v následujících tabulkách 2 a 3. Ke každému spektru je přiřazena zjednodušená tabulka přehledu hlavních diagnostických pásů. Referenční tabulky s výčtem všech pásů získaných ramanovských signálů uvedených spekter se nalézají v příloze. Vyhodnocení výsledků HPLC/UV-VIS se zakládá na základě konzultace s Ing. Kopeckým (MBÚ AV ČR, sektor fofotrofních mikroorganismů, laboratoř řasové biotechnologie, Třeboň) a RNDr. Koblížkem (MBÚ AV ČR, sektor fofotrofních mikroorganismů, laboratoř fotosyntézy, Třeboň), jež se opírá o metodu dle Van Heukel a Thomas (2001).

## 9.1 Výsledky ramanovské analýzy



**Obr. 9** Ramanovská spektra halofilních Archaea – řád Halobacteriales. **A** *Haloarcula vallismortis*, **B** *Halorubrum sodomense*, **C** *Halobacterium* NRC1, **D** *Halobacterium* R1. Všechna spektra byla nahrána při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 1% (0,245 mW) a expirační době 10s po 10 akumulací. Vzorky byly obdrženy a měřeny ve formě lyofilizované buněčné pelety.

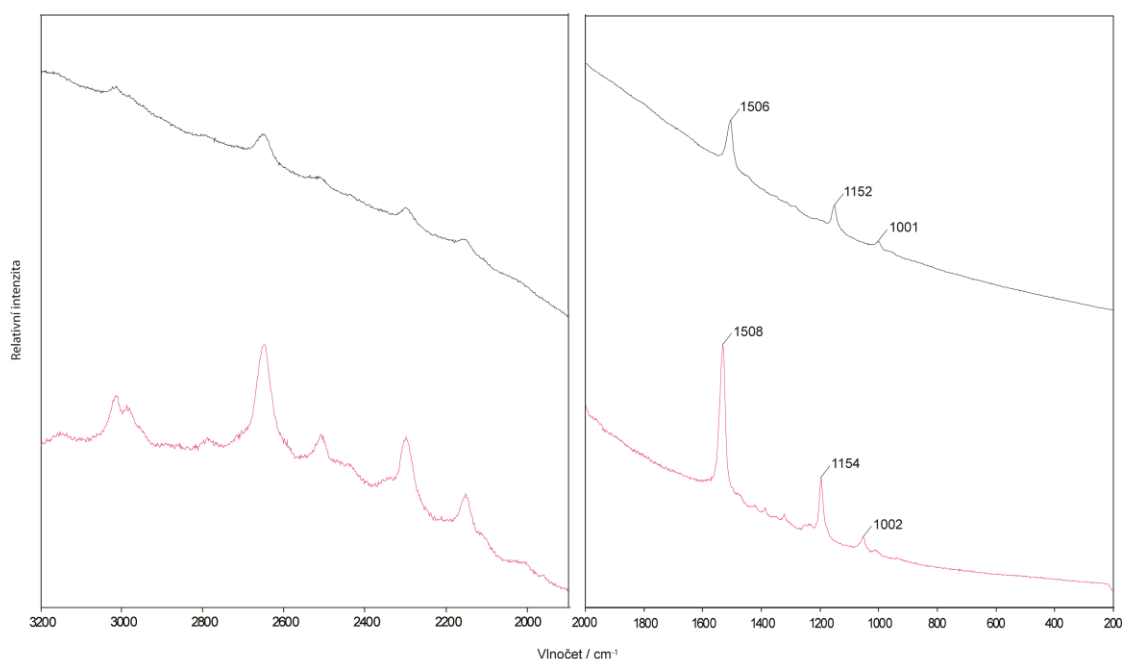
V regionu vlnočtu 200 – 2000  $\text{cm}^{-1}$  se všechny halofilní Archaea projeví především třemi výraznými signály. Silné pásy 1506, 1152 a slabý až středně silný signál, pás 1001. Jsou to vibrační módy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$ , tedy valenční vibrace C=C, C-C a deformační vibrace C=CH. Dle srovnání s literaturou (např. Marshall a kol. (2007) prezentuje hlavní pásy bakterioruberinu 1505, 1152, 1000) vidíme, že se jedná o typický projev karotenoidu C50, bakterioruberinu. Jehlička a kol. (2013a) po měření čisté kultury *Haloarcula vallismortis* také získávají spektrum bakterioruberinu s charakteristickými pásy 1506, 1151, 1000. Pro tyto extremofilní mikroorganismy je typická produkce pigmentů: bakterioruberin a bakteriorodopsin. Ten druhý je však akumulován v nízkých koncentracích. Oblastí druhého řádu (region 1800 – 3200  $\text{cm}^{-1}$ ) je v tomto případě měření laserem disponujícím vlnovou délkou 514,5 nm, oblastí především overtonů a kombinačních tónů. Podle Okamoto a kol. (1994) a Withnall a kol. (2003) hlavní pásy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$  v rezonančním módu způsobují charakteristické overtony a kombinační tóny v oblasti 2150 – 2650  $\text{cm}^{-1}$ . Široký, slabý až středně silný pás, ale v důsledku jevu zmíněného v předchozí větě nepřilíš výrazný, kolem 3015 spadá do regionu 2800 – 3100  $\text{cm}^{-1}$ , který je připisován



především proteinům (Maquelin a kol., 2002). Ve spektrech prvního řádu také nalézáme projevy přítomných buněčných proteinů v podobě slabých pásů oblasti kolem 1665 (Goodwin a kol., 2006), 1445 – 1460 (Fendrihan a kol., 2009) a oblast regionu vlnočtů 1230 – 1295  $\text{cm}^{-1}$  (Goodwin a kol., 2006). Prokaryotní buňka je složena z proteinů, nukleonových kyselin, tuků, polysacharidů a dalších sloučenin o malém množství (méně než 1% suché váhy). Archeální buňky neobsahují mastné kyseliny.

**Tab. 4 Hlavní diagnostické pásy halofilních Archaea, řádu Halobacteriales.**

$(\lambda) 514,5 \text{ nm}$			
<i>Haloarcula vallismortis</i>	<i>Halobacterium NRC1</i>	<i>Halobacterium R1</i>	<i>Halorubrum sodomense</i>
1001 w	1001 m	1001 m	1001 m
1152 m	1152 s	1152 s	1152 s
1506 s	1506 vs	1506 vs	1506 s



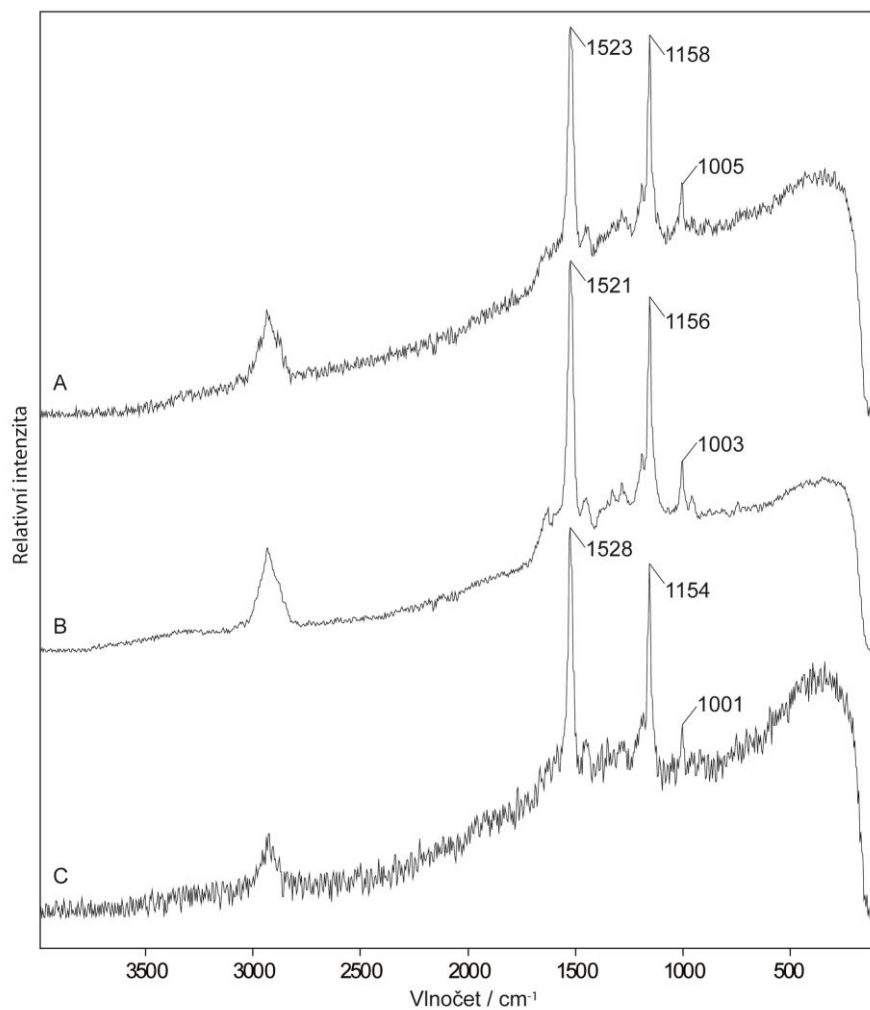
**Obr. 10 Srovnání ramanovských spekter lyofilizované biomasy mikroorganismu *Haloarcula vallismortis* (černě) a pigmentového extraktu z této biomasy (červeně). Podmínky měření extraktů byly stejné jako měření lyofilizované biomasy halofilních archea (viz výše).**

Na příkladu *Haloarcula vallismortis* je na první pohled zřejmé, že spektrum extrahovaného pigmentu se shoduje se spektrem biomasy a tedy při analýze spekter extraktů vzorků mikroorganismů řádu Halobacteriales bychom dospěli ke stejnému závěru jako ze spekter lyofilizované biomasy, která extrakcí neprošla. Charakteristické pásy 1508, 1154 a 1002 odpovídají bakterioruberinu. Oblast druhého řádu odpovídá overtonům a kombinačním tónům.

**Tab. 5 Hlavní diagnostické pásy spekter extrahovaných pigmentů z lyofilizované biomasy halofilních Archaea.**

(λ) 514,5 nm			
<i>Haloarcula vallismortis</i>	<i>Halobacterium NRC1</i>	<i>Halobacterium R1</i>	<i>Halorubrum sodomense</i>
1002 m			1002 m
<b>1154 s</b>	1151 m	1152 m	<b>1153 s</b>
<b>1508 vs</b>	<b>1506 s</b>	<b>1509 s</b>	<b>1507 vs</b>

BACTERIA:



**Obr. 11 Ramanovská spektra vybraných Cyanobacterií (sinic), řádu Synechococcales. A *Chamaesiphon polymorphus*, B *Chroococcus* sp. „zelený“, C *Chroococcus* sp. pozn.: červený. Excitační vlnová délka laseru FT Ramanova spektrometru je 1064 nm. Vzorky A, B byly pořízeny při síle laseru 0,7 W, spektrum C bylo pořízeno při síle 0,5 W. Počet akumulací 512.**

Jednotlivé Cyanobacterie byly měřeny laboratorním mikrospektrometrem InVia Reflex, nejprve byla použita excitační vlnová délka 514,5 nm a posléze 785 nm. Vzorky neposkytly Ramanovský signál, při použití těchto vlnových délek. Měření bylo úspěšné FT Ramanovým spektrometrem za použití excitační vlnové délky 1064 nm.

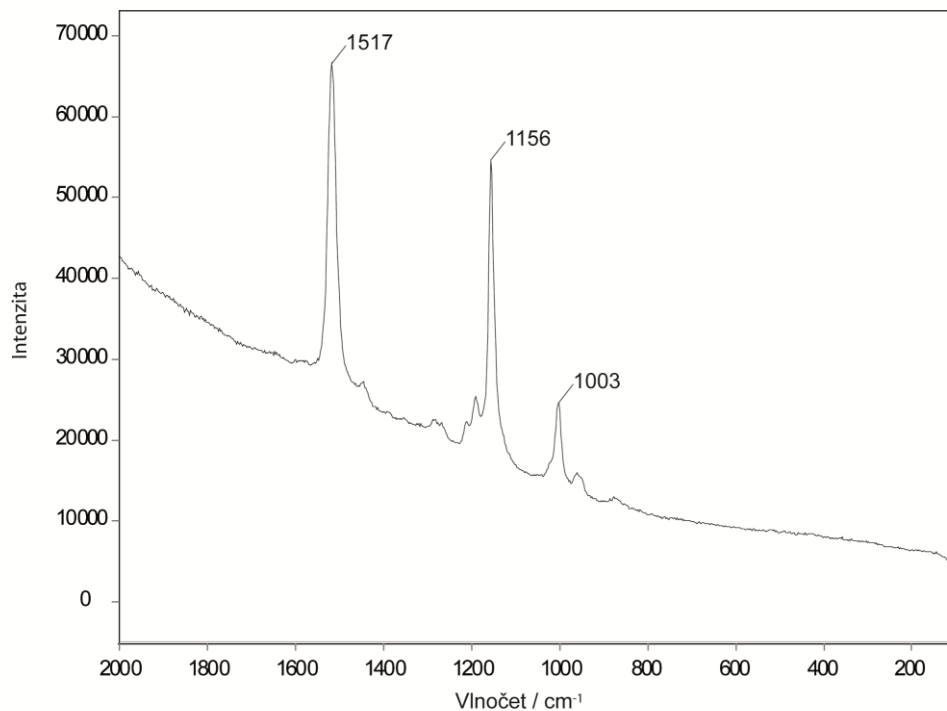
Pro tato spektra platí, že vidíme 3 hlavní pásy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ , a  $\nu_3$ , které se nacházejí v oblasti charakteristické pro projev karotenoidů a nazývají se takzvaným otiskem prstu karotenoidů. Pro zde analyzované Synechococcales se  $\nu_1$  pohybuje v regionu 1521 – 1528,  $\nu_2$  1154 – 1158 a  $\nu_3$  1001 – 1005  $\text{cm}^{-1}$ . Dle Collins a kol. (2001) – excitace 523 nm – hlavní pásy luteinu jsou 1523, 1157, 1006 a zde, ve spektru A, *Chamaesiphon polymorphus* (1523, 1158, 1005) nalézáme shodu. Jiná Ramanovská spektra luteinu: např., Jehlička a kol. (2013b) prezentují hlavní pásy na pozicích 1524, 1158, 1007  $\text{cm}^{-1}$ . Podle Schaffer a kol. (1991) se charakteristický vibrační mód  $\beta$ -karotenu  $\nu_1$  přírodních vzorků nachází v regionu 1531 – 1515  $\text{cm}^{-1}$  Tyto sinice akumulovaly lutein nebo  $\beta$ -karoten v majoritním množství. Dále ve spektrech Synechococcales vidíme slabý pás na pozici 1192 (spektrum A), 1190 (B), 1183 (C), který je druhým pásem oblasti 1100 – 1200, ve které se právě vyskytují 2 pásy, což je podle Nakamuro a kol. (2001) typické pro pigmenty typu  $\beta$ -karoten a lutein. Spektrum B, *Chroococcus sp.* „zelený“, vykazuje poměrově nejnižší stupeň šumu a tím jsou viditelné i slabší pásy. Díky tomu snad vidíme projev fykobilinů. Pozorujeme shodu v pozicích 4 pásů z 8 prezentovanými Edwards a kol. (2000), které přisuzuje fykobilinům.

V oblasti vlnočtů blízké se 3000  $\text{cm}^{-1}$  se nachází široký pás (s vrcholy: A 2938, B 2937, C 2929), který tak vznikl splynutím pravděpodobně tří nebo čtyř vibračních módů. Podle Jehličky a kol. (2013a) 3 vibrační módy v tomto regionu náleží vibračním skupiny CH<sub>2</sub> a 1 mód skupině CH<sub>3</sub> (pozn: v rámci detekce salinixantinu). Podle Maquelin a kol. (2002) valenční vibrace CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> a aromatického kruhu (C=C-H), které se ve spektru projevují pásy v oblasti 2800 – 3100, dokládají přítomnost proteinů.

Je možné konstatovat, že jsme detekovali směs karotenoidů.

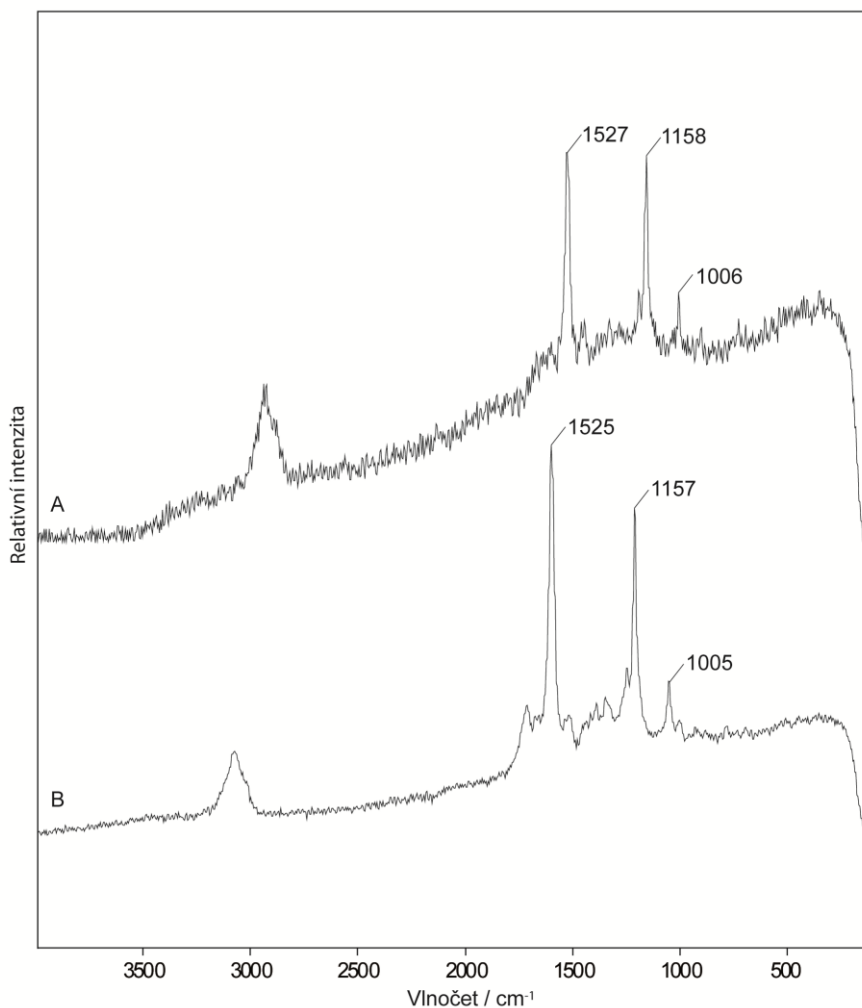
**Tab. 6** Spektrální pásy Cyanobacterií třídy Synechococcales.

(λ) 514,5 nm		
<i>Chamaesiphon polymorphus</i>	<i>Chroococcus sp.</i> "zelený"	<i>Chroococcus sp.</i> "červený"
1005 m	1003 m	1001 m
<b>1158 vs</b>	<b>1156 vs</b>	<b>1154 vs</b>
<b>1523 vs</b>	<b>1521 vs</b>	<b>1528 vs</b>



**Obr. 12 Ramanovské spektrum halofilní Cyanobacteria –*Oscillatoria limnetica*. Spektrum bylo nahráno při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 1% (0,245 mW) a expirační době 10s po 10 akumulací. Vzorek byl měřen ve formě lyofilizované buněčné pelety.**

Halofilní *Oscillatoria limnetica* se projevila ve spektru dvěma velmi silnými pásy 1517, 1156 a středně silným pásem 1003. Výčet hlavních pásů je shrnut v tabulce 7 společně s dalšími Oscillatoriales. Výrazné pásy se od naměřeného standardu  $\beta$ -karotenu (1008, 1156, 1513 podle Alajtal a kol., 2010) liší drobným posunem. Převážná většina slabých pásů v oblasti 1190 – 1352  $\text{cm}^{-1}$  také odpovídá  $\beta$ -karotenovému standardu. Např. Villar a kol. (2007) detekovali  $\beta$ -karoten z přírodních vzorků s hlavními pásy 1515, 1155, 1003. Ve spektru *Oscillatoria limnetica* vidíme vibrační módy, které jsou projevem  $\beta$ -karotenu. Chlorofyl není detekovatelný zeleným laserem, tj. touto excitační vlnovou délkou, 514,5 nm (CIT).



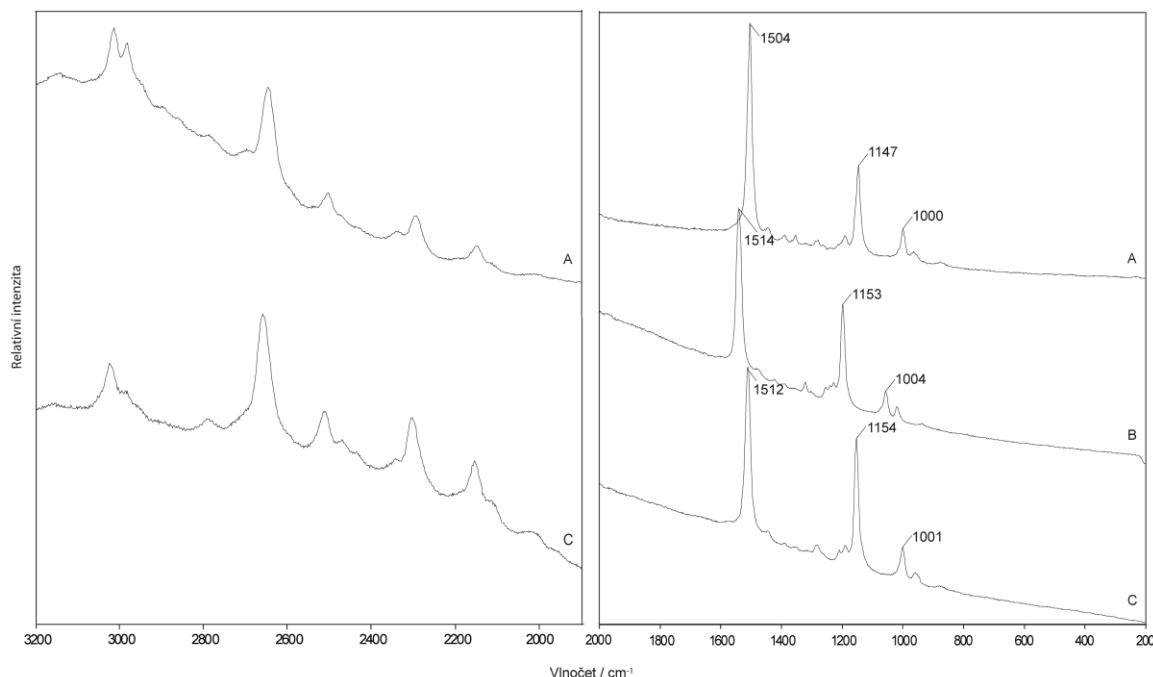
**Obr. 13 Ramanovská spektra Cyanobacterií řádu Oscillatoriales. A *Oscillatoria sancta*, B *Phormidium cf. Subfuscum*. Excitační vlnová délka laseru 1064 nm. Spektrum A bylo pořízeno při síle laseru 0,3 W, B při síle 0,7 W.**

Ramanovská spektra nehalofilních sinicí třídy Oscillatoriales se podařilo získat při excitační vlnové délce 1064 nm. Spektrum A (*Oscillatoria sancta*) bylo nahráno s výraznějším šumem oproti spektru B (*Phormidium cf. subfuscum*). Výrazné Ramanovské signály na pozicích 1527 a 1525, 1158 a 1157, 1006 a 1005, se od sebe téměř neliší. Jsou projevem charakteristických skupin karotenoidů. Vibrační mód  $\nu_1$  svou pozicí kolem 1525 odpovídá luteinu či velmi podobnému karotenoidu. Oblast 1100 – 1200  $\text{cm}^{-1}$  s výskytem 2 pásů je podle Nakamuro a kol. (2001) tím typická pro pigmenty typu  $\beta$ -karoten a lutein.

Pásky v oblasti 2800 – 3200 jsou přisouzeny především proteinům, stejně tak některé slabé pásky kolem 1665  $\text{cm}^{-1}$  (Goodwin a kol., 2006) a oblasti 1445 – 1460 (Fendrihan a kol., 2009) a 1230 – 1295 (Goodwin a kol., 2006).

**Tab. 7** Spektrální pásky Cyanobacterií třídy Oscillatoriales.

( $\lambda$ ) 514,5 nm	( $\lambda$ ) 1064 nm	
<i>Oscillatoria limnetica</i>	<i>Oscillatoria sancta</i>	<i>Phormidium cf. subfuscum</i>
1003 m	1006 w	1005 m
1156 vs	1158 vs	1157 vs
1517 vs	1527 vs	1525 vs



**Obr. 14** Ramanovská spektra bakteriálních kmenů – Proteobacteria, Bacteroidetes. A *Rhodospirillum rubrum*, B haloofilní *Ectothiorhodospira marismortui*, C haloofilní *Salinibacter* M31. Lyofilizované vzorky byly měřeny při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 1% (0,245 mW) a expirační době 10s po 10 akumulacích. Spektrum oblasti 1900 – 3200 nebylo pro bakterii *Ectothiorhodospira marismortui* pořízeno.

*Rhodospirillum rubrum* v oblasti 200 – 2000 se projevilo silnými pásky 1504, 1147 a pásem 1000 o střední intenzitě. *Ectothiorhodospira marismortui* 1514, 1153, 1004. Jsou to identifikační pásky

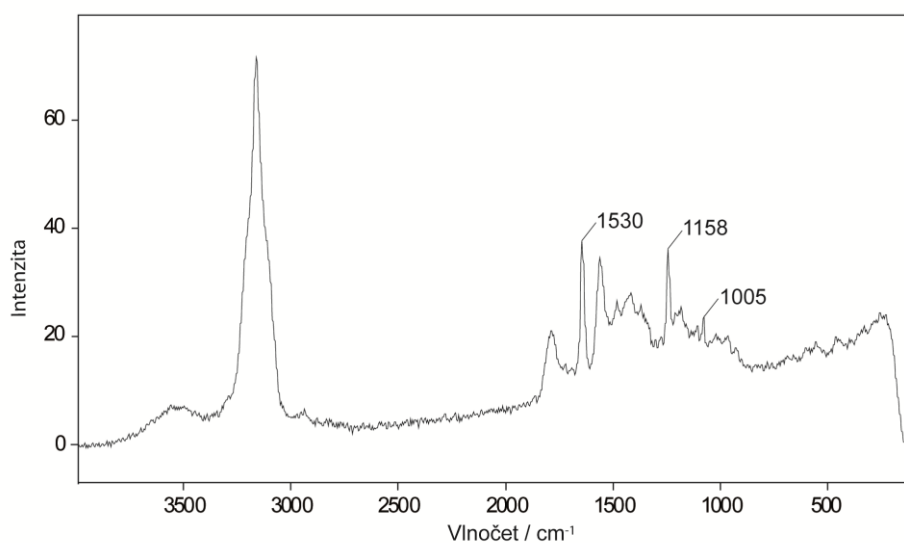
karotenoidů, vibrační módy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$ . v těchto případech se nacházejí kolem pozic  $\beta$ -karotenu, echinenonu či spirilloxanthinu, který bychom u těchto bakteriálních kmenů spíše očekávali. Jehlička a Oren (2013) analýzu endolitických kolonií halofilů s ramanovskými pásy 1510, 1151 a 1004 přisuzují spiriloxantinu či spiriloxantinu podobným pigmentům. *Salinibacter* M31 se projevil velmi silnými signály 1512, 1154 a středně silným 1001. spektrum by mělo vypovídat o přítomnosti salinixantinu, který tato halofilní bakterie akumuluje. Jehlička a kol. (2013a) salinixanthin popisuje hlavními pásy: 1512, 1155, 1003; při měření excitací 514,5 nm.

Oblast druhého řádu podléhá vlivu overtonů a kombinačních tónů. Podle Okamoto a kol. (1994) a Withnall a kol. (2003) hlavní pásy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$  v rezonančním módu způsobují charakteristické overtony a kombinační tóny v oblasti 2150 – 2650  $\text{cm}^{-1}$ . Široký pás kolem 3015 spadá do regionu 2800 – 3100  $\text{cm}^{-1}$ , který je připisován především projevu proteinů (Maquelin a kol., 2002).

**Tab. 8 Hlavní Ramanovské pásy získané z lyofilizované biomasy kmenů Proteobacteria a Bacteroidetes.**

(λ) 514,5 nm		
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	<i>Ectothiorhodospira marismortui</i>	<i>Salinibacter M31</i>
1000 m	1004 m	1001 m
<b>1147 s</b>	<b>1153 s</b>	<b>1154 vs</b>
<b>1504 vs</b>	<b>1514 vs</b>	<b>1512 vs</b>

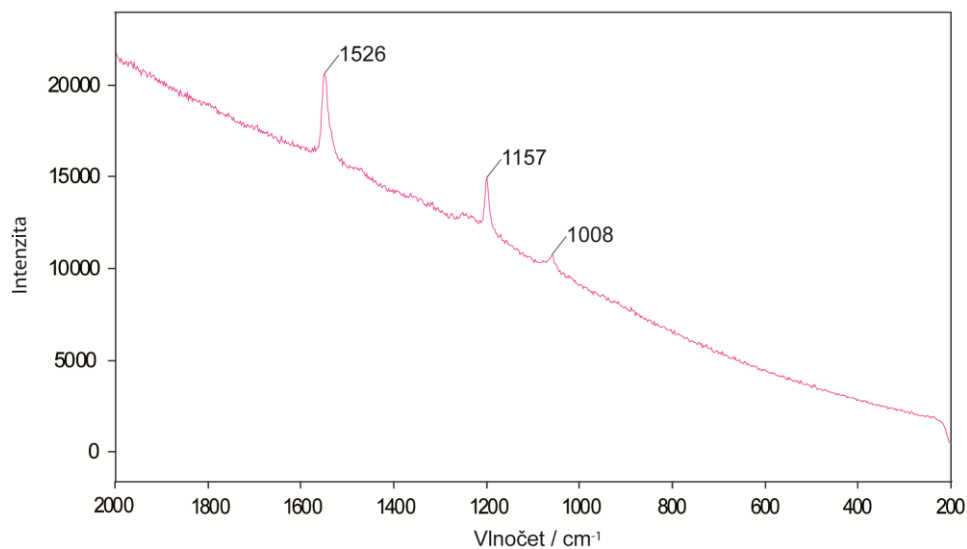




**Obr. 15** Spektrum halotolerantní Actinobacterie *Micrococcus luteus*. Excitační vlnová délka laseru FT Ramanova spektrometru je 1064 nm. Spektrum bylo pořízeno při síle laseru 0,7 W a počet akumulací skenů 215.

*Micrococcus luteus* se podařilo detekovat s hlavními diagnostickými pásy na pozicích 1530, 1158 a 1005  $\text{cm}^{-1}$ .

Rösch a kol. (2005) naměřili ramanovské spektrum této aktinobakterie excitační vlnovou délkou 532 nm a silné pásy 1532, 1157 a 1005 prohlašují za projev sarcinaxantinu. Další silné signály na pozicích 1666 a 1452  $\text{cm}^{-1}$  náleží projevu proteinům (Rösch a kol., 2005), stejně jako výrazný široký pás spadající do regionu 2800 – 3100  $\text{cm}^{-1}$  (Maquelin a kol., 2002).

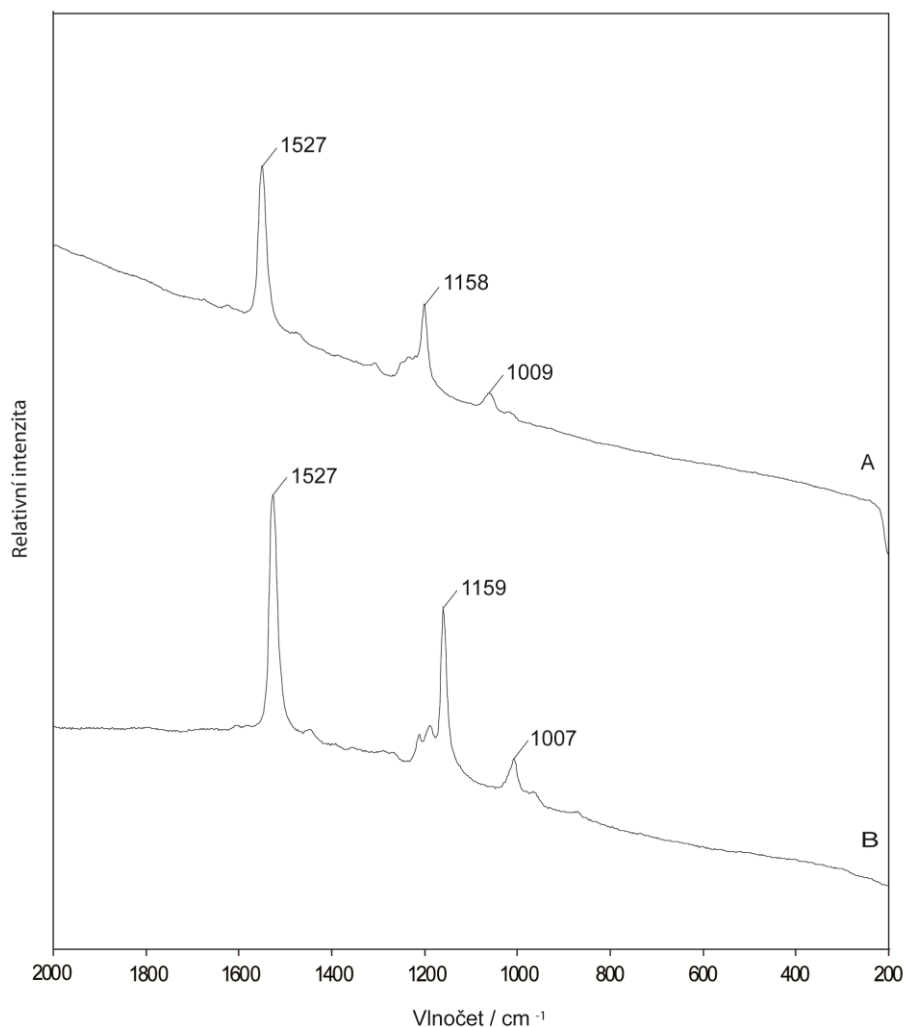


**Obr. 16 Ramanovské spektrum pigmentového extraktu z bakteriální biomasy *Micrococcus luteus*. Excitační vlnová délka měření – 514,5 nm, expirační doba 10s, akumulace 10x, síla laseru 1%.**

Pigmentový extrakt se podařilo naměřit strojem InVia Reflex Raman s použitím excitační vlnové délky laseru 514,5 nm, zatímco analýza lyofilizované biomasy byla úspěšná až s použitím excitační vlnové délky 1064 nm spektrometru FT Raman. Detekované vibrační módy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  (1526, 1157, 1008) dokládají přítomnost karotenoidu, jehož hodnoty jsou blízké hodnotám luteinu.

**Tab. 9 Hlavní diagnostické pásy bakterie *Micrococcus luteus*. Vlevo – lyofilizovaná biomasa, vpravo – pigmentový extrakt.**

( $\lambda$ ) 1064 nm	( $\lambda$ ) 514,5 nm
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
1005 w	1008 m
1158 s	1157 s
1530 s	1526 s



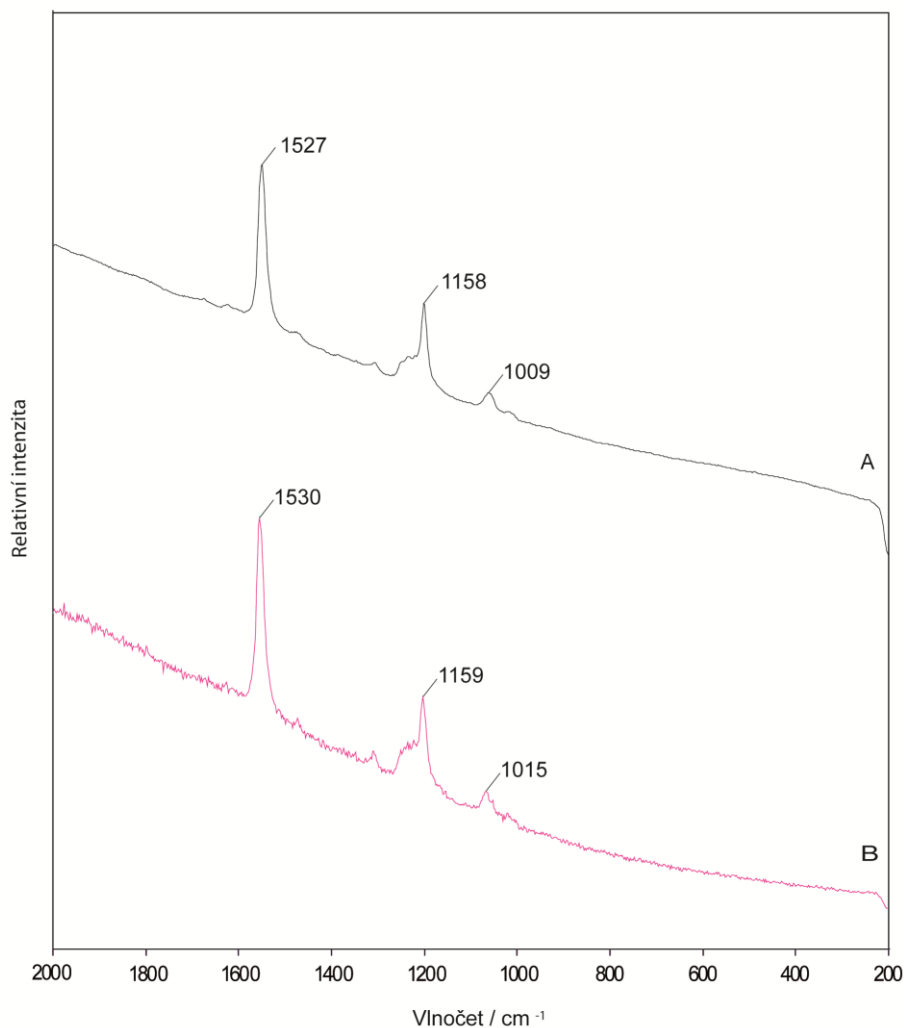
**Obr. 17** Ramanovská spektra mikroorganismů kmenu Ochrophyta. **A** *Diademsis gallica*, **B** *Botrydiopsis aplina*. Lyofilizované vzorky byly měřeny při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 0,5% (0,123 mW) a expirační době 5s po 10 akumulací.

*Diademsis gallica* a *Botrydiopsis aplina* se projeví silnými signály v 1527 cm<sup>-1</sup> a pásy 1158 resp. 1159, 1009 a 1007. Tyto vibrační módy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ , a  $\nu_3$  jsou hlavními diagnostickými pásy karotenoidů. Dle Collins a kol. (2001) – excitace 523 nm – hlavní pásy luteinu jsou 1523, 1157, 1006. Jiná Ramanovská spektra luteinu: např., Jehlička a kol. (2013b) prezentují hlavní pásy na pozicích 1521, 1158, 1007 cm<sup>-1</sup>. Ve spektrech je patrný středně slabý pás kolem 1190 cm<sup>-1</sup>, což znamená, že v oblasti

1100 – 1200, se vyskytují 2 zřetelné pásy, což je podle Nakamuro a kol. (2001) typické pro pigmenty typu  $\beta$ -karoten a lutein. Přítomnost  $\beta$ -karotenu nemůžeme vyloučit. Podle Schaffer a kol. (1991) se charakteristický vibrační mód  $\beta$ -karotenu  $\nu_1$  přírodních vzorků nachází v regionu 1531 – 1515  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tab. 10 Hlavní diagnostické pásy hnědých řas (Ochrophyta).**

$(\lambda)$ 514,5 nm	
<i>Diadsmis gallica</i>	<i>Botrydiopsis alpina</i>
1009 m	1007 m
<b>1158 s</b>	<b>1159 s</b>
<b>1527 vs</b>	<b>1527 vs</b>

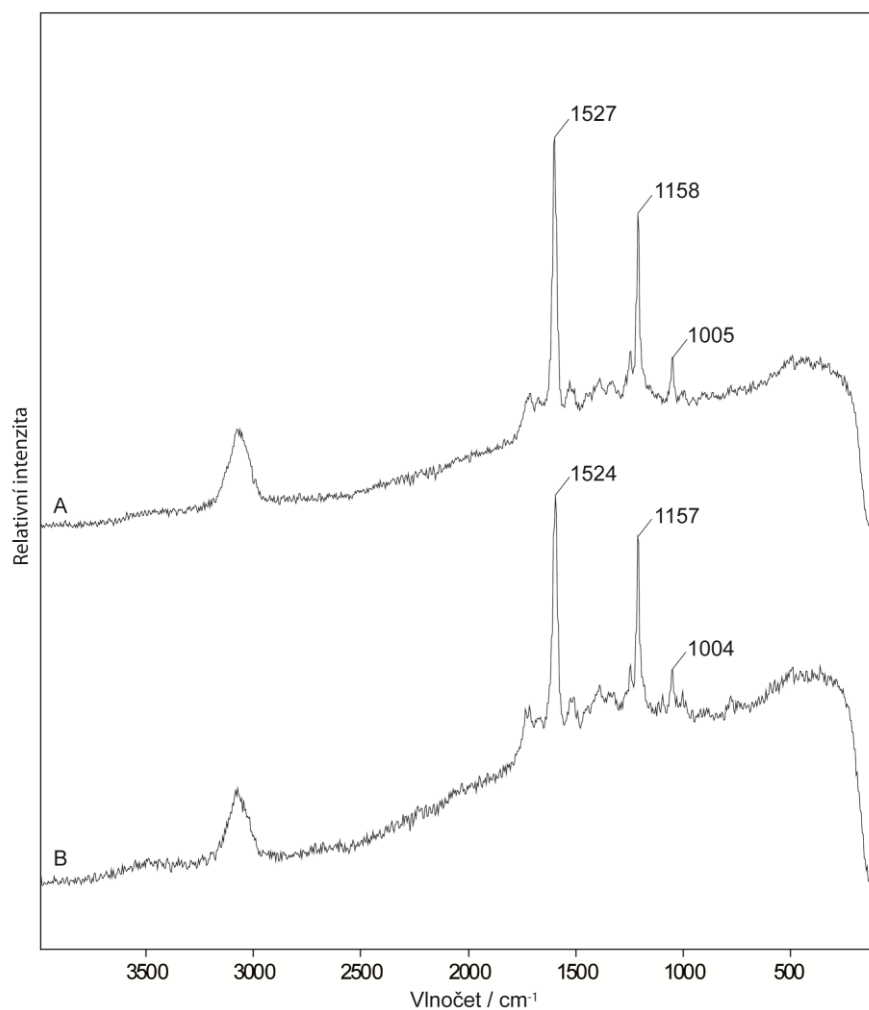


**Obr. 18 Ramanovská spektra A lyofilizované biomasy (černě), B pigmentového extraktu (červeně) mikroorganismu *Diadismis gallica*. Měření obou vzorků probíhalo při excitační vlnové délce laseru 514,5 nm o intenzitě 0,5% (0,123 mW) a expirační době 5s po 10 akumulací.**

V případě detekce čistého pigmentového extraktu došlo k nevýznamnému posunu polohy diagnostických pásů v rámci prvního řádu jednotek recipročných centimetrů. Vibrační módy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  vypovídají o přítomnosti karotenoidu typu lutein / zeaxantin. Hlavní diagnostické pásy čistého fukoxantinu jsou 1529, 1162 a 1013 (Jehlička a kol., 2013b).

**Tab. 11** Hlavní Ramanovské pásy mikroorganismu *Diademsis gallica*. Vlevo – lyofilizovaná biomasa, vpravo – pigmentový extrakt.

(λ) 514,5 nm	
<i>Diademsis gallica</i>	<i>Diademsis gallica</i>
1009 m	1015 m
1158 s	1159 s
1527 vs	1530 vs



**Obr. 19** Ramanovská spektra červených řas (kmen Rhodophyta). A *Balbiana investiens*, B *Porphyridium cruentum*. Spektra A, B byla pořízena při síle laseru 0,7 W.

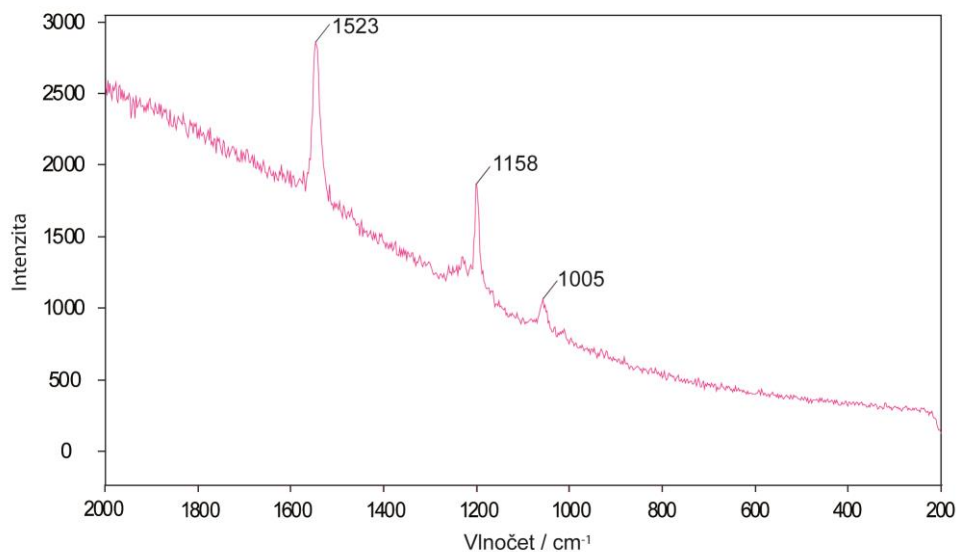
Řasy z kmene Rhodophyta byly měřeny laboratorním mikrospektrometrem InVia Reflex, nejprve byla použita excitační vlnová délka 514,5 nm a posléze 785 nm. Vzorky neposkytly Ramanovský signál, při použití těchto vlnových délek. Měření bylo úspěšné FT Ramanovým spektrometrem za použití excitační vlnové délky 1064 nm.

*Balbiania investiens* se projevila výraznými pásy 1527, 1158, 1005. *Porphyridium cruentum* 1524, 1157, 1004. jsou to vibrační módy charakteristické pro karotenoidy. Vibrační mód  $\nu_1$  (C=C) je situován na pozicích 1527 a 1524  $\text{cm}^{-1}$ , to značí přítomnost pigmentů o délce izoprenového řetězce podobné luteinu či fukoxantinu. Dle Jehlička a kol. (2013b)  $\nu_1$  zeaxantinu – 1521,  $\nu_1$  luteinu – 1524,  $\nu_1$  fukoxanthinu – 1529. U řas předpokládáme i projev přítomnost  $\beta$ -karotenu, nejběžnějšího karotenoidu.

Pásy v oblasti 2800 – 3200 jsou přisouzeny především proteinům, stejně tak některé slabé pásy kolem 1665  $\text{cm}^{-1}$  (Goodwin a kol., 2006) a oblasti 1445 – 1460 (Fendrihan a kol., 2009) a 1230 – 1295 (Goodwin a kol., 2006).

**Tab. 12 Hlavní diagnostické pásy červených řas (Rhodophyta).**

(λ) 1064 nm	
<i>Balbiania investiens</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>
1004 m	<b>1158 vs</b>
<b>1157 vs</b>	1190 sh
<b>1524 vs</b>	<b>1527 vs</b>



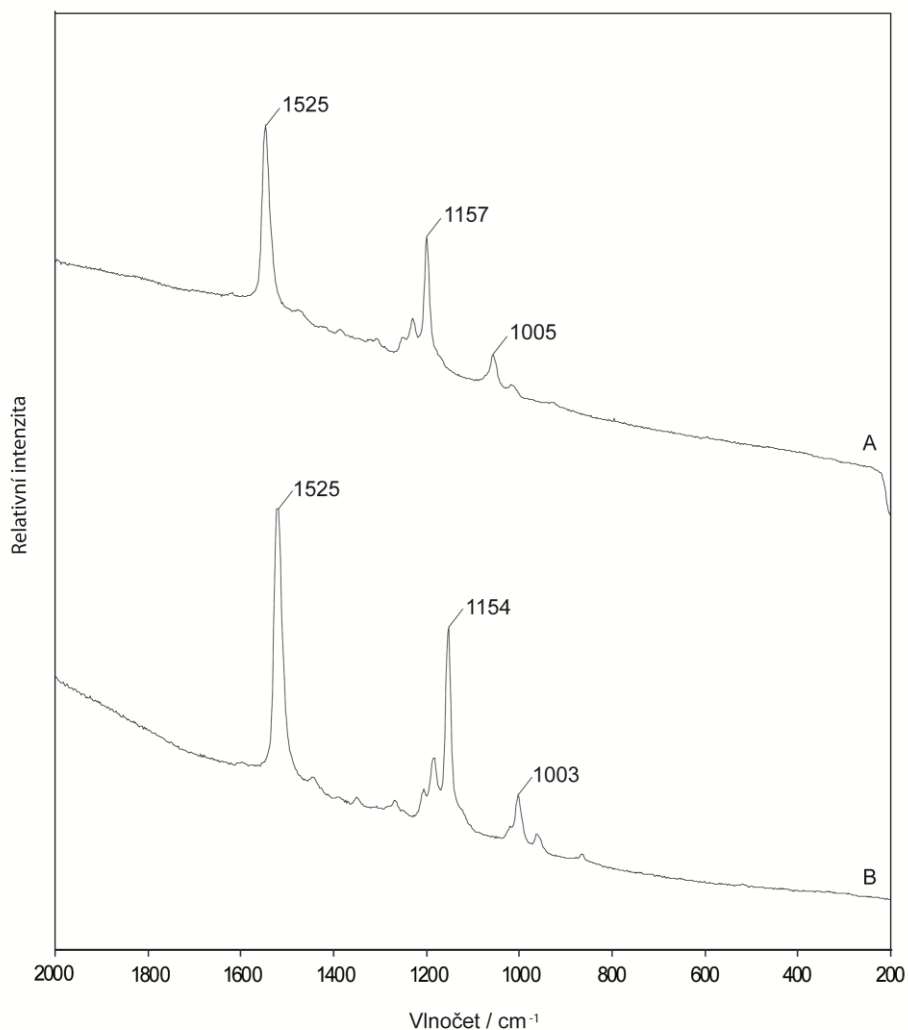
**Obr. 20 Ramanovské spektrum pigmentového extraktu z lyofilizované biomasy červené řasy *Balbiania investiens*. Excitační vlnová délka měření – 514,5 nm, expirační doba 10s, akumulace 10x, síla laseru 0,245 mW.**

Spektrum pigmentového extraktu se podařilo nahrát Ramanovým mikrospektrometrem s excitační vlnovou délkou 514,5 nm. Hlavní diagnostické pásy 1005, 1158, 1523  $\text{cm}^{-1}$  jsou projevem karotenoidů typu lutein/zeaxantin či  $\beta$ -karoten.

Tab. 13 Hlavní diagnostické pásy červené řasy *Balbiania investiens*. Vlevo – lyofilizovaná biomasa, vpravo – pigmentový extrakt.

( $\lambda$ ) 1064 nm	( $\lambda$ ) 514,5 nm
<i>Balbiania investiens</i>	<i>Balbiania investiens</i>
1005 m	1005 m
1158 s	1158 vs
1527 vs	1523 vs

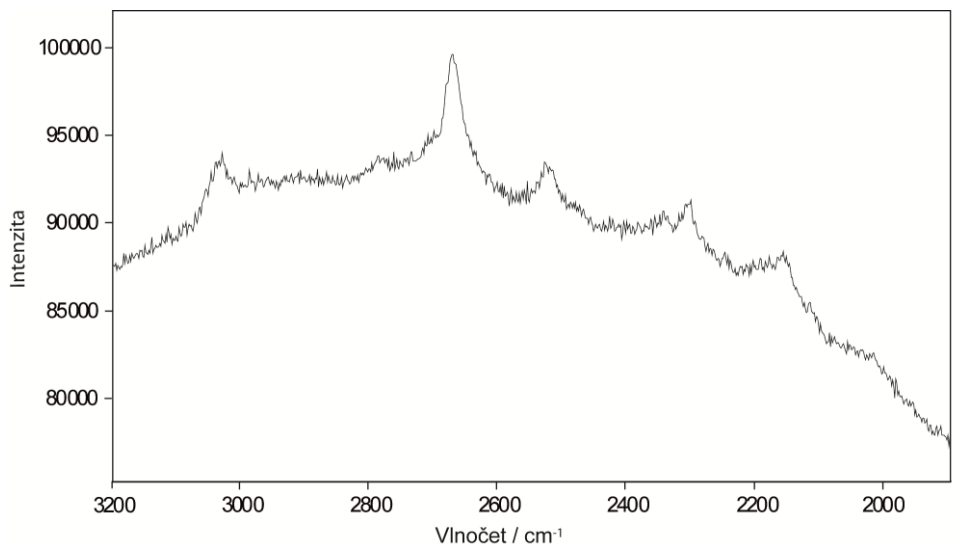




**Obr. 21 Ramanovská spektra zelených řas (kmen Chlorophyta). A halofilní *Dunaliella parva*, B *Haematococcus pluvialis*. Excitační vlnová délka měření – 514,5 nm při síle laseru 0,245 mW, expirační doba 10s, akumulace 10x.**

Hlavní pásy halofilní řasy *Dunaliella parva* jsou na pozicích 1525, 1157 a 1005  $\text{cm}^{-1}$ . Hlavní pásy nehalofilní řasy *Haematococcus pluvialis* se nacházejí na pozicích 1525, 1154 a 1003. Tyto organismy, žijící v extrémně rozdílném prostředí a tak se také od sebe liší složením akumulovaných pigmentů. Avšak detekované vibrační módy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$ , a  $\nu_3$  se svými hodnotami téměř shodují. Dle Collins a kol. (2001) – excitace 523 nm – hlavní pásy luteinu jsou 1523, 1157, 1006. Jiná Ramanovská spektra luteinu: např., Jehlička a kol. (2013b) prezentují hlavní pásy na pozicích 1521, 1158, 1007  $\text{cm}^{-1}$ . Ve spektrech je patrný středně slabý pás kolem 1190  $\text{cm}^{-1}$ , což znamená, že v oblasti 1100 – 1200, se vyskytují 2 zřetelné pásy, což je podle Nakamuro a kol. (2001) typické pro pigmenty typu  $\beta$ -karoten a lutein. Přítomnost  $\beta$ -karotenu nemůžeme vyloučit. Podle Schaffer a kol. (1991) se charakteristický

vibrační mód  $\beta$ -karotenu  $\nu_1$  přírodních vzorků nachází v regionu 1531 – 1515  $\text{cm}^{-1}$ . Podle Collins a kol. (2001)  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$  astaxantinu 1516, 1157 a 1008  $\text{cm}^{-1}$ .



**Obr. 22 Ramanovské spektrum lyofilizované biomasy zelené řasy *Haematococcus pluvialis* v rozsahu vlnočtu 1900 – 3200  $\text{cm}^{-1}$ .**

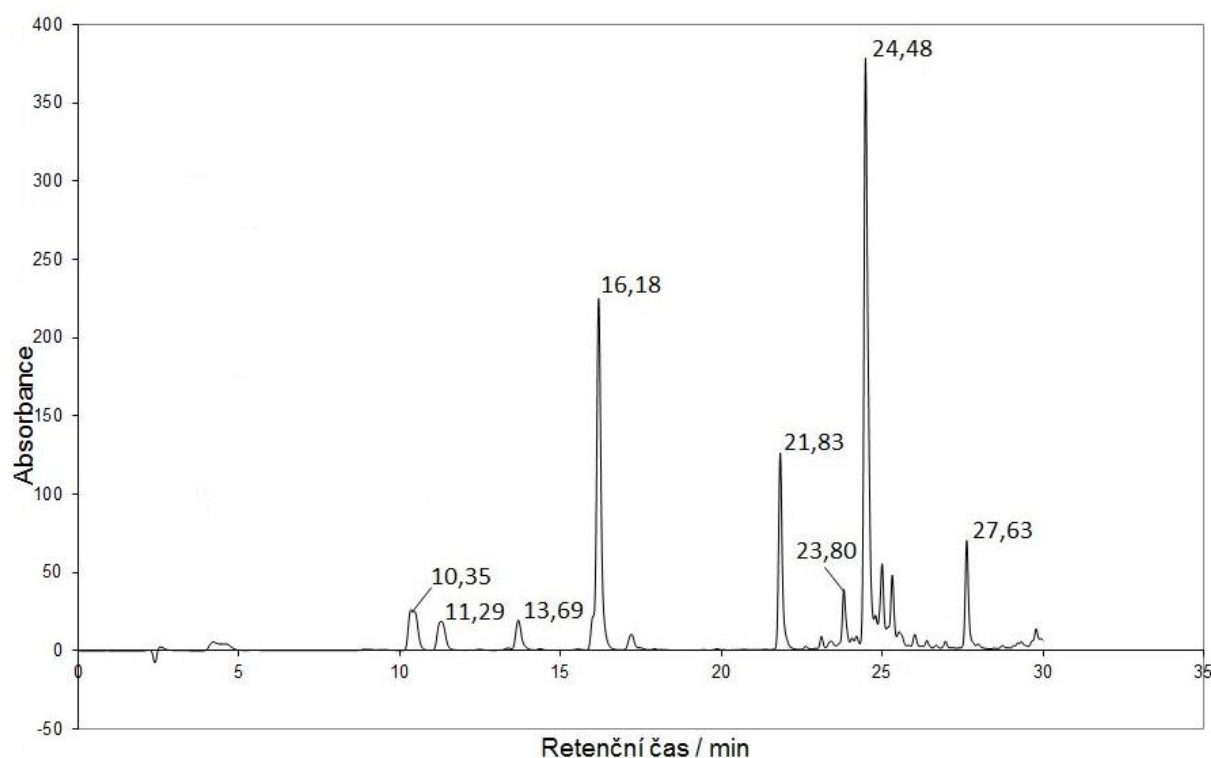
Oblast druhého řádu podléhá vlivu overtonů a kombinačních tónů. Podle Okamoto a kol. (1994) a Withnall a kol. (2003) hlavní pásy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$  v rezonančním módu způsobují charakteristické overtony a kombinační tóny v oblasti 2150 – 2650  $\text{cm}^{-1}$ . Široký pás kolem 3015 spadá do regionu 2800 – 3100  $\text{cm}^{-1}$ , který je připisován především projevu proteinů (Maquelin a kol., 2002).

**Tab. 14 Hlavní diagnostické pásy zelených řas.**

(λ) 514,5 nm	
<i>Dunaliella parva</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>
1005 m	1003 m
<b>1157 vs</b>	<b>1154 s</b>
<b>1525 vs</b>	<b>1525 vs</b>

## 9.2 HPLC/UV-VIS analýza

Jako srovnávací metoda byla využita kapalinová chromatografie. Vysokoučinná kapalinová chromatografie umožňuje pohodlné rozdělení pigmentů ze směsí a jejich detekci pomocí UV-VIS analyzátoru. Smyslem jejího použití bylo vyhodnotit pestrost přítomné asociace pigmentů akumulovaných mikroorganismy, aby bylo možno porovnat takto získané výsledky s daty z Ramanovy spektroskopie. Bylo analyzováno 13 vzorků. Chromatogramy odpovídají nastavené absorbanci na 440 nm. Zobrazení při této absorbanci odhaluje peaky chlorofylu i  $\beta$ -karotenu a sekundárních karotenoidů, které se v chromatogramech objevují vůči chlorofylu poměrově výrazně menší, jelikož jejich maximální absorbance jsou spíše v rozsahu 470 – 480 nm. Ve výsledkové části je uveden chromatogram získaný analýzou extraktu ze vzorku *Haematococcus pluvialis* (Obr. 23), zbylých 12 chromatogramů se nachází v příloze.



Obr. 23 Chromatogram vzorku *Haematococcus pluvialis*

Následující hodnoty retenčních časů peaků udaných v minutách odpovídají přiřazeným pigmentům: 10,35 – neoxantin; 11,29 - violaxantin; 13,69 – anteraxantin; 16,18 – lutein; 21,83 – chlorofyl b; 23,80

- astaxantin; 24,48 – chlorofyl a; 27,63 –  $\beta$ -karoten. Oblast peaků kolem 25 minuty jsou projevem esterů astaxantinu.

Přehled analyzovaných mikroorganismů a výsledky analýzy pigmentů jsou uvedeny v následujících tabulkách.

**Tab. 15 Seznam pigmentů (pravý sloupec) zjištěných při HPLC analýze vybraných prokaryotních mikroorganismů (levý sloupec).**

<i>Chamaesiphon polymorphus</i>	chl a; $\beta$ - karoten; lutein; myxoxantofyl; kantaxantin; astaxantin; echinenon
<i>Chroococcus sp.</i> (pozn.: zelený)	chl a; $\beta$ - karoten; zeaxantin; myxoxantofyl; kantaxanthin; echinenon
<i>Chroococcus sp.</i> (pozn.: červený)	chl a; $\beta$ - karoten; zeaxantin; myxoxantofyl; echinenon
<i>Oscillatoria limnetica</i>	chl a; $\beta$ - karoten; zeaxantin
<i>Oscillatoria sancta</i>	chl a; $\beta$ - karoten; zeaxantin; myxoxantofyl
<i>Phormidium cf. subfuscum</i>	chl a; $\alpha$ , $\beta$ - karoten; zeaxantin; myxoxanthofyl; echinenon
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	bchl a; bakteriofeofytin; spiriloxantin; anhydrorodovibrin
<i>Micrococcus luteus</i>	sarcinaxantin; sarcinaxantin monoglukosid; sarcinaxantin diglukosid

**Tab. 16 Seznam pigmentů (pravý sloupec) zjištěných při HPLC analýze vybraných eukaryotních mikroorganismů (levý sloupec).**

<i>Botrydiopsis alpina</i>	chl a; $\beta$ - karoten; zeaxantin; myxoxanthofyl
<i>Balbiana investiens</i>	chl a; $\beta$ - karoten; zeaxantin
<i>Porphyridium cruentum</i>	
<i>Dunaliella parva</i>	chl a, b; $\alpha$ , $\beta$ - karoten; zeaxantin; violaxantin; neoxantin; anteraxantin
<i>Haematococcus pluvialis</i>	chl a, b; $\beta$ - karoten; lutein; violaxantin; neoxantin; antheraxantin; astaxantin

## 10 DISKUZE

Diskuze poskytuje shrnutí výsledků ramanovské analýzy a zároveň jejich porovnání s výsledky získané z analýzy HPLC/UV-VIS.

Některé halofilní a nehalofilní kolonie vybraných skupin mikroorganismů akumulují komplexní pigmentové směsi s více než jedním karotenoidem a tím se analýza komplikuje.

V případě analýzy kultur skupiny Haloarchea dobře známo, že kolonie akumulují karotenoid C50 – bakterioruberin jako hlavní pigment v majoritním množství. Ramanovské pásy 1506, 1152 a 1001 se přisuzují projevu bakterioruberinu.

HPLC/UV-VIS analýza cyanobakterií řádu Synechococcales prokázala přítomnost chlorofylu a,  $\beta$  – karotenu, luteinu, kantaxantinu a echinenonu ve všech těchto cyanobacteriích. Pro obě *Chroococcus* sp. byl navíc prokázán myxoxanthofyl, naproti tomu pro *Chamaesyphon polymorphus* - astaxanthin. Pigment-proteinové komplexy, fykobiliproteiny, které sinice běžně akumulují, nebylo možné pomocí HPLC detekovat. Ramanovská analýza potvrdila přítomnost karotenoidů typu lutein/zeaxantin pro *Chamaesyphon polymorphus* a *Chroococcus* sp. „zelený“. Diagnostické pásy těchto pigment-proteinových komplexů se projevují pouze slabou intenzitou signálu. Některé pásy vidíme ve spektru *Chroococcus* sp. „zelený“ (viz příloha). Vibrační mód  $\nu_1$  vzorku *Chroococcus* sp. „červený“ svou pozicí 1528  $\text{cm}^{-1}$  napovídá o přítomnosti karotenoidu s nižším počtem konjugovaných vazeb oproti  $\beta$ -karotenu, jako je například fukoxantin.

Dle HPLC/UV-VIS analýzy všechny Oscillatoriales obsahují chlorofyl a,  $\beta$ -karoten a zeaxantin. *Phormidium cf. subfuscum* navíc obsahuje  $\alpha$ -karoten, myxoxanthofyl a echinenon. Ramanova spektroskopie detekovala karotenoid pravděpodobně typu lutein/zeaxantin. Spektrum halofilní cyanobakterie *Oscillatoria limnetica* s hlavními pásy 1517, 1156, 1003  $\text{cm}^{-1}$  je typickým projevem  $\beta$ -karotenu.

HPLC/UV-VIS analýza proteobakterie *Rhodospirillum rubrum* ukázala přítomnost bakteriochlorofylu a, bakteriofeofytinu, spirilloxantinu a anhydrorhodovibrinu. Hlavní ramanovské pásy *Rhodospirillum rubrum* jsou na pozicích 1504, 1147, 1000  $\text{cm}^{-1}$  a spektrum *Ectothiorhodospira marismortui* ukazuje hlavní pásy 1514, 1153, 1004  $\text{cm}^{-1}$ . Proteobakterie akumulují především bakteriochlorofyl a spiriloxantin. Jehlička a Oren (2013) analýzu endolitických kolonií halofilů s ramanovskými pásy 1510, 1151 a 1004 přisuzují právě spiriloxantinu či spiriloxantinu podobným pigmentům. *Salinibacter* M31 (Bacteroidetes) se projevil silnými signály 1512, 1154, 1001. Spektrum by mělo vypovídat o přítomnosti salinixantinu, který tato halofilní bakterie akumuluje, a hodnoty těchto pásů tomu odpovídají. Jehlička a kol. (2013a) salinixantin popisuje hlavními pásy 1512, 1155, 1003  $\text{cm}^{-1}$ .

Halotolerantní *Micrococcus luteus* se podařilo detekovat s hlavními diagnostickými pásy na pozicích 1530, 1158 a 1005  $\text{cm}^{-1}$ , které náleží sarcinaxantinu. HPLC/UV-VIS dokládá přítomnost pouze tohoto

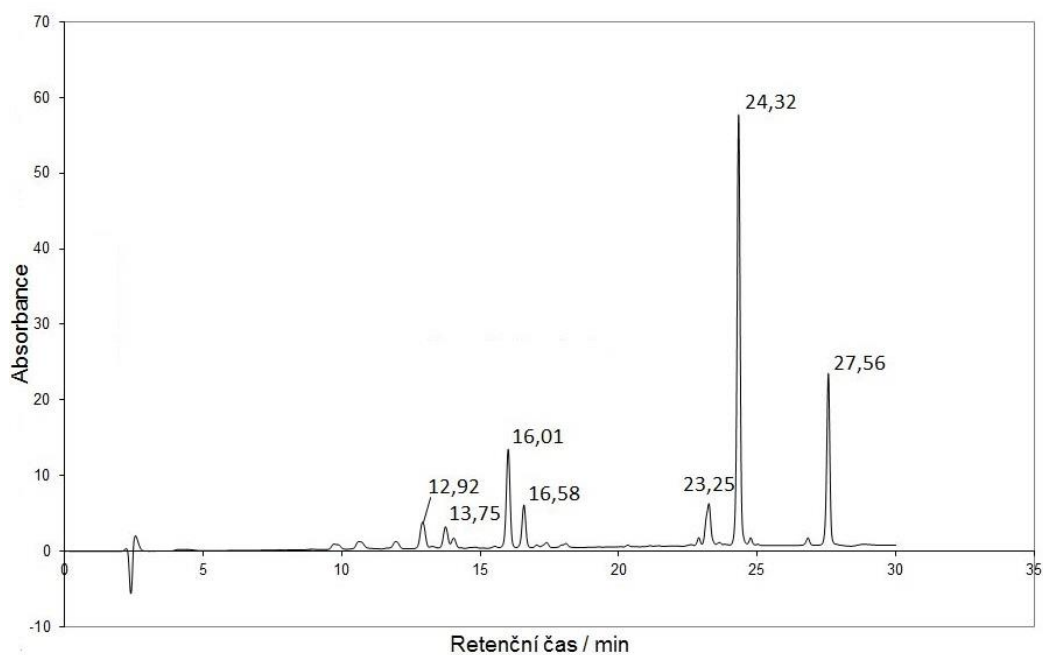
pigmentu a jeho glykosidovým derivátům. Měření pigmentového extraktu ukázalo jiné výsledky, spektrum s hlavními pásy 1526, 1157 a 1008  $\text{cm}^{-1}$ .

Řasy kmene Ochrophyta *Diademsis gallica* a *Botrydiopsis aplina* se projevily silnými signály v 1527, 1158 resp. 1159, 1009 a 1007  $\text{cm}^{-1}$ , které jsou diagnostickými pásy karotenoidů typu  $\beta$ -karoten nebo lutein. HPLC analýza prokázala přítomnost chlorofylu a,  $\beta$ -karotenu, luteinu a myxoxanthofylu v biomase řasy *Botrydiopsis aplina*. *Diademsis gallica* by měla navíc obsahovat fukoxantin.

*Balbiania investiens* se projevila výraznými pásy 1527 (resp. 1523 v případě měření pigmentového extraktu), 1158, 1005. *Porphyridium cruentum* 1524, 1157, 1004. Jsou to vibrační módy charakteristické pro karotenoidy typu  $\beta$ -karoten nebo lutein/zeaxantin. HPLC/UV-VIS analýza potvrdila přítomnost chlorofylu a,  $\beta$ -karotenu a zeaxantinu u obou ruduch (Rhodophyta).

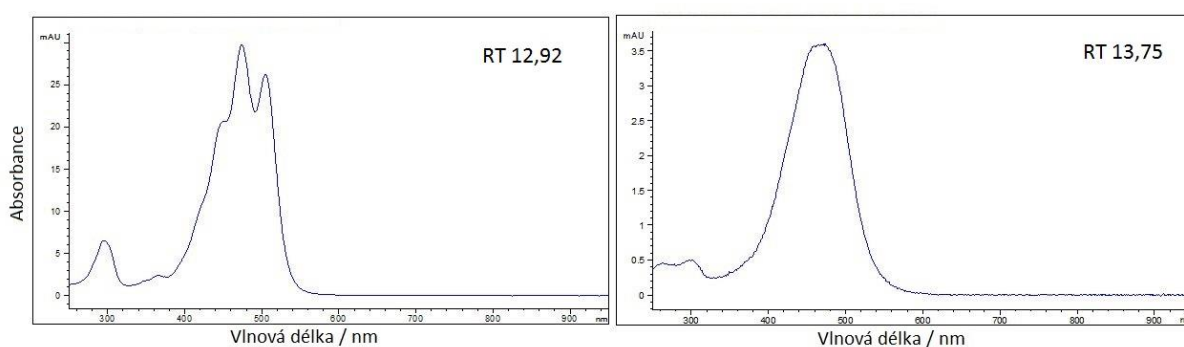
HPLC/UV-VIS analýza těchto zelených řas (Chlorophyta) prokázala přítomnost chlorofylu a i b,  $\alpha$  i  $\beta$ -karotenu, violaxantinu, neoxantinu. *Dunaliella parva* navíc akumulovala zeaxantin, naproti tomu *Haematococcus pluvialis* anteraxantin. Avšak Ramanovská analýza ukazuje na karotenoid typu  $\beta$ -karoten nebo lutein/zeaxantin s hlavními diagnostickými pásy 1525, 1157 a 1005  $\text{cm}^{-1}$  (halofilní *Dunaliella parva*) a 1525, 1154 a 1003  $\text{cm}^{-1}$  (*Haematococcus pluvialis*).

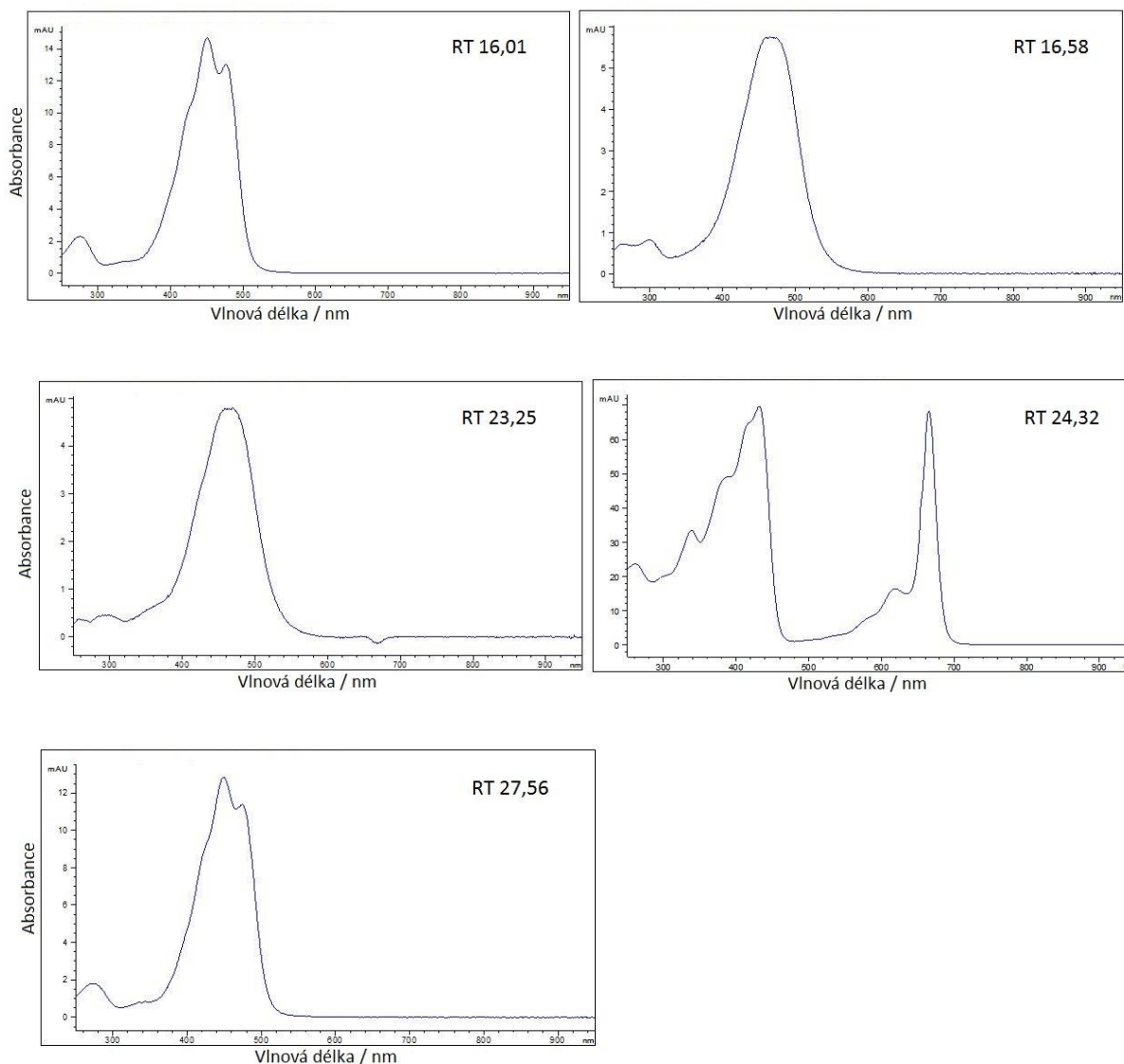
Příklad analýzy *Chamaesiphon polymorphus*, chromatogram (Obr. 24) a absorpční spektra (Obr. 25) náležící detekovaným pigmentům. Ramanovská spektra těchto pigmentů již byla naměřena. Některá z přírodních vzorků, jiná z čistých látek. Jehlička a kol. (2013b) uvádí hlavní ramanovské pásy vybraných karotenoidů získaných z měření čistých pigmentů. Myxoxantofyl s diagnostickými pásy 1512, 1153, 1000; astaxantin 1513, 1156, 1006; lutein 1524, 1158, 1007; kantaxantin 1515, 1158, 1009 a echinenon 1512, 1156, 1006  $\text{cm}^{-1}$ . Chlorofyl a s hlavními pásy 1325, 915, 745 (Vítek a kol., 2010) A referenční pásy čistého  $\beta$ -karotenu jsou 1513 a 1156, 1008  $\text{cm}^{-1}$  (Alajtal a kol., 2011). Přírodní vzorek, který obsahuje všechny tyto pigmenty, spektrum *Chamaesiphon polymorphus* se podařilo získat s hlavními pásy na pozicích 1523, 1158, 1005  $\text{cm}^{-1}$ . Na základě toho můžeme konstatovat, že pomocí Ramanovy spektroskopie jsme detekovali směs karotenoidů.



**Obr. 24** Chromatogram vzorku *Chamaesiphon polymorphus*.

Následující hodnoty retenčních časů peaků udaných v minutách odpovídají přiřazeným pigmentům:  
 12,92 – myxoxantofyl; 13,75 – astaxantin; 16,01 – lutein; 16,58 – kantaxantin; 23,25 – echinenon;  
 24,32 – chlorofyl a; 27,56 –  $\beta$ -karoten.





**Obr. 25** UV-VIS absorpční spektra *Chamaesiphon polymorphus*. RT je označení retenčního času, hodnota udána v minutách. UV-VIS spektra ukazují tvary peaků, která jsou typická pro daný pigment nebo skupinu, k níž náleží.

Po srovnání výsledků z obou analýz je jasné, že HPLC/UV-VIS analýza umožňuje detekci jednotlivých karotenoidů i jiných pigmentů. Chromatografie umožnila spolehlivou separaci jednotlivých pigmentů z extraktu a jejich účinnou detekci díky UV-VIS detektoru. Ramanova spektroskopická analýza rozlišení a určení dílčích karotenoidů neumožnila. Měříme-li přírodní vzorky, které obsahují směsi pigmentů z jedné skupiny, nemůžeme očekávat podrobné výsledky, kterých je možno dosáhnout analýzou, která zahrnuje přípravu vzorku a analytickou separaci extrahovaných pigmentů.



Úspěšnost Ramanovy spektroskopie pigmentů přírodních vzorků, mikroorganismů náležících třem doménám života, které byly v této práci analyzovány, lze rozdělit do čtyř trendů. Prvním je jednoznačné určení pigmentu. Jmenovitě se podařilo detekovat bakterioruberin, salinixantin a sarcinaxantin. Tento případ nastal, pokud daný organismus akumuloval pouze jediný pigment nebo pigmenty minoritní akumuloval v tak malém množství, pod mezí detekce, nebo takové množství, které významně analýzu neovlivnilo.

Druhým trendem je možnost detekce jiného pigmentu nebo skupiny pigmentů, které nenáležejí karotenoidům (fykobiliny, potenciálně i porfyriny aj.). Pigmenty, které lze určit diagnostickými pásy, které se nacházejí mimo pozice hlavních pásů karotenoidů. (případ některých sinic).

Třetím je detekce hlavních diagnostických pásů karotenoidů. V některých případech se zdá, že se podařilo detekovat majoritní pigment a to  $\beta$ -karoten či lutein/zeaxantin. Zprvů nemůžeme říci, že jeden z nich poskytl signál, pokud se vyskytují v analytu oba v detekovatelném množství, což je při měření biomasy pravděpodobné. Navíc určení konkrétního karotenoidu je zavádějící, pokud vzorek obsahuje pestré asociace karotenoidů, které mikrobiální kolonie mohou produkovat. Tato situace platí pro většinu spekter mikrobiální biomasy i extraktů měřených v této práci. Ačkoliv je vibrační mód  $\nu_1$  klíčový pro určení konkrétního karotenoidu, tak jako se od sebe pigmenty liší počtem konjugovaných vazeb, pás tohoto vibračního módu se posouvá. Takové posuny vidíme i ve spektrech této práce. Ze směsi karotenoidů, které se svou strukturou značně podobají, mají i velice podobné spektroskopické vlastnosti, jen těžko můžeme určit detekci jednoho, pokud nevíme, že je absolutně majoritní. Zdá se hlavní příčinou posunu pásů vibračního módu  $\nu_1$ , ale i dalších ( $\nu_2$  a  $\nu_3$ ) právě vliv minoritních pigmentů také nevíme s jistotou, jelikož tyto posuny jsou pro spektra přírodních vzorků typické a to i v případě, že obsahují jen jeden pigment. To je dáno chemickým okolím pigmentu, které se vyskytuje ve specifických částech buňky, kde je vázán a akumulován. Díky tomu v některých případech spektra extrahovaných pigmentů ukazují rozdílné polohy hlavních pásů (posuny) nebo dokonce jejich získání bylo úspěšné jinou excitační vlnovou délkou laseru. Většina spekter extraktů se od spekter lyofilizované biomasy náležící stejnému vzorku nelišila.

Ukázalo se, že pro analýzu mikroorganismů náležících rozdílným kmenům bylo potřeba disponovat dvěma lasery lišící se excitační vlnovou délkou (514,5 a 1064 nm). Oba tyto lasery prokázaly vhodnost pro detekci karotenoidů avšak ne tetra-pyrolových pigmentů (chl, bchl). Analýza sinic, které obsahují fykobiliproteiny, byla úspěšná užitím FT Ramanovy spektroskopie s laserem o vlnové délce 1064 nm. S použitím mikrospektrometru s laserem vlnové délky 514,5 nm, spektra byla zahalena silnou fluorescencí. Také chlorofyl se nepodařilo určit disponovanými vlnovými délkami laserů (514,5; 785; 1064). Vliv maximální absorpce analytu (pigmentu) na výběr excitační vlnové délky laseru je patrný.

Hlavní diagnostické pásy karotenoidů  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$ , které jsou projevem C=C a C-C valenčních vibrací a C-CH<sub>3</sub> deformačních vibrací. Pás  $\nu_1$  (valenční vibrace C=C) posouvá svou polohu v rámci vlnočtů v závislosti na počtu efektivních konjugovaných vazeb. To jsou vazby izoprenového řetězce a mohou to být vazby řetězce společně s vazbou navazující (např. ve struktuře terminálního kruhu). V této práci

jsou např. prezentována spektra karotenoidů s izoprenovým řetězcem o 13 C=C vazbách (bakterioruberin, spiriloxantin) a 11 C=C vazbách ( $\beta$ -karoten, lutein, salinixantin) s polohy pásu  $\nu_1$  okolo  $1506\text{ cm}^{-1}$  (13 C=C) a  $1515$  až  $1530\text{ cm}^{-1}$  (11 C=C). Polohy pásů přírodních vzorků v rámci vlnočtů se mohou měnit také v závislosti na molekulách, které pigment v buňce obklopují. Okolní molekuly interagují s pigmentem a mění tak jeho konformaci a tudíž tyto vazby ovlivňují i ramanovská spektra.

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní metodou, která umožňuje relativně rychlé měření i bez přípravy vzorků. Je vhodná pro detekci karotenoidů i jiných biomolekul, které mohou být hledanými biomarkery.

## 11 ZÁVĚR

Ramanova spektrometrie je vhodným nástrojem pro detekci karotenoidů mikroorganismů halofilních archea, bakterií, cyanobakterií a mikroorganických řas.

Ramanova spektroskopie navíc umožňuje rychlou detekci pigmentů skupiny karotenoidů i bez složitých příprav vzorku nebo dokonce *in situ*. Pigmenty v geologických, biologických i geobiologických matricích, rostlinné tkáně či kolonie endolitů v halitu jsou vhodné objekty studia. Karotenoidy jsou vedle dalších pigmentů považovány za tzv. biomarkery. Studium přítomnosti těchto biomarkerů umožňuje získat řadu cenných informací o charakteru mikroorganismů v různých prostředích. Detekce pigmentů v horninovém prostředí může naznačovat preexistenci mikrobiálního života. Ramanova spektrometrie byla vybrána jako jedna z klíčových analytických technik pro exobiologicky zaměřené mise kosmických agentur NASA a ESA, mimo jiné díky těmto schopnostem detekce. Tato práce se pokusila naznačit možnosti a omezení využívání Ramanovy spektrometrie pro účely detekce a rozlišení karotenoidů mikroorganismů.

Pro určení a odlišení karotenoidů jsou zásadní zejména Ramanovo pásy  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$ , které jsou projevem C=C a C-C valenčních vibrací a C-CH<sub>3</sub> deformačních vibrací. Spektra s hlavními diagnostickými pásy se podařilo získat z měření halofilních i nehalofilních kolonií mikroorganismů náležících různým kmenům tří domén života.

Spektra s diagnostickými pásy karotenoidů je možné získat, i pokud se tyto biomarkery vyskytují ve vzorku ve stopovém množství, díky rezonančnímu nabohacení. Pro získání rezonančního nabohacení se ověřil laser s excitační vlnovou délkou 514,5 nm. Pro řadu získaných spekter platí, že na základě polohy pásů  $\nu_1$ ,  $\nu_2$  a  $\nu_3$  není možné jednoznačně určit konkrétní pigment náležící skupině karotenoidů. Tato situace souvisí zejména s nemožností jednoznačně odlišit příčiny malých posunů poloh relevantních pásů ve spektru. To souvisí například s tím, že spektra velmi podobných karotenoidů se mohou odlišovat polohami pásů v řádu jednotek cm<sup>-1</sup>, spektrální rozlišení a přesnost určení poloh pásů využívanými laboratorními přístroji je na obdobné úrovni a měření mohou být navíc ovlivněna řadou dalších vlastností vzorku. Je to například způsob vazby karotenoidů v buňce, chemické okolí molekuly a její interakce s prostředím v rámci buňky.

Několik velmi podobných minoritních karotenoidů ve vzorku Ramanova spektrometrie většinou neumožní určit. Ramanova spektra mikroorganismů akumulujících několik karotenoidů velice podobné struktury je nezbytné interpretovat se zvýšenou opatrností. Rozlišení karotenoidů ve směsi je však možné v extraktech biomasy a následném rozdělení a určení pomocí HPLC a spekter UV-VIS. Nelze opomenout ideální situaci Ramanovy spektrometrie, kdy by se podařilo pomocí řady měření s využitím laserů s odlišnou vlnovou délkou získávat postupně spektra jednotlivých karotenoidů, která by odpovídala rezonanci za dané excitace.

## 12 POUŽITÁ LITERATURA

- Antón, J., Oren, A., Benlloch, S., Rodríguez-Valera, F., Amann, R., & Rosselló-Mora, R. (2002). *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, stránky 485-491.
- Barnard, W., & Waal, D. (2006). Raman investigation of pigmentary molecules in the molluscan biogenic matrix. *Journal of Raman Spectroscopy*, 37(1-3), stránky 342–352.
- Barnavid, R. E., Ionescu, D., Oren, A., Rainey, F. A., Hollen, B. J., Bagaley, D. R., . . . McKay, C. (2007). Selectiv enrichment, isolation and molecular detection of *Salinibacter* and related extremely halophilic Bacteria from hypersaline environments. *Hydrobiologica*, stránky 576: 3-13.
- Bold, H. (1949). The Morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*, Sp. Nov. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76, stránky 101-108.
- Brody, M., & Emerson, R. (1959). The quantum yield of photosynthesis in *Porphyridium cruentum*, and the role of chlorophyll a in the photosynthesis of red algae. *The Journal of General Physiology*, 43(2), stránky 251-264.
- Collins, A. M., Jones, H. D., Han, D., Qiang, H., Beechem, T. E., & Timlin, J. A. (6. 10 2011). Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS ONE*, stránky 1-7.
- DasSarma, S., & Arora, P. (2001). A general review of Halophiles. V *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature publishing group, www.els.net.
- DasSarma, S., & DasSarma, P. (2006). Halophiles. V *Encyclopedia of Life Sciences* (stránky 1-9). John Wiley and Sons.
- De Gelder, J., de Gussem, K., Vandenabeela, P., & Moens, L. (2007). Reference database of raman spectra of biological molecules. *J. Raman Spectrosc.*, stránky 38:1133-1147.
- de Oliveira, V. E., Castro, H. V., Edwards, H. G., & de Oliveira, L. F. (2010). Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. *J. Spectrosc.*, stránky 41: 542-650.
- Edwards, H. G., Garcia-Pichel, F., Newton, E. M., & Wynn-Williams, D. D. (2000). Vibrational Raman spectroscopy study of scytonemin, the UV-protective cyanobacterial pigment. *Spectrochimica Acta A.*, stránky 56: 193-200.
- Fendrihan, S., Maurizio, M., & Stan-Lotter, H. (2009). Raman spectroscopy as a potential method for the detection of extremely halophilic archaea embedded in halite in terrestrial and possibly extraterrestrial samples. *J Raman Spectrosc*, 40(12), stránky 1996–2003.
- Gill, D., Kilponen, R. G., & Rimai, L. (1970). Resonance Raman scattering of laser radiation by vibrational modes of carotenoid pigment molecules in intact plant tissues. *Nature*, stránky 227: 743-744.

- Goodwin, J. R., Hafner, L. M., & Fredericks, P. M. (2006). Raman spectroscopic study of heterogeneity of microcolonies of a pigmented bacterium. *J. Raman Spectrosc.*, stránky 37: 932-936.
- Goodwin, J., Hafner, L., & P.M., F. (2006). Raman spectroscopic study of heterogeneity of microcolonies of a pigmented bacterium. *J. Raman Spectrosc.*, stránky 37: 932-936.
- Hoek, C., Mann, D., & Jahns, H. M. (1955). *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press.
- Holzbecher, Z., & Churáček, J. (1987). Analytická chemie. Praha, SNTL . str. 664.
- Jehlička, J., & Oren, A. (2013). 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. . *J. Raman Spectrosc.*, stránky 44: 1285-1291.
- Jehlička, J., Edwards, H., & Oren, A. (2013a). Bacterioruberin and salinixanthin carotenoids of extremely halophilic Archaea and Bacteria: A Raman spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106, stránky 99-103.
- Jehlička, J., Osterrothová, K., Oren, A., & Edwards, H. G. (2013b). Raman spectrometric discrimination of flexirubin pigments from two genera of Bacteroidetes. *FEMS Microbiology Letters*, 348(2), stránky 97-102.
- Jorge-Villar, S., Benning, L., & Edwards, H. (2007). Raman and SEM analysis of a biocolonised hot spring travertine terrace in Svalbard, Norway. *Geochemical Transactions*, 8(15), stránky 1467-4866-8-8.
- Kaczor, A., & Baranska, M. (2011). Structural changes of carotenoid astaxanthin in a single algal cell monitored in situ by Raman spectroscopy. *Anal. Chem.*, stránky 83: 7763-7770.
- Kodíček, M. (2007). Biochemické pojmy - výkladový slovník [CD-ROM]. Verze 2.0, Praha: .
- Lanyi, J. K. (2004). Bacteriorhodopsin. *Annu. Rev. Physiol.*, stránky 66:665–88.
- Lemoine, Y., & Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, stránky 106: 155–177 .
- Mac Donald, I. R., Reiley II, J. F., & Guinasso, N. L. (1990). Chemosynthetic mussels at brine-filled pockmark in the northern Gulf of Mexico. *Sci*, stránky 248: 1096-1099.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clarck, P. V. (2012). *Brock biology of microorganisms*. Benjamin Cummings, 13th ed.
- Maguregui, M., Knuutinen, U., Trebolazabala, J., Morillas, H., Castro, K., Martienz-Arkarazo, I., & Madariaga, J. M. (2012). Use of in situ an confocal Raman spectroscopy to study the nature and distribution of carotenoid in brown patinas from deteriorated wall painting in Marcus Lucretius House (Pompeii). *Anal. Bioanal. Chem.*, stránky 402: 1529-1539.

- Maquelin, K., Kirshner, C., Coe-Smith, L. P., van den Braak, N., Endtz, H. P., Naumann, D., & Pupells, G. J. (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Methods*, stránky 51: 255-271.
- Marshall, C., Javaux, E., Carter, E., & Leuko, S. (2006). Vibrational spectroscopy of extant and fossil microbes: Relevance for the astrobiological exploration of Mars. *Vibrational Spectroscopy, Volume(2)*, stránky 182–189.
- Marshall, C., Leuko, S., Coyle, C., Walter, M., Burns, B., & Neilan, B. (2007). Carotenoid analysis of halophilic archaea by resonance Raman spectroscopy. *Astrobiology*, 7(4), stránky 631-43.
- Mc Murry: Organická chemie, překlad z originálu 6. vydání, 2004, vydáno VUT Brno-nakladatelství VUTIUM a VŠCHT Praha, listopad 2007. (nedatováno).
- Merlin, J. (1985). Resonance Raman spectroscopy of carotenoids and carotenoid - containing systems. *Pure and Applied Spectroscopy*, 57(5), stránky 785-792.
- Nakamura, R., Yamamoto, S., & Nakahara, J. (2002). Broad Raman scattering and luminescence in  $\beta$ -carotene solution. *The Journal of Chemical Physics*, 117(1), stránky 238-247.
- Okamoto, H., Sekimoto, Y., & Tasumi, M. (1994). Assignment and anharmonicity analysis of overtone and combination bands observed in the resonance Raman spectra of carotenoids. *Spectrochimica Acta*, stránky 50: 1467–1473.
- Ollivier, B., Caumette, P., Garcia, J. L., & Mah, R. A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiology Reviews*, stránky 58 (1): 27-38.
- Oren, A. (1983). Halobacterium sodomense sp. nov., a Dead Sea halobacterium with extremely high magnesium requirement and tolerance. *International Journal of systematic Bacteriology*, 33, stránky 381-386.
- Oren, A. (2000). Salts and Brines. V B. A. Whitton, & M. Potts, *Ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space*. (str. 281\_306). Dordrecht: Kluwer academic publishers.
- Oren, A. (2002). Pigments of Halophilic Microorganisms. V *Halophilic Microorganisms and their Environments* (Sv. 5, stránky 173-206).
- Oren, A. (2011). Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. *Taxonomy of Prokaryotes - Methods in Microbiology*, 38, stránky 261-282.
- Oren, A., & Rodriguez-Valera, F. (2001). The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds. *FEMS Microbiol Ecol*, 36(2-3), stránky 123-130.
- Oren, A., Duker, S., & Ritter, S. (1996). The polar lipid composition of walsby's square bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 138(2-3), stránky 135–140.
- Oren, A., Heldal, M., Norland, S., & Galinski, E. (2002). Intracellular ion and organic solute concentrations of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Extremophiles*, 6(6), stránky 491-498.

- Oren, A., Kessel, M., & Stackebrandt, E. (1989). *Ectothiorhodospira marismortui* sp. nov., an obligately anaerobic, moderately halophilic purple sulfur bacterium from a hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea. *Archives of Microbiology*, 151(6), stránky 524-529.
- Oren, A., Kessel, M., & Stackebrandt, E. (1989). *Ectothiorhodospira marismortui* sp. nov., an obligately anaerobic, moderately halophilic purple sulfur bacterium from a hypersaline sulfur spring on the shore of the Dead Sea. *Archives of Microbiology*, 151(6), stránky 524-529.
- Oren, A., Kuhl, M., & Karsten, U. (1995). An endoevaporitic microbial mat within a gypsum crust: zonation of phototrophs, photopigments and light penetration. *Marine Ecology Progress*, 128, stránky 151-159.
- Parker, S., Tavender, S., Dixon, N., Herman, H., Williams, K., & Maddams, W. (1999). Raman spectrum of beta-Carotene using laser lines from Green (514.5 nm) to near-infrared (1064 nm): Implications for the characterization of conjugated polyenes. *Applied Spectroscopy*, 53, stránky 86-91.
- Rodriguez-Valera, F. (nedatováno). Biotechnological potential of halobacteria. V M. J. Danson, D. W. Hough, & G. G. Hunt, *The Archeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. London: Portland Press.
- Rösch, P., Harz, M., Schmitt, M., Peschke, K., Ronneberger, O., Burkhardt, H., . . . Lankers, M. (2005). Chemotaxonomic Identification of Single Bacteria by Micro-Raman Spectroscopy: Application to Clean-Room-Relevant Biological Contaminations. *Appl Environ Microbiol.*, 71(3), stránky 1626-37.
- Schaffer, H., Chance, R., Silbey, R., & Knoll, K. (1991). Conjugation length dependence of Raman scattering in a series of linear polyenes: Implications for polyacetylene. *The Journal of Chemical Physics*, 94(6), stránky 4161-4170.
- Schubert, B., Lowenstein, T., & Timofeeff, M. (2009). Microscopic identification of prokaryotes in modern and ancient halite, Saline Valley and Death Valley, California. *Astrobiology*, 9(5), stránky 467-82.
- Schulz, H., Baranska, M., & Baranski, R. (2005). Potential of NIR-FT-Raman spectroscopy in natural carotenoid analysis. *Biopolymers*, 77(4), stránky 212-221.
- Spiro, T. G. (1987). *Biological Applications of Raman Spectroscopy*. New York: Vol. 1, Wiley.
- Šetlík, I., Sedlová, F., & Šantrůček. (1998). Fyziologie rostlin. *Skripta PŘF JCU*.
- Thomas, L. L., Kim, J., & Cotton, T. M. (1990). Comparative study of resonance Raman and surface-enhanced resonance Raman chlorophyll a spectra using soret and red excitation. *J. Am. Chem. Soc.*, stránky 112: 9378-9386.
- Tsai, T.-H., Short, M. A., McLean, D. I., Zeng, H., McElwee, K., & Lui, H. (2014). Label-free identification and characterization of murine hair follicle stem cells located in thin tissue sections with Raman micro-spectroscopy. *Analyst*, stránky 139, 2799-2805.

- Van Heukelem, L., & Thomass, C. S. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *J. of Chromatography*, stránky 910: 31-49.
- Veronelli, M., Zerbi, G., & Stradi, R. (1995). In situ resonance Raman spectra of carotenoids in bird's feathers. *Journal of Raman Spectroscopy*, 26(8-9), stránky 683-692.
- Vítek, P., Edwards, H., Jehlička, J., Ascaso, C., Rios, A., Valea, S., . . . Wierchos, J. (2010). Microbial colonization of halite from the hyper-arid Atacama Desert studied by Raman spectroscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368(1922), stránky 3205-3221.
- Withnall, R., Chowdhry, B., Silver, J., Edwards, H., & Luiz, O. (2003). Raman spectra of carotenoids in natural products. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 59(10), stránky 2207-2212.
- Woes, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (nedatováno). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, stránky 87: 4576-4579.
- Zarnecki, J. C. (2004). Mars; Titan. V I. G. Sephton, *An Introduction to Astrobiology* (stránky 85-125; str. 171-197.). Cambridge: Cambridge University Press.
- [algaebase.com](http://algaebase.com), 3.10.2012
- <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/raman/method.php>, 5.2.2014
- <http://www.renishaw.com/en/what-raman-images-can-reveal--25802>, 5.2.2014
- <http://www.renishaw.com/en/applications--6259>, 5.2.2014
- <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 10.11.2012
- <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 5.3.2013
- <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>, 5.2.2014