

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Geologie

Studijní obor: Geochemie



**Bc. Michal Kovács**

Ramanova spektrometrie pigmentů sinic, řas a lišejníků v astrobiologickém kontextu  
Raman spectrometry of pigments of cyanobacteria, algae and lichens in the astrobiology context

Diplomová práce

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

Praha, 2016

**Prohlášení:**

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

V Praze, 16.5. 2016

Podpis

## **Pod'akovanie**

Za odborný dohľad pri vzniku tejto práce a za možnosť pracovať na tejto zaujímavej a prínosnej téme patrí vďaka predovšetkým prof. RNDr. Janu Jehličkovi, Dr. Ďalej by som chcel veľmi poďakovať Mgr. Adamu Culkovi, Ph.D., bez ktorého pomoci pri meraní vzoriek a jeho nesmierne užitočným radám by táto práca nedosiahla svoj konečný prínos. Veľká vďaka patrí aj Mgr. Julii Novotnej, ktorej rady boli nesmierne užitočné.

Ďakujem aj RNDr. Linde Nedbalovej Ph.D. (Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie), ktorá nám pomohla pri analýze vzoriek rias a takisto poskytla užitočné rady. Ďakujem aj RNDr. Davidu Svobodovi, Ph.D. (Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky), ktorý nám poskytol vzorky lišajníkov a často krát užitočné rady pri práci s nimi. Za poskytnutie vhodných vzoriek siníc patrí vďaka Ing. Josefu Elsterovi CSc., z Botanického ústavu AV ČR, vedecké pracovisko Třeboň. Za vzorky frakcií pigmentov metódou HPLC patrí vďaka Mgr. Janu Pilnému (Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň). Ďalej by som sa chcel poďakovať doc. RNDr. Ivanu Němcovi Ph.D. (Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Univerzita Karlova v Praze) za poskytnutie prístroja pre ďalšiu analýzu našich vzoriek.

V neposlednom rade patrí veľká vďaka mojej rodine a priateľom, ktorí boli veľkou psychickou oporou vždy keď bolo treba.

## ABSTRAKT

Tato práce se zabývá možností identifikace biomarkerů vybraných druhů extrémofilních organismů pomocí Ramanovy spektroskopie. Zaměřuje se hlavně na vybrané sinice, řasy a lišejníky s důrazem na možnost detekce karotenoidů. Tento pigment se v Ramanovských spektrech projevuje třemi charakteristickými pásy, které reprezentují valenční vibrace C=C a C-C a deformační vibrace C-CH<sub>3</sub> v molekulách karotenoidů. Ramanova spektra byla měřena nejen pomocí laboratorních mikrospektrometrů ( $\lambda$  - 514 nm a 532 nm) ale též přenosnými a příručními spektrometry ( $\lambda$  - 532 nm, 785 nm a 700 - 1100 nm). V případě sinic byly spektroskopické analýzy doplněny analýzami frakcí získaných pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie (HPLC). Tato práce kriticky hodnotí možnosti Ramanovy spektrometrie pro identifikaci karotenoidů sinic, řas a lišejníků. Vedle signálů karotenoidů je v několika případech uvedena interpretace dalších Ramanovských pásů získaných spekter, které odpovídají přítomnosti dalších biomarkerů. Získaná Ramanova spektra karotenoidů je nutno interpretovat s velkou obezřetností s ohledem na vliv několika faktorů, potenciálně způsobujících nesystematické posuny poloh Ramanových pásů (vazba karotenoidů v biologické tkáni, interakce s makromolekulami i experimentální faktory včetně spektrálního rozlišení použitých přístrojů). Značná strukturní podobnost mnohých karotenoidů (včetně délky jejich konjugovaných řetězců) je příčinou značné podobnosti Ramanovských spekter a tak tato metoda mnohdy neumožňuje jednoznačné rozlišení těchto molekul. Ideální se v případě možnosti získání extraktů ukazuje analýza směsí pigmentů pomocí HPLC.

## SUMMARY

This work deals with the possibility of Raman spectroscopical identification of selected biomarkers of extremophile species. It focuses mainly on selected cyanobacteria, algae and lichens with an emphasis on the ability to detect carotenoids. These pigments exhibit three characteristic bands of Raman spectra which represent stretching vibrations C=C; C-C and bending vibration C-CH<sub>3</sub> in molecules of carotenoids. Raman spectra were measured not only by laboratory microspectrometers ( $\lambda$  - 514 nm and 532 nm), but also by portable and handheld spectrometers ( $\lambda$  - 532 nm, 785 nm and 700 - 1100 nm). In the case of cyanobacteria, the spectroscopical analysis was performed also on the fractions obtained by high performance liquid chromatography (HPLC). This work critically evaluates the possibilities of Raman spectroscopy to identify the carotenoids of cyanobacteria, algae and lichens. Besides the signal of carotenoids, interpretation of other bands in the Raman spectra corresponding to the presence of other biomarkers is given here for selected samples. The obtained Raman spectra of carotenoids should be interpreted with great caution, because of the influence of several factors, which potentially cause unsystematic shifts in the positions of Raman bands (carotenoids bond in biological tissue, interactions with macromolecules, experimental factors including spectral resolution of Raman instruments). Significant structural similarities of many different carotenoids (including the length of the conjugated chain) is causing considerable similarities of Raman spectra and so this method often does not allow for a clear identification of these molecules. The ideal case of obtaining extracts is reflected in the analysis of pigment mixtures by HPLC.

## OBSAH

1.0 ÚVOD .....	1
2.0 EXTRÉMOFILNÝ ORGANIZMUS .....	3
2.1 Rozdelenie extrémofilných prostredí .....	4
2.1.1 Extrémy nízkych teplôt .....	4
2.1.2 Extrémy vysokej salinity .....	5
2.1.3 Extrémy vysokého tlaku .....	6
2.1.4 Extrémy vysokej teploty .....	6
2.1.5 Extrémy pH .....	7
2.1.6 Iné druhy extrémofilných prostredí .....	8
3.0 VYBRANÉ SKUPINY ORGANIZMOV VHODNÝCH PRE DEMOŠTRÁCIU VYUŽITIA RAMANOVEJ SPEKTROMETRIE .....	8
3.1 Sinice .....	8
3.2 Riasy .....	10
3.3 Lišajníky .....	11
4.0 NIEKTORÉ VÝZNAMNÉ PIGMENTY VYBRANÝCH DRUHOV ORGANIZMOV .....	12
5.0 ASTROBIOLÓGIA .....	16
6.0 SPEKTROMETRIA .....	18
6.1 Ramanova spektrometria .....	18
6.1.1 Princíp metódy .....	19
6.1.2 Ramanove spektrá .....	20
6.1.3 Základné schéma - Ramanov spektrometer .....	21
6.1.4 Prenosné prístroje .....	22
7.0 HPLC - VYSOKO ÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIA .....	24
8.0 PREHĽAD DRUHOV ORGANIZMOV POUŽITÝCH PRE RAMANOVU ANALÝZU .....	25
8.1 Taxonomické zaradenie analyzovaných organizmov pomocou Ramanovej spektrometrie .....	26
9.0 METODIKA .....	27
9.1 Príprava vzoriek psychrofilných rias .....	27
9.2 Príprava vzoriek lišajníkov .....	28
9.3 Príprava vzoriek psychrofilných siníc .....	29
9.4 Príprava zmesí pigmentov pomocou metódy HPLC .....	29
10.0 INŠTRUMENTÁCIA .....	30
10.1 Ramanove spektrometre a ich parametre .....	30
10.2 HPLC .....	31
11.0 VÝSLEDKY .....	32

11.1 Ramanova spektrometria vybraných druhov siníc z vypestovaných kultúr .....	32
11.2 Ramanova spektrometria vybraných druhov psychrofilných rias .....	35
11.3 Ramanova spektrometria vybraných druhov lišajníkov .....	37
11.4 Ramanova spektrometria vybraných frakcií pigmentov izolovaných pomocou metódy HPLC.....	42
11.5 Výsledné analýzy frakcií pigmentov siníc pomocou metódy HPLC .....	45
12.0 DISKUSIA .....	48
13.0 ZÁVER.....	54
14.0 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....	55

## Zoznam použitých obrázkov

Obr. 1 Peptidoglykan (upravené podľa URL 1).

Obr. 2 Fykobilizóm (upravené podľa URL 2).

Obr. 3  $\beta$  - karotén  $C_{40}H_{56}$  (upravené podľa URL 3).

Obr. 4 Luteín  $C_{40}H_{56}O_2$  (upravené podľa URL 4).

Obr. 5 Chlorofyl *a* (upravené podľa URL 5).

Obr. 6 Scytonemín (upravené podľa URL 6).

Obr. 7 Astaxantín (upravené podľa URL 16).

Obr. 8 Rover misie ExoMars (2018), (upravené podľa URL 13).

Obr. 9 Ramanov a Rayleigho rozptyl. Obrázok popisuje prechod častíc medzi virtuálnymi energetickými hladinami a zmenu ich vibračného stavu.

Obr. 10 (A, B) Prítomnosť psychrofilných rias na reliktoch snehu. Rozsiahlosť plochy povlakov je ľahko predstaviteľná na základe veľkosti napadaného ihličia.

Obr. 11 (A, B) *Chloromonas nivalis* a *Chloromonas brevispina* (spóry + bičíkaté štádiá). Veľkosť organizmov je cca 15 - 20  $\mu\text{m}$ .

Obr. 12 Lišajníky použité pre analýzu (A - *Cladonia coniocraea*: archív, B - *Candelaria pacifica*, C - *Cladonia digitata*, D - *Cladonia digitata*: sporangium, E - *Pseudevernia furfuracea*). Veľkosť vzoriek cca 4 cm.

Obr. 13 Namerané spektrá psychrofilnej sinice *Calothrix elsteri*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  532 nm), B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm), C - prenosný spektrometer ( $\lambda$  785 nm). Merania vypestovanej kultúry na Petriho miskách.

Obr. 14 Namerané spektrá psychrofilnej sinice *Phormidermis priestleyi*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  532 nm), B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm), C - prenosný spektrometer ( $\lambda$  785 nm). Merania vypestovanej kultúry na Petriho miskách.

Obr. 15 Namerané spektrá psychrofilnej sinice *Phormidium*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  532 nm), B - prenosný spektrometer ( $\lambda$  785 nm). Merania vypestovanej kultúry na Petriho miskách.

Obr. 16 Spektrá psychrofilných rias merané laboratórnym mikrospektrometrom ( $\lambda$  514 nm). Výsledné spektrá druhov *Chloromonas nivalis* + *Chloromonas brevispina*

Obr. 17 Spektrá psychrofilných rias namerané príručným spektrometrom ( $\lambda$  532 nm) v zmrznutom snehu. Výsledné spektrá druhov *Chloromonas nivalis* + *Chloromonas brevispina*.

Obr. 18 Namerané spektrá lišajníka *Cladonia coniocraea* z archívnych zbierok. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm), B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm).

Obr. 19 Namerané spektrá lišajníka *Candelaria pacifica*. A, D - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm), B, C - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm).

Obr. 20 Namerané spektrum lišajníka *Candelaria pacifica*. E - príručný spektrometer ( $\lambda$  700 - 1100 nm).

Obr. 21 Namerané spektrá lišajníka *Cladonia digitata*. A, B - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm). C, D, E - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm).

Obr. 22 Namerané spektrá lišajníka *Pseudevernia furfuracea*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm). B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm). C - príručný spektrometer ( $\lambda$  700 - 1100 nm).



Obr. 23 Namerané spektrá frakcií pigmentov pomocou laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm). Označenie vzoriek FM. Na základe retenčných časov určené ako: A - celkový extrakt bez frakcionácie, B - myxoxantofyl (ret. čas 14,376), C - astaxantin (20,034), D - kantaxantin (20,727).

Obr. 24 Namerané spektrá frakcií pigmentov pomocou laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm). Označenie vzoriek TH. Na základe retenčných časov určené ako: A - celkový extrakt bez frakcionácie, B - myxoxantofyl (ret. čas 14,378), C - kantaxantin (20,762), D - echinenón (24,898), E - chlorofyl *a* + neznámy karotenoid (26,26), F - astaxantin (20,063), G -  $\beta$ -karotén (28,339), H - karoteniod X (10,502).

Obr. 25 Chromatogram sinice *Scytonema hyalinum* (TH). Pigmenty odpovedajúce príslušným retenčným časom sú popísané v tabulke č. 18.

Obr. 26 Chromatogram sinice *Scytonema* sp. (FM). Pigmenty odpovedajúce príslušným retenčným časom sú popísané v tabulke č. 19.

## Zoznam použitých tabuliek

Tab. 1 Tabuľka popisuje základné rozdelenie organizmov žijúcich v prostredí s extrémne nízkymi teplotami (upravené podľa Canganella a Wiegel, 2011).

Tab. 2 Tabuľka popisuje základné rozdelenie organizmov žijúcich v prostredí s extrémne vysokými hodnotami salinity (upravené podľa Larsen, 1962; Canovas *et al.*, 1996).

Tab. 3 Tabuľka popisuje základné rozdelenie organizmov žijúcich v prostredí s extrémne vysokými hodnotami tlaku (upravené podľa Horikoshi, 1998).

Tab. 4 Tabuľka popisuje základné rozdelenie organizmov žijúcich v prostredí s extrémne vysokými hodnotami teploty (upravené podľa Mesbah a Wiegel, 2008).

Tab. 5 Tabuľka popisuje základné rozdelenie organizmov žijúcich v prostredí s extrémne nízkymi hodnotami pH (upravené podľa Canganella a Wiegel, 2011).

Tab. 6 Tabuľka popisuje základné rozdelenie organizmov žijúcich v prostredí s extrémne vysokými hodnotami pH (upravené podľa Wiegel, 1998).

Tab. 7 Tabuľka popisuje základné taxonomické rozdelenie analyzovaných organizmov pre túto diplomovú prácu (upravené podľa URL 17, 18, 19).

Tab. 8 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy *Calothrix elsteri*

Tab. 9 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy *Phormidermis priestleyi*

Tab. 10 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy sinice *Phormidium*

Tab. 11 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy *Chloromonas nivalis* a *Chloromonas brevispina*

Tab. 12 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy lišajníka *Cladonia coniocraea*

Tab. 13 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy lišajníka *Candelaria pacifica*

Tab. 14 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy lišajníka *Cladonia digitata*

Tab. 15 Tabuľka popisuje základné Ramanove pásy lišajníka *Pseudevernia furfuracea*

Tab. 16 Tabuľka popisuje základné hodnoty pásov frakcií pigmentov extrahovaných zo sinice *Scytonema* sp. Označenie vzoriek: FM. (Uvedené hodnoty vlnočtov odpovedajú meraniam na frakciách odpovedajúcich uvedeným karotenoidom).

Tab. 17 Tabuľka popisuje základné hodnoty pásov frakcií pigmentov extrahovaných zo sinice *Scytonema hyalinum*. Označenie vzoriek: TH. (Uvedené hodnoty vlnočtov odpovedajú meraniam na frakciách odpovedajúcich uvedeným karotenoidom).

Tab. 18 Tabuľka popisuje extrahované pigmenty sinice *Scytonema hyalinum* (TH) a ich retenčné časy.

Tab. 19 Tabuľka popisuje extrahované pigmenty sinice *Scytonema* sp. (FM) a ich retenčné časy.

Tab. 20 Tabuľka popisuje hodnoty Ramanovho pásu ( $\nu_1C=C$ ) - valenčná vibrácia. Posudzuje posuny pásu v rámci jednotlivých karotenoidov v závislosti na štruktúre konjugovaného reťazca. Popisuje výsledky vlastných meraní a hodnoty z literatúry. Tmavá farba znázorňuje čistú látku.

### **Zoznam použitých schém**

Schéma 1 Základné schéma laboratórneho Ramanovho mikrospektrometra, ktoré popisuje modrou farbou pohyb laserového lúču a následnú detekciu rozptylu žiarenia (1 - laser, 2 - filter, 3 - zrkadlo, 4 - Notch filter, 5 - objektív, 6 - vzorka, 7 - optika / šošovka, 8 - štrbina, 9 - mriežka, 10 - detektor).

### **Zoznam použitých skratiek**

ATP (adenozíntrifosfát)

CCD (Charge-Coupled device)

FT (Fourierova transformácia)

HPLC (high performance liquid chromatography) - vysoko účinná kvapalinová chromatografia

IR (infrared – infračervené)

ITS (internal transcribed spacer)

MAAs (mycosporine like amino acids - amino kyseliny podobné mykosporínu)

NADPH (nikotínamidadenínindinukleotidfosfát)

PAR (photosynthetic active radiation – fotosynteticky aktívne žiarenie)

PCD (programmed cell death – programovaná bunková smrť)

ROS (reactive oxygen species - reaktívne formy kyslík)

UV,UVR (ultraviolet radiation – ultrafialové žiarenie)

VAZ (violaxantin, antheraxantin, zeaxantin) – pigmenty xantofilového cyklu

VIS (visible – viditeľný)

### **Zoznam skratiek používaných pri popise Ramanových spektrier**

s (strong – silný)

vs (very strong – veľmi silný)

m (medium – stredne silný)

w (weak – slabý)

vw (very weak – veľmi slabý)

## 1.0 ÚVOD

Planéta Zem je rozmanitý ekosystém života a rozličných životných foriem. Takmer vo všetkých podmienkach nájdeme dôkazy o prítomnosti života. Nielen na miestach blízko preskúmaných ako sú napríklad jazerá alebo lesy, ale aj v prostredí, ktoré by pre štandardné fyziologické podmienky bolo nezlučiteľné so životom. Takéto prostredia nazývame tiež extrémnymi. Organizmy, ktoré dokážu v týchto podmienkach prosperovať sa nazývajú extrémofily. Na Zemi máme hneď niekoľko ekvivalentov toho, čomu hovoríme extrémne prostredie. Patria sem napríklad hlbokomorské oblasti s vysokým tlakom a vysokou teplotou v oblastiach hydrotermálnych systémov, Arktické alebo Antarktické ľadovce, suché oblasti púští, miesta vzniku evaporitov a mnohé iné.

Vo všetkých týchto oblastiach nájdeme istý druh organizmov, ktoré si vytvorili na tieto faktory vhodné adaptácie a dokážu prosperovať za "nehostinných" podmienok. Výsledkom evolúcie sú potom rôzne druhy metabolitov, ktoré boli vyvinuté za určitým účelom. Práve tieto produkty ich metabolizmu sú predmetom výskumu mnohých vedcov, ktorý sa snažia o identifikáciu týchto látok a následnú analýzu. Tieto látky sa tak dajú použiť ako vhodné biomarkre pri dôkaze prítomnosti života či už minulého, alebo súčasného. Identifikácia takýchto látok je často veľmi obtiažná, pretože v prírode dochádza často k degradácii biologického materiálu a tak sa nám zriedka kedy zachovajú. Ďalším problémom je zvolenie vhodnej identifikačnej metódy, ktorá by bola schopná detegovať látku a pritom ju čo najmenej poškodiť.

Jednou z vhodných metód by mohla byť Ramanova spektrometria, ktorá sa javí ako účinná nedeštruktívna metóda, schopná detekcie priamo v teréne. Pri správne zvolenom nastavení a vhodnej vlnovej dĺžke sa stáva významným nástrojom v identifikácii biomarkerov. Metóda je rýchla, účinná a miniaturizovaním spektrometrov sa stala v posledných rokoch veľmi praktickou pre transport a prácu v teréne.

Dôležitou súčasťou výskumu extrémofilov je aj obor astrobiológia, ktorý sa zaoberá výskumom možností života vo vesmíre. Na základe extrémnych prostredí na Zemi vyhodnocujú vhodné oblasti výskumu mimo našu planétu, kde by sa mohol vyskytovať život či už v súčasnosti, alebo v minulosti. Jedným z významných objektov výskumu astrobiológie je aj planéta Mars. Po významnom dôkaze o prítomnosti vody na Marse sa záujem o túto planétu ešte viac zvýšil. Z poznatkov o Zemi vieme, že voda je základnou podmienkou pre život mezofilných organizmov, ale aj extrémofilných. Práve metóda Ramanovej spektrometrie je vhodným kandidátom na plánovanú misiu ExoMars (2018), ktorá by mala byť zameraná práve na identifikáciu biomarkerov priamo v teréne a priniesť tak dôkazy o životných formách na Marse.

Jedným z vhodných príkladov biomarkerov môže byť aj produkcia tzv. karotenoidov. Tento druh pigmentov sa produkuje za účelom ochrany proti UV žiareniu. Možnosťami detegovania týchto látok či už priamo v teréne, alebo za laboratórnych podmienok sa zaoberá aj táto práca. Sinice, ako jeden z najstarších organizmov prosperujúci na Zemi (3,8 mld. rokov), sú schopné produkcie takýchto látok. Preto sa demonštrácia využitia Ramanovej spektrometrie v tejto práci, venuje aj týmto druhom organizmov. Pre ďalší výskum možností tejto metódy sme zvolili príklady lišajníkov a psychrofilných rias ako organizmov, ktoré takisto odolávajú extrémnym faktorom prostredia. Vhodný výber organizmov vznikol v spolupráci s RNDr. Lindou Nedbalovou Ph.D. (Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie), ktorá nám pomohla pri výbere vhodnej lokality výskytu psychrofilných rias. RNDr. David Svoboda, Ph.D. (Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra botaniky) nám poskytol vzorky čerstvých lišajníkov, u ktorých sme predpokladali výskyt karotenoidov. Ďalším príkladom boli vzorky psychrofilných siníc od doc. Ing. Josefa Elstera CSc., z Botanického ústavu AV ČR, vedecké pracovisko Třeboň. Mnohé organizmy produkujú viacero druhov pigmentov. Preto bola táto práca doplnená o analýzu frakcií pigmentov z extraktov

siníc získaných metódou Vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie. Vzorky nám poskytol Mgr. Jan Pilný (Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň).

Základným predmetom výskumu tejto práce je poukázať na vzorkách prevažne extrémofilných organizmov na možnosti detekcie karotenoidov ako vhodných biomarkerov. Poukazuje na spojenie medzi výskumom extrémnych prostredí na Zemi a ich ekvivalentmi, ktoré sú zaujímavé pre bližší výskum astrobiológie. Zameriava sa na možnosti využitia Ramanovej spektrometrie v exobiologickom výskume. Práca sa sústreďuje na dôkaz prítomnosti významných biomarkerov v organizmoch a tým poukazuje na možnosť detegovať stopy ich života. Nesnaží sa o presnú identifikáciu druhov karotenoidov a to z dôvodu, že Ramanova spektrometria väčšinou nie je schopná ich presnej identifikácie. Výhodnejšou v tejto oblasti sa javí metóda HPLC, ktorá dokáže jednotlivé metabolity rozlíšiť a na základe štandardov pre retenčné časy aj identifikovať.

## 2.0 EXTRÉMofilný ORGANIZMUS

Podstatná časť organizmov žijúcich na Zemi sa vyskytuje v podmienkach, ktoré sú veľmi odlišné od hodnôt prospešných pre ľudský život. Napriek tomu sú tieto formy života schopné prosperovať a množiť sa. Pre ľudský druh a väčšinu vyšších organizmov sú prijateľné hodnoty okolitého prostredia zhruba 37 °C, pH 7,4, salinita približne od 0,9 % do 3% a tlak 1 atm (Canganella a Wiegel, 2011). Pri pohľade na Zem a jej rôznorodosť životných prostredí je faktom, že život nájdeme aj v podmienkach, ktoré by sme mohli nazvať extrémne. Takýto typ organizmov teda nazveme extrémofilné. Z toho vyplýva fakt, že tieto druhy vyžadujú pre svoj život a rast extrémne podmienky, dokážu v nich prosperovať a získavať potrebné živiny z okolitých zdrojov. Naproti tomu definujeme pojem extrémotolerantné organizmy, ktoré síce dokážu prežiť extrémne podmienky prostredia, ale optimálneho rastu dosahujú pri životných faktoroch, ktoré majú priemerné (normálne) hodnoty. Extrémofily sú charakterizované maximálnymi a minimálnymi hodnotami určitých faktorov.

Prvý krát bol pojem extrémofil použitý v roku 1974 pánom MacElroyom (MacElroy, 1974). Tento pojem zahŕňa rôzne druhy živočíchov alebo rastlín, od prokaryotických (sinice, baktérie) cez riasy, huby atď. V dnešnej dobe sa predpokladá, že je definovaných približne 2 % mikroorganizmov (Canganella a Wiegel, 2011). Niektoré prostredia na Zemi nevykazujú prítomnosť života. To ale neznamená, že by sme s určitosťou mohli označiť toto prostredie za nevhodné pre život. Často krát sme limitovaný technológiou, ktorá by bola schopná identifikovať stopy života alebo život na určitých extrémnych miestach. Jednou z technológií, ktorá je schopná identifikácie významných biomarkerov je Ramanova spektrometria. Jej charakterizáciou sa zaoberá samostatná kapitola v tejto práci.

Existujú dve teórie vzniku adaptácií života na extrémne prostredia. Prvá je založená na fakte, že extrémofily sú fylogeneticky staršou skupinou než ich dnešný potomkovia. Druhá teória tvrdí, že adaptácie na extrémne sa vyvinuli až sekundárne (Wiegel a Adams, 1998). Táto skupina organizmov je študovaná aj z hľadiska exobiológie, ktorá skúma možnosti života vo vesmíre. Jedna z teórií, ktoré sa snažia dokázať pôvod života na Zemi tvrdí, že život prišiel na Zem z okolitého vesmíru (Canganella a Wiegel, 2011). Tým pádom je veľký záujem vo výskume extrémofilov, keďže sú schopné prežiť extrémne podmienky vyskytujúce sa v rôznych častiach vesmíru. Z hľadiska finančných zdrojov a limitovanou technológiou sú výskumy v tejto oblasti sústredené hlavne na extrémne prostredia na Zemi, ktoré sa potom porovnávajú s možnosťami života vo Vesmíre. Na základe výpočtov a modelov je potom možné zistiť, kam smerovať ďalší výskum v oblasti exobiológie. Jedným z takých miest je napríklad planéta Mars, na ktorej bola dokázaná prítomnosť vody. Nakoľko je voda základom života ako ho poznáme, výskum sa orientuje na miesta na Zemi s podobnými extrémnymi podmienkami, aké vládnu na "Červenej planéte". Jedným z takých miest je aj púšť Atacama, na ktorej prebiehal výskum aj pomocou Ramanových spektrometrov. Bližšie sa tejto problematike venujú práce Vítka *et al.*, 2012 a Vítka *et al.*, 2009a. Vedci tvrdia, že hypertermofilné organizmy, ktoré sú na fylogenetickom strome života blízko jeho koreňov, by mohli byť najbližším príbuzným posledného spoločného predka všetkých organizmov (LUCA – last universal common ancestor); (Imanaka, 2008).

Medzi extrémne prostredia pre život môžeme zaradiť napríklad púšte, hlbokomorské alebo arktické prostredie a taktiež oblasti zvýšených teplôt v okolí postvulkanickej činnosti. Za extrémne prostredia sú považované aj hydrotermálne systémy v oblasti stredoocéánskeho chrbta, pôdy vulkanického pôvodu (fumaroly, solfatary) alebo miesta s veľkými zmenami pH ako napríklad alkalické jazerá ("soda lakes"). Dôležité je uvedomiť si, že jeden organizmus môže mať viacero adaptácií k rôznym druhom extrémnych podmienok. Napríklad život v slanej vode na dne morí sa musel prispôbiť vysokej salinite, nízkej teplote a zároveň vysokým tlakom. Inými slovami sa extrémofilné organizmy vyskytujú v prostredí vysokej teploty, nízkej teploty, vysokej salinity, vysokého alebo nízkeho pH, vysokej slnečnej radiácie a sucha alebo prostredia s nedostatkom živín.

## 2.1 Rozdelenie extrémofilných prostredí

### 2.1.1 Extrémy nízkych teplôt

Pri celkovom pohľade na charakter prostredí pre život na našej planéte je zrejmé, že prevažná časť biosféry je typická permanentne nízkymi teplotami. Je to približne 80 % celkovej biosféry, ktorá má priemernú teplotu  $< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Cavicchioli a Thomas, 2000). Dôvodom je, že sa sem radia aj oceány a moria s ich hlbokomorskými oblasťami, ktorých priemerná teplota je  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Chladné oblasti zahŕňajú aj permafrost, Arktické alebo Antarktické ľadovce a takisto ľudskou rukou vytvorené prostredia, ktoré slúžia na kultiváciu organizmov žijúcich v chladných podmienkach (Canganella a Wiegel, 2011). Organizmy, ktoré prosperujú v teplotách  $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  nazývame psychrofilné. Teploty blízke  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zastavujú ich vývoj. Organizmy dosahujúce optimálneho rastu pri teplotách  $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nazývame psychrotolerantné. Tie dokážu tolerovať extrémne nízke teploty, ale ich vývoj je značne redukovaný. Tieto skupiny organizmov sú zastúpené hlavne gram-negatívnym typom baktérií (druhy *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, ...). V menšom množstve máme zástupcov kmeňov *Actinobacteria* a *Firmicutes*, ktoré patria medzi tzv. gram-pozitívne typy baktérií. Medzi psychrofilmi a ostatnými na chlad adaptovanými organizmami nájdeme aj zástupcov skupín Archea, kvasiniek alebo húb (Canganella a Wiegel, 2011). Polárne oblasti sú skúmané aj z hľadiska ich analogického prostredia voči extraterestrickým oblastiam Marsu, konkrétne jeho pôde. Jazero Vostok by mohlo byť analógom k ľadom pokrytej Európe (mesiac planéty Jupiter).

Extrémy nízkych teplôt	
psychrotolerant	optimálny rast : $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tolerancia extrémov)
psychrofil	optimálny rast : $< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (často teploty okolo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

**Tab. 1** Základné rozdelenie organizmov v extrémoch nízkych teplôt (upravené podľa Canganella a Wiegel, 2011).

Redukcia teploty spomaľuje väčšinu fyziologických procesov. Zmení interakcie medzi proteínmi, zníži fluiditu membrány, zvýši viskozitu vody. Zvýšená viskozita môže spôsobiť hlavný problém a to vznik intracelulárneho ľadu. Ten môže poškodiť bunky a spôsobiť ich smrť. Navyše zníži rozpustnosť solí a mení pH, čo ovplyvní rozpustnosť proteínov a náboj aminokyselín (Gerday *et al.*, 2000). Preto majú psychrofilny vyvinuté účinné adaptácie na nízke teploty. Hlavnou reakciou na stres je zníženie bunkovej veľkosti, syntéza intracelulárnych rozpustných látok a zmena kompozície bunkovej membrány. V membránových lipidoch dochádza k zvýšeniu nenasatovaných mastných kyselín a tým sa udržuje fluidita vo vnútri bunky za nízkych teplôt. Mnoho organizmov má hrubé, pigmentované bunkové steny a okolo buniek extracelulárne polysacharidy. Najčastejšie fotoprotektívne zlúčeniny sú melaníny, karotenoidy a aminokyseliny podobné mykosporínu (Christner *et al.*, 2000). Bakteriálna bunka je veľká len niekoľko mikrónov a intracelulárna voda blízko povrchu má teda znížený bod mrazu. Voda uprostred má vysokú koncentráciu rozpustených látok (soli) a preto nezamrzne (Pomeroy a Wiebe, 2001). Štruktúrne zmeny v proteínoch umožnia správnu funkciu enzýmov v prostredí s nízkou kinetickou energiou reagujúcich molekúl (Gerday *et al.*, 1997). Sinice a baktérie sú v týchto extrémoch schopné fotosyntézy a fixácie dusíku. Termofily a mezofily produkujú enzýmy s rigidnejšou štruktúrou, ktorá im zabezpečuje termostabilitu. Psychrofilny majú enzýmy s vysokou flexibilitou, ktorá pri nízkych energetických nákladoch zvyšuje komplementaritu medzi aktívnym miestom enzýmu a substrátom. Tieto enzýmy majú vysokú katalytickú aktivitu pri nízkych teplotách a ich termostabilita so zvyšujúcou teplotou klesá. Zabezpečujú podobnú termostabilitu ako u iných typov extrémofilov (Fields, 2001; Cavicchioli *et al.*, 2002). Mnoho psychrofilných rozsievok a rias uvoľňuje v ľade aktívne látky, ktoré dokážu meniť povrch a optické vlastnosti ľadu, vyskytujúceho sa

v okolí bunky. Menia teda fyzikálno-chemické vlastnosti prostredia. Najčastejšie plnia funkciu kryoprotektantov glykoproteíny (Krembs *et al.*, 2002).

### 2.1.2 Extrémy vysokej salinity

Približne dve tretiny zemského povrchu (71 %) pokrýva svetový oceán. Vytvára teda prostredie, ktoré má priemernú salinitu asi 36 ‰ (3,6 ‰). V jednom litri vody je teda rozpustených 36 gramov NaCl. Takýto obsah solí nie je vhodný pre vyššie organizmy, vrátane človeka. Náš organizmus vyžaduje viac prijateľné podmienky a to salinitu medzi 0 ‰ až 0,9 ‰. Na druhej strane, organizmom ako sú napríklad ryby, sa darí pri hodnotách okolo 3 ‰ NaCl. Čo je teda priemerná salinita svetového oceánu, alebo salinita ľudských slz (Canganella a Wiegel, 2011). Na Zemi sa vyskytujú miesta, ktoré nedovoľujú prosperovať vyšším organizmom, dokonca ani niektorým prokaryotickým. Takéto hypersalinné prostredia sú vhodné pre niektoré mikroorganizmy, ktoré nazývame halofily. Stupeň salinity je závislý na teplote, pH, zrážkach, výpare, prítokoch riek, ľadovcoch alebo všeobecnej cirkulácii vody vo svetovom oceáne.

Život v oceánoch a moriach sa naučil tolerovať salinitu približne 3 ‰. Patria sem napríklad ryby, niektoré bezstavovce, ale aj väčšina prokaryot. Takéto organizmy nazývame halotolerantné. Optimálneho rastu dosahujú pri salinite 0 ‰ – 0,5 ‰ (Oren, 2006). Halofily vyžadujú zvýšené hodnoty salinity. Môžeme ich rozdeliť na slabých halofilov (2 ‰ - 5 ‰ NaCl), miernych halofilov (5 ‰ - 20 ‰ NaCl) a extrémnych halofilov (20 ‰ - 30 ‰ NaCl); (Larsen, 1962). Život týchto organizmov je skúmaný aj z hľadiska exobiológie, pretože sa predpokladá podobné zloženie solí na Marse, ako na Zemi. Zahŕňa to aj predpoklad života založeného na bázy uhlíku. Halofilné habitaty na Zemi zahŕňajú oblasti hyperslaných jazier, evaporitmi pokryté plochy, soľanky, polárne oblasti, Antarktické skaly alebo dokonca ropné polia v Severnom mori (Lien *et al.*, 2000). Dominantná časť solí je tvorená iónmi Na<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup>, bežné sú aj Mg<sup>2+</sup> alebo Ca<sup>2+</sup> (Canganella a Wiegel, 2011). Všetky sú prítomné vo vysokých koncentráciách oproti bežnému prostrediu. V soľankách sa nám väčšinou zráža CaSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> ale aj NaCl. V hypersalinných jazerách sú to hlavne karbonátové zrazeniny horčíka a vápnika.

Extrémy vysokej salinity		koncentrácia NaCl
halotolerant		0 ‰ - 0,5 ‰ (max. do 3 ‰)
halofil :	slabý -	2 ‰ - 5 ‰
	mierny -	5 ‰ - 20 ‰
	extrémny -	20 ‰ - 30 ‰

**Tab. 2** Základné rozdelenie organizmov v extrémoch vysokej salinity (upravené podľa Larsen, 1962; Canovas *et al.*, 1996).

Na optimálny rast v extrémnom prostredí so zvýšenou salinitou sú halofily vybavené významnými adaptáciami. Tieto znaky sú dôležitým predmetom štúdia. Významné sú produkty metabolizmu (sekundárne metabolity, osmolyty) týchto organizmov. Výskumný tím profesora Jehličky sa zaoberá týmito látkami, ako možnými biomarkermi pri exobiologickom výskume. Dôležitú úlohu pritom opäť zohráva Ramanova spektrometria, ktorá sa ukazuje ako vhodná metóda pri identifikácii týchto látok ako v teréne, tak aj v laboratórnych podmienkach. V práci Jehličky a Orena, 2013b bolo znázornené využitie príručného Ramanovho spektrometru (532 nm) na vzorke sadrovca z lokality Eilat (Izrael). Vzorke pochádzala zo slaných kryštalizačných nádrží. V jednotlivých farebných vrstvách sadrovca sa nachádzali mikrobiálne komunity, ktoré boli v každej vrstve zastúpené iným druhom halofila.



Následne boli zmerané bunkové pelety týchto organizmov a preukázala sa prítomnosť bakterioruberínu ako dominantného karotenoidu. Ďalej boli preukázané prítomnosti salinixantínu, deriváty spiriloxantínu, echinenónu a myxoxantofylu. Očakávaný chlorofyl v zelenej vrstve nebol danou vlnovou dĺžkou detegovaný. Ďalej je téma halofilov popísaná v prácach Jehličky a Orena, 2013a; Jehličky *et al.*, 2012; Jehličky *et al.*, 2011.

Pre optimálny rast halofilov sú významné ióny sodíka, ktoré sú súčasťou príjmu živín, membránovej respirácie a výroby energeticky významného ATP (Unemoto, 2000). Preto je dôležité, aby si organizmy boli schopné kontrolovať hladinu sodíka v cytoplazme. Pomocou vnútrobunkových štruktúr a vhodných enzýmov sú schopné aktívne vytlačiť prebytočný sodík (Eddy a Jablonski, 2000). Využitím ATP sú halofily, ale aj halotoleranti, schopní importovať sodík do substancií ako amino kyseliny (Unemoto, 2000). V hypersalinom prostredí je dôležité sa vyrovnávať s osmotickým tlakom. Organizmy si z tohto dôvodu zvyšujú intracelulárne hladiny iónov (KCl) alebo akumulujú rozpustené organické látky (osmolyty); (Empadinhas a da Costa, 2008; Jehlička *et al.*, 2011). Na takéto extrémne podmienky majú halofily prispôbené aj enzýmy a proteíny, ktoré napr. u obligátnych archea pracujú aktívne a stabilne pri koncentráciách solí nad 2 - 3 M KCl. Pod touto hranicou denaturujú (Eisenberg, 1995).

Skupina halofilov zahŕňa hlavne prokaryotické organizmy (archea + baktérie) a to aeróbne, aj anaeróbne formy. Halofilné a halotolerantné baktérie spolu s eukaryotmi akumulujú hlavne neutrálne osmolyty, pričom halotolerantné a halofilné archea akumulujú negatívne nabité osmolyty. Napríklad halofilné archea majú takú istú základnú štruktúru fosfolipidov a glykolipidov ako termofilné archea. Dva izopreniodné reťazce C<sub>20</sub> sú pripojené na glycerol a zvyšná hydroxilová skupina je spojená na fosfonát alebo glykozid (Wilson a Brimble, 2009).

### 2.1.3 Extrémy vysokého tlaku

Všetky dna svetového oceánu sú prostredím, ktoré je vystavené vysokému tlaku a nízkej teplote. Lokálne v oblasti hydrotermálnych prieduchov je vysoká teplota (až 400 °C). Organizmy žijúce vo vysokotlakových podmienkach označujeme ako barofily (piezofily), (ZoBell a Morita, 1957). Základné rozdelenie je uvedené v Tab. 3.

Obligátne barofilné organizmy patria do piatich rodov proteobaktérií a to *Psychromonas*, *Moritella*, *Colwellia*, *Photobacterium* a *Shewanella* (Delong *et al.*, 1997). Tieto organizmy vedú regulovať fluiditu membrán na základe narastajúceho tlaku. Navyše majú adaptované gény ako na atmosférický, tak na vysoký tlak a v závislosti na zmenách sa aktivita týchto génov reguluje (Kato *et al.*, 1996b).

Extrémy vysokého tlaku	
barofil (piezofil)	optimálny rast za tlaku > 40 MPa
barotolerant	optimálny rast za tlaku < 40 MPa a sú schopné rásť aj za atmosférického tlaku

**Tab. 3** Základné rozdelenie organizmov v extrémoch vysokého tlaku (upravené podľa Horikoshi, 1998).

### 2.1.4 Extrémy vysokej teploty

Organizmy žijúce v extrémoch vysokej teploty majú aj na Zemi svoje prirodzené prostredia. Patria sem oblasti s vulkanickou aktivitou, podmorské hydrotermálne systémy, podzemné zásoby ropy, prehriate povrchové vody alebo komposty a haldy antropogénneho charakteru (Oshima a Moriya, 2008). Takéto organizmy nazývame termofily. Bližšie sú charakterizované v Tab. 4.

Extrémy vysokej teploty		optimálna teplota
termofil	a) hypertermofil	≥ 80 °C
	b) extrémny termofil	70 °C - 80 °C
	c) mierny termofil	45 °C - 70 °C
termotolerant		okolo 35 °C

**Tab. 4** Základné rozdelenie organizmov v extrémoch vysokej teploty (upravené podľa Mesbah a Wiegel, 2008).

Vykonávajú metabolické procesy ako metanogenéza, anaeróbna či aeróbna respirácia alebo fermentácia. Významným znakom všetkých hypertermofilov je enzým reverzná gyráza, ktorý dokáže zabezpečiť vysokú termostabilitu DNA (Sato *et al.*, 2003). Hypertermofilné archea a baktérie zastupujú rody ako *Sulfolobus*, *Thermococcus*, *Thermotoga* alebo *Aquifex* (Canganella a Wiegel, 2011). Mierne a extrémne termofily zastupujú druhy ako anaeróbna baktéria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Rainey *et al.*, 1994). Zastúpenie aeróbných druhov je napríklad *Bacillus stearothermophilus* (Canganella a Wiegel, 2011). Termofilné organizmy sa považujú za prvé životné formy na planéte. V niektorých prípadoch využívajú pre život substráty, o ktorých sa predpokladá, že boli v prvotnom terestrickom zložení a takisto produkujú látky, ktoré prevažujú v súčasnej geochémii.

### 2.1.5 Extrémy pH

Fyziologické hodnoty pH pre život buniek vyšších organizmov sa pohybujú okolo hodnoty 7,4. Morské ryby zasa potrebujú pre svoj život pH aké má morská voda a to 8,1 - 8,4. No nájdu sa aj organizmy, ktoré vyžadujú extrémne hodnoty blízke ku koncom pH rozsahovej škály. Na základe toho ich delíme na alkalofilov alebo acidofilov (Canganella a Wiegel, 2011).

Acidofilné organizmy sú schopné rásť pri hodnotách pH < 5, optimum rastu dosahujú v rozmedzí 2 - 4. Vyvinuté majú efektívne mechanizmy pre udržanie vnútornej homeostázy. Využívajú napríklad reverzný membránový potenciál a vysoko nepriepustné bunkové membrány. Tieto bunkové membrány dokážu regulovať tok protónov smerom do bunky ale aj smerom von. Zvyšujú si množstvo purínov v kodónoch, čo vedie k denaturácii (Canganella a Wiegel, 2011). Nájde ich v pôdach vulkanického charakteru (solfatary, fumaroly) alebo v prostrediach vzniknutých antropogénnym spôsobom, pri ťažbe uhlia alebo kovov (Bond *et al.*, 2000; Johnson, 1998). Zástupcom acidofilných prokaryot je napríklad baktéria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, ktorá pri pH < 3 dokáže oxidovať síru a železo (Leduc a Ferroni, 1994).

Extrémy nízkeho pH		
acidofil	schopnosť rastu pri pH < 5	
	optimum	pH 2 - 4

**Tab. 5** Základné rozdelenie organizmov v extrémne nízkom pH (upravené podľa Canganella a Wiegel, 2011).

Ak organizmy preferujú vysoké hodnoty pH, nazývame ich alkalofily. Optimálne rastú pri pH > 9. Pri neutrálnom alebo nižšom pH rastú veľmi obtiažne (Canganella a Wiegel, 2011). Ich bunkový povrch zohráva dôležitú úlohu pri udržaní stabilného vnútorného pH, ale táto ich vlastnosť nie je poriadne preskúmaná. Takéto organizmy sa vyskytujú napríklad v záhradných pôdach alebo alkalických jazerách s vysokým obsahom Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Alkalofily vyžadujú pre svoj optimálny rast ióny sodíka. Vďaka tomu sú schopné udržať správny protónový gradient intracelulárnych H<sup>+</sup> iónov a tak udržať

správne pH vo vnútri cytoplazmy (Mesbah *et al.*, 2009). Ich intracelulárne enzýmy majú vyššie rýchlosti katalýzy za neutrálneho pH, ale extracelulárne enzýmy pri hodnotách pH > 9 (Larson a Kallio, 1954). Patria sem zástupcovia prokaryot radu *Chroococcales* alebo *Spirulina*, alebo archeí ako napríklad *Halorubrum Vacuolatum* (Canganella a Wiegel, 2011).

Extrémny vysokého pH			
alkalotolerant	optimum pH < 8,5		max. pH ≥ 9
alkalofil	fakultatívny	min. pH < 8	opt. pH > 8,5; pri hodnotách blízkych neutrálnemu pH (6,5) nie sú schopné rasti, alebo rastú veľmi pomaly

**Tab. 6** Základné rozdelenie organizmov v extrémne vysokom pH (upravené podľa Wiegel, 1998).

### 2.1.6 Iné druhy extrémofilných prostredí

Vyššie uvedené prostredia sú typickou definíciou extrémov. Existujú aj doplnkové faktory, ktorým musia organizmy čeliť, pokiaľ chcú optimálne prosperovať. Tie sa často prelínajú so základnými typmi extrémov. Niektoré oblasti na Zemi sú vystavené intenzívnejšiemu slnečnému žiareniu. Napríklad oblasti blízko pólů. Organizmy používajú rôzne opatrenia ako napríklad pigmenty (karotenoidy), ktoré ničia nebezpečné kyslíkové radikály. Identifikácia týchto pigmentov je hlavným predmetom tejto práce. V súvislosti so silným UV žiarením je dôležité spomenúť ďalší typ extrémneho prostredia a to extrémne suché. Príkladom by mohla byť púšť Atacama na západnom pobreží Južnej Ameriky. V súvislosti s výskumom na týchto lokalitách sa výrazne podieľal Ramanov spektrometer. V práci Vítka *et al.*, 2012 veľmi presne demonštrovali využitie tejto metódy v identifikácii významných biomarkerov organizmov žijúcich v týchto extrémoch.

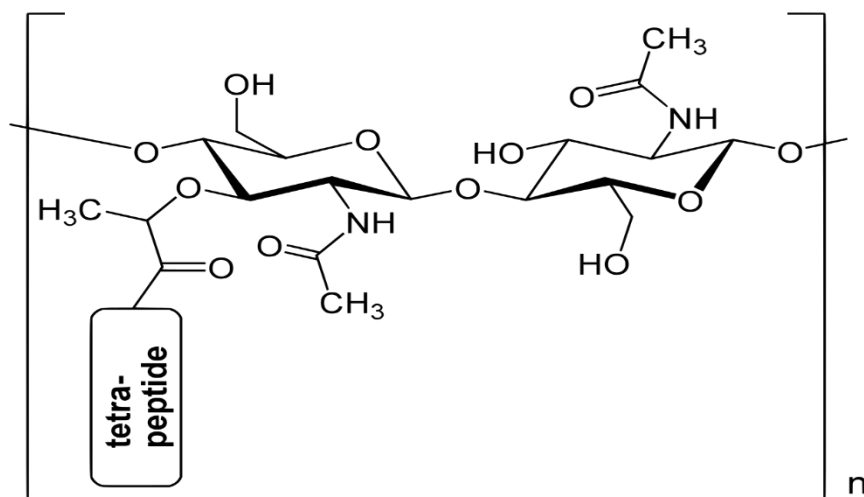
## 3.0 VYBRANÉ SKUPINY ORGANIZMOV VHODNÝCH PRE DEMOŠTRÁCIU VYUŽITIA RAMANOVEJ SPEKTROMETRIE

### 3.1 Sinice

Cyanobaktérie sú najrozsiahljšou skupinou gram-negatívnych fotosyntetizujúcich prokaryotických organizmov. Na Zemi sú kozmopolitne rozšírené od horúcich prameňů až po oblasti Antarktídy a Arktídy (Stanier a Cohen-Bazire, 1977). Ich pôvod sa datuje do obdobia Prekambria. V tomto období neexistovala ozónová vrstva, takže cyanobaktérie boli evolučným tlakom prinútené k vývoju efektívnych mechanizmov obrany proti UV-radiácii (Rajeshwar a Donat, 2007). Najstaršie nálezy skamenelín siníc sa datujú vekom 3,5 miliardy rokov, čo je skutočne obdobie Prekambria. Tieto fosílie pochádzajú z Apex Basalt zo západnej Austrálie (Schopf, 1993). Niektoré práce datujú najstaršie kolónie cyanobaktérií vekom 3,8 miliardy rokov (Edwards, 2010). Ďalšie fosílie, ktoré sa považujú za najstarší dôkaz oxigénnej fotosyntézy sú 2,7 miliardy rokov staré a pochádzajú takisto zo západnej Austrálie, Tumbiana Formation (Buick, 1992). Vďaka tejto vlastnosti siníc, vytvorili tieto organizmy vhodné podmienky pre evolúciu ďalších foriem života.

Sinice sú hlavnými producentmi biomasy vo vodných, ale aj terestrických ekosystémoch. V niektorých vodných ekosystémoch reprezentujú až 50% biomasy (Häder *et al.*, 2007). V dnešnej dobe majú aj iný význam a to napríklad ich schopnosť fixácie atmosférického dusíku (viac než 35 miliónov ton ročne). To ich robí významnými pre ekológiu krajín, v ktorých sa pestuje ryža. Prispievajú k zvýšeniu fertility rastlín (Vaishampayan *et al.*, 2001).

Sinice patria do prokaryotných organizmov a preto je stavba ich bunky pomerne jednoduchá oproti eukaryotom. V cytoplazme chýba jadro, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum, mitochondrie, atď. Ich bunecná stena je tzv. gram-negatívneho typu. Základnou stavebnou jednotkou ich bunecnej steny je peptidoglykan. Je tvorený dvoma cukrami, N-acetylglukozamin a N-acetylmuramová kyselina. Sú spojené beta (1, 4) glykozidickou väzbou. Na tieto cukry sa viaže skupina štyroch aminokyselín. V bunecnej stene gram-negatívnych organizmov sa vyskytuje približne 10 % peptidoglykanu. Preto sa tu nachádza navyše vonkajšia membrána, ktorá je tvorená na vnútornej strane fosfolipidmi a lipoproteínmi a na strane vonkajšej zasa lipopolysacharidmi. Je priepustná pre menšie molekuly a vodu.

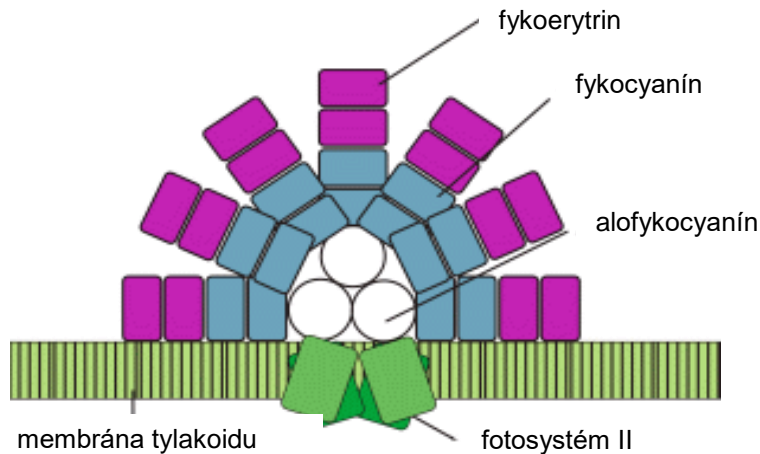


Obr. 1 Peptidoglykan

Medzi najdôležitejšie organely bunky siníc patria tylakoidy. Tylakoidné membrány sú miesta respiračného elektrónového transportu, ale aj miesta fotosyntetických reakcií (Mullineaux, 2013). Premeny energie počas fotosyntézy sú kontrolované veľmi komplexnými systémami, ktoré sa spúšťajú vplyvom externých faktorov. Tie sú napríklad intenzita a kvalita svetla alebo vystavenie svetelnému žiareniu. Na druhej strane sú faktory interné, ako napríklad dostupnosť uhlíka. Jednotlivé kroky fotosyntézy sa dajú primárne rozdeliť do dvoch fáz (Peter *et al.*, 2014).

Prvá, tzv. svetelná fáza, zahŕňa procesy premeny svetelnej energie na energiu chemickú, v podobe NADPH a ATP. Tieto molekuly sú v ďalšej fáze využité k tvorbe cukrov. Uvoľňuje sa tu kyslík. Pigmenty v tylakoidoch dokážu absorbovať svetelnú energiu a premieňajú ju na energiu chemickú. V membráne tylakoidu sa nachádzajú chlorofyl *a*,  $\alpha$  a  $\beta$ -karotén a xantofyly. Na povrchu tylakoidu sa nachádzajú útvary zvané fykobilizómy, ktoré obsahujú farbivá fykobilíny. Dva z nich sú modré: *c*-fykocyanín a alofykocyanín, a jeden je červený: fykoerytrin. Umožňujú absorpciu svetla aj za nízkych hodnôt svetelného žiarenia (napr. v pôde, pod vodou, atď.), (<http://ibiochemie.upol.cz/WebGraphics/biochemie/download/Modul-07A.ppt>).

Druhá tzv. tmavá fáza, využíva energiu NADPH a ATP a fixáciou CO<sub>2</sub> ju ukladá do sacharidov. Nepotrebuje svetelnú energiu pre svoje procesy. (<http://ibiochemie.upol.cz/WebGraphics/biochemie/download/Modul-07A.ppt>).



Obr. 2 Fykobilizóm

### 3.2 Riasy

Jednou z významných skupín organizmov, ktoré dokážu odolávať nepriaznivým vplyvom prostredia sú riasy. Prevažne sa jedná o prostredie s vysokým UV žiarením, kde podobne ako sinice, využívajú rôzne typy pigmentov. Je možné nájsť aj druhy, ktoré sú psychrofilné a dokážu odolávať nízkym teplotám pomocou rôznych adaptácií, ktoré boli popísané bližšie v kapitole o extrémoch nízkych teplôt. Vyskytujú a aj iné extrémofilne orientované riasy.

Vo všeobecnosti sa jedná o jednoduché autotrofné organizmy, ktoré môžu byť jedno aj viac bunkové a vytvárajúce stielky. Ich predchodcami boli heterotrofné riasy a po procese primárnej symbiôzy so sinicou, alebo sekundárnej s inou riasou, vznikli súčasné riasy. Tie sú schopné fotosyntézy vďaka symbiotickému vývoju chloroplastov. Pre svoj život potrebujú nevyhnutne vodu a tak ich nájdeme hlavne vo vodnom prostredí. Vyskytujú sa aj v symbióze s lišajníkmi, kde mykobiont poskytuje riasu dostatok vody na prežitie a správnu funkciu fotosyntetického aparátu.

Systém rias je často značne nejednotný. Dôležité je pre nás rozdelenie z hľadiska obsahu pigmentov. Červené vývojové štádiá obsahujú hlavne chlorofyl *a + d*, zelené chlorofyl *a + b* a hnedé chlorofyl *a + c*. Červené riasy môžu obsahovať ešte fykocyanín a fykoerytrín. Fukoxantín môže byť obsiahnutý v hnedých rozsievkach a chaluhách. Červenoočká obsahujú xantofyly a  $\beta$  - karotén. Zelené riasy môžu obsahovať xantofyly a takisto  $\beta$  - karotén (www.scsp.sk/professori/sromekova/riasy.ppt).

Význam týchto organizmov je veľmi výrazný. Sú súčasťou fytoplanktónu a čistiaceho procesu vôd. Tvoria významné bioindikátory, vytvárajú diatomit a taktiež sa využívajú ako krmivá alebo potravina.

V práci Barletta *et al.*, 2015 sa venovali identifikácii niektorých pigmentov rias pomocou Ramanovej spektrometrie. Zamerali sa hlavne na rozsievky. Úspešne analyzovali pigmenty vo fytoplanktóne. Špeciálne  $\beta$  - karotén, fukoxantín a luteín. Touto prácou potvrdili, že Ramanova spektrometria je nedeštruktívna metóda vhodná pri identifikácii pigmentov. V prípade fukoxantínu, ktorý výrazne reaguje na prísun UV žiarenia, boli schopný sledovať aj zmeny v pomeroch koncentrácií tohto pigmentu.

### 3.3 Lišajníky

V súvislosti s exobiológiou a Ramanovou spektrometriou bola skúmaná aj skupina organizmov lišajníky.

Lišajníky sú symbiotické organizmy, zložené z dvoch navzájom prospešných partnerov. Symbiózu tvorí mykobiont (huba) a fotobiont (sinica alebo riasa). Niekedy je v symbióze väčší počet fotobiontov než jeden (Lumbsch a Leavitt, 2011). Väčšina voľne žijúcich siníc alebo rias sa vyskytuje v prírode, najmä vo vodnom alebo veľmi vlhkom prostredí. Pokiaľ sú ale v symbióze s hubou a tvoria lišajník, fungujú aj v prostredí, ktoré môže byť pravidelne suché. Úlohou mykobionta je poskytnúť lišajníku anorganické látky a to najmä vodu. Taktiež poskytuje ochranu pred predátormi. Ďalšou vlastnosťou huby je pevné prichytenie k substrátu celého lišajníka a vytvorenie typu stielky. Mykobiont je schopný prichytenia a rastu na skalách, na púštnej pôde alebo na listoch v tropických dažďových lesoch (Lumbsch a Leavitt, 2011). Fotobiont má hlavne fotosyntetickú úlohu. Poskytuje organické látky (zdroj uhlíku). Výhodou tejto symbiózy je fakt, že spoločne si dokážu huba a sinica (riasa) vyrobiť tzv. sekundárne metabolity, ktoré sú nevyhnutné pre prežitie organizmu v extrémnych podmienkach. Zriedka sa tieto typy metabolitov vyskytnú v iných typoch organizmov. Vďaka tomu sú lišajníky schopné prosperovať v podmienkach extrémne nízkych teplôt (arktická tundra), odolávať vysokej úrovni slnečného žiarenia (polárne oblasti, púšte) alebo zvládať vplyvy suchých oblastí. Všetky druhy lišajníkov zahŕňajú viac než 20% svetovej biodiverzity húb. V prípade približne 20% lišajníkov je fotobiont zelená riasa *Trebouxia* (Vasudeo a Lew, 2012).

Druh stielky, ktorú lišajník vytvorí, závisí na interakcii mykobionta a fotobionta. Poznáme tieto typy stielok: kôrovitá (pevne zrastená s podkladom), lupeňovitá (k podkladu prichytená len čiastočne), kríčkovitá (z jedného miesta vyrastajú, niekedy až meter dlhé stielky, ktoré sa kríčkovito vetvia), vláknitá (tvorená dlhými vláknami) a slizovitá (neurčitý tvar, rôsolovitá konzistencia) (Rosypal, 2003). Pokiaľ sa mykobiont vyskytuje v prírode v nelichenizovanom stave, zostáva relatívne amorfný. V prípade kontaktu s jeho fotobiontom dochádza k tvorbe stielky (Ahmadjian, 1993). Rast lišajníka je obvyčajne veľmi pomalý (milimetre za rok). Niektoré druhy sa môžu dožívať viac než tisíc rokov a preto sa dajú použiť napríklad na datovanie povrchu skál (Beschel, 1961).

V dnešnej dobe je podľa odhadov väčšina húb neidentifikovaná. Tým pádom je druhová diverzita lišajníkov stále dopĺňovaná (Lumbsch a Leavitt, 2011). Nedávne štúdie zistili, že počet druhov húb môže byť vyšší než 1,5 milióna (Blackwell, 2011). Pritom len 100 000 druhov je v súčasnosti popísaných. Viac než 16 000 sa ich vyskytuje vo forme lišajníkov (Kirk *et al.*, 2008). Vo väčšine prípadov je mykobiont zastúpený kmeňmi Ascomycota a Basidiomycota. Z toho najväčšia časť patrí kmeňu Ascomycota a iba približne 2 % druhov sú zastúpené kmeňom Basidiomycota. Ascomycota sú huby pomerne dosť diverzifikované a preto sú vo všeobecnosti dôležité pre pochopenie evolúcie húb a teda aj lišajníkov (Lumbsch a Leavitt, 2011). Pri pomerne komplikovanej klasifikácii lišajníkov sú dôležité okrem konzervatívnych ultraštruktúrnych znakov aj morfológický charakter stielky, samotný chemizmus lišajníkov a produkcia sekundárnych metabolitov (tzv. extrolity - extracelulárne sekundárne metabolity).

Lišajníky produkujú široké spektrum primárnych a sekundárnych metabolitov. Za primárne sa považujú intracelulárne, pričom sekundárne majú extracelulárny charakter (Lauterwein *et al.*, 1995). Sekundárne metabolity sú z väčšej časti nerozpustné vo vode a môžeme ich extrahovať z organických rozpúšťadiel. Medzi primárne metabolity radíme aminokyseliny, polyoly, karotenoidy, polysacharidy a vitamíny. Sekundárne metabolity sú produkované hlavne mykobiontom a vylučované na povrch hýf v amorfnej forme, alebo ako kryštály. Majú rôzne funkcie ako napríklad antibiotickú, antivirálnu, antimykobakteriálnu a antiherbivornú. Znižujú aktivitu enzýmov alebo inhibujú rast rastlín. Niektoré primárne polysacharidy, ktoré sa vyskytujú v bunkových stenách (lichenan, izolichenan, niektoré karotenoidy) majú veľký význam z taxonomického hľadiska a pomáhajú pochopiť evolúciu lišajníkov

(Shawuti a Abbas, 2007). V dnešnej dobe je známych asi 1000 sekundárnych metabolitov (Orange *et al.*, 2001). Látky produkované lišajníkmi sa dajú rozdeliť aj z hľadiska chemickej štruktúry a to na: alifatické (kyseliny, polyhydričné alkoholy), aromatické (polyfenolické látky, chinóny, triterpény, zložky obsahujúce dusík a iné), karbohydráty (polysacharidy) (Dayan a Romagni, 2001; Orange *et al.*, 2001). V Suchých údoliach McMurdo v oblasti Rossovoho mora sa vyskytujú epilittické lišajníky, ktoré sú vystavené extrémnemu UVB žiareniu, vysychaniu a nízkym teplotám. Ako ochranu si preto produkujú karotenoidy a rozpustné látky. Kompatibilné rozpustné látky produkuje hlavne huba. Sú to napr. polyhydričné alkoholy, polyoly alebo trehalózu (disacharid) pri extrémnom vysychaní (Edwards *et al.*, 2003).

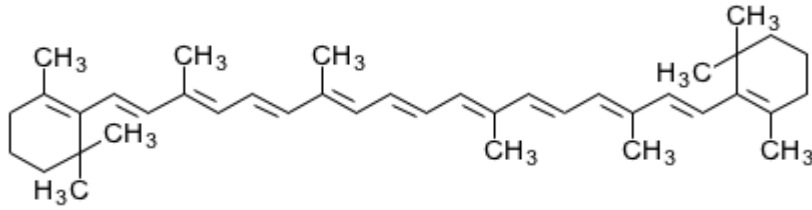
V práci Jorge-Villar *et al.*, 2011 sa zamerali na možnosti Ramanovej spektrometrie pri výskume lišajníkov zo španielskej púšte Tabernas. Lišajníky produkujú rozličné biomolekuly na ochranu proti vysokým teplotám a vysychaniu. Pomocou troch druhov spektrometrov (prenosný - 785 nm, FT-Raman - 1064 nm a micro-Raman) a v dvoch experimentálnych podmienkach sa snažili tieto biomolekuly detegovať. Lišajníky boli merané v laboratóriu ako vlhké a potom po intenzívnom sušení ako suché. V teréne boli merané ako vlhké vplyvom intenzívneho dažďa. V oboch prípadoch boli použité prenosné spektrometre a následne laboratórny mikrospektrometer. Skúmané boli lišajníky *Squamarina lentigera*, *Diploschistes diacapsis* a *Lepraria crassissima*. Analýzy na suchých vzorkách pomocou prenosného spektrometru ukázali na pozadí fluorescenciu. Niektoré lišajníky sú totiž fotosynteticky aktívne len v prípade vysokej vodnej saturácie a dostatočnej úrovne PAR. V prípade intenzívneho dažďa bolo možné pozorovať zmeny v intenzite sfarbenia (zelená a hnedá boli intenzívnejšie). Toto môže byť významné zistenie pre exobiologický výskum, pretože v extrémnych podmienkach môžu niektoré druhy extrémofilov vykazovať nečinnosť, až kým sa nedosiahnu potrebné úrovne faktorov, ktoré vyžadujú pre svoj aktívny metabolizmus. Táto práca ďalej dokázala, že pri meraní komplexných biomolekúl je taktiež dôležitá veľkosť daného bodu na vzorke. V jednom bode môže byť jeden pigment prítomný viac a iný menej. V inom bode je to opačne (Jorge-Villar *et al.*, 2011). Podobnou problematikou sa zaoberá aj práca Miralles *et al.*, 2012, v ktorej sa zamerali takisto na vzorky z púšte Tabernas, ale pridaná je aj analýza cyanobaktérií.

#### 4.0 NIEKTORÉ VÝZNAMNÉ PIGMENTY VYBRANÝCH DRUHOV ORGANIZMOV

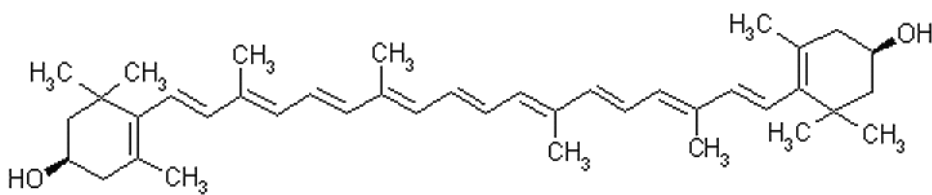
Lišajníky sú výsledkom symbiózy medzi hubou a riasou alebo hubou a sinicou. Dôležité pigmenty pre náš výskum sú práve tie, ktoré obsahujú fotobionti. Napriek tomu je možné zaznamenať iné sekundárne metabolity, ktoré produkuje huba. Tie sú bohužiaľ veľmi zložité na identifikáciu. Preto sa táto kapitola venuje hlavne základným pigmentom siníc a rias. Riasy majú podobné obsahy týchto látok ako sinice, nakoľko sa sinice odvodzujú zo skupiny rias. Podrobná analýza týchto látok pre každú skupinu zvlášť by bola zbytočná.

Medzi základné farbivá siníc, ktoré sú schopné pohlcovať svetelné žiarenie o istých vlnových dĺžkach, patria chlorofyl *a*,  $\alpha$  a  $\beta$ -karotén, xantofyly a fikobilíny. Karotény a xantofyly patria do skupiny karotenoidov. Sú to tetraterpény (40 atómov uhlíku). Majú významný antioxidačný účinok. Tetraterpény sú skupinou terpenoidov. Sú to látky produkované výhradne rastlinami. Medzi terpenoidy patria uhlovodíky a ich kyslíkaté deriváty alkoholy, ketóny, aldehydy a karboxylové kyseliny (Kříbek, 1981).

Karotenoidy sú červené a žlté pigmenty, ktoré tvoria súčasť tkanív baktérií (siníc), húb a väčšiny zelených rastlín. Vyskytujú sa v peľových zrnách a spórach ako látka sporopolenín. Karotenoidy v tkanivách sa v priebehu diagenézy rýchlo rozpadajú. Sporopolenin je veľmi odolný a stály. Karotenoidy sú látky alifaticko-cyklickej povahy so systémom konjugovaných väzieb. Delíme ich na karotény (uhlovodíky) a xantofyly (kyslíkaté deriváty). Najznámejší karotén je  $\beta$ -karotén a najznámejší xantofyl je luteín a flavoxantín (Kříbek, 1981).

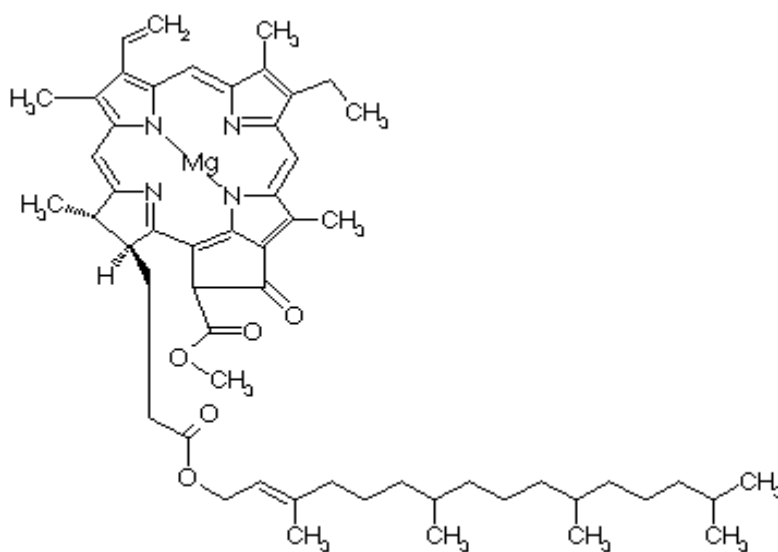


**Obr. 3** β-karotén  $C_{40}H_{56}$



**Obr. 4** Luteín  $C_{40}H_{56}O_2$

Chlorofyl je respiračný pigment živých organizmov. Patrí do skupiny porfyrínov. Porfiríny sú dusíkaté heterocyklické látky, ktorých štruktúra je tvorená štyrmi pyrolovými jadrami. Tie sú navzájom spojené metinovými skupinami. Chlorofyl *a* má horčík vo svojich molekulách u živých organizmov. Na jadro chlorofylu je estericky viazaný diterpenický alkohol fytol (Kříbek, 1981).



**Obr. 5** Chlorofyl *a*



V období pred 3,5 - 2,7 miliardami rokov sa sinice museli vyrovnat' s absenciou ozónovej vrstvy, ktorá by ich ochránila pred ničivým ultrafialovým žiarením (UVR). Vyvinuli niekoľko účinných stratégií na obranu proti UVR. V dnešnej dobe industrializácie dochádza vplyvom antropogénnej činnosti ku stenčovaniu ozónovej vrstvy v stratosfére. Spôsobuje to napríklad uvoľňovanie chlorofluórokarbónov, chlorokarbónov alebo organobromidov (Crutzen, 1992). Proces ochudobňovania ozónovej vrstvy je výrazný hlavne v Antarktíde, kde sa hladina ozónu znížila o viac než 70 % v polárnom vortexe (Smith *et al.*, 1992). Fixácia dusíku a fotosyntéza sú procesy, ktoré sú závislé na solárnej energii. Preto sú sinice v ich prírodných prostrediach vystavené škodlivým dávkam UV-A (315 - 400 nm) a UV-B (280 - 315 nm) radiácie (Singh *et al.*, 2010). UV-B žiarenie produkuje reaktívne formy kyslíka (ROS - reactive oxygen species), ktoré môže poškodiť lipidy, DNA alebo proteíny. Sinice sú súčasne vystavené fotosynteticky aktívnemu žiareniu (PAR - photosynthetic active radiation, 400 - 700 nm) aj UVR. Mechanizmy obrany siníc proti radiácii zahŕňajú napríklad aktívne vyhýbanie a zbavenie sa ROS (Reactive oxygen species) enzymatickými a neenzymatickými antioxidantmi. Syntetizujú zložky, ktoré dokážu absorbovať UV žiarenie ako napríklad MAAs (mycosporine - like amino acids = amino kyseliny podobné mykosporínu) a pigment scytonemín. Takisto majú schopnosť opraviť poškodenú molekulu DNA a resyntetizovať proteíny (Singh *et al.*, 2010). V siniciach môže dôjsť k trom stupňom diferenciácie buniek a to na bunky vegetatívne, schopné fotosyntézy. Heterocyty, schopné fixácie dusíku a nakoniec akinety, ktoré sú schopné prežiť v nepriaznivých podmienkach a zároveň uskladňujú fosfát. Vystavenie buniek UV-B radiácii spôsobilo oneskorenie v diferenciácii vegetatívnych buniek na akinety alebo heterocyty. Tento jav bol pozorovaný na sinici *Anabaena aequalis* (Blakefield a Harris, 1994).

Zo všetkých pigmentov, ktoré sinice produkujú, sú najdôležitejšie fykobiliproteíny (fykoerytrín:  $\lambda_{\max}$  540 - 570 nm; fykocianín:  $\lambda_{\max}$  610 - 620 nm; alofykocianín:  $\lambda_{\max}$  650 - 655 nm). Sú usporiadané v útvaroch, ktoré nazývame fykobilizómy (Sinha *et al.*, 2005). V sinici *Nostoc spongiaeforme* bolo pozorované, že vysoké vystavenie PAR spôsobilo zníženie hladiny fykocianínu o 93 %, alofykocianínu o 75 % a fykoerytrínu o 69 % (Bhandari a Sharma, 2006). Vystavenie siníc UV-B radiácii spôsobuje blednutie fykocianínu a fykoerytrínu ako následok rozpadu fykobilizómov (Sinha *et al.*, 2005). V niektorých siniciach z ryžových polí bola pozorovaná kompletná strata aktivity enzýmu nitrogenáza (schopnosť fixácie dusíku) v priebehu 25 - 40 minútového vystavenia UV-B radiácii (Kumar *et al.*, 2003).

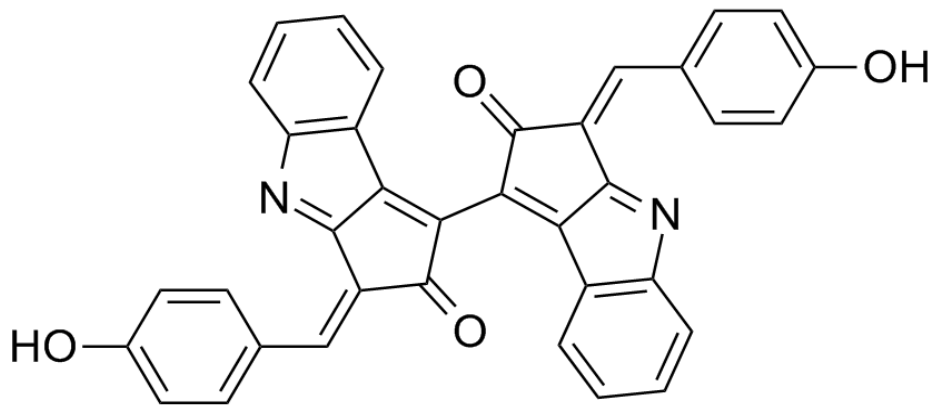
Niektoré sinice sú schopné aktívneho pohybu a tak sa môžu v prípade vysokej solárnej radiácie, pohybovať nižšie (Reynolds *et al.*, 1987). Mnohé dokážu syntetizovať extracelulárne polysacharidy, ktoré sú schopné absorbovať škodlivú radiáciu (Ehling-Schultz *et al.*, 1997). Toxické ROS ako superoxid ( $O_2^-$ ), hydroxilové radikály (OH) alebo peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ) môžu spôsobiť tzv. oxidačný stres (nerovnováha medzi antioxidačnou kapacitou bunky a počtom voľných radikálov). Preto si sinice tvoria enzymatické (kataláza, superoxid dismutáza alebo glutation peroxidáza) a neenzymatické antioxidanty (vitamín C, vitamín E alebo karotenoidy), (He a Häder, 2002).

Najznámejšími zlúčeninami schopnými absorbovať UV radiáciu sú MAAs a scytonemín. MAAs sú malé, bezfarebné, vo vode rozpustné zlúčeniny zložené z chromofórov cyklohexenónu alebo cyklohexenimínu konjugovaného s dusíkatým substituentom amino kyseliny (Singh *et al.*, 2008b). MAAs majú absorpčné maximum medzi 310 - 362 nm. Absorbujú vysoko energetické UVR a rozptyľujú ho do svojho okolia vo forme neškodného tepelného žiarenia (Conde *et al.*, 2004). Sú schopné fungovať ako antioxidanty a ochrániť tak bunku pred ROS z UVR (Dunlap a Yamamoto, 1995). Syntéza MAAs v siniciach závisí na množstve dostupného dusíka. Väčšia dostupnosť dusíka spôsobí vyššiu syntézu MAAs (Singh *et al.*, 2008a).

Scytonemín je žlto-hnedý pigment siníc rozpustný v lipidoch. Lokalizovaný je v extracelulárnom polysacharidovom obale (Sinha a Häder, 2008). Jeho absorpčné maximum je 370 nm *in vivo*. Čistý scytonemín ukazuje maximum svetelnej absorpcie v 386 nm ale výrazne absorbuje aj v 252, 278 a 300

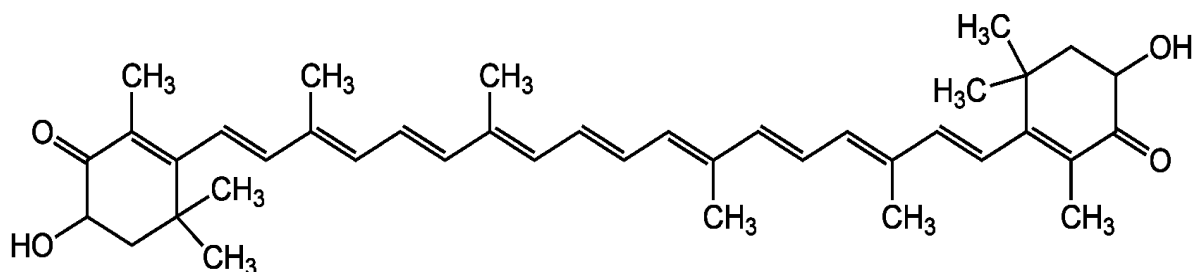
nm. Jeho syntéza je primárne podmienená UV-A žiarením. Vyskytuje sa aj v prípade vlnových dĺžok UV-B a UV-C radiácie. Redukuje vstup UV-A žiarenia do bunky až o 90 % a je vysoko stabilný (Garcia-Pichel a Castenholz, 1991). Pomocou vibračnej metódy Ramanovej spektroskopie bol scytonemín prvý krát charakterizovaný v roku 2000 (Edwards *et al.*, 2000).

Niektoré sinice sú schopné podstúpiť apoptózu alebo programovanú bunkovú smrť (PCD - programmed cell death). Tento dej nastáva v prípade, že je bunka natoľko poškodená, že nieje možná jej reparácia. PCD bola pozorovaná na dusík fixujúcej sinici *Trichodesmium* sp. a vyvolala ju zvýšená radiácia, nedostatok železa a oxidatívny stres (Berman-Frank *et al.*, 2004).



**Obr. 6** Scytonemín

Riasy patria medzi významných obyvateľov vodných ekosystémov. Často sú prítomné v extrémnych prostrediach kde je nedostatok živín, vysoké UV žiarenie alebo nízka teplota. Preto sa musia s týmito faktormi vysporiadať pomocou rôznych adaptácií. Jednou z významných adaptácií typických pre riasy je produkcia pigmentu astaxantínu. Tento pigment je produkovaný v určitých vývojových štádiách organizmu a slúži ako fotoprotektívny pigment, ktorý chráni bunky pred UV žiarením. A takisto pred jeho oxidatívnymi účinkami (Maia *et al.*, 2014). Patrí medzi karotenoidné pigmenty a nájdeme ho hlavne v týchto druhoch organizmov.



**Obr. 7** Astaxantín

## 5.0 ASTROBIOLOGIA

Astrobiológia, alebo aj exobiológia, je veda zaoberajúca sa možnosťami života vo vesmíre, ktorá využíva multidisciplinárny prístup. Zahŕňa v sebe poznatky biológie, geológie, chémie, fyziky a iných vedných oborov. Pozornosť sa venuje prostrediam v alebo mimo slnečnú sústavu, ktoré by mohli poskytnúť vhodné podmienky pre život. Významnou súčasťou výskumu exobiológie je aj otázka technológií, ktoré môžu byť schopné detegovať život ako ho poznáme na Zemi. Nieje totiž reálne možné vyrobiť technológiu pre výskum života, ktorý má iný základ než ten na Zemi. Jednoducho preto, pretože taký život zatiaľ nepoznáme. Aj tu sa ale stretávame s istými limitmi, a to hlavne problém financovania. Preto je prvoradé využiť existujúce technológie, charakterizovať ich limity a sústrediť pozornosť na možnosti, ktoré poskytuje vo výskume exobiológie naša Zem. Kvôli tomu je pozornosť venovaná otázke limitov pre život, ktorý môžeme pozorovať na našej planéte.

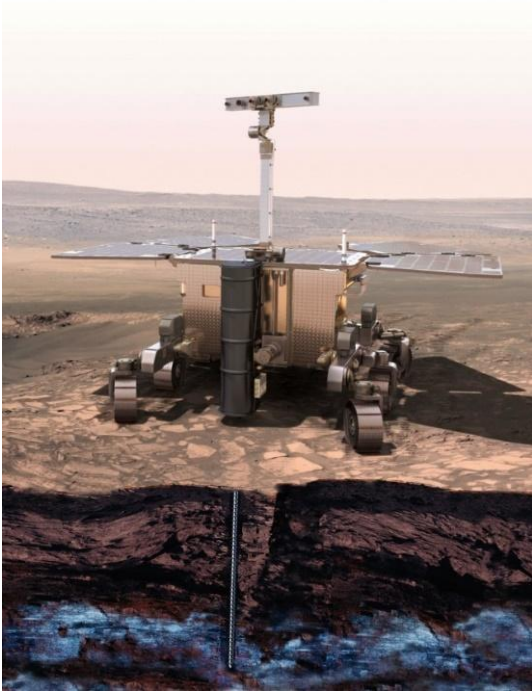
Stále väčšia pozornosť je venovaná aj planéte Mars. Na "Červenú planétu" bolo vyslaných niekoľko misií. Prvé sondy boli vypustené už v roku 1962 (USA – Mariner 4). Nasledovali sovietske sondy Mars 2 a Mars 3 (1971). Medzi najdôležitejšie misie patria Mars Odyssey (2001), ktorá stále obieha okolo planéty a vďaka gamma spektrometru objavila známky vodíka vo vrchnej časti miestneho regolitu (upravené podľa URL 7). V roku 2003 bola Európskou agentúrou vyslaná sonda Mars Express, ktorá pomocou planetárneho Fourierovho spektrometra, ktorý využíva infračervené žiarenie, dokázala prítomnosť metánu v atmosfére Marsu (Bertaux *et al.*, 2005). Medzi najúspešnejšie misie patrí americký projekt Mars Exploration Rover, ktorý funguje dodnes. Dve vozítka Spirit a Opportunity v roku 2004 pomocou mechanického ramena odobrali vzorky z povrchu Marsu a úspešne ich analyzovali. Objavili minerály sadrovec, hematit a goethit v takých formách, v akých sa vyskytujú na našej planéte v podmienkach pôsobenia vody. Toto bol dôkaz o tom, že na Marse skutočne existovala voda v tekutom stave (upravené podľa URL 7).

Na Mars bolo vyslaných mnoho iných misií. Po objave dôkazov prítomnosti vody v tekutom stave sa zvýšil záujem organizácií o objave stôp po živote na tejto planéte. Ako vieme, na Zemi je voda základným elementom pre život ako ho poznáme. Preto sa do budúcnosti plánujú misie, ako napríklad ExoMars (2018), ktoré sa budú zaoberať práve výskumom organických molekúl pod povrchom Marsu. Budú sa snažiť o objav stôp po živote, či už minulom alebo súčasnom. Práve misia ExoMars by mala na svojej palube niesť miniaturizovaný Ramanov spektrometer ako vhodný nástroj pri identifikácii látok, ktoré by mohli indikovať prostredie vhodné pre extrémny život. Ďalšími cieľmi astrobiologického výskumu sú aj vesmírne telesá Európa a Titán.

Misia ExoMars má za úlohu doručiť na planétu európske vozidlo, ktoré bude cestovať po povrchu a ruskú pristávaciu platformu pre toto vozidlo, ktorá takisto poniesie isté typy prístrojov. Primárny cieľ misie je pristáť s roverom na mieste s vysokým potenciálom dobre zachovaného organického materiálu. Najlepšie z ranných období histórie Marsu. Nakoľko je atmosféra planéty príliš riedka a neposkytuje dostatočnú ochranu pred silným UV žiarením, bude rover získavať vzorky hlavne z podpovrchovej oblasti. Maximálne do hĺbky dvoch metrov. V prvých dvoch metroch sa nepredpokladá prítomnosť biomarkerov a biomolekúl vzhľadom k vysokému UV žiareniu. Vrták bude opatrený infračerveným spektrometrom pre okamžité určenie mineralogického zloženia priamo v navítanej diere. Ďalej bude vzorka transportovaná do roveru pre bližšiu chemickú a mineralogickú analýzu so špeciálnym zameraním na organické látky (upravené podľa URL 11).

Vozidlo poniesie so sebou tzv. next generation instruments, teda prístroje ďalšej generácie. Pre digitálne mapovanie terénu bude použitá panoramatická kamera (PanCam). Pre vhodný výber vzoriek bude z mineralogického hľadiska použitý infračervený spektrometer, špeciálne navrhnutý pre ExoMars (ISEM). Pre detailné obrázky vzoriek alebo vrtov je vybraný systém Close – UP Imager (CLUPI). Podpovrchovú oblasť priamo pod roverom bude skúmať radar WISDOM (Water Ice and Subsurface Deposit Observation On Mars), ktorý poskytne informácie o stratigrafii v spolupráci so

zariadením ADRON. Toto zariadenie je schopné identifikovať podpovrchovú vodu a hydratované minerály. Mineralogické zloženie bude analyzovať takisto zariadenie Ma\_MISS (Mars Multispectral Imager for Subsurface Studies), umiestnené priamo vo vrtáku a zariadenie MicrOmega, teda spektrometer s viditeľným a infračerveným zobrazovaním. Bližšie identifikovanie významných biomarkerov pomôže určiť MOMA (Mars Organic Molecule Analyser). V neposlednom rade, a pre nás veľmi významnom, bude pre analýzu mineralogického zloženia a identifikáciu organických molekúl použitý RLS Ramanov spektrometer (upravené podľa URL 12).



**Obr. 8** Rover misie ExoMars (2018)

V kontexte projektu ExoMars súvisia okrem prác nášho výskumného tímu aj iné zaujímavé publikácie. V práci Lopez-Reyes *et al.*, 2013, sa španielsko-francúzsky výskumný tím pokúsil o simuláciu podmienok merania na Marse pomocou Ramanovho spektrometra (RLS), ktorý sa pri misii použije. Jeho úlohou bude identifikovať druhy minerálnych zŕn v horninách, detegovať organické zložky a stopy biologickej aktivity. Takisto bude charakterizovať minerálne fázy, ktorých vznik sa vzťahuje na prítomnosť vody a magmatické minerály s ich alteračnými produktmi. Vlnová dĺžka spektrometra bude 532 nm s výkonom 0,6 – 1,2 kW/cm<sup>2</sup> a stopou laseru 50 μm, ktorý analyzuje 20 rôznych miest na jednej vzorke vo forme prášku (veľkosť zŕn 200 – 250 μm). Vedci skonštruovali kópiu spektrometra a nasimulovali podmienky silného UV žiarenia na povrchu Marsu. Použili dva prírodné vzorky. Karbonátovú brekciu z nórskeho Špicbergu a silicifikovaný sopečný piesok (rohovec) z Barbertonu v Južnej Afrike, ktorý obsahoval organické stopy (3,3 miliárd starý). Tretia vzorka bola synteticky pripravená ako mix dusičnanu draselného s oxalátom sodným a kalcitu so sadrovcom. Stopa laseru 50 μm a veľkosť rozomletých zŕn ≤ 250 μm dokázali, že táto technológia je schopná detegovať minerálne druhy a takisto aj minoritné fázy. Problém môže nastať vtedy, ak máme zmes dvoch materiálov, z ktorých jeden je zastúpený v menšine a má slabý Ramanov rozptyl. Druhý má signál silný a tak prekryje minoritnú zložku a tá nieje detegovaná. Počas automatickej RLS analýzy, kde sa vyhodnocujú spektrá na základe pomeru signál/šum, nemusia byť niektoré významné látky detegované.

Štúdiom možností Ramanovej spektrometrie v súvislosti s astrobiologickým výskumom Marsu sa zaoberajú aj práce na našej univerzite. V neposlednom rade sa výskum zameriava na prenosné a príručné prístroje, pretože sa ukazujú ako vhodný nástroj vo vesmírnom výskume. Ramanova spektrometria sa považuje za analytickú, nedeštruktívnu metódu schopnú detegovať biomolekuly, ktoré by mohli súvisieť so životom na Marse. Je nutné pripomenúť, že podmienky pre život na Marse sú jednoznačne extrémne a preto sa výskum musí sústrediť na extrémofilné organizmy a extrémne prostredia pre život na Zemi. V práci Vítka *et al.*, 2012 sa zamerali na vzorky halitu z hyperarídnej oblasti púšte Atakama. Jedná sa o najsuchšie miesto na Zemi so zrážkami menej ako 2 mm za rok (McKay *et al.*, 2003). Merania uskutočnili pomocou miniaturizovaného Ramanovho spektrometra s laserom o vlnovej dĺžke 532 a 785 nm. Merania boli uskutočnené priamo v teréne na skalách, ale aj na homogenizovaných práškových vzorkách. Jednalo sa kolónie endolitických siníc. Vlnová dĺžka 532 nm sa ukázala ako vhodnejšia pri identifikácii karotenoidov a vlnová dĺžka 785 nm bola viac senzitívna pri detekcii scytonemínu (Vítek *et al.*, 2012). Ramanova spektrometria sa teda ukázala ako vhodný nástroj pri exobiologickom výskume a identifikácii biomarkerov v extrémnych prostrediach. Podobnú tému riešia aj práce ako napríklad Vítek *et al.*, 2009 alebo Jehlička *et al.*, 2010. Použitie tejto technológie vo vesmírnom výskume čelí aj rôznym problémom, ktoré je treba prekonať. Sú to napríklad stabilita laseru alebo rozlíšenie kľúčových spektier, ktoré by mohli reprezentovať súčasný alebo minulý život v skúmaných vzorkách. Dôležitá je redukcia hmotnosti prístrojov. V roku 2003 bola na Mars vyslaná britská sonda Beagle 2, ktorá ukázala, že hmotnosť prístroja 5 kg je príliš veľká. Na misiu ExoMars sa plánuje použiť prístroj o hmotnosti 2,3 kg. Ďalším problémom môže byť výdrž batérie, ktorá je u prenosných (portable) spektrometrov 4 – 6 hodín. Vo všeobecnosti platí, že prístroje musia byť veľmi odolné pretože budú vystavené extrémnym podmienkam (Vandenabeele *et al.*, 2014). V práci Zhang *et al.*, 2012, bolo ukázané, že Ramanove spektrum je možné namerať aj v prostredí vysokého tlaku a to 1024 metrov pod morom. Na povrchu ryby ropušnice bol pomocou laseru o vlnovej dĺžke 532 nm zmeraný pigment  $\beta$ -karotén.

## 6.0 SPEKTROMETRIA

Vo všeobecnosti sú spektrometrické metódy založené na interakcii elektromagnetického žiarenia s určitým typom hmoty (vzorky). Pri tejto interakcii môže hmota (molekuly, atómy) žiarenie buď absorbovať alebo emitovať. V oboch prípadoch dochádza k výmene energie. Niekedy môže hmota žiarenie absorbovať a po čase ho sekundárne emitovať (fluorescencia). Látky môžeme skúmať v pevnom, kvapalnom aj plynnom skupenstve. Dokážeme určiť prítomnosť, zloženie, koncentráciu či štruktúru danej látky. Infračervená spektrometria (IR) sleduje kvantové prechody medzi vibračno-rotáčnými stavmi molekúl. Röntgenová spektrometria sa zaoberá zmenami energetických stavov elektrónov vnútorného elektrónového obalu. Ultrafialová a viditeľná spektrometria (UV/VIS) sa zaoberá energetickými zmenami elektrónov vonkajšieho elektrónového obalu. Ramanova spektrometria sleduje absorpciu energie molekulou a jej sekundárne uvoľnenie v podobe rozptylu.

### 6.1 Ramanova spektrometria

Ramanova spektrometria je považovaná za nedeštruktívnu, analytickú metódu vibračnej molekulovej spektroskopie. Je vhodná pri identifikácii látok, určovaní ich zloženia a štruktúry. Umožňuje analýzu látok v pevnom, kvapalnom a plynnom skupenstve. Základom metódy je neelastický optický rozptyl (Ramanov rozptyl), ktorý bol popísaný v roku 1928 indickým fyzikom Čandrašékhara Venkata Ramanom a Kariamanickam Srinivasa Krishnanom. V roku 1930 bola profesorovi Ramanovi udelená Nobelova cena za fyziku. V súčasnosti sú vzorky ožarované laserom a spätne rozptylené žiarenie je následne detegované. Z príchodom laseru sa táto metóda začala používať v širokom spektre oblastí (geológia, geochemia, kriminalistika, farmaceutika, biológia, oblasti umenia, uhľikáté zlúčeniny, ...).

Výhodou metódy je analýza vzorky bez predošlej úpravy. Metóda je rýchla a detekcia je možná stopových množstvách. Miniaturizovaním spektrometrov našla metóda uplatnenie priamo v teréne. Rýchlu identifikáciu nám umožňujú databázy spektier, ktoré sú stále rozširované o ďalšie látky. Veľká výhoda je detekcia organických látok, ktoré by mohli reprezentovať biomarkery priamo v prírode, v ich prirodzenom zložení a stave. Tento fakt je uplatnený aj v aplikácii Ramanových spektrometrov v oblasti exobiológie. Nevýhodou môže byť detekcia ultrastopových množstiev alebo kovov. Takisto nie je pravidlom, že každá látka má namerateľné Ramanovo spektrum. Problém je často spôsobený prítomnosťou fluorescencie. V dnešnej dobe máme možnosti použitia rôznych druhov laserov, čo nám pomáha eliminovať negatívne faktory ovplyvňujúce naše analýzy (Dendisová *et al.*, upravené podľa URL 8). Napriek tomu, že fluorescencia môže znížiť viditeľnosť významných pásov, použitie inej vlnovej dĺžky pri eliminácii tohto javu, neovplyvní hodnotu vlnočtu ( $\text{cm}^{-1}$ ) Ramanových pásov analyzovanej látky (Villar a Edwards, 2006).

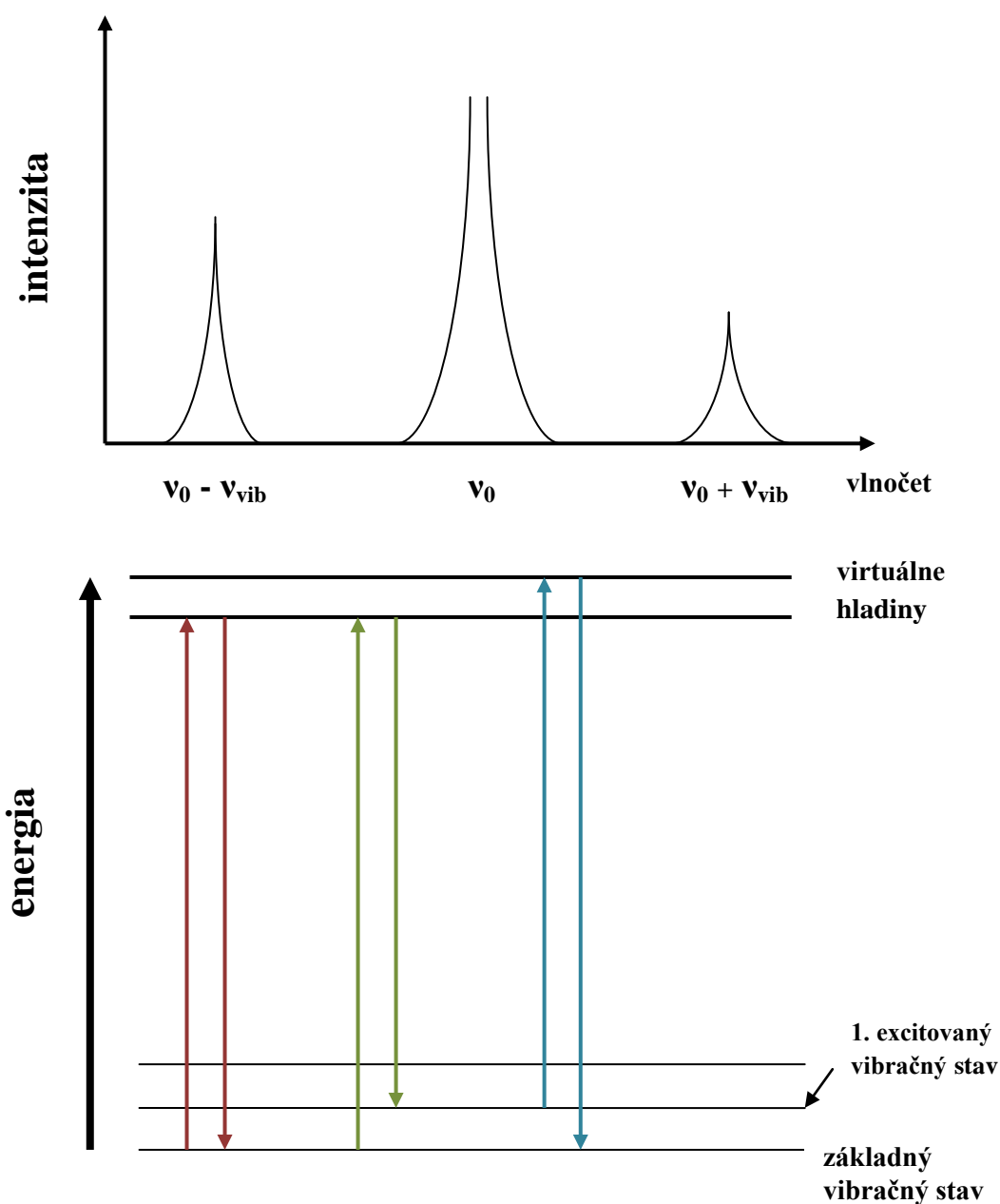
### 6.1.1 Princíp metódy

Základom metódy Ramanovej spektrometrie je interakcia molekuly skúmanej látky s fotónom budiaceho žiarenia (monochromatické žiarenie – laser), ktoré má frekvenciu  $\nu_0 > |E_2 - E_1| / h$  ( $h$  je Planckova konštanta –  $6,62606957(29) \times 10^{-34}$  J.s ;  $E_1, E_2$  sú energie dvoch stacionárnych vibračných stavov molekuly). Dochádza k vyžiareniu fotónu rozptýleného žiarenia, ktoré má frekvenciu  $\nu_R$ . Fotóny budiaceho žiarenia sú absorbované molekulou, ktorá tým mení svoju virtuálnu energetickú hladinu a následne emituje sekundárne fotóny. Pri tomto deji sa musí splniť podmienka zachovania energie, teda  $h\nu = \Delta E$ . Súčasne, aby sa prejavila Ramanovsky aktívna látka, musí dôjsť ku zmene polarizovateľnosti pri danom vibračnom pohybe molekuly. Vtedy platí rovnica  $\partial\alpha / \partial Q \neq 0$  ( $\alpha$  je polarizovateľnosť,  $Q$  sú vnútorné súradnice molekuly). Polarizovateľnosť znamená schopnosť molekuly deformovať elektrónový obal vplyvom vonkajšieho elektrického pola.

Molekuly sú schopné absorbovať elektromagnetické žiarenie a to elektrónovou excitáciou, vibračnými pohybmi atómov chemických väzieb a rotáciou molekuly. Najviac energie je potrebnej pre elektrónovú excitáciu a najmenej pre rotačné pohyby. Základom Ramanovej spektrometrie je neelastický rozptyl fotónov excitačného žiarenia pri reakcii s molekulami analyzovaného vzorku. Časť kinetickej energie týchto zrážajúcich sa telies je premenená na vnútornú energiu, teda kinetická energia aspoň jedného z telies sa nezachová. Časť fotónov je rozptýlená elasticky, jedná sa o tzv. Rayleigho rozptyl. Ten je spôsobený časticami menšími než vlnová dĺžka excitačného žiarenia. Spôsobí frekvenciu rozptýleného žiarenia, ktoré má rovnakú energiu ako excitačné žiarenie (upravené podľa URL 9 a URL 10).

Ramanov posun nám charakterizujú dva typy interakcií. Prvým druhom sú tzv. Stokesove línie (rozptyl). Dochádza k interakcii molekuly s fotónom excitačného žiarenia o energii  $E_0 = h\nu_0$ . Molekula sa nachádza v základnom vibračnom aj elektrónickom stave a pri deexcitácii emituje fotón s nižšou energiou  $E = h(\nu_0 - \nu_v)$ . Prechádza do vyššieho vibračného stavu, ale elektrónický stav zostáva nezmenený (upravené podľa URL 9).

V prípade tzv. Anti-Stokesovej línie (rozptylu) dochádza opäť k interakcii molekuly s fotónom excitačného žiarenia o energii  $E_0 = h\nu_0$ . V tomto prípade sa molekula nachádza v základnom elektrónickom stave, ale v prvom excitovanom vibračnom stave. Pri deexcitácii emituje fotón s vyššou energiou  $E = h(\nu_0 + \nu_v)$ . Molekula sa vracia do základného elektrónického aj vibračného stavu (upravené podľa URL 9).



Obr. 9 Ramanov a Rayleigho rozptyl

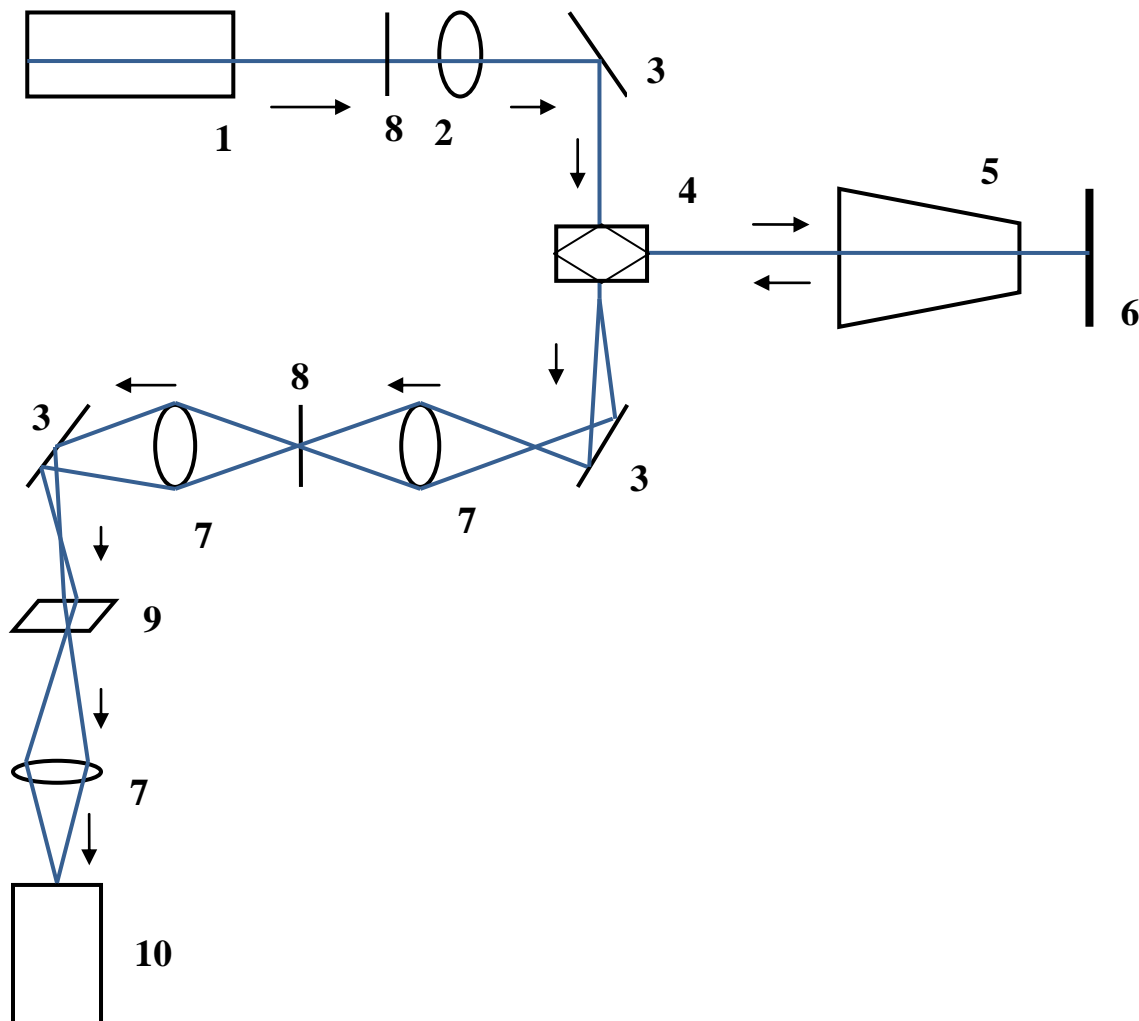
### 6.1.2 Ramanove spektrá

Ramanove spektrá poskytujú informácie o vibračných a rotačných pohyboch molekúl. Závisia na hmotnostiach zúčastnených atómov a na sile väzby, ktorá je medzi nimi. Intenzita pásov v Ramanovom spektre je úmerná druhej mocnine zmeny polarizovateľnosti počas vibračného pohybu  $(\partial\alpha / \partial q)^2$ . Na vertikálnej ose máme zobrazenú intenzitu pásov, podľa ktorej sa realizuje kvantitatívna analýza. Na horizontálnej ose sú údaje tzv. relatívneho vlnočtu, ktorý sa udáva v jednotkách  $\text{cm}^{-1}$  (reciproký centimeter). Vyjadruje rozdiel medzi excitačným a rozptýleným žiarením. Vlnočť je definovaný ako prevrátená hodnota vlnovej dĺžky, ktorý sa rovná počtu vln pripadajúcich na jednotku dĺžky v smere šírenia vln. Ramanove spektrá súvisia so zmenou polarizovateľnosti pri danom vibračnom pohybe molekuly. Veľmi intenzívne sa v spektre budú javiť viacnásobné symetrické väzby ( $-\text{C}=\text{C}-$ ;  $-\text{N}=\text{N}-$ ). Intenzívnejšie pásy sa objavia v prípade symetrických vibrácií a vibrácií vo fázy, než

pri antisymetrických a vibráciách v protifázy. Slabými pásmi sa prejavujú väzby ako napríklad C=O (Dendisová *et al.*, upravené podľa URL 8 a URL 10).

Komplikácia, ktorá môže nastať pri meraní Ramanovým spektrometrom, je už spomenutá prítomnosť fluorescencie. Tá nám môže zatieniť významné pásy. Dochádza k nej v prípade, kedy energia excitačného žiarenia je taká istá ako energia potrebná pre elektrónovú excitáciu molekúl. Molekula teda absorbuje žiarenie a emituje žiarenie o vyššej vlnovej dĺžke a teda s menšou energiou. Ďalším problémom môže byť nízke spektrálne rozlíšenie, ktoré sa prejaví širšími a silnejšími pásmi. Tie môžu vo výsledku prekryť slabšie a užšie pásy. Pre väčšinu minerálov je vhodné rozlíšenie  $8\text{ cm}^{-1}$  a pre organické látky zasa  $16\text{ cm}^{-1}$ . V prípade extrémofilných organizmov a ich organických či anorganických súčastí, ktoré by mohli byť vhodnými biomarkermi, je vhodná nižšia veľkosť rozlíšenia. A to z hľadiska správnej detekcie možných biomarkerov (Villar a Edwards, 2006).

### 6.1.3 Základné schéma - Ramanov spektrometer



**Schéma 1** Ramanov spektrometer – základné schéma (1 - laser, 2 - filter, 3 - zrkadlo, 4 - Notch filter, 5 - objektiv, 6 - vzorka, 7 - optika / šošovka, 8 - štrbina, 9 - mriežka, 10 - detektor).



Medzi základné komponenty, ktoré nám tvoria Ramanov spektrometer, patria v prvom rade laser, ako zdroj excitujúceho žiarenia. Prístroje sú vybavené buď laserom o jednej vlnovej dĺžke, alebo je možné vlnovú dĺžku meniť použitím rôznych typov laserov. Pomocou softwaru a filtrov je potom možné meniť výkon laseru a tak predísť poškodeniu vzorku alebo chybným spektrám. V celom prístroji sa nachádza rôzny počet zrkadiel a komplikovanej optiky, ktoré slúžia na usmernenie lúčov a ich zaostrenie. Štrbiny nám eliminujú rozptýlené žiarenie a filtre ho upravujú. Používa sa tzv. Notch filter, ktorý nám odfiltruje Rayleigho rozptyl. Ďalej žiarenie postupuje k optickej difrakčnej mriežke, ktorá dokáže rozložiť svetlo na spektrum pomocou sústavy rovnobežných čiar, ktoré ju delia na priehľadné a nepriehľadné štrbiny. Na konci celého systému sa nachádza CCD (Charge-Coupled device) detektor, ktorý je schopný snímať obrazovú informáciu a zaznamenať Ramanov rozptyl. Pomocou pravouhlého dvojrozmerného pola pixelov, ktoré konvertuje dopadajúce svetlo na pixle na náboj, ktorý je úmerný integrovanej intenzite svetla. Dáta sú potom spracované počítačom a výsledkom sú spektrá, ktoré sú špecifické pre každú látku.

#### 6.1.4 Prenosné prístroje

Ramanove spektrometre nachádzajú čoraz širšie uplatnenie v rôznych oblastiach analýz. Dlhé roky sa používali hlavne laboratórne spektrometre a až v posledných rokoch, kedy došlo ku miniaturizovaniu Ramanovho spektrometra, nastal významný posun využitia tejto metodiky v iných oblastiach. Výhodou je využitie prístrojov priamo v teréne. Metóda zasahuje hlavne do oblastí vedy a výskumu, ale využitie nachádza aj vo sférach kriminalistiky (identifikácia neznámych látok ako napr. drogy, forenzná veda), umenia (overovanie pravosti a veku obrazov alebo iných predmetov, archeológia) alebo pyrotechniky (identifikácia výbušnín). Významnou oblasťou, kde miniaturizovaný Ramanov spektrometer našiel svoje uplatnenie, je astrobiologický výskum. Podrobnejšie je táto problematika popísaná v kapitole o astrobiológii.

V súčasnej dobe sa čoraz častejšie využívajú terénne prístroje, ktoré majú vlastný display a zabudovaný software, ktorý dokáže namerané hodnoty okamžite vyhodnotiť a porovnať s databázou spektier. Problémom môže byť veľmi strohá databáza spektier a tým môže nastať problém pri identifikácii nameraných hodnôt. Výhoda je väčšia mobilita prístroja oproti usporiadaniu, ktoré by obsahovalo prídavný notebook. V takom prípade sa Ramanov spektrometer vyskytuje samostatne a na prídavnom zariadení (notebook) sa vyhodnotia namerané dáta. Analýza dát je podrobnejšia a databáza spektier v prístroji často obsiahlejšia. Software umožňuje okamžitú úpravu spektier, nastavenia výkonu laseru, čas merania alebo opakovanie meraní. Mobilita takéhoto zariadenia je menšia a energeticky (batéria) náročnejšia. Optika a celkové vnútorné usporiadanie takýchto prístrojov je v porovnaní s laboratórnym mikrospektrometrom odlišné.

V článku Vandennebeele *et al.*, 2014 rozdelili mobilné Ramanove spektrometre do piatich skupín. Prvá skupina sú prenosné (transportable) prístroje. Sú ľahko prenosné z jedného miesta na druhé, no vyžadujú určité nastavenia pre optimálny chod zariadenia na danom mieste. Nie sú navrhnuté pre častý transport. Druhá skupina sú mobilné (mobile) prístroje. Je to súhrnná skupina pre všetky mobilné prístroje, ktoré nevyžadujú špeciálnu prípravu spektrometra na mieste merania. Tretiu skupinu tvoria prenosné (portable) prístroje, ktoré je možné dopraviť na určité miesto len jednou osobou (v kufríku napr.). V roku 2012 sa objavili na trhu prístroje tohto typu s vlnovou dĺžkou 532 nm. Štvrtou skupinou sú prístroje príručné (handheld), ktoré je možné obsluhovať jednou rukou. Prístroj je pri analýze umiestnený pred vzorku. Prvé prístroje tohto typu boli vybavené laserami o vlnovej dĺžke blízkej infračervenej oblasti (785 nm). Poslednou, piatou skupinou, sú prístroje, ktoré je možné držať dlaňou (palm) jednej ruky. Ich veľkosť je značne redukovaná.

Mobilné spektrometre sú vo všeobecnosti vybavené laserom o jednej vlnovej dĺžke, no v súčasnosti sa objavujú prístroje s dvoma rôznymi laserami. Namerané spektrá sa porovnávajú s existujúcimi

databázami. Niektoré prístroje umožňujú vytvorenie vlastných databáz. Spektrá musia byť porovnané so spektrami vzniknutými za podobných podmienok (napr. rovnaká vlnová dĺžka), (Vandenabeele *et al.*, 2014).

Účinnosť týchto spektrometrov je dobre znázornená v práci Vítka *et al.*, 2012, kde boli porovnané dva miniaturizované spektrometre o rôznych vlnových dĺžkach. Prvý prístroj disponoval vlnovou dĺžkou 532 nm (príručný, Nd:YAG laser s výkonom 100 mW, operačný rozsah 200 - 3400  $\text{cm}^{-1}$ , rozlíšenie 10  $\text{cm}^{-1}$ ), čo je dĺžka navrhnutá pre misiu ExoMars. Druhý prístroj mal vlnovú dĺžku 785 nm (prenosný, diódový laser s výkonom 120 mW, operačný rozsah 200 - 2000  $\text{cm}^{-1}$ , spektrálne rozlíšenie 8  $\text{cm}^{-1}$ ), čo je považované za univerzálnu vlnovú dĺžku používanú v laboratórnych podmienkach pri identifikácii organických molekúl a anorganických minerálnych fáz. V hyperaridnom prostredí púšte Atacama sa pokúsili o identifikáciu mikrobiálnych biomarkerov v prírodnom halite. Z oblasti Yungay bola odobratá vzorka z vrchnej časti halitovej krusty, ktorá bola bohato kolonizovaná. Na povrchu a tesne pod povrchom sa nachádzala zóna A, ktorá mala čierny povrch a sivú vnútornú kolonizáciu v pruhoch. Zóna B mala sivú farbu a zóna C bola zelená vnútorná oblasť vzorky. Analýza prebehla priamo na vzorke a následne boli časti s kolonizáciou cyanobaktérií separované, rozdrvené, zpráškované a homogenizované. Čo demonštruje proces analýzy plánovaný v misii ExoMars. Distribúcia mikroorganizmov a tým pádom aj biomarkerov vo vzorke je veľmi heterogénna a preto má veľký význam aj priemer plochy, ktorú je spektrometer schopný analyzovať.

V zónach A a B bol detegovaný scytonemín, ktorý je zodpovedný za tmavé farby. Je to významný fotoprotektívny pigment. Výraznejší signál bol v zóne A, pretože je viac pri povrchu a ochrana voči UV žiareniu musí byť účinnejšia. Použitie vlnovej dĺžky 785 nm sa ukázalo ako vhodné pri detekcii scytonemínu bez predošlej úpravy vzorky. Preukázali to aj spektrá s hodnotami pásov typických pre scytonemín (1595, 1554 a 1173  $\text{cm}^{-1}$ ). Vlnová dĺžka 532 nm preukazovala pri scytonemíne slabé odozvy a tak sa ukázala ako nevhodná pri detekcii tohto pigmentu. Naproti tomu sa pomocou tejto dĺžky namerá významný signál karotenoidov dominantný v zóne B (pásky boli 1518, 1155 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ ). V zóne C bola preukázaná relatívna absencia scytonemínu a použitím dĺžky 532 nm bola preukázaná prítomnosť karotenoidov vďaka ich zosilnenému signálu pri použití tejto vlnovej dĺžky. Žiaden signál sa nepreukázal v zóne C použitím vlnovej dĺžky 785 nm. Toto je evidentný dôkaz citlivosti pigmentov na jednotlivé excitačné vlnové dĺžky. Homogenizácia vzorky zhoršila schopnosť detegovať pigmenty použitím vlnovej dĺžky 785 nm alebo 532 nm pri detekcii scytonemínu. Je to dané znížením koncentrácie pigmentov pri homogenizácii.

Ďalšou prácou, ktorá demonštruje využitie Ramanových spektrometrov v teréne je práca Jehličky a Orena, 2013. Zameraná bola na autotrofné a heterotrofné halofilné mikroorganizmy v súvislosti s detegovaním ich pigmentov ako vhodnými biomarkermi. Ramanove spektrá boli obstarané pomocou miniaturizovaného príručného spektrometra, ktorý bol vybavený diódovým laserom o vlnovej dĺžke 532 nm, výkonom 60 mW, spektrálnym rozsahom 200 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  a spektrálnym rozlíšením 6  $\text{cm}^{-1}$ . Okrem vypestovaných kultúr jednotlivých organizmov a vzoriek planktónu z kryštalizačných evaporačných nádrží v lokalite Eliat v Izraeli, je najpodstatnejšie spomenúť vzorky sadrovcovej krusty odobratej zo dna týchto nádrží.

Sadrovec bol stratifikovaný do troch vrstiev podľa typu mikroorganizmov (sinice a ružové sírne baktérie), ktoré sa vnich vyskytovali (žltá-oranžová, zelená, červeno-purpurová). Táto analýza je dôležitá z toho hľadiska, že merania daných kolónií boli uskutočnené priamo na vzorke. Dôležitá je prítomnosť karotenoidov vo všetkých vrstvách minerálu. Odlišnosť týchto pigmentov je závislá na vrstve (hlbke), v ktorej sa organizmy nachádzajú. V povrchovej časti sa nachádzali sinice typu *Halothece*. Spôsobujú oranžové sfarbenie (preukázaná prítomnosť myxoxantofylu, echinenónu a malé množstvá chlorofylu *a*, feofytínu, zeaxantínu a kantaxantínu). Boli tu namerané Ramanove pásky 1510, 1152, 1006  $\text{cm}^{-1}$  a 1513, 1153, 1005  $\text{cm}^{-1}$ . Pod nimi sa nachádzali sinice typu *Phormidium* zodpovedné za zelené sfarbenie (preukázaná prítomnosť pigmentov myxoxantofyl, echinenón, fykocianín s malým

zastúpením feofytínu *a* a chlorofylu *a*). Spektrá, ktoré sa tu namerali, mali hodnoty 1509, 1150 a 1003  $\text{cm}^{-1}$ . Chlorofil *a* a fykocyanin, ktoré boli očakávané v tejto vrstve sa touto vlnovou dĺžkou nedetegovali. Ich detekcia by bola možná vlnovou dĺžkou 785 nm avšak polysacharidy prítomné vo vzorke spôsobujú pri tomto type laseru fluorescenciu a tak zakrývajú slabé signály pigmentov. Červeno-purpurové sfarbenie v najspodnejšej vrstve je spôsobené anoxygénnymi fototrofmi (spiriloxantin a bakteriochlorofyl *a*). Pásky mali hodnoty 1510, 1151 a 1004  $\text{cm}^{-1}$ . Namerané spektrá kultivovanej baktérie *Ectothiorhodospira* dali podobné hodnoty pásov a to 1510, 1149 a 1002  $\text{cm}^{-1}$  a preto sa dost podobajú na spomenutý spiriloxantin.

## 7.0 HPLC - VYSOKO ÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA

HPLC je separačná metóda, ktorá je významná pre svoju vysokú účinnosť a opakovateľnosť. Je vhodná pri separácii organických kvapalných a tuhých látok, ktoré su rozpustné vo vode, organických rozpúšťadlách alebo zriedených kyselinách. Analyzovaná vzorka je separovaná na základe distribúcie medzi stacionárnou a mobilnou fázou. Ako stacionárna fáza sa používajú polárne nemodifikované adsorbenty ako silikagel alebo oxid hlinitý. Používajú sa aj náplne s chemicky viazanými stacionárnymi fázami na silikagelovom nosiči. Mobilná fáza je väčšinou voda, organické rozpúšťadlá alebo ich zmesi. Stacionárna fáza je zakotvená v chromatografickej kolóne. Pri separácii sa uplatňujú interakcie analytov s mobilnou fázou, interakcie mobilnej so stacionárnou fázou a sorpcia analytov na stacionárnu fázu. Vzorky sú dávkokované dávkovacím ventilom do mobilnej fázy. Tá prenáša jednotlivé zložky vzorky na kolónu kde dochádza k rovnováhe medzi mobilnou a stacionárnou fázou a podľa chemicko-fyzikálnych vlastností sa separuje analyt. Zo separačnej kolóny putuje analyt do prietokovej cely detektoru kde je detegovaný na základe vlastností ako absorbanca, index lomu, elektrická vodivosť alebo fluorescencia. Z detektoru máme informáciu v podobe grafického záznamu, ktorý vyjadruje závislosť odozvy detektoru na retenčnom čase (jednotlivé zložky opúšťajú kolónu a sú zaznamenané ako pásky s charakteristickou výškou a plochou). Kvantitatívna analýza sa zakladá na princípe odčítania výsledku z kalibračnej krivky. Využitie HPLC sa uplatňuje napr. pri stanovení organických kyselín, vitamínov, bielkovín, liečiv alebo metabolitov (upravené podľa URL 14).

Táto metóda má významné využitie v identifikácii organických látok. V porovnaní s metódou Ramanovej spektrometrie je potrebná príprava vzoriek pred vlastným meraním. HPLC počíta s tým, že skúmané látky sú rozpustné vo vode, organických rozpúšťadlách alebo zriedených kyselinách. Pri využití Ramanovej spektrometrie nieje potrebné žiadne špeciálne spracovanie vzorky a meranie sa môže uskutočniť priamo na surovej vzorke. Bez ohľadu na skupenstvo látky. Takisto je meranie možné priamo v teréne bez predošlého odobratia vzorky alebo jej poškodenia a to vďaka miniaturizácii prístrojov a ich možnosti transportu na miesta s rôznym stupňom prístupnosti. Takisto má väčšiu výhodu pri práci v teréne čo je dôležitá vlastnosť napríklad v astrobiologickom výskume. Extrakty pri HPLC metóde prechádzajú kolónou a rôzne fázy vzorkov sa zobrazujú v rôznych retenčných časoch. Podľa nich sa pomocou štandardov pre retenčné časy určí o akú látku sa jedná.

Význam metódy HPLC je napriek tomu významný. Mnohé práce dokazujú dôležitosť metódy pri identifikácii organických látok akými sú napríklad metabolity lišajníkov alebo siníc. Tieto látky sú významné z hľadiska Ramanovej spektrometrie, pretože niektoré z nich sa dajú použiť ako významné biomarkre. Jedná sa predovšetkým o skupinu pigmentov karotenoidy, ale ako dôkaz prítomnosti živých organizmov by mohli byť podstatné aj iné sekundárne metabolity ako napríklad niektoré druhy kyselín, ktoré organizmy ako lišajníky nevyhnutne potrebujú pre život. Tieto skupiny látok je možné detegovať aj pomocou Ramanovej spektrometrie ale problém nastáva pri špecifickej identifikácii, kedy niesme schopný jednoznačne rozlíšiť druhy jednotlivých biomarkerov. Preto nám metóda HPLC pomáha identifikovať, ktoré metabolity by mohli byť prítomné v danom organizme. Jednou z významných prác, ktoré sa zaoberajú analýzou lišajníkovou metódou HPLC je výskum skupiny

Ranković *et al.*, 2014. V tejto práci sa venovali identifikácii sekundárnych metabolitov lišajníka *Hypogymnia physodes*. V práci použili metódu HPLC-UV, kde z lišajníka vytvorili acetónový extrakt a ten následne analyzovali. Účel bol identifikovať chemické zloženie a vlastnosti hlavných metabolitov. Na základe retenčných časov a ich absorpčných maxím detegovali v extrakte látky depsidóny (fumaroprotocentrická, 3-hydroxyfysodalicá, fysodalicá a fysodická kyselina), depsidy (atranorín a chloroatranorín) a takisto významnú usnovú kyselinu patriacu do skupiny dibenzofuránov, ktorá je dôležitá pre jej antibiotické účinky. Všetky tieto látky majú dôležité antioxidačné vlastnosti. Dokážu zbaviť organizmus voľných radikálov ako singletový kyslík, superoxid a hydroxylové radikály (Kosanić *et al.*, 2012). Táto vlastnosť je významná pre organizmy, ktoré musia odolávať extrémnym faktorom prostredia ako napríklad vysokému UV žiareniu.

V práci Chandra *et al.*, 2001 využili HPLC-MS metódu pri separácii a identifikácii pigmentov antocianínov, ktoré sú rozpustné vo vode. Objavujú sa u všetkých vyšších rastlín a majú rôzne farby vzhľadom na hodnoty pH. Sú dcérskou skupinou molekúl flavonoidov. Zafarbujú časti rastlín a používajú sa ako potravinárske farbivo. V práci použili ako externý štandard cyanidin-3-glukosid chlorid a pomocou hmotnostného spektrometra identifikovali jednotlivé pásy antocianínov.

Ďalšou významnou ukážkou využitia HPLC-UV metódy je práca Wright *et al.*, 1991, kde pomocou tejto techniky opísali identifikáciu a separáciu viac než 50 druhov karotenoidov, chlorofylov a ich derivátov zo vzoriek morského fytoplanktónu. Metóda je vhodná pre všetky typy pigmentov. Problém nastal pri použití silikagelu ako stacionárnej fáze, ktorá spôsobuje degradáciu chlorofylov. Napriek tomu sa podarilo separovať a identifikovať na základe referenčných štandardov veľké množstvo pigmentov. Niektoré z nich, ako zeaxantin, kantaxantin alebo fukoxantin, sú vhodné biomarkre organizmov.

## 8.0 PREHLAD DRUHOV ORGANIZMOV POUŽITÝCH PRE RAMANOVU ANALÝZU

Vlastný výskum tejto práce bol zameraný hlavne na skupiny extrémofilných organizmov z extrémne chladných prostredí ale aj skupiny organizmov ako lišajníky. Extrémofilné snežné riasy sme získali priamo v terénne z oblasti Krkonošských hôr blízko Pančavského vodopádu. V reliktoch snehu sme preukázali prítomnosť rias rodu *Chloromonas* a ďalších druhov organizmov. Prítomnosť karotenoidov sme sa snažili preukázať pomocou príručného Ramanovho spektrometra a následne sme v laboratórnych podmienkach preverili výsledky pomocou laboratórneho mikrospektrometra.

Ďalšou skupinou organizmov sú lišajníky, ktorým sa v tejto práci venovala významná pozornosť. Vzorky lišajníkov boli pripravené v spolupráci s Katedrou botaniky Karlovej Univerzity a poskytol nám ich RNDr. David Svoboda, Ph.D., pričom boli použité vzorky odobrané priamo v terénne a vzorky zmrazené, takisto relatívne čerstvé. Zmrazené vzorky boli rozmrazené. Kvôli simulácii terénneho merania sme sa snažili o získanie čerstvých lišajníkov. Vzorky boli pri suchom meraní staré maximálne 2 – 3 týždne. V prvom rade sme sa zamerali na výskyt karotenoidov, o ktorých sme vedeli, že sú vhodnými biomarkermi extrémofilov. Dopredu sme vedeli o prítomnosti iných metabolitov, ktoré by sa mohli v nameraných spektrách prejaviť výraznými pásmi. Väčšinou sme nemali k dispozícii presné definície druhov metabolitov, ktoré dané lišajníky obsahujú.

Použitie metódy Ramanovej spektrometrie sme demonštrovali aj na vzorkách siníc, ktoré nám dodali vypestované na Petriho miskách z Botanického ústavu AV ČR, vedecké pracovisko Třeboň. Vďaka patrí doc. Ing. Josefovi Elsterovi CSc. Jednalo sa o psychrofilné organizmy z rôznych oblastí typických svojim chladným prostredím (Antarktída: James Ross Island, Princess Elisabeth Station; Nový Zéland).

Demonštrácia účinnosti Ramanovej spektrometrie bola názorne prevedená na vzorkách frakcií pigmentov siníc separovaných pomocou HPLC metódy, ktoré nám boli dodané od Mgr. Jana Pilného

(Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň). Vzorok s označením TH patria kmeňu sinice *Scytonema hyalinum* (Kauai, Hawaii, USA) a vzorky s označením FM patria kmeňu *Scytonema* sp. (tropický skleníkový Fata Morgana, botanická záhrada Praha, Trója).

### 8.1 Taxonomické zaradenie analyzovaných organizmov pomocou Ramanovej spektrometrie

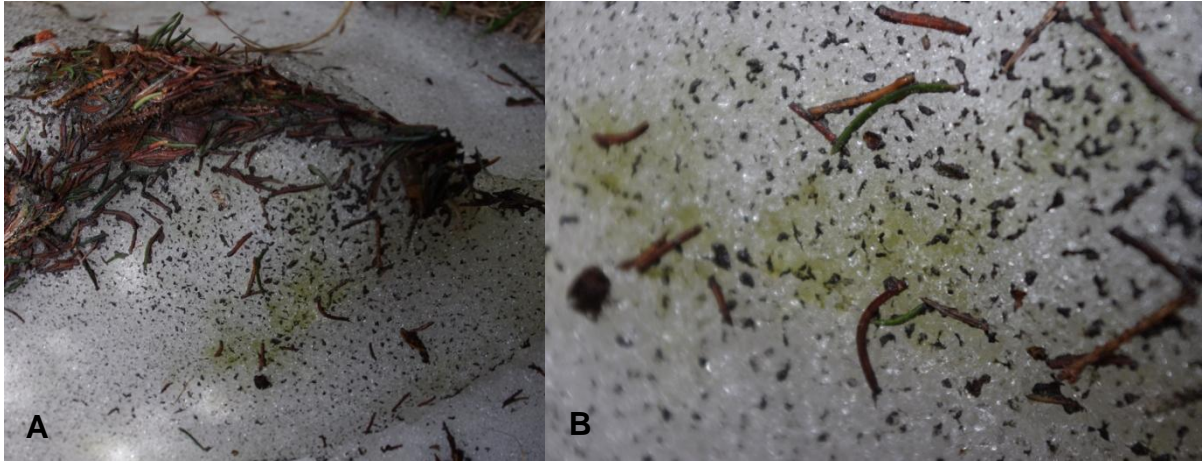
Doména	Ríša	Kmeň	Trieda	Rad	Čeľad'	Druh
Eukarya	Plantae	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlamydomonadales	Chlamydomonadaceae	<i>Chloromonas nivalis</i>
						<i>Chloromonas brevispina</i>
	Fungi	Ascomycota	Lecanoromycetes	Lecanorales	Cladoniaceae	<i>Cladonia coniocraea</i>
						<i>Cladonia digitata</i>
				<i>Pseudevernia furfuracea</i>		
			Candelariales	Candelariaceae	<i>Candelaria pacifica</i>	
Bacteria		Cyanobacteria	Cyanophyceae	Nostocales	Rivulariaceae	<i>Calothrix elsteri</i>
					Scytonemataceae	<i>Scytonema</i> sp.
				Oscillatoriales	Pseudanabaenaceae	<i>Phormidermis priestleyi</i>
					Phormidiaceae	<i>Phormidium</i>

**Tab. 7** Základné taxonomické rozdelenie analyzovaných organizmov (upravené podľa URL 17, 18, 19).

## 9.0 METODIKA

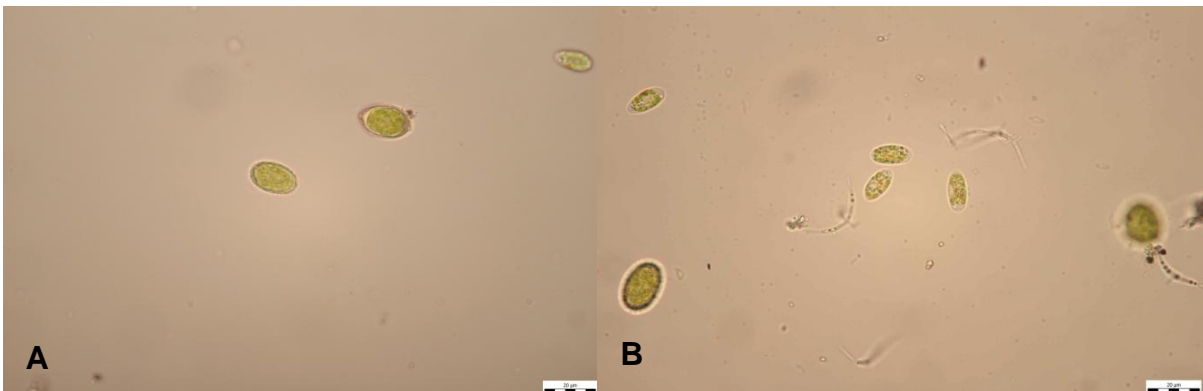
### 9.1 Príprava vzoriek psychrofilných rias

1. Pre demonštráciu príručného Ramananovho spektrometra sme po dohode s RNDr. Lindou Nedbalovou Ph.D. (Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra ekologie) zvolili lokalitu Krkonošské hory, v okolí meandrov prameňa rieky Labe, v blízkosti Pančavského vodopádu.
2. Na reliктоch snehu sme identifikovali prítomnosť zelených povlakov.



Obr. 10 (A, B) Prítomnosť psychrofilných rias na reliктоch snehu.

3. Následne sme pomocou príručného spektrometra ( $\lambda$  532 nm) previedli niekoľko meraní priamo na snehu v oblasti najväčšej koncentrácie organizmov. Merania prebehli pod tmavou plachtou z dôvodu ochrany proti slnečnému žiareniu a znehodnoteniu výsledkov. Následne sme odobrali vzorky organizmov z viacerých reliктов do termonádob a preniesli do laboratória.
4. Ďalšie merania boli prevedené pomocou laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm). Najprv na zamrznutých vzorkách so snehom. Výsledky boli neuspokojivé a dochádzalo k vysokému šumu spôsobenému veľkým množstvom vody, ktorá zriedila vzorku. Preto sme pomocou papierového filtru o priemere pórov 50  $\mu$ m zbavili vzorky čo najväčšieho množstva vody a dostali sme takmer čistú biomasu organizmov. Následne sme biomasu preniesli na mikroskopické sklíčko a premerali. Výsledky sa rapídne zlepšili.

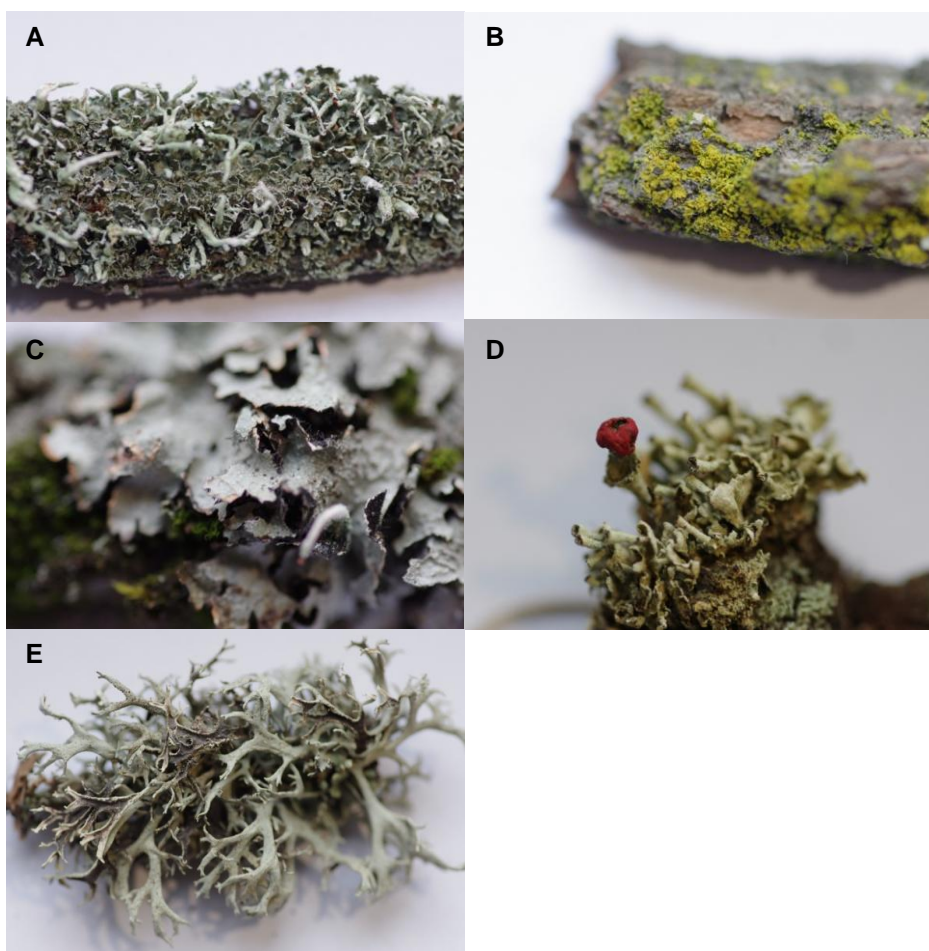


Obr. 11 (A, B) *Chloromonas nivalis* a *Chloromonas brevispina* (spóry + bičíkaté štádiá).

Žiadne ďalšie úpravy vzoriek neboli uskutočnené. Pomocou analýzy morfológie spór sa organizmy identifikovali ako psychrofilné riasy *Chloromonas nivalis* (spóry s lištami) a *Chloromonas brevispina* (ostnaté spóry).

## 9.2 Príprava vzoriek lišajníkov

Po stretnutí a prehodnotení výberu vzoriek lišajníkov sme v spolupráci s RNDr. Davidom Svobodom, Ph.D. (Katedra botaniky Univerzity Karlovej) zvolili vzorky orgnizmov, ktoré podľa predbežných informácií mali obsahovať vo väčšine prípadov prítomné karotenoidy. Niektoré druhy boli zvolené bez kľúča kvôli demonštrácii možnosti Ramanovej spektrometrie identifikovať významné biomarkre v neznámych vzorkách. Jednalo sa o vzorky z lokality Modrava (Šumava, hora Medvěd) a Ketkovský hrad (Náměst' nad Oslavou).



**Obr. 12** Lišajníky použité pre analýzu (A - *Cladonia coniocraea*: archív, B - *Candelaria pacifica*, C - *Cladonia digitata*, D - *Cladonia digitata*: sporangium, E - *Pseudevernia furfuracea*).

1. Vzorky sme zvolili tak, aby boli čo najviac čerstvé v zmysle možnej prítomnosti primárnych a sekundárnych metabolitov. Väčšina bola maximálne dva týždne stará od odobratia zo substrátu priamo v teréne. Niektoré vzorky boli odobrané aj so substrátom, čo nám umožnilo bližšie demonštrovať meranie za terénnych podmienok. Niektoré vzorky boli zmrazené, ale predpokladali sme, že po rozmrazení dôjde ku štandardnému spusteniu metabolizmu organizmov.

2. Niektoré lišajníky pochádzali z archívnych zbierok a pri týchto vzorkách sme s určitosťou vedeli o prítomnosti karotenoidov. Napriek tomu sa nám pri všetkých vzorkách nepodarilo úspešne preukázať ich prítomnosť. Zrejme vzhľadom na vek odobratej vzorky, kedy už vo väčšine organizmu došlo k degradácii sekundárnych metabolitov.

3. Vzorky sme premiestnili na Petriho misky a následne premerali príručným spektrometrom ( $\lambda$  532 nm). Niektoré vzorky nevykazovali pri tejto vlnovej dĺžke žiadny prejav pásov v nameraných spektrách.

4. Ďalším krokom bolo navlhčenie vzoriek v Petriho miskách, pretože sme predpokladali aktiváciu metabolizmu lišajníkov do cca 24 hodín. Následne sme vzorky premerali príručným spektrometrom ( $\lambda$  532 nm). Žiadna významná zmena v zlepšení výsledkov nenastala. Z toho sme usúdili, že ďalšie merania vlhkých vzoriek nie sú nutné.

5. Následne sme vzorky merali laboratórnym mikrospektrometrom ( $\lambda$  514 nm). Bez navlhčenia. Výsledky boli o poznanie lepšie a to z dôvodu prítomnosti optického mikroskopu vybaveného kamerou. To nám umožnilo presné zameranie na vybranú lokalitu, v ktorej sme predpokladali prítomnosť pigmentov.

6. Posledným krokom bola krátka demonštrácia merania pomocou ďalšieho príručného spektrometra, ktorý sa v niektorých prípadoch prejavil ako účinný nástroj na identifikáciu iných látok než karotenoidov. Je to dané vlnovou dĺžkou prístroja 700 - 1100 nm.

### 9.3 Príprava vzoriek psychrofilných siníc

V spolupráci s doc. Ing. Josefom Elsterom CSc. (Botanický ústav AV ČR, vedecké pracovisko Třeboň) nám boli dodané vzorky psychrofilných siníc (Antarktída: James Ross Island, Princess Elisabeth Station; Nový Zéland).

1. Organizmy boli kultivované na Petriho miskách so štandardným živným médiom:

- 1/2 BG11, 2 % agar, kultivované pri teplote 10 °C až po dostatočné množstvo biomasy pre následné meranie. Vzorky boli udržiavané v chlade z hľadiska ich psychrofilnej adaptácie.

2. Následne sa vzorky merali príručného spektrometra ( $\lambda$  532 nm) a prenosného spektrometra ( $\lambda$  785 nm). Ďalšie merania boli uskutočnené na laboratórnom mikrospektrometri s vlnovou dĺžkou 445 nm a 532 nm pod dohľadom doc. RNDr. Ivana Němce Ph.D. (Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Univerzita Karlova v Praze).

Žiadne ďalšie úpravy vzoriek neboli uskutočnené.

### 9.4 Príprava zmesí pigmentov pomocou metódy HPLC

V spolupráci s Mgr. Janem Pilným (Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň) nám boli dodané frakcie pigmentov izolované z kmeňov siníc *Scytonema hyalinum* a *Scytonema* sp. Pri prechádzaní vzorky kolónou sa rôzne fázy prejavujú v odlišných retenčných časoch. Tieto retenčné časy zodpovedajú vždy inej látke. Na základe štandardov pre merané látky sa vyhodnotilo o aký pigment sa jedná. V našom prípade bola pre nás podstatná prítomnosť karotenoidov, ale prejavili sa aj iné pigmenty ako napr. chlorofyl.

Izolované kmene siníc boli analyzované pomocou prístroja Agilent – 1200 high pressure liquid chromatography.



1. Vzorky boli extrahované s 90 % metanolom. Separované boli na kolóne reverznej fáze: Kinetex C8, veľkosť častíc: 2,6  $\mu\text{m}$ , 3,9 x 150 mm.

- Solvent A: 35 % metanol, 15 % acetonitril v 0,25 M pyridínu.
- Solvent B: 20 % metanol, 20 % acetón v acetonitrile.

Pigmenty boli vyluhované pomocou gradientovej elúcie solventu B (30 - 95 % v 25 min. ) a následne solventu B (95 %). Prietoková rýchlosť: 0,8 ml/min. Teplota: 40 °C.

## 10.0 INŠTRUMENTÁCIA

### 10.1 Ramanove spektrometre a ich parametre

Merania vzorkov boli uskutočnené pomocou príručných, prenosných a laboratórnych Ramanových spektrometrov.

- **FirstGuard (Rigaku)**: vybavený zeleným diódovým laserom o vlnovej dĺžke 532 nm, s výkonom až 60 mW, spektrálnym rozsahom 200 – 3000  $\text{cm}^{-1}$  a spektrálnym rozlíšením 6  $\text{cm}^{-1}$ .

Nastavenia prístroja nebolo možné fixne stanoviť, nakoľko sa pri každom type vzorky previedlo niekoľko opakujúcich sa meraní s rôznymi nastaveniami prístroja. Z nich bolo následne vybraté najreprezentatívnejšie spektrum, ktoré jasne definovalo prítomnosť istého druhu pigmentu.

Najvhodnejšie nastavenie:

- Riasy - dĺžka akumulácie: 5 - 10s, počet akumulácií: 5, výkon: 20 - 60 mW
- Sinice - dĺžka akumulácie: 0,1 - 1s, počet akumulácií: 10, výkon: 1 mW
- Lišajníky - dĺžka akumulácie: 1s, počet akumulácií: 10 - 40, výkon: 1 mW

- **Rock Hound od DeltaNu**: 785 nm, červený diódový laser s výkonom až 120 mW, operačný rozsah 200-2000  $\text{cm}^{-1}$ , spektrálne rozlíšenie 8  $\text{cm}^{-1}$ .

Využitý bol hlavne pri meraní vzoriek psychrofilných siníc. Opäť boli zvolené rôzne nastavenia prístroja v závislosti na kvalite výsledkov. Z nich boli následne vybraté najreprezentatívnejšie spektrá s kvalitnými výsledkami.

Najvhodnejšie nastavenie:

- Sinice - dĺžka akumulácie: 10s, počet akumulácií: 10 - 20, výkon: medium - medium high

- **Laboratórny mikrospektrometer Renishaw In Via Reflex s CCD detektorom**: spektrálne rozlíšenie 2  $\text{cm}^{-1}$ , operačný rozsah 100 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý pracoval s dvoma typmi laseru a to zeleným argónovým 514,5 nm (výkon až 20 mW) a červeným diódovým 785 nm (výkon až 150 mW).

Poskytol najvhodnejšie spektrá pri identifikácii pigmentov (karotenoidov). Veľkou výhodou je vybavenie kamerou v mikroskope, ktorá umožnila presné zameranie laseru na miesta s pravdepodobným výskytom karotenoidov. Nastavenia boli zvolené podľa hodnoty výsledných meraní a následne upravované pre zvýšenie presnosti spektrier.

Najvhodnejšie nastavenia:

- Riasy - dĺžka akumulácie: 20s, počet akumulácií: 15, výkon: 0,05 %
- Lišajníky - dĺžka akumulácie: 20s, počet akumulácií: 20, výkon: 0,1 - 0,5 %
- HPLC - dĺžka akumulácie: 20s, počet akumulácií: 1 - 40, výkon: 0,5 %

- **Thermo Scientific DXR Raman Microscope:** spektrálny rozsah 2000 - 50  $\text{cm}^{-1}$ , maximálny výkon 8 mW, spektrálne rozlíšenie 1  $\text{cm}^{-1}$ , vybavený modrým diódovým laserom s vlnovou dĺžkou 445 nm a zeleným diódovým laserom s vlnovou dĺžkou 532 nm.

Najvhodnejšie pre naše merania bolo nastavenie výkonu na 0,1 mW pre obe vlnové dĺžky (menšie nebolo možné). Prístroj nám poskytol k dispozícii doc. RNDr. Ivan Němec Ph.D. (Přírodovědecká fakulta, Katedra anorganické chemie, Univerzita Karlova v Praze). Vlastné merania previedol Mgr. Adam Culka, Ph.D. Tento prístroj bol využitý najmä pri meraní psychrofilných siníc a následne pri identifikácii frakcií pigmentov z extraktov siníc získaných pomocou metódy HPLC.

Najvhodnejšie nastavenia:

445 nm:

- Sinice - dĺžka akumulácie: 4 - 10s, počet akumulácií: 16 - 64, výkon: 0,1 mW
- HPLC - dĺžka akumulácie: 20s, počet akumulácií: 1 - 10, výkon: 0,5 - 1 mW

532 nm:

- Sinice - dĺžka akumulácie: 1s, počet akumulácií: 128 alebo 256, výkon: 0,2 - 5 mW

-**Bravo od firmy Bruker:** disperzný prenosný Ramanov spektrometer vybavený CCD detektorom, spektrálny rozsah 3200 - 300  $\text{cm}^{-1}$ , spektrálne rozlíšenie 10 - 12  $\text{cm}^{-1}$ , vlnová dĺžka laseru 700 - 1100 nm (Duo Laser), výkon až 100 mW pre oba lasery.

Prístroj bol zapožičaný nášmu výskumnému tímu priamo od firmy Bruker a v rámci toho bol otestovaný na niektorých vzorkách lišajníkov analyzovaných v tejto diplomovjve práci. Merania boli uskutočnené v automatickom režime nakoľko nešlo o hlavnú náplň praktickej časti, ale len o príklad využitia tohoto typu zariadenia.

## 10.2 HPLC

Frakcie pigmentov boli získané rutinnou analýzou hlavných pigmentov z extraktov siníc. Použitý bol prístroj Agilent – 1200 high pressure liquid chromatography.

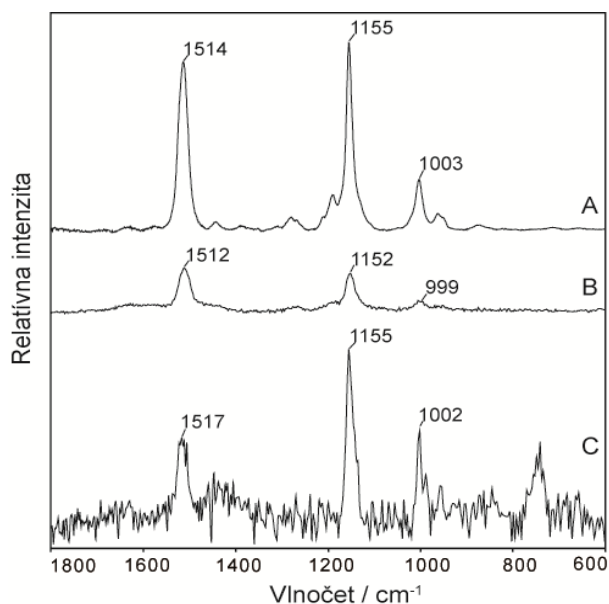
Extrahované vzorky boli separované na kolóne Kinetex C8, veľkosť častíc: 2.6  $\mu\text{m}$ , 3,9 x 150 mm.

Analýzu pigmentov pomocou metódy HPLC previedol Mgr. Jan Pilný (Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň). Kmen sinice *Scytonema hyalinum* TH02-NP izoloval Dr. Tomáš Hauer (PřF JU, České Budějovice). Kmen sinice *Scytonema* sp. FM5-MK45 izolovala Dr. Markéta Bohunická (PřF JU, České Budějovice).

## 11.0 VÝSLEDKY

### 11.2 Ramanova spektrometria vybraných druhov siníc z vypestovaných kultúr

Analýza pomocou Ramanovej spektrometrie bola prevedená aj na vzorkách psychrofilných siníc. Kultúry boli vypestované a analyzované na Petriho miskách. Predpokladali sme prítomnosť ochranného UV pigmentu scytonemínu, ktorý je pre tento druh siníc typický produkt v stresových podmienkach.



<i>Calothrix elsteri</i>		
532 nm (DXR) - A	532 nm - B	785 nm - C
1514 vs	1512 s	1517 s
1155 vs	1152 s	1155 vs
1003 m	999 m	1002 s

Tab.8 Základné pásy *Calothrix elsteri*

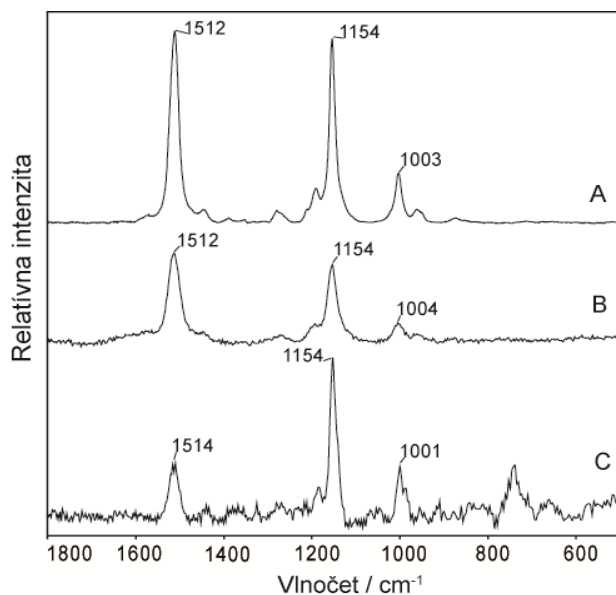
**Obr. 13** Namerané spektrá psychrofilnej sinice *Calothrix elsteri*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  532 nm), B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm), C - prenosný spektrometer ( $\lambda$  785 nm). Merania vypestovanej kultúry na Petriho miskách.

Namerané hodnoty pásov v rozsahu 1512 - 1517, 1152 - 1155, 999 - 1003  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ,  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ) vo všetkých spektrách dokazujú prítomnosti karotenoidov. Charakteristické pásy scytonemínu sa neprejavili.

Použitím laboratórneho mikrospektrometra (spektrum A) sa výrazne prejavili tri charakteristické pásy karotenoidov. Tento prístroj poskytol najpresnejšie výsledky analýzy tohto druhu pigmentov. Vidíme aj prejav vedľajších pásov typických pre karotenoidy v oblasti 1190 a 962 ( $\text{C}-\text{H}$ )  $\text{cm}^{-1}$ . Slabším signálom sa prejavil aj pás v oblasti 1443  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je pre karotenoidy netypický (diskutované v diskusii).

Príručný prístroj (spektrum B) nám potvrdil prítomnosť karotenoidov prejavom typických troch pásov. Ďalšie pásy sa v tomto prípade výrazne neprejavili. Signál karotenoidov bol výrazne slabší než v prípade laboratórneho mikrospektrometra.

Prenosným spektrometrom (spektrum C) sme znova dokázali prítomnosť karotenoidov. Zmenou vlnovej dĺžky došlo k potlačeniu signálu karotenoidov a tak sa nám prejavili aj pásy v netypickej oblasti pre tieto pigmenty. Pás s hodnotou 741  $\text{cm}^{-1}$  môže reprezentovať prítomnosť chlorofylu, ktorý sa pri tejto vlnovej dĺžke ( $\lambda$  785 nm) typicky výraznejšie prejavuje (Vítek *et al.*, 2010).



<i>Phormidermis priestleyi</i>		
532 nm (DXR) - A	532 nm - B	785 nm - C
1512 vs	1512 s	1514 m
1154 vs	1154 s	1154 vs
1003 m	1004 m	1001 m

**Tab. 9** Základné pásy *Phormidermis priestleyi*

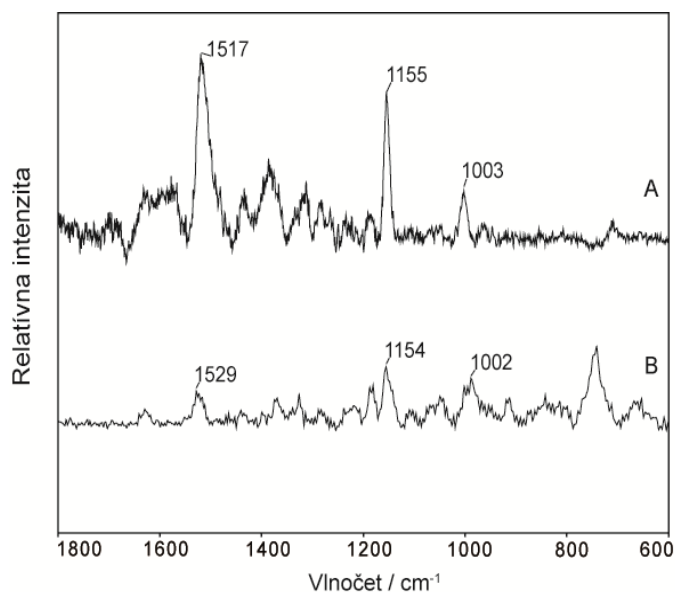
**Obr. 14** Namerané spektrá psychrofilnej sinice *Phormidermis priestleyi*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  532 nm), B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm), C - prenosný spektrometer ( $\lambda$  785 nm). Merania vypestovanej kultúry na Petriho miskách.

Namerané hodnoty pásov v rozsahu 1512 - 1514, 1154, 1001 - 1004  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ,  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ) vo všetkých spektrách dokazujú prítomnosť karotenoidov. Typické pásy scytonemínu sa neprejavili.

Laboratórny mikrospektrometer (spektrum A) spoľahlivo preukázal silný signál karotenoidov. Prejavili sa aj typické pásy týchto pigmentov v oblasti 961 a 1191  $\text{cm}^{-1}$ . Slabším signálom sa pri použití tohto prístroja prejavil aj netypický pás karotenoidov v oblasti 1445 a 1280  $\text{cm}^{-1}$  (diskutované v diskusii).

Príručný spektrometer (spektrum B) spoľahlivo identifikoval tri hlavné pásy karotenoidov. Slabší signál sa prejavil v oblasti 1193  $\text{cm}^{-1}$ . Tento pás je typický práve pre skupinu pigmentov karotenoidy.

Prenosný spektrometer s odlišnou vlnovou dĺžkou (spektrum C) znova identifikoval prítomnosť troch hlavných pásov karotenoidov. Pri zmene vlnovej dĺžky, kedy došlo k potlačeniu rezonančného efektu, sa prejavil aj vedľajší pás v oblasti 742  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je typický pre prítomnosť chlorofylu. Pás s hodnotou 1186  $\text{cm}^{-1}$  reprezentuje prítomnosť karotenoidov.



<i>Phormidium</i>	
532 nm (DXR) - A	785 nm - B
1517 s	1529 m
1155 s	1154 m
1003 m	1002 m

**Tab. 10** Základné pásy sinice *Phormidium*

**Obr. 15** Namerané spektrá psychrofilnej sinice *Phormidium*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  532 nm), B - prenosný spektrometer ( $\lambda$  785 nm). Merania vypestovanej kultúry na Petriho miskách.

Namerané hodnoty pásov v rozsahu 1517 - 1529, 1154 - 1155 a 1002 - 1003  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ,  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ) poukazujú na prítomnosť karotenoidov. Pásky typické pre scytonemín sa neprejavili.

Laboratórny mikrospektrometer (spektrum A) spoľahlivo preukázal tri typické pásy pre karotenoidy. Prejavili sa aj vedľajšie pásy v oblasti 1434, 1386  $\text{cm}^{-1}$  a v rozsahu 1284 - 1286  $\text{cm}^{-1}$  (diskutované v dikusii).

Príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm) neukázal žiaden signál karotenoidov ani iných pásov. Za tento fakt zodpovedá podľa všetkého prítomnosť fluorescencie, kedy došlo k prekrytiu slabého signálu karotenoidov.

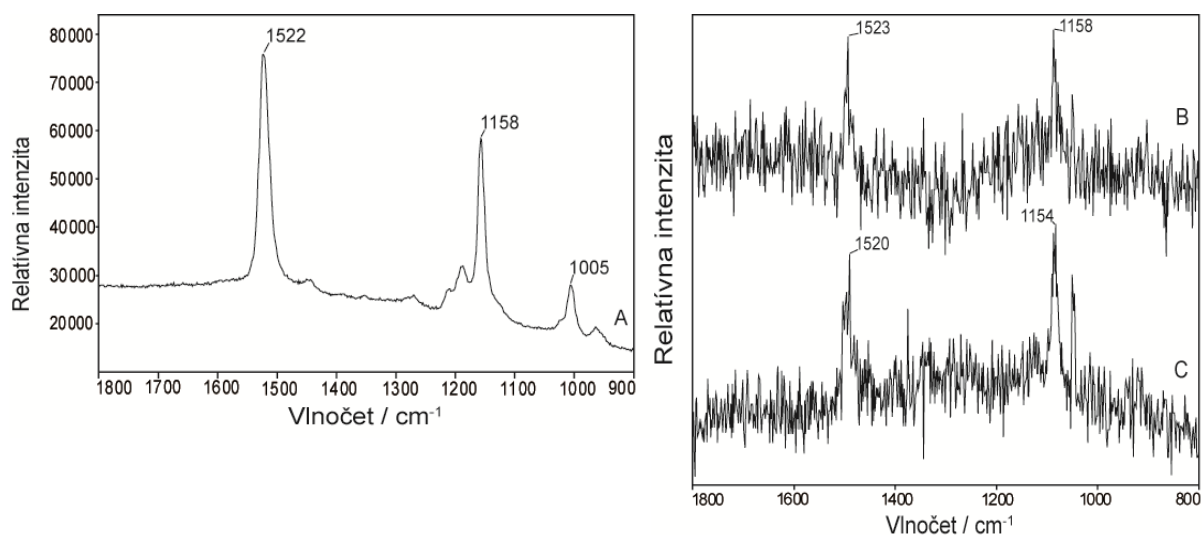
Prenosný spektrometer (spektrum B) identifikoval slabší signál karotenoidov, čo spôsobila zmena vlnovej dĺžky. Naproti tomu sa výrazne prejavil pás s hodnotou 741  $\text{cm}^{-1}$  typický pre prítomnosť chlorofylu. Slabo sa prejavil pás v oblasti 1283  $\text{cm}^{-1}$ .

## 11.1 Ramanova spektrometria vybraných druhov psychrofilných rias

Použitím metódy Ramanovej spektrometrie sme preukázali prítomnosť karotenoidov na vzorkách psychrofilných rias. Analyzované vzorky obsahovali zmes druhov *Chloromonas nivalis* a *Chloromonas brevispina*. Prítomné boli ich bičíkaté štádiá a spóry. Pre tieto druhy organizmov je typická produkcia pigmentu astaxantínu ako ochranného mechanizmu pred UV žiarením. Produkujú sa v určitých životných štádiách.

<i>Chloromonas nivalis</i> + <i>Chloromonas brevispina</i>					
514 nm (filter) - A	514 nm (sneh) - B, C		532 nm - D, E, F		
1522 vs	1523 s	1520 s	1516 s	1515 s	1520 s
1158 vs	1158 s	1154 s	1149 s	1154 s	1159 s
1005 m				1007 w	1006 vw

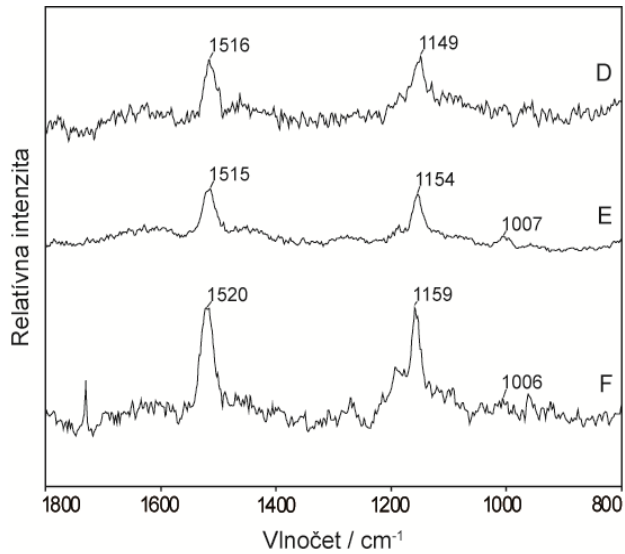
Tab. 11 Základné pásy *Chloromonas nivalis* a *Chloromonas brevispina*.



Obr. 16 Spektrá psychrofilných rias merané laboratórnym mikrospektrometrom ( $\lambda$  514 nm). Výsledné spektrá druhov *Chloromonas nivalis* + *Chloromonas brevispina*.

Laboratórny mikrospektrometer spoľahlivo preukázal prítomnosť typických karotenoidových pásov. Spektrum A (1522, 1158, 1005  $\text{cm}^{-1}$  -  $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ,  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ) popisuje výsledné spektrum rias po odfiltrovaní zamrznutého snehu. Jedná sa o najdokonalejšie meranie z dôvodu vysokej koncentrácie organickej hmoty a tak sa typické karotenoidové pásy prejavili silným signálom. Prejavili sa aj ďalšie pásy s hodnotami 1188 a 963  $\text{cm}^{-1}$ , ktoré sa pripisujú prítomnosti karotenoidov.

Spektrá B a C popisujú analýzu rias laboratórnym mikrospektrometrom priamo v zamrznutej vzorke snehu. Prejavili sa typické karotenoidové pásy (1520 - 1523, 1154 - 1158  $\text{cm}^{-1}$ ). Tretí typický pás pre karotenoidy sa v oblasti okolo 1000  $\text{cm}^{-1}$  neprejavil z dôvodu vysokého šumu. Koncentrácia meranej vzorky bola nižšia nakoľko sa jednalo o zamrznutú vzorku so snehom.

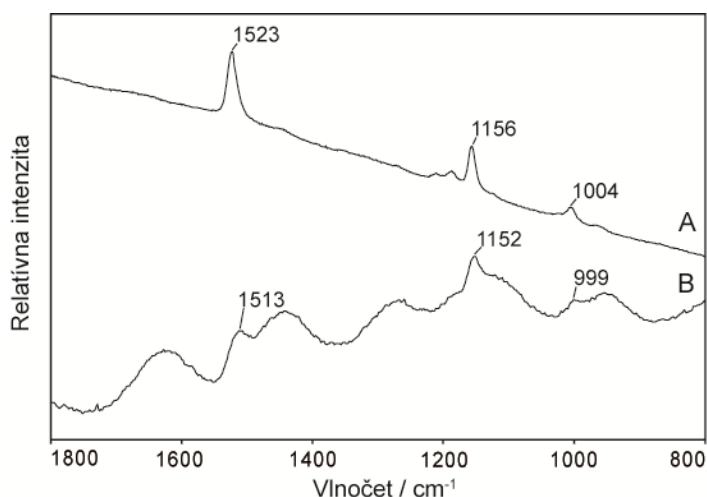


**Obr. 17** Spektrá psychrofilných rias namerané príručným spektrometrom ( $\lambda$  532 nm) v zmrznutom snehu. Výsledné spektrá druhov *Chloromonas nivalis* + *Chloromonas brevispina*.

Príručným spektrometrom ( $\lambda$  532 nm) sme preukázali prítomnosť karotenoidov priamo v teréne na reliktoch snehu v okolí meandrov rieky Labe. Spektrá reprezentujú tri rôzne miesta merania s obsahom rovnakých druhov organizmov. Hodnoty pásov (1515 - 1520, 1149 - 1159, 1006 - 1007  $\text{cm}^{-1}$ ) jasne definujú prítomnosť karotenoidov. Výrazný šum, spôsobený nízkou koncentráciou organizmov a prítomným snehom, eliminovali prejav pásu v oblasti okolo 1000  $\text{cm}^{-1}$  (spektrum D). Ďalšie pásy sa výrazne neprejavili.

### 11.3 Ramanova spektrometria vybraných druhov lišajníkov.

Na vybraných vzorkách lišajníkov sa nám pomocou Ramanových spektrometrov podarilo preukázať prítomnosť pigmentov karotenoidov. Vo výnimočných prípadoch sa prejavili signály ďalších metabolitov. Analyzované boli archívne vzorky a čerstvé vzorky odobrané priamo v teréne. Vzorky odobrané v teréne sme analyzovali príručným spektrometrom za suchých podmienok a následne po navlhčení, kvôli predpokladu spustenia metabolizmu organizmov a tým prejavu ďalších látok vo výsledných spektrách (napr. kyseliny produkované mykobiontom). Výsledné spektrá sú z väčšej časti meraní prejavom fotobionta a ich typických primárnych metabolitov (karotenoidov).



<i>Cladonia coniocraea</i>	
514 nm - A	532 nm - B
1523 s	1513 m
1156 s	1152 m
1004 m	999 w

**Tab. 12** Základné pásy lišajníka *Cladonia coniocraea*

**Obr. 18** Namerané spektrá lišajníka *Cladonia coniocraea* z archívnych zbierok. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm), B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm).

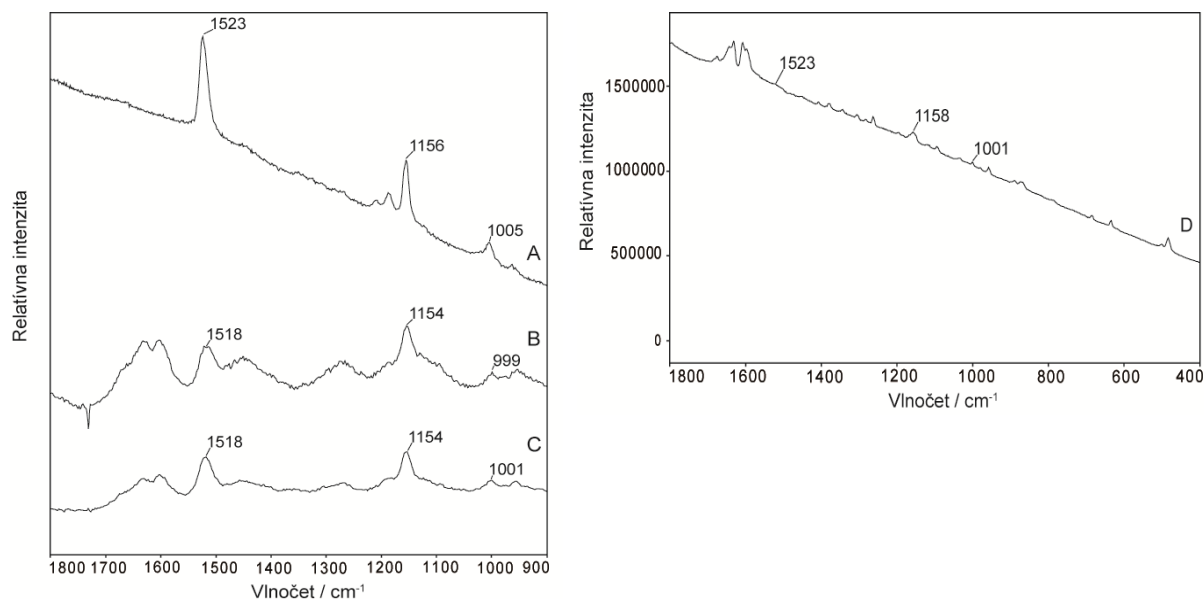
Laboratórny mikrospektrometer (spektrum A) identifikoval tri hlavné pásy karotenoidov (1523, 1156, 1004  $\text{cm}^{-1}$  -  $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ,  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ). Slabo sa prejavil pás s hodnotou 1187  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý sa priradzuje prítomnosti karotenoidov. Signál karotenoidov je v nameranom spektre pomerne slabý nakoľko sa jedná o archívnu vzorku, v ktorej neprebíha žiaden metabolizmus organizmu.

Príručný prístroj (spektrum B) identifikoval veľmi slabý signál hlavných pásov karotenoidov (1513, 1152, 999  $\text{cm}^{-1}$ ). Ďalšie pásy sa v spektre neprejavili. Signál je prekrytý vlnami, ktoré sú typické pre tento typ prístroja.



<i>Candelaria pacifica</i>				
514 nm - A, D		532 nm (suché) - B	532 nm (vlhké) - C	BRAVO - E
1523 vs	1523 w	1518 m	1518 s	1524 vs
1156 s	1158 s	1154 s	1154 s	1156 s
1005 m	1001 m	999 w	1001 w	1004 m

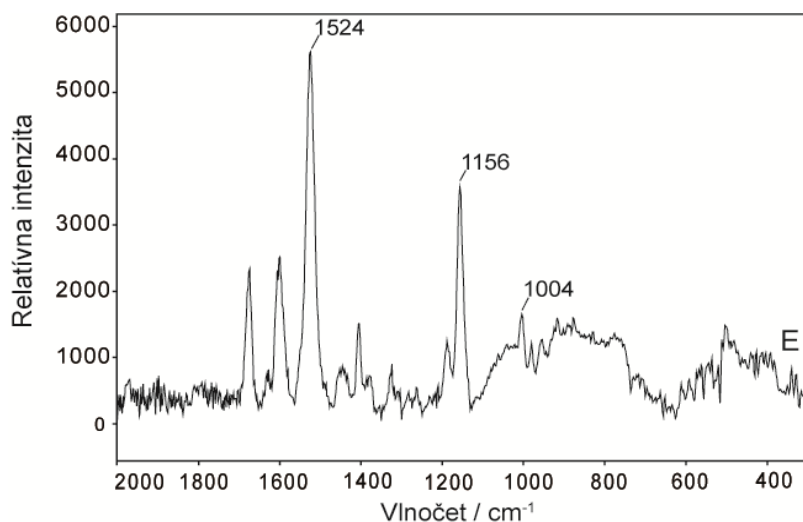
**Tab. 13** Základné pásy lišajníka *Candelaria pacifica*



**Obr. 19** Namerané spektrá lišajníka *Candelaria pacifica*. A, D - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm), B, C - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm).

Laboratórny spektrometer (spektrum A) spoľahlivo určil hlavné pásy karotenoidov ( $1523, 1156, 1005 \text{ cm}^{-1}$  -  $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ,  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ). Prítomnosť karotenoidov potvrdzujú aj slabšie pásy s hodnotami  $1187$  a  $963 \text{ cm}^{-1}$ , ktoré sú typické pre tento typ pigmentov. Posunutím analyzovaného miesta na povrchu lišajníku do oblasti, ktorá vykazovala jasne žltú farbu (spektrum D) sme znova určili tri hlavné pásy karotenoidov ( $1523, 1158, 1001 \text{ cm}^{-1}$ ). Prejavili sa tu silné pásy s hodnotami  $1632$  a  $1608 \text{ cm}^{-1}$ , ktoré nepatria hodnotám typickým pre karotenoidy. Tieto pásy sa prejavili silnejším signálom než karotenoidy, ktoré sa tu vyskytovali zrejme v menšej koncentrácii. Hodnoty týchto pásov môžu v porovnaní s literatúrou definovať prítomnosť kalycínu (diskutované v diskusii).

Príručný spektrometer (spektrá B a C) preukázali prítomnosť karotenoidov ( $1518, 1154, 999 - 1001 \text{ cm}^{-1}$ ). Slabým signálom sa prejavili pásy v rozsahu  $954 - 963 \text{ cm}^{-1}$ , ktoré sa pripisujú prítomnosti karotenoidov. Silným signálom sa prejavili netypické pásy karotenoidov v rozsahu  $1630 - 1634 \text{ cm}^{-1}$  a  $1602 - 1604 \text{ cm}^{-1}$ . Ďalej sú tieto hodnoty popísané v diskusii. Rozdiel medzi hodnotami pásov v prípade suchej a vlhkej vzorky nebol pozorovaný.

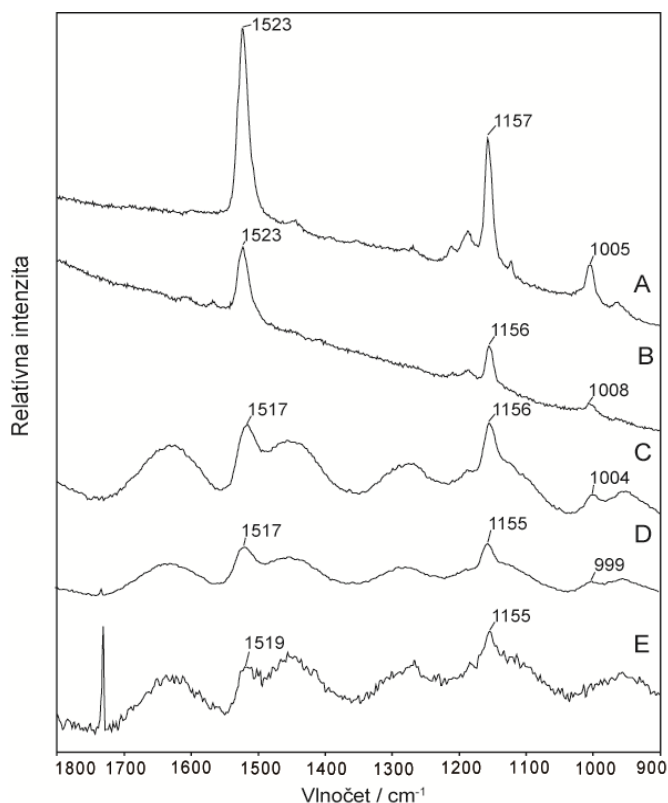


**Obr. 20** Namerané spektrum lišajníka *Candelaria pacifica*. E - príručný spektrometer ( $\lambda$  700 - 1100 nm).

Príručný spektrometer ( $\lambda$  700 - 1100 nm) nám v prípade spektra E preukázal prítomnosť karotenoidov ( $1524$ ,  $1156$  a  $1004$   $\text{cm}^{-1}$ ). Potvrzuje nám to aj prítomnosť pásu v oblasti  $1188$   $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je typický pre pigmenty tohto typu. Nakoľko tento prístroj pracuje s dvoma typmi laseru, došlo k prejavu látok netypických pre karotenoidy. Pásky  $1629$  a  $1605$   $\text{cm}^{-1}$ , ktoré sa prejavili silným signálom znova poukazujú na možnú prítomnosť proteínu kalycínu (diskutované v diskusii). Výrazne sa prejavil aj pás s hodnotou  $1446$   $\text{cm}^{-1}$ . Táto hodnota je ďalej diskutovaná.

<i>Cladonia digitata</i>				
514 nm - A, B		532 nm (suché) - C	532 nm (vlhké) - D, E	
1523 vs	(V) 1523 s	1517 m	1517 m	(V) 1519 w
1157 s	1156 m	1156 s	1155 m	1155 m
1005 m	1008 w	1004 w	999 vw	

Tab. 14 Základné pásy lišajníka *Cladonia digitata*



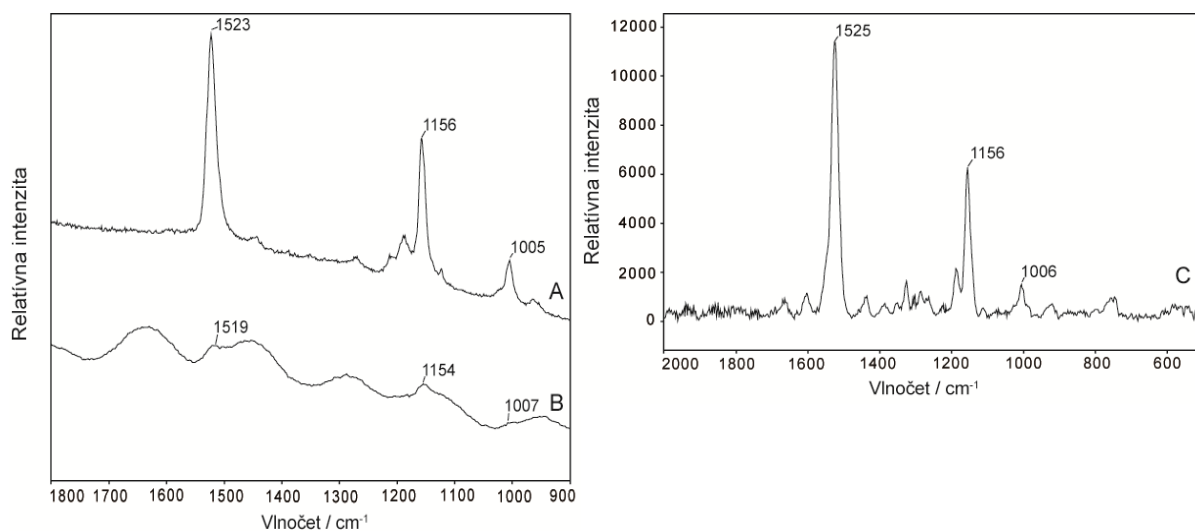
Obr. 21 Namerané spektrá lišajníka *Cladonia digitata*. A, B - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm). C, D, E - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm).

V prípade laboratórneho mikrospektrometra (spektrá A a B) sa prejavili tri typické pásy karotenoidov ( $1523, 1156 - 1157, 1005 - 1008 \text{ cm}^{-1}$  -  $\nu_1\text{C}=\text{C}, \nu_2\text{C}-\text{C}, \delta_3\text{C}=\text{CH}$ ). Pásy v oblasti  $1187$  a  $963 \text{ cm}^{-1}$  sú typické pre pigmenty tohto typu. Spektrum B sme namerali na sporangiu daného lišajníka. Napriek jeho sýto červenej farbe sa neprejavili pásy iných metabolitov. Ďalej je tento jav popísaný v diskusii.

Príručný spektrometer (spektrá C, D, E) dokázal prítomnosť karotenoidov ( $1517 - 1519, 1155 - 1156, 999 - 1004 \text{ cm}^{-1}$ ). Ďalšie pásy sa neprejavili. Vidíme typické vlny pre tento typ prístroja. Spektrum E patrí sporangiu lišajníka. Neprejavili sa v ňom pásy iných látok. Rozdiel výsledných hodnôt pásov medzi suchou a vlhkou vzorkou nebol významný.

<i>Pseudevernia furfuracea</i>		
514 nm - A	532 nm (vlhké) - B	BRAVO - C
1523 vs	1519 w	1525 vs
1156 s	1154 w	1156 s
1005 m	1007 vw	1006 m

Tab. 15 Základné pásy lišajníka *Pseudevernia furfuracea*



Obr. 22 Namerané spektrá lišajníka *Pseudevernia furfuracea*. A - laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm). B - príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm). C - príručný spektrometer ( $\lambda$  700 - 1100 nm).

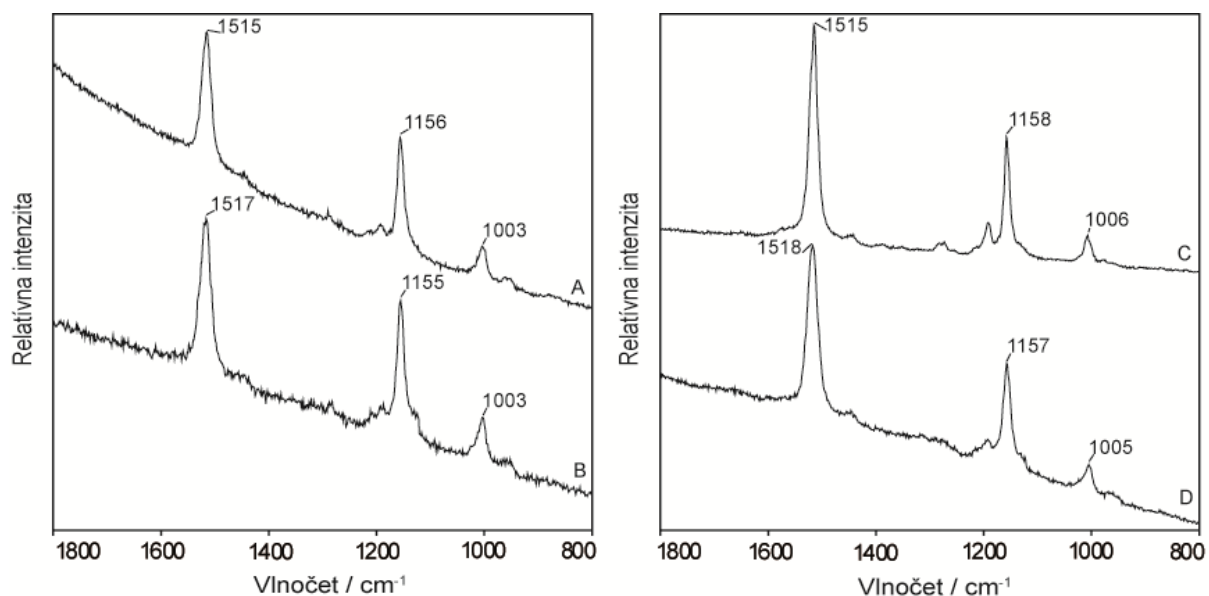
Použitím laboratórneho mikrospektrometra (spektrum A) sme preukázali prítomnosť karotenoidov, ktoré sa prejavili tromi výraznými pásmi (1523, 1156, 1005  $\text{cm}^{-1}$  -  $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ,  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ). Prítomnosť tohto typu pigmentov dokazujú aj slabšie pásy s hodnotami 1188 a 964  $\text{cm}^{-1}$ , ktoré sú prene typické.

Príručný spektrometer preukázal prítomnosť karotenoidov (spektrum B), ktoré sa prejavili tromi pásmi s veľmi slabým signálom (1519, 1154, 1007  $\text{cm}^{-1}$ ). Koncentrácia karotenoidov bola v tomto mieste merania zrejme veľmi malá. Typické vlny tohto typu prístroja prekrývajú slabý signál karotenoidov. Výsledné spektrum je z navlhčenej vzorky. V prípade suchej vzorky sa žiadne pásy neprejavili.

Použitím príručného spektrometra ( $\lambda$  700 - 1100 nm) sa v spektre C výrazne prejavili tri charakteristické pásy karotenoidov (1525, 1156, 1006  $\text{cm}^{-1}$ ). Typický pre prítomnosť karotenoidov je pás s hodnotou 1187  $\text{cm}^{-1}$ . Vďaka použitiu tejto vlnovej dĺžky došlo k prejavu pásov, ktoré niesú typické pre karotenoidy. V oblasti 1663, 1603 a 1326  $\text{cm}^{-1}$  sa prejavili pásy typické pre metabolity lišajníkov. Výraznejší je aj pás s hodnotou 1436  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je takisto netypický pre pigmenty typu karotenoidy, ale skôr sa pripisuje prejavu aminokyselín. Bližšie je popis vedľajších pásov rozvedený v diskusii. Pás s hodnotou 746  $\text{cm}^{-1}$  koreluje typicky s prítomnosťou chlorofylu.

## 11.4 Ramanova spektrometria vybraných frakcií pigmentov izolovaných pomocou metódy HPLC

Výsledné merania pigmentov siníc pomocou Ramanovej spektrometrie boli doplnené o analýzy frakcií pigmentov získaných pomocou metódy HPLC. Pigmenty boli extrahované zo sinice *Scytonema hyalinum* (TH02-NP) s pracovným označením TH a zo sinice *Scytonema* sp. (FM5-MK45) s pracovným označením FM. Výsledky analýz pigmentov Ramanovou spektrometriou sú doplnené o výsledné chromatogramy pigmentov oboch druhov siníc.



**Obr. 23** Namerané spektrá frakcií pigmentov pomocou laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm). Označenie vzoriek FM. Na základe retenčných časov určené ako: A - celkový extrakt bez frakcionácie, B - myxoxantofyl (ret. čas 14,376), C - astaxantín (20,034), D - kantaxantín (20,727).

Laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$ 514 nm). Označenie vzoriek: FM			
celkový extrakt (A)	myxoxantofyl (B)	astaxantín (C)	kantaxantín (D)
1515 s	1517 s	1515 s	1518 s
1156 s	1155 s	1158 s	1157 s
1003 m	1003 m	1006 m	1005 m

**Tab. 16** Základné hodnoty pásov frakcií pigmentov extrahovaných zo sinice *Scytonema* sp. Označenie vzoriek: FM. (Uvedené hodnoty vlnočtov odpovedajú meraniam na frakciách odpovedajúcich uvedeným karotenoidom).

Použitím laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm) sa nám v niektorých frakciách pigmentov podarilo s istotou identifikovať prítomnosť karotenoidov. Ich typické tri pásy odpovedajú vibračným módom  $\nu_1$ C=C,  $\nu_2$ C-C a  $\delta_3$ C=CH. Niektoré frakcie nebolo možné identifikovať pomocou Ramanovej spektrometrie. Koncentrácia izolovaného pigmentu bola v týchto prípadoch veľmi nízka.

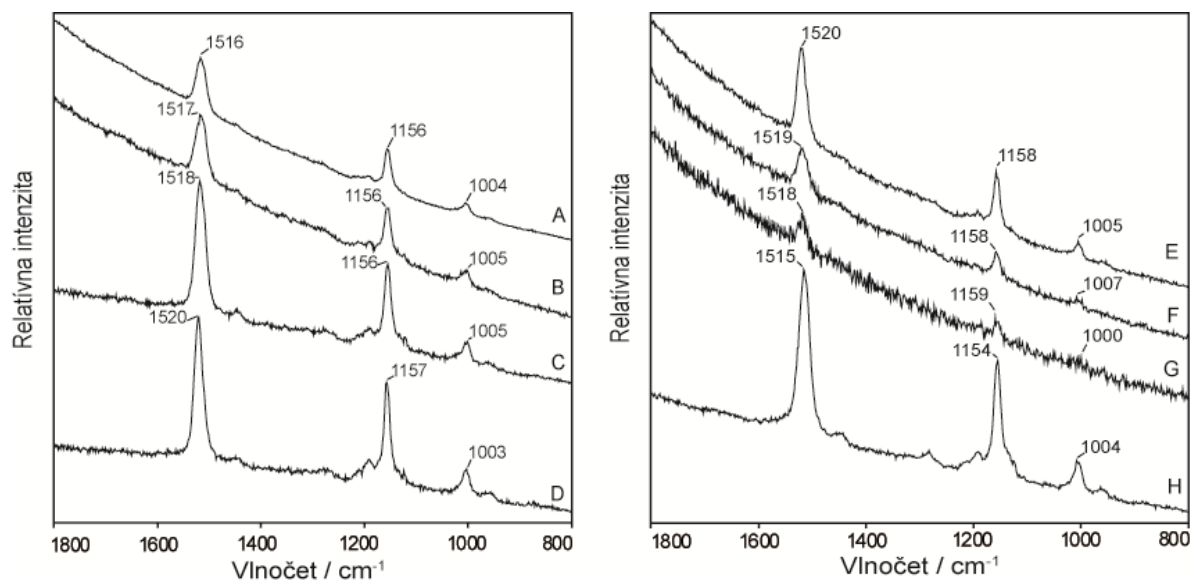
V spektre A sme namerali hodnoty 1515, 1156 a 1003  $\text{cm}^{-1}$ . Podľa výsledkov HPLC sa jedná o celkový extrakt pigmentov bez predošlej frakcionácie. S istotou sme určili prítomnosť karotenoidu. Odpovedajú tomu aj typické pásy karotenoidov v oblasti 1192 a 961  $\text{cm}^{-1}$ .

Spektrum B s hodnotami 1517, 1155 a 1003  $\text{cm}^{-1}$  nám potvrdilo znova prítomnosť karotenoidu. Podľa výsledkov analýz HPLC by sa malo jednať o myxoxantofyl. Slabo sa prejavil pás s hodnotou 1187  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý definuje prítomnosť karotenoidu.

Laboratórny mikrospektrometer nameril silný signál karotenoidov aj v spektre C (1515, 1158, 1006  $\text{cm}^{-1}$ ). Prítomnosť karotenoidov dokazujú aj pásy s hodnotami 1276 a 1191  $\text{cm}^{-1}$ . Silný signál karotenoidu je daný jeho vyššou koncentráciou. Podľa analýzy HPLC by sme mali očakávať prítomnosť astaxantínu.

Spektrum D by malo podľa HPLC reprezentovať prítomnosť kantaxantínu. My sme namerali hodnoty 1518, 1157 a 1005  $\text{cm}^{-1}$ . Tie dokazujú prítomnosť karotenoidov. Potvrďuje to aj slabý pás s hodnotou 1192  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je typický pre skupinu pigmentov karotenoidy.

Bližšia identifikácia pigmentov pomocou Ramanovej spektrometrie nebola možná. S ohľadom na značnú podobnosť jednotlivých karotenoidov sú takisto polohy Ramanových pásov značne podobné a často se nedarí jednoznačne jednotlivé karotenoidy rozlíšiť. Vplyv na pozorovaný posun môže mať aj možná kontaminácia frakcie karotenoidu iným karotenoidom. Účinitejšia v tomto smere sa javí metóda HPLC. Bližšie je táto tematika popísaná v diskusii.



**Obr. 24** Namerané spektrá frakcií pigmentov pomocou laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm). Označenie vzoriek TH. Na základe retenčných časov určené ako: A - celkový extrakt bez frakcionácie, B - myxoxantofyl (ret. čas 14,378), C - kantaxantín (20,762), D - echinenón (24,898), E - chlorofyl *a* + neznámy karotenoid (26,26), F - astaxantín (20,063), G -  $\beta$ -karotén (28,339), H - karoteniod X (10,502).

Laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$ 514 nm). Označenie vzoriek: TH			
celkový extrakt (A)	myxoxantofyl (B)	kantaxantin (C)	echinenón (D)
1516 s	1518 s	1518 s	1520 s
1156 s	1156 s	1156 s	1157 s
1004 m	1005 m	1005 m	1003 m
chlorofyl a + neznámy karotenoid (E)	astaxantin (F)	B, $\beta$ -carotene (G)	karotenoid X (H)
1520 s	1519 s	1518 m	1515 s
1158 s	1158 m	1159 m	1154 s
1005 m	1007 w	1000 vw	1004 m

**Tab. 17** Základné hodnoty pásov frakcií pigmentov extrahovaných zo sinice *Scytonema hyalinum*. Označenie vzoriek: TH. (Uvedené hodnoty vlnočtov odpovedajú meraniam na frakciách odpovedajúcich uvedeným karotenoidom).

V extrahovaných frakciách pigmentov sa nám pomocou Ramanovej spektrometrie podarilo preukázať prítomnosť karotenoidov. Niektoré frakcie sa nepodarilo namerať. Dôvod môže byť nízka koncentrácia karotenoidu vo vzorke. Pri dostatočnej koncentrácii sa prejavili aj ďalšie slabšie pásy, ktoré nám prítomnosť karotenoidu vo vzorke potvrdili.

Laboratórnym spektrometrom ( $\lambda$  514 nm) sme v spektre A identifikovali tri hlavné pásy karotenoidov (1516, 1156, 1004  $\text{cm}^{-1}$  -  $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ,  $\nu_2\text{C}-\text{C}$  a  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ). Vzorka obsahovala celkový extrakt pigmentov sinice bez ďalšej frakcionácie. Vedľajšie pásy karotenoidov sa prejavili veľmi slabým signálom, ktorému bolo obtiažne určiť presnú hodnotu.

V spektre B sme namerali hodnoty karotenoidových pásov 1517, 1156 a 1005  $\text{cm}^{-1}$ . Podľa výsledkov HPLC sa jedná o myxoxantofyl. Veľmi slabým signálom sa prejavil pás s hodnotou 1190  $\text{cm}^{-1}$ . Tento pás sa pripisuje prítomnosti karotenoidov.

V spektre C sme určili hlavné karotenoidové pásy ako 1518, 1156 a 1005  $\text{cm}^{-1}$ . Analýza HPLC určila vzorku ako kantaxantin. Slabo sa previli pásy v oblasti 1447 a 1193  $\text{cm}^{-1}$ . Tieto pásy sa pripisujú prítomnosti karotenoidov a iných produktov metabolizmu.

Spektrum D s hodnotami pásov (1520, 1157, 1003  $\text{cm}^{-1}$ ) nám dokazuje prítomnosť karotenoidu. Analýza HPLC identifikovala tento pigment ako echinenón. Prejavil sa aj pás s hodnotou 1191  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý sa pripisuje prítomnosti karotenoidov.

V spektre E sme identifikovali tri hlavné pásy karotenoidov (1520, 1156, 1005  $\text{cm}^{-1}$ ). Analýza HPLC určila tento pigment ako chlorofyl a + neznámy karotenoid. Typické pásy chlorofylu sa v Ramanovom spektre neprejavili. Slabý pás s hodnotou 1192  $\text{cm}^{-1}$  nám ale dokazuje prítomnosť bližšie nešpecifikovaného karotenoidu.

Spektrum F s hodnotami hlavných pásov 1519, 1158 a 1007  $\text{cm}^{-1}$  dokazuje prítomnosť troch hlavných pásov karotenoidov. Analýza HPLC určila karotenoid ako astaxantin. Ďalšie pásy karotenoidov sa v tomto spektre neprejavili. Pigment sa tu vyskytuje zrejme v malej koncentrácii.

V spektre G sme určili hodnoty troch hlavných pásov karotenoidov ako 1518, 1159 a 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Analýza HPLC určila pigment ako  $\beta$ -karotén. Žiadne vedľajšie pásy typické pre karotenoidy sa neprejavili. Koncentrácia pigmentu vo vzorke bola kvôli slabému signálu veľmi nízka.

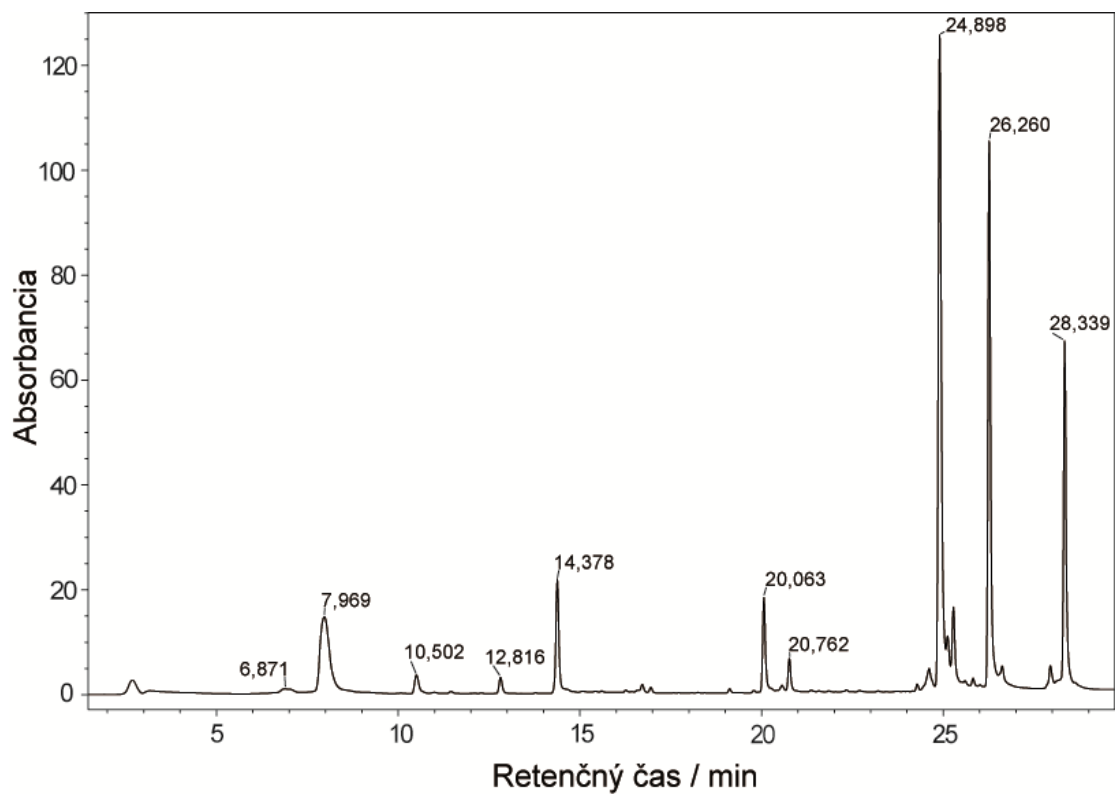
Spektrum H s hodnotami hlavných karotenoidových pásov 1515, 1154 a 1004  $\text{cm}^{-1}$  nám dokazuje prítomnosť tohto typu pigmentov. Analýza HPLC nám určila pigment ako neznámy karotenoid X. Vysoká koncentrácia tohto karotenoidu odhalila aj vedľajšie pásy typické pre karotenoidy a iné produkty metabolizmu s hodnotami 1447, 1282, 1190 a 961  $\text{cm}^{-1}$ .

Bližšia identifikácia pigmentov pomocou Ramanovej spektrometrie nebola možná. S ohľadom na značnú podobnosť jednotlivých karotenoidov sú takisto polohy Ramanových pásov značne podobné a často se nedarí jednoznačne jednotlivé karotenoidy rozlíšiť. Vplyv na pozorovaný posun môže mať aj možná kontaminácia frakcie karotenoidu iným karotenoidom. Účinejšia v tomto smere sa javí metóda HPLC. Bližšie je táto tematika popísaná v diskusii.

### **11.5 Výsledné analýzy frakcií pigmentov siníc pomocou metódy HPLC.**

Ako zrovnávací metóda s Ramanovou spektrometriou bola použitá vysoko účinná kvapalinová chromatografia. Pomocou tejto metódy sme získali frakcie pigmentov siníc, ktoré boli následne analyzované Ramanovým spektrometrom. V prípade identifikácie typu pigmentu sa metóda HPLC javí ako vhodnejší nástroj na analýzu. Pigmenty boli extrahované z dvoch druhov siníc: *Scytonema hyalinum* (TH02-NP) s pracovným označením TH a zo sinice *Scytonema* sp. (FM5-MK45) s pracovným označením FM. Metóda HPLC nám poukázala na rôznorodosť pigmentov vo vybraných druhoch siníc. Kapitola je doplnená o výsledné chromatogramy extraktov. Posúdenie retenčných časov umožňuje určenie jednotlivých pigmentov.

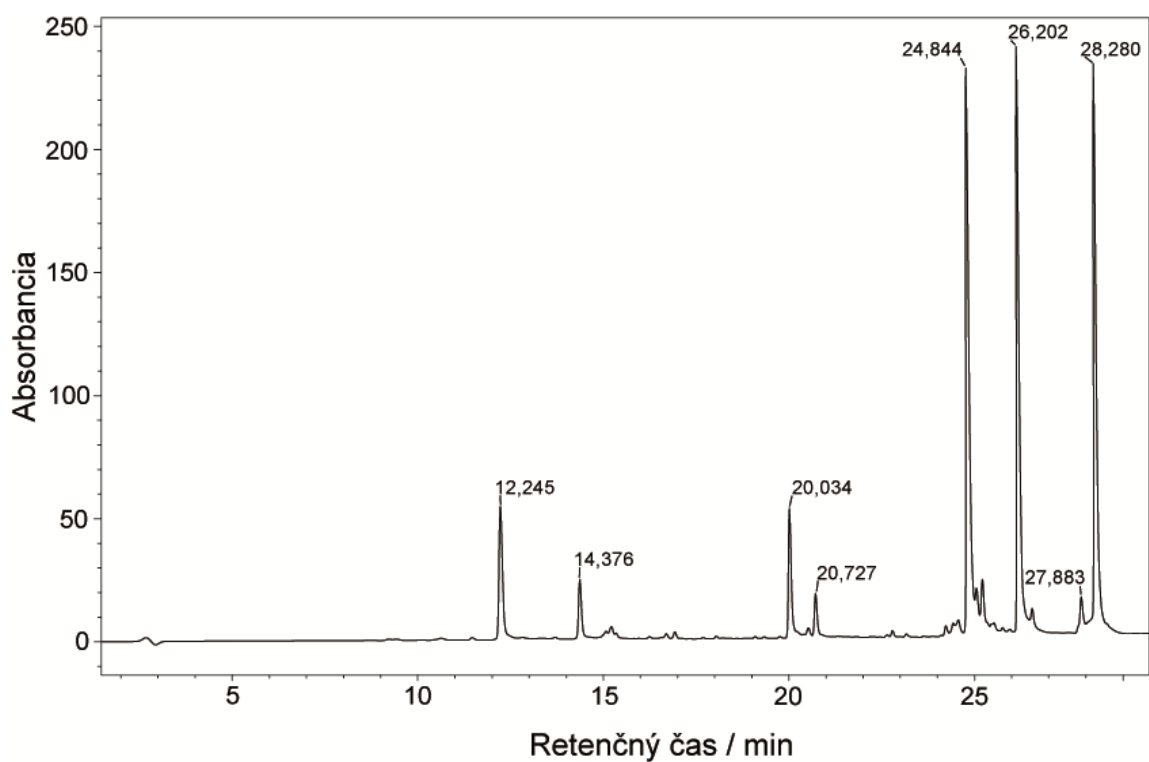




**Obr. 25** Chromatogram sinice *Scytonema hyalinum* (TH). Pigmenty odpovedajúce príslušným retenčným časom sú popísané v tabulke č. 18.

Frakcie pigmentov. Označenie vzoriek: TH	
Pigment	Retenčný čas / min
neznámy pigment	6,871
neznámy pigment	7,969
karotenoid X	10,502
karotenoid X	12,816
myxoxantofyl	14,378
astaxantin	20,063
kantaxantin	20,762
echinenón	24,898
chlorofyl <i>a</i> + karotenoid	26,26
B, $\beta$ -karotén	28,339

**Tab. 18** Extrahované pigmenty sinice *Scytonema hyalinum* (TH) a ich retenčné časy.



**Obr. 26** Chromatogram sinice *Scytonema* sp. (FM). Pigmenty odpovedajúce príslušným retenčným časom sú popísané v tabulke č. 19.

Frakcie pigmentov. Označenie vzoriek: FM	
Pigment	Retenčný čas / min
rozličné formy myxoxantofylu	12,245
myxoxantofyl	14,376
astaxantin	20,034
kantaxantin	20,727
echinenón	24,844
chlorofyl <i>a</i>	26,202
feofytin s $\beta$ -karoténom	27,883
B, $\beta$ -karotén	28,28

**Tab. 19** Extrahované pigmenty sinice *Scytonema* sp. (FM) a ich retenčné časy.

## 12.0 DISKUSIA

Diskusia poskytuje zhrnutie výsledných meraní Ramanovou spektrometriou pre vybrané druhy organizmov. Následne porovnáva limity v identifikácii významných biomarkerov pomocou prenosných, príručných a laboratórnych spektrometrov. Získané výsledky meraní porovnáva s výsledkami analýzy HPLC.

Analyzá jednotlivých karotenoidov sa nám značne komplikovala, nakoľko všetky vybrané druhy organizmov pre túto prácu produkujú zložené zmesi karotenoidov. Štruktúrne vzorce jednotlivých karotenoidov sú veľmi podobné a tak sa vo výsledných spektrách prejavujú malými odchýlkami, ktoré je obtiažne rozlíšiť. Napriek tomu sa nám vo všetkých prípadoch podarilo preukázať účinnosť Ramanovej spektrometrie pri detekcii týchto významných biomarkerov.

V prípade psychrofylných siníc sme mohli predpokladať prítomnosť pigmentu scytonemínu (Wilson *et al.*, 2007). Tento pigment je typicky produkovaný v stresových podmienkach za zvýšeného UV žiarenia ako mechanizmus ochrany proti tomuto žiareniu. Sinice sa zrejme nenachádzali v podmienkach, kedy bolo nutné produkovať tento pigment. Hlavné pásy tohto pigmentu určili ako 1595, 1154 a 1173  $\text{cm}^{-1}$  (Edwards *et al.*, 2000). Typicky sa môže tento pigment prejavovať pri vlnovej dĺžke 785 nm. V našich výsledkoch sa jeho typické pásy neprejavili.

Použitím laboratórneho mikrospektrometra sme namerali najreprezentatívnejšie spektrá karotenoidov. Napriek tomu je bližšia identifikácia konkrétneho karotenoidu prakticky nemožná. Rozptyl hodnôt jednotlivých pásov je tak výrazný, že snaha o identifikáciu karotenoidu by nemala zmysel. Pri tejto vlnovej dĺžke ( $\lambda$  532 nm) a vďaka technickým vlastnostiam tohto prístroja (rozlíšenie, mikroskop ...) sa prejavili aj slabšie pásy. Prejavili sa vo všetkých troch druhoch siníc (*Calothrix elsteri*, *Phormidermis priestleyi*, *Phormidium*). Pásy v oblasti 1443 - 1445  $\text{cm}^{-1}$  môžu podľa literatúry odpovedať prítomnosti karbohydrátov, proteínov a lipidov (Goodwin *et al.*, 2006 - 1448  $\text{cm}^{-1}$   $\delta(\text{CH}_2)$ ). Slabšie pásy v oblasti 961 - 962  $\text{cm}^{-1}$  sú typické pre prítomnosť karotenoidov (Goodwin *et al.*, 2006 - 961  $\text{cm}^{-1}$  (C-H)). Ďalším typickým prejavom karotenoidov vo výsledných spektrách sú pásy v oblasti 1185 - 1193  $\text{cm}^{-1}$  (Nakamura *et al.*, 2001 definuje pre tento typ pigmentov rozsah pásov ako 1100 - 1200  $\text{cm}^{-1}$ ). V prípade sinice *Phormidium* sa prejavili výraznejšie pásy v oblasti okolo 1434  $\text{cm}^{-1}$ , ktoré môžu reprezentovať prítomnosť aminokyselín ako glutamát (Vítek *et al.*, 2013). V rozsahu 1386 - 1389  $\text{cm}^{-1}$  sa prejavujú pásy, ktoré sú takisto typické pre aminokyseliny ako L-prolin (De Gelder *et al.*, 2007). Slabé pásy v rozsahu 1283 - 1286  $\text{cm}^{-1}$  reprezentujú podľa Vítka *et al.*, 2013 prítomnosť fykobiliproteínov.

V prípade príručného spektrometra ( $\lambda$  532 nm) sa vo výsledných spektrách prejavili len typické pásy karotenoidov. Tento prístroj má oproti laboratórnemu nižšie rozlíšenie a tak je detekcia vedľajších pásov karotenoidov alebo iných látok netypických pre karotenoidy veľmi obtiažna. Navyše ak sa tieto látky vyskytujú v nízkej koncentrácii v mieste, ktoré analyzujeme, je signál obtiažne detegovať. V prípade sinice *Phormidium* sa týmto prístrojom nepodarilo detegovať žiadny signál karotenoidov, kvôli prítomnosti fluorescencie. Tá prekryla slabý signál karotenoidov.

Použitím prenosného spektrometra ( $\lambda$  785 nm) došlo k potlačeniu rezonančného zosilnenia signálu karotenoidov a tak sa nám prejavili aj iné pásy s vyššou intenzitou. Typicky sa pri tejto vlnovej dĺžke prejavil pás v rozsahu 741 - 742  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý sa pripisuje prítomnosti chlorofylu (Vítek *et al.*, 2010 - 745  $\text{cm}^{-1}$ ).

Analyzovali sme aj skupinu psychrofylných rias. Merania sme uskutočnili priamo v teréne a následne na laboratórnom mikrospektrometri za laboratórnych podmienok. V oboch prípadoch sme preukázali účinnosť Ramanovej spektrometrie v identifikácii karotenoidov ako významných biomarkerov. Na reliktoch snehu pri meandri rieky Labe sme analyzovali zmes druhov *Chloromonas nivalis* a *Chloromonas brevispina*. Prítomné boli ich bičíkaté štádiá a takisto spóry. Pre tieto druhy rias je typická produkcia ochranného UV pigmentu astaxantínu (Remias *et al.*, 2010). Hlavné pásy

astaxantínu určili pri meraní na prírodných vzorkách ako 1520, 1160 a 1005  $\text{cm}^{-1}$  (Maia *et al.*, 2014). Tento pigment je produkovaný v určitých cistálnych vývojových štádiách a nám sa jeho prítomnosť nepodarila definitívne preukázať, respektíve sa nachádzal vo vzorkách vo veľmi malom množstve. Napriek tomu dochádza v týchto organizmoch aj k produkcii iných ochranných pigmentov (Remias *et al.*, 2010 - chlorofyl *b*, luteín,  $\beta$ -karotén, VAZ pigmenty). Pre tieto zeleno-žlté vývojové štádiá je typická väčšia produkcia  $\beta$ -karoténu.

Laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514 nm) poskytol najdokonalejšie spektrum rias. Po odfiltrovaní prebytočného snehu sme získali čistú biomasu, čím sme sa zbavili prejavu výrazného šumu. Vďaka mikroskopu a kamere sme boli schopní analyzovať miesto z najväčšou koncentráciou zelenej biomasy. Zásluhou toho sa nám vo výslednom spektre prejavili aj vedľajšie pásy karotenoidov s hodnotami 1188 a 963  $\text{cm}^{-1}$ . Týmto prístrojom sme analyzovali aj zamrznutú vzorku, v ktorej bola koncentrácia rias náhodná a tomu zodpovedá aj výrazný šum, ktorý sa prejavil vo výsledných spektrách. Napriek tomu sa vďaka rezonančnému zosilneniu signálu karotenoidov, ku ktorému dochádza pri použití tejto vlnovej dĺžky, výrazne prejavili dva pásy typické pre tieto pigmenty ( $\nu_1\text{C}=\text{C}$  a  $\nu_2\text{C}-\text{C}$ ). Tretí pás karotenoidov ( $\delta_3\text{C}=\text{CH}$ ) bol prekrytý šumom. Tento šum bol spôsobený prítomnosťou snehu, ktorý sa pri teplote laboratória a teplote lasera začínal topiť. Mohlo dochádzať k posunu ohniskovej vzdialenosti.

Príručným spektrometrom ( $\lambda$  532 nm) sme previedli merania priamo v teréne a tým sme dokázali účinnosť týchto prístrojov pri identifikácii karotenoidov. Na troch rôznych miestach sme namerali hlavné pásy karotenoidov. Nakoľko sme riasy merali priamo na snehu, znova bol viditeľný šum. V závislosti na koncentrácii biomasy vidíme rozdiely v intenzite nameraných pásov. Pri vyššom počte akumulácii (10) došlo k miernej redukcii šumu. Vedľajšie pásy pripisované prítomnosti karotenoidov sa neprejavili. Paradoxne sme preukázali, že príručný spektrometer poskytol lepšie výsledky pri meraní zamrznutých vzoriek. Spôsobené to je zrejme faktom, že prístroj má menšie rozlíšenie a tak zaberá väčšiu plochu. Výsledné hodnoty karotenoidových pásov vykazovali nesystematický posun, ktorý sa niekedy prejaví pri tomto type prístroja (štandarde je daný rozptyl od výrobcu 3 - 5  $\text{cm}^{-1}$ ). Použitím počítačového programu (peak fitting) sa tento jav dá sčasti eliminovať. Presná identifikácia typu karotenoidu napriek tomu nie je možná.

Prítomnosť karotenoidov sme dokázali aj na vzorkách lišajníkov, ktoré neboli zvolené podľa kľúča. Napriek tomu sme prepokladali prítomnosť týchto pigmentov kvôli symbióze s fotobiontom, ktorý tieto látky produkuje. Identifikovali sme signál aj iných látok, ktoré sú typické pre metabolizmus lišajníkov. Použili sme archívne a čerstvé vzorky. Čerstvé vzorky sme analyzovali ako suché a následne ako navlhčené za predpokladu, že sa spustí metabolizmus organizmu a prejaví sa vo výsledných spektrách výrazne aj iné metabolity.

Vo vzorke lišajníka *Cladonia coniocraea* (archív) sme pomocou laboratórneho spektrometra ( $\lambda$  514 nm) preukázali prítomnosť karotenoidových pásov. Tie sa tu nachádzali v nižšej koncentrácii než u čerstvých vzoriek a tak sa prejavili slabšou intenzitou. Prejavil sa aj pás s hodnotou 1187  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je typickým vedľajším pásom pre karatenoidy. Príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm) takisto preukázal prítomnosť karotenoidov. Tie sa v tomto prípade prejavili veľmi slabým signálom, ktorý bol výrazne prekrytý vlnami, ktoré sa prejavujú typicky pre tento typ prístroja v prípade nízkej koncentrácie pigmentu. Podľa literatúry by sme v rode *Cladonia* mohli očakávať pásy usnovej kyseliny (Liao *et al.*, 2010). Tu určili hlavné pásy usnovej kyseliny ako 1629, 1537 a 1191  $\text{cm}^{-1}$ . V našich výsledkoch sa prítomnosť tejto látky neprejavila.

V lišajníku *Candelaria pacifica* sme znova identifikovali tri hlavné pásy patriace karotenoidom. Laboratórny mikrospektrometer ( $\lambda$  514) nám poskytol veľmi jasné spektrum karotenoidov, v ktorom sa prejavili aj veľajšie pásy typické pre tieto pigmenty v oblasti 1187  $\text{cm}^{-1}$  a 963  $\text{cm}^{-1}$ . Previedli sme aj meranie, kde sme sa sústredili na miesto s vysokou koncentráciou žltej farby a dokázali sme

prítomnosť inej látky než karotenoidu. Táto látka prekryla svojou intezitou hlavné karotenoidové pásy, ktoré sa v tomto spektre prejavili veľmi slabými signálmi. Hodnoty výrazných pásov tejto látky boli 1632 a 1608  $\text{cm}^{-1}$ . Podľa literatúry by mohli definovať prítomnosť kalycínu. V práci Fernandes *et al.*, 2015 analyzovali vybrané druhy rodu *Candelaria* a určili pre kalycín pásy 1631 a 1604  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu\text{C}=\text{C} + \nu\text{C}-\text{C}$  dilatón a  $\nu\text{C}=\text{C} + \nu\text{C}-\text{C} + \delta\text{CH}$ ). Odchyľky v hodnotách hlavných pásov tohto proteínu v porovnaní s literatúrou môžu byť spôsobené tým, že sme identifikovali derivát kalycínu.

Príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm) identifikoval hlavné pásy karotenoidov a navyše sa prejavili aj pásy v rozsahu 1630 - 1634 a 1602 - 1604  $\text{cm}^{-1}$ , ktoré môžu znova reprezentovať prítomnosť proteínu kalycínu. Dokázali sme, že táto látka sa vyskytuje v rôznych miestach danej vzorky vo vysokej koncentrácii. V rozsahu 954 - 963  $\text{cm}^{-1}$  sa nám v spektrách prejavuje slabý pás, ktorý sa priradzuje prítomnosti karotenoidov (Goodwin *et al.*, 2006 - 961  $\text{cm}^{-1}$  (C-H)). Rozdiely výsledných hodnôt pásov medzi suchou a navlhčenou vzorkou neboli pozorované.

Analýza lišajníka *Candelaria pacifica* bola doplnená o merania príručným spektrometrom ( $\lambda$  700 - 1100 nm), ktorý má v sebe zabudovanú funkciu vylepšenia spektier a dokáže potlačiť napríklad prejav fluorescencie. Preto vidíme vo výslednom spektre aj prejav iných pásov než karotenoidových. Znova sme dokázali prítomnosť karotenoidov čo nám potvrdzuje pás v oblasti 1188  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je typický pre pigmenty tohto typu. Pásy 1629 a 1605  $\text{cm}^{-1}$  znova poukazujú na možnú prítomnosť proteínu kalycínu. Výrazne sa prejavil aj pás s hodnotou 1446  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý by mohol odpovedať prítomnosti karbohydrátov, proteínov a lipidov (Goodwin *et al.*, 2006 - 1448  $\text{cm}^{-1}$   $\delta(\text{CH}_2)$ ).

Analýzou lišajníka *Cladonia digitata* sme pomocou laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm) získali veľmi reprezentatívne spektrá, ktoré nám s istotou preukázali prítomnosť hlavných karotenoidových pásov. Potvrdzuje nám to aj prítomnosť pásov v oblasti 1188 a 963  $\text{cm}^{-1}$ .

Príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm) preukázal prítomnosť karotenoidov vo všetkých meraniach. Ďalšie pásy sa neprejavili. Rozdiel medzi suchou a navlhčenou vzorkou nebol pozorovaný.

V prípade tohto druhu lišajníka sme mali k dispozícii sporangium, ktoré sme mohli bližšie analyzovať. Sporangium malo sýto červenú farbu. V tomto prípade by sme mohli predpokladať prítomnosť atranorínu (Kosanić *et al.*, 2014), ktorý by v rode *Cladonia* mal byť prítomný a táto červená farba by mohla reprezentovať jeho prítomnosť. V porovnaní s prácou Edwards *et al.*, 1997, kde identifikovali hlavné pásy atranorínu (1674 s, 1629, 1605 s, 1453, 1406 s, 1379, 1311, 1281, 1115, 1033, 1000, 980, 956, 869, 826, 743 m, 704, 615, 503, 303) sa pomocou našich spektrometrov nepodarilo preukázať prítomnosť tejto látky. V rode *Cladonia* by sme podľa literatúry mohli očakávať prítomnosť usnovej kyseliny (Liao *et al.*, 2010). Nám sa pomocou našich spektrometrov nepodarilo túto látku identifikovať.

V lišajníku *Pseudevernia furfuracea* sa nám pomocou laboratórneho mikrospektrometra ( $\lambda$  514 nm) podarilo identifikovať silný signál hlavných karotenoidových pásov, ktorý nám potvrdzuje aj pás s hodnotou 1188  $\text{cm}^{-1}$ , ktorý je typický pre pigmenty tohto typu.

Príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm) nameral veľmi slabé pásy karotenoidov, ktoré boli prekryté vlnami, ktoré sa pri tomto type prístroja prejavujú. V prípade suchej vzorky sa žiadne pásy vo výslednom spektre neprejavili.

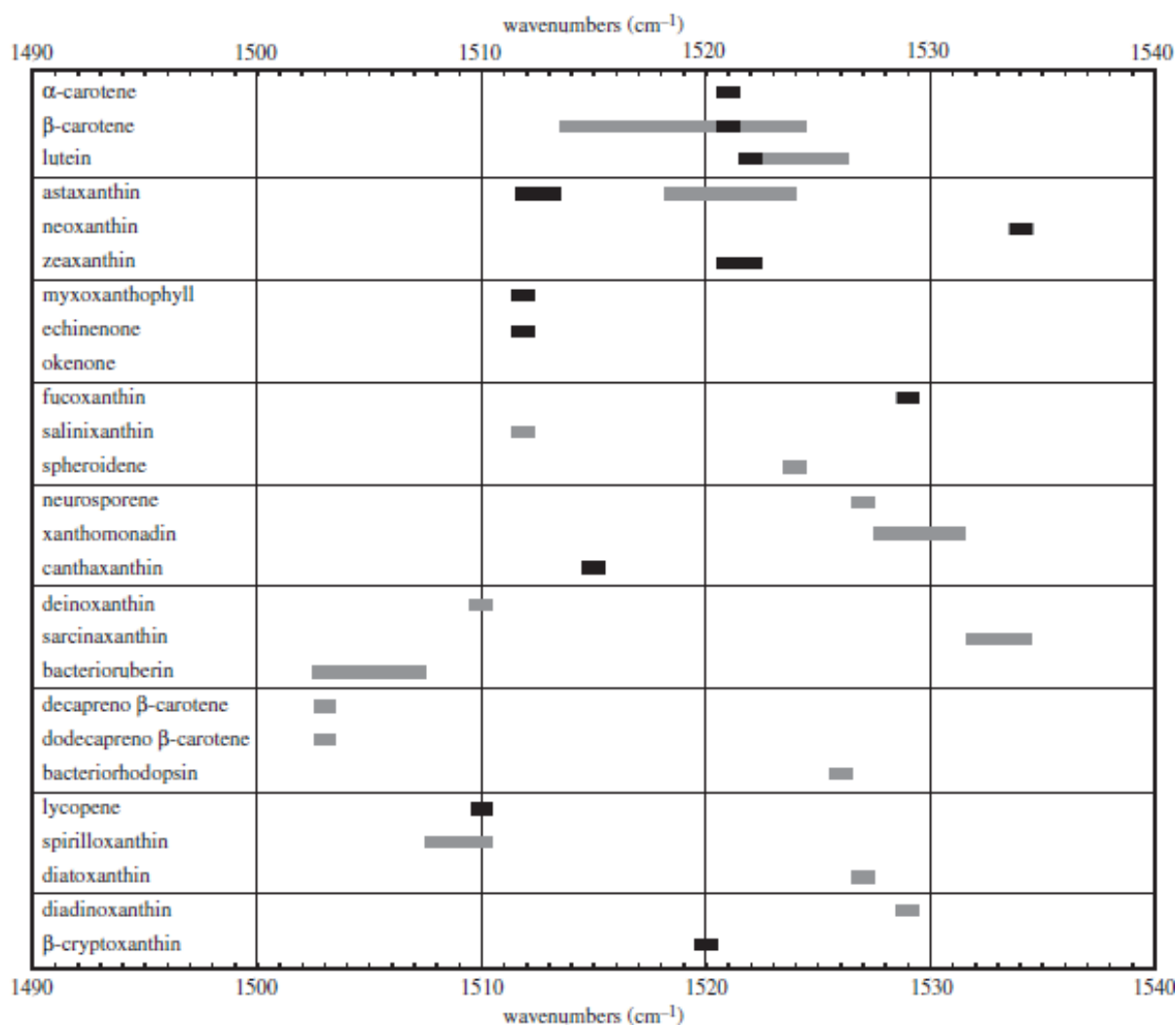
Použitím príručného spektrometra ( $\lambda$  700 - 1100 nm) sa nám vo výslednom spektre prejavili aj iné pásy, okrem hlavných karotenoidových. V prípade lišajníka *Pseudevernia furfuracea* by sme podľa literatúry mohli očakávať prítomnosť atranorínu (Proksa *et al.*, 1994). Tejto skutočnosti by zodpovedala aj hodnota peaku v oblasti 1663  $\text{cm}^{-1}$ . V porovnaní s literatúrou (Edwards *et al.*, 2003b), ktorý mu pripisuje hodnotu hlavného pásu 1666  $\text{cm}^{-1}$ . Naproti tomu rizokarpickej kyseliny, ktorá je takisto súčasťou metabolizmu mnohých lišajníkov, pripisuje hodnotu hlavných pásov 1668 a 1608  $\text{cm}^{-1}$ .

Tieto hodnoty by mohli korelovať s našou hodnotou 1663 a 1603  $\text{cm}^{-1}$ . V práci Villar a Edwards, 2006 popisujú hodnoty hlavného pásu atranorínu ako 1666  $\text{cm}^{-1}$  a rizokarpickej kyseliny ako 1665  $\text{cm}^{-1}$ . Naše ďalšie pásy v oblasti 1603 a 1326  $\text{cm}^{-1}$  by mohli korelovať s pásmi usnovej kyseliny, ktorých hodnotu hlavných peakov popísal Villar a Edwards, 2010 ako 1604 a 1324  $\text{cm}^{-1}$ . Hodnota pásu 746  $\text{cm}^{-1}$  by mohla odpovedať prítomnosti chlorofylu (Villar a Edwards, 2006 - 744  $\text{cm}^{-1}$ ). Naš ďalší výraznejší pás s hodnotou 1436  $\text{cm}^{-1}$  by mohol reprezentovať Ramanovský prejav aminokyselín ako glutamát (Vítek *et al.*, 2013).

Táto práca bola doplnená o analýzy frakcií pigmentov, získaných z extraktov siníc pomocou metódy HPLC. Zrovnanie výsledkov z oboch metód nám ukazuje, že chromatografia nám umožňuje detekciu jednotlivých karotenoidov a iných pigmentov. Ramanova spektrometria nám túto možnosť neposkytuje nakoľko analyzované organizmy obsahujú komplexné zloženie karotenoidov, ktoré sú si štruktúrne veľmi podobné. Bližšia identifikácia takýchto látok vyžaduje prípravu vzoriek do extraktov a následnú analýzu. Napriek tomu sa nám vo väčšine frakcií podarilo namerať hlavné pásy karotenoidov. V niektorých prípadoch sa identifikácia prítomnosti karotenoidov nepodarila, nakoľko sa daný pigment vyskytoval vo vzorke vo veľmi malej koncentrácii. Malá koncentrácia spôsobila v niektorých spektrách veľmi nízke intenzity pásov karotenoidov.

Všetky organizmy skúmané v tejto práci produkujú veľmi komplexné zloženie karotenoidov a iných pigmentov a takisto mnoho vedľajších látok, ktoré nemajú súvislosť s karotenoidmi (ako napríklad kyseliny lišajníkov). Pigmenty typu karotenoidov sa odlišujú v počte dvojitých väzieb v konjugovanom reťazci. Tieto odlišnosti sú natoľko malé, že sa prejavujú nepatrným posunom hodnôt hlavných pásov. Hlavne vibračného módu  $\nu_1\text{C}=\text{C}$ . Zmeny hodnôt tohto pásu sa môžu prezentovať aj v rámci jedného druhu karotenoidu a to napríklad zmenou vlnovej dĺžky excitačného žiarenia. Polohy pásov v prírodných vzorkách sa môžu meniť aj v závislosti na molekulách obklopujúcich daný pigment. Tie s týmto pigmentom interagujú a tak menia jeho konformáciu, čo sa prejaví v zmenách polôh pásov vo výslednom Ramanovom spektre. Bez prístupu inej metódy, ako napríklad HPLC, nie sme schopní na základe Ramanovej spektrometrie určiť pomery koncentrácií viacerých druhov pigmentov v organizme. Preto nemôžeme s istotou určiť, ktorý pigment sa prejavil vo výslednom spektre. Posunutím miesta merania na povrchu vzorky, napríklad lišajníka, môže dôjsť k prejavu iného pigmentu, alebo dokonca proteínu, ktorý bude v danom mieste vo väčšej koncentrácii. Niektoré pigmenty sa môžu akumulovať v špecifických častiach bunky, čo má takisto vplyv na výslednú polohu pásov v spektre.

Posuny hlavného pásu karotenoidov ( $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ) sú dobre znázornené v nasledujúcej tabuľke uvedenej Jehličkou *et al.*, 2014. Táto tabuľka zahŕňa vlastné merania a výsledky z literatúry. Veľmi dobre popisuje rozptyl polôh daného pásu karotenoidov a naznačuje komplikáciu pri jednoznačnom určení typu karotenoidu pomocou Ramanovej spektrometrie. To platí o karotenoidoch s rovnakým podielom dvojitých väzieb a rovnakou dĺžkou konjugovaného reťazca ( $\beta$ -karoten versus luteín, zeaxantin). V prípade väčších štruktúrnych rozdielov karotenoidov sa darí nameranie vzájomne odľahlých hodnôt, aj rozlíšenie konkrétnych pigmentov (vid'. napr. baktérioruberín versus astaxantin, fukoxantin). Vplyv na výsledné spektrum majú aj bočné skupiny naviazané na hlavný polyénový reťazec. Nezaobera sa analytickými aspektmi (vlnová dĺžka, režim merania). Údaje z referenčných čistých chemikálií sú znázornené tmavými farbami.



**Tab. 20** Hodnoty Ramanovho pásu ( $\nu_1\text{C}=\text{C}$ ) - valenčná vibrácia. Posudzuje posuny pásu v rámci jednotlivých karotenoidov v závislosti na štruktúre konjugovaného reťazca. Popisuje výsledky vlastných meraní a hodnoty z literatúry. Tmavá farba znázorňuje čistú látku.

Výsledky tejto práce poukazujú na úspešné využitie Ramanovej spektrometrie pri identifikácii biomarkerov extrémofilných organizmov. Na výskum týchto organizmov je zameraný aj vedný obor astrobiológia. V súvislosti s astrobiologickým výskumom sa metóda Ramanovej spektrometrie javí ako vhodný kandidát pri detekcii organických látok priamo v teréne. V súčasnosti sa najväčšia pozornosť venuje výskumu planéty Mars, kde bola dokázaná prítomnosť vody.

Použitím príručného spektrometra ( $\lambda$  532 nm) sme dokázali detegovať významné biomarkre ako karotenoidy vo všetkých analyzovaných organizmoch, vďaka ich silnému signálu, ktorým sa prejavujú. Práve tento typ prístroja sa javí ako vhodný nástroj pri spoločnej (ESA, NASA, RKA) plánovanej misii ExoMars (2018), ktorej cieľom bude výskum organických molekúl pod povrchom Marsu. Rover poniesie RLS Ramanov spektrometer. Účinnosť tohto prístroja bola popísaná v práci Lopez-Reyes *et al.*, 2013. V prostredí nasimulovaných podmienok na povrchu Marsu dokázali identifikovať organické molekuly v horninovom substráte. V našom prípade nám extrémofilné prostredia pre život reprezentujú psychrofilné sinice, riasy (nízka teplota, UV žiarenie) a lišajníky (UV

žiarenie). Vysoké UV žiarenie je typické aj pre povrch Marsu. Na tento faktor extrémneho prostredia poukazuje aj práca Vítka *et al.*, 2012 kde v hyperaridnom prostredí púšte Atacama identifikovali vo vzorkách halitu karotenoidy, ktoré produkovali prítomné organizmy. Využili pritom vyššie spomenutý príručný spektrometer ( $\lambda$  532 nm).

V porovnaní s metódou HPLC sa Ramanova spektrometria ukazuje ako účinný nástroj vo výskume astrobiológie a to hlavne vďaka praktickému a rýchlemu využitiu v teréne, ktoré metóda HPLC neumožňuje. Navyše použitie Ramanových spektrometrov nevyžaduje žiadnu úpravu vzoriek pred vlastnou analýzou a tak je táto metóda dôležitou súčasťou identifikácie významných biomarkerov v extraterestrickom prostredí. Ako poukázala Mgr. Julie Novotná vo svojej diplomovej práci a ďalej bol tento poznatok prezentovaný v práci Jehličky *et al.*, 2014, za vhodných podmienok kedy dochádza v organizme k produkcii predovšetkým jedného typu karotenoidu a ostatné sú produkované minoritne, je Ramanova spektrometria schopná identifikácie konkrétneho typu pigmentu. Ako príklad boli analyzované halofilné archea a ich produkcia pigmentu bakterioruberínu. Tento fakt pridáva tejto metóde na hodnotu hlavne v prípade detekcie biomarkerov extrémofilných organizmov.



### 13.0 ZÁVER

Využitie Ramanovej spektrometrie sa javí ako vhodný nástroj pri identifikácii karotenoidov vo vybraných druhoch siníc, rias a lišajníkov. Zamerali sme sa hlavne na organizmy žijúce v stresových podmienkach, tzv. extrémofily. Táto nedeštruktívna metóda poskytuje pomerne rýchle analýzy bez predošlej úpravy vzorky.

Miniaturizovaním Ramanových spektrometrov došlo k výraznému rozšíreniu možností tejto metódy. Prenosné a príručné prístroje sú ideálny nástroj pre rýchlu analýzu vzoriek priamo v teréne. Na druhej strane laboratórne mikrospektrometre poskytujú presnejšie analýzy. Kombináciou viacerých spektrometrov, ktoré disponujú odlišnou vlnovou dĺžkou, sme schopní detegovať prítomnosť nielen karotenoidov, ale aj iných druhov pigmentov ako napr. chlorofyl. Za ideálnych podmienok sme schopní detegovať aj iné produkty metabolizmu ako proteíny alebo aminokyseliny.

Karotenoidy sú významné ako tzv. biomarkre. Výskum biomarkerov nám pomáha analyzovať stopy po živote organizmov, či už minulom, alebo súčasnom. Ramanova spektrometria je účinný nástroj pri identifikácii týchto látok a poskytuje nám tak radu významných informácií o vlastnostiach prítomných organizmov. Táto metóda je významnou súčasťou astrobiologického výskumu a to vďaka svojej schopnosti rýchlo a nedeštruktívne detegovať významné biomarkery extrémofilných organizmov. Napríklad v horninovom prostredí, ktoré bude pre bližší výskum astrobiológie kľúčové (ExoMars).

V Ramanových spektrách sa karotenoidy prejavujú svojimi typickými tromi pásmi, ktoré reprezentujú vibračné módy  $\nu_1\text{C}=\text{C}$  a  $\nu_2\text{C}-\text{C}$  (valenčné vibrácie) a  $\delta_3\text{C}=\text{CH}$  (deformačné vibrácie). Tieto pásy sa nám podarilo namerať v prípade všetkých analyzovaných organizmov. Schopnosť detekcie hlavných pásov karotenoidov sme dokázali aj na vzorkách frakcií pigmentov extrahovaných zo siníc pomocou metódy HPLC. Karotenoidy je možné detegovať aj v prípade, že sa nachádzajú vo vzorke v stopovom množstve a to použitím prístroja s vhodnou vlnovou dĺžkou ( $\lambda$  514nm,  $\lambda$  532 nm), kedy dochádza k rezonančnému zosilneniu signálu karotenoidov. Napriek tomu platí, že na základe troch hlavných pásov, ktoré sú pre karotenoidy typické, nie je možné určiť konkrétny typ karotenoidu. Spektrálne štruktúrne podobných karotenoidov sa vo výsledku môžu odlišovať jednotkami  $\text{cm}^{-1}$ . Ďalším faktorom, ktorý nám neumožňuje bližšiu identifikáciu karotenoidov Ramanovou spektrometriou je fakt, že tieto látky sa často vyskytujú vo väzbe na biologické tkanivo alebo interagujú s molekulami. V neposlednom rade musíme zohľadniť experimentálne faktory, ako napríklad rozlíšenie použitých prístrojov.

Vo všeobecnosti teda môžeme povedať, že metóda Ramanovej spektrometrie je významná pre identifikáciu prítomnosti karotenoidov vo vzorkách organizmov. Praktické využitie prenosných a príručných spektrometrov sa ukázalo ako užitočné pre prácu so vzorkami v teréne a v oblasti astrobiológie. Správnym nastavením a zvolením prístroja sme schopní významných výsledkov. Pri práci s karotenoidmi podobnej štruktúry je potrebná zvýšená opatrnosť pri vyhodnocovaní Ramanových spektier. Pre bližšiu identifikáciu a rozlíšenie jednotlivých karotenoidov je účelnejšie využitie metódy HPLC, ktorá z extraktov biomasy dokáže na základe retenčných časov rozlíšiť jednotlivé typy karotenoidov.

## 14.0 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Ahmadjian V (1993) *The Lichen Symbiosis*. John Willey and Sons, New York
- Alajtal AI, Edwards HGM, Scowen IJ (2011) The effect of spectral resolution on the Raman spectra of polyaromatic hydrocarbons and beta-carotene mixtures. *J Raman Spectrosc* 42:179-185
- Barletta RE, Krause JW, Goodie T, Sabae HE (2015) The direct measurement of intracellular pigments in phytoplankton using resonance Raman spectroscopy. *Marine Chemistry* 176:164-173
- Berman-Frank I, Bidle KD, Haramaty L, Falkowski PG (2004) The demise of the marine cyanobacterium, *Trichodesmium* spp., via an autocatalyzed cell death pathway. *Limnol Oceanogr* 49:997-1005
- Bertaux JL, Leblanc F, Witasse O, Quemerais E, Lilensten J, Stern SA, Sandel B, Korabely O (2005) Discovery of an aurora on Mars. *Nature* 435:790-794
- Beschel RE (1961) Dating rock surfaces by lichen growth and its application to glaciology and physiography (lichenometry). *Zverejnené v Raasch GO: Geology of the Arctic, vol. 2*, University of Toronto Press, Canada
- Bhandari R, Sharma PK (2006) High-light-induced changes on photosynthesis, pigments, sugars, lipids and antioxidant enzymes in freshwater (*Nostoc spongiaeforme*) and marine (*Phormidium corium*) cyanobacteria. *Photochem Photobiol* 82:702-710
- Blackwell M (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98:426-438
- Blakefield MK, Harris DO (1994) Delay of cell differentiation in *Anabaena aequalis* caused by UV-B radiation and the role of photoreactivation and excision repair. *Photochem Photobiol* 59:204-208
- Bond PL, Smriga SP, Banfield JF (2000) Phylogeny of microorganisms populating a thick, subaerial, predominantly lithotrophic biofilm at an extreme acid mine drainage site. *Appl Environ Microbiol* 66:3842-3849
- Buick R (1992) The Antiquity of Oxigenic Photosynthesis: Evidence from Stromatolites in Sulphate-Deficient Archaean Lakes. *Science* 255:74-77
- Canganella F, Wiegel J (2011) Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. *Naturwissenschaften* 98:253-279
- Canovas D, Vargas C, Csonka LN, Ventosa A, Nieto JJ (1996) Osmoprotectants in *Halomonas elongata*: high-affinity betaine transport system and choline-betaine pathway. *J Bacteriol* 178:7221-7226
- Casanova Municchia A, Caneva G, Ricci MA, Sodo A (2014) Identification of endolithic traces on stone monuments and natural outcrops: preliminary evidences. *J Raman Spectrosc* 45:1180-1185
- Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR (2002) Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13:253-261
- Cavicchioli R, Thomas T (2000) *Encyclopedia of microbiology vol 2, 2. vyd.*, Academic: London 317-337
- Collins AM, Jones HDT, Han D, Hu Q, Beechem TE, Timlin JA (2011) Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Plos One* 6:1-7
- Conde FR, Churio MS, Previtali CM (2004) The deactivation pathways of the excited-states of the mycosporine-like amino acids shinorine and porphyra-334 in aqueous solution. *Photochem Photobiol Sci* 3:960-967

- Crutzen PJ (1992) Ultraviolet on the increase. *Nature* 356:104-105
- Dayan FE, Romagni JG (2001) Lichens as a potential source of pesticides. *Pestic Outlook* 12:229-232
- De Gelder J, De Gussem K, Vandenabeele P, Moens L (2007) Reference database of Raman spectra of biological molecules. *J Raman Spectrosc* 38:1133-1147
- Delong EF, Franks DG, Yayanos AA (1997) Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:2105-2108
- Dunlap WC, Yamamoto Y (1995) Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidants activity of mycosporine-glycine. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 112:105-114
- Eddy ML, Jablonski PE (2000) Purification and characterization of a membrane-associated ATPase from *Natronococcus occultus*, a haloalkaliphilic archeon. *FEMS Microbiol Lett* 189:211-214
- Edwards HGM (2010) Raman spectroscopic approach to analytical astrobiology: the detection of key geological and biomolecular markers in the search for life. *Phil Trans R Soc A* 368:3059-3065
- Edwards HGM, Cockell ChS, Newton EM, Wynn-Williams DD (2004) Protective pigmentation in UVB-screened Antarctic lichens studied by Fourier transform Raman spectroscopy: an extremophile bioresponse to radiation stress. *J Raman Spectrosc* 35:463-469
- Edwards HGM, Farwell DW, Seaward MRD (1997) FT-Raman spectroscopy of *Dirina massiliensis* f. *sorediata* encrustations growing on diverse substrata. *Lichenologist* 29:83-90.
- Edwards HGM, Garcia-Pichel F, Newton EM, Wynn-Williams DD (2000) Vibrational Raman spectroscopic study of scytonemin, the UV-protective cyanobacterial pigment. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectros* 56:193-200
- Edwards HGM, Moody CD, Newton EM, Villar SEJ, Wynn-Williams DD (2005) Raman spectroscopic analysis of cyanobacterial colonization of hydromagnesite, a putative martian extremophile. *Icarus* 175:372-381
- Edwards HGM, Newton EM, Dickensheets DL, Wynn-Williams DD (2003) Raman spectroscopic detection of biomolecular markers from Antarctic materials: evaluation for putative Martian habitats. *Spectrochimica Acta Part A* 59:2277-2290
- Ehling-Schultz M, Bilger W, Scherer S (1997) UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J Bacteriol* 179:1940-1945
- Eisenberg H (1995) Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys* 318:1-5
- Empadinhas N, Da Costa MS (2008) Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Internat Microbiology* 11:151-161
- Fernandes RF, Ferreira GR, Spielmann AA, Edwards HGM, De Oliveira LFC (2015) FT-Raman spectroscopy of the *Candelaria* and *Pyxine* lichen species: A new molecular structural study. *Journal of Molecular Structure* 1102:57-62
- Fields PA (2001) Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp Biochem Physiol* 129:417-431
- Garcia-Pichel F, Castenholz RW (1991) Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *J Phycol* 27:395-409

- Gerday C, Aittaleb M, Arpigny JL, Baise E, Chessa JP, Garsoux G, Petrescu I, Feller G (1997) Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim et Biophys Acta-Protein Struc Mol Enzymol* 1342:119-131
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georgette D, Hoyoux A, Lonchienne T, Meeuwis MA, Feller G (2000) Cold adapted enzymes: from Fundamentals to biotechnology. *Tibtech* 18:103-107
- Goodwin JR, Hafner LM, Fredericks PM (2006) Raman spectroscopic study of the heterogeneity of microcolonies of a pigmented bacterium. *J Raman Spectrosc* 37:932-936
- Häder DP, Kumar HD, Smith RC, Worrest RC (2007) Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 6:267-285
- He YY, Häder DP (2002) Reactive oxygen species and UV-B: effect on cyanobacteria. *Photochem Photobiol Sci* 1:729-736
- Horikoshi K (1998) Barophiles: deep-sea microorganisms adapted to an extreme environment. *Current Opinion in Microbiology* 1:291-295
- Chandra A, Rana J, Li Y (2001) Separation, identification, quantification and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:3515-3521
- Christner BC, Mosley-Thompson E, Thompson LG, Zagorodnov V, Sandman K, Reeve JN (2000) Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. *Icarus* 144:479-485
- Imanaka T (2008) Adaptation Strategy of Thermophiles toward Hyperthermophily and Their Molecular Bases. *Bull Chem Soc Jpn* 81:171-182
- Jehlička J, Edwards HGM, Osterrothová K, Novotná J, Nedbalová L, Kopecký J, Němec I, Oren A (2014) Potential and limits of Raman spectroscopy for carotenoid detection in microorganisms: implications for astrobiology. *Phil Trans R Soc A* 372:20140199
- Jehlička J, Edwards-Howell GM, Culka A (2010) Using portable Raman spectrometers for the identification of organic compounds at low temperatures and high altitudes: exobiological applications. *Phil Trans R Soc* 368:3109-3125
- Jehlička J, Oren A (2013a) Raman spectroscopy in halophile research. *Frontiers in Microbiology* 4:3-7
- Jehlička J, Oren A (2013b) 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* 44:1285-1291
- Jehlička J, Oren A, Edwards-Howell GM (2011) Raman spectra of osmotic solutes of halophiles. *J Raman Spectrosc* 43:1134-1140
- Jehlička J, Oren A, Vitek P (2012) Use of Raman spectroscopy for identification of compatible solutes in halophilic bacteria. *Extremophiles* 16:507-514
- Jehlička J, Osterrothová K, Oren A, Edwards HGM (2013c) Raman spectrometric discrimination of flexirubin pigments from two genera of *Bacteroidetes*. *FEMS Microbiol Lett* 1-6
- Johnson DB (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 27:307-317
- Jorge-Villar SE, Miralles I, Capel Ferrón C, Hernández V (2011) Raman spectroscopy study of lichens using three spectrometers under different experimental conditions: analyses of the results with relevance for extraplanetary exploration. *Anal Methods* 3:2783-2791

- Kaczor A, Baranska M (2011) Structural Changes of Carotenoid Astaxanthin in a Single Algal Cell Monitored in Situ by Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 83:7763-7770
- Kato C, Masui N, Horikoshi K (1996) Properties of obligately barophilic bacteria isolated from a sample of deep-sea sediment from the Izu-Bonin trench. *J Mar Biotechnol* 4:96-99
- Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers J (2008) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*, 10. vydanie. CAB International, Wallingford (Oxon)
- Kosanić M, Ranković B, Stanojković T (2012) Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *J Sci Food Agric* 92:1909-1916
- Kosanić M, Ranković B, Stanojković T, Rančić A, Manojlović N (2014) *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Science and Technology* 59:518-525
- Krembs C, Eicken H, Junge K, Deming JW (2002) High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep-Sea Res I* 49:2163-2181
- Křibek B (1981) *Organická geochemie*. Státní pedagogické nakladatelství Praha
- Kumar A, Tyagi MB, Jha PN, Srinivas G, Singh A (2003) Inactivation of cyanobacterial nitrogenase after exposure to ultraviolet-B radiation. *Curr Microbiol* 46:380-384
- Larsen H (1962) In: *The bacteria* (Gunsalus IC, Stanier RY – eds.), Academic press, New York 4:297-342
- Larson AD, Kallio RE (1954) Purification and properties of a bacterial urease. *J Bacteriol* 68:67-73
- Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, Peters T, Marre R (1995) *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)- usnic acid, and (-)- usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2541-2543
- Leduc LG, Ferroni GD (1994) The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus Ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Rev* 14:103-120
- Liao C, Piercey-Normore MD, Sorensen JL, Gough K (2010) *In situ* imaging of usnic acid in selected *Cladonia* spp. by vibrational spectroscopy. *Analyst* 135:3242-3248
- Lien T, Madsen M, Rainey FA, Birkeland NK (1998) *Petrotoga mobilis* sp. Nov., from a North Sea oil-production well. *Int J Syst Bacteriol* 48:1007-1013
- Lopez-Reyes G, Rull F, Venegas G, Westall F, Foucher F, Bost N, Sanz A, Catalá-Espí A, Vegas A, Hermosilla I, Sansano A, Medina J (2013) Analysis of the scientific capabilities of the ExoMars Raman Laser Spectrometer instrument. *Eur J Mineral* 25:721-733
- Lumbsch HT, Leavitt SD (2011) Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity* 50:59-72
- MacElroy RD (1974) Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* 6:74-75
- Maia LF, Ferreira GR, Costa RCC, Lucas NC, Teixeira RI, Fleury BG, Edwards HGM, de Oliveira LFC (2014) Raman Spectroscopic Study of Antioxidant Pigments from Cup Corals *Tubastraea* spp. *J Phys Chem* 118:3429-3437
- McKey CP, Friedman EI, Gómez-Silva B, Cáceres-Villanueva L, Andersen DT (2003) Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997-1998. *Astrobiology* 3:393-406

- Mesbah N, Cook G, Wiegel J (2009) The halophilic alkalithermophile *Natranaerobius thermophilus* adapts to multiple environmental extremes using a large repertoire of Na<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> antiporters. *Mol Microbiol* 74:270-281
- Mesbah NM, Wiegel J (2008) Life at extreme limits. The anaerobic halophilic alkalithermophiles. *Ann NY Acad Sci* 1125:44-57
- Miralles I, Jorge-Villar SE, Canton Y, Domingo F (2012) Using a Mini-Raman Spectrometer to Monitor the Adaptive Strategies of Extremophile Colonizers in Arid Deserts: Relationships Between Signal Strength, Adaptive Strategies, Solar Radiation, and Humidity. *Astrobiology* 12:743-753
- Mullineaux CW (2013) Co-existence of photosynthetic and respiratory activities in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837:503-511
- Nakamura R, Yamamoto S, Nakahara J (2001) Broad Raman scattering and luminescence in  $\beta$ -carotene solution. *The Journal of Chemical Physics* 117:238-247
- Orange A, James PW, White FJ (2011) *Microchemical methods for the identification of lichens*. British Lichen Society, London.
- Oren A (2006) Life at high salt concentrations. *Prokaryotes* 2:263-282
- Oshima T, Moriya T (2008) A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high-temperature compost. *Ann NY Acad Sci* 1125:338-344
- Peter S, Zell BM, Blum Ch, Stuhl A, Elgass K, Sackrow M, Subramaniam V, Meixner JA, Harter K, Maurino GV, Schleifenbaum EF (2014) Photosynthesis in a different light: spectro-microscopy for *in vivo* characterization of chloroplasts. *Plant Science* 292:1-7
- Pomeroy LR, Wiebe WJ (2001) Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat Microb Ecol* 23:187-204
- Proksa B, Adamcová J, Strudíková M, Fуска J (1994) Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes. *Pharmazie* 49:282-3
- Rainey FA, Donnison AM, Janssen PH, Saul D, Rodrigo A, Bergquist PL, Daniel RM, Stackebrandt E, Morgan HW (1994) Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 120:263-266
- Rajeshwar PS, Donat PH (2007) UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science* 174:278-289
- Ranković B, Kosanić M, Manojlović N, Rančić A, Stanojković T (2014) Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Med Chem Res* 23:408-416
- Remias D, Karsten U, Lütz C, Leya T (2010) Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. *Protoplasma* 243:73-86
- Reynolds CS, Oliver RL, Walsby AE (1987) Cyanobacterial dominance: the role of buoyancy regulation in dynamic lake environments. *N Z J Mar Freshwater Res* 21:379-390
- Rosypal S (2003) *Nový přehled biologie*. Scientia
- Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T (2003) Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J Bacteriol* 185:210-220
- Shawuti G, Abbas A (2007) Research progress on biological activities of lichens secondary metabolites. *Food Sci J* 28:624-627

- Schopf JW (1993) Microfossils of the Early Archean Apex Chert: New Evidence of the Antiquity of Life. *Science* 260:640-646
- Singh SP, Häder DP, Sinha RP (2010) Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: Mitigation strategies. *Elsevier, Ageing Research Reviews* 9:79-90
- Singh SP, Klisch M, Häder DP, Sinha RP (2008a) Role of various growth media on shinorine (mycosporine-like amino acids) concentration and photosynthetic yield in *Anabaena variabilis* PCC 7937. *World J Microbiol Biotechnol* 24:3111-3115
- Singh SP, Kumari S, Rastogi RP, Singh KL, Sinha RP (2008b) Mycosporine-like amino acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Ind J Exp Biol* 46:7-17
- Sinha RP, Häder DP (2008) UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Sci* 174:278-289
- Sinha RP, Kumar A, Tyagi MB, Häder DP (2005) Ultraviolet-B-induced destruction of phycobiliproteins in cyanobacteria. *Physiol Mol Biol Plants* 11:313-319
- Smith RC, Prézelin BB, Baker KS, Bidigare RR, Boucher NP, Coley T, Karentz D, MacIntyre S, Matlick HA, Menzies D, Ondrusek M, Wan Z, Waters KJ (1992) Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255:952-959
- Stanier RY, Cohen-Bazire G (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu Rev Microbiol* 31:225-274
- Unemoto T (2000) Bioenergetics of marine bacteria - respiration-coupled Na<sup>+</sup> pump. *Yakugaku Zasshi* 120:16-27
- Vaishampayan A, Sinha RP, Häder DP, Dey T, Gupta AK, Bhan U, Rao AL (2001) Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. *Bot Rev* 67:453-516
- Vandenabeele P, Edwards HGM, Jehlička J (2014) The role of mobile instrumentation in novel applications of Raman spectroscopy: archaeometry, geosciences, and forensics. *Chem Soc Rev* 43:2628-2649
- Vasudeo PZ, Lew PCh (2012) Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology* 50:778-798
- Villar SEJ, Benning LG, Edwards HGM, AMASE team (2007) Raman and SEM analysis of a biocolonised hot spring travertine terrace in Svalbard, Norway. *Geochemical Transactions* 8:8
- Villar SEJ, Edwards HGM (2006) Raman spectroscopy in astrobiology. *Anal Bioanal Chem* 384:100-113
- Villar SEJ, Edwards HGM (2010) Lichen colonization of an active volcanic environment: a Raman spectroscopic study of extremophile biomolecular protective strategies. *J Raman Spectrosc* 41:63-67
- Vítek P, Cámara-Gallego B, Edwards HGM, Jehlička J, Ascaso C, Wierzchos J (2013) Phototrophic community in gypsum crust from the Atacama Desert studied by Raman spectroscopy and microscopic imaging. *Geomicrobiol J* 30:399-410
- Vítek P, Edwards HGM, Jehlička J, Ascaso C, De los Ríos A, Valea S, Jorge-Villar SE, Davila AF, Wierzchos J (2010) Microbial colonization of halite from the hyper-arid Atacama Desert studied by Raman spectroscopy. *Phil Trans R Soc A* 368:3205-3221
- Vítek P, Jehlička J, Edwards HGM, Hutchinson I, Ascaso C, Wierzchos J (2012) The miniaturized Raman system and detection of traces of life in halite from the Atacama desert: some considerations for the search for life signatures on Mars. *Astrobiology* 12:1095-1099

- Vítek P, Jehlička J, Edwards HGM, Osterrothová K (2009b) Identification of  $\beta$ -carotene in an evaporitic matrix – evaluation of Raman spectroscopic analysis for astrobiological research on Mars. *Anal Bioanal Chem* 393:1967-1975
- Vítek P, Osterrothová K, Jehlička J (2009a) Beta-carotene - A possible biomarker in the Martian evaporitic environment: Raman micro-spectroscopic study. *Planetary and Space Science* 57:454-549
- Wiegel J (1992) *Thermophilic bacteria.*, CRC: Boca Raton 105-184
- Wiegel J (1998) Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. *Extremophiles* 2:257-267
- Wiegel J, Adams MWW (1998) *Thermophiles-the keys to molecular evolution and the origin of life?*, Taylor and Francis: London
- Wilson R, Monaghan P, Bowden SA, Parnell J, Cooper JM (2007) Surface Enhanced Raman Signatures of Pigmentation of Cyanobacteria from within Geological Samples in a Spectroscopic-Microfluidic Flow Cell. *Anal Chem* 79:7036-7041
- Wilson ZE, Brimble MA (2009) Molecules derived from the extremes of life. *Nat Prod Rep* 26:44-71
- Wright SW, Jeffrey SW, Mantoura RFC, Llewellyn CA, Bjornland T, Repeta D, Welschmeyer N (1991) Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar Ecol Prog Ser* 77:183-196
- Zhang X, Kirkwood WJ, Walz PM, Peltzer ET, Brewer PG (2012) A Review of Advances in Deep-Ocean Raman Spectroscopy. *Appl Spectrosc* 66:237-249
- ZoBell CE, Morita RY (1957) Barophilic bacteria in some deep-sea sediments. *J Bacteriol* 73:563-568



## Internetové zdroje

URL 1 [http://cs.wikipedia.org/wiki/Peptidoglykan#mediaviewer/File:Peptidoglycan\\_en.svg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Peptidoglykan#mediaviewer/File:Peptidoglycan_en.svg)

URL 2 <http://cronodon.com/BioTech/Cyanobacteria.html>

URL 3 [http://web2.mendelu.cz/af\\_291\\_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1271](http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=1271)

URL 4 [http://www.worldofmolecules.com/antioxidants/lutein\\_zeaxanthin.htm](http://www.worldofmolecules.com/antioxidants/lutein_zeaxanthin.htm)

URL 5 <http://www.sinicearasy.cz/134/Cyanobacteria>

URL 6 <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Scytonemin.png>

URL 7 [http://www.nasa.gov/missions/index.html#.VCVy72d\\_uxc](http://www.nasa.gov/missions/index.html#.VCVy72d_uxc)

URL 8 <http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>

URL 9 <http://www.vscht.cz/lam/new/SpAnalPL-2.pdf>

URL 10 [http://physics.ujep.cz/~mkormund/P323/ChMat\\_II\\_pr5.pdf](http://physics.ujep.cz/~mkormund/P323/ChMat_II_pr5.pdf)

URL 11 <http://exploration.esa.int/mars/48088-mission-overview/>

URL 12 <http://exploration.esa.int/mars/45103-rover-instruments/>

URL 13 <http://exploration.esa.int/mars/53845-landing-site/>

URL 14 <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>

URL 15 [www.scspp.sk/professori/sromekova/riasy.ppt](http://www.scspp.sk/professori/sromekova/riasy.ppt)

URL 16 <http://www.adipogen.com/media/catalog/product/a/g/ag-cn2-0055.png>

URL 17 <http://www.algaebase.org/>

URL 18 <http://www.gbif.org/>

URL 19 <http://eol.org/>