

Využití mikroorganismů v kriminalistické detekci

Bc. Daniel Kres

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta aplikované informatiky

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta aplikované informatiky
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Daniel Kres**
Osobní číslo: **A14371**
Studijní program: **N3902 Inženýrská informatika**
Studijní obor: **Bezpečnostní technologie, systémy a management**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Využití mikroorganismů v kriminalistické detekci**
Téma anglicky: **The Use of Microorganisms in Criminal Detection**

Zásady pro vypracování:

- 1. Seznamte se s metodami kriminalistické identifikace.**
- 2. Zaměřte se na problematiku využití mikroorganismů pro kriminalistickou detekci.**
- 3. Specifikujte proces, který souvisí s přípravou a analýzou bakteriálních otisků.**
- 4. Navrhněte a provedte experiment, ve kterém se zaměříte na studium bakteriálních vzorků pomocí mikroskopické a spektroskopické techniky.**
- 5. Citujte použitou literaturu dle požadavků na vypracování diplomové práce.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. FIERER, N.; LAUBER, Ch. L.; ZHOU, N.; McDONALD, D.; COSTELLO, E. K. and R.KNIGHT. Forensic identification using skin bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010; DOI:10.1073/pnas.1000162107.
2. FIERER, N.; HAMADY, M.; LAUBER, Ch. L. and R. KNIGHT. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008; DOI:10.1073/pnas.0807920105.
3. PORADA, Viktor. Teorie kriminalistických stop a identifikace: technické a biomechanické aspekty. 1. vyd. Praha: Academia, 1987, 328 s., barev. obr. příl.
4. STRAUS, Jiří. Kriminalistika, kriminalistická technika: (pro kvalifikační kurz kriminalistických expertů). Vyd. 2., upr. Praha: Policejní akademie České republiky, 2006, 301 s. ISBN 80-7251-216-1.
5. MUSIL, J., Z. KONRÁD a J. SUCHÁNEK. Kriminalistika. 2., přeprac. a dopl. vyd. V Praze: C.H. Beck, 2004, xxiii, 583 s. Beckovy mezioborové učebnice. ISBN 80-7179-878-9.
6. RAK, R., V. MATYÁŠ a Z. ŘÍHA. Biometrie a identita člověka ve forezních a komerčních aplikacích. 1. vyd. Praha: Grada, 2008, 631 s., 32 s. obr. příl. Profesionál. ISBN 978-80-247-2365-5.
7. ERZINCLIOGLU, Zakaria. Forezní metody vyšetřování. Vyd. 1. Praha: Fortuna Libri, 2008, 192 s. ISBN 978-80-7321-433-3.
8. MAZURA, Ivan. Speciální metody molekulární biologie. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001, 101 s., il. ISBN 80-246-0258-x.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Marie Nedvědová

Ústav elektroniky a měření

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2016

Ve Zlíně dne 5. února 2016



doc. Mgr. Milan Adámek, Ph.D.
děkan



doc. RNDr. Vojtěch Křesálek, CSc.
ředitel ústavu


Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k prezenčnímu nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen v příruční knihovně Fakulty aplikované informatiky Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen připouští-li tak licenční smlouva uzavřená mezi mnou a Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně s tím, že vyrovnání případného přiměřeného příspěvku na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše) bude rovněž předmětem této licenční smlouvy;
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové/bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně, dne 12.05.2016


.....
podpis diplomanta

ABSTRAKT

Diplomová práca sa zameriava na využitie mikroorganizmov v kriminalistickej detekcii. Kriminalistická identifikácia pomocou bakteriálnych odtlačkov je nová disciplína kombinujúca mikrobiológiu, genetiku a forenzné vedy. V teoretickej časti je popísaná kriminalistická identifikácia osôb, kriminalistická genetika a využitie spektroskopie v oblasti forenzných vied a to predovšetkým terahertzovej spektroskopie v časovej doméne. Praktická časť práce je venovaná experimentálnej identifikácii vybraných bakteriálnych vzoriek pomocou spektroskopickú a mikroskopickú techniky, vyhodnoteniu a diskusii získaných dát.

Kľúčové slová: Kriminalistická identifikácia, bakteriálne odtlačky, mikroorganizmy, spektroskopické metódy.

ABSTRACT

Diploma thesis is focused on using the microorganisms in criminal detection. The criminal identification by the bacterial fingerprints is a new discipline which combines microbiology, genetics and forensic science. In the theoretical part, there are described the criminal identification of persons, criminal genetics and spectroscopy usage in the field of forensic science, especially the Terahertz time-domain spectroscopy. The practical part of this work deals with the experimental identification of chosen bacterial samples by the spectroscopic and microscopic techniques, evaluation and discussion about results.

Keywords: Criminal identification, bacterial fingerprints, microorganisms, spectroscopic methods.

Na tomto mieste by som rád poďakoval vedúcej mojej diplomovej práce Ing. Marii Nedvědovej za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytovala v priebehu spracovania diplomovej práce. Ďalej by som rád poďakoval Ing. Kateřine Sulovskej za pomoc pri meraniach v laboratóriu.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia diplomovej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČASŤ	10
1 KRIMINALISTICKÁ IDENTIFIKÁCIA	11
1.1 POJEM KRIMINALISTICKÁ IDENTIFIKÁCIA	11
1.2 OBJEKT KRIMINALISTICKEJ IDENTIFIKÁCIE.....	12
1.3 PRINCÍP KRIMINALISTICKEJ IDENTIFIKÁCIE	13
1.4 METÓDY KRIMINALISTICKEJ IDENTIFIKÁCIE.....	14
1.5 DAKTYLOSKOPICKÉ SKÚMANIE OSÔB.....	15
1.6 KRIMINALISTICKÉ BIOLOGICKÉ SKÚMANIE OSÔB	16
1.6.1 Zaisťovanie a skúmanie biologických stôp.....	17
1.6.2 Právna úprava odberu biologického materiálu.....	18
1.7 MIKROBIÁLNA KRIMINALISTICKÁ ANALÝZA	19
1.7.1 Využitie mikroorganizmov v kriminalistickej detekcii.....	20
2 KRIMINALISTICKÁ GENETIKA	21
2.1 DNA	21
2.2 METÓDY ANALÝZY DNA	22
2.3 ZÍSKAVANIE A ANALÝZA STÔP DNA.....	23
2.4 VYUŽITIE DNA ANALÝZY V KRIMINALISTIKE	24
2.5 OCHRANA OSOBNÝCH ÚDAJOV	25
2.6 DATABÁZA DNA	26
3 SPEKTROSKOPICKÉ METÓDY VO FORENZNEJ ANALÝZE	27
3.1 INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIA	28
3.2 ULTRAFIALOVÁ A VIDITELNÁ SPEKTROSKOPIA (UV / VIS SPEKTROSKOPIA).....	28
3.3 RAMANOVA SPEKTROSKOPIA	29
3.4 HMOTNOSTNÁ SPEKTROSKOPIA.....	30
3.5 TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIA.....	31
3.5.1 Terahertzové vlny.....	31
3.5.2 Zdroje terahertzového žiarenia.....	32
3.5.3 Terahertzová detekcia	32
3.5.4 Výhody a využitie terahertzovej spektroskopie	34
II PRAKTICKÁ ČASŤ	35
4 NÁVRH EXPERIMENTU	36
5 VÝBER A PRÍPRAVA VZORIEK	37
5.1 ESCHERICHIA COLI	37
5.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	38
5.3 BAKTERIÁLNA KULTÚRA	38
5.4 BAKTERIÁLNE ODTLAČKY PRSTOV	39
6 MERANIA BAKTERIÁLNYCH KULTÚR	41
6.1 SPEKTROSKOPICKÉ MERANIA VYBRANÝCH VZORIEK.....	41
6.1.1 TPS Spectra 3000.....	41

6.1.2	Postup merania	42
6.1.3	Terahertzové zorobrazovanie	43
6.2	MIKROSKOPICKÉ POROVNÁVANIE VZORIEK	44
6.2.1	Axio Scope.A1	44
6.3	MERANIA VYKONANÉ LABORATÓRNÝM ZARIADENÍM	46
7	VÝSLEDKY MERANÍ	48
7.1	VÝSLEDKY SPEKTROSKOPICKÉHO MERANIA	48
7.1.1	Porovnávanie vzoriek E.coli a S.aureus na podkladovej fólii.....	48
7.1.2	Porovnávanie vzoriek E.coli a S.aureus na polyetylénovej fólii.....	52
7.1.3	Porovnávanie pomocou terahertzového zobrazovania.....	53
7.1.4	Porovnávanie vzoriek odtlačkov prstov	54
7.2	VÝSLEDKY MIKROSKOPICKÉHO SKÚMANIA	56
7.3	VÝSLEDKY Z LABORATÓRNEHO VYŠETRENIA.....	56
	ZÁVER	58
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	60
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	63
	ZOZNAM OBRÁZKOV	64

ÚVOD

Mikroorganizmy sú všade okolo nás. Ich rýchla a správna identifikácia je dôležitá nielen v laboratórnej praxi v zdravotníctve alebo potravinárstve, ale rovnako nachádza svoje uplatnenie v kriminalistickej detekcii. Klasické metódy identifikácie páchatel'a narážajú často na nedostatok dôkazného materiálu. Čiastočný odtlačok prsta, ktorý nie je vhodný k identifikácii páchatel'a, v sebe ukrýva množstvo stôp. V zostatkoch kože a tekutín, ktoré odtlačok tvoria, zostanú aj stopy látok a baktérii, ktoré sa dajú využiť k identifikácii.

Identifikácia baktérii je založená na vlastnostiach ako je rast na selektívnych médiách, farba a vzhľad kolónii. Ďalšou možnosťou je identifikácia podľa biochemických reakcii alebo molekulárne biologickými metódami. Tieto techniky dokážu baktérie presne identifikovať. Sú však časovo náročné, čo je veľkou nevýhodou aj v kriminalistickej detekcii, kde sa vyžaduje identifikácia páchatel'a v čo najkratšom čase.

V tejto diplomovej práci sa zaoberám využitím mikroorganizmov v kriminalistickej detekcii. Cieľom práce je poukázať na nové metódy identifikácie. Teoretická časť práce je rozdelená na tri kapitoly. V prvej sa venujem problematike kriminalistickej identifikácie, kde sú uvedené základné pojmy a metódy kriminalistického skúmania osôb. V druhej kapitole práce je načrtnutá analýza DNA, ktorá úzko súvisí s biologickou a mikrobakteriálnou identifikáciou. V tretej kapitole je uvedený prehľad spektroskopických metód a ich využitie vo forenzných vedách.

Praktická časť práce sa zaoberá experimentálnou analýzou bakteriálnych vzoriek využitím terahertzovej spektroskopie a pomocou mikroskopického prístroja. Merania prebiehali na prístrojovom vybavení FAI UTB. Pre meranie boli vybrané vzorky *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Získané výsledky sa vzájomne porovnali a vyhodnotili. Všetky dáta sú spracované a uvedené v grafoch.

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 KRIMINALISTICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Identifikácia nie je využívaná len v kriminalistike, ale je aj dôležitou súčasťou iných vedných odborov, ako sú napríklad chémia, botanika, zoológia, geológia a iné. Takáto identifikácia sa od kriminalistickej identifikácie líši predovšetkým podstatou stotožňovania, formami realizácie a svojím cieľom. V týchto vedných odboroch je cieľom určenia rodu, druhu objektu, s čím by si kriminalistika nevystačila, nakoľko je u nej dôležité zistenie totožnosti konkrétneho, individuálne určeného objektu.

1.1 Pojem kriminalistická identifikácia

Základom kriminalistickej identifikácie je učenie o identite, totožnosti, individuálnosti a relatívnej stálosti objektu identifikácie. Termínom identita (totožnosť) objektu sa v kriminalistike označuje predovšetkým jeho individuálnosť, odlišnosť od všetkých ostatných podobných objektov, neopakovateľnosť komplexu jeho vlastností a identifikačných znakov. [1]

Kriminalistická identifikácia je proces, v priebehu ktorého sa zisťuje, ktorým konkrétnym objektom bola vytvorená konkrétna kriminalistická stopa. Ide o proces stotožňovania objektov podľa kriminalistických stôp a iných zobrazení, v ktorých sa hľadajú súvislosti osôb alebo vecí s kriminalistickou udalosťou. Jednotliví autori charakterizujú a uvádzajú pre kriminalistickú identifikáciu rozdielne definície, ich podstata je však rovnaká. Kriminalistická identifikácia je špeciálnou kriminalistickou teóriou, ktorej základ spočíva v stotožnení konkrétneho objektu pomocou metódy porovnávacej, používanej pre stopu materiálnu aj pamäťovú, pričom vlastný identifikačný proces sa uskutočňuje porovnaním súhrnu identifikačných znakov, resp. vlastností najmenej dvoch objektov. [2]

Kriminalistická identifikácia pre potreby dokazovania v trestnom konaní zahrňuje tieto etapy:

1. odhalenie zdroja informácie obhliadnutím objektu,
2. určením východiskového súhrnu preverovaných objektov,
3. určenie počtu preverovaných objektov z východiskového súhrnu preverovaných objektov,
4. vlastné porovnávacie identifikačné skúmanie,
5. zistenie hľadaného objektu, výsledok identifikačného skúmania.[1]

Identifikácia je dokumentovaná a jej výsledky sú zaznamenané dvoma základnými formami, stanovenými trestným poriadkom, ktorými môže byť znalecký posudok alebo odborné vyjadrenie. V praxi sa stretávame aj s inými formami dokumentov, napr. oznámenie alebo správa. Kriminalistická identifikácia môže byť ukončená rôznymi výsledkami, ktoré môžu byť všeobecné alebo formálne. Všeobecným výsledkom môžeme dosiahnuť tzv. dovŕšenú identifikáciu, čo znamená úplné stotožnenie alebo vylúčenie totožnosti objektu. Tým môžeme konštatovať, že bola nájdená dôležitá informácia alebo naopak, že sa nepodarilo zo stopy vyčítať žiadnu alebo dostatočnú informáciu a tým je stopa vylúčená z ďalšieho skúmania. V tomto prípade ide teda o všeobecný výsledok kriminalistickej identifikácie. [1]

Druhým typom je výsledok formálny, kde môže nastať viac možností. Jednou z nich je, že dospejeme k individuálnej identifikácii, pričom ide o stotožnenie alebo vylúčenie totožnosti konkrétnej osoby alebo predmetu. Ďalšou možnosťou môžeme dospieť k určeniu skupinovej príslušnosti, čím sa osoba alebo predmet zaradi do určitej skupiny. Treťou možnosťou je zaradenie a definovanie pevných, plyných alebo kvapalných látok k ich základnému druhu. V neposlednom rade ide o zisťovanie poznatkov ako je stav skúmaného objektu, zisťuje sa mechanizmus vzniku udalosti a vzniku stôp. [1]

1.2 Objekt kriminalistickej identifikácie

Nie každý objekt je vhodný pre kriminalistickú identifikáciu. Konkrétnym objektom môžu byť len tie, ktorých súhrn špecifických vlastností je neopakovateľný, a preto umožňuje ich individuálne stotožnenie.

V procese vzájomného pôsobenia objektov vzniká materializovaný odraz, ktorý nazývame znak. Tento obsahuje určitú vlastnosť objektu a tak dochádza k uchovaniu informácie o tomto objekte a možnému budúcemu využitiu. Identifikačné znaky sú teda všeobecné a špecifické vlastnosti, ktoré obsahuje stopa trestného činu a porovnávací materiál. Súhrn neopakovateľných vlastností, teda špecifických identifikačných vlastností patrí len určitému objektu, ktorý je nazývaný identifikačné pole. Napríklad vonkajšia stavba papilárnych línií je jednou radou identifikačných polí človeka a práve toto jediné pole postačí k identifikácii človeka. [2]

V prípravnom trestnom konaní sa pracuje s niekoľkými ďalšími pojmami, ako hľadaný alebo preverovaný objekt, pričom hľadaný objekt je taký, ktorý mohol danú

kriminalistickú stopu vytvoriť odrazom svojich vlastností alebo zanechal časť zo svojho celku. Preverovaný objekt mohol danú stopu vytvoriť, a preto je skúmaný.

Do procesu kriminalistickej identifikácie spravidla vstupuje niekoľko objektov, ktorých úloha v procese identifikácie je rôzna. Rozpoznávame objekty stotožňované a stotožňujúce.

Stotožňovaný (identifikovaný) objekt je taký, ktorý má jednoznačnú súvislosť s vyšetrovaným prípadom. Je to objekt, ktorý sa odrazil v stope alebo inom odraze a preto je podrobený identifikácii. [2]

Stotožňujúci (identifikujúci) objekt je taký, ktorý zobrazuje vlastnosti stotožňovaného objektu, s ktorého pomocou identifikujeme osoby, prípadne predmety. [2]

1.3 Princíp kriminalistickej identifikácie

Kriminalistická identifikácia vychádza zo štyroch základných princípov.

Princíp individuálnosti objektu – je vylúčené, aby dva objekty mali absolútne rovnaké všetky svoje vlastnosti. Musí ísť o objekty materiálneho sveta s relatívne stálymi priestorovými hranicami (priestorovo neohraničené látky ako sú plyny alebo kvapaliny môžu byť v rôznych prípadoch celkom identické). Individuálnymi objektmi kriminalistickej identifikácie sú osoby, zvieratá, predmety. Priestorovo ohraničené objekty môžeme individuálne identifikovať, pretože okrem všeobecných vlastností majú i vlastnosti špecifické. Všeobecné vlastnosti vznikajú vždy u všetkých objektov a sú vždy spoločné pre určitú skupinu objektov (obuv, strelná zbraň). Špecifické vlastnosti (individuálne identifikačné znaky) sú náhodné a spojené s procesom vzniku konkrétneho objektu a podmienkami jeho existencie (používaním, opotrebovaním, vývojom konkrétneho človeka a pod.) [3]

Princíp relatívnej stálosti objektov – medzi okamžikom spáchania trestného činu a jeho vyšetrovaním ubehne rôzne dlhá doba a objekty v tejto dobe podliehajú zmenám. Pôsobia na ne vplyvy poveternostné, fyzikálne, chemické a ďalšie zmeny, ktoré ovplyvňujú ich stabilitu. Pre úspešnú kriminalistickú identifikáciu je dôležité, aby zmeny na objektoch, či ide o stopy alebo porovnávacie materiály boli čo najmenšie. Čím viac je objekt stálejší, tým je cennejší pre identifikáciu. [3]

Spôsobilosť objektov prejavovať svoje vlastnosti navonok – objekty odrážajú a zanechávajú svoje všeobecné i špecifické vlastnosti vo vonkajšom prostredí, teda

vytvárajú stopy. Kriminalisti pri svojej činnosti využívajú rôzne databázy a moderné prostriedky identifikácie a vďaka nim sú schopní individuálne identifikovať daný objekt, ktorý stopu vytvoril alebo ktorý je s ním spojený. [3]

Princíp totožnosti – znamená, že sa objekt musí v dvoch či viacej znakoch zhodovať sám so sebou aby ho bolo možné identifikovať. Objekt odrážajúci zobrazí objekt odrážaný a to isté platí aj naopak. [3]

1.4 Metódy kriminalistickej identifikácie

Kriminalistická identifikácia a kriminalistická metóda sú dva samostatné pojmy v kriminalistickej vede, kde len súčasným uplatnením postupu kriminalistickej identifikácie a kriminalistickej metódy naplňujeme rámec kriminalistického poznávania. Oprávnenie nieť označenie kriminalistická môže mať len taká identifikácia, pri ktorej sa uplatnia špecifické poznatky vypracované kriminalistikou a použijú sa špecifické metódy a prostriedky kriminalistiky. [3]

Kriminalistickú metódu môžeme využiť aj pri riešení problémov iných vedných odborov, pričom nejde o kriminalistickú identifikáciu. Podobne ak využijeme pri riešení problémov kriminalistiky iné ako kriminalistické metódy, nejde sa o kriminalistickú identifikáciu. Kriminalistická metóda má vedecký základ presne definovaný a musí byť takisto zohľadnený v plnom rozsahu a bez výnimiek.

Ako príklad môžeme uviesť kriminalistickú daktyloskopiu, ktorá využíva poznatky genetiky, a to že papilárne línie vytvárajú na posledných článkoch prstov obrazce, ktoré nepodliehajú zákonom dedičnosti a sú pre každú osobu individuálne. Základom kriminalistickej metódy porovnávania daktyloskopických stôp je, že postačuje nájsť desať markantov zhodnej topografie, aby sme mohli obrazce považovať za rovnaké. Z uvedeného vyplýva, že vedecký základ kriminalistickej metódy je iný ako teoretický odkaz genetiky, no rešpektujúci vedecké poznatky.

V súčasnej kriminalistickej identifikácii existuje celý rad kriminalistických metód, ktoré sú využívané pri identifikácii osôb, zvierat a vecí. Používané metódy sa pri jednotlivých druhoch líšia, no nie je možné ich striktne rozdeliť do kategórii, v ktorých by sa mala identifikovať len jedna skupina, pretože v množstve prípadov môžeme využiť jednu metódu na všetky okruhy objektov.

1.5 Daktyloskopické skúmanie osôb

Daktyloskopia je charakterizovaná ako náuka o obrazcoch papilárnych línií vytvorených na vnútornej strane článkov prstov, na dlaniach a na prstoch nôh a chodidiel. Vychádza sa z poznatkov, ktoré dali podklad pre vznik troch daktyloskopických zákonov:

- 1/ na svete nie sú dvaja jedinci, ktorí by mali rovnaké obrazce papilárnych línií,
- 2/ obrazce papilárnych línií zostávajú po celý život relatívne nemenné,
- 3/ papilárne línie sú relatívne neodstrániteľné. [3]

Daktyloskopia umožňuje identifikovať osobu, ktorá stopu vytvorila, a tak nevyvrátiteľne preukázať jej prítomnosť na mieste činu. Zaistené daktyloskopické stopy, či už na mieste činu alebo zaistené ako porovnávací materiál, môžeme veľmi dobre uchovať v zbierkach pre neskoršie využitie.

Daktyloskopické stopy vznikajú kontaktom časti pokožky pokrytej papilárnymi líniami s predmetom, na ktorom zanechá obrazce papilárnych línií. Takto zanechaná stopa môže byť viditeľná alebo skrytá. Viditeľné sú plošne navrstvené stopy (krvou zašpinené bruško prstu), plošne odvrstvené stopy (páchatel' chytil zašpinený predmet) alebo stopy plastické (vzniknuté tlakom prstu napr. do plastelíny). Skryté (latentné) daktyloskopické stopy sa vyskytujú najčastejšie. Vznikajú prenosom potu na pokožke na plochu nosiča stopy (odtlačok na pohári). [4]

Daktyloskopické stopy sa zaisťujú in natura (vrátane nosiča) zvýraznením (*Obr. 1*) a nanosením na daktyloskopickú fóliu, pásku alebo fotograficky. Na mieste činu je dôležité, aby kriminalistický technik využil k odhaleniu daktyloskopických stôp všetky dostupné metódy.



Obr. 1 Zvýrazňovanie odtlačku prstu [5]

Mimo štandardného zaistenia odtlačku prstov sa v súčasnej dobe pracuje na vylepšení metódy zaistenia odtlačkov. Každý nájdený odtlačok by sa pripravoval v dvoch krokoch. Najskôr sa popráši špeciálnym púdom a potom sa jemne postrieka kvapalným rozpúšťadlom. Výsledkom toho je vznik drobných kryštálov, ktoré uchovávajú tvar odtlačku a zároveň v sebe uchovávajú aj jeho chemické zloženie, vďaka čomu je možné odtlačok využiť dvakrát. V prvom prípade klasickým porovnaním odtlačku v databáze. Druhýkrát by sa tento odtlačok využil k podrobnej chemickej analýze, z ktorej je možné zistiť, čoho sa podozrivý dotkol, prípadne čo sa deje v jeho tele. Chemická analýza sa vykonáva pomocou hmotnostnej spektrometrie, ktorá môže poskytnúť zaujímavé informácie pre vyšetrovateľov. Výhodou je, že tieto informácie sa dajú získať aj z čiastočného odtlačku prstu, ktorých kriminalisti nachádzajú veľa, ale na priamu identifikáciu páchatel'a nie sú vhodné. Takýto postup znamená aj úsporu času pri identifikácii páchatel'a.

1.6 Kriminalistické biologické skúmanie osôb

Hlavným cieľom kriminalistickej biológie je identifikovať jedinca a to buď priamo alebo nepriamo. Až donedávna nebola konkrétna identifikácia možná, všetko sa zmenilo využitím deoxyribonukleovej kyseliny (analýza DNA).

Kriminalistická biológia je aplikovanou biologickou vedou, ktorá slúži kriminalistickej praxi vyhľadávaním, zaisťovaním, skúmaním a vyhodnocovaním biologických stôp ľudského, zvieracieho alebo rastlinného pôvodu. [3]

Biologické stopy sú nositeľmi radu cenných informácií, ktoré sú využiteľné pre odhaľovanie najrôznejších trestných činov. Nevyužívajú sa len pre identifikáciu osôb, ale môžu pomôcť aj pri stanovení doby smrti pomocou hmyzu a rastlín na mŕtvoľe. [6]

Pre kriminalistickú prax sú najdôležitejšie biologické stopy ľudského pôvodu, ktorý môžeme rozdeliť do troch skupín podľa mechanizmu ich oddelenia od ostatku organizmu:

1/ samovoľné (spontánne) odlúčený materiál bez použitia násilia, ktorý je prejavom životných funkcií jedinca a látkovej výmeny (moč, pot, sliny, vlasy, slzy, chlpy, ejakulát, kožné šupiny a iné),

2/ materiál oddelený pôsobením vonkajším násilím, ktorého pôvodcom môže byť páchatel' trestného činu, zvierat (krv, časti pokožky, nechty, tkanivo a iné)

3/ materiál zo zaniknutého organizmu (mŕtvoľy, časti tiel, kostrové nálezy a iné).

Biologické stopy sa najčastejšie vyskytujú na miestach trestných činov. Cieľom biologického skúmania je zistenie DNA, prípadne určenie krvnej skupinovej vlastnosti. V praxi je tiež významné skúmanie hmyzu, ktorý bol nájdený v mŕtvolách alebo pod telami mŕtvol, z dôvodu, že v ňom môžu byť obsiahnuté látky, ktoré by mohli mať súvis so smrťou človeka, alebo pomocou hmyzu sa dá určiť približná doba smrti. [6]

1.6.1 Zaisťovanie a skúmanie biologických stôp

Uvedené stopy môžu mať charakter stôp viditeľných alebo neviditeľných (latentných). Pri viditeľných stopách nie sú zvyčajne problémy, keďže sú vizuálne zrejme. Horšie vyhľadávanie môže nastať pri malých vzorkách, ktoré nie sú na prvý pohľad viditeľné alebo splývajú s podložíom. Prítomnosť latentných stôp môžeme len predpokladať, aj pri väčšom množstve sú menej viditeľné, na niektoré nás môže upozorniť zápach. Ich vyhľadávanie sa vykonáva pomocou kriminalisticko-technických metód alebo chemickými postupmi. Využívajú sa UV zariadenia, prípadne postreky luminalom. [6]

Pri zaisťovaní biologických stôp je nutné rešpektovať všeobecné požiadavky. Dôležité je stopu zaistiť čo najskôr, aby nepodľahla rozkladu a nebola ovplyvnená inými vonkajšími vplyvmi. Zároveň je nutné dodržiavať určité hygienické návyky, používať ochranné pomôcky a vyvarovať sa kontaminácie. Taktiež je však nutné dávať pozor na zdravotné riziká, ktoré môžu hroziť osobám manipulujúcim so zaisteným biologickým materiálom. V kriminalistickej praxi musíme rešpektovať nasledujúce špecifiká:

- Nikdy sa nedotýkať nájdeného materiálu rukou bez ochranných pomôcok (chirurgických rukavíc) z dôvodu kontaminácie biologického materiálu. Tým by došlo k ovplyvneniu následného skúmania. Zároveň by mohlo dôjsť i k prenosu choroboplodných zárodkov zo stopy na osobu, ktorá ju zaisťuje.
- Pokiaľ je to možné, zaistiť celé predmety, ktoré sú nositeľmi biologickej stopy. Následne si znalec určí, aké množstvo vzorky je potrebné na správne skúmanie. Týmto sa má zamedziť znehodnoteniu biologickej stopy.
- V prípadoch, keď nie je možné zaistiť stopu s jej nosičom, sa musí vykonať dôkladné odobratie stopy z podkladového materiálu. Využívajú sa na to mechanické alebo fyzikálne spôsoby. Mechanické zaistenie spočíva v zoškrabaní zaschnutej stopy pomocou ostrých nástrojov alebo prenesení stopy pomocou pinzety do sterilného obalu. Pri fyzikálnom zaistení stopy dochádza k zmývaniu

stopy na vatový tampón, ktorý je zvlhčený destilovanou vodou alebo fyziologickým roztokom.

- Biologické stopy a ich nosiče sa na skúmanie zasielajú suché, inak by mohli byť napadnuté plesňami alebo iným mikroorganickým procesom. To by mohlo zmeniť vlastnosti zaistenej stopy a ovplyvniť výsledok skúmania. Pokiaľ nie sú zaistené stopy ihneď odosielané, je vhodné uložiť ich do chladiaceho zariadenia. Vždy je potrebné dodržať stanovené časové lehoty pre odovzdanie zaistenej stopy.
- Pre zaistenie stopy je najvhodnejšie použiť papierové obálky, do ktorých sa dá umiestniť väčšina biologických stôp. Tieto obálky sú na rozdiel od plastových obalov priepustné a umožňujú doschnutie zaistenej stopy. Tekuté stopy sa zaistujú do sklenených obalov, skúmaviek. [6]

Dôležitou podmienkou pre ďalšie skúmanie je zaistenie porovnávacieho materiálu. Skúmanie biologických stôp prebieha v štyroch fázach, ktoré na seba vzájomne nadväzujú. Ide o orientačné skúšky, špecifické skúšky, rozlíšenie stôp, bližšiu špecifikáciu biologického materiálu. V niektorých prípadoch je možné niektorú fázu vylúčiť. Môže to byť z dôvodu, že pre presnú identifikáciu postačí prevedenie len niektorých fáz alebo v prípade keď je zaistené množstvo biologickej stopy veľmi malé a v konečnej fáze by mohla chýbať.

1.6.2 Právna úprava odberu biologického materiálu

Pre bližšie skúmanie vzorky (najmä pri analýze DNA) sa vykonáva porovnanie biologického materiálu zaisteného na mieste činu s biologickým materiálom porovnávacím, ktorý bol za týmto účelom odobratý fyzickej osobe. Podľa zásahu do telesnej integrity delíme odbery na invazívne (odber krvi) a neinvazívne (odber pomocou steru). Toto delenie je zreteľné priamo zo zákona. Všetky tieto odbery sa vykonávajú v súlade s ustanovením §114 ods. 2 trestného poriadku, ktorý znie:

Ak je k dôkazu potrebné vykonať skúšku krvi alebo iný odborný úkon, je osoba, o ktorú ide, povinná strpieť, aby jej lekár alebo odborný zdravotnícky pracovník odobral krv alebo u nej vykonal iný potrebný úkon, ak nie je spojený s nebezpečenstvom pre jej zdravie. Odber biologického materiálu, ktorý nie je spojený so zásahom do telesnej integrity osoby, ktorej sa takýto úkon týka, môže vykonať aj táto osoba alebo s jej súhlasom orgán činný v trestnom konaní. Na požiadanie orgánu činného v trestnom konaní

môže tento odber i bez súhlasu podozrivého alebo obvineného vykonať lekár alebo odborný zdravotnícky pracovník. [7]

Je teda zrejmé, že policajný orgán môže podľa súčasnej právnej úpravy vymáhať identifikačné úkony, ktoré nie sú spojené so zásahom do telesnej integrity osoby napriek odporu a proti vôli. Musí však ísť o osobu podozrivú alebo obvinenú. Pri podozrivej osobe je nutný aj súhlas štátneho zástupcu. Toto ustanovenie bolo posilnené v súvislosti s novelou z roku 2006, ktorá do paragrafu včlenila nový štvrtý odstavec. Na novú úpravu reagoval aj zákon o Polícii. Súčasná právna úprava aplikuje zásady trestného poriadku v niekoľkých ustanoveniach. Jedným z nich je §63 ods. 4 a 5 zákona o Polícii:

Ak nie je možné totožnosť predvedenej osoby zistiť na základe uvedených údajov ani v dostupných evidenciách, je policajt oprávnený získať informácie potrebné k jej stotožneniu odobratím daktyloskopických odtlačkov, zisťovaním telesných znakov, meraním tela, zhotovovaním obrazových, zvukových a iných záznamov a odoberaním biologických vzoriek umožňujúcich získanie informácií o genetickom vybavení. Ak nie je možné úkon podľa odstavca 4 pre odpor vykonať, je policajt oprávnený tento odpor prekonať. Spôsob prekonania odporu musí byť primeraný intenzite odporu. Prekonať odpor osoby nemožno, ak ide o odber krvi alebo iný obdobný úkon spojený so zásahom do telesnej integrity. [7]

Pre policajné orgány je rozhodujúci Záväzný pokyn policajného prezidenta č. 88/2002 zo dňa 29. 5. 2002 k naplňovaniu, prevádzkovaniu a využívaniu Národnej databázy DNA.

1.7 Mikrobiálna kriminalistická analýza

Mikroorganizmom sa darí nielen vo vnútri ľudského tela ale aj na ňom. Jedným z najväčších stanovišť mikroorganizmov je povrch ľudskej kože, ktorá ukrýva veľké množstvo baktérii. Tieto baktérie sa uvoľnia pri dotyku s predmetom, čím sa na danom predmete zanechá trvalá stopa – bakteriálny odtlačok. Baktérie môžu pretrvať na povrchu predmetu dlhšiu dobu, pretože mnohé z nich sú odolné voči poveternostným vplyvom, teplote, vlhkosti aj UV žiareniu. [8]

Mikrobiálna forenzná analýza bola definovaná ako vedný odbor, určený na analýzu dôkazov z bioterorizmu, trestného činu vykonaného použitím mikroorganizmov alebo toxínov a na objasnenie takýchto trestných činov. Mikrobiálna analýza je stále v štádiu

vývoja a snaží sa vyšetrovateľom ponúknuť nové nástroje a techniky pre identifikáciu páchateľa. [9]

Hoci je mikrobiálna forenzná analýza vo vývoji, hľadá techniky a metódy, ktoré by slúžili pre čo najlepšie dosiahnutie výsledkov. Rovnako ako ostatné vedné odbory musí byť náležite preskúmaná a overená pred zavedením do praxe. Tiež sa musí preukázať, že výsledky získané touto analýzou budú zodpovedať pre kriminalistické a právne dokazovanie. Mikrobiálna analýza sa rozvíja pomocou príbuzných vedných odborov, pretože sa zaoberá nespočtým množstvom organizmov vrátane vírusov, baktérii, húb, parazitov a toxínov, ktoré tieto organizmy produkujú. Tiež skúma, či vlastnosti týchto organizmov neboli geneticky alebo chemicky upravené. [9]

1.7.1 Využitie mikroorganizmov v kriminalistickej detekcii

Nielen DNA je pre každého jedinečná, ale aj zloženie baktérii, ktoré sa nachádzajú na našej koži a dotykom sú prenášané na predmety, s ktorými manipulujeme, je rovnako individuálne ako odtlačok prsta. Preto sa mikrobiálna forenzná analýza zaoberá týmto poznatkom, ktorý by sa využíval ako nový nástroj identifikácie. S rozvojom techniky sa objavujú nové možnosti identifikácie páchateľa, aj keď na mieste činu nezanechal odtlačok prsta pre daktyloskopické skúmanie alebo vzorky pre identifikáciu pomocou DNA.

Nedávne výskumy mikrobiálnych kolónii na ľudskej pokožke ukázali veľkú variabilitu baktérii a funkciu mikroorganizmov a preukázali, že zloženie týchto mikrobiálnych kolónii ostáva dlhšie časové obdobie nemenné. Tieto pozorovania naznačujú, že jedinci môžu byť jednoznačne a trvalo identifikovaní na základe ich rezidentnej mikroflóry. [10]

2 KRIMINALISTICKÁ GENETIKA

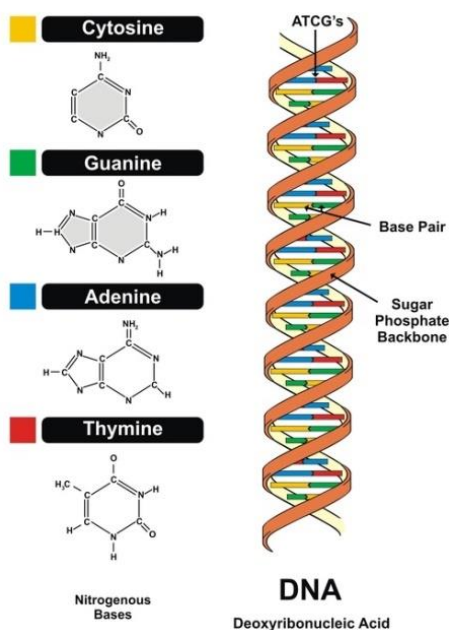
Aj keď štruktúra molekuly DNA bola popísaná pred viac než šesťdesiatimi rokmi, jej využitie na identifikáciu človeka je záležitosťou posledných troch desaťročí. Rozvoj tohto kriminalistického odboru zapríčinil objav amerického vedca Oswalda Averyho, ktorý označil DNA ako molekulu uplatňujúcu sa v prenose dedičných znakov.

Kriminalistická genetika je vedná disciplína, vďaka ktorej metódam sme schopní docieľiť presnú individuálnu identifikáciu osôb. Pre túto vednú disciplínu sa častejšie využíva označenie forenzná genetika, ktorá sa delí na tri hlavné odvetvia. Prvým je kriminalistická genetika, ktorá skúma predovšetkým stopy zanechané na mieste trestného činu s cieľom spojiť ich s páchatelom. Druhým je identifikačná genetika, pod ktorú spadá napríklad určovanie identity neznámych osôb, a tretím odvetvím je kognitívna¹ genetika, ktorá sa zaoberá príbuzenskými vzťahmi. [3]

2.1 DNA

Deoxyribonukleová kyselina, ktorej skratka DNA pochádza z anglického deoxyribonucleic acid, je vysoko molekulová látka nachádzajúca sa v bunkových jadrách všetkých organizmov. Jej štruktúra je veľmi dobre preskúmaná. Skladá sa z dvoch reťazcov a každý reťazec je zložený z veľkého množstva lineárne usporiadaných základných stavebných jednotiek – nukleotidov, pričom platí, že ak poznáme sekvenciu jedného reťazca DNA, poznáme aj odpovedajúcu sekvenciu druhého reťazca (*Obr. 2*). Informácia zapísaná v DNA sa dedí z bunky do bunky ale aj z jedinca na potomstvo. [11]

¹ poznávanie, poznávacia schopnosť



Obr. 2 Štruktúra DNA [12]

2.2 Metódy analýzy DNA

Metódy, ktoré sú využívané pri porovnávaní vzoriek deoxyribonukleovej kyseliny je veľké množstvo. Ich použitie sa veľmi často prelína a kombinuje. Medzi najpoužívanejšie metódy môžeme zaradiť:

1. **PCR** - polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia) je proces, ktorý je používaný k vytvoreniu niekoľko miliónov kópií vzorového fragmentu DNA s maximálnou dĺžkou 10 000 nukleotidov, čo umožňuje vykonať analýzu DNA i z veľmi malej vzorky.
2. **RAPD** - random-amplified polymorphic patří medzi menej presné metódy. Vďaka svojej jednoduchosti a menšej náročnosti sa využíva často ako predtest.
3. **RFLP** - restriction fragment length polymorphism (polymorfizmus dĺžky štepených fragmentov) je metóda, ktorej podstatou je enzymatické štiepenie molekúl DNA v špecifickom štepenom mieste enzýmom. Každý typ enzýmu štepí cieľovú DNA v rôznych miestach v závislosti na sekvenciách DNA. Po rozdelení vzniknutých fragmentov pomocou gélovej elektroforézy môžeme na základe počtu a veľkosti fragmentov sledovať rozdiely v sekvenciách – polymorfizmy, ktoré sú spôsobené

prestavbami v študovaných miestach, zapríčinené zmenou počtu reštrikčných² miest.

4. **STRP** - short tandem repeat polymorphism je moderná, dnes najvyužívanejšia metóda, ktorá sa podobá RFLP metóde, pracujúca s inak získanými fragmentmi DNA. 99% DNA majú spoločných všetci ľudia. Vyskytujú sa miesta, ktoré neslúžia ku kódovaniu génov a sú tvorené opakovaním krátkeho motívu, opakujúceho sled 2 – 4 nukleotidov, ktorých podoba a dĺžka je výrazne individuálna. [11]

2.3 Získavanie a analýza stôp DNA

Fyzická stopa je hmatateľný objekt, vďaka ktorému môžeme páchateľa spojiť s trestnými činom. Biologická stopa obsahujúca DNA je tiež typ stopy fyzickej. Aj keď nie sú takéto stopy na prvý pohľad viditeľné, testovanie DNA rozširuje typy použiteľných stôp. Všetky biologické stopy nájdené na mieste činu môžu byť podrobené testovaniu DNA.

Bežným spôsobom získania DNA materiálu je bukálny (lícný) ster, ktorý spočíva v stere buniek z dutiny ústnej sterilným tampónom na drevenej tyčinke z vnútornej strany úst. Tá sa následne vloží do pripravenej skúmavky, v ktorej je zasielaná na laboratórne spracovanie. Táto metóda sa využíva aj pre odber porovnávacích vzoriek. [3]

Ako rutinne geneticky spracovateľné biologické stopy označujeme tie materiály ľudského pôvodu, v ktorých zostalo zachované bunkové jadro. Najčastejšie ide o krvné stopy, kde je DNA izolovaná z leukocytov a uvoľnených buniek tkaniva krvného obehu. Ďalej sú to stopy slín, epidermické³ bunky uvoľnené z pokožky na miestach kontaktu, bunky zachytené na koreničkoch vlasov, spermie alebo uvoľnené bunky v telových sekrétoch. To znamená, že DNA môže byť získaná z prepoteného oblečenia, oliznutej známky, použitej žuvačky, ohorkov cigariet a iných biologických vzoriek. Všade kde daná osoba zanechá svoje biologické stopy, zanechá aj svoju DNA. [11]

V momente, keď sa vzorka doručí na genetické oddelenie napr. Kriminalistického ústavu Praha, je potrebné ju preskúmať, to znamená určiť, aká metóda sa pre izoláciu DNA

² zmenšovanie, zmenšenie (napr. počtu, množstva)

³ kožné

použije. Po vykonaní DNA analýzy sa vytvára takzvaný profil DNA, čo sú vybrané znaky, ktoré sa zapisujú ako kombinácia písmen a čísiel, takže je možné ich uložiť do databázy a v priebehu okamžiku porovnať. Problémy môžu nastať len pri jednovaječných dvojčatách, ktoré majú DNA celkom rovnakú. [11]

2.4 Využitie DNA analýzy v kriminalistike

V súčasnej dobe sú analytické metódy kyseliny deoxyribonukleovej jedným z najrýchlejších sa rozvíjajúcich odborov kriminalistickej biológie. Skutočnosť, že je možné detailnú genetickú analýzu vykonať aj z niekoľko málo buniek, umožnila aplikáciou metódy DNA skúmať gény jedinca v kriminalistickej praxi. Analýza DNA umožňuje spoľahlivo identifikovať jedinca, v kriminalistike sa začala využívať na prelome 80. a 90. rokov s rozvojom techniky a metód skúmania. V ČR a SR sa táto metóda začala využívať približne o 10 rokov neskôr. Analýza DNA sa v kriminalistike využíva najviac pre určenie totožnosti ľudského jedinca na základe biologických stôp.

Pre kriminalistiku je dôležité, že zdroj kyseliny deoxyribonukleovej je špecifický a nepodlieha žiadnym veľkým zmenám. Pomocou genetickej analýzy je možné identifikovať páchatel'a či jeho obeť, ale tiež napríklad určiť totožnosť obetí hromadných havárii. Môžeme tiež preukázať paternitu⁴ a to i po smrti otca (exhumáciou tela). Kriminalistika na rozdiel od medicíny využíva na analýzu odlišné molekuly DNA, takzvané nekódujúce sekvencie, ktoré neposkytujú informácie o zdravotnom stave osoby. [3]

V oblasti vyšetrovania biologických materiálov má analýza ľudskej DNA mnoho predností pred metódami sérologickými a to najmä z týchto dôvodov:

- molekula DNA je oveľa stabilnejšia než antigény a enzýmy skúmané sérologickými metódami,
- molekuly DNA sú rovnaké vo všetkých bunkách daného jedinca, antigénne zloženie buniek sa líši podľa druhu skúmaného tkaniva,

⁴ určenie otcovstva

- v DNA je množstvo miest, v ktorých sa dvaja jedinci líšia. Literatúrou je uvádzané, že výskyt dvoch osôb s rovnakým profilom DNA nie je možné predpokladať (s výnimkou jednovaječných dvojčiat),
- metódy analýzy DNA sú oveľa citlivejšie než metódy sérologické a sú potvrdené príklady, keď k analýze DNA postačila DNA obsiahnutá v jedinej bunke,
- metóda DNA umožňuje spoľahlivo stanoviť pohlavie jedinca aj v prípadoch, keď iné známe metódy zlyhali. [11]

Na základe týchto skúseností môžeme konštatovať, že pre skúmanie DNA bol prepracovaný analytický aparát, ktorý má zásadný kriminalistický význam. V množstve prípadov je možná individuálna identifikácia osôb, čo doterajšie kriminalisticko–biologické metódy až na výnimky neumožňovali. Pre kriminalistickú prax sa tak po ekonomickom sprístupnení metódy ponúka možnosť jej využívania nielen na centrálnej úrovni ale aj na úrovni regionálnych kriminalistických expertíznych pracovísk.

2.5 Ochrana osobných údajov

Spolu s databázou DNA, kde dochádza k uloženiu týchto biologických vzoriek, naskytla sa tiež otázka ochrany osobných údajov, možnosti ich zneužitia, prípadne obava z toho, že niekto môže získať k dispozícii genetickú informáciu určitej osoby.

Dôležité je poznamenať, že v momente, keď sa získa zo vzoriek DNA časť, ktorá slúži k identifikácii v počítačovej databáze v podobe kódu, čísiel a písmen, je všetko ostatné zničené. Uchovávané sú len vzorky od páchatel'ov. Vzorky od podozrivých, ktorí boli vylúčení ako páchatelia, prípadne svedkovia, ktorí sa na mieste činu pohybovali a ich biologický materiál sa musí odlišiť od ostatných, sa musia zničiť a neuchováva sa ani zmenený profil DNA slúžiaci na identifikáciu.

Môžeme teda povedať, že informácia, ktorú zistíme z odtlačku prstu, je porovnateľná s informáciou, ktorú získame na základe DNA profilu. To, čo je uchovávané ako informácia získaná z našej DNA, nemôže už neskôr po uložení do databázy slúžiť na nič iné než na prípadnú identifikáciu alebo na stotožnenie osoby s biologickou stopou. [3]

S ochranou osobných údajov súvisí aj právna úprava pre odber porovnávacích vzoriek, ktorá je už popísaná v kapitole 1.6.2. Právna úprava odberu biologického materiálu.

2.6 Databáza DNA

Už niekoľko rokov po svojom objavení začala byť metóda DNA v širokom meradle využívaná políciou a v tejto súvislosti sa objavili aj úvahy o zriadení porovnávacej databázy, ktorá by zvyšovala pravdepodobnosť úspešného uplatnenia tejto metódy. Ako prvá na svete bola zriadená v roku 1995 Národná databáza DNA vo Veľkej Británii. Na medzinárodnej úrovni bolo rozhodnuté o zriaďovaní národných databáz DNA v roku 1997. Z praktických dôvodov je potrebné, aby vznikajúce databázy boli vzájomne kompatibilné a mohlo dochádzať k porovnávaniu jednotlivých genetických profilov v nich obsiahnutých. Tomuto výrazným spôsobom napomáha databázový systém CODIS, ktorý vyvinula americká FBI ako databázový software genetických profilov špeciálne pre kriminalistické účely a na základe dohôd ho poskytuje cudzím štátom bezplatne, vďaka čomu je na svete najrozšírenejší.

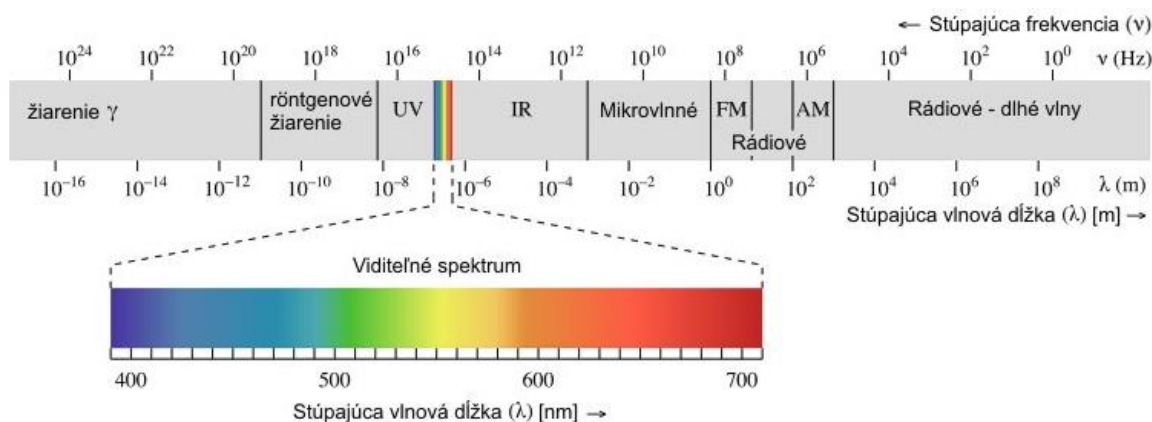
3 SPEKTROSKOPICKÉ METÓDY VO FORENZNEJ ANALÝZE

Forenzná analýza slúži predovšetkým na overovanie chemického zloženia látok a materiálov, zisťovanie chemických a fyzikálnych vlastností látok a určenie ich zloženia. Slúži účelom súdneho vyšetrovania, využívajúc analytické techniky, ktorých účelom je zistiť zloženie materiálov porovnávaním nájdenej vzorky so vzorkou známou.

Spektrometria môže v kriminalistike priniesť zaujímavé informácie aj z čiastočného odtlačku, ktorý nie je vhodný k identifikácii páchateľa. V zostatkoch kože a tekutinách, ktoré odtlačok vytvorila, zostanú okrem mikroorganizmov aj stopy látok, ktorých sa páchateľ dotýkal. Môžu to byť výbušniny, drogy alebo rôzne chemikálie.

Klasické metódy identifikácie baktérii sú založené na vlastnostiach, ako je rast na selektívnych médiách, vzhľad a farba kolónii. Ďalšou možnosťou je identifikácia pomocou biochemických reakcií alebo molekulárne-biologickými metódami. Tieto techniky dokážu baktérie presne identifikovať, sú však časovo náročné, čo je nevýhodné pri potrebe rýchlej identifikácie mikroorganizmov. V kriminalistike, kde sa vyžaduje identifikácia v čo najkratšom čase sú spektroskopické metódy veľmi užitočné.

Spektroskopia je fyzikálny odbor zaoberajúci sa vznikom a vlastnosťami spektier (Obr. 3). Metóda je založená na interakcii elektromagnetického žiarenia so vzorkou danej látky. Každá látka totiž na elektromagnetické žiarenie reaguje inak. Niektoré látky žiarenie absorbujú, iné naopak odrážajú alebo reagujú iným špecifickým spôsobom. Na základe týchto známych vlastností látok môžeme využitím vhodného typu spektroskopie odhaliť napr. nebezpečné látky, drogy, výbušniny, chemické látky ale aj mikroorganizmy. [13]



Obr. 3 Elektromagnetické žiarenie – široká oblasť vlnových dĺžok [14]

Zvolenie správnej metódy napomáha k správne mu určeniu druhu a zloženiu vzorky. Medzi najvyužívanejšie spektroskopické metódy v kriminalistickej detekcii patrí infračervená spektroskopia, ultrafialová a viditeľná spektroskopia, Ramanova spektroskopia, hmotnostná spektrometria a terahertzová spektroskopia, ktorou sa v tejto kapitole budem zaoberať najpodrobnejšie, nakoľko bola využitá v praktickej časti.

3.1 Infračervená spektroskopia

Infračervená absorpčná spektroskopia je založená na interakcii⁵ elektromagnetického žiarenia vlnočtov v rozmedzí 10 až 10000 cm^{-1} s meranou vzorkou. Energia tohto žiarenia je dostatočujúca na to, aby molekuly pri absorpcii zmenili svoj rotačný či vibračný stav. Táto zmena sa môže uskutočniť len prechodom medzi dvoma stavmi charakterizovanými rôznymi vibračnými či rotačnými číslami. [15]

Pri tejto metóde môžeme prakticky pracovať so vzorkami všetkých skupenstiev:

- tuhé látky – výhodná je metóda lisovaných tabliet. Z celistvých tuhých látok je možné na meranie vybrúsiť tenkú doštičku alebo urobiť fóliu,
- roztoky – pre ich prípravu je potrebné použiť nepolárne alebo málo polárne rozpúšťadlá a súčasne je treba počítať s tým, že v spektre budú pásy molekúl rozpúšťadla,
- plynné látky – merajú sa v kyvetách vybavených dvoma bočnými kohútikmi pre napojenie na plyn. Absorpčná dráha sa zvyšuje viacnásobným odrazom na pozlátých zrkadlách. [16]

Vo forenznej analýze nachádza táto metóda uplatnenie pri analýze drog, škvŕn alebo pri stanovovaní zloženia vlákien. [17]

3.2 Ultrafialová a viditeľná spektroskopia (UV / VIS spektroskopia)

Táto dnes najpoužívanejšia metóda je založená na absorpcii ultrafialového a viditeľného žiarenia molekulami analyzovanej vzorky. Najčastejšie sa používa žiarenie v rozmedzí vlnových dĺžok 200 – 800 nm. Menšie vlnové dĺžky sú zle merateľné kvôli veľkej absorpcii vzduchu. Pre meraní získame elektrónové spektrum keďže dochádza

⁵ vzájomné pôsobenie dvoch alebo viacerých činiteľov

pri pohlcovaní žiarenia k excitácii⁶ valenčných elektrónov. Ako bezfarebné sa nám javia látky absorbujúce žiarenie vlnovej dĺžky menšej ako 380 nm, teda žiarenie ultrafialové. Látky absorbujúce žiarenie vlnovej dĺžky 380 nm až 770 nm, teda viditeľné svetlo, sa nám javia ako farebné a umožňujú nám vidieť farbu komplementárnej⁷ farby pohltenej. [16]

Metódy pre meranie UV / VIS spektroskopie:

- kolorimetria – najstaršia optická metóda. Spočíva vo vizuálnom porovnávaní intenzity sfarbenia vzorky a štandardu. Porovnávame buď roztok vzorky so sadou rôzne koncentrovaných roztokov pri rovnakých hrúbkach absorpčnej vrstvy, alebo meníme hrúbku absorbujúcej vrstvy, pokiaľ sa nedosiahne zhodná absorbancia.
- fotometria – spočíva v objektívnom meraní prejdeného žiarivého toku. Na meranie sa používajú buď jednoduchšie fotometre (k vymedzeniu intervalu vlnových dĺžok používajú farebné filtre) alebo spektrofotometre. Prístroje sú jedno- alebo dvoj lúčové. [16]

Ultrafialové a viditeľné spektrá sa doplnkovo využívajú na identifikáciu neznámej organickej látky a riešeniu štruktúrnych otázok porovnávaním zameraného priebehu spektra so známymi spektrami. Zistenie zhody nie je dostatočné na vyvodenie záveru o preukázateľnosti identifikácie, pretože spektrá sú jednoduché a poskytujú pre identifikáciu látky obmedzené množstvo informácií. Získame však podklady, ktoré vhodne dopĺňujú informácie z meraní infračervených spektier a hmotnostných spektier. [16]

3.3 Ramanova spektroskopia

Ramanova spektroskopia je metóda vibračnej molekulovej spektroskopie, ktorá umožňuje skúmať štruktúru a zloženie látok na molekulovej úrovni. Metóda je vhodná pre analýzu kvapalín, pevných látok, plynov a slúži tiež napríklad pre analýzu povrchov, či analýzu biologických systémov (bunky, tkanivá, mikroorganizmy). [18]

Ramanova spektroskopia je založená na tzv. Ramanovom jave (rozptyle), kde monochromatický lúč dopadá na vzorku:

- väčšina dopadajúceho žiarenia prejde,

⁶ vybudenie

⁷ doplnkovej, dodatočnej

- približne 10^{-4} dopadajúcich fotónov je elasticky rozptýlených a dochádza len k zmene fotónu bez zmeny frekvencie (tzv. Rayleighov elastický rozptyl),
- časť fotónov môže byť absorbovaná elektrónovými preskokmi a potom emitovaná – fluorescencia,
- len nepatrné množstvo fotónov (cca 10^{-8}) je neelasticky rozptýlených a interaguje so vzorkou. [19]

Ramanova spektroskopia má v porovnaní s ostatnými analytickými metódami veľa výhod no samozrejme, má aj svoje nevýhody. Za hlavné výhody považujeme, že ide o bezkontaktnú a nedeštruktívnu metódu, ide o rýchlu analýzu bez náročnejšej prípravy vzorky, možnosti získania spektra aj z malej vzorky, analýza organických aj anorganických látok, analýza vzoriek cez obalové materiály, napr. plastové vrecká, obálky. K nevýhodám radíme nemožnosť využiť metódu pre väčšinu kovov a zliatin, citlivá vzorka môže podľahnúť teplotnej degradácii vplyvom intenzívneho laserového žiarenia.

Ramanova spektroskopia zaujala vo forenzných vedách dôležité postavenie, pretože je využívaná ako kriminalisticko-technický prostriedok pri znaleckom skúmaní vecných dôkazov a stôp a môže tak slúžiť dokonca aj na identifikáciu páchatel'a trestného činu. Môže byť využitá pri identifikácii auto lakov, analýze farieb, identifikácii narkotík, overovaní pravosti bankoviek a dokumentov, detekcii výbušnín či zostatku strelného prachu. [20]

3.4 Hmotnostná spektroskopia

Hmotnostná spektrometria je fyzikálno-chemická detekčná metóda, ktorá využíva separáciu urýchlených ionizovaných častíc (iontov) vo vákuu podľa ich hmotnosti pri ich priechode magnetickým a elektrickým poľom. [21]

Princíp hmotnostnej spektrometrie spočíva v rozdelení nabitých častíc podľa ich molekulových hmotností. Hmotnostný spektrometer separuje nabité častice podľa ich merného náboja a umožňuje ich stanovenie. Záznam molekulárnych a fragmentovaných iontov je charakteristický pre danú látku (proteín) a dáva cenné informácie o ich štruktúre a na jeho základe je možné väčšinou štruktúru látky odvodiť alebo potvrdiť. Hmotnostná spektrometria je citlivá metóda a umožňuje analyzovať látky v množstve až 10^{-15} g. Všetky tieto operácie prebiehajú v uzatvorenom priestore, kde je udržiavané vákuum. [21]

K identifikácii proteínu môžeme využiť jednoduchú a tandemovú hmotnostnú spektrometriu. Pri jednoduchej hmotnostnej spektrometrii je proteín naštepený proteolytickým enzýmom nie menším ako peptidy⁸, ktorých presné hmotnosti sú pomocou hmotnostnej spektrometrie zmerané. Spektrum týchto hmotností je potom porovnané s teoretickými spektrami, ktoré sú vypočítané zo sekvencií proteínov v dostupných databázach. Tandemová hmotnostná spektrometria využíva dva jednoduché hmotnostné spektrometre spolupracujúcich v kooperácii – tandeme. [21]

Hmotnostná spektrometria s laserovou despciou a ionizáciou za účasti matrice s preletovým analyzátorom je separačná technika, pomocou ktorej môžeme stanoviť molekulové hmotnosti biopolymérov (peptidov), bielkovín, oligosacharidov aj mikroorganizmov.

3.5 Terahertzová spektroskopia

Existencia terahertzových vln je známa až od začiatku 20. storočia. Dlhú dobu zostávalo toto zariadenie mimo záujmu kvôli technickým problémom pri jeho generovaní a detekcii. Výskum terahertzových systémov priniesol nové technologické pokroky, vďaka ktorým sa rozšíril potenciál a profil systémov terahertzovej spektroskopie. Terahertzová technológia sa stala veľmi atraktívnou oblasťou výskumu v rôznych odvetviach, najmä pri analýze chemických a biologických látok, aplikácii v medicíne a iných. [22]

3.5.1 Terahertzové vlny

Terahertzové vlny označujú oblasť elektromagnetického vlnenia o frekvencii v pásme medzi 100 GHz až 10 THz, čo zodpovedá vlnovej dĺžke menšej ako 3 mm a väčšej ako 30 μm . V elektromagnetickom spektre vyplňujú tieto vlny oblasť medzi mikrovlnným a infračerveným žiarením. Terahertzová oblasť bola dlhú dobu nevyužívanou oblasťou celého spektra a z tohto dôvodu bola označovaná ako terahertzová medzera. Terahertzové žiarenie preniká s nepatrným zoslabením väčšinou dielektrík (bežnými materiálmi, ako sú textílie, papier, drevo, umelá hmota). [23]

V porovnaní s relatívne dobre vyvinutými technológiami a všeobecne rozšírenými aplikáciami v oblasti mikrovln, stredne infračervených a optických pásiem je základný

⁸ produkty štiepenia bielkovín, ktoré sú zložené z aminokyselín

výskum a vývoj pokročilých technológií a aplikácii pre reálny svet v THz pásme stále v začiatkovej fáze vývoja. V poslednom desaťročí však zažívajú terahertzové technológie rýchly vývoj a umožnili aplikovať terahertzové snímanie a zobrazovanie v chemických, biologických a ďalších oblastiach rôznych odborov, a ukázali sa ako sľubná metóda pre aplikáciu v oblasti obrany a bezpečnosti. [23]

3.5.2 Zdroje terahertzového žiarenia

Terahertzové zdroje, ktoré je možné v praxi využiť môžu byť širokopásmové s pulznou vlnou alebo úzkopásmové so spojitou vlnou.

Väčšina širokopásmových pulzných zdrojov je založená na excitácii rôznych polovodičových materiálov pomocou ultrakrátkych laserových pulzov pomocou titan-safírového laseru. Najčastejšie metódy pre generovanie širokopásmových pulzných terahertzových zariadení sú fotovodivostné emitory⁹ a optické usmerňovanie. [23]

Pri metóde fotovodivostných emitorov sa vytvára optický laserový pulz (dĺžka trvania je 100 fs alebo menej) nosiča v polovodičovom materiály. Laserový pulz je zameraný na veľmi úzku medzeru (10 μm) dipólovej antény vytvorenej na polovodičovom substráte. Za predpokladu, že energia fotónov je väčšia než odstup pásma polovodiča, vytvorí sa páry elektrón – diera a polovodič sa tak mení z izolantu na vodič. Pokiaľ je aplikované dostatočne veľké predpätie, sú elektróny urýchlené, čím vznikne prúd, ktorý produkuje THz elektromagnetické vlny. [23]

3.5.3 Terahertzová detekcia

Pri detekcii terahertzových pulzov sa využívajú metódy fotovodivostnej a elektrooptickej detekcie. [24]

Pri našom meraní budeme pracovať s typom generovania terahertzového žiarenia, založenom na urýchľovaní častíc a časovo premennom napätí.

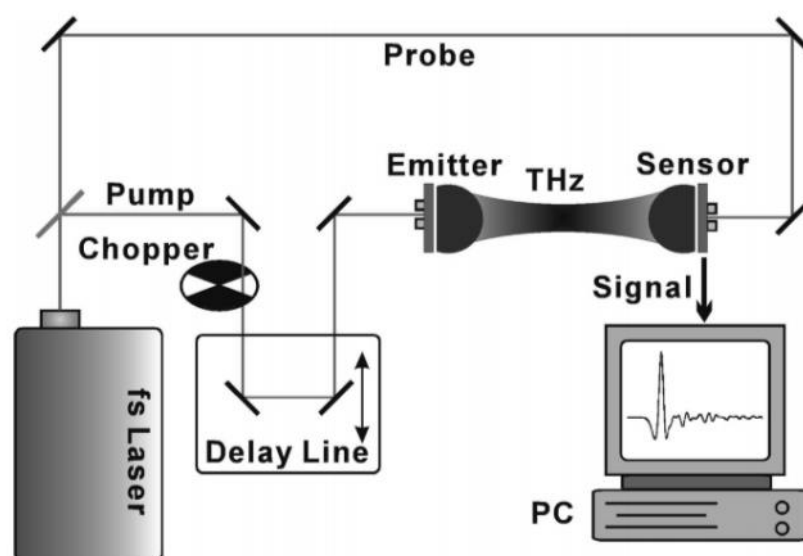
Základný princíp detekcie THz pola vo foto-elektricky vodivej anténe je prevažne zhodný s THz generovaním vo foto-elektrickom žiariči. Pri absencii napäťového pola indikuje THz pole prúd vo fotoelektricky vodivej medzere, za podmienky, že sú tu

⁹ elektróda tranzistora, z ktorej vychádza prúd

privedené fotoelektrické nosiče optického snímaného pulzu. Fotoelektrický prúd trvá tak dlho ako je veľká životnosť nosiča, ktorá by mala byť menšia než hustota THz pulzov pre časové rozlíšené meranie tvaru vlny. Vyvolaný fotoelektrický prúd je úmerný k veľkosti amplitúdy pola THz žiarenia zameraného na fotoelektricky vodivú medzeru. Tvar THz pulzu je snímaný v časovej závislosti meraním prúdu zatiaľ čo sa mení oneskorenie medzi THz pulzom a snímaným optickým pulzom. Typický fotoelektrický prúd je v rade nA, preto je pre meranie potrebný prúdový zosilňovač. V prípade zväčšenia odstupú medzi signálom a šumom je signál spracovaný synchronným zosilňovačom s modulátorom optickej intenzity ako je prerušovač optického lúča (optical chopper). Meraným parametrom je zosilnený prúd zodpovedajúci intenzite terahertzového pola. [24]

Elektrooptická detekcia je založená na zmene dvojlomu krištáľu v externom elektrickom poli, kedy určité krištáľové materiály v prítomnosti elektrického pola vykazujú dvojlom, čo znamená, že sa lúč v krištáli štiepi na dva lúče, z ktorých každý sa lomí pod iným uhlom tzv. Pocklesov jav. Dvojlom vyvolaný elektrickým polom terahertzového pulzu vedie k zmene optickej polarizácie detekovaného pulzu. Zmena polarizácie je úmerná intenzite elektrického pola. [24]

Na obrázku (Obr. 4) je zobrazená schéma THz-TDS merania, kde je lúč ultra rýchleho laseru rozdelený na budiaci (pump) a snímací (probe) lúč, zatiaľ čo budiaci lúč je iniciátorom vzniku THz pulzov a snímací lúč je určený pre ich detekciu. Optický budiaci signál je časovo predĺžovaný oneskorovacím komponentom (delay line). [25]

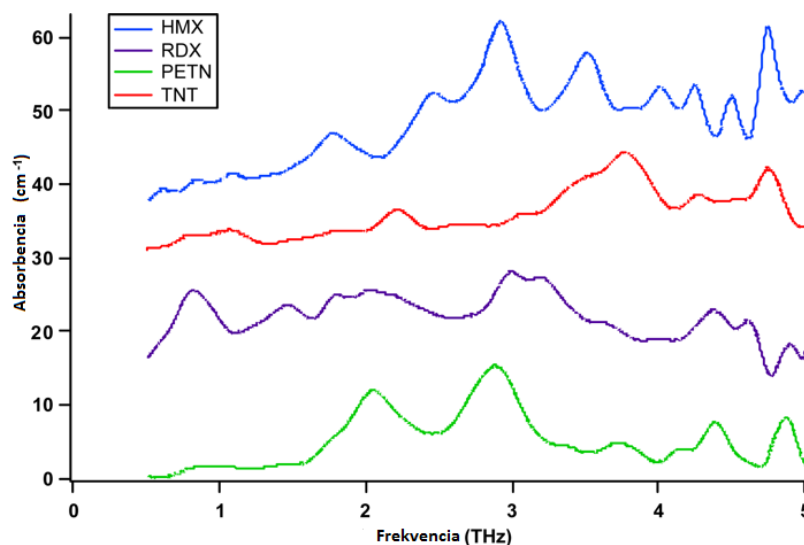


Obr. 4 Nastavenie generovania a detekcie THz pulzných vln [25]

3.5.4 Výhody a využitie terahertzovej spektroskopie

Terahertzová spektroskopia má svoje výhody aj nevýhody. Keďže ide o technológiu, ktorá je stále vo výskume, jej uplatnenie nie je oproti ostatným technológiám tak široké. Medzi výhody tejto technológie patrí, že terahertzové žiarenie je nedeštruktívne a neionizujúce, nepoškodzuje ani ľudské tkanivo, bez problémov prejde tenkými vrstvami nevodivých materiálov, má veľmi dobrú rozlišovaciu schopnosť a na rozdiel od Ramanovej spektroskopie žiarenie nevytvára nežiaduci luminiscenčný jav. K nevýhodám môžeme zaradiť stále prebiehajúci výskum tejto technológie, nepriepustnosť kovmi a vodou a to, že terahertzové žiarenie nepreniká hlboko do tkanív.

V bezpečnostnom priemysle nachádza terahertzová spektroskopia uplatnenie na letiskách, železničných staniciach a ďalších miestach so zvýšenou koncentráciou osôb. Vďaka určeniu spektra nebezpečných, výbušných (*Obr. 5*) či omamných látok je možné vykonávať kontroly osôb a predmetov bez toho, aby tieto osoby alebo predmety boli vystavené zdraviu škodlivému žiareniu.



Obr. 5 Terahertzové spektrá výbušnín [26]

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

4 NÁVRH EXPERIMENTU

Kriminalistika ako vedná disciplína neustále napreduje. Je to dané technologickým vývojom. Nástroje a možnosti pre identifikáciu páchatel'a sa čoraz viac zdokonaľujú. Odvetvie skúmania sa v dnešnej dobe vďaka technickým pokrokom presúva do skúmania mikrostôp alebo bakteriálnych stôp.

Nedávne prieskumy bakteriálnych kolónii žijúcich na ľudskej koži ukázali, že sú pre každého jedinca individuálne a na základe zanechaného bakteriálneho odtlačku je možné identifikovať osobu, ktorá daný odtlačok zanechala. Bakteriálne odtlačky je možné zo skúmaného predmetu za ideálnych podmienok odobrať aj po dlhšom čase.

Z tohto dôvodu je praktická časť práce zameraná na štúdium vybraných bakteriálnych vzoriek pomocou terahertzovej spektroskopie a mikroskopického skúmania. Meranie bolo vykonané na prístrojovom vybavení v laboratóriách FAI UTB.

Ciele praktickej časti:

- výber, identifikácia a príprava bakteriálnych vzoriek,
- zoznámenie sa s terahertzovým spektroskopom TPS Spectra 3000 a mikroskopom Axio Scope.A1,
- vyhodnotenie a porovnanie nameraných dát.

Pre merania sme využili baktérie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a baktérie kultivované z odtlačkov prstov pravej ruky, na ktorých sme merali mieru absorbanície na THz spektroskope TPS Spectra 3000. Pre odtlačky prstov bolo vykonané aj laboratórne vyšetrovanie v nemocničnom zariadení.

5 VÝBER A PRÍPRAVA VZORIEK

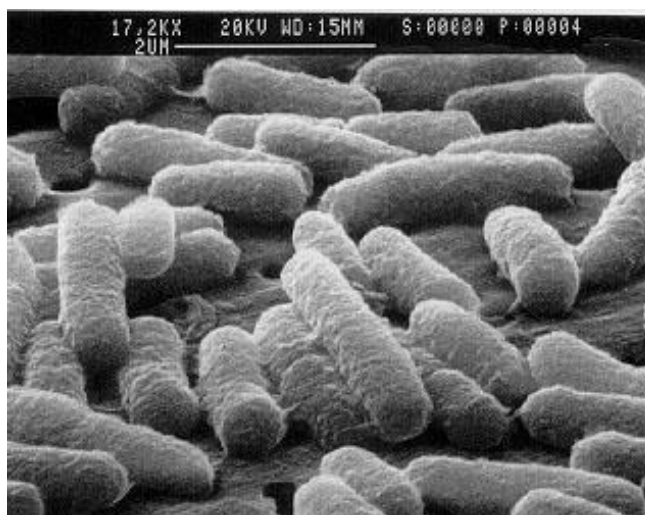
Baktériám sa darí nielen vo vnútri ľudského tela ale aj na ňom. Jedným z najväčších mikro-bakteriálnych stanovišť je povrch ľudskej kože, ktorý ukrýva veľké množstvo baktérii. Typickým príkladom je ruka, ktorá môže ukrývať až stovky unikátnych druhov. Počet a rozmanitosť zloženia baktérii je individuálna, závisí nielen na hygiene a pohlaví jedinca, ale aj na podmienkach spojených so životom človeka.

Prvým krokom pred samotnými meraniami bola príprava vzoriek baktérii, ktoré boli pre dané merania vybrané. Pre merania boli použité baktérie *Escherichia coli* skrátene *E. coli* a *Staphylococcus aureus* skrátene *S. aureus*, ktoré patria k známejším a najčastejšie sa vyskytujúcim baktériám u ľudí.

5.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*Obr. 6*) je baktéria, ktorá je súčasťou črevnej flóry človeka a ostatných teplotných živočíchov. Na základe antigénnej štruktúry sa rozlišuje okolo 700 sérovarov v druhu. Väčšina z týchto sérovarov je človeku prospešná a podstatne prispievajú k fyziologickým pomerom a vyváženým ekologickým vzťahom v črevnom trakte.

Produkujú množstvo látok, ktoré bránia premnoženiu patogénnych mikroorganizmov v črevnom trakte, majú tiež podiel na syntéze vitamínov. Zúčastňujú sa na odbúravaní nestráviteľných zvyškov potravy. [27]

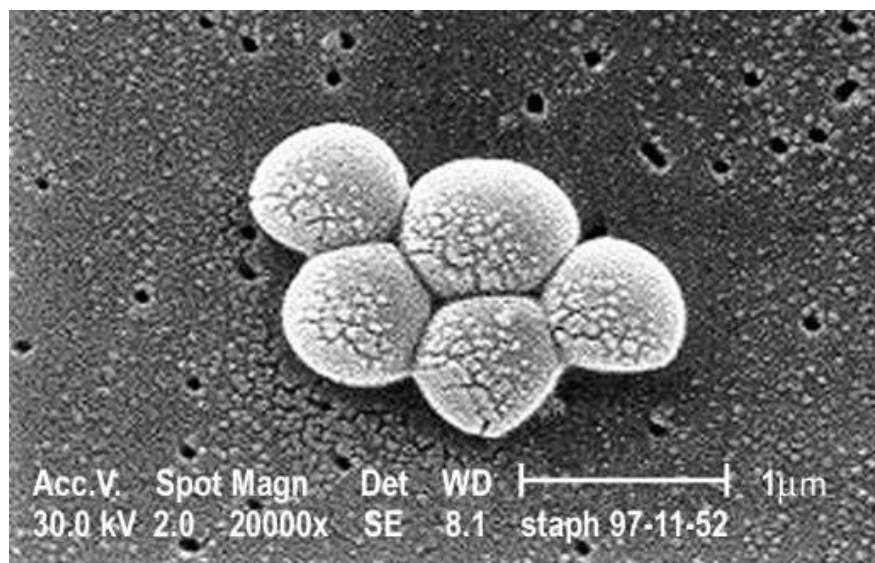


Obr. 6 Escherichia coli pod elektrónovým mikroskopom [27]

5.2 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (Obr. 7) sú koky zoskupené do strapcovitých tvarov. Sú najvýznamnejším patogénom rodu *Staphylococcus*, vyvolávajú mnoho infekcií u ľudí aj zvierat. Vyskytuje sa všade okolo nás - vo vzduchu, prachu, vode. Je súčasťou mikroflóry nosnej a ústnej dutiny ľudí aj zvierat.

U tretiny ľudskej populácie sa vyskytuje na koži. *Staphylococcus aureus* odoláva chladu, pri teplote vyššej než 60 °C neprežíva. [28]



Obr. 7 *Staphylococcus aureus* pod elektrónovým mikroskopom [28]

5.3 Bakteriálna kultúra

Baktérie potrebujú pre život a rozmnožovanie vhodné prostredie, ktoré musí obsahovať živiny, soli, stopové prvky a rastové faktory. Okrem toho je potrebný aj určitý obsah kyslíka a oxidu uhličitého, ako aj vhodná hodnota pH a správna teplota. Kým v prirodzenom prostredí baktérie sú tieto podmienky viac či menej ideálne, v laboratórnych podmienkach sa darí rastu baktérii len ak sú prirodzené podmienky prostredia simulované podľa možnosti čo najlepšie. Na kultiváciu baktérii sa používajú živné médiá. Do týchto médií sú pridané všetky potrebné živiny. [29]

Gél označovaný aj ako živný agar, obsahuje polysacharidovú agarózu, ktorá sa nad 96°C skvapalňuje a pod 40°C prechádza do gélovitého stavu. Agar je priehľadný, bezfarebný a bez chuti. Živné pôdy obsahujú jednopercentný agarový roztok a lejú sa do plastových alebo sklenených misiek nazývaných Petriho misky. Na povrchu platní môžu bakteriálne kultúry rásť a tvoriť tam kolónie. [29]

Očkovanie pôd v Petriho miske sme vykonali jednoduchým rozterom bakteriologickou kľučkou, ktorý sa používa vtedy, keď je potrebné získať čo najväčšie množstvo čistej kultúry mikroorganizmov. Pri očkovaní sa využila celá plocha živnej pôdy. Baktérie boli pripravované k meraniu aj na polyetylénovej fólii, ktorá bola po očkovaní pôdy vložená do Petriho misky. Následne sa baktérie dali kultivovať pri teplote 37 °C po dobu 12 hodín. Po tejto dobe sú baktérie pripravené pre meranie (*Obr. 8*), alebo sa uložia do chladiaceho zariadenia pre neskoršie meranie.



Obr. 8 Kultivované baktérie

E. coli na Petriho miske

5.4 Bakteriálne odtlačky prstov

Preto ďalším krokom v experimentálnej časti práce bola príprava vzoriek k meraniu z odtlačkov prstov pravej ruky, ktoré sa opatrne odtlačili do živného agaru v Petriho miskách (*Obr. 9*). Podobne ako pri bakteriálnych vzorkách sme baktérie kultivovali, avšak pri izbovej teplote po dobu 24 hodín. Následne sme vybrali jednotlivé bakteriálne kolónie,

ktoré boli rozlíšené rozdielnym sfarbením a skúmané pomocou mikroskopického merania na zariadení Axio Scope.A1. Tieto bakteriálne kolónie sme preočkovali samostatne na agar a opäť kultivovali.



*Obr. 9 Kultivované baktérie
z odtlačku prstenníka pravej ruky*

6 MERANIA BAKTERIÁLNYCH KULTÚR

Jednotlivé druhy baktérii boli merané pomocou terahertzovej spektroskopie využitím transmisnej spektroskopie a skenovacieho režimu odrazeného svetla. Ďalej sa baktérie skúmali pomocou mikroskopického pozorovania a tiež sa využilo laboratórneho vyšetrenia v nemocničnom zariadení.

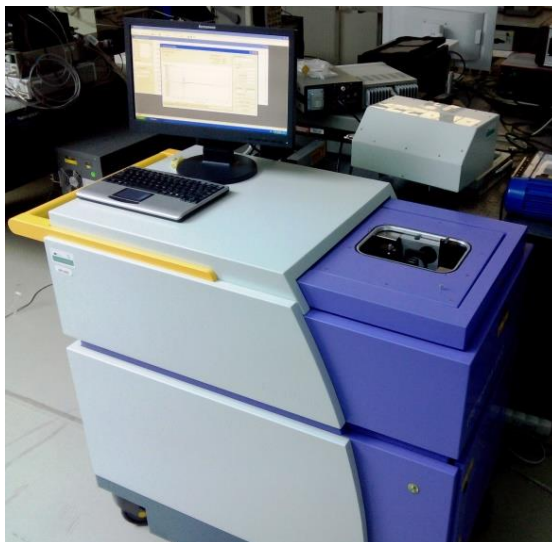
6.1 Spektroskopické merania vybraných vzoriek

Meranie bolo vykonané v laboratóriu FAI, kde je k dispozícii terahertzový spektrometer TPS Spectra 3000 (*Obr. 10*) od firmy TeraView Ltd., ktorý je prvým komerčným zariadením umožňujúcim vykonať spektroskopické merania a terahertzové zobrazenie skúmanej látky. Pre meranie bol využitý tzv. rapid-scan režim transmisnej spektroskopie, zobrazujúci spektrálnu charakteristiku skúmanej látky v reálnom čase. Pri tomto režime je vzorka snímaná 30x za sekundu pri rozlíšení 32 GHz. Použili sme aj skenovací režim odrazeného (reflexného) zobrazenia, pomocou ktorého vznikne obraz skúmanej vzorky. V tomto prípade čas merania závisí od požadovaného rozlíšenia snímky.

6.1.1 TPS Spectra 3000

TPS Spectra 3000 je terahertzový spektrometer, ktorý vykonáva merania pomocou prechodu žiarenia a absolútneho odrazu. Toto zariadenie umožňuje pulzné zobrazenie spektroskopického merania. Obsahuje:

- užívateľsky prístupnú základnú jednotku obsahujúcu laserový zdroj, uzatvorený optický systém a uzatvorený cyklus chladenia vody,
- uzatvorený elektronický systém založený na 16 bitovom digitálnom integrovanom procesore
- počítač, ktorý využíva software TeraView, umožňujúci ovládať spektrometer a nastavovať potrebné parametre,
- dostupné príslušenstvo: reflaktančný zobrazovací modul a zrkadlový reflaktančný modul. [30]



Obr. 10 TPS Spectra 3000

6.1.2 Postup merania

Spektrometer TPS Spectra 3000 umožňuje získať rôzne spektrá signálu, index lomu, absorbanciu¹⁰, alebo transmitanciu¹¹. Pre meranie spektrálnych vlastností skúmanej vzorky bolo potrebné najskôr získať referenčnú hodnotu signálu. Tú sme získali prechodom THz žiarenia cez podkladovú fóliu, na ktorú boli jednotlivé vzorky nanášané. Vlastnosti skúmaných vzoriek môžu byť získané porovnaním signálového a referenčného spektra.

Pred začiatkom merania sme nastavili frekvenciu snímania. Počet skenov bol nastavený na 10. Potom bola nameraná referenčná hodnota – priechod THz žiarenia podkladovou fóliou a vzduchom. Následne sme začali meranie jednotlivých vzoriek. Tie boli postupne umiestňované do pracovného priestoru prístroja. Software prístroja spracoval namerané hodnoty a previedol ich do číselnej podoby, ktorú je možné využiť pre ďalšie spracovanie. Merania boli vykonané celkovo päťkrát.

Prvé boli merané vzorky baktérii E. coli a S. aureu, ktoré sme naniesli pomocou bakteriologickej kľučky na vyčistenú a dezinfikovanú podkladovú fóliu. Podkladová fólia je vďaka nízkej absorbancii vhodná na meranie. Na čistenie a dezinfekciu sme využili izopropylalkohol, ktorý sa využíva aj v zdravotníctve. Dezinfekcia a čistenie boli

¹⁰ **Absorbancia** – znázorňuje koľko svetla bolo pohlteneho meranou vzorkou, ide o bezrozmernú veličinu

¹¹ **Transmitance** – je množstvo svetla, ktoré prejde meranou vzorkou (akým spôsobom materiál prepúšťa žiarenie)

vykonané z dôvodu ďalšieho kultivovania baktérii, ktoré boli nanesené na fólii. Následne boli vzorky postupne merané (Obr. 11).



Obr. 11 Meranie vzorky baktérii na podkladovej fólii

Ďalej nasledovali merania baktérii na polyetylénovej fólii, ktorá sa pinzetou odobrala zo živného agaru v Petriho miske, umiestnila sa na vyčistenú podkladovú fóliu a pripevnila sa pomocou samolepiacej pásky (Obr. 12).



Obr. 12 Vzorky *E.coli* na PE fólii

6.1.3 Terahertzové zobrazovanie

Terahertzové zobrazovanie môžeme rozdeliť na pasívnu a aktívnu oblasť. Pasívne zobrazovanie sníma THz časť tepelného vyžarovania telies. Následne prevedie frekvencie THz žiarenia na viditeľný obraz. Aktívne zobrazovanie využíva, že skúmaný objekt je ožarovaný zdrojom THz žiarenia a zobrazuje žiarenie, ktoré bolo pohltené, alebo odrazené

objektom. Snímaním sa získa obraz, ktorý je prevedený do viditeľnej oblasti. Čas merania závisí na požadovanom rozlíšení snímky. K tomu aby sme získali kvalitný obraz látky musí byť pracovné pole redukované ideálne na otvor priemeru cca 3 cm. Tým sme dosiahli sústredenie žiarenia do požadovaného priestoru a vyhneme sa tak stratám signálu.

6.2 Mikroskopické porovnávanie vzoriek

Bakteriálne kolónie, ktoré vykultivovali z odtlačkov prstov mali rôzne sfarbenie a niektoré sme podrobili mikroskopickému skúmaniu pomocou Axio Scope.A1.

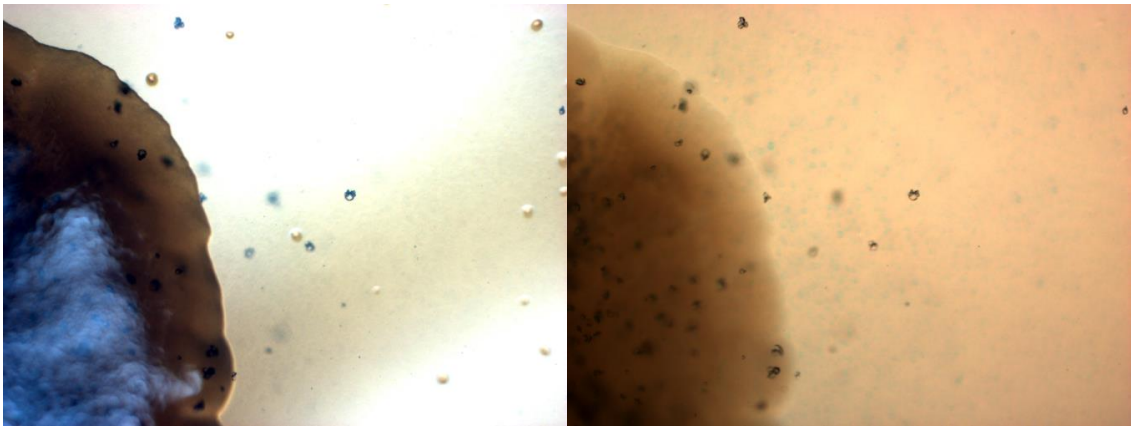
6.2.1 Axio Scope.A1

Axio Scope.A1 (*Obr. 13*) je polarizačný mikroskop so zväčšením od 50x do 1000x. Tento mikroskop umožňuje skúmať vzorky a zobrazit' ich v bielom svetle, polarizovanom svetle prípadne zobrazenie s tmavým farbením. To poskytuje vynikajúci kontrast a minimalizuje rozptýlené svetlo. Model v laboratóriu UTB je vybavený kamerou AxioCam ICc 1 s rozložením 1392 x1040 pixlov, ktorá je pripojená k počítaču a ovládaná pomocou software Axio Vision. [31]

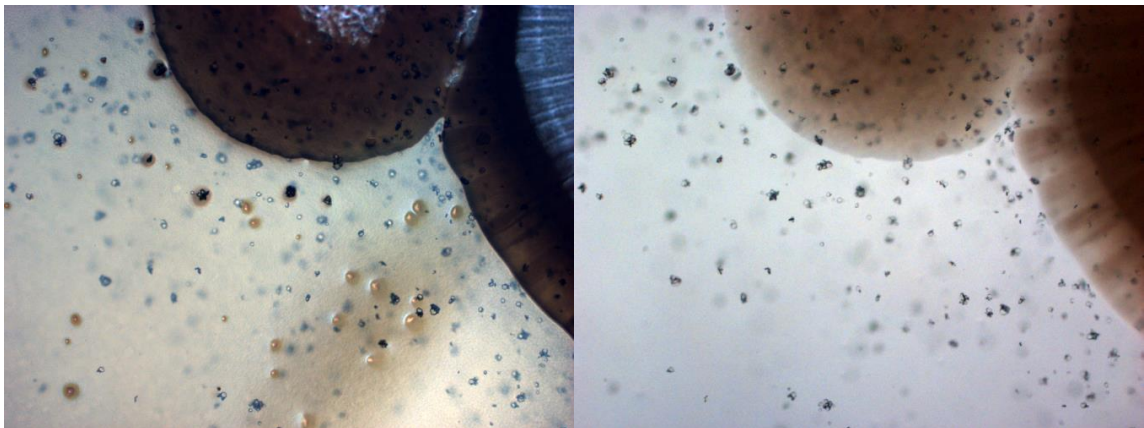


Obr. 13 Polarizačný mikroskop Axio Scope.A1

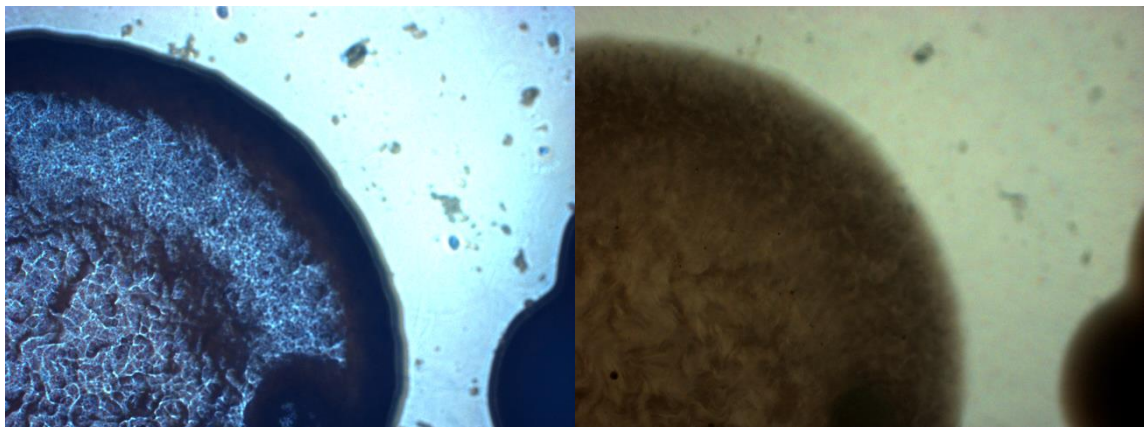
Pred zachytením snímky pomocou AxioCam je možné snímku vylepšiť prednastavenými funkciami. Napr. Exposure umožňuje automatickú expozíciu, White balance - vyváženie bielej farby, upraví snímaný obraz, aby sa čo najlepšie zhodoval s podaním farieb tak, ako ho vidí ľudské oko. K pozorovaniu sme využívali objektív so zväčšením 5x a použili sme režim prechádzajúceho aj odrazeného svetla (*Obr. 14 – 17*).



Obr. 14 Baktérie E.coli vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo



Obr. 15 Baktérie S.aureus vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo



Obr. 16 Baktérie žltých kolónii vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo



Obr. 17 Baktérie tmavožltých kolónii vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo

6.3 Merania vykonané laboratórnym zariadením

Pred samotným otlačením prstov som navštívil laboratórne zariadenie, kde mi sterilným vatovým tampónom vykonali ster z končekov prstov pravej ruky.

Pri podobných vyšetreniach je následne tampón naočkován na krvný agar a kultivovaný pri teplote 37 °C po dobu 24 hodín. Bakteriálne kmene, ktoré vyrastú na pôde sú identifikované na základe mikroskopických vlastností (preparát farbený podľa Grama), podľa biochemických vlastností (PYR test) a pomocou hmotnostnej spektroskopie využitím metódy MALDI TOF.

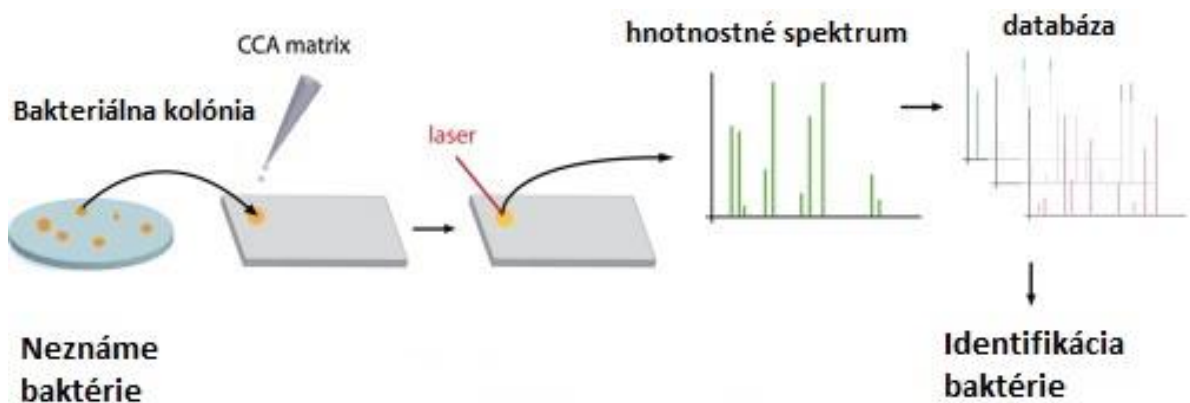
Preparát farbený podľa Grama je metóda, ktorá slúži na rozdelenie bakteriálnych druhov do dvoch skupín (gram-pozitívne a gram-negatívne). Rozdelenie je založené na ich chemických a fyzikálnych vlastnostiach. [32]

PYR test je metóda, ktorá sa využíva pre rýchle odlišenie baktérii *Streptococcus pyogenes* od ostatných β hemolitických streptokokov. [32]

Metóda MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization – ionizácia laserom za prítomnosti matrice) sa využíva pre analýzu biomolekúl a organických látok, ktoré sú náchylné k fragmentácii pri ionizácii. K stanoveniu vyšších molekulových hmotností sa používa spoločne v kombinácii s detektorom doby letu TOF (time of flight). Detektor umožňuje zmerať dobu prechodu a z nej je možné vypočítať rýchlosť častice. Ionty analyzovanej látky sú zrýchlené silným elektrickým polom. Zariadenie obsahuje doštičku s terčíkom, do ktorého sa aplikuje vzorka a matrica spôsobí jeho kryštalizáciu. [34]

MALDI TOF hmotnostná spektrometria predstavuje alternatívu pri identifikácii mikroorganizmov. Pomocou nej sa získajú hmotnostné spektrá časti látok, ktoré sú obsiahnuté v bunke. Každý rod, druh, alebo kmeň má svoje charakteristické spektrum. Získané spektrá sú porovnávané s údajmi v databáze a na základe toho je mikroorganizmus identifikovaný. Príprava vzorku k analýze aj samotná analýza je veľmi jednoduchá a rýchla. Najdlhší čas zaberie kultivácia, ktorá je však potrebná aj pri klasických taxonomických metódach.

Pri laboratórnych štúdiách bola hodnotená schopnosť metódy MALDI TOF pre identifikáciu bakteriálnych kmeňov, ktoré sú bežne izolované zo vzoriek. Získané bakteriálne kolónie, ktoré boli odobraté z rôznych bakteriálnych sterov, boli analyzované pomocou matričnej doštičky. Tieto boli potom podrobené meraniam a výsledky boli porovnávané s databázou v softwari BioTyper 2.0. (Obr. 18). Úspešnosť identifikácie bola na úrovni až 97%. [34]



Obr. 18 Priebeh identifikácie pomocou metódy MALDI TOF [35]

7 VÝSLEDKY MERANÍ

V nasledujúcej kapitole sú popísané všetky výsledky meraní. Výsledky sú rozdelené do častí podľa metódy meraných vzoriek.

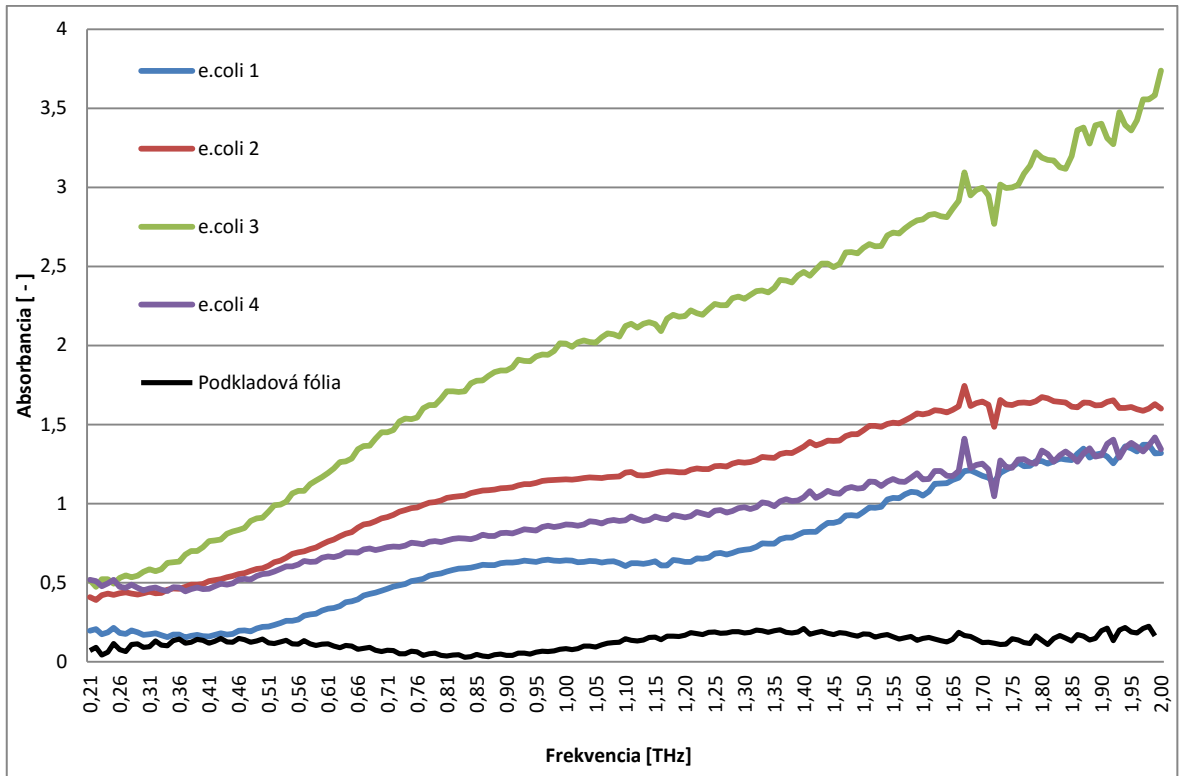
7.1 Výsledky spektroskopického merania

Software TPS Spectra 3000 umožňuje export absorbancie, ktorú využívam pre porovnanie. Pre výpočet absorbancie sa používa vzorec $A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$, kde A je požadovaná absorbancia, I je intenzita THz žiarenia, ktoré prešlo meranou vzorkou a I_0 je referenčná intenzita žiarenia bez prítomnej vzorky.

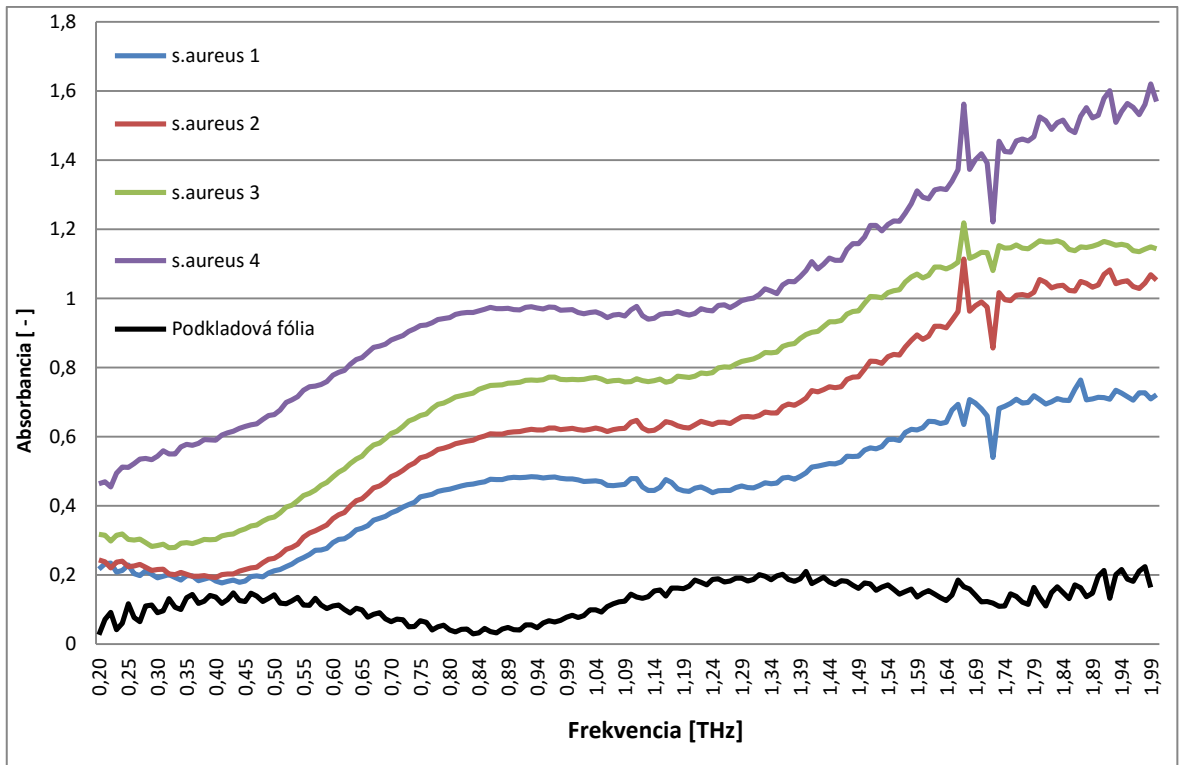
7.1.1 Porovnávanie vzoriek E.coli a S.aureus na podkladovej fólii

Ako prvé sú uvedené výsledné dáta vzoriek E.coli a S.aureus, ktoré boli merané čerstvé a z baktérii vyschnutých sedem dní na podkladovej fólii a následne vykultivovaných. Namerané hodnoty sú uvedené zvlášť v grafoch (Obr. 19 – 22), keďže bolo meraných viac vzoriek jednotlivých baktérii.

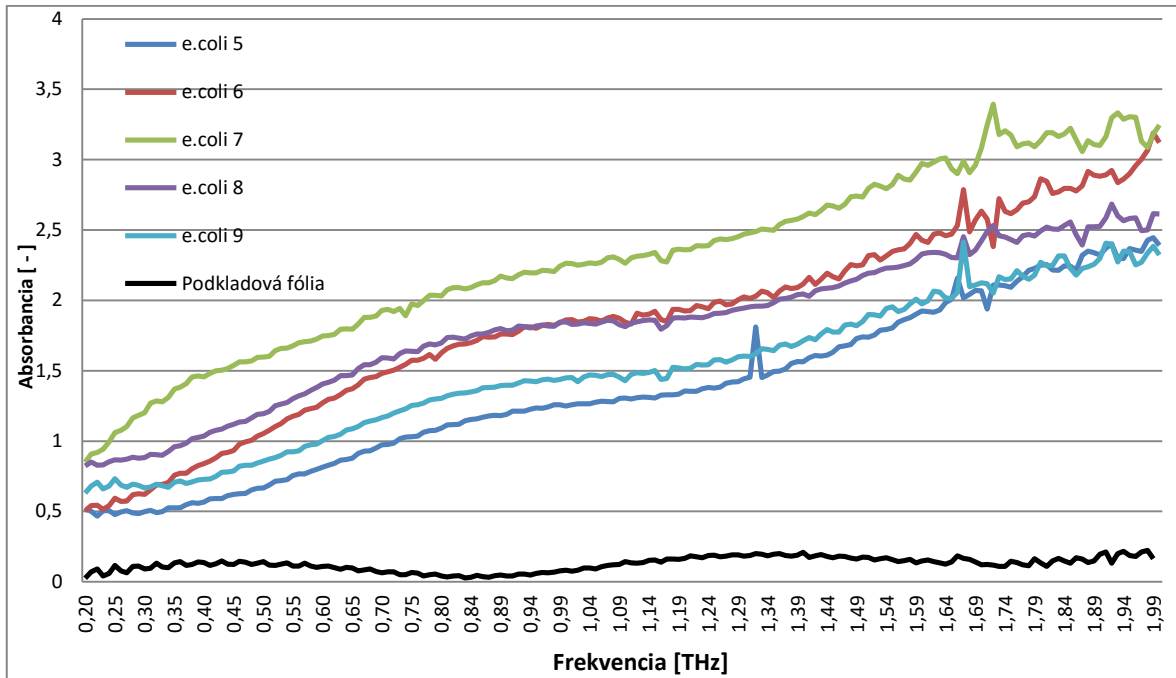
Pri pohľade na absorpčné spektrá sú medzi jednotlivými vzorkami baktérii veľmi malé rozdiely. Žiadna zo vzoriek nemá ostré minimum ani maximum, ktoré by danú vzorku charakterizovali. Z grafov vyplýva, že bakteriálne vzorky majú veľmi podobnú charakteristiku a jednotlivé baktérie sú ťažko rozlíšiteľné. Viditeľné rozdiely v absorpčných spektrách nie sú medzi baktériami, ktoré boli merané čerstvé a taktiež ani medzi baktériami vysušenými a následne kultivovanými. Z uvedených údajov a rozdielov medzi jednotlivými meraniami rovnakej baktérie je zrejmé, že závisí od hrúbky vrstvy, ktorá bola nanosená na podkladovú fóliu pomocou bakteriologickej kľučky. Preto boli ďalšie merania vykonané aj s meraním hrúbky nanesej vrstvy.



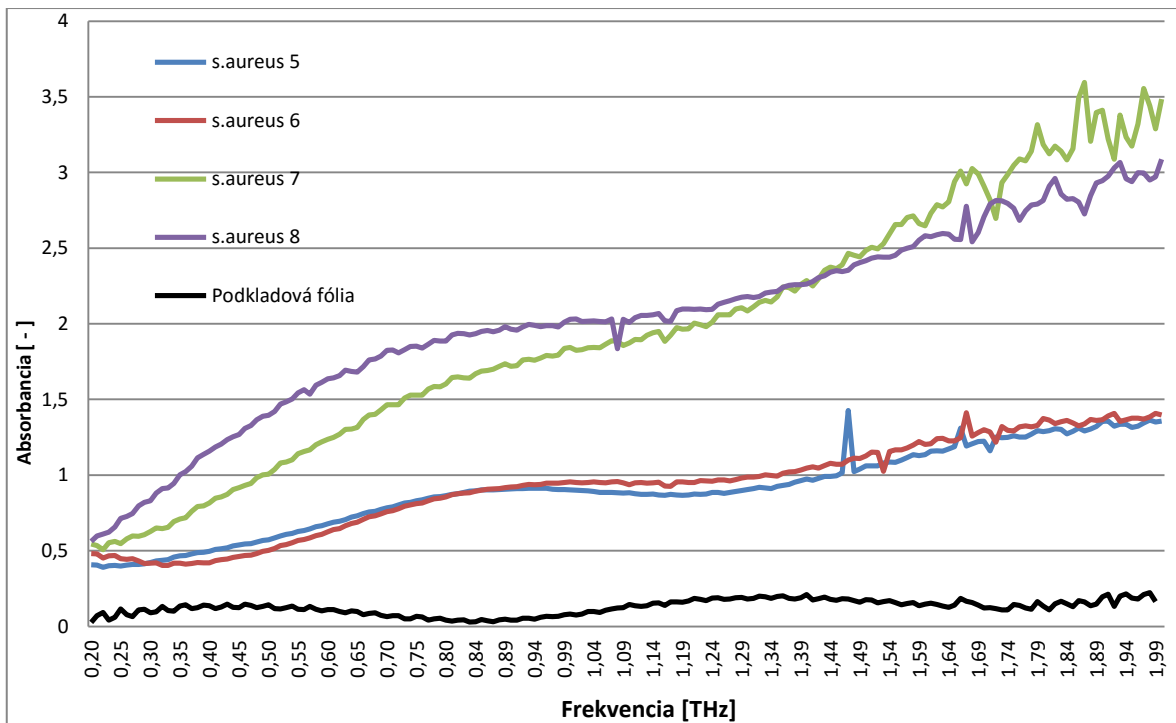
Obr. 19 Frekvenčné spektrá vzoriek E.coli - čerstvé



Obr. 20 Frekvenčné spektrá vzoriek S.aureus – čerstvé



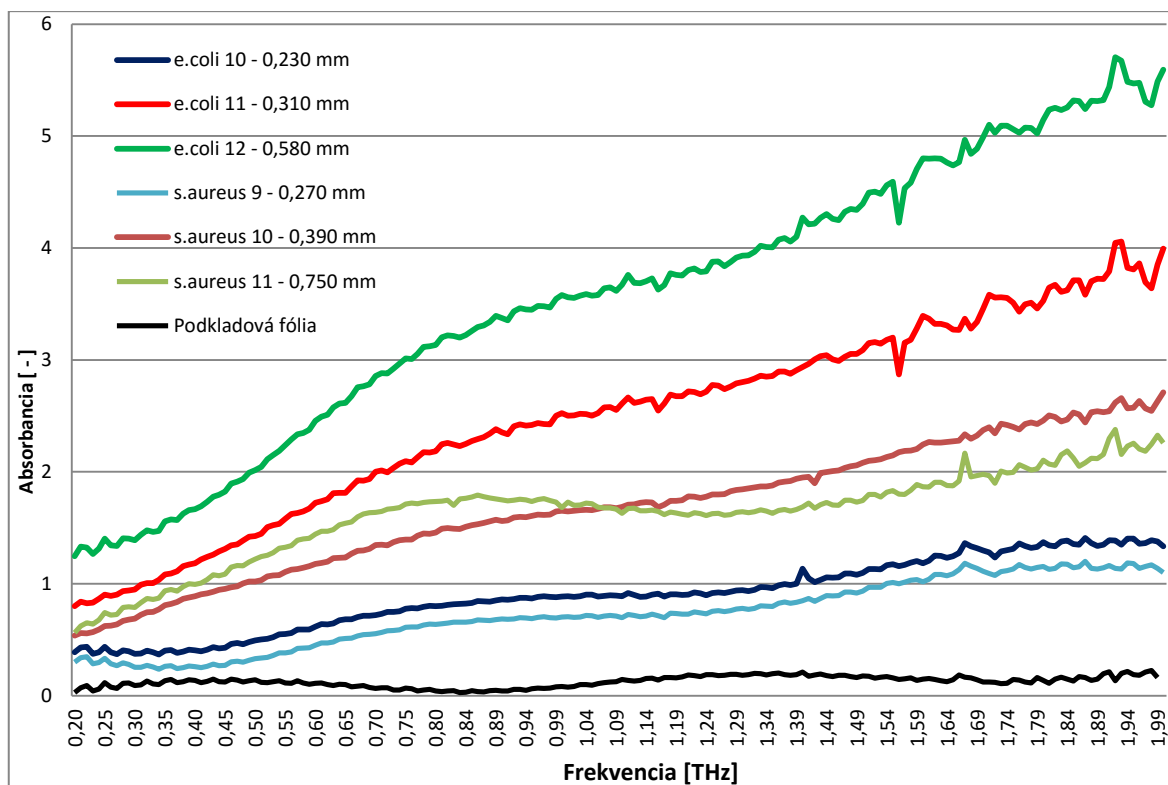
Obr. 21 Frekvenčné spektrá vzoriek *E.coli* – sušených 7 dní a následne kultivovaných po prvom a druhom meraní



Obr. 22 Frekvenčné spektrá vzoriek *S.aureus* – sušených 7 dní a následne kultivovaných po prvom a druhom meraní

Ďalšie dáta (Obr. 23) sú z meraní baktérii *E.coli* a *S.aureus* vyschnutých 7 dní a následne vykultivovaných. Pred jednotlivými meraniami bola odmeraná aj hrúbka nanesej vrstvy (uvedená pri vzorke) na podkladovú fóliu.

Z dát v grafe možno pozorovať, že aj keď sú absorpčné spektrá podobné, čím väčšia je hrúbka nanesej vrstvy baktérii, tým vyššie sú aj absorpčné spektrá. Pri najtenšej vrstve baktérii *E.coli* aj *S.aureus* sú namerané hodnoty takmer totožné. Ani v týchto meraniach nemali jednotlivé vzorky svoje maximá alebo minimá. Pri väčších hrúbkach vrstvy stúpa absorpčné spektrum baktérie *E.coli*, ktoré si zachováva aj svoj tvar. Absorpčné spektrum *S.aureus* pri väčšej hrúbke vrstvy na frekvencii 1,05 THz prechádza do nižšej absorbancie ako vzorka s tenšou vrstvou. V týchto meraniach sa potvrdilo, že miera absorbancie závisí na hrúbke meranej vzorky.

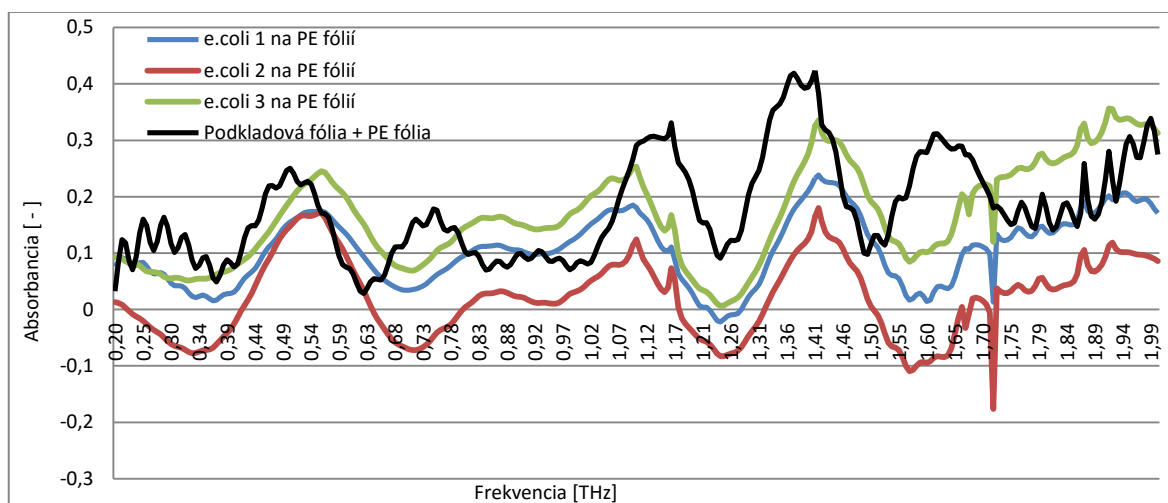


Obr. 23 Frekvenčné spektrá vzoriek *E.coli*, *S.aureus* sušených 7 dní a následne kultivovaných po treťom meraní s meranou hrúbkou vrstvy

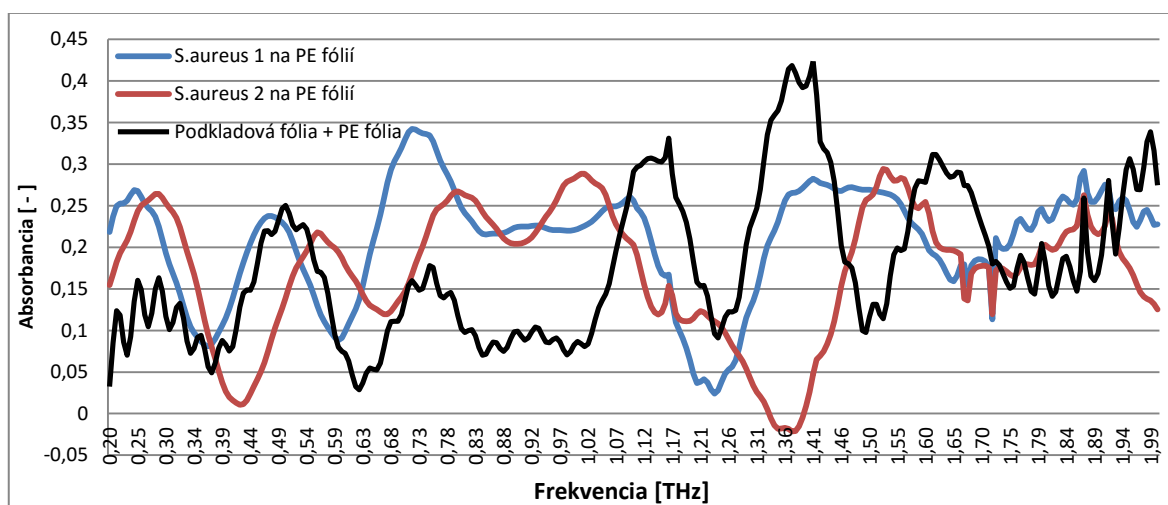
7.1.2 Porovnávanie vzoriek E.coli a S.aureus na polyetylénovej fólii

Ďalšie merania boli vykonané so vzorkami baktérii E.coli a S.aureus, ktoré boli na polyetylénovej fólii. V týchto grafoch (Obr. 24, Obr. 25) je vidno, že tieto vzorky majú odlišnú charakteristiku absorpčných spektier. Tá je však ovplyvnená použitím dvoch fólii. Čierna krivka znázorňuje absorpčné spektrum referenčnej vzorky.

Absorpčné spektrum vzorky E.coli a má podobný priebeh ako referenčná vzorka. Vzorka S.aureus nemala pri opakovanom meraní úplne totožný tvar, podoba v priebehu absorpčného spektra ostala. Ani pri meraní na polyetylénovej fólii nemajú dané vzorky charakteristické minimum ani maximum. Ostré minimum na frekvencii 1,72 je spôsobené vodnými parami.



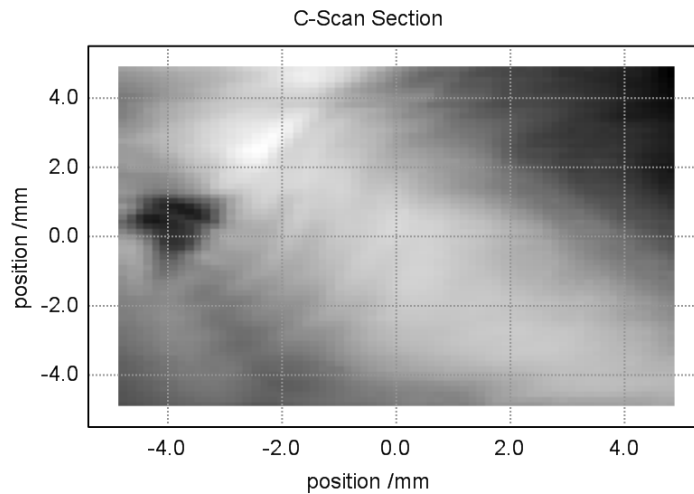
Obr. 24 Frekvenčné spektrá vzoriek E.coli na PE fólii



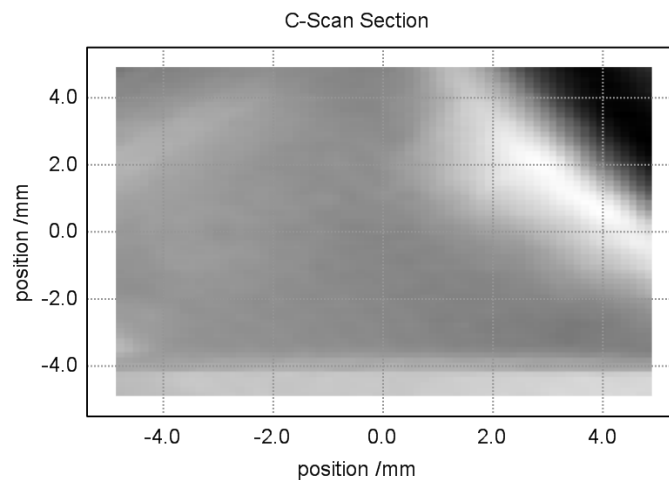
Obr. 25 Frekvenčné spektrá vzoriek S.aureus na PE fólii

7.1.3 Porovnávanie pomocou terahertzového zobrazovania

Pre skúmanie vzoriek *E.coli* a *S.aureus* na polyetylénovej fólii sme využili aj možnosť terahertzového zobrazovania.



Obr. 26 THz snímok baktérii *E.coli* nanesej na polyetylénovej fólii



Obr. 27 THz snímok baktérii *S.aureus* nanesej na polyetylénovej fólii

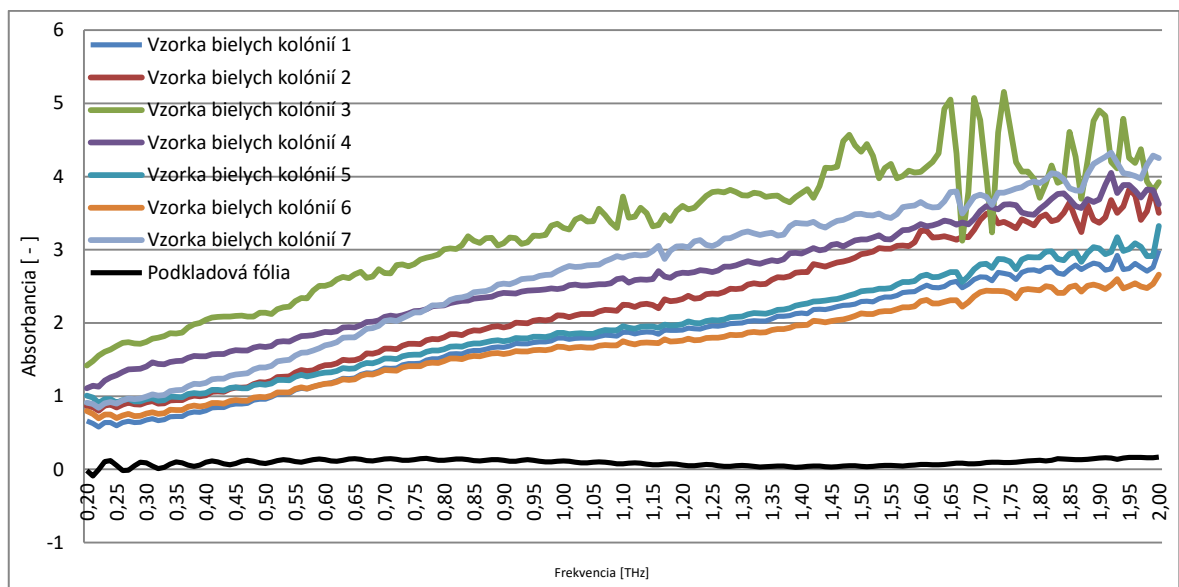
Medzi snímkami baktérii *E.coli* a *S.aureus*, ktoré boli nanesené na polyetylénovej fólii (Obr. 26, Obr. 27) nie je znateľný rozdiel a absorpcia je v podobných odtieňoch šedej. Čím svetlejší je odtieň šedej farby, tým vyššia je absorpcia snímaných látok. V čiernej oblasti je vzorka takmer priehľadná. Podobná je aj štruktúra jednotlivých látok. Využitím 2D skenovania nie je možné jednoznačne identifikovať bakteriálne vzorky.

7.1.4 Porovnávanie vzoriek odtlačkov prstov

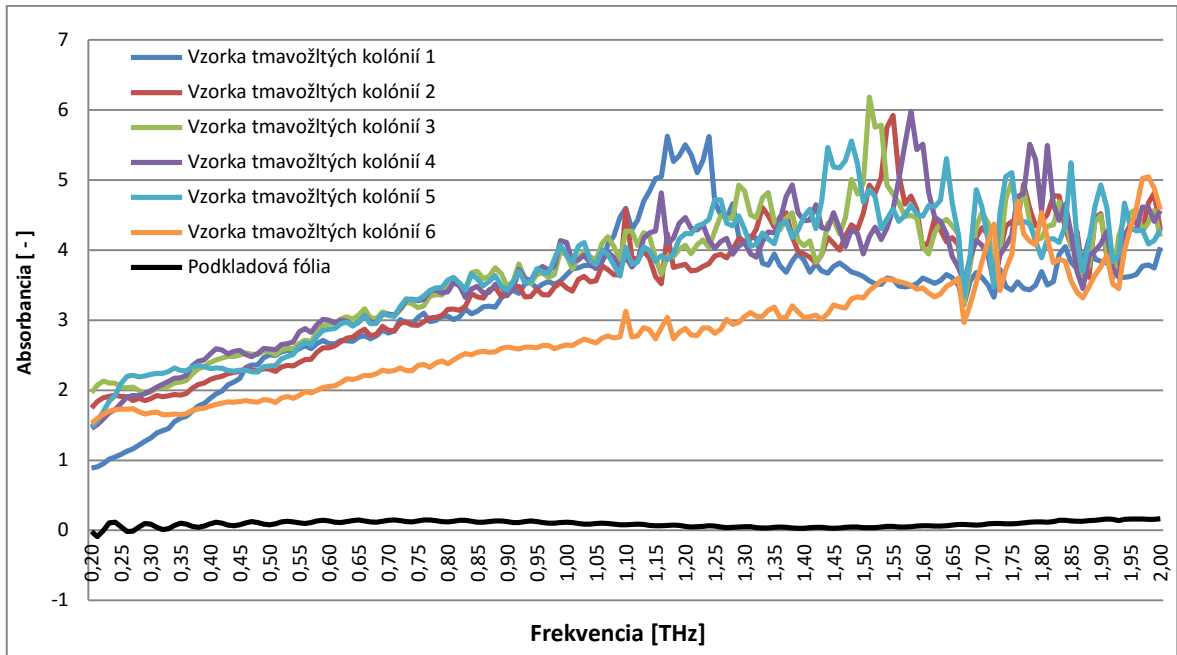
Posledné piate meranie bolo vykonané so vzorkami, ktoré boli získané bakteriálnymi odtlačkami prstov pravej ruky a následným preočkovaním na živnú pôdu agar. Tieto vzorky boli rozdelené na základe odlišnej farebnosti (Obr. 28). Pri meraní jednotlivých vzoriek bola meraná aj hrúbka nanesej vrstvy na podkladovú fóliu.



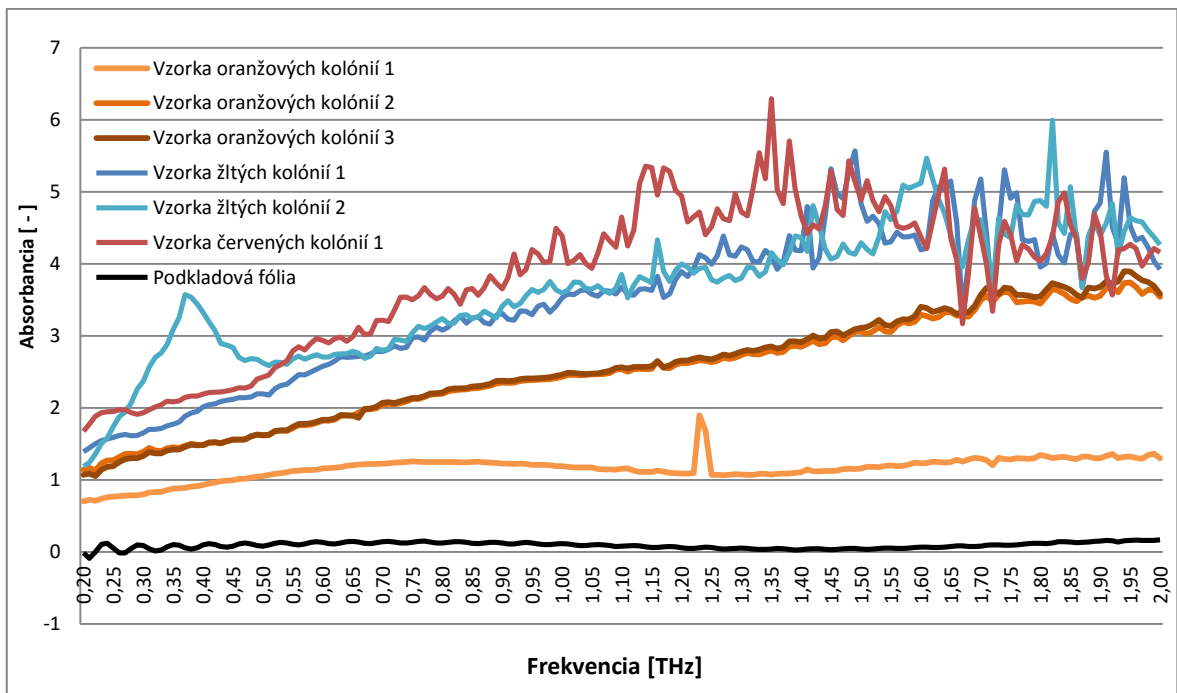
Obr. 28 Vzorky vykultivovaných baktérii z odtlačkov prstov



Obr. 29 Frekvenčné spektrá vzoriek bielych bakteriálnych kolónií



Obr. 30 Frekvenčné spektrá vzoriek tmavožltých bakteriálnych kolónií



Obr. 31 Frekvenčné spektrá ostatných vzoriek bakteriálnych kolónií

V grafe (Obr. 29) sú merané bakteriálne vzorky z bielych kolónií. Z grafu je vidno, že namnožené vzorky majú rovnaký charakteristický tvar absorpčného spektra, ale nemajú žiadne ostré maximum ani minimum. Zelená krivka znázorňuje vzorku s najhrubšou

meranou vrstvou. Priebeh absorpčného spektra je veľmi podobný aj pri baktériách kolóniách označených ako oranžové (*Obr. 31*), kde len vzorka s najtenšou meranou vrstvou má odlišný priebeh. Vzorka červených bakteriálnych kolónii pri frekvencii 1,35 THz má svoje maximum. Vzorky baktérii tmavožltej farby (*Obr. 30*) majú podobný priebeh, no nie celkom rovnaký a pre tieto vzorky taktiež nie je charakteristické žiadne ostré maximum alebo minimum.

7.2 Výsledky mikroskopického skúmania

Vybrané bakteriálne kolónie vrátane baktérii *E.coli* a *S.aureus* boli podrobené mikroskopickému skúmaniu pomocou Axio Scope.A1. K pozorovaniu vzoriek bol využitý objektív so zväčšením 5x a režim prechádzajúceho aj odrazeného svetla.

Vzhľadom k tomu, že skúmané vzorky kolónii baktérii boli pozorované priamo na kultivačnej pôde v Petriho miske, nebolo možné využiť objektív s vyšším zväčšením. Bolo to dané nerovnomerným kultivovaním baktérii a pri priblížení by mohlo dôjsť k otláčaniu baktérii na objektív. Zo zachytených snímok pomocou AxioCam a spomínaným objektívom nebolo možné rozlíšiť jednotlivé bakteriálne kolónie a ani baktérie *E.coli* a *S.aureus*. K rozlíšeniu by bolo vhodné využitie elektrónového mikroskopu, ktorý je na fakulte umiestnený, inštalácia a zaškolenie na meranie prebehli až po našom skúmaní.

7.3 Výsledky z laboratórneho vyšetrenia

Na základe vykonaného steru v laboratórnom zariadení nebol aeróbnou kultiváciou zistený žiadny nález. Až následným pomnožením bol zistený nález (*Obr. 32*) baktérie *Enterococcus spp.*. Keďže kultivácia prebiehala len na krvnom agare, nevyrástli tu všetky kolónie baktérii tak, ako pri agare, ktorý sme využili na bakteriálne odtlačky. Z výsledku je vidno aj citlivosť na antibiotiká.

Odber : 04.04.2016 **Lekár:**
Príjem : 04.04.2016
Odoslanie : 08.04.2016 **Laboratórium:**
Komentár : prsty pravej ruky

Vyšetrenie: Kultivačné vyšetrenie - ložisko

Vysvetlivky: (r) - rezistentný (m) - účinná koncentrácia iba v moči (s)
-stredne citlivý (c) -citlivý

Aerobná kultivácia:

Nález: Pôdy ostali sterilné.

Pomnoženie aerobnej kultivácie:

Nález: Enterococcus spp.

Stanovenie kvalitatívnej citlivosti na antibiotika:

ampicilin(c) tetracyklin(r) chloramfen.(c) ciprofloxx.(c)

Nález: Vzdušné saprophyty

Obr. 32 Výsledky steru prstov pravej ruky

ZÁVER

Cieľom diplomovej práce bolo zamerať sa na využitie mikroorganizmov v kriminalistickej detekcii a zoznámiť sa s metódami využívanými v kriminalistickej identifikácii. Ďalej sú popísané spektroskopické metódy, ktoré sa využívajú v oblasti bezpečnostného priemyslu a kriminalistiky. Praktická časť práce je experimentálna, kde sa pomocou terahertzovej spektroskopie a mikroskopu venujem skúmaniu a identifikácii vybraných druhov baktérii a bakteriálneho odtlačku.

Aj keď výskumy bakteriálnych odtlačkov naznačujú, že sú pre každého jedinca individuálne a je možné identifikovať konkrétnu osobu, ktorá daný odtlačok zanechala, vynára sa otázka, či identifikácia osoby bude jednoznačná v prípade užívania antibiotík a liečiv, ktoré majú vplyv na baktérie žijúce v našom tele. Taktiež zmena bydliska má vplyv na bakteriálne kmene, ktoré sú na našich rukách. Metóda identifikácie na základe bakteriálnych odtlačkov môže ďalším skúmaním a rozvojom do budúcnosti pomôcť kriminalistom pri identifikácii a popri súčasných využívaných metódach rozšíriť možnosti identifikácie osôb.

Na základe meraní, ktoré boli vykonané sa ukázalo, že väčšina meraných bakteriálnych vzoriek na podkladovej fólii malo podobný priebeh absorpčného spektra, a meranie značne ovplyvňuje aj hrúbka vrstvy danej vzorky nanesej na fóliu. Lepšie výsledky neboli dosiahnuté ani použitím polyetylénovej fólie, ktorá značne ovplyvnila priebeh absorpčného spektra.

Namerané spektrá nie sú jednoznačné a tým ani identifikácia jednotlivých bakteriálnych kolónii, ktoré sa vykultivovali z odtlačkov prstov, nebola možná. Zároveň sa ukázalo, že je možné kultivovať baktérie aj po siedmych dňoch vyschnutia pri izbovej teplote, čím sa potvrdilo, že sa bakteriálne odtlačky dajú odobrať zo skúmaného predmetu aj po dlhšom čase.

Samotná podkladová fólia sa vďaka nízkej absorbancii ukázala ako veľmi vhodný materiál pre podobné merania. Naopak v kombinácii s polyetylénovou fóliou nie je vôbec vhodná pre meranie bakteriálnych vzoriek.

Z týchto meraní vyplýva, že terahertzová spektroskopia nie je najvhodnejšou metódou pre skúmanie bakteriálnych vzoriek. Ďalšie skúmanie terahertzovej spektroskopie a meraní bakteriálnych odtlačkov by vyžadovalo dôkladnejšiu prípravu bakteriálnych vzoriek, viac

meraní a velká pozornost by sa mala venovať hrúbke meraných vzoriek, ktorá sa ukázala ako dôležitý faktor pri meraní.

Terahertzová spektroskopia však môže nájsť širšie uplatnenie v kriminalistickej detekcii. Vďaka terahertzovému žiareniu a zobrazovaniu je možné detekovať skryté predmety a vytvoriť snímky s dostatočnou rozlišovacou schopnosťou.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] STRAUS, J. *Kriminalistika, kriminalistická technika: (pro kvalifikační kurz kriminalistických expertů)*. Vyd. 2., upr. Praha: Policejní akademie České republiky, 2006. ISBN 80-7251-216-1.
- [2] RYBÁŘ, M. *Základy kriminalistiky: (vybrané kapitoly pro studenty povinně volitelného předmětu právnických fakult)*. 1. vyd. Dobrá Voda u Pelhřimova: A. Čeněk, 2001. Právnické učebnice (Aleš Čeněk). ISBN 80-86473-03-1.
- [3] MUSIL, J., Z. KONRÁD a J. SUCHÁNEK. *Kriminalistika*. 2., dopl. vyd. V Praze: C.H. Beck, 2004. Beckovy mezioborové učebnice. ISBN 80-7179-878-9.
- [4] PORADA, V. *Teorie kriminalistických stop a identifikace: technické a biomechanické aspekty*. 1. vyd. Praha: Academia, 1987.
- [5] Forensic Assurance. *Fingerprint identification* [online]. © 2016 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <https://forensicassurance.com/product/fingerprint-proficiency-test/>
- [6] PORADA, V. *Kriminalistika: (úvod, technika, taktika)*. Plzeň: Vydavatelství a nakladatelství Aleš Čeněk, 2007. ISBN 978-80-7380-038-3.
- [7] *Zákony pro lidi. Sbírka zákonů ČR v aktuálním konsolidovaném znění* [online]. © 2010-2016 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/sbirka>
- [8] FIERER, N.; LAUBER, Ch. L.; ZHOU, N.; McDONALD, D.; COSTELLO, E. K. and R. KNIGHT. *Forensic identification using skin bacterial communities*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010; DOI:10.1073/pnas.1000162107.
- [9] *Science needs for microbial forensics: developing initial international research priorities*. Washington, D.C.: The National Academies Press, 2014. ISBN 0309302455.
- [10] FRANZOSAA E., HUANGB K., MEADOWC J., GEVERSB D., LEMOND K., BOHANNANC B. and HUTTENHOWERA C., *Identifying personal microbiomes using metagenomic codes*, 2015, DOI:10.1073/pnas.1423854112.
- [11] VOREL, F. *Soudní lékařství*. 1.vydání. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-7169-728-1.
- [12] LIVESCIENCE. *DNA: Definition, Structure & Discovery* [online]. © 2013 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.livescience.com/37247-dna.html>
- [13] MILATA, V. a P. SEGLA. *Spektrálne metódy v chémii*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo STU, 2004. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 80-227-2049-6.
- [14] USPORNAZIAROVKA. *Svetlo* [online]. © 2016 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.uspornaziarovka.sk/pages/%C4%8Co-je-Svetlo%3F.html>
- [15] ČŮTA, F. *Instrumentální analýza: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty vysokých škol technických skupin oborů 27-Technická chemie silikátů, 28-Technická chemie, 31-Textil a oděvnictví*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.

- [16] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [17] ERZINÇLIOĞLU, Z. *Forenzní metody vyšetřování*. Vyd. 1. Praha: Fortuna Libri, 2008, 192 s. ISBN 978-80-7321-433-3.
- [18] MATĚJKA, P., M. KOUDELKOVÁ, Z. DEYL, et al. *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie III*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-7080-466-1.
- [19] VALÁŠEK, P. *Využití Ramanovy spektroskopie pro identifikaci inkoustů na českých bankovkách a jejich padělcích*. Zlín, 2012. Diplomová práce. [online]. [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://akce.fs.vsb.cz/2012/stoc2012/soutezni prace/valasek.pdf>
- [20] PITT, G.D., et al. *Engineering aspects and applications of the new Raman instrumentation*. IEE Proc.-Sci.Meas.Technol.. November 2005, Vol.152
- [21] HERNYCHOVÁ, L. *Základy hmotnostní spektrometrie* [online]. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Zaklady_MS.pdf
- [22] GAVENDA, T., a V. KŘESÁLEK. *Materiály pro aplikace v terahertzové oblasti spektra*. 2011. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, č. 10.
- [23] FERGUSON, B., X.CH. ZHANG. *Materials for terahertz science and technology*. [online]. © 2002 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: http://www.eleceng.adelaide.edu.au/thz/publications/ferguson_2002_npg.pdf
- [24] LEE, Y. *Principles of terahertz science and technology*. New York, NY: Springer, 2008. ISBN 9780387095400.
- [25] ZHANG, X. a J. XU. Generation and Detection of THz Waves. *Introduction to THz Wave Photonics* [online]. Boston, MA: Springer US, 2010, s. 27 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.1007/978-1-4419-0978-7_2. ISBN 978-1-4419-0977-0. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0978-7_2
- [26] LEAHY-HOPPA, M. R., J. MIRAGLIOTTA, R. OSIANDER, J. BURNETT, Y. DIKMELIK, C. MCENNIS a J.B. SPICER. Ultrafast Laser-Based Spectroscopy and Sensing: Applications in LIBS, CARS, and THz Spectroscopy. *Sensors* [online]. 2010, **10**(5), 4342-4372 [cit. 2016-05-10]. DOI: 10.3390/s100504342. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/10/5/4342/>
- [27] VILLARD, C. *The Effects of K1F bacteriophage on the EV36 strain of E. coli*. [online]. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/me111/sp98-projects/courtney/>
- [28] MRSA. *Staphylococcus Aureus Picture*. [online]. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/staph/sem2.html>
- [29] SME: *Bakteriálne kultúry a rast baktérii*. [online]. © 2004 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://primar.sme.sk/c/4117318/bakterialne-kultury-a-rast-bakterii.html>

- [30] TPS spectra 3000 - User's Guide. St John's Innovation Park Cambridge, March 2011.
- [31] ZEISS. *Axio Scope.A1*. [online]. [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/light-microscopes/axio-scope-a1-for-biology.html
- [32] TANKESHWAR, A. Microbeonline. *Principle, procedure and results*. [online]. © 2013 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://microbeonline.com/pyrrolidonyl-arylamidase-pyr-test-principle-procedure-results/>
- [33] FIERER, N.; HAMADY, M.; LAUBER, Ch. L. and R. KNIGHT. *The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008; DOI:10.1073/pnas.0807920105.
- [34] SOGAWA, K., WATABANE M., NOMURA F. *Rapid identification of microorganisms using MALDI-TOF mass spectrometry*. 2013. PMID: 23672081. [online]. © 2013 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672081>
- [35] KRÁSNÝ, L., HYNEK, R., HOCHÉL, I. *Identification of bacteria using mass spectrometry techniques*. 2013, DOI: 10.1016/ijms.2013.04.016 [online]. © 2013 [cit. 2016-05-03]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387380613001437>

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
FBI	Federal Bureau of Investigation (Federálny úrad pre vyšetrovanie)
GHz	Gigahertz
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)
PE	polyetylénový
RAPD	Random-amplified polymorphic
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polymorfizmus dĺžky štiepených fragmentov)
STRP	Short tandem repeat polymorphism
THz	Terahertz
UV	Ultrafialový
VIS	Viditeľný

ZOZNAM OBRÁZKOV

<i>Obr. 1 Zvýrazňovanie odlačku prstu [5]</i>	15
<i>Obr. 2 Štruktúra DNA [12]</i>	22
<i>Obr. 3 Elektromagnetické žiarenie – široká oblasť vlnových dĺžok [14]</i>	27
<i>Obr. 4 Nastavenie generovania a detekcie THz pulzných vĺn [25]</i>	33
<i>Obr. 5 Terahertzové spektrá výbušnín [26]</i>	34
<i>Obr. 6 Escherichia coli pod elektrónovým mikroskopom [27]</i>	37
<i>Obr. 7 Staphylococcus aureus pod elektrónovým mikroskopom [28]</i>	38
<i>Obr. 8 Kultivované baktérie E. coli na Petriho miske</i>	39
<i>Obr. 9 Kultivované baktérie z otláčku prstenníka pravej ruky</i>	40
<i>Obr. 10 TPS Spectra 3000</i>	42
<i>Obr. 11 Meranie vzorky baktérii na podkladovej fólii</i>	43
<i>Obr. 12 Vzorky E.coli na PE fólii</i>	43
<i>Obr. 13 Polarizačný mikroskop Axio Scope.A1</i>	44
<i>Obr. 14 Baktérie E.coli vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo</i>	45
<i>Obr. 15 Baktérie S.aureus vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo</i>	45
<i>Obr. 16 Baktérie žltých kolónii vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo</i>	45
<i>Obr. 17 Baktérie tmavožltých kolónii vľavo odrazené, vpravo prechádzajúce svetlo</i>	46
<i>Obr. 18 Priebeh identifikácie pomocou metódy MALDI TOF [35]</i>	47
<i>Obr. 19 Frekvenčné spektrá vzoriek E.coli - čerstvé</i>	49
<i>Obr. 20 Frekvenčné spektrá vzoriek S.aureus – čerstvé</i>	49
<i>Obr. 21 Frekvenčné spektrá vzoriek E.coli – sušených 7 dní a následne kultivovaných po prvom a druhom meraní</i>	50
<i>Obr. 22 Frekvenčné spektrá vzoriek S.aureus – sušených 7 dní a následne kultivovaných po prvom a druhom meraní</i>	50
<i>Obr. 23 Frekvenčné spektrá vzoriek E.coli, S.aureus sušených 7 dní a následne kultivovaných po treťom meraní s meranou hrúbkou vrstvy</i>	51
<i>Obr. 24 Frekvenčné spektrá vzoriek E.coli na PE fólii</i>	52
<i>Obr. 25 Frekvenčné spektrá vzoriek S.aureus na PE fólii</i>	52
<i>Obr. 26 THz snímok baktérii E.coli nanesej na polyetylénovej fólii</i>	53
<i>Obr. 27 THz snímok baktérii S.aureus nanesej na polyetylénovej fólii</i>	53
<i>Obr. 28 Vzorky vykultivovaných baktérii z odtlačkov prstov</i>	54
<i>Obr. 29 Frekvenčné spektrá vzoriek bielych bakteriálnych kolónii</i>	54

<i>Obr. 30</i>	<i>Frekvenčné spektrá vzoriek tmavožltých bakteriálnych kolónii.....</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 31</i>	<i>Frekvenčné spektrá ostatných vzoriek bakteriálnych kolónii.....</i>	<i>55</i>
<i>Obr. 32</i>	<i>Výsledky steru prstov pravej ruky</i>	<i>57</i>