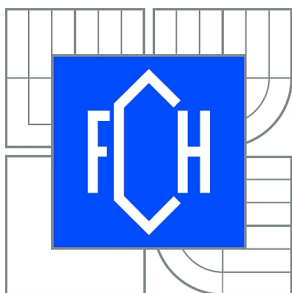




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV SLOŽENÍ KULTIVAČNÍHO MÉDIA NA HMOTNOSTNÍ SPEKTRA KVASINEK DRUHŮ CRYPTOCOCCUS LAURENTII A CRYPTOOCOCCUS FLAVESCENS

EFFECT OF MEDIUM COMPOSITION ON THE MASS SPECTRA OF THE YEAST SPECIES OF
CRYPTOCOCCUS LAURENTII AND CRYPTOOCOCCUS FLAVESCENS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VOJTĚCH LEDVINA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. EVA STRATILOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0919/2014	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Vojtěch Ledvína	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Stratilová, Ph.D.	
Konzultanti:	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	

Název diplomové práce:

Vliv složení kultivačního média na hmotnostní spektra kvasinek druhů *Cryptococcus laurentii* a *Cryptococcus flavescens*

Zadání diplomové práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Vojtěch Ledvína
Student(ka)

Ing. Eva Stratilová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu BiochemNet – Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo projektu CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt byl realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.

BiochemNet



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ABSTRAKT

Cryptococcus laurentii a *Cryptococcus flavescens* jsou nefermentující kvasinky tvořící extracelulární polysacharidovou kapsuli. Jedná se o saprofytické druhy, nicméně *Cr. laurentii* je znám i jako oportunní patogen u imunokomprimovaných jedinců. Dříve byl *Cr. flavescens* považován za synonymum *Cr. laurentii*, v současnosti je ale klasifikován jako samostatný druh náležící do fylogenetické skupiny I *Cr. laurentii*. V experimentální části bylo 28 kmenů druhů *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens* a *Cr. victoriae* biotypizováno pomocí MALDI-TOF MS. Buňky byly kultivovány na třech různých médiích (Sabouraudův, YPD a bramborový agar) a proteiny byly extrahovány třemi metodami. Sledován byl vliv složení původního média, ze kterého byly kmeny přeočkovány, na kvalitu spekter, vhodnost jednotlivých metod pro různá média, dále zda složení média ovlivňuje kvalitu spekter a na závěr byly všechny kmeny porovnány s typovým kmenem *Cr. laurentii* CCY 17-3-2.

Bylo zjištěno, že vliv původního substrátu nemá zásadní vliv na kvalitu spekter a stejně tak složení kultivačního média. Rozhodující je metoda přípravy vzorku. Nejvyšší spektra byla detekována při kultivaci na YPD agaru a promytí buněk ethanolem. Bramborový agar byl shledán nevhodným pro kultivaci kvasinek rodu *Cryptococcus*, protože při růstu buněk dochází ke značné produkci extracelulárních polysacharidů znesnadňujících extrakci proteinů. Všechny kmeny byly dále srovnány s typovým kmenem *Cr. laurentii* CCY 17-3-2 a byly vytvořeny MSP dendrogramy na základě podobnosti spekter. Při vzájemném srovnání všech kmenů byly kmeny úspěšně rozděleny na všech médiích do příslušných druhů. V závěru byly srovnány sekvence D1/D2 domén LSU genu vybraných kmenů a fylogenetický strom byl porovnán s MSP dendrogramy.

ABSTRACT

Cryptococcus laurentii and *Cryptococcus flavescens* are nonfermenting yeasts forming extracellular polysaccharide capsule. Both species are mainly saprophytic but *Cr. laurentii* is also known to be an opportunistic pathogen in immunocompromised patients. *Cr. flavescens* used to be considered a synonym of *Cr. laurentii* but nowadays it is classified as a separate species that belongs to the phylogenetic group I of the *Cr. laurentii* group. In the experimental part 28 strains of species *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens* a *Cr. victoriae* were biotyped using MALDI-TOF MS. The yeasts were cultivated on three different media (Sabouraud, YPD and potato agar) and three methods were used for the protein extraction. The impact of growth medium composition from which the strains were inoculated on the quality of spectra was studied together with the suitability of individual methods for use on different media. Then the impact of growth medium composition on the quality of acquired spectra was evaluated. Finally, all strains were compared mutually and with the type strain of *Cr. laurentii* CCY 17-3-2.

The composition of the medium cells were inoculated from was found to have little impact on the spectra quality. The same result was determined for the composition of the actual growth medium cells were cultivated on. Crucial for the quality of mass spectrum is the method of cells preparation. Best results were acquired when cultivating cells on YPD agar, washing the cells with ethanol and using mix of sinapinic and ferulic acid as a matrix. Potato agar was found not suitable for cultivating yeasts of the *Cryptococcus* genus due to significant production of extracellular polysaccharides which complicate the protein isolation process. All strains were compared to *Cr. laurentii* type strain CCY 17-3-2 and MSP dendrograms were created based on the spectra similarity. In the MSP dendrograms all strains were successfully divided into relevant species on all tested media. Finally sequences of D1/D2 domain of LSU gene were compared and phylogenetic tree was created. This tree was then compared to the MSP dendrograms.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cryptococcus laurentii, *Cryptococcus flavescens*, biotypizace, MALDI-TOF MS.

KEYWORDS

Cryptococcus laurentii, *Cryptococcus flavescens*, biotyping, MALDI-TOF MS.

LEDVINA, V. *Vliv složení kultivačního média na hmotnostní spektra kvasinek druhů Cryptococcus laurentii a Cryptococcus flavescens*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 68 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat své vedoucí diplomové práce Ing. Evě Stratilové, Ph.D. a zaměstnancům Zbierky kultúr kvasiniek CHÚ SAV za ochotu, poskytnuté rady a pomoc s vypracováním této diplomové práce.

OBSAH

1	Úvod.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Charakteristika rodu <i>Cryptococcus</i>	9
2.2	Klasifikace rodu <i>Cryptococcus</i>	9
2.3	Virulence a patogenita rodu <i>Cryptococcus</i>	11
2.3.1	Kryptokokózy způsobené <i>Cr. neoformans</i> a <i>Cr. gatii</i>	12
2.3.2	Ne- <i>neoformans</i> kryptokokózy.....	13
2.4	Taxonomická situace skupiny <i>Cryptococcus laurentii</i>	14
2.5	Biochemické vlastnosti a enzymová aktivita <i>Cr. laurentii</i> a <i>Cr. flavescens</i>	15
2.6	Charakteristika druhu <i>Cryptococcus laurentii</i> (Kufferath) C. E. Skinner (1950)..	16
2.7	Charakteristika druhu <i>Cryptococcus flavescens</i> (Saito) C. E. Skinner (1950).....	17
2.8	Charakteristika druhu <i>Cryptococcus victoriae</i> M. J. Montes et al.....	18
2.9	Instrumentace v hmotnostní spektrometrii.....	19
2.9.1	Iontové zdroje.....	20
2.9.2	Hmotnostní analyzátory.....	22
2.9.3	Detektory.....	24
2.9.4	Vakuové pumpy.....	25
2.10	Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	25
2.11	Identifikace kvasinek srovnáním sekvencí jaderné ribozomální DNA.....	28
3	Cíle práce.....	29
4	Experimentální část.....	30
4.1	Použité kmeny kvasinek.....	30
4.2	Kultivační média.....	30
4.2.1	Příprava Sabouraudova agaru.....	31
4.2.2	Příprava YPD agaru.....	31
4.2.3	Příprava bramborového agaru.....	31
4.3	Podmínky kultivace.....	31
4.4	Příprava roztoků.....	31
4.4.1	10% kyselina trifluoroctová.....	31
4.4.2	70% kyselina mravenčí.....	31
4.4.3	Kyselina α -kyano-4-hydroxyisovalerátová (CHCA) – matrice 1.....	32
4.4.4	Směsná matrice kyseliny sinapové a ferulové (SA:FA) – matrice 2.....	32
4.5	Příprava vzorků pro biotypizaci.....	32

4.5.1	Odběr vzorků	32
4.5.2	Promývání buněk a extrakce proteinů	32
4.6	MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	32
4.7	Zpracování a vyhodnocení dat	33
4.8	Sekvenace D1/D2 domén LSU rRNA genu.....	33
5	Výsledky a diskuze.....	34
5.1	Vztah mezi složením kultivačního média a metodou přípravy vzorku.....	34
5.2	Rozsah vlivu složení kultivačního média na kvalitu hmotnostních spekter	36
5.3	Identifikace jednotlivých kmenů.....	38
5.4	Srovnání sekvencí D1/D2 domén LSU	42
6	Závěr.....	44
7	Seznam použitých zdrojů	46
8	Seznam použitých zkratk.....	54
9	Přílohy	55
9.1	Srovnání jednotlivých metod po přeočkování ze sladiny a z média	55
9.1.1	Kmen <i>Cr. laurentii</i> CCY 17-3-9.....	55
9.1.2	Kmen <i>Cr. flavescens</i> CCY 17-3-34.....	56
9.1.3	Kmen <i>Cr. victoriae</i> CCY 17-3-26	57
9.1.4	Kmen <i>Cr. laurentii flavescens</i> CCY 17-3-43 = 17-27-4	58
9.2	Vzájemné srovnání metod v rámci jednotlivých médií	60
9.2.1	Kmen <i>Cr. laurentii</i> CCY 17-3-9.....	60
9.2.2	Kmen <i>Cr. flavescens</i> CCY 17-3-34.....	61
9.2.3	Kmen <i>Cr. victoriae</i> CCY 17-3-26	62
9.2.4	Kmen <i>Cr. laurentii flavescens</i> CCY 17-3-43 = 17-27-4	63
9.3	Srovnání metody 2 (EtOH SA:FA) na různých médiích	64
9.4	Srovnání všech kmenů s CCY 17-3-2 - YPD agar a metoda EtOH SA:FA	65

1 ÚVOD

Kvasinky rodu *Cryptococcus* jsou jednobuněčné nefermentující basidiomycety s širokým geografickým rozšířením, které obývají velmi rozmanitá prostředí. K roku 2011 je uváděno celkem 70 druhů z tohoto rodu, které jsou rozděleny do šesti řádů. Většina druhů je nepatogenních, ale několik druhů je známo jako původce lidských chorob, zejména plicních onemocnění a meningitid u imunokomprimovaných jedinců. Charakteristickým rysem tohoto rodu je tvorba extracelulární polysacharidové kapsule, kterou tvoří jako jediné eukaryotické organismy a která je jedním z hlavních virulenčních faktorů těchto kvasinek spolu s produkcí melaninu a lakázy.

V literatuře často zmiňovanou skupinou rodu *Cryptococcus* je skupina *Cryptococcus laurentii*. Kmeny v této skupině byly dříve považovány za synonyma *Cr. laurentii* nicméně na základě studií, které srovnávali sekvence ITS oblastí, D1/D2 domén a 18S rDNA, byla tato skupina reklasifikována a byly vyčleněny nové samostatné druhy. Jedním z nich je i *Cr. flavescens*, který je spolu s *Cr. laurentii* hlavním předmětem studia experimentální části této práce. Tyto dva druhy lze nejspolehlivěji rozlišit porovnáním sekvencí D1/D2 domény 26S rDNA a ITS oblasti, ale je možné je identifikovat i na základě specifických asimilačních vzorů. Oba druhy také vykazují určité specifické rozdíly v extracelulární enzymové aktivitě.

V posledních letech se těší velké oblibě rychlá identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Nejvíce prozkoumanou oblastí je využití MALDI-TOF MS k identifikaci patogenních bakterií. Tato technika je jednoduchá a časově nenáročná a v současnosti je velmi užitečným pomocníkem v mnoha vybavených klinických laboratořích. Využití k identifikaci kvasinek je o něco složitější vzhledem k faktu, že kvasničné buňky mají rigidnější strukturu buněčné stěny, která znesnadňuje extrakci proteinů z buněk a neumožňuje aplikaci jednoduchých postupů použitelných pro bakterie. Další výzvou je pak identifikace kvasinek rodu *Cryptococcus*, které navíc tvoří extracelulární polysacharidy a polysacharidovou kapsuli, jež dále znesnadňují identifikaci.

Náplní této diplomové práce je právě identifikace kvasinek druhů *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens* a *Cr. victoriae* (II. fylogenetická skupina *Cr. laurentii*) pomocí hmotnostní spektrometrie a posouzení vlivu složení kultivačního média na kvalitu získaných spekter. Dále byla posuzována vhodnost několika metod pro jednotlivá testovaná média a reprodukovatelnost a možnost identifikace jednotlivých druhů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Charakteristika rodu *Cryptococcus*

Kvasinky rodu *Cryptococcus* jsou jednobuněčné basidiomycety vyskytující se v mnoha různých prostředích zahrnujících půdy, povrch ovocných plodů, povrchové vody i ptačí výkaly. Typovým druhem pro celý rod je *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin. Několik druhů infikuje živočichy od hmyzu až po člověka, většina je však nepatogenních [1]. Mezi hlavní lidské a zvířecí patogeny patří druhy *Cryptococcus neoformans* a *Cr. gatii* [2], nicméně i druhy *Cr. laurentii* a *Cr. albidus* mohou vzácně způsobovat onemocnění zejména u imunodeficientních jedinců (HIV pozitivní jedinci, pacienti po chemoterapii a pacienti po transplantacích, jimž byla podávána imunosupresiva) [3].

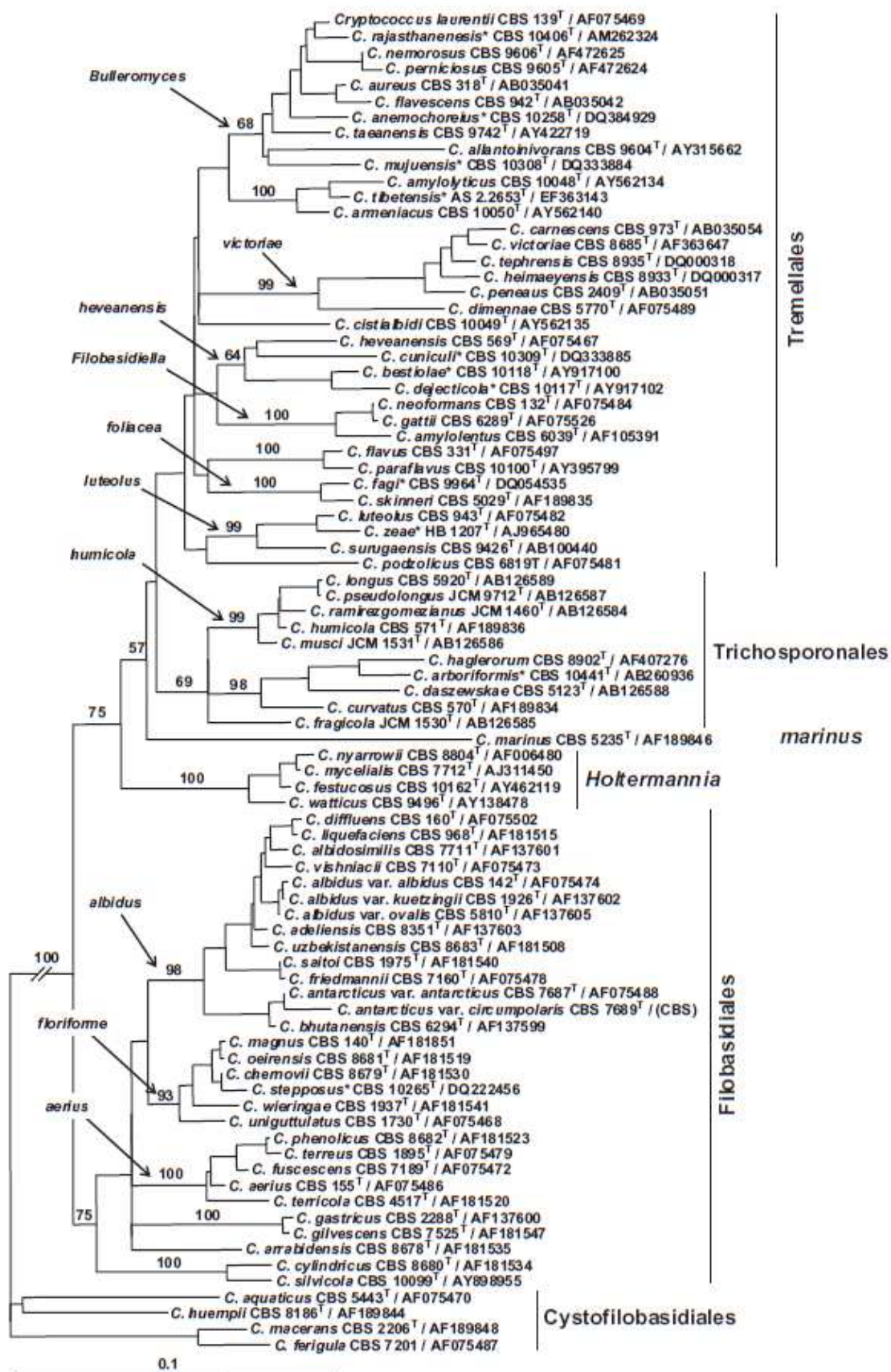
Tvar buněk je elipsovitý, vejčitý nebo protažený. Kolonie na pevném médiu mají bílou, krémovou nebo žlutohnědou barvu a některé druhy mohou produkovat červené, oranžové, žluté nebo tmavě hnědé pigmenty. Textura kolonií je máslovitá až hlenovitá. Všechny druhy tohoto rodu mají tuhou pórovitou buněčnou stěnu z polysacharidů, proteinů a pigmentů. Hlavním monosacharidem obsaženým v buněčné stěně je glukóza a dále jsou zastoupeny manóza a xylóza [4]. Většina druhů tvoří ochrannou polysacharidovou kapsuli, která je považována za hlavní virulenci faktor. Složení kapsule bylo zkoumáno zejména u patogenního druhu *Cr. neoformans* a jako hlavní složky byly identifikovány glukuronoxylomanany, galaktooxylomanany a manoproteiny [5]. Obdobné sacharidové složení uvádí Schutzbach et al. i u druhu *Cr. laurentii* [1].

Kvasinky rodu *Cryptococcus* se rozmnožují zejména nepohlavně multilaterálním nebo polárním enteroblastickým pučením a mohou tvořit pseudohyfy nebo pravé hyfy. U druhů tvořících pravé hyfy mají septa dolipóry s nebo bez parenthesesů. Arthrokonidie ani ballistokonidie se netvoří. Pohlavní rozmnožování nebylo u většiny druhů zjištěno, ale některé druhy jsou anamorfními stádii teleomorfních rodů spadajících do řádů Cystofilobasidiales, Filobasidiales a Tremellales [4].

Co se týče biochemických vlastností, všechny druhy využívají D-glukuronát a většina druhů syntetizuje extracelulární polysacharidy podobné škrobu. Druhy, které škrobovitě polysacharidy netvoří, využívají myo-inositol a D-glukuronát, kombinaci odlišující je od většiny druhů rodu *Rhodotorula*, s nimiž byly v minulosti často zaměňovány. Fermentační schopnosti obecně chybí. Test na hydrolýzu močoviny a test s diazoniovou modří B (orientační test na rozlišení askomycet a basidiomycet) jsou pozitivní [4].

2.2 Klasifikace rodu *Cryptococcus*

Jak už bylo zmíněno dříve, rod kvasinek *Cryptococcus* se řadí do kmene Basidiomyceta, podkmene Agaromycotina, třídy Tremellomycetes. K roku 2011 uvádí Kurtzman et al. [4] celkem 70 jednotlivých druhů rodu *Cryptococcus*, které jsou v rámci třídy Tremellomycetes rozděleny do šesti řádů (obrázek 1). Jedná se o polyfyletický rod a některé druhy jsou v rámci třídy smíšené s dalším anamorfními (např. *Bullera*) a teleomorfními rody (např. *Tremella*). Mezi pět hlavních řádů patří Cystofilobasidiales, Filobasidiales, Tremellales, Trochisporonales, Holtermannia. Šestou oddělenou skupinu marinus tvoří momentálně pouze jeden druh *Cryptococcus marinus*, jehož zařazení je zatím nejasné [4].



Obrázek 1 Fylogenetické vztahy mezi druhy rodu *Cryptococcus* založené na neighbour-joining analýze sekvencí D1/D2 domény LSU rRNA genu [4]

2.3 Virulence a patogenita rodu *Cryptococcus*

Onemocnění způsobená kvasinkami rodu *Cryptococcus* se označují jako kryptokokózy a hlavními původci těchto onemocnění jsou zejména druhy *Cr. neoformans* a *Cr. gatii*. V posledních letech nicméně přibývá případů onemocnění způsobených i druhy *Cr. laurentii* a *Cr. albidus*. Ve všech případech se jedná především o onemocnění osob s narušenou buněčnou imunitou (lidé trpící AIDS, pacienti po transplantaci orgánů, pacienti s rakovinou při chemoterapii, pacienti s hematologickými malignitami). Imunokompetentní jedinci vykazují většinou jen mírné příznaky nebo jsou úplně bez příznaků. Nejčastěji bývá zasažen mozek a plíce, dále pak játra, močové cesty, kůže, oči, případně i pohlavní orgány [2].

Hlavním virulenčním faktorem je tvorba polysacharidové kapsule, která je přítomná u všech druhů rodu. Manoproteiny v ní obsažené jsou hlavním antigenem pro T-buňky a spouští imunitní odpověď lidského organismu. Současně obsahuje kapsule i galaktoxylomanany, které působí antifagocyticky a indukují apoptózu lidských T-buněk a makrofágů, čímž přímo zpomalují nebo potlačují buněčnou imunitu [2].

Patogenní druhy vykazují i další vlastnosti zvyšující jejich virulenci a to produkci melaninu a lakázy. Melanin je molekula s oxidačně-redukčními vlastnostmi odolná vůči degradaci. Pomáhá zajišťovat celistvost buněčné stěny, neutralizuje volné radikály a je schopen vázat antibiotika, těžké kovy a proteiny, včetně antimikrobiálních peptidů produkovaných imunitními buňkami. Melanin také umožňuje buňkám růst v širokém rozsahu teplot a odolávat ionizujícímu záření, čímž značně zvyšuje schopnost přežití [2,6].

Lakázy jsou enzymy obsahující měď, které katalyzují jedoelektronové oxidace širokého spektra substrátů včetně mono-, di- a polyfenolů, aminofenolů, methoxyfenolů, aromatických aminů a askorbátu za současné čtyřelektronové redukce kyslíku na vodu. Běžně jsou přítomné v buňkách basidiomycet [7]. Studie na *Cr. neoformans* ukázaly, že enzym je u tohoto druhu lokalizován na vnější straně buněčné stěny. U pacientů způsobuje oxidaci dopaminu v centrální nervové soustavě a zvyšuje odolnost buněk proti makrofágům díky schopnosti oxidovat železnaté ionty [8]. Lakáza má vysokou aktivitu zejména u *Cr. neoformans*, u ostatních druhů je její aktivita nižší [6].

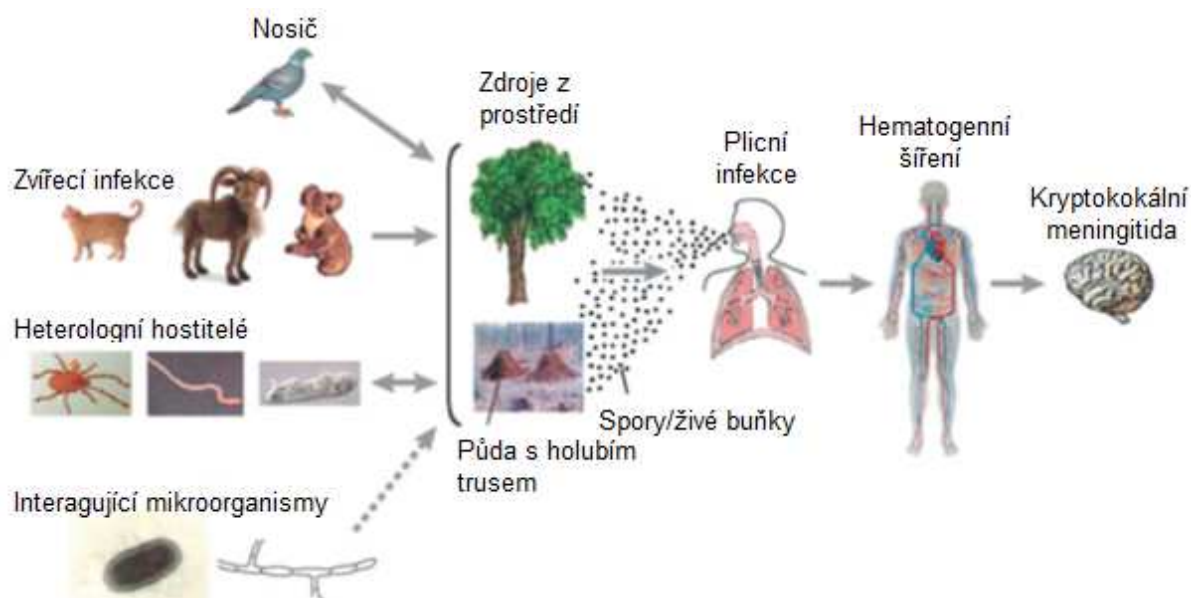
Posledním významným virulenčním faktorem přítomným pouze u *Cr. neoformans* je tvorba tzv. titan cells (obřích buněk), které se tvoří zejména na počátku plicní infekce. Jedná se o buňky o velikosti 15–100 μm (velikost normálních eukaryotických buněk je asi 5–7 μm), které mají tužší a více zesíťovanou kapsuli, což ovlivňuje permeabilitu kapsule pro různé sloučeniny, např. pro komplementární proteiny. Obří buňky mají také abnormálně silnou buněčnou stěnu (2–3 μm oproti 150–200 nm u normálních buněk). Velikost buněk je spojována s tvorbou extrémně velkých vakuol a se zvýšeným obsahem DNA uvnitř buňky. Obří buňky jsou oproti typickým haploidním buňkám polyploidní. Mohou být tetraploidní nebo oktoploidní a největší buňky mohou obsahovat i 64 a více kopií genomu. Přesto ale obsahují jediné jádro a dceřiné buňky, které se oddělují pučením, jsou haploidní. To naznačuje, že obří buňky pravděpodobně vznikají endoreduplikací [9]. Spouštěčem jejich tvorby je pravděpodobně detekce fosfolipidů v membránách fagocytů [10]. Obří buňky nemohou být díky své velikosti fagocytovány a nemohou pronikat z plic do mozku. Jejich tvorba ale snižuje fagocytózu normálních buněk, čímž podporují přežití celé populace v plicích, a podporuje i šíření normálních buněk do ostatních tkání. V konečném důsledku může dojít působením obřích buněk až k třicetnásobnému nárůstu pronikání buněk do

centrální nervové soustavy [9]. Tento fenomén je tedy důležitým faktorem podporujícím virulenci *Cr. neoformans* a cílená eliminace oběhových buněk by mohla mít významný vliv na léčbu a předcházení kryptokokózám u ohrožených jedinců.

2.3.1 Kryptokokózy způsobené *Cr. neoformans* a *Cr. gatii*

Jak už bylo řečeno dříve, infekce se objevují zejména u imunokomprimovaných jedinců, ale mohou postihnout i mnohem méně imunokomprimované jedince, např. po odstranění sleziny, trpící srpkovitou glomerulonefritidou, cirhózou, nekrotizující fasciitidou, tuberkulózou nebo těhotné ženy. Hlavní cílové orgány jsou plíce a mozek, ale zasažen může být prakticky jakýkoliv orgán včetně jater, penisu, kůže, prostaty, močových cest, očí, srdečního svalu, kostí a kloubů. *Cr. neoformans* byl dříve klasifikován do 4 sérotypů (A, B, C, D) podle polysacharidového složení kapsule, ale na základě molekulární analýzy byly sérotypy B a C reklasifikovány jako samostatný druh *Cr. gatii* a *Cr. neoformans* byl rozdělen do dvou variant – *Cr. neoformans* var. *grubii* (sérotyp A) a *Cr. neoformans* var. *neoformans* (sérotyp D) [2].

Příznaky se mohou lišit podle zdravotního stavu a rozsahu infekce. Nejlehčí infekce mohou být bez příznaků nebo pouze s kašlem, v horších případech nastává horečka, zápal plic, meningoencefalopatie, šíření buněk *Cr. neoformans* do dalších částí těla až smrt. Za hlavní rezervoár *Cr. neoformans* je považována půda kontaminovaná holubími výkaly, pro *Cr. gatii* jsou to pak stromy eukalyptu a rozkládající se dutiny stromů. Vstupní branou mikroorganismu do těla jsou plíce, které jsou velmi často postiženy. K infekci dochází vdechnutím infekčních propagulí, které se z plic šíří krevním oběhem dále do těla. Schématické znázornění šíření infekce uvádí obrázek 2. Plicní infekce může působit horečku, kašel, zápal plic. V některých případech se může plicní kryptokokóza prezentovat pleuralním výpotkem či endobronchiálními lezemi [2].



Obrázek 2 Schéma šíření a přenosu kryptokoků z prostředí do lidského těla [11]

Meningoencefalopatie je nejčastějším projevem kryptokokózy centrální nervové soustavy a příznaky mohou být meningismus (ztuhlý krk, bolest hlavy, světloplachost), otok slepé skvrny v oku vlivem zvýšeného nitrolebečního tlaku, ochrnutí lebečních nervů, jiné ohniskové

neurologické poruchy nebo zhoršený stav vědomí. V extrémních případech může zvýšený nitrolebeční tlak způsobit ztrátu zraku nebo sluchu a dokonce i kóma a smrt [2]

Primární kryptokokóza kůže a měkkých tkání je vzácná a může se projevovat tvorbou vředů. V dalších případech se může vyskytnout panariciium (hnisání na měkkých částech prstů) nebo edematózní uzlíky s horečkou. Tyto případy bývají častější a závažnější po transplantacích orgánů, dlouhodobé léčbě steroidními hormony a při chronické lymfocytické leukémii. Sekundární kožní infekce se mohou vyskytnout, pokud se buňky rozšíří do dalších částí těla a projevuje se tvorbou lezí, které začínají jako malé pupínky a přeměňují se na vředy, nebo tvorbou abscesů, celulitidy a pevných nádorů [2].

Může dojít i k postižení jater u imunokompetentních jedinců. V tomto případě se napadení kryptokoky projevuje jako žloutenka s kryptokokózou a/nebo spontánní kryptokokální zánět pobřišnice u pacientů s cirhózou jater. Diagnóza není vždy jednoduchá, protože symptomy jsou podobné jiným jaterním chorobám [2].

Neoformansové kryptokokózy se nejefektivněji léčí podáváním antimykotik. Nejčastěji to bývá kombinace amfotericinu B a flucytosinu po dobu prvních dvou týdnů a následně podávání flukonazolu po dobu nejméně dalších osmi týdnů. U velmi závažných infekcí nemusí být následná léčba běžnými dávkami flukonazolu dostatečná, pak je potřeba přikročit ke kombinaci s dalšími antimykotiky [2].

2.3.2 Ne-neoformans kryptokokózy

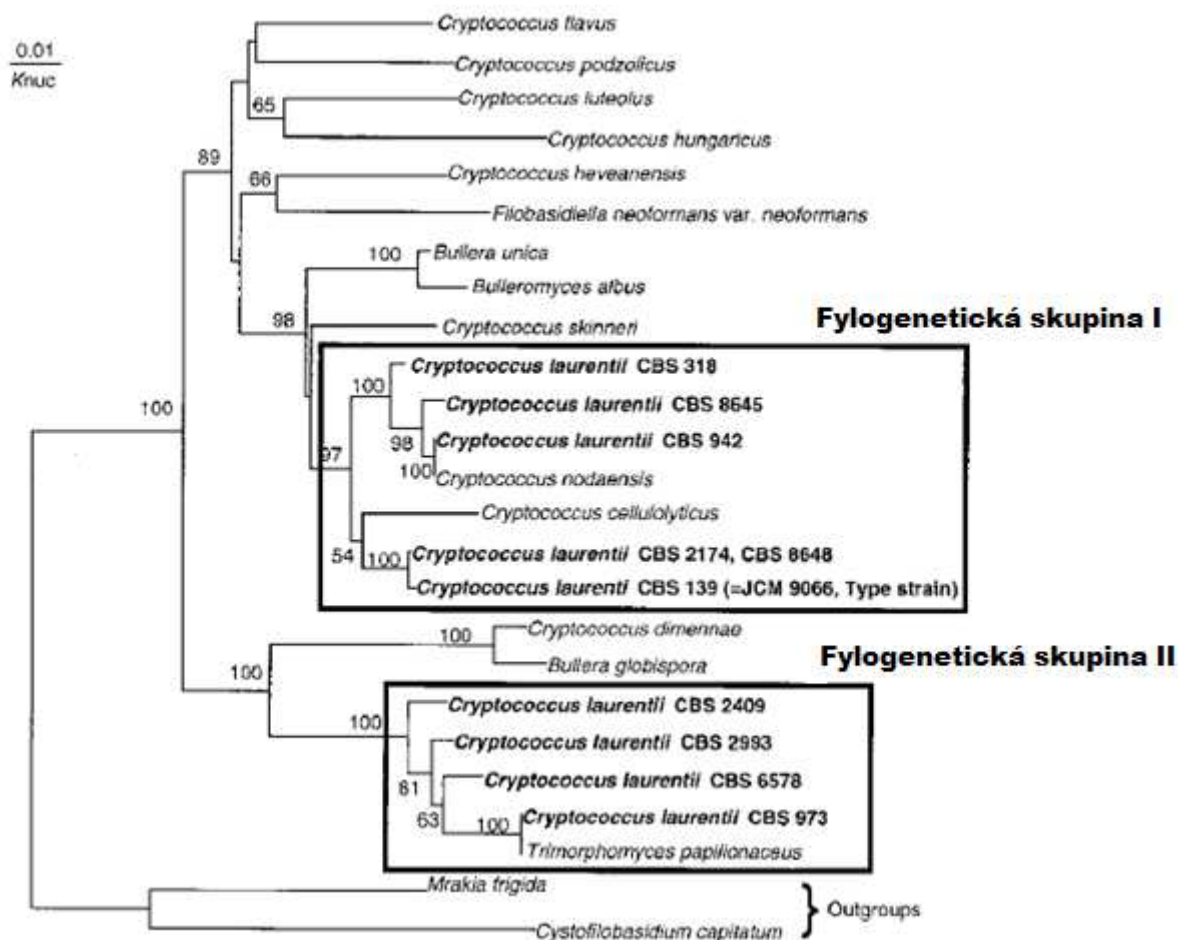
Hlavními původci jsou zejména *Cr. laurentii* a *Cr. albidus*, ale byly hlášeny i výjimečné případy způsobené druhy *Cr. adeliensis*, *Cr. curvatus*, *Cr. humicolus*, *Cr. luteolus*, *Cr. macerans* a *Cr. uniguttulatus*. Tyto druhy se vyskytují po celém světě včetně extrémních prostředí, jako je Antarktida nebo Himaláje. Hlavní ohroženou skupinou jsou stejně jako u kryptokokóz způsobených *Cr. neoformans* imunokomprimovaní jedinci a příznaky jsou často nerozeznatelné od neoformansových kryptokokóz. Do těla se mikroorganismus dostává opět přes plíce vdechnutím infekční propagulí, následně přechází do krevního oběhu a může způsobovat infekce v mnoha orgánových soustavách. Nejčastěji bývá infikována centrální nervová soustava, krevní oběh a plíce, vzácněji pak kůže, gastrointestinální trakt, oči nebo lymfatické uzliny [6].

Infekce krevního oběhu vyvolává u pacientů horečku, hypotermii a septický šok. Mezi rizikové faktory patří přítomnost invazivního zařízení, neutropenie (tj. abnormálně nízký počet neutrofilů – nejpočetnějších bílých krvinek v lidském těle) a AIDS. Infekce centrální nervové soustavy způsobuje horečku, bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, parestézii, poruchy chůze, paralýzu a změnu duševního stavu. U všech pacientů s těmito symptomy byly izolovány kryptokoky z mozkomíšního moku. Při plicních infekcích dochází ke vzniku chronických netečných chorob. Podle rozsahu infekce se může projevovat jako zápal plic nebo může docházet k tvorbě plicních abscesů či empyém. Diagnóza se dá snadno potvrdit pozitivní kultivací stěrů ze stěn průdušek a hlenů nebo biopsií [6].

Léčba těchto kryptokokóz je poměrně jednoduchá a obdobná jako u *Cr. neoformans*. Pacientům se podávají antimykotika jako např. amfotericin B, flukonazol nebo itraconazol. Doba léčby se může lišit podle místa zasažení a jeho rozsahu od 14 dní až po půl roku. Nicméně při správné diagnóze má léčba velmi vysokou úspěšnost [6].

2.4 Taxonomická situace skupiny *Cryptococcus laurentii*

Taxonomické zařazení druhů *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* se v posledních 20 letech neustále měnilo. Ještě donedávna se *Cr. flavescens* někdy klasifikoval jako *Cr. laurentii* var. *flavescens*, často však byly oba druhy považovány za synonyma. Druh *Cr. laurentii* byl pouze považován za heterogenní na základě rozdílného obsahu G + C bází a na základě rozdílných celobuněčných elektroforetických proteinových profilů. Později byla skupina *Cr. laurentii* na základě rozdílů v sekvencích ITS (internal transcribed spacer) oblasti a genu pro 28S rRNA rozčleněna do dvou fylogenetických skupin I a II, které byly dále rozčleněny do sedmi různých druhů (obrázek 3) [12].



Obrázek 3 Molekulární fylogenetický strom některých druhů *Cryptococcus* vytvořený na základě částečných sekvencí 28S rDNA. Strom byl sestaven pomocí neighbor-joining metody [12]

Pozdější studie Takashimy et al. [13] na základě analýzy sekvencí 18S rDNA, D1/D2 domén 26S rDNA a ITS oblasti a na základě biochemických vlastností přerozdělila skupinu *Cr. laurentii*. Do fylogenetické skupiny I byl zařazen *Cr. laurentii* (typový kmen JCM 9066 = CBS 139 a kmeny CBS 2174 a CBS 8648) spolu s *Cr. aureus* (CBS 318) a *Cr. flavescens* (CBS 8645, CBS 942), který byl vyčleněn jako samostatný druh. Současně byl touto studií reklasifikován i *Cr. nodaensis* (kmen CBS 101036), který je nyní považován za *Cr. flavescens*. Kmeny *Cr. laurentii* z fylogenetické skupiny II byly reklasifikovány jako *Cr. carnescens* (CBS 973) a *Cr. peneaus* (CBS 2409). Kmeny CBS 2993 a CBS 6578 jsou

pravděpodobně druhy *Cr. heimaeyensis*, respektive *Cr. tephrensensis*. Tato informace však nebyla definitivně potvrzena. Dále se pak do skupiny II řadí ještě *Cr. victoriae*. Fylogenetickou skupinu I tedy tvoří druhy *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens* a *Cr. aureus* a fylogenetickou skupinu II druhy *Cr. carnescens*, *Cr. peneaus* a *Cr. victoriae*.

Všechny druhy ve skupině *Cr. laurentii* jsou si po fyziologické i biochemické stránce podobné, ale obě fylogenetické skupiny lze rozlišit na základě určitých asimilačních vzorů. Zástupci fylogenetické skupiny I asimilují kombinaci D-glukosaminu, N-acetyl-D-glukosaminu, DL-mléčné kyseliny, 1,2-propandiolu, dusitanu sodného a liší se nároky na vitaminy. Skupinu II lze odlišit na základě kombinace asimilace L-sorbózy, inulinu, D-glukosaminu, N-acetyl-D-glukosaminu, glukono- δ -laktonu, kyseliny DL-mléčné, dusičnanu draselného, dusitanu sodného, ethylenaminhydrochloridu a kadaverindihydrochloridu [13].

2.5 Biochemické vlastnosti a enzymová aktivita *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens*

Jelikož jsou *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* součástí jedné fylogenetické skupiny, jsou si fyziologicky velmi blízké. Nejspolehlivěji lze identifikovat porovnáním sekvence D1/D2 domény 26S rDNA a ITS oblasti, ale je možné je rozlišit i na základě biochemických vlastností. *Cr. flavescens* je oproti *Cr. laurentii* schopen růst bez přidaných vitaminů v médiu, ale není schopen asimilovat D-glukosamin a kreatinin, *Cr. laurentii* naopak k růstu vitaminy potřebuje a D-glukosamin a kreatinin schopen asimilovat je [4].

Mezi oběma druhy se vyskytují i rozdíly v extracelulární enzymové aktivitě. Při screeningu kvasinek izolovaných z rostliny *Vriesea minarum* testovali Gomes et al. [14] celkem třináct kmenů *Cr. flavescens* a sedm kmenů *Cr. laurentii*. V této studii všechny kmeny obou druhů vykazovali xylanázovou a proteázovou aktivitu. Lišily se však v produkci dalších enzymů. Celkem 6 ze 7 kmenů *Cr. laurentii* vykazovalo amylázovou aktivitu a štěpilo škrob, dále dva ze sedmi kmenů štěpily karboxymethylcelulózu a vykazovalo tedy celulázovou aktivitu. U *Cr. flavescens* vykazovaly amylázovou aktivitu pouze 3 kmeny ze 13, celulázová aktivita nebyla zjištěna u žádného kmene a jeden kmen vykazoval pektinázovou aktivitu při pH 7.

Celulázovou aktivitu *Cr. laurentii* potvrzuje i screening kvasinek prováděný de Souza et al. [15]. Ti v Brazílii izolovali kmeny kvasinek z půdy během období dešťů a následně testovali jejich celulolytickou aktivitu na výliscích cukrové třtiny ošetřených kyselinou sírovou. Po 72 hodinách bylo dosaženo 32% konverze celulózy a byla prokázána β -glukosidázová aktivita.

V další studii vypracované Ganou et al. [16] byly izolovány kvasinky z povrchu plodů manga a byla testována jejich amylolytická, proteolytická a lipolytická aktivita. Mezi izolovanými kvasinkami byl i jeden kmen *Cr. flavescens*, který vykazoval vysokou lipolytickou aktivitu a podobně jako kmeny ve studii Gomes et al. [14] nevykazoval amylolytickou aktivitu, oproti této studii ale nevykazoval ani proteolytickou aktivitu, kterou Gomes et al. zaznamenali u všech izolovaných kmenů *Cr. flavescens*.

2.6 Charakteristika druhu *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C. E. Skinner (1950)

Synonyma:

Torula laurentii Kufferath (1920)

Torulopsis laurentii (Kufferath) Lodder (1934)

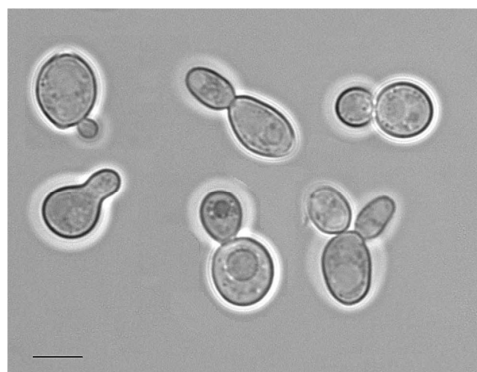
Rhodotorula laurentii (Kufferath) Hasegawa, Banno & Yamauchi (1960)

Rhodotorula nitens Mackenzie & Auret (1963)

Cr. laurentii (obrázek 4) se řadí do třídy Tremellomycetes, řádu Tremellales a čeledi Bulleromyces. Druh byl izolován z mnoha rozmanitých prostředí po celém světě včetně palmového vína, půdy, mořské vody, rozkládajícího se dřeva, ptačího trusu, ale i z klinických zdrojů jako původce kryptokokózy. Typovým kmenem je *Cr. laurentii* CBS 139 [4].

V tekutém 2% glukózovém médiu s kvasničným extraktem se tvoří film a vločkovitý sediment. Buňky jsou nepravidelné, široce elipsovité až kulovité, buňky mají velikost 5–11 μm \times 4–6,5 μm a množí se polárním pučením [4].

Na 5% sladinovém agaru tvoří mírně vypouklé kolonie, šedavě krémově zbarvené, hlenovité s hladkým povrchem a mírně narušeným okrajem. Buňky jsou široce elipsovité až válcovité o velikosti 6,5–8,5 μm a obvykle se množí polárním pučením. Netvoří se vlákna ani pseudohyfy. Fermentační aktivita chybí. [4].



Obrázek 4 Typový kmen *Cryptococcus laurentii* CBS 139, délka čáry odpovídá 10 μm

Cr. laurentii je znám jako antagonista růstu plísní na skladovaném ovoci. Suspenze jeho buněk byly úspěšně použity k inhibici růstu plísní *Botrytis cinerea* na jablkách [17] a dále k inhibici *Penicillium expansum* na jablkách a hruškách v kombinaci s dalšími mikroorganismy (např. *Lentinula edodes*) nebo chemickými sloučeninami (např. pyrimethanilem) [18] [19]. V biotechnologii byl využit např. pro asymetrickou redukci substituovaných acetofonenonů na opticky aktivní fenylethanolu [20]. Kmeny izolované v Antarktidě byly využity pro biosyntézu nenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem [21]. Dalším využitím je produkce L-lyzinu z DL- α - ϵ -aminokaprolaktamu pomocí L- α - ϵ -aminokaprolaktamázy *Cr. laurentii* [22]. *Cr. laurentii* byl úspěšně použit i pro čištění odpadní vody ve vinařství. Santos et al. [23] testovali několik kmenů kvasinek a s pomocí kmene *Cr. laurentii* AGG726 dosáhli 90-93% poklesu obsahu polyfenolů a chemické spotřeby kyslíku ve vodě. Hodnoty těchto parametrů po biotechnologickém zpracování nicméně stále nesplňovaly zákonné limity a bylo nutné dočištění nízkými koncentracemi Fentonova činidla (směs peroxidu vodíku a železnatých iontů v poměru 15:1).

2.7 Charakteristika druhu *Cryptococcus flavescens* (Saito) C. E. Skinner (1950)

Synonyma:

Torula flavescens Saito (1922)

Torulopsis flavescens (Saito) Lodder (1934)

Cryptococcus flavescens (Saito) C. E. Skinner (1974b)

Cryptococcus laurentii (Kufferath) C. E. Skinner var. *flavescens* (Saito) Lodder & Kreger-van Rij (1952)

Cryptococcus nodaensis (Sato et al. 1999) nom. inval. (nebyl stanoven latinský popis)

Cr. flavescens se stejně jako *Cr. laurentii* řadí do třídy Tremellomycetes, řádu Tremellales a čeledi Bulleromyces. Donedávna byl považován za synonymum *Cr. laurentii*, ale Takashimou et al. [13] byl vyčleněn jako samostatný druh. Izolován byl z různých zdrojů po celém světě včetně Japonska, USA, Indonésie i Evropy. Buňky byly izolovány ze zrn pšenice, z mozkomíšního moku pacientů trpících AIDS, z půdy, z nektaru květů silenky bílé, z řek i z trávicího traktu housenek. Typovým kmenem je *Cr. flavescens* CBS 942 [4].

V tekutém 2% glukózovém médiu s kvasničným extraktem jako zdrojem dusíku tvoří téměř kulovité buňky velikost 8–17 µm × 7–14 µm. Mohou se tvořit chlamydosporám podobné shluky buněk s tlustou buněčnou stěnou, které klíčí pomocí krátkých vláken s délkou do 25 µm [4].

Na 5% sladinovém agaru tvoří ploché až mírně vypouklé kolonie, barva je matná a šedavě krémová, konzistence máslovitá až hlenovitá. Kolonie mají hladký povrch s hladkým nebo mírně zvlněným okrajem. Tvar buněk je nepravidelný a může být válcovitý, elipsovité nebo hruškovité. Buňky mohou být částečně nafouknuté a jejich velikost je 8–17 µm × 3–6,5 µm. Pučení je polární i laterální na protažených výběžcích nebo sterigmě podobných útvarech. Buňky se mohou spojovat a tvořit krátké řetězce pseudohyf. Fermentační aktivita chybí [4].

Z biotechnologického hlediska je významný například kmen *Cr. noadensis* CBS 101036, který byl později identifikován jako *Cr. flavescens*. Tento kmen byl patentován jako producent termostabilní glutaminázy tolerantní k vyšším koncentracím soli [24]. Kmen *Cr. flavescens* 39-A izolovaný z trávicích šťáv masožravé rostliny *Nepenthes ventricosa* byl využit pro produkci lipázy 39-A, která byla aplikována do čerstvých sýrů typu mozzarella pro zlepšení sensorického profilu [25]. Podobně jako *Cr. laurentii* má i *Cr. flavescens* antagonistický účinek proti růstu plísní. Zejména kmen OH 182.9 je velmi často citován jako inhibitor růstu plísní rodu *Fusarium* na pšenici i dalších obilovinách [26]. Vzhledem k tomu, že dříve byl tento druh považován za synonymum *Cr. laurentii*, je možné, že některé kmeny identifikované fenotypicky jako *Cr. laurentii* a následně použité v biotechnologických výrobcích mohou ve skutečnosti představovat *Cr. flavescens*. Pro potvrzení takových nejasností je nejvhodnější provést porovnání D1/D2 domén LSU a ITS sekvencí.

2.8 Charakteristika druhu *Cryptococcus victoriae* M. J. Montes et al.

Synonyma:

Nejsou známa žádná synonyma.

Cryptococcus victoriae se řadí do třídy Tremellomycetes, řádu Tremellales, čeledi *victoriae*. Řadí se do fylogenetické skupiny II spolu s dvěma bývalými synonymy *Cr. laurentii* – *Cr. peneaus* a *Cr. carnescens*. Od *Cr. laurentii* je snadno odlišitelný tím, že nedokáže asimilovat ethanol, DL-laktát a kreatinin a není schopen růst při 30 °C. Odlišení od ostatních druhů v čeledi *victoriae* je možné pouze porovnáním D1/D2 nebo ITS sekvence. *Cr. victoriae* má široké geografické rozšíření a obývá rozmanitá prostředí. Byl izolován např. z půdy v Antarktidě [27], z vody jezera v Patagonii [28], z nektaru květů rulíku zlomocného v Německu [29], z nosní dutiny divokých koček v Itálii [30] nebo ze španělské sušené šunky [31]. Obecně se zdá, že *Cr. victoriae* je všudypřítomný druh, který toleruje nízké teploty, ale jeho výskyt není omezen pouze na prostředí s nízkou teplotou. Typovým kmenem je *Cr. victoriae* CBS 8685 [4].

Na 2% tekutém glukózovém médiu s kvasničným extraktem tvoří tenký film, případně může tvořit kroužek nebo sediment. Buňky mají elipsovité až válcovité tvar a jejich velikost je 5–9 µm × 2,8–4 µm. Buňky se v tekutém médiu dělí polárním pučením a mohou se tvořit krátká vlákna nebo pseudohyfy [4].

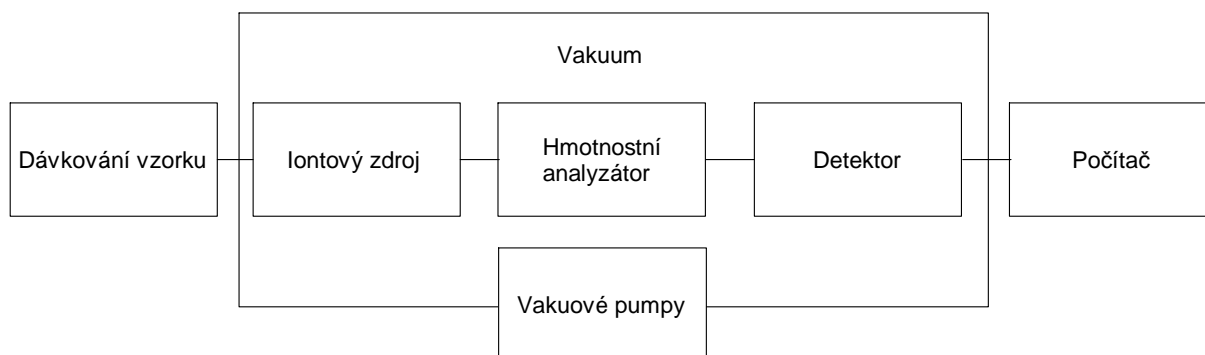
Při růstu na 5% sladinovém agaru se po týdenní kultivaci při 20 °C tvoří ploché mírně vystouplé kolonie s lesklým povrchem a krémovou až bledě žlutavě hnědou barvou. Konzistence je hlenovitá a hladká a kolonie mají rovný okraj. Buňky jsou elipsovité až protažené o velikosti 4,5–11 µm × 3–4 µm. Množí se sympodiálním pučením, kdy vzniká protahující se konidiofor, na jehož vrcholu se vytvoří konidium a růst dále pokračuje do strany od vrcholu konidioforu. Výsledkem je „zubatý“ řetězec buněk. Buňky se mohou spojovat do krátkých řetězců [4].

V biotechnologii je *Cr. victoriae* využíváný velmi málo [4]. Pouze kmen NPCC 1263 byl využit podobně jako *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* k velmi účinné inhibici růstu *Botrytis cinerea* a *Penicillium expansum* na povrchu sklizených hrušek díky svým schopnostem kolonizovat rány na plodech, produkovat hydrolytické enzymy a killer toxiny a bránit klíčení spor [32]. Další možné biotechnologické využití je předmětem dalšího bádání.

2.9 Instrumentace v hmotnostní spektrometrii

Hmotnostní spektrometrie (MS) je instrumentální analytická technika, která slouží k určování molekulové hmotnosti, prvkové analýze a identifikaci a strukturní analýze látek. Tato technika má mnoho výhod. Pro analýzu stačí velmi malé množství vzorku a detekční limity jsou velmi nízké. Lze analyzovat jednotlivé prvky i sloučeniny o molekulové hmotnosti až v řádech MDa. Technika je využitelná pro anorganické, organické, organokovové, přírodní i syntetické látky a molekulovou hmotnost sloučenin lze určit podle použitého módu buď na jedno (tzv. low resolution MS – MS s nízkým rozlišením) nebo až na čtyři nebo šest desetinných míst (tzv. high resolution MS – MS s vysokým rozlišením). Lze taktéž analyzovat vzorky všech skupenství, pouze je pro ionizaci určitého skupenství potřeba použít příslušný iontový zdroj. Velmi často se MS spojuje s dalšími technikami jako je plynová či kapalinová chromatografie, což umožňuje skloubit výhody obou zařízení a dosáhnout tak dobré separace molekul ze směsí s následnou identifikací pomocí MS. Často se také využívá tandemová hmotnostní spektrometrie MS/MS, která umožňuje další fragmentaci vybraných iontů a detailnější strukturní analýzu.

Princip fungování MS je založený na interakci iontů a magnetického a elektrického pole. Obecné schéma hmotnostního spektrometru uvádí obrázek 5. Každý spektrometr se skládá ze tří hlavních částí - iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Další důležité součásti zařízení jsou vakuové pumpy, které zajišťují vakuum nutné pro funkci přístroje a počítač, který řídí celé zařízení a zpracovává data z detektoru. Průběh každé MS analýzy je shodný. Do iontového zdroje se dává vzorek, který se ve zdroji převádí na ionty v plynném skupenství. Ionizovaný analyt přechází do analyzátoru, kde se generuje elektrické a magnetické pole a na iont působí elektrická a magnetická síla, přičemž platí, že elektrická síla ovlivňuje rychlost pohybu iontu a magnetická síla směr pohybu iontu. Míra vychýlení iontu a rychlost pohybu jsou závislé na poměru hmotnosti iontu a velikosti náboje podle druhého Newtonova pohybového zákona ($F = ma$). Lehčí ionty se snáze vychýlí z trajektorie a pohybují se rychleji, zatímco těžší ionty se pohybují pomaleji a vychylují se méně při působení těžké magnetické a elektrické síly. Hmotnostní analyzátor a detektor jsou vždy pod vakuem, které zajišťuje prodloužení střední volné dráhy molekul v systému. Vyselektovaný paprsek iontů dopadá po rozdělení v analyzátoru na detektor, který zaznamenává množství dopadajících iontů každého poměru. Detekovaný elektrický signál pak počítač převede na hmotnostní spektrum, ze kterého lze určit molekulovou hmotnost látky a její strukturu.



Obrázek 5 Obecné schéma hmotnostního spektrometru

2.9.1 Iontové zdroje

Pro převod sloučenin na ionty lze využít rozličné techniky, které jsou závislé na skupenství analyzovaného vzorku, jeho polaritě, stabilitě, velikosti molekul analytu, těkavosti a dalších fyzikálně chemických vlastnostech. Jejich využití se ne vždy překrývá a každá ionizační technika je více či méně vhodná pro určitý analyt.

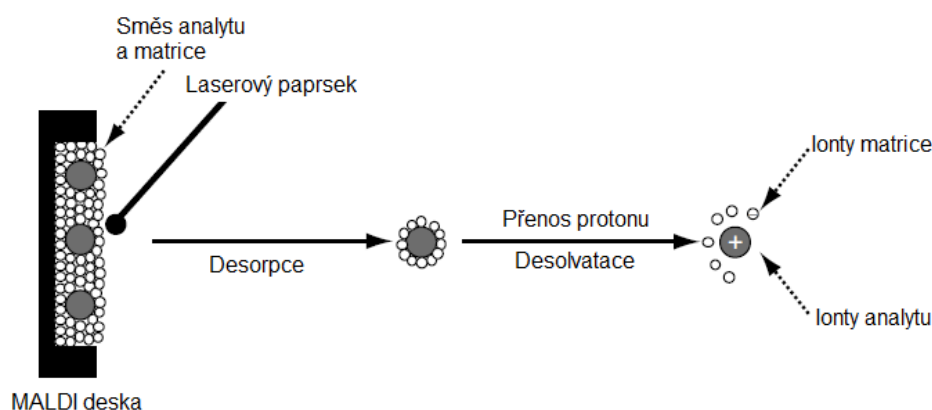
Pro ionizaci ve spojení s plynovou chromatografií se využívají elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI). EI je založená na bombardování molekul analytu urychlenými elektrony a jedná se o tvrdou ionizační techniku. Žhavené vlákno emituje elektrony, které jsou urychlovány v potenciálu 70 eV. Magnetické pole tyto elektrony směřuje do paprsku, který prochází proudem plynů z kolony. Narážející elektrony vyráží z molekul plynného analytu elektrony a tvoří se radikálové kationty zvané molekulové ionty ($M^{\bullet+}$). Pokud má molekulový iont dostatečnou vnitřní energii, dojde k fragmentaci molekuly za vzniku fragmentových iontů o nižší vnitřní energii. Standardně se měření provádí při 70 eV, protože při této energii je pozorována maximální intenzita iontů. Díky opakovatelnosti ionizace umožňuje EI tvorbu knihoven spekter pro jednotlivé látky (např. databáze NIST). CI je oproti EI měkká ionizační technika. Vzorek z kolony se mísí s nadbytkem ionizačního plynu (nejčastěji methan), který se ionizuje elektronovou ionizací. Vzniklé primární ionty interagují s analytem za vzniku protonovaných pseudomolekulárních iontů $[M + H^+]$, které mají většinou nízkou vnitřní energii a jsou málo náchylné k fragmentaci. Díky nízké fragmentaci je intenzita vzniklých iontů velmi vysoká a CI nabízí vyšší citlivost díky nižší intenzitě šumu [33].

Pro ionizaci kapalných vzorků ve spojení s kapalinovou chromatografií nebo kapilární elektroforézou se nejčastěji používá elektrosprejová ionizace (ESI) a méně často pak chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). ESI je jemná ionizační technika, při které vznikají protonované pseudomolekulární ionty nebo iontové adukty se sodnými, draselnými či amonnými kationty. Vzorek přichází do iontového zdroje kovovou kapilárou, na kterou je přiváděno vysoké napětí (2,5–4 kV). V kapiláře dochází k uspořádání náboje a při výstupu se vzorek disperguje do aerosolu. Kolem proudí sušící plyn, který odpařuje z kapek rozpouštědlo. Vlivem hromadění náboje na kapkách dochází ke coulombickým explozím a kapky se neustále zmenšují až na jednotlivé ionty a následně jsou vtahovány do hmotnostního analyzátoru. APCI je jemná ionizační technika s podobným principem jako CI. Vzorek se v zmlžovači převádí na aerosol, který je unášen proudem dusíku. Analyt je desolvatován ve vyhřívané křemenné trubici a pomocný plyn (dusík) se následně ionizuje koronovým výbojem za vzniku primárních iontů. Primární ionty kolidují s odpařenými molekulami rozpouštědla za tvorby sekundárních plynných iontů, které poté ionizují molekuly analytu. Při ionizaci pomocí APPI je analyt bombardován fotony o energii 10 eV emitovanými kryptonovou lampou. Tyto fotony mohou ionizovat molekuly, jejichž ionizační energie je menší než 10 eV. To zahrnuje ionizaci většiny větších molekul (sledovaných analytů) a vylučuje ionizaci většiny rozpouštědel a běžných plynů v APPI [33].

Pro prvkovou analýzu se používá ionizace indukčně vázaným plazmatem (ICP). Zmlžený vzorek je přiváděn nosným plynem do argonového plazmatu o teplotě 6 000–10 000 K. V plazmatu dochází k vysušení vzorku, rozkladu na atomy a tvorbě kladně nabitých iontů, které jsou vtahovány vakuem do hmotnostního analyzátoru [33]. Pomocí ICP-MS lze analyzovat téměř všechny prvky s výjimkou vodíku, helia, neonu, argonu a fluoru [34].

2.9.1.1 Ionizace laserovou desorpčí za pomoc matrice (MALDI)

MALDI je metoda pro ionizaci z pevného skupenství a je vhodná zejména pro organické sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností, které jsou termolabilní nebo netěkavé (např. peptidy, proteiny, glykoproteiny, oligoproteiny a oligonukleotidy). Před samotnou analýzou se vzorek nanese na MALDI desku a převrství se roztokem matrice. Jako matrice se používají sloučeniny, které efektivně absorbují záření v UV nebo IR oblasti a při excitaci uvolňují proton. Další funkcí matrice je ochrana analytu před rozkladem přímým působením laserových paprsků [35]. Směs je poté vysušena, aby se odstranily molekuly rozpouštědla, a dochází ke kokrytalizaci analytu s matricí, která molekuly analytu uzavírá do svých krystalů. Krystaly jsou následně ozařovány intenzivními laserovými paprsky. Dopadající paprsky způsobují rychlé zahřátí krystalů a sublimaci shluků analytu a matrice do plynné fáze. Excitované molekuly matrice se ionizují, předávají proton analytu a poté se odpařují a oddělují od ionizovaného analytu v plynné fázi, který je vtahován do hmotnostního analyzátoru [33]. Schématické znázornění průběhu ionizace uvádí obrázek 6. Výsledkem je opět vznik pseudomolekulárního iontu $[M + H^+]$ a jedná se o měkkou ionizační techniku.



Obrázek 6 Princip ionizace v MALDI iontovém zdroji [33]

Co se týče matric, nejčastěji se využívají kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina sinapová a kyselina ferulová, ale bylo testováno nespočetné množství dalších matric. V zásadě lze využít k ionizaci každou organickou kyselinu, avšak účinnost může být velmi rozdílná [35]. V infračervené oblasti lze využít jako matrici i vodu v podobě ledu, což je velmi výhodné, jelikož je přirozeně přítomna ve všech biologických vzorcích a není nutná jiná úprava vzorku než jeho zmrazení [36]. Takové vzorky samozřejmě nelze používat delší dobu, protože ve vakuu dochází k rychlé sublimaci ledu a vzorky po ostřelování laserem velmi rychle tají. Při MALDI analýze lze také využít pomocné matrice (tzv. co-matrix), které se přímo neúčastní procesu ionizace a desorpce, ale mohou zlepšovat kvalitu konečného signálu. Takto lze využít např. amonné soli při analýze fosfopeptidů. Fosfátové skupiny na peptidovém řetězci působí proti tvorbě kationtů a použitím citrátu nebo octanu amonného jako pomocné matrice lze zlepšit intenzitu signálu [37]. Pro zlepšení ionizace nepolárních polymerů lze využít přísad kovových iontů v podobě měďnatých nebo stříbrných solí [38]. Na závěr je třeba dodat, že ačkoliv je výběr vhodné matrice důležitý, nejzásadnější parametrem analýzy je vždy příprava vzorku.

Velmi důležitou součástí MALDI je laser, protože zajišťuje desorpci molekul a dodává energii pro ionizaci analytu. Nejčastěji se využívají lasery pracující v UV a IR oblasti. Nejběžnější UV lasery jsou dusíkový laser emitující záření o vlnové délce 337 nm a Nd:YAG laser (yttrium aluminium granát dopovaný ionty neodymu) emitující záření o vlnové délce 355 nm. Nejběžnější IR lasery jsou Er:YAG (yttrium aluminium granát dopovaný ionty erbia) emitující záření o vlnové délce 2,94 μm a laser s oxidem uhličitým a vlnovou délkou 10,6 μm [35]. Při běžných analýzách poskytují IR i UV lasery podobné výsledky, ale při analýze křehkých molekul poskytuje IR laser až desetkrát vyšší citlivost než UV laser. To má velký význam zejména při sledování posttranslačních modifikací proteinů a peptidů jako je glykosylace nebo sulfatace, kterýchž ztrátám dochází při desorpci UV laserem a v hmotnostním spektru pak nejsou vidět [39].

Ve většině MALDI zařízení probíhá desorpce a ionizace ve vakuu a vzorek je tedy během analýzy nepřístupný. V současné době existují i MALDI zdroje pracující za atmosférického tlaku (APMALDI), nicméně i v těchto iontových zdrojích musí být vzorek uzavřen v prostoru, aby byl chráněn před nečistotami z okolí a aby byl obsluhující pracovník chráněn před možným ozářením laserem [40].

2.9.2 Hmotnostní analyzátoary

Hmotnostní analyzátoar je samotnou „duší“ hmotnostního spektrometru a separuje ionty na základě poměru hmotnosti a náboje iontu (m/z). Analyzátoarů je opět mnoho typů a liší se v hlavních parametrech, mezi které patří zejména měřitelný rozsah molekulových hmotností, přesnost měření molekulové hmotnosti, citlivost, mód a rychlost získávání spekter, lineární dynamický rozsah, univerzálnost použití s jednotlivými ionizačními technikami a v neposlední řadě samozřejmě pořizovací cena.

Prvním typem jsou sektorové analyzátoary. Jedná se o zakřivené trubice, ve kterých na ionty působí magnetická a/nebo elektrická síla a dochází k zakřivení trajektorie prolétající částice. Nastavením parametrů lze vyselektovat pouze určitý rozsah m/z , který se dostane na detektor. Často se kombinuje magnetický sektor s elektrostatickým. Magnetický sektor zakřivuje trajektorii částic a elektrostatický zajišťuje, aby měly všechny částice stejnou kinetickou energii.

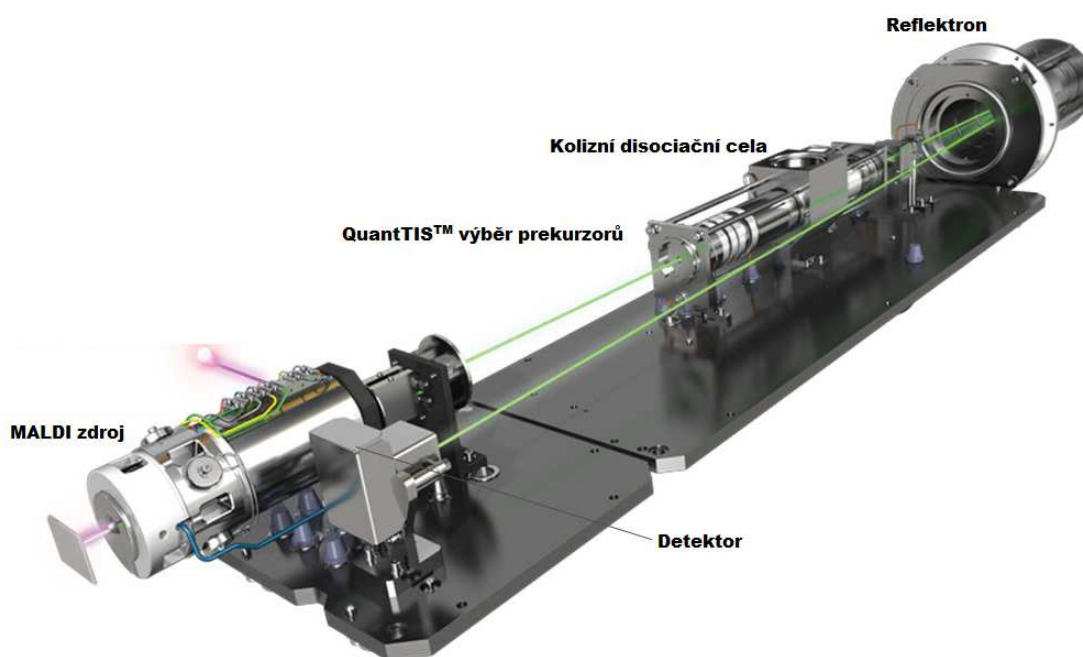
Kvadrupól je asi nejpobulárnější typ analyzátoaru, protože jeho pořizovací cena je relativně nízká, je robustní, spolehlivý a snadno se obsluhuje. Skládá se ze čtyř tyčí posazených rovnoběžně s pohybem iontů. Dvě protější tyče jsou nabity kladně stejnosměrným proudem a vedlejší tyče jsou nabity záporným nábojem. Kombinací stejnosměrného napětí a radiofrekvenčního pole na tyčích kvadrupólu lze buď selektivně ustálit nebo vychýlit dráhu iontu s určitým poměrem m/z . Nestabilní ionty se vychýlí, narazí na tyč kvadrupólu a vybijí se, zatímco stabilní ionty proletí trubicí po relativně přímé dráze a dopadnou na detektor [33].

Kvadrupólová iontová past je skladnější variací klasického kvadrupólu. Skládá se ze tří válcovitých symetrických elektrod – dvou krycích elektrod a jedné prstencové elektrody. Ionty analyzovaného poměru m/z se zachytí v iontové pasti působením radiofrekvenčního potenciálu mezi vstupní krycí a prostřední prstencovou elektrodou. Zvýšením radiofrekvenčního pole dojde k vymrštění požadovaných iontů z pasti směrem k detektoru. Kombinací kvadrupólu a iontové pasti je lineární kvadrupólová iontová past. V ní jsou ionty

zachyceny mezi tyčemi s radiofrekvenčním polem, přičemž na konce tyčí je přiváděno stejnosměrné napětí bránící iontům ve vylétnutí [33].

2.9.2.1 Průletový analyzátor (*time-of-flight*)

Průletový analyzátor (TOF) je pulzní hmotnostní analyzátor, který se velmi často spojuje s MALDI jako iontovým zdrojem, který také pracuje v pulzním režimu. Jedná se o poměrně jednoduché zařízení skládající se z pulzní elektrody, která je orientována kolmo na přicházející paprsek iontů, průletové trubice a případně reflektoru. Iontům ze zdroje je na počátku průletové trubice předána pulzní elektrodou stejná kinetická energie a ionty jsou vymrštěny do letové trubice. Díky tomu, že všem iontům je předána stejná energie, dojde při průletu trubicí k rozdělení na základě poměru m/z . Větší ionty poletí pomaleji, menší rychleji. Na konci průletové zóny může být umístěn reflektor, což je soustava kruhových elektrod s postupně se zvyšujícím napětím, která slouží jako iontové zrcadlo. Ionty s vyšší energií proniknou hlouběji do elektrického pole a jejich doba letu se prodlouží, zatímco ionty s menší energií se odrazí hned na počátku. Přítomnost reflektoru prodlužuje dvojnásob vzdálenost, kterou musí ionty urazit, a zvyšuje se rozlišovací schopnost. Pokud není reflektor přítomen je místo něj umístěn detektor [33]. Čas, za který dopadne iont na detektor je úměrný druhé odmocnině z poměru m/z [41]. TOF-MS má také velmi vysokou efektivitu. Guilhaus et al. [42] uvádí, že účinnost TOF-MS je až 25 %, zatímco zařízení s kvadrupólem mají účinnost asi jen 0,1 %.

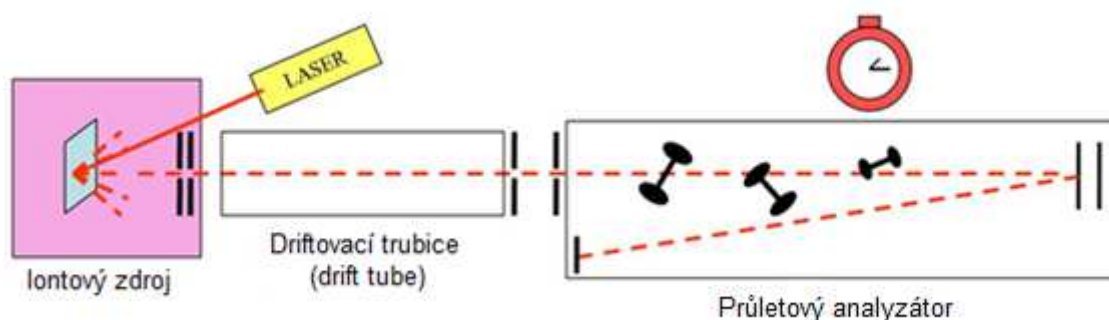


Obrázek 7 Instrumentace MALDI-TOF/TOF spektrometru TOF-TOFTM 5800 Systems firmy Sciex [43]

Složitější variantou klasického TOF je tandemový MALDI-TOF/TOF. Zjednodušeně se jedná o spektrometr složený ze dvou TOF analyzátorů. Konstrukčně se mohou zařízení různých firem mírně lišit a může se lišit i způsob prováděné fragmentace. Přístroje firmy Sciex (obrázek 7) se skládají ze dvou TOF analyzátorů, mezi nimiž je umístěna kolizní cela. V prvním analyzátoru se ionty rozdělí a na základě jejich rychlosti lze pomocí elektronické „brány“ vybrat ionty jen o určitém poměru m/z tím, že se brána na určitou dobu otevře.

V kolizní cele, která je vyplněna inertním plynem (argon, helium, vodík, vzduch), dojde ke srážce iontů s molekulami tohoto plynu a fragmentaci. Vzniklé fragmenty se na počátku druhého TOF analyzátoru elektrickým impulzem opět urychlí a detekují se [44].

Přístroje řady ultrafleXtreme firmy Bruker Daltonics (obrázek 8) obsahují také dva TOF analyzátor, mezi nimiž je umístěna elektronická „brána“, která může stejně jako u předchozího zařízení odseparovat nežádoucí ionty na základě jejich rychlosti pohybu v prvním analyzátoru. Fragmentace je ale u těchto zařízení prováděna hned na počátku zvýšením intenzity laserového paprsku, který předá molekulám vyšší energii a způsobí tak jejich štěpení. Selektované fragmenty jsou pak opět urychleny elektrickým impulsem v druhém TOF analyzátoru [45].



Obrázek 8 Schematické znázornění instrumentace MALDI-TOF/TOF spektrometru firmy Bruker Daltonics [45]

Tandemová MALDI-TOF/TOF zařízení mohou pracovat i v režimu klasického MALDI-TOF analyzátoru. Stačí pouze vyřadit z provozu kolizní celu, respektive snížit intenzitu laseru. Měření lze provádět v lineárním módu, kdy je reflektrom vypnutý a ionty se detekují na detektoru umístěném právě za reflektrem, nebo v opačném případě se zapnutým reflektrem a detekcí pomocí reflektromového detektoru umístěného naproti reflektoru vedle vstupu iontů do druhého TOF analyzátoru.

2.9.3 Detektory

Ionty, které se rozdělí v hmotnostním analyzátoru na základě poměru m/z přichází do detektoru, který zaznamenává jejich množství pro každý poměr m/z a generuje hmotnostní spektrum. Rozlišují se tři základní typy detektorů.

Prvním typem jsou tzv. point ion collectors (bodové iontové kolektory), které detekují všechny dopadající ionty v jednom místě, ale v různém čase. Mezi tyto detektory se řadí elektronový násobič a fotonásobič. V elektronovém násobiči dopadají ionty na dynodu a vyráží z ní elektron, který je elektrickým potenciálem urychlen a dopadá na další dynodu, ze které vyráží další elektrony. Tento proces se obvykle opakuje desetkrát až dvanáctkrát (opakování určuje počet dynod v detektoru) a signál se zesílí až milionkrát. U fotonásobiče je situace mírně složitější. Zde dopadají ionty také na dynodu a vyráží elektrony. Ty ale dopadají na fosforeskující destičku, kde dochází ke konverzi na fotony, které detekuje fotonásobič. Tento typ detektorů se běžně používá pro MS s kvadrupólem, iontovou pastí nebo sektorovými analyzátoru [33].

Druhým typem jsou tzv. array collectors (polové kolektory), které detekují všechny dopadající ionty ve stejném čase, ale na různém místě. Řadí se mezi ně zejména MCP detektor (micro-channel plates), který se využívá zejména u zařízení s TOF detektorem. Tento detektor se skládá z velkého počtu miniaturních elektronových násobičů, které jsou uspořádány vedle sebe v ploše a povrch detektoru je pokrytý kovem, který slouží jako elektrody. Mezi ně je vloženo napětí, které vytváří gradient elektrického pole. Ionty dopadají na povrch MCP a vyrazí několik elektronů, které jsou urychleny elektrickým polem a opakovaně naráží na vnitřní stěny obou elektrod za vyrazení dalších elektronů. Nakonec jsou elektrony zachyceny anodou a detekuje se elektrický signál. MCP detektory zajišťují zesílení signálu v řádech 10^4 až 10^5 . Pro dosažení vyššího zesílení se zařazují dva MCP detektory za sebe [33].

Třetím typem jsou detektory využívané pro FT-ICR MS a MS s orbitrapem. Jedná se o dvě kovové desky, které jsou umístěny v oblasti hmotnostního analyzátoru. Ionty oscilují v analyzátoru a při přiblížení k deskám detektoru se generuje v obvodu mezi deskami slabý elektrický proud, který se musí dále zesílit [33].

2.9.4 Vakuové pumpy

Vakuové pumpy jsou v publikacích často opomíjenou součástí hmotnostních spektrometrů, jejich činnost je ale pro funkci celého systému velmi důležitá. S klesajícím tlakem se totiž velmi výrazně mění střední volná dráha molekul, což je vzdálenost, kterou urazí molekula plynu předtím, než se srazí s jinou molekulou. Při běžném atmosférickém tlaku je střední volná dráha přibližně $6,7 \cdot 10^{-6}$ cm, pokud ale hodnota tlaku klesne na $1,33 \cdot 10^{-7}$ Pa, hodnota střední volné dráhy vzroste až na $5,1 \cdot 10^6$ cm [46]. Pokud by tedy v systému nebylo zajištěno vakuum, plynné částice by do sebe narážely, vyletovaly by z analyzátoru a výrazně by se snižovala intenzita signálu.

Hmotnostní spektrometry jsou vybaveny dvoustupňovým vakuovým systémem. Prvním stupněm jsou rotační olejové vývěvy s rotujícími lamelami, které zajišťují tlak 10^{-1} – 10^{-2} Pa. Druhým stupněm jsou u současných zařízení nejčastěji turbomolekulární vývěvy, které dokáží zajistit tlak až 10^{-8} Pa a jejich činnost je efektivnější než u starších difuzních vývěv.

2.10 Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Jelikož identifikace a charakterizace mikroorganismů pomocí klasických metod založených na sledování morfologických, fyziologických a biochemických vlastností jsou časově náročné, pracné a mohou mnohdy poskytovat ne zcela jednoznačné výsledky, probíhá neustálý vývoj a snaha o nalezení nových technik a metod, které by poskytovaly snadno opakovatelné a spolehlivé výsledky.

S rozvojem molekulárně biologických metod vzniklo mnoho technik založených na izolaci DNA. Pro identifikaci kvasinek je možné použít např. pulzní gelovou elektroforézu, která využívá periodicky se měnící směr napětí. Touto metodou lze rozdělit řetězce DNA až o velikosti v řádu Mbp. Další možnosti jsou pak různé varianty PCR (polymerázové řetězové reakce). Tyto metody jsou sice přesné, ale zároveň poměrně nákladné a vyžadují u pracovníka určitý stupeň znalosti metody a jejich použití v průmyslu je tedy velmi omezené [47].

Pro identifikaci kvasinek byly úspěšně použity i spektroskopické techniky. Např. Timmins et al. úspěšně identifikovali a rozlišili pivovarské kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* pro spodní a svrchní kvašení [48]. Využili k tomu pyrolytickou hmotnostní spektrometrii (PyMS) a infračervenou spektrometrii s Fourierovou transformací (FT-IR) použité na celé intaktní buňky po kultivaci. Obě metody jsou velmi rychlé. Autoři uvádí dobu měření 2 minut pro PyMS a 10 s pro FT-IR, nicméně použití těchto technik v průmyslu je opět omezeno složitou interpretací získaných hmotnostních či IR spekter a jejich použití v průmyslové praxi je nevhodné.

V poslední době zaznamenala v tomto ohledu velký rozvoj hmotnostní spektrometrie. Biotypizace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS je založená na extrakci proteinů z intaktních buněk, jejich následné ionizaci pomocí matrice a analýze pomocí hmotnostní spektrometrie. Konečným výstupem je charakteristické hmotnostní spektrum daného mikrobiálního druhu případně i variety (tzv. fingerprint), jehož porovnáním s knihovnou či známým referenčním vzorkem lze velmi jednoduše identifikovat analyzovaný mikroorganismus. Jak příprava vzorku, tak i identifikace jsou jednoduché, časově nenáročné a nevyžadují zkušenosti s interpretací spekter jako například dříve zmíněné FT-IR či PyMS analýzy. V současnosti se tato metoda běžně využívá pro spolehlivou identifikaci bakterií (např. identifikace patogenních kmenů v klinických laboratořích), ale lze ji využít i pro identifikaci virů [49], hub [50], hmyzích druhů [51] nebo hlístic [52].

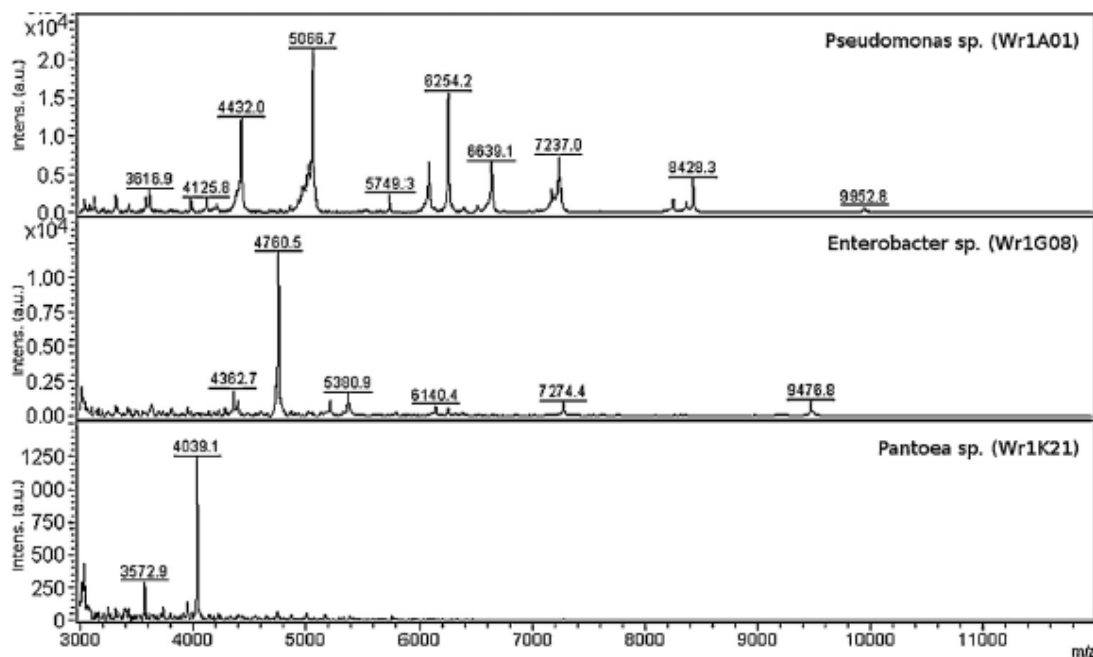
U kvasinek je získání charakteristického fingerprintu obtížnější než u bakterií kvůli struktuře buněčné stěny, ale pomocí optimalizovaných postupů lze kvasinky spolehlivě identifikovat na úrovni rodu i druhu. Moothoo-Padayachie et al. úspěšně identifikovali i jednotlivé kmeny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Odebrali celkem 44 kmenů používaných v různých odvětvích kvasného průmyslu v Jihoafrické republice (pivovarnictví, lihovarnictví, vinařství) a pomocí slepých zkoušek úspěšně identifikovali a zařadili jednotlivé vzorky do daných kmenů (pivovarské, vinařské, lihovarnické kvasinky) [47]. Probíhá i vývoj a optimalizace metod pro identifikaci mikroskopických vláknitých hub.

Příprava vzorků pro analýzu se skládá z několika základních kroků. Prvním krokem je odběr mikrobiálních buněk pro analýzu. Kolonie intaktních buněk po kultivaci se resuspenduje ve vodě a promývá ethanolem nebo methanolem. Promývání alkoholickými roztoky značně zvyšuje výtěžnost proteinů vyšších molekulových hmotností (nad 15 kDa) a zlepšuje stabilitu vzorku [53]. Po odstředění a odstranění supernatantu se rozruší buněčná stěna přidáním silné organické kyseliny. Nejčastěji se využívá kyselina mravenčí, trifluoroctová nebo octová a z buněk se extrahují ribozomální proteiny přidáním acetonitrilu. Extrakce proteinů jako biomarkerů je z hlediska jejich zastoupení v buňkách velmi výhodná, protože tvoří téměř 50 % hmotnosti sušiny mikrobiální biomasy [54]. Po dalším odstředění se získaný roztok proteinů (supernatant) nanese na MALDI desku a po vysušení se překryje roztokem vhodné matrice. Při analýze proteinů se nejčastěji využívají kyselina α -kyano-4-hydroxybenzoičová (CHCA), sinapová (SA) a ferulová (FA). Nicméně výběr matrice je silně závislý na povaze vzorku. U patogenních bakterií se jeví jako nejvhodnější volba CHCA, protože je citlivější než SA. Na druhou stranu ale poskytuje nižší stupeň ionizace u molekul s vyšším m/z . Pro vyšší poměry m/z (nad 15 kDa) se u gram-pozitivních a gram-negativních bakterií jeví jako nejvhodnější FA [53]. Ve výsledku je tedy nejvhodnější použít směs matic v určitém ideálním poměru, aby došlo k rovnoměrné

ionizaci izolovaných proteinů v celém rozsahu m/z . Další možnou variantou přípravy vzorku je nanesení intaktních buněk přímo na MALDI desku a smíchání s roztokem matrice přímo na desce. Tento postup je ale aplikovatelný pouze na bakterie.

Co se týče postupu přípravy kvasničných buněk pro MALDI-TOF identifikaci, velká část studií aplikuje postup doporučený firmou Bruker Daltonics pro biotypizaci obtížných případů na jejich přístrojích. Buňky se resuspendují v 300 μ l redestilované vody a přidá se 700 μ l ethanolu, případně se buňky resuspendují přímo v 1 ml ethanolu. Po důkladném promytí, odstředění a odstranění supernatantu se buňky lyzují 70% kyselinou mravenčí a proteiny se extrahují acetonitrilem. Jako matrice je pak nejčastěji uváděna CHCA. Tuto metodu s menšími variacemi úspěšně použili např. Jamal et al. při analýze kvasinek rodu *Candida* [55], Pavlovic et al. při analýze kvasinek z potravin [56] nebo Panda et al. při analýze rozličných plísní a kvasinek z klinických zdrojů [57].

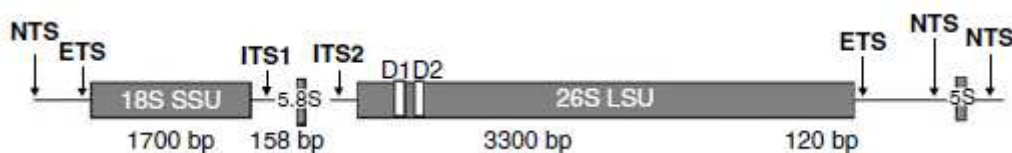
Konečným výstupem MALDI-TOF biotypizace je proteinový otisk prstu. Několik takových otisků prstů uvádí obrázek 9. V jednotlivých spektrech je jasně patrné, že každý rod má jiný profil a jednotlivé píky se mezi rody výrazně liší ve svém poměru m/z a intenzitě. Na základě poloh a intenzit píků ve spektru lze pak porovnáním s knihovnou nebo známým referenčním vzorkem určit druh, případně i kmen mikroorganismu. Porovnávání spekter se provádí pomocí specializovaných komerčních softwareů (např. Bruker Daltonics Biotyper), které na základě podobnosti vypočítají skóre shody. Pokud je skóre shody dostatečně vysoké, lze považovat identifikaci mikroorganismu za spolehlivou.



Obrázek 9 MALDI-TOF MS spektra proteinů bakterií izolovaných s kořenových systémů pšenice, rody byly určeny pomocí sekvenace 16S rRNA genu [58]

2.11 Identifikace kvasinek srovnáním sekvencí jaderné ribozomální DNA

Jaderná ribozomální DNA (rDNA) je velmi důležitým prvkem spojujícím transkripci a translaci v buňkách. Jejím přepisem vzniká rRNA, která je hlavní strukturální a katalytickou součástí translačního aparátu ribozomů. Ribozomální geny jsou seskupeny do tandemových transkripčních jednotek, které se v genomu sto až dvě stěkrát opakují. Každá jednotka rDNA obsahuje gen pro 28S velkou ribozomální podjednotku (LSU), gen pro 18S malou podjednotku (SSU), 5.8 gen, dva ITS segmenty (internal transcribed spacer) ITS1 a ITS2 a mezigenový NTS segment (nontranscribed spacer). Dále může být součástí této jednotky ještě 5S rRNA gen, což je typické pro většinu kvasinek, nebo může být tento gen lokalizován jinde na genomu, což je běžné pro většinu ostatních eukaryotických organismů [59]. Strukturu jaderné rDNA uvádí obrázek 10. Ribozomální geny jsou obecně velmi dobře zachované ve smyslu jejich neměnnosti. Ve skutečnosti jsou ale tvořeny jakousi směsí zachovalých neměnných a odlišných oblastí. Tyto odlišné oblasti se nazývají divergentní oblasti či domény (anglicky divergence regions) a označují se písmenem D a číslem 1 až 12. Jejich číselné označení je ve směru od 5' ke 3' konci příslušné rRNA [60]. Pro identifikaci kvasinek se nejčastěji využívá právě sekvenace D1/D2 domén, které jsou lokalizovány na 5' konci 26S LSU genu [61]. Velikost D1/D2 nukleotidu je u kvasinek běžně okolo 600 bp. Dalšími často využívanými úseky pro sekvenaci jsou 18S gen [62] a ITS oblasti. Sekvence D1/D2 domén jsou ve velkém množství dostupné v databázích a jsou velmi užitečným nástrojem pro identifikaci neznámých druhů kvasinek.



Obrázek 10 Struktura jaderné ribozomální DNA [59]

Provedení takové identifikace je díky rozvoji PCR a technologiím automatického sekvenování relativně rychlé a nenáročné. Z buněk se izoluje DNA a pomocí specifických primerů se amplifikuje požadovaný úsek. PCR produkt se purifikuje pomocí komerčního kitu, aby se odstranil přebytek primerů a přebytek volných deoxyribonukleotidů, které způsobují interference při sekvenční reakci. V automatických systémech pro sekvenaci se využívá čtyř rozdílných fluorescenčních barviv pro každou z bází (A, G, C, T). Barviva se pomocí PCR reakce se stejnými primery zabudují do řetězců nukleotidů a takto označené fragmenty se separují v tenkých kapilárách podle velikosti. Při průchodu jsou jednotlivé fragmenty excitovány laserem, čímž dochází k emisi odlišné vlnové délky pro každou bázi. Naměřené signály se v počítači převedou na barevné píky, kde každá barva odpovídá jednomu typu dusíkaté báze. Automatizované systémy umožňují nasekvenování nukleotidu o délce 600 bp během dvou až tří hodin [59]. Získané sekvence se pak porovnávají pomocí specializovaného programu (např. WU-BLAST2 nebo ClustalW2) a určí se procentuální shoda obou sekvencí.

3 CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce měla několik hlavních cílů. Prvním cílem bylo posoudit, zda výběr kultivačního média ovlivňuje i vhodnost metody pro přípravu vzorků. Zejména bylo posuzováno, zda má vliv způsob promývání buněk a výběr matrice.

Druhým cílem bylo otestovat rozsah vlivu složení různých kultivačních médií na vzhled hmotnostních spekter jednotlivých kmenů a posoudit, zda má na vzhled spektra vliv i původní kultivační médium, ze kterého byl mikroorganismus přeočkován.

Třetím cílem bylo stanovit reprodukovatelnost spekter kmenů *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* ze Zbierky kultur kvasiniek (CCY) a přispět novými referenčními spektry kvasinek do vytvářející se databáze.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité kmeny kvasinek

Pro biotypizaci bylo použito celkem 28 kmenů kvasinek druhů *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens* a *Cr. victoriae* ze Zbierky kultur kvasiniek CHÚ SAV (CCY). Dva kmeny *Cr. victoriae* byly použity jako kontrola, protože náležejí do fylogenetické skupiny II a měly by poskytovat odlišná spektra než kmeny z fylogenetické skupiny I. Všechny kmeny použité v experimentální části uvádí tabulka 1.

Tabulka 1 Seznam kmenů použitých pro experimentální část a zdroj, ze kterého byly izolovány

CCY	Sbírkový název	Zdroj
17-3-2	<i>Cryptococcus laurentii</i>	CBS 139; typový kmen, palmové víno Kongo
17-3-6	<i>Cryptococcus flavescens</i>	akapsulární kmen, Puščino (Golubjev)
17-3-7	<i>Cryptococcus laurentii</i>	jezero Plavecký Štvrtok, 1987
17-3-8	<i>Cryptococcus laurentii</i>	rybník Jakubov
17-3-9	<i>Cryptococcus laurentii</i>	rybník Jakubov
17-3-10	<i>Cryptococcus laurentii</i>	rybník Jakubov sedimenty
17-3-11	<i>Cryptococcus laurentii</i>	rybník Jakubov sedimenty
17-3-14	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Dunaj, květen 1993
17-3-15	<i>Cryptococcus flavescens</i>	voda Malý Dunaj, květen 1993
17-3-16	<i>Cryptococcus flavescens</i>	voda Malý Dunaj, listopad 1993
17-3-17	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Dunaj, březen 1994
17-3-19	<i>Cryptococcus flavescens</i>	voda Morava, prosinec 1994
17-3-20	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Morava, prosinec 1994
17-3-21	<i>Cryptococcus laurentii</i>	voda Morava, duben 1995
17-3-22	<i>Cryptococcus laurentii</i>	půda les
17-3-23	<i>Cryptococcus laurentii</i>	země les, 1999
17-3-24	<i>Cryptococcus laurentii</i>	země les, 1999
17-3-25	<i>Cryptococcus laurentii</i>	země tráva, 2000
17-3-26	<i>Cryptococcus victoriae</i>	zatravněná půda na cestě, Dúbravka
17-3-27	<i>Cryptococcus victoriae</i>	země tráva, 2000
17-3-29	<i>Cryptococcus flavescens</i>	zemědělská půda, 2002
17-3-31	<i>Cryptococcus flavescens</i>	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-32	<i>Cryptococcus flavescens</i>	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-33	<i>Cryptococcus flavescens</i>	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-34	<i>Cryptococcus flavescens</i>	listy z ovocného stromu, 2004
17-3-38	<i>Cryptococcus flavescens</i>	květy z ovocného stromu, 2013
17-3-39	<i>Cryptococcus flavescens</i>	ovoce, 2013
17-3-43 = 17-27-4	<i>Cryptococcus flavescens</i> <i>laurentii</i>	list rostliny <i>Phragmites australis</i> (rákos obecný), Pernek

4.2 Kultivační média

Kvasinky byly kultivovány celkem na 3 pevných médiích – na Sabouraudově agaru, YPD agaru a bramborovém agaru. Připravená média byla vždy vysterilizována, rozlita do

zkumavek po cca 4 ml a agary byly našikmeny a ponechány v klidu až do ztuhnutí. Nenaočkovaná média byla uchovávána v chladu. Složení jednotlivých médií uvádí tabulka 2.

*Tabulka 2 Složení použitých kultivačních médií; * odpovídá výtazku z 200 g brambor*

	Sabouraudův agar	YPD agar	Bramborový agar
Glukóza [g/l]	40	20	20
Pepton [g/l]	10	20	-
Agar [g/l]	15	20	15
Bramborový extrakt [g/l]	-	-	4*
Kvasničný extrakt [g/l]	-	10	-
pH		5,6	

4.2.1 Příprava Sabouraudova agaru

Sabouraudův agar byl připraven rozpuštěním 2,5 g peptonu, 10 g glukózy a 5 g agaru v 250 ml destilované vody. Hodnota pH byla upravena kyselinou chlorovodíkovou na 5,6. Médium bylo vysterilizováno, rozlito do zkumavek a našikmeno.

4.2.2 Příprava YPD agaru

YPD agar byl připraven rozpuštěním 16,25 g agaru s kvasničným extraktem (Sigma-Aldrich YPD Agar) v 250 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno, rozlito do zkumavek a našikmeno.

4.2.3 Příprava bramborového agaru

Bramborový agar byl připraven rozpuštěním 9,75 g agaru s bramborovým extraktem (Merck Potato dextrose agar) v 250 ml destilované vody. Médium bylo vysterilizováno, rozlito do zkumavek a našikmeno.

4.3 Podmínky kultivace

Všechny kmeny byly kultivovány stacionárně na šikmých agarech po dobu 4 dní při teplotě 20 °C. Jelikož byl mimo jiné zkoumán i vliv původního média, na kterém byly jednotlivé kmeny kultivovány, byly všechny kmeny nejprve přeočkovány ze sladidového agaru, na kterém uchovává sbírka CCY jednotlivé kmeny, na příslušné médium (Sabouraudův, YPD a bramborový agar). V druhém kole pak byly jednotlivé kmeny přeočkovány ze stejného média opět na stejné médium. Přeočkovávání stejně jako pozdější odběr vzorků bylo prováděno ve sterilním očkovacím boxu pomocí kličky, která byla před každým odběrem důkladně vysterilizována v plamenu kahanu.

4.4 Příprava roztoků

4.4.1 10% kyselina trifluoroctová

Roztok kyseliny mravenčí byl připraven smícháním 4,5 ml destilované vody a 0,5 ml 100% kyseliny trifluoroctové. Roztok byl řádně promíchán a poté uchováván v chladu

4.4.2 70% kyselina mravenčí

Roztok kyseliny mravenčí byl připraven smícháním 35 ml 100% kyseliny mravenčí a 15 ml destilované vody. Roztok byl řádně promíchán.

4.4.3 Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA) – matrice 1

Na analytických vahách bylo naváženo 10 mg CHCA (Sigma-Aldrich), která byla následně rozpuštěna ve směsi 500 μ l acetonitrilu, 250 μ l 10% kyseliny trifluoroctové a 250 μ l destilované vody. Směs byla důkladně promíchána a skladována v chladničce při 4 °C.

4.4.4 Směsná matrice kyseliny sinapové a ferulové (SA:FA) – matrice 2

Do jedné zkumavky bylo naváženo 10 mg kyseliny ferulové (Sigma-Aldrich) a do druhé 30 mg kyseliny sinapové (Sigma-Aldrich). Obě kyseliny byly rozpuštěny ve směsi 500 μ l acetonitrilu, 250 μ l 10% kyseliny trifluoroctové a 250 μ l destilované vody. Oba roztoky byly řádně promíchány a poté smíseny v poměru 1:1.

4.5 Příprava vzorků pro biotypizaci

Celkem byly testovány tři metody přípravy vzorků pro biotypizaci, přičemž postup přípravy první a druhou metodou je shodný a pracovalo se vždy se stejným vzorkem, pouze se na závěr na MALDI desce překryl vzorek odlišným roztokem matrice. Postup třetí metody je pak odlišný.

4.5.1 Odběr vzorků

Kvasinky byly kultivovány na pevném médiu a odběr byl prováděn očkovací kličkou. V očkovacím boxu bylo očkem odebráno co největší množství buněk, které byly následně resuspendovány v 300 μ l (první a druhá metoda) nebo 1000 μ l (třetí metoda) destilované vody v 1,5ml mikrozkuhavce Eppendorf.

4.5.2 Promývání buněk a extrakce proteinů

V případě první a druhé metody byly suspenze buněk v 300 μ l destilované vody důkladně promíchány na vortexu a poté bylo přidáno 900 μ l ethanolu. Po opětovném promíchání na vortexu byly vzorky 2 minuty centrifugovány při 14 000 ot./min. Supernatant byl odpipetován a vzorky byly znovu odstředěny. Po dalším odstředění byl odpipetován zbytek supernatantu a ke vzorkům bylo přidáno 100 μ l 70% kyseliny mravenčí a 100 μ l 100% acetonitrilu. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 30 minut a poté opět odstředěny. Z takto získaného roztoku proteinů v supernatantu byl nanesen 1 μ l na MALDI desku. V případě první metody se po zaschnutí vzorku překryl spot na desce 1 μ l matrice 1 (CHCA). V případě druhé metody byl vzorek na desce překryt 1 μ l matrice 2 (SA:FA).

Postup třetí metody byl odlišný. Buňky resuspendované v 1 ml destilované vody byly zvortexovány a vzorky byly centrifugovány při 14 000 ot./min po dobu 2 minut. Po odstředění byl supernatant odpipetován, opět se přidal 1 ml destilované vody a vzorky byly promíchány na vortexu a centrifugovány. Takto byly vzorky promyty celkem sedmkrát. Po sedmém promytí, odstředění a odpipetování supernatantu bylo ke vzorkům přidáno 50 μ l roztoku matrice 2 (SA:FA) a proteiny byly extrahovány přímo roztokem matrice. Po 30 minutách inkubace při laboratorní teplotě byly vzorky znovu odstředěny 2 minuty při 14 000 ot./min a 1 μ l supernatantu byl nanesen na MALDI desku.

4.6 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Měření všech vzorků bylo prováděno na přístroj Bruker ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (obrázek 11) v pozitivním lineárním módu. K ionizaci využívá přístroj laser typu smartbeam-IITM, který emituje záření o vlnové délce 355 nm. Použitá frekvence laseru byla 1000 Hz, napětí urychlovače 25 kV a počet výstřelů laseru byl 1000 na vzorek. Měření bylo

prováděno v rozsahu 2 000–22 000 Da a přístroj byl kalibrován na cytochrom c. Měření bylo řízeno programem flexControl verze 3.4 firmy Bruker Daltonics GmbH.



Obrázek 11 Bruker ultrafleXtreme Maldi-TOF/TOF MS [45]

4.7 Zpracování a vyhodnocení dat

Získaná spektra byla normalizována a porovnána v programu MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH). Vždy byla porovnáována vzájemně dvě spektra a pro každou dvojici byla vypočtena hodnota skóre shody. Tato hodnota nabývá hodnot od 0 do 3, přičemž výrobce deklaruje, že spektra se považují za prokazatelně shodná, pokud je hodnota skóre 2 a vyšší. V experimentální části se pracovalo s navrhnutou hraniční hodnotou pro rod *Cryptococcus*, tj. 1,7 [63].

Hodnota skóre se vypočítává podle porovnávacího algoritmu, který určí tři hodnoty pro tři základní charakteristiky obou srovnávaných spekter. Tyto tři hodnoty se vzájemně vynásobí a výsledek je normalizován na 1000. Hodnota skóre je dekadickým logaritmem tohoto výsledku. Maximální hodnota je 3 ($\log_{10}1000$).

1. Nejprve se určí počet signálů v referenčním spektru, které mají odpovídajícího partnera v neznámém spektru. Žádná shoda je rovna 0, úplná shoda je rovna 1.
2. Poté se určí počet signálů v neznámém spektru, které mají odpovídajícího partnera v referenčním spektru. Žádná shoda odpovídá hodnotě 0, úplná shoda hodnotě 1.
3. Nakonec se vypočte symetrie odpovídajících signálů. Pokud signál o vysoké intenzitě v jednom spektru odpovídá signálu o vysoké intenzitě v druhém spektru a signály s nízkou intenzitou si také odpovídají, míra symetrie je velmi vysoká a tomuto stavu odpovídá hodnota blízka 1. V opačném případě, pokud si signály intenzitou neodpovídají, dostaneme hodnotu blízka 0.

4.8 Sekvence D1/D2 domén LSU rRNA genu

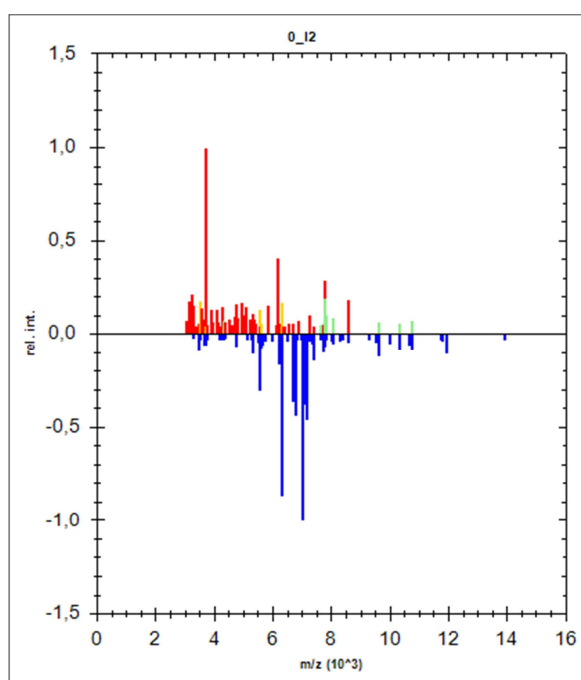
Sekvence D1/D2 domén LSU rRNA genu byla provedena pracovníky Zbierky kultúr kvasiniek CHÚ SAV podle příslušného manuálu. Poskytnuté sekvence byly poté porovnány pomocí programu ClustalW2.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Vztah mezi složením kultivačního média a metodou přípravy vzorku

Prvním zkoumaným parametrem bylo, zda složení kultivačního média ovlivňuje výběr metody pro přípravu vzorku. U každého kmene byla vzájemně srovnána spektra získaná na stejném médiu různou metodou a vypočtena hodnota skóre shody.

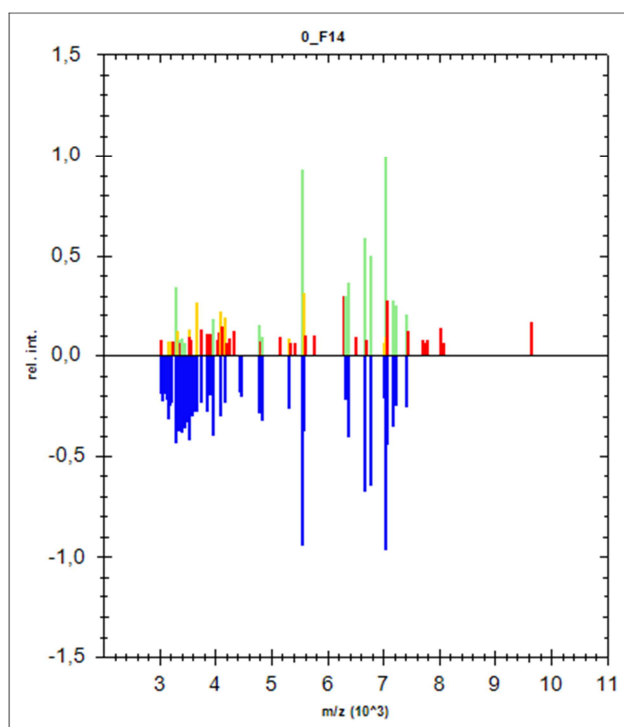
Hned na úvod je nutné uvést, že první a druhá metoda (promytí ethanolem) poskytovaly odlišná spektra než metoda třetí (promytí vodou). Při pohledu na spektra je zjevné, že při promytí ethanolem docházelo k extrakci a následné ionizaci proteinů spíše o vyšším poměru m/z a nejintenzivnější píky ležely v rozsahu hodnot m/z od 6 000 do 8 000, zatímco při promývání vodou byly hlavní píky v rozsahu m/z od 2 000 do 4 000 (obrázek 12). Rozdílnou extrakci vysokomolekulárních látek u jednotlivých metod lze přičíst odlišnému způsobu lyze buněk, protože v prvním a druhém případě byly buňky lyzovány 70% kyselinou mravenčí a ve třetím případě směsí kyseliny trifluoroctové (2,5% v/v), sinapové (1,5% w/v) a ferulové (0,5 % w/v). Úlohu určitě sehrála i schopnost metody promývání odstranit extracelulární polysacharidy a uvolněné fragmenty kapsul ovlivňující kvalitu spekter.



Obrázek 12 Spektra CCY 17-3-11 na YPD médiu po promytí vodou a použití směsné matrice SA:FA (nahore) a po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA (dole)

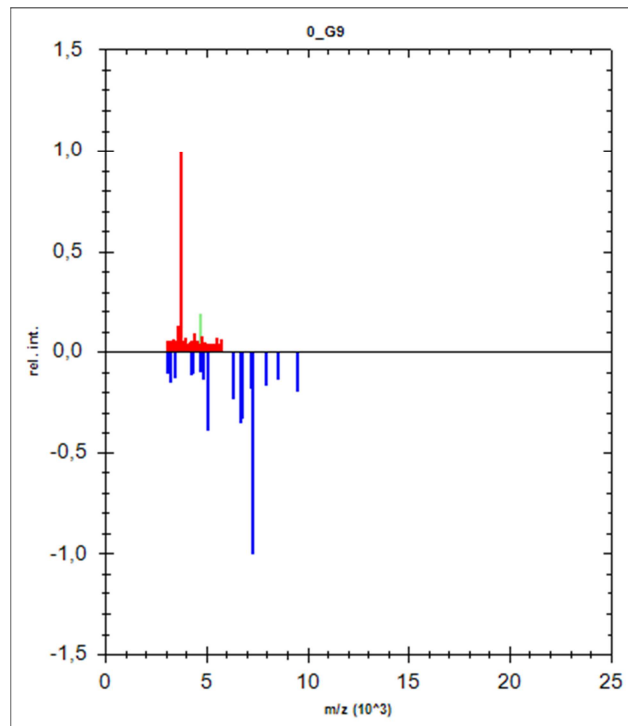
Co se týče vztahu vhodnosti metody a složení média, jako nejvhodnější se pro tři testovaná média jevila metoda číslo dvě, kdy byly buňky promývány ethanolem, lyzovány 70% kyselinou mravenčí, extrahovány 100% acetonitrilem a jako matrice byla použita směs matric SA:FA. Tato metoda poskytovala po kultivaci na všech třech médiích nejlepší spektra s minimem šumu a kvalitní spektrum bylo zaznamenáno ve všech případech. Při použití CHCA jako matrice bylo ve spektrech často přítomno velké množství píků o m/z do cca 4 500, které pravděpodobně odpovídají neúplně odstraněným ionizovaným extracelulárním polysacharidům. Tyto píky tvořily jakýsi šum, který značně snižoval skóre shody, přestože

poloha a intenzita nejintenzivnějších píků v obou spektrech si odpovídala (obrázek 13). Nejvýrazněji se tento fakt projevil při biotypizaci buněk kultivovaných na bramborovém agaru. Při kultivaci jednotlivých kmenů na Sabouraudově a YPD agaru jakožto bohatších médiích se tvořily jasně ohraničené krémově až růžově zbarvené kolonie a produkce extracelulárních polysacharidů byla až na jedinou výjimku (CCY 17-3-15) minimální. Oproti tomu na bramborovém agaru, který byl ze tří testovaných médií nejchudší na obsah dusíku, produkovaly téměř všechny kmeny veliké množství extracelulárních polysacharidů. Tvořili se hlenovité, jasně neohraničené kolonie, které stékaly na dna zkumavek, čímž se ztlačil odběr buněk a samotné promývání, protože buňky při centrifugaci hůře sedimentovaly a obtížněji se odebíral supernatant z mikrozkušavek.



Obrázek 13 Spektra CCY 17-3-8 na bramborovém agaru po promytí buněk ethanolem a použití směsné matrice SA:FA (nahore) a CHCA (dole), skóre shody 2,082

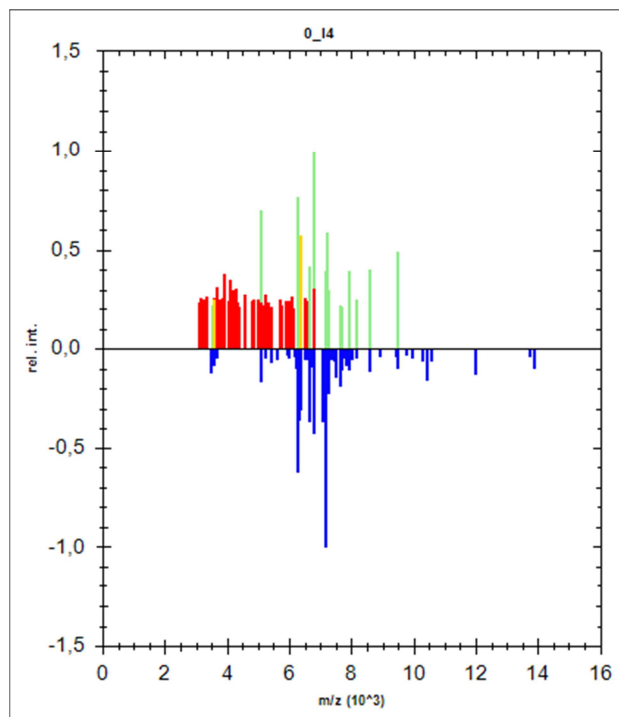
Metoda promývání vodou poskytovala v mnoha případech také velmi dobrá spektra (obrázek 14), nicméně intenzita získaných píků byla nižší a v mnoha případech byla koncentrace proteinů v extraktu nanášeném na MALDI desku natolik nízká, že na spotu bylo nutné zdlouhavě ručně vyhledávat místo s deponovanými proteiny nebo nebyly detekovány vůbec žádné proteiny. Z těchto důvodů byla metoda číslo 3 označena pro Sabouraudův, YPD a bramborový agar za nevhodnou. Tento poznatek je ale v rozporu s předchozí diplomovou prací Jakuba Jägera [64], který prováděl biotypizaci kvasinek rodu *Cryptococcus* kultivovaných na sladinném agaru a jako nejvhodnější metodu označil právě promývání vodou a následnou extrakci proteinů. Při budoucí tvorbě knihoven spekter pro jednotlivé druhy kvasinek je tedy žádoucí, aby pro každé evidované spektrum bylo stanoveno kultivační médium, na kterém byly buňky kultivovány a metoda, jakou byly lyzovány buňky a extrahovány proteiny. Jinak může docházet k zisku odlišných spekter, výraznému zkreslení výsledku, případně k nesprávné identifikaci testovaných mikroorganismů.



Obrázek 14 Spektra CCY 17-3-33 na Sabouraudově agaru po promytí vodou a extrakci roztokem matrice SA:FA (nahore) a po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA

5.2 Rozsah vlivu složení kultivačního média na kvalitu hmotnostních spekter

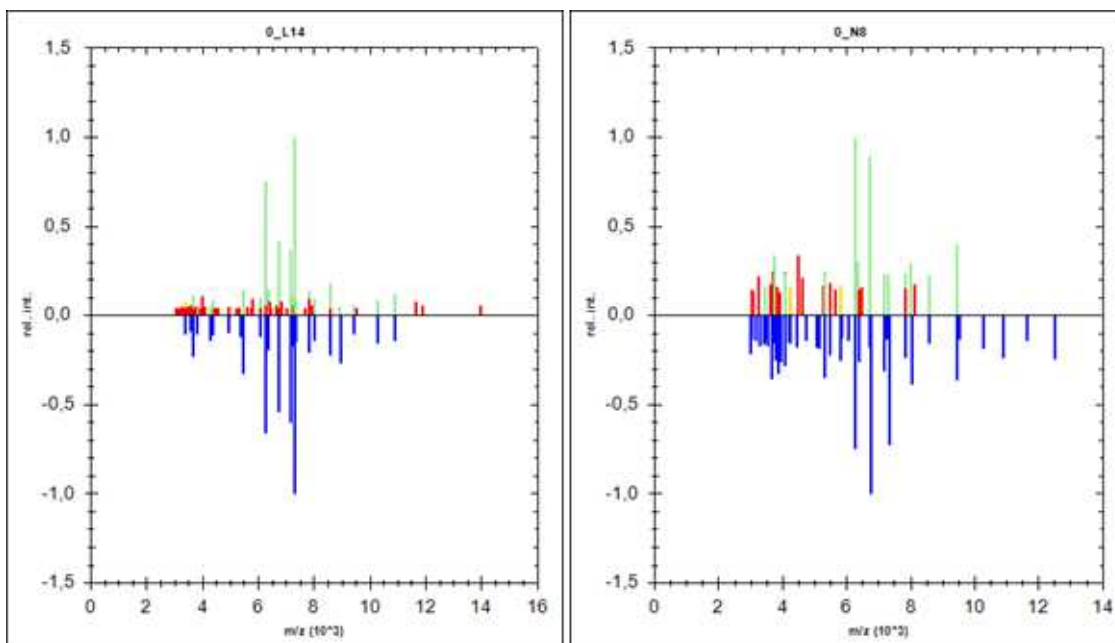
Druhým posuzovaným parametrem bylo určení rozsahu vlivu složení kultivačního média na kvalitu hmotnostních spekter. V případě třech pevných médií, která byla použita v experimentální části, lze říci, že složení média jako takové nemělo na kvalitu spekter druhů *Cr. laurentii*, *Cr. flavescens* a *Cr. victoriae* zásadní vliv a jejich vzhled ovlivňuje především metoda přípravy vzorků. Při použití stejné metody byla spektra pro jednotlivé kmeny na různých médiích velmi podobná. Při srovnání spekter získaných po promývání ethanolem a použití směsné matrice SA:FA na Sabouraudově agaru a YPD agaru bylo skóre shody u 26 kmenů z celkových 28 vyšší než 1,7 a pouze ve dvou případech u kmenů CCY 17-3-15 a CCY 17-3-38 bylo skóre 1,527, respektive 1,673. Nicméně i u těchto dvou případů byla poloha a intenzita nejintenzivnějších píků stejná a spektra lze považovat za shodná (obrázek 15). Právě takové výsledky pravděpodobně vedli McTaggart et al. [63] k návrhu, aby hodnota prokazatelné identifikace daná programem Biotyper (vyšší než 2), byla pro rod *Cryptococcus* snížena na hodnotu 1,7 a pravděpodobná identifikace na 1,5. Při srovnání spekter ze Sabouraudova a YPD média se spektry získanými z buněk kultivovaných na bramborovém agaru byla situace výrazně horší, protože v mnoha případech byl díky přítomnosti výrazného množství nevymytých polysacharidů ve spektrech detekován značný počet píků nižších poměrů m/z . Pokud ale bylo získáno kvalitní spektrum, shoda se spektry z ostatních médií byla za použití stejné metody vyšší než 1,7.



Obrázek 15 Spektra CCY 17-3-15 po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA na Sabouraudově agaru (nahore) a YPD agaru (dole), skóre shody 1,527

K závěru, že složení média zásadně neovlivňuje identifikaci a ve spektrech je i po kultivaci na různých médiích stále dostatečné množství specifických diagnostických iontů, došly i další studie týkající se biotypizace jiných druhů kvasinek, viz např. Moothoo-Padayachie et al., kteří testovali různé kmeny *S. cerevisiae* [47], van Veen et al. [65], kteří testovali kvasinky rodu *Candida* a Marklein et al. [66], kteří prováděli experimenty s rody *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Pichia* a *Blastoschizomyces*. Složení média nicméně výrazně ovlivňuje růst buněk a tím i následnou extrakci proteinů. Při budoucích biotypizacích kvasinek rodu *Cryptococcus* je tedy vhodné použít pro kultivaci buněk médium bohatší na živiny a tím předejít zisku nekvalitních a hůře hodnotitelných spekter z chudších médií, na kterých dochází k vysoké produkci extracelulárních polysacharidů. V našem případě byl takovým médiem právě bramborový agar.

Co se týče vlivu původního média, ze kterého byly kvasinky na kultivační médium přeočkovány, jisté rozdíly ve spektrech se u jednotlivých kmenů vyskytovaly. U většiny kmenů bylo ale dosaženo skóre shody vyšší než 2,0 (obrázek 16). U případů s nižším skóre poloha píků s nejvyšší intenzitou odpovídala a hlavní rozdíly byly pozorovány v poloze a intenzitě slabších signálů. Médium, ze kterého byl mikroorganismus přeočkován, tedy nemá výrazný vliv na kvalitu získaného spektra.



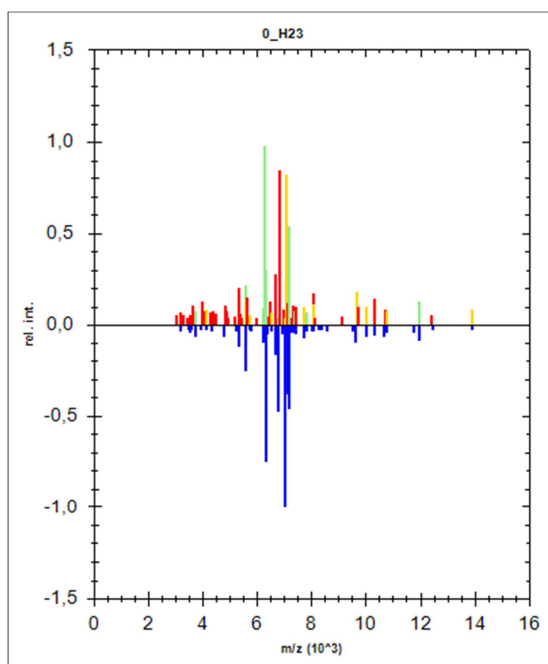
Obrázek 16 Spektra CCY 17-3-26 po promytí ethanolem a se směsnou matricí SA:FA; přeočkování ze sladiny na YPD a z YPD na YPD (vlevo nahoře, respektive dole), přeočkování ze sladiny na Sabouraudův agar a ze Sabouraudova na Sabouraudův agar (vpravo nahoře, respektive dole); skóre shody 2,312, respektive 2,103.

5.3 Identifikace jednotlivých kmenů

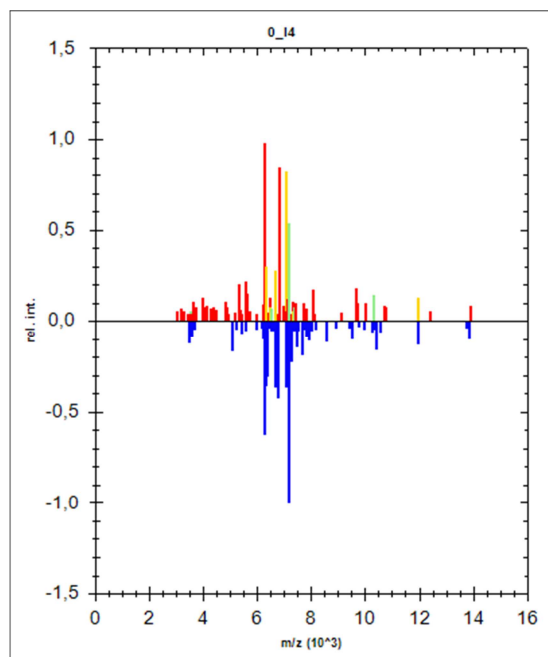
Všechny testované kmeny byly srovnány v rámci jednotlivých médií a metody 2 (promytí ethanolem, směsná matrice SA:FA), která se jevila jako nejspolehlivější, s typovým kmenem *Cr. laurentii* CCY 17-3-2. Dále byly všechny kmeny porovnány vzájemně a na základě podobnosti spekter byly vytvořeny MSP dendrogramy pro jednotlivá média a byla zhodnocena spolehlivost, s jakou lze jednotlivé kmeny rozlišit pomocí MALDI-TOF biotypizace do příslušných druhů. Vzhledem k velkému množství vyhodnocovaných spekter (celkem přes 650 spekter) jsou vybraná spektra uvedena v přílohách. Srovnání kmenů s CCY 17-3-2 je uvedeno pouze na YPD médiu, které se pro kultivaci jeví jako nejvhodnější (příloha 9.4). Dále jsou v přílohách uvedeny příklady spekter pro všechna předchozí srovnání pro jeden vybraný kmen z každého testovaného druhu. Jsou uvedena pouze spektra po přeočkování ze sladiny na dané testované médium, protože bylo zjištěno, že vliv složení původního média je zanedbatelný.

Při srovnání všech kmenů s CCY 17-3-2 bylo zjištěno, že i přesto, že se jedná o typový kmen pro druh *Cr. laurentii*, je poskytované spektrum odlišné od ostatních testovaných kmenů tohoto druhu (obrázek 17) a zcela odlišné od kmenů druhů *Cr. victoriae* a *Cr. flavescens* (obrázek 18). Ačkoliv byla shoda kmenů *Cr. laurentii* s CCY 17-3-2 nejvyšší, skóre shody se pohybovalo pouze v rozmezí 0,201–1,559 na Sabouraudově agaru, 1,330–1,766 na YPD agaru a 0,748–2,071 na bramborovém agaru, přičemž skóre vyššího než 1,7 bylo na jednotlivých médiích dosaženo pouze u 0 %, resp. 7,7 % a 23,1 % kmenů. Možným důvodem odlišnosti typového kmene od ostatní *Cr. laurentii* je jeho odlišný geografický původ. S výjimkou akapsulárního kmene *Cr. flavescens* CCY 17-3-6, který byl izolovaný v Rusku, byly totiž všechny ostatní kmeny použité v experimentální části izolovány

převážně v oblasti západního Slovenska, zatímco typový kmen CCY 17-3-2 byl izolován z palmového vína v Kongu.



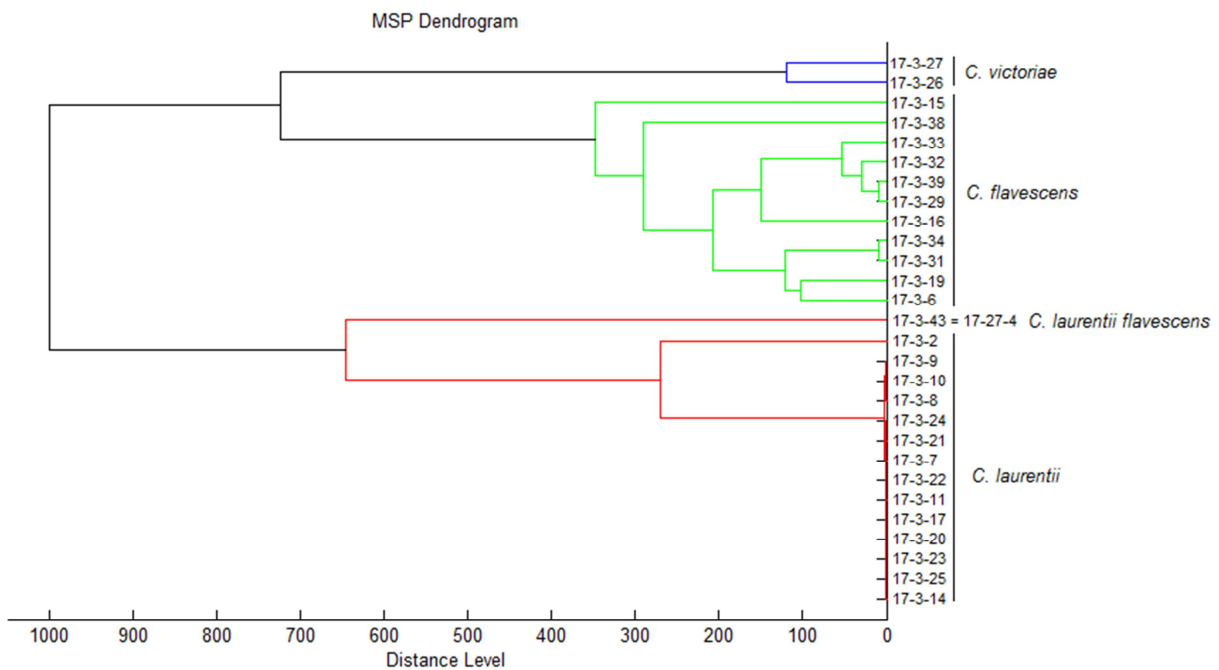
Obrázek 17 Srovnání spekter *Cr. laurentii* CCY 17-3-2 (nahore) a CCY 17-3-8 (dole) po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA na YPD agaru, skóre shody 1,587



Obrázek 18 Srovnání spekter *Cr. laurentii* CCY 17-3-2 (nahore) a *Cr. flavescens* CCY 17-3-15 (dole) po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA na YPD agaru, skóre shody 0,944.

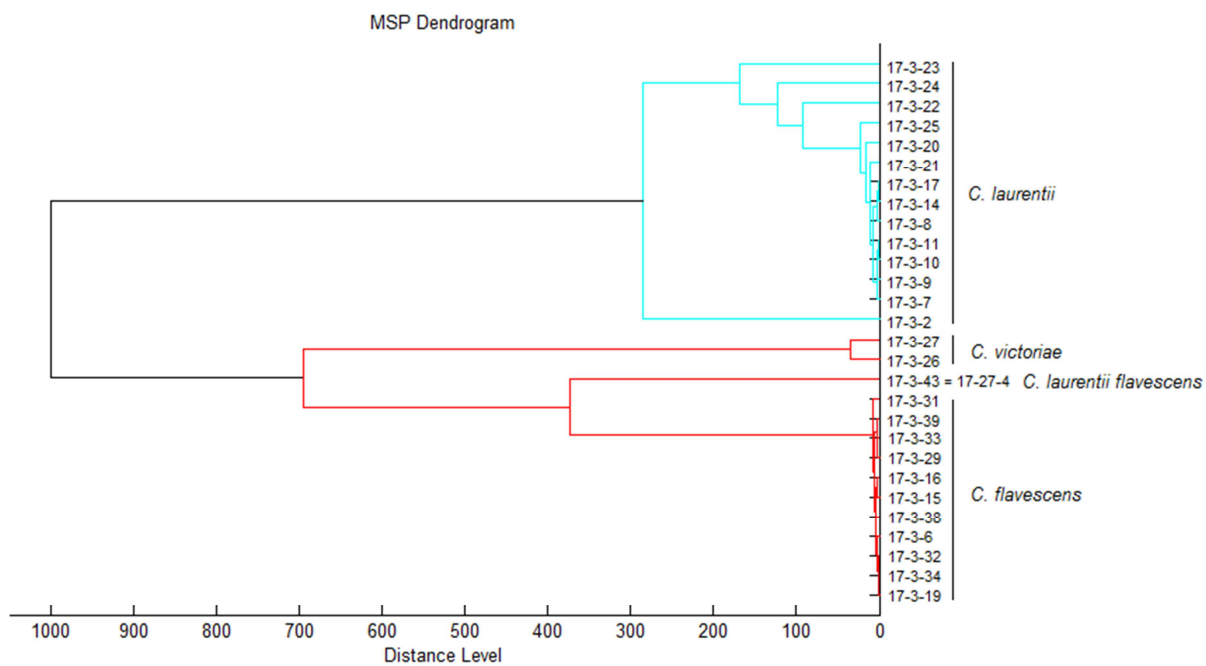
Vzájemné srovnání spekter všech kmenů na jednotlivých médiích uvádí obrázek 19, obrázek 20 a obrázek 21. Na všech třech médiích bylo detekováno vždy 5 typů spekter. První typ odpovídal výše komentovanému CCY 17-3-2. Druhý typ odpovídal zbývajícím 13

kmenům *Cr. laurentii*, třetí typ spektra poskytovalo 11 kmenů *Cr. flavescens*, čtvrtý typ spektra byl společný pro 2 kmeny *Cr. victoriae* a poslední typ odpovídal kmenu *Cr. laurentii flavescens* CCY 17-3-43 = 17-27-4. Na všech médiích byly na základě proteinového fingerprintu ve fylogenetických stromech kmeny správně rozděleny do příslušných druhů a spektra v rámci jednoho druhu si vždy odpovídala. Celkově bylo dosaženo nejlepšího rozdělení při kultivaci na YPD médiu a bramborovém agaru. Bramborový agar se ale nejeví jako vhodné médium pro biotypizaci, protože dochází k dříve zmíněné nadměrné produkci extracelulárních polysacharidů, a na Sabouraudově agaru byly detekovány určité odchylky u druhu *Cr. flavescens*. Jako nejvhodnější se tedy z testovaných postupů jeví kultivace buněk na YPD agaru po dobu 4 dní při teplotě 20 °C, promytí pomocí ethanolu a použití směsné matrice kyseliny sinapové a ferulové.

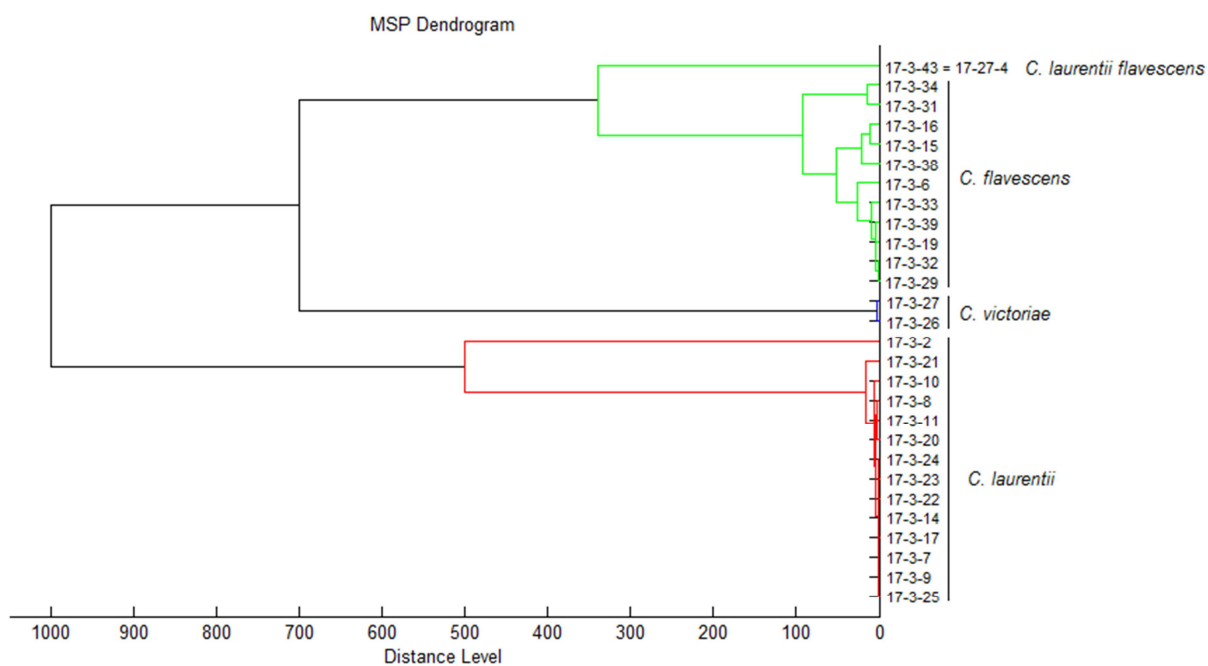


Obrázek 19 Srovnání spekter kmenů na Sabouraudově agaru po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA.

Sporným kmenem je kmen CCY 17-3-43 = 17-27-4. Tento kmen byl porovnáním sekvencí D1/D2 domén umístěn CCY na pomezí druhů *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens*. Jeho přesné zařazení není zcela jasné ani na základě biotypizace, protože na Sabouraudově médiu byl na základě proteinového otisku prstu přiřazen spíše k druhu *Cr. laurentii*, zatímco na zbylých dvou médiích k druhu *Cr. flavescens*. Vzhledem k těmto nejasnostem by bylo vhodné v budoucnu nasekvenovat a porovnat i ITS oblasti jednotlivých kmenů.



Obrázek 20 Srovnání spekter kmenů na YPD agaru po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA.



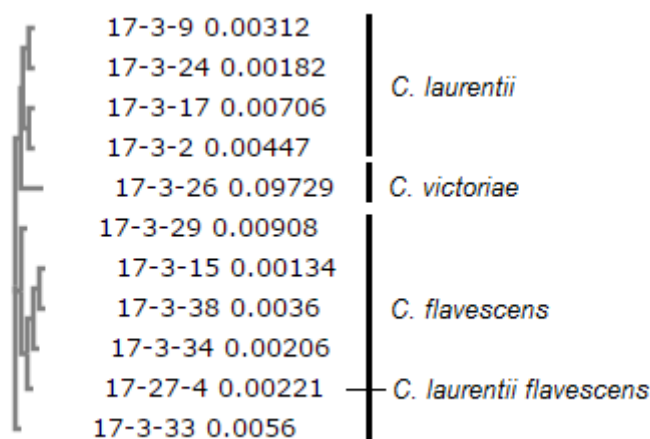
Obrázek 21 Srovnání spekter kmenů na bramborovém agaru po promytí ethanolem a použití směsné matrice SA:FA.

5.4 Srovnání sekvencí D1/D2 domén LSU

Na závěr byly sekvence D1/D2 domén velké ribozomální podjednotky vybraných kmenů, které byly poskytnuty Zbierkou kultur kvasiniek CHŮ SAV, vzájemně porovnány pomocí programu ClustalW2 [67] a byla vypočtena procentuální shoda pro každou dvojici hodnocených kmenů. Na základě sekvencí D1/D2 domén byl vytvořen fylogenetický strom, který byl porovnán s dendrogramy vytvořenými na základě proteinových otisků prstu. Srovnání jednotlivých dvojic kmenů spolu s procentuální shodou jejich sekvencí uvádí tabulka 3.

Tabulka 3 Vzájemné srovnání sekvencí D1/D2 domén LSU vybraných kmenů, skóre uvádí procento shody pořadí bází amplifikovaného fragmentu.

Kmen A	Délka	Kmen B	Délka	Skóre	Kmen A	Délka	Kmen B	Délka	Skóre
17-3-2	612	17-3-9	611	98,69	17-3-24	612	17-3-29	614	94,44
17-3-2	612	17-3-17	615	97,55	17-3-24	612	17-3-33	612	94,28
17-3-2	612	17-3-24	612	97,71	17-3-24	612	17-3-34	608	94,24
17-3-2	612	17-3-15	613	94,28	17-3-24	612	17-3-38	607	95,22
17-3-2	612	17-3-29	614	94,44	17-3-24	612	17-27-4	593	95,45
17-3-2	612	17-3-33	612	95,1	17-3-24	612	17-3-26	609	89,0
17-3-2	612	17-3-34	608	95,07	17-3-15	613	17-3-29	614	97,55
17-3-2	612	17-3-38	607	94,07	17-3-15	613	17-3-33	612	97,39
17-3-2	612	17-27-4	593	94,94	17-3-15	613	17-3-34	608	99,01
17-3-2	612	17-3-26	609	87,52	17-3-15	613	17-3-38	607	99,18
17-3-9	611	17-3-17	615	98,36	17-3-15	613	17-27-4	593	98,65
17-3-9	611	17-3-24	612	99,18	17-3-15	613	17-3-26	609	87,36
17-3-9	611	17-3-15	613	94,76	17-3-29	614	17-3-33	612	98,37
17-3-9	611	17-3-29	614	94,44	17-3-29	614	17-3-34	608	97,2
17-3-9	611	17-3-33	612	95,42	17-3-29	614	17-3-38	607	97,53
17-3-9	611	17-3-34	608	94,74	17-3-29	614	17-27-4	593	98,82
17-3-9	611	17-3-38	607	94,23	17-3-29	614	17-3-26	609	87,36
17-3-9	611	17-27-4	593	95,11	17-3-33	612	17-3-34	608	98,03
17-3-9	611	17-3-26	609	87,85	17-3-33	612	17-3-38	607	97,36
17-3-17	615	17-3-24	612	98,2	17-3-33	612	17-27-4	593	98,48
17-3-17	615	17-3-15	613	93,96	17-3-33	612	17-3-26	609	86,86
17-3-17	615	17-3-29	614	95,93	17-3-34	608	17-3-38	607	98,68
17-3-17	615	17-3-33	612	95,1	17-3-34	608	17-27-4	593	98,82
17-3-17	615	17-3-34	608	94,41	17-3-34	608	17-3-26	609	86,68
17-3-17	615	17-3-38	607	93,9	17-3-38	607	17-27-4	593	98,65
17-3-17	615	17-27-4	593	95,28	17-3-38	607	17-3-26	609	86,82
17-3-17	615	17-3-26	609	87,36	17-27-4	593	17-3-26	609	86,85
17-3-24	612	17-3-15	613	95,42					



Obrázek 22 *Fylogenetický strom vytvořený na základě porovnání sekvencí D1/D2 domén LSU*

Fylogenetický strom sestavený ze sekvencí D1/D2 domén uvádí obrázek 22. Tento zkrácený fylogenetický strom odpovídá strukturou stromům získaným na základě podobnosti hmotnostních spekter, ale najdou se zde určité rozdíly. Na základě porovnání sekvencí je patrné, že kmen CCY 17-3-2 je opravdu zástupcem druhu *Cr. laurentii*, ačkoliv poskytuje při biotypizaci odlišné spektrum než ostatní kmeny tohoto druhu. Jeho D1/D2 sekvence poskytuje shodu 97,55 % a více s ostatními uvedenými kmeny *Cr. laurentii*, zatímco shoda s nejpodobnějším kmenem *Cr. flavescens* 17-3-33 je pouze 95,10 %.

Kmen *Cr. victoriae* CCY 17-3-26 byl na základě proteinového otisku prstu na všech třech médiích řazen na samostatnou větev, která byla blíže *Cr. flavescens*. Při srovnání sekvencí je situace odlišná a CCY 17-3-26 je řazen na samostatnou větev blíže k *Cr. laurentii* i přesto, že se taxonomicky řadí do fylogenetické skupiny II a při biotypizaci poskytoval odlišná spektra než *Cr. flavescens* i *Cr. laurentii*, které se řadí do fylogenetické skupiny I.

Kmen CCY 17-3-43 = 17-27-4 byl na základě porovnání sekvencí umístěn mezi *Cr. flavescens*, což částečně odpovídá i výsledkům biotypizace, kde byl řazen na samostatnou větev, ale blíže právě tomuto druhu. Zajímavým faktem je, že jeho sekvence má vyšší procento shody s ostatními kmeny *Cr. flavescens* než sekvence kmene *Cr. flavescens* CCY 17-3-33, který poskytoval při biotypizaci identická spektra s ostatními kmeny tohoto druhu. Na závěr je nutno dodat, že ačkoliv se mezi sekvencemi jednotlivých kmenů vyskytují určité rozdíly, jedná se ve všech případech o druhy ze skupiny *Cr. laurentii*. Pokud by se porovnály sekvence s druhem mimo tuto skupinu, byly by rozdíly mezi testovanými kmeny a druhem mimo skupinu výrazně větší.

6 ZÁVĚR

Tématem této diplomové práce byla biotypizace kvasinek *Cryptococcus laurentii* a *Cryptococcus flavescens* pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Cílem první poloviny teoretické části bylo shrnout dostupné informace týkající se kvasinek rodu *Cryptococcus* jako celku a detailněji se zaměřit na testované druhy *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens*. Byly popsány jejich morfologické, fyziologické a biochemické vlastnosti a také jejich extracelulární enzymová aktivita. Druhá polovina teoretické části se zabývá hmotnostní spektrometrií se zaměřením na MALDI-TOF a metodikou biotypizace mikroorganismů touto instrumentální technikou.

Experimentální část měla několik základních cílů. Prvním cílem bylo posoudit, zda má složení kultivačního média vliv i na výběr metody pro přípravu vzorku, konkrétně na promývání buněk a výběr matrice. Bylo zjištěno, že vliv použité metody je poměrně významný a při promývání buněk vodou a extrakci proteinů roztokem matrice bylo pro stejný kmen detekováno zcela odlišné spektrum než při promývání buněk ethanolem. Pro všechna tři média se jako nejvhodnější jevila metoda, kdy byly buňky promyty ethanolem, lyzovány 70% kyselinou mravenčí, proteiny byly extrahovány 100% acetonitrem a jako matrice byla použita směs kyselin sinapové a ferulové. Při použití matrice CHCA, která je používána u většiny studií kvasinek, bylo ve spektru přítomno větší množství ionizovaných polysacharidů o nižším m/z a spektra byla méně kvalitní. Nejvíce se tento fakt projevil na bramborovém agaru chudém na živiny, kde se extracelulární polysacharidy tvořily v největším množství.

Druhým cílem bylo otestovat rozsah vlivu složení různých kultivačních médií na vzhled hmotnostních spekter jednotlivých kmenů a posoudit, zda má na vzhled spektra vliv původní substrát, ze kterého byl mikroorganismus na médium přeočkován. V tomto případě bylo zjištěno, že složení média nemá zásadní vliv na kvalitu spekter u kvasinek druhů *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* a o jeho vzhledu rozhoduje především použitá metoda přípravy vzorku. Při použití stejné metody na různém médiu byla pro stejný kmen detekována spektra s vysokou shodou. Problémy se vyskytovaly pouze na bramborovém agaru, kde se v mnoha případech nepodařilo získat kvalitní spektrum. Pokud ale bylo detekováno kvalitní spektrum, jeho skóre shody se spektry stejného kmene na jiných médiích bylo vyšší než 2,0. Poznotek, že složení kultivačního média nemá výrazný vliv, potvrdily i další studie na odlišných druzích kvasinek. Vliv původního substrátu, ze kterého byl mikroorganismus na kultivační médium přeočkován, má také jen malý vliv a rozhoduje hlavně složení samotného kultivačního média.

Třetím cílem bylo stanovit reprodukovatelnost spekter mezi kmeny *Cr. laurentii* a *Cr. flavescens* ze Zbierky kultur kvasiniek (CCY). Celkem bylo detekováno 5 typů spekter. První typ spektra poskytoval kmen CCY 17-3-2, který je typovým kmenem pro *Cr. laurentii*. Při srovnání tohoto kmene s ostatními kmeny testovanými kmeny bylo zjištěno, že tento kmen poskytuje odlišné spektrum než zbylých 13 kmenů *Cr. laurentii* a zcela odlišné spektrum než druhy *Cr. flavescens* a *Cr. victoriae*. Příčinou tohoto jevu je pravděpodobně odlišný geografický původ. Většina kmenů byla izolována na západním Slovensku zatímco CCY 17-3-2 je sbírkový kmen CBS izolovaný v Kongu. Ostatní kmeny *Cr. laurentii* kromě CCY 17-3-2 poskytovaly vzájemně shodná spektra a stejně tak poskytovalo vzájemně shodná spektra i všech 11 kmenů *Cr. flavescens* a 2 kmeny *Cr. victoriae*. Kmen *Cr. laurentii*

flavescens CCY 17-3-43 poskytoval odlišné spektrum od všech ostatních a na základě proteinového otisku prstu byl řazen blíže *Cr. flavescens*.

V závěru experimentální části byly porovnány sekvence D1/D2 domén LSU vybraných kmenů v programu ClustalW2. Procentuální shoda mezi CCY 17-3-2 a dalšími kmeny *Cr. laurentii* byla 97,55 % a více. To potvrzuje, že na základě této sekvenace se opravdu jedná o kmen *Cr. laurentii*, přestože poskytuje odlišné hmotnostní spektrum než ostatní kmeny tohoto druhu. Kmen *Cr. victoriae* CCY 17-3-26 byl při srovnání sekvencí zařazen blíže *Cr. laurentii* než *Cr. flavescens* i přesto, že se jedná o zástupce fylogenetické skupiny II skupiny *Cr. laurentii*. Kmen CCY 17-3-43 (17-27-4) byl na základě sekvenace zařazen mezi *Cr. flavescens*, ke kterým byl řazen blíže i na základě hmotnostních spekter.

Poznatky této diplomové práce naleznou využití při budoucí izolaci a identifikaci kvasinek rodu *Cryptococcus* pracovníky Zbierky kultúr kvasiniek CHÚ SAV. Optimalizace postupu kultivace, přípravy vzorku a volba vhodné metody umožní maximalizaci růstu buněk a redukci tvorby extracelulárních polysacharidů, jejichž nadměrná produkce způsobuje značné zkreslení spekter při identifikaci. Dále umožní postupné vytvoření interní databáze spekter, případně rozšíření externí databáze programu MALDI Biotyper a získaná spektra mohou být využita k identifikaci i pracovníky z dalších vědeckých pracovišť.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1] SCHUTZBACH, J., H. ANKEL, I. BROCKHAUSEN; Synthesis of cell envelope glycoproteins of *Cryptococcus laurentii*; *Carbohydrate research*, No. 342 (2007), p. 881-893.

[2] LI, S. S., C. H. MODY; *Cryptococcus*; *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 7, no. 3 (2010), p. 186-196.

[3] CHENG, M.-F., C. C. CHIOU, Y.-C. LIU, H.-Z. WANG a K.-S. HSIEH. *Cryptococcus laurentii* Fungemia in a Premature Neonate. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001-04-01, vol. 39, issue 4, s. 1608-1611. DOI: 10.1128/JCM.39.4.1608-1611.2001. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.39.4.1608-1611.2001>.

[4] *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. Editor C Kurtzman, Jack W Fell, Teunis Boekhout. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 2011, xxii, 289, 48, 178 s. ISBN 978-012-3847-089.

[5] BOSE, I., A. J. REESE, J. J. ORY, G. JANBON a T. L. DOERING. A Yeast under Cover: the Capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*. 2003-08-01, vol. 2, issue 4, s. 655-663. DOI: 10.1128/EC.2.4.655-663.2003. Dostupné z: <http://ec.asm.org/cgi/doi/10.1128/EC.2.4.655-663.2003>.

[6] KHAWCHAROENPORN, T., A. APISARNTHANARAK a L. M. MUNDY. Non-*neoformans* Cryptococcal Infections: a Systematic Review. *Infection*. 2007, vol. 35, issue 2, s. 51-58. DOI: 10.1007/s15010-007-6142-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s15010-007-6142-8>.

[7] MADHAVI, V. a S. S. LELE. Laccase: Properties and application. *BioResources*. 2009, roč. 4, č. 4, s. 1694-1717.

[8] ZHU, X., J. GIBBONS, J. GARCIA-RIVERA, A. CASADEVALL a P. R. WILLIAMSON. Laccase of *Cryptococcus neoformans* Is a Cell Wall-Associated Virulence Factor. *Infection and Immunity*. 2001-09-01, vol. 69, issue 9, s. 5589-5596. DOI: 10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.69.9.5589-5596.2001>.

[9] ZARAGOZA, O. a K. NIELSEN. Titan cells in *Cryptococcus neoformans*: cells with a giant impact. *Current Opinion in Microbiology*. 2013, vol. 16, issue 4, s. 409-413. DOI: 10.1016/j.mib.2013.03.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527413000386>.

[10] CHRISMAN, C. J., P. ALBUQUERQUE, A. J. GUIMARAES, E. NIEVES, A. CASADEVALL a C. M. HULL. Phospholipids Trigger *Cryptococcus neoformans* Capsular Enlargement during Interactions with Amoebae and Macrophages. *PLoS Pathogens*. 2011-5-26, vol. 7, issue 5, e1002047-. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002047. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002047>.

- [11] LIN, X. a J. HEITMAN. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species Complex. *Annual Review of Microbiology*. 2006, vol. 60, issue 1, s. 69-105. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142102. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.micro.60.080805.142102>.
- [12] SUGITA, T., M. TAKASHIMA, R. IKEDA, T. NAKASE a T. SHINODA. Intraspecies Diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, vol. 38, issue 4, s. 1468-1471.
- [13] TAKASHIMA, M., T. SUGITA, T. SHINODA a T. NAKASE. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescens* and *Cryptococcus peneaus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003-07-01, vol. 53, issue 4, s. 1187-1194. DOI: 10.1099/ijms.0.02498-0. Dostupné z: <http://ijms.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijms.0.02498-0>.
- [14] GOMES, F. C. O., S. V. B. SAFAR, A. R. MARQUES, A. O. MEDEIROS, A. R. O. SANTOS, C. CARVALHO, M.-A. LACHANCE, J. P. SAMPAIO a C. A. ROSA. The diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from water tanks of *Vriesea minarum*, an endangered bromeliad species in Brazil, and the description of *Occultifur brasiliensis* f.a., sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2015, vol. 107, issue 2, s. 597-611. DOI: 10.1007/s10482-014-0356-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-014-0356-4>.
- [15] SOUZA, A. C. de. Sugarcane Bagasse Hydrolysis Using Yeast Cellulolytic Enzymes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2013, vol. 23, issue 10, s. 1403-1412. DOI: 10.4014/jmb.1302.02062. Dostupné z: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?year=2013>.
- [16] GANA, N. H. T., B. C. MENDOZA a R. G. MONSALUD. Yeasts with amylolytic, lipolytic and proteolytic activities isolated from mango (*Mangifera indica* L.) fruits. *Asia Life Sciences*. 2014, roč. 23, č. 1, s. 243-253.
- [17] ROBERTS, R. G. Postharvest Biological Control of Grey Mold of Apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopathology*. 1990, roč. 80, č. 6, s. 527-530.
- [18] TOLAINI, V., S. ZJALIC, M. REVERBERI, C. FANELLI, A. A. FABBRI, A. DEL FIORE, P. DE ROSSI a A. RICELLI. *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits. *International Journal of Food Microbiology*. 2010-04-15, vol. 138, issue 3, s. 243-249. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.044. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510000619>.
- [19] YU, C., T. ZHOU, K. SHENG, L. ZENG, C. YE, T. YU a X. ZHENG. Effect of pyrimethanil on *Cryptococcus laurentii*, *Rhodosporidium paludigenum*, and *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Penicillium expansum* infection in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, vol. 164, 2-3, s. 155-160. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160513001967>.

[20] KURBANOGLU, E. B., K. ZILBEYAZ a N. I. KURBANOGLU. *Cryptococcus laurentii* as a new biocatalyst for the asymmetric reduction of substituted acetophenones. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2011, vol. 22, issue 3, s. 345-350. DOI: 10.1016/j.tetasy.2011.01.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095741661100036X>.

[21] PAVLOVA, K., M. ZLATANOV, G. ANTOVA, M. ANGELOVA-ROMOVA a K. GEORGIEVA. Biosynthesis and Characterization of Exopolysaccharides and Lipids from Antarctic Yeasts. *Biotechnology*. 2014-04-16, vol. 26, issue 4, s. 3123-3128. DOI: 10.5504/BBEQ.2012.0038. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.5504/BBEQ.2012.0038>.

[22] FUKUMURA, T., G. TALBOT, H. MISONO, Y. TERAMURA, K. KATO a K. SODA. Purification and properties of a novel enzyme, L- α -amino- ϵ -caprolactamase from *Cryptococcus laurentii*. *FEBS Letters*. 1978, vol. 89, issue 2, s. 298-300. DOI: 10.1016/0014-5793(78)80240-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014579378802403>.

[23] SANTOS, C., M. S. LUCAS, A. A. DIAS, R. M. F. BEZERRA, J. A. PERES a A. SAMPAIO. Winery wastewater treatment by combination of *Cryptococcus laurentii* and Fenton's reagent. *Chemosphere*. 2014, vol. 117, s. 53-58. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.05.083. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653514007292>.

[24] SATO, I., H. KOBAYASHI, Y. HANYA, K. ABE, S. MURAKAMI, G. SCORZETTI a J.W. FELL. *Cryptococcus nodaensis* sp nov, a yeast isolated from soil in Japan that produces a salt-tolerant and thermostable glutaminase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1999, č. 22, 127–132.

[25] MASE, T., K. ASANO, Y. IKEDA, Y. KATO, H. ESAKI a S. ISSHIKI. Characterization and Application of Lipase 39-A from *Cryptococcus flavescens* for Cheese Flavoring. *Food Science and Technology Research*. 2013, vol. 19, issue 1, s. 89-95. DOI: 10.3136/fstr.19.89. Dostupné z: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/fstr/19.89?lang=en>.

[26] SCHISLER, D. A., A. B. CORE, M. J. BOEHM, L. HORST, C. KRAUSE, C. A. DUNLAP a A. P. ROONEY. Population dynamics of the *Fusarium* head blight biocontrol agent *Cryptococcus flavescens* OH 182.9 on wheat anthers and heads. *Biological Control*. 2014, vol. 70, s. 17-27. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.11.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1049964413002776>.

[27] VAZ, A. B. M., L. H. ROSA, M. L. A. VIEIRA, V. DE GARCIA, L. R. BRANDÃO, L. C. R. S. TEIXEIRA, M. MOLINÉ, D. LIBKIND, M. VAN BROOCK a C. A. ROSA. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011, vol. 42, issue 3, s. 937-947. DOI: 10.1590/s1517-83822011000300012.

[28] BRANDÃO, L. R., D. LIBKIND, A. B. M. VAZ, L. C. ESPÍRITO SANTO, M. MOLINÉ, V. DE GARCÍA, M. VAN BROOCK a C. A. ROSA. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. *FEMS Microbiology Ecology*. 2011, vol. 76, issue 1. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.01030.x.

[29] HERZBERG, M., R. FISCHER a A. TITZE. Conflicting results obtained by RAPD-PCR and large-subunit rDNA sequences in determining and comparing yeast strains isolated from flowers: a comparison of two methods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002, vol. 52, issue 4, s. 1423-1433. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/ijs.0.02162-0>.

[30] DANESI, P., C. FURNARI, A. GRANATO, A. SCHIVO, OTRANTO, G. CAPELLI a C. CAFARCHIA. Molecular identity and prevalence of *Cryptococcus* spp. nasal carriage in asymptomatic feral cats in Italy. *Medical Mycology*. 2014-09-10, vol. 52, issue 7, s. 667-673. DOI: 10.1093/mmy/myu030. Dostupné z: <http://mmy.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/mmy/myu030>.

[31] GALLARDO, G., S. RUIZ-MOYANO, A. HERNÁNDEZ, M.J. BENITO, M.G. CÓRDOBA, F. PÉREZ-NEVADO a A. MARTÍN. Application of ISSR-PCR for rapid strain typing of *Debaryomyces hansenii* isolated from dry-cured Iberian ham. *Food Microbiology*. 2014, vol. 42, s. 205-211. DOI: 10.1016/j.fm.2014.03.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002014000756>.

[32] LUTZ, M. C., C. A. LOPES, M. E. RODRIGUEZ, M. C. SOSA a M. P. SANGORRÍN. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, vol. 164, 2-3, s. 166-172. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160513001797>.

[33] ÖTLEŞ, S. *Handbook of food analysis instruments*. Boca Raton, FL: CRC Press, c2009, s. 197-228. ISBN 1420045660.

[34] TODOLÍ, J. L. aj. M. MERMET. Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2006, vol. 61, issue 3, s. 239-283. DOI: 10.1016/j.sab.2005.12.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854706000292>.

[35] BIENVENUT, W. V. *Acceleration and improvement of protein identification by mass spectrometry*. Norwell, MA: Springer, 2005, s. 25-75. ISBN 1-4020-3319-2.

[36] BERKENKAMP, S., M. KARAS a F. HILLENKAMP. Ice as a matrix for IR-matrix-assisted laser desorption/ionization: mass spectra from a protein single crystal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996, vol. 93, issue 14, s. 7003-7007. DOI: 10.1007/springerreference_67094.

[37] ASARA, J. M. a J. ALLISON. Enhanced detection of phosphopeptides in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ammonium salts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 1999, vol. 10, issue 1, s. 35-44. DOI: 10.1016/s1044-0305(98)00129-9.

[38] MACHA, S. F., P. A. LIMBACH, S. D. HANTON a K. G. OWENS. Silver cluster interferences in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry of nonpolar polymers. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2001, vol. 12, issue 6, s. 732-743. DOI: 10.1016/s1044-0305(01)00225-2.

[39] BUDNIK, B., K. JENSEN, T. JORGENSEN, A. HAASE a R. ZUBAREV. Benefits of 2.94 mm infrared matrix-assisted laser desorption/ionization for analysis of labile molecules by Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2000, roč. 14, č. 7, s. 578-584.

[40] LAIKO, V. V., M. A. BALDWIN a A. L. BURLINGAME. Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2000, vol. 72, issue 4, s. 652-657. DOI: 10.1021/ac990998k. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac990998k>.

[41] CAJKA, T. a J. HAJŠLOVA. Gas Chromatography–Time-of-Flight Mass Spectrometry in Food Analysis. *LCGC Europe* [online]. 2007, roč. 20, č. 1 [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/node/232975>.

[42] GUILHAUS, M., D. SELBY a V. MLYNSKI. Orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2000, č. 19, s. 65-107.

[43] TOF/TOF™ 5800 System. In: *Sciex: Answers for Science. Knowledge for Life*. [online]. © 2010-2015 [cit. 2015-03-16]. Dostupné z: <http://sciex.com/products/mass-spectrometers/tof/tof-systems/tof/tof-5800-system>.

[44] 4800 System Overview: Concepts and Principles. In: *Institute of Biochemistry and Cell Biology: Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS* [online]. © 2000-2015 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.sibcb.ac.cn/cfmb/download/AB4800-principle.pdf>.

[45] MALDI-TOF-TOF MS/MS. In: *Max Planck Institute for Plant Breeding* [online]. © 2003-2015 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: https://www.mpipz.mpg.de/44542/MALDI-TOF-TOF_MS_MS.

[46] ROTH, A. *Vacuum technology*. 3rd upd. and enl. ed. Amsterdam: Elsevier, c1990, s. 3. ISBN 0444880100.

[47] MOOTHOO-PADAYACHIE, A., H. R. KANDAPPA, S. B. N. KRISHNA, T. MAIER a P. GOVENDER. Biotyping *Saccharomyces cerevisiae* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *European Food Research and Technology*. 2013, vol. 236, issue 2, s. 351-364. DOI: 10.1007/s00217-012-1898-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-012-1898-1>.

[48] TIMMINS, É. M., D. E. QUIAN a R. GOODACRE. Differentiation of brewing yeast strains by pyrolysis mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy. *Yeasts*. 1998, vol. 14, issue 10, s. 885-893.

[49] FRANCO, C. F., M. C. M. MELLADO, P. M. ALVES a A. V. COELHO. Monitoring virus-like particle and viral protein production by intact cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Talanta*. 2010-02-15, vol. 80, issue 4, s. 1561-1568. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.06.081. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914009005463>.

[50] CHALUPOVÁ, J., M. RAUS, M. SEDLÁŘOVÁ a M. ŠEBELA. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*. 2014, vol. 32, issue 1, s. 230-241. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975013001948>.

[51] CAMPBELL, P. M. Species differentiation of insects and other multicellular organisms using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling. *Systematic Entomology*. 2005, vol. 30, issue 2, s. 186-190. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2004.00279.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3113.2004.00279.x>.

[52] PERERA, M. R., V. A. VANSTONE a M. G. K. JONES. A novel approach to identify plant parasitic nematodes using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005-06-15, vol. 19, issue 11, s. 1454-1460. DOI: 10.1002/rcm.1943. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.1943>

[53] MADONNA, A. J., F. BASILE, I. FERRER, M. A. MEETANI, J. C. REES a K. J. VOORHEES. On-probe sample pretreatment for the detection of proteins above 15 KDa from whole cell bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*. 2000, č. 14, 2220–2229.

[54] FENSELAU, C. a P. A. DEMIREV. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2001, vol. 20, issue 4, s. 157-171. DOI: 10.1002/mas.10004. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.10004>.

[55] JAMAL, W. Y., S. AHMAD, Z. U. KHAN a V. O. ROTIMI. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014, vol. 26, s. 167-170. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.05.031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971214015604>.

[56] PAVLOVIC, M., A. MEWES, M. MAGGIPINTO, W. SCHMIDT, U. MESSELHÄÜßER, J. BALS LIEMKE, S. HÖRMANSDORFER, U. BUSCH a I. HUBER. MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. *Journal of Microbiological Methods*. 2014, vol. 106, s. 123-128. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.08.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701214002553>.

[57] PANDA, A., A. K. GHOSH, B. R. MIRDHA, I. XESS, S. PAUL, J. C. SAMANTARAY, A. SRINIVASAN, S. KHALIL, N. RASTOGI a Y. DABAS. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *Journal of Microbiological Methods*. 2015, vol. 109, s. 93-105. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.12.014. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701214003637>.

[58] STETS, M. I., A. S. PINTO, L. F. HUERGO, E. M. DE SOUZA, V. F. GUIMARÃES, A. C. ALVES, M. B. R. STEFFENS, R. A. MONTEIRO, F. de O. PEDROSA a L. M. CRUZ. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *Journal of Biotechnology*. 2013, vol. 165, 3-4, s. 167-174. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.04.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165613001818>.

[59] QUEROL, A. a G. FLEET. *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer, c2006, 453 p. ISBN 978-354-0283-881.

[60] SONNENBERG, R., A. W. NOLTE a D. TAUTZ. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Frontiers in Zoology*. 2007, vol. 4, issue 1. DOI: 10.1186/1742-9994-4-6. Dostupné z: <http://www.frontiersinzoology.com/content/4/1/6>.

[61] KURTZMAN, C. P. a C. J. ROBNETT. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998, vol. 73, issue 4, s. 331-371. DOI: 10.1023/A:1001761008817. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1001761008817>.

[62] JAMES, S. A., J. CAI, I. N. ROBERTS a M. D. COLLINS. A Phylogenetic Analysis of the Genus *Saccharomyces* Based on 18S rRNA Gene Sequences: Description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1997-04-01, vol. 47, issue 2, s. 453-460. DOI: 10.1099/00207713-47-2-453. Dostupné z: <http://ijs.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/00207713-47-2-453>.

[63] MCTAGGART, L. R., E. LEI, S. E. RICHARDSON, L. HOANG, A. FOTHERGILL a S. X. ZHANG. Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011-07-28, vol. 49, issue 8, s. 3050-3053. DOI: 10.1128/JCM.00651-11. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00651-11>.

[64] JÄGER, J. *Biotypizácia kvasiniek skupiny *Cryptococcus laurentii* hmotnostnou spektrometriou*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 70 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Stratilová, Ph.D.

[65] VAN VEEN, S. Q., E. C. J. CLAAS a E. J. KUIJPER. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010-02-25, vol. 48, issue 3, s. 900-907. DOI: 10.1128/JCM.02071-09. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02071-09>.

[66] MARKLEIN, G., M. JOSTEN, U. KLANKE, E. MULLER, R. HORRE, T. MAIER, T. WENZEL, M. KOSTRZEWA, G. BIERBAUM, A. HOERAUF a H.-G. SAHL. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Fast and Reliable Identification of Clinical Yeast Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009-08-31, vol. 47, issue 9, s. 2912-2917. DOI: 10.1128/JCM.00389-09. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.00389-09>.

[67] GOUJON, M., H. MCWILLIAM, W. LI, F. VALENTIN, S. SQUIZZATO, J. PAERN a R. LOPEZ. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*. 2010-06-24, vol. 38, Web Server, W695-W699. DOI: 10.1093/nar/gkq313. Dostupné z: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkq313>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

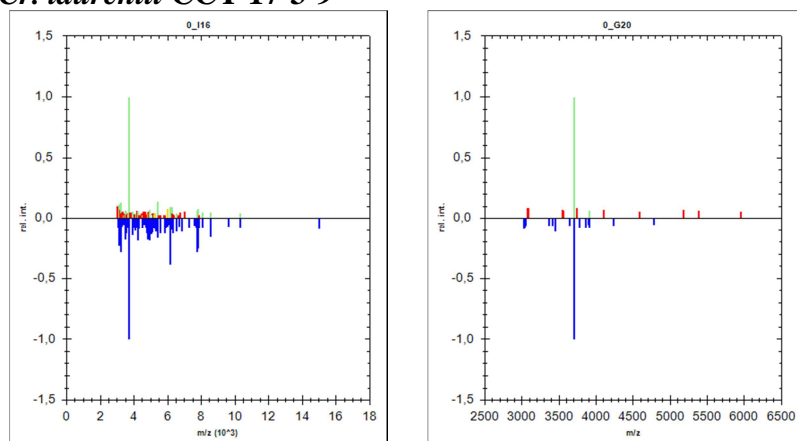
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APMALDI	matricí asistovaná laserová desorpce za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal biodiversity centre
CCY	Culture Collection of Yeasts, Zbierka kultúr kvasiniek
CHCA	α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina
CI	chemická ionizace
D1/D2	divergentní domény 1 a 2 na genu velké ribozomální podjednotky
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EI	elektronová ionizace
Er:YAG	yttrium aluminium granát dopovaný ionty erbia
ESI	elektrosprejová ionizace
FA	kyselina ferulová
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
CHÚ SAV	Chemický ústav Slovenské akademie věd
ICP	indukčně vázané plazma
IR	infračervený
ITS	internal transcribed spacer
LSU	velká ribozomální podjednotka
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce
MCP	micro channel plate, mikrokanálová destička
MS	hmotnostní spektrometrie
MSP	main spectrum, spektrum získané sjednocením více spekter do jednoho
Nd:YAG	yttrium aluminium granát dopovaný ionty neodymu
NIST	National Institute of Standards and Technology
NPCC	North Patagonian Culture Collection
PCR	polymerázová řetězová reakce
PyMS	pyrolytická hmotnostní spektrometrie
SA	kyselina sinapová
TOF	time-of-flight, průletový analyzátor
UV	ultrafialový
YPD	yeast extract peptone dextrose, médium s kvasničným extraktem, peptonem a glukózou

9 PŘÍLOHY

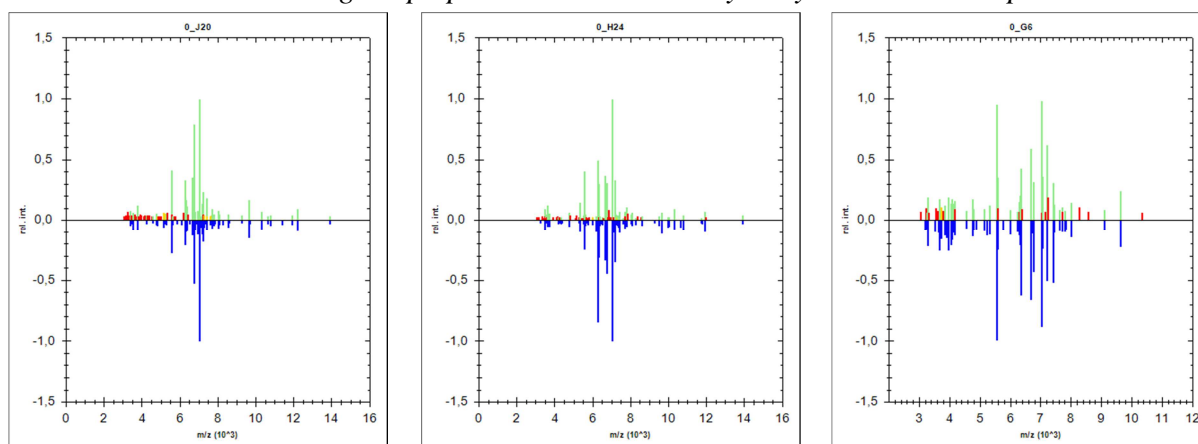
V rámci zpřehlednění popisu jednotlivých spekter je v přílohách zavedena zjednodušená nomenklatura, kdy je metoda 1 (promývání ethanolem, matrice CHCA) označena jako EtOH CHCA, metoda dvě (promývání ethanolem, matrice SA:FA) jako EtOH SA:FA a metoda 3 (promývání vodou a extrakce roztokem matrice SA:FA) jako H₂O SA:FA.

9.1 Srovnání jednotlivých metod po přeočkování ze sladiny a z média

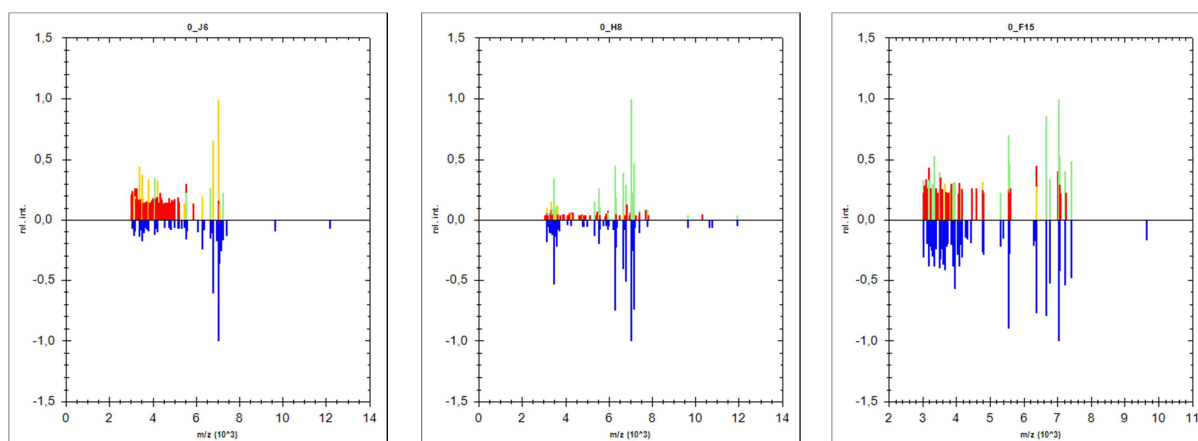
9.1.1 Kmen *Cr. laurentii* CCY 17-3-9



Obrázek 23 H₂O SA:FA; vlevo srovnání sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,184; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 1,108. Na Sabouraudově agaru po přeočkování ze sladiny nebylo detekováno spektrum.

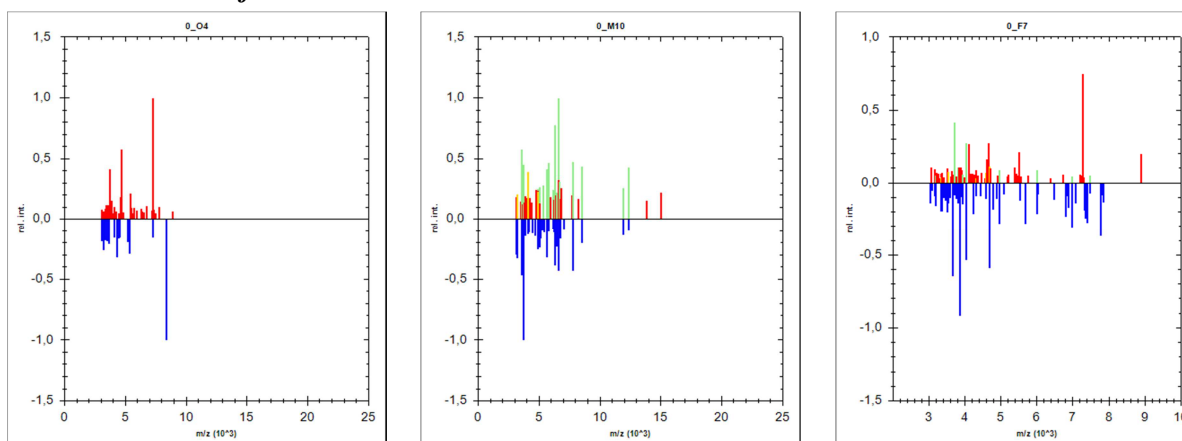


Obrázek 24 EtOH SA:FA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 2,496; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,639; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 2,682

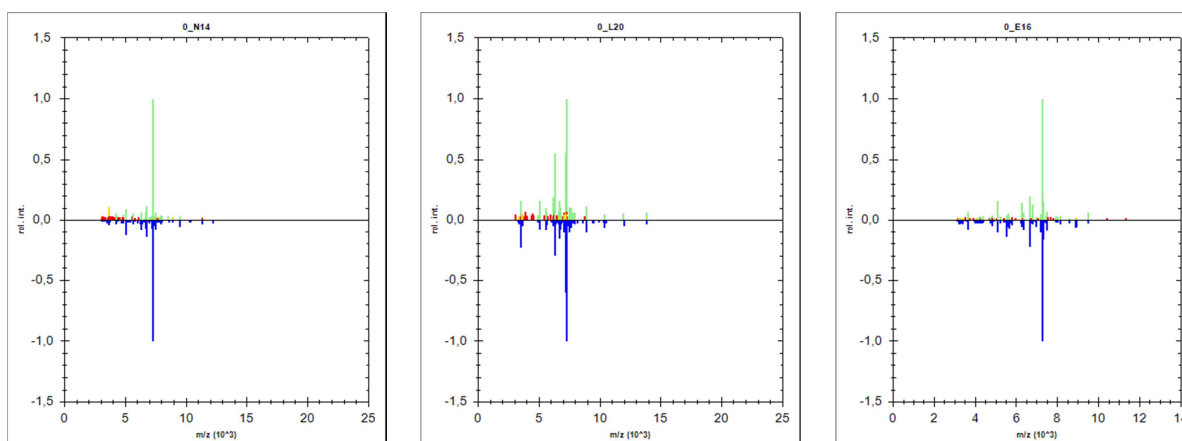


Obrázek 25 EtOH CHCA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 1,485; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,214; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 2,165

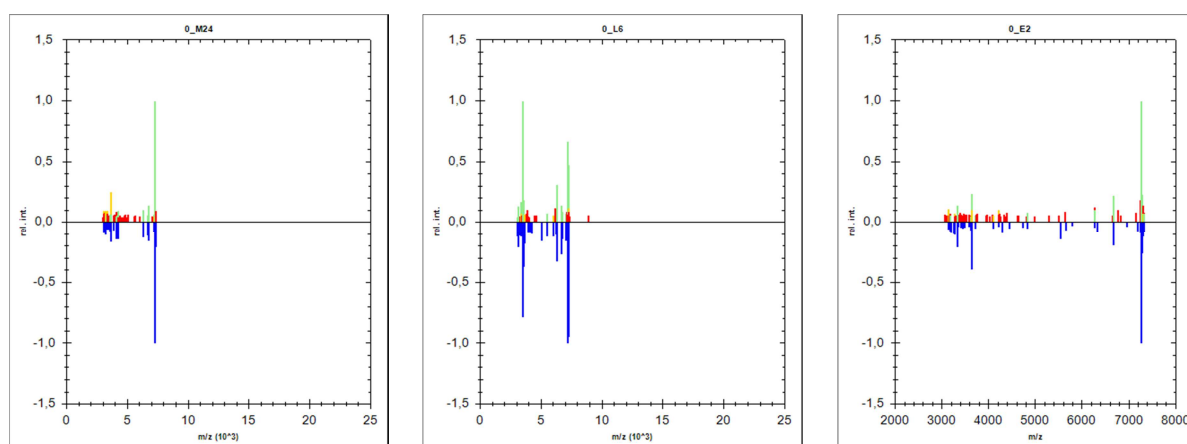
9.1.2 Kmen *Cr. flavescens* CCY 17-3-34



Obrázek 26 H₂O SA:FA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 0,427; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,338; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 1,307

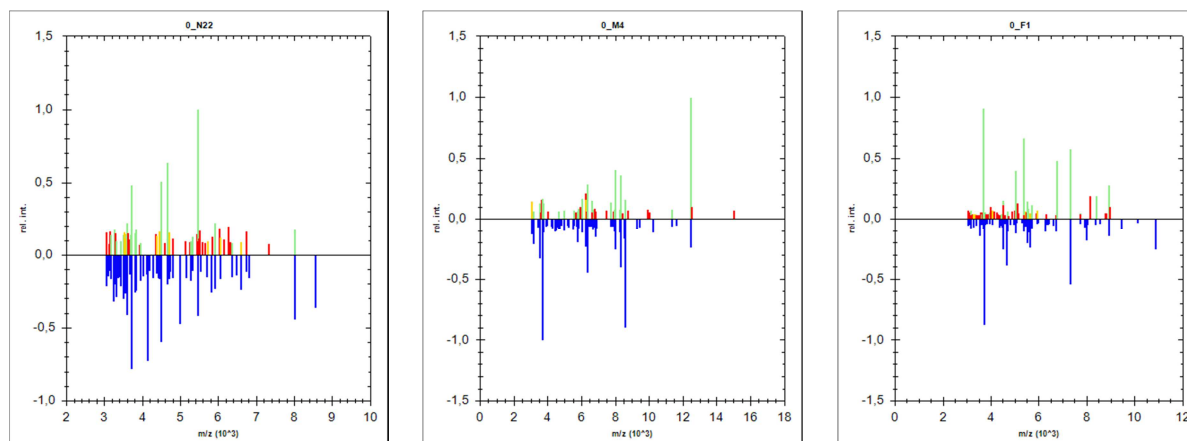


Obrázek 27 EtOH SA:FA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 2,293; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,437; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 2,536

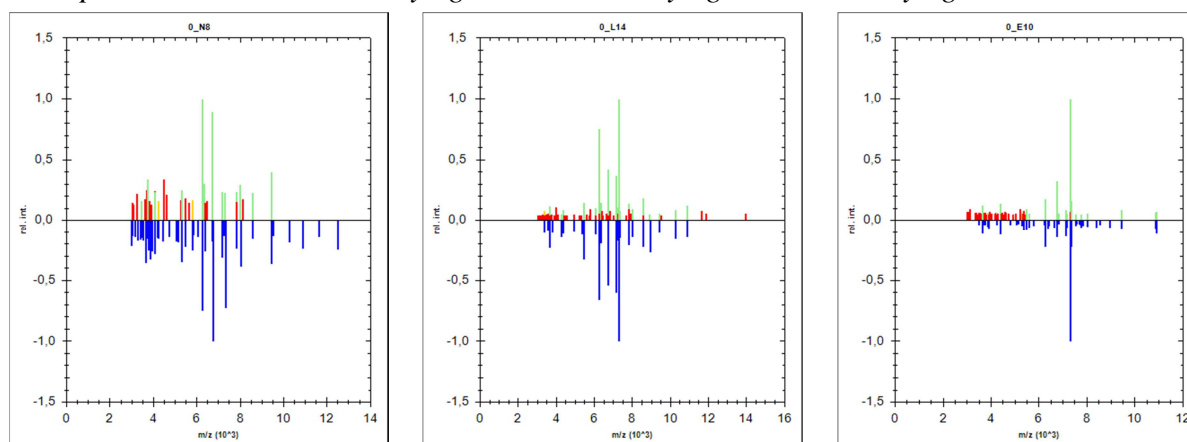


Obrázek 28 EtOH CHCA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 2,226; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,408; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 1,866

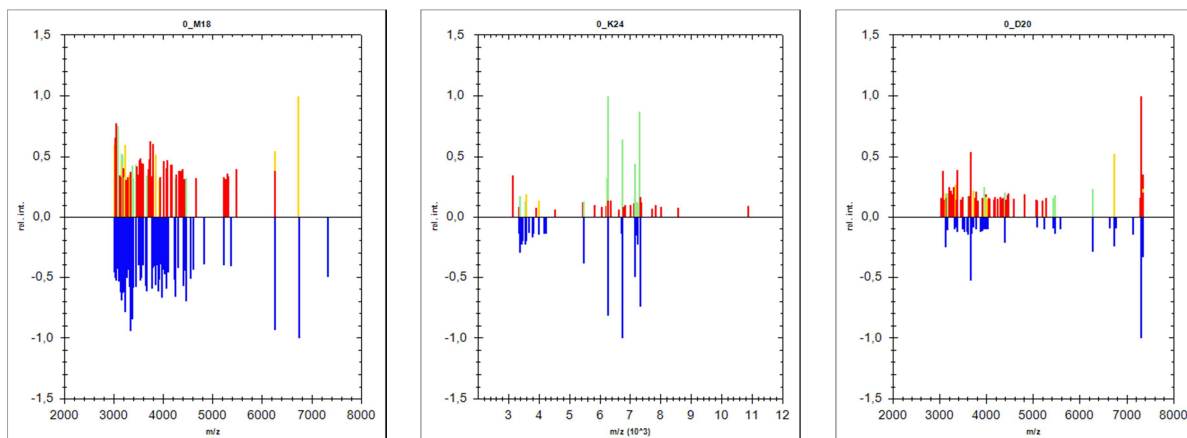
9.1.3 Kmen *Cr. victoriae* CCY 17-3-26



Obrázek 29 H₂O SA:FA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 2,217; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 1,997; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 1,950

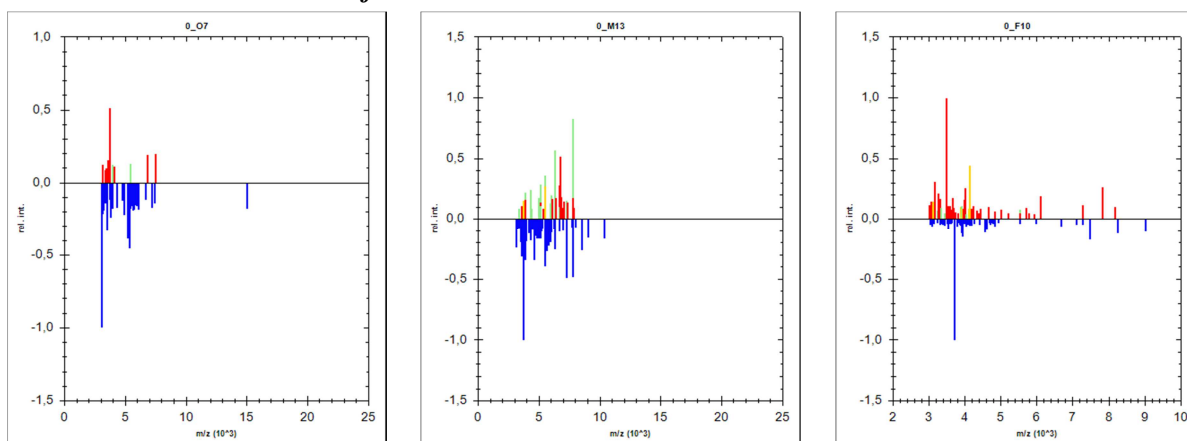


Obrázek 30 EtOH SA:FA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 2,103; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,312; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 2,150

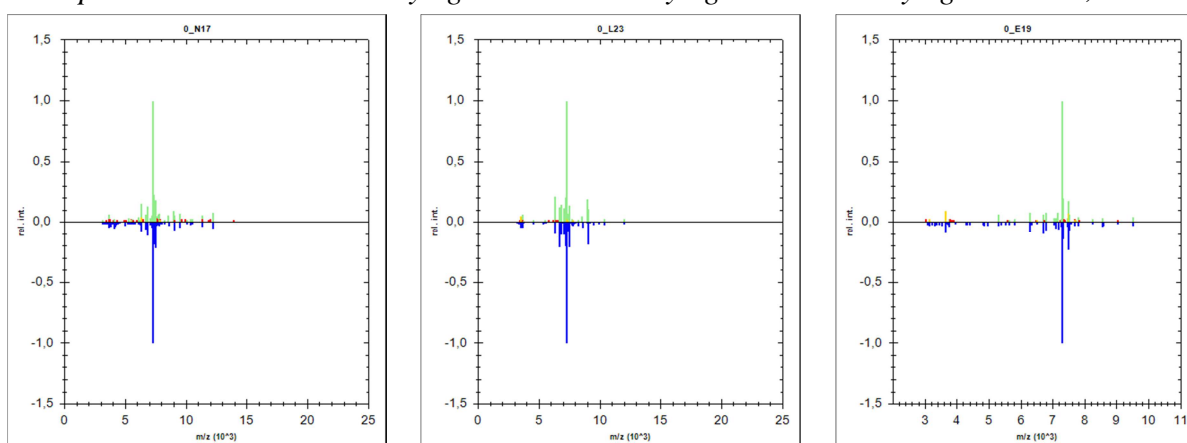


Obrázek 31 EtOH CHCA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 1,451; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,092; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 1,509

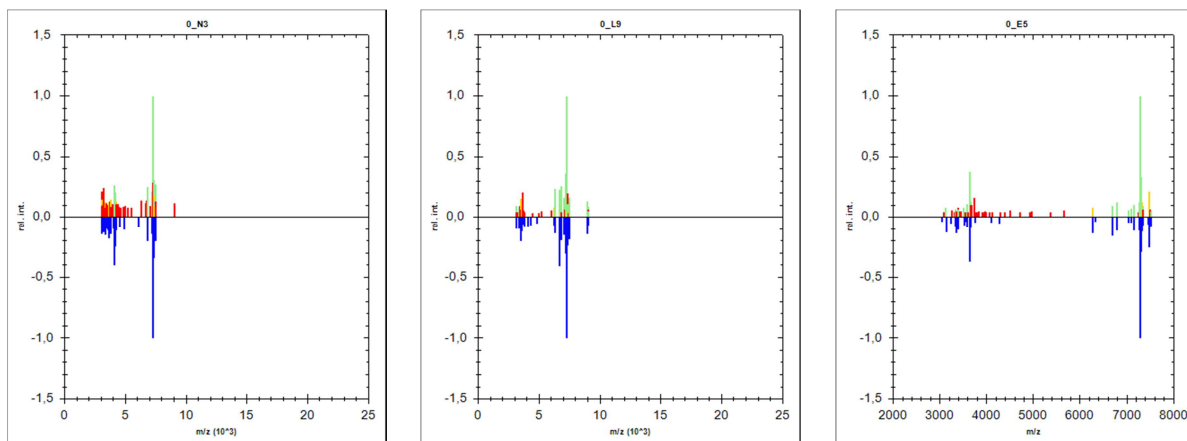
9.1.4 Kmen *Cr. laurentii* flavescens CCY 17-3-43 = 17-27-4



Obrázek 32 H₂O SA:FA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 0,412; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 1,732; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 0,868



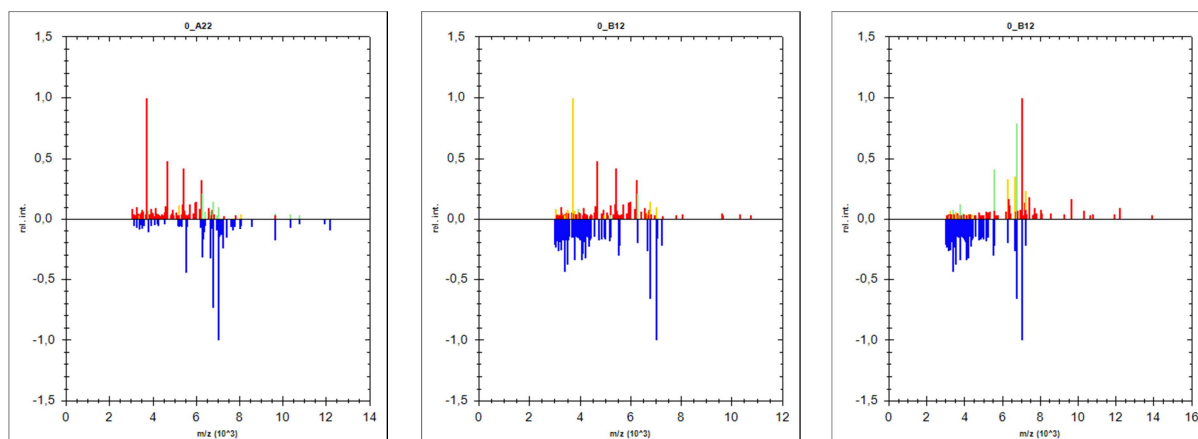
Obrázek 33 EtOH SA:FA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 2,443; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,419; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 2,438



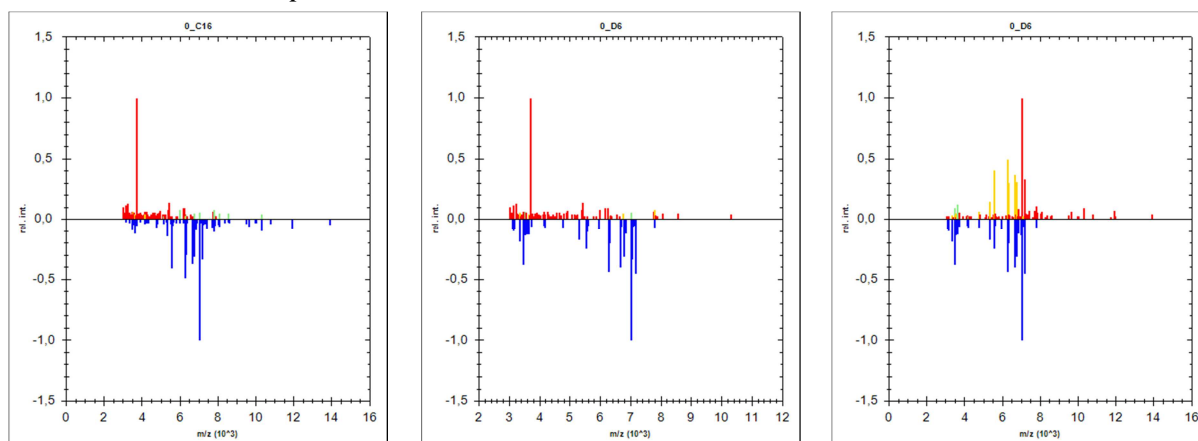
Obrázek 34 EtOH CHCA; vlevo srovnání sladina-Sabouraudův agar a Sabouraudův agar-Sabouraudův agar skóre 1,962; uprostřed sladina-YPD agar a YPD-YPD agar skóre 2,301; vpravo sladina-bramborový agar a bramborový agar-bramborový agar skóre 2,108

9.2 Vzájemné srovnání metod v rámci jednotlivých médií

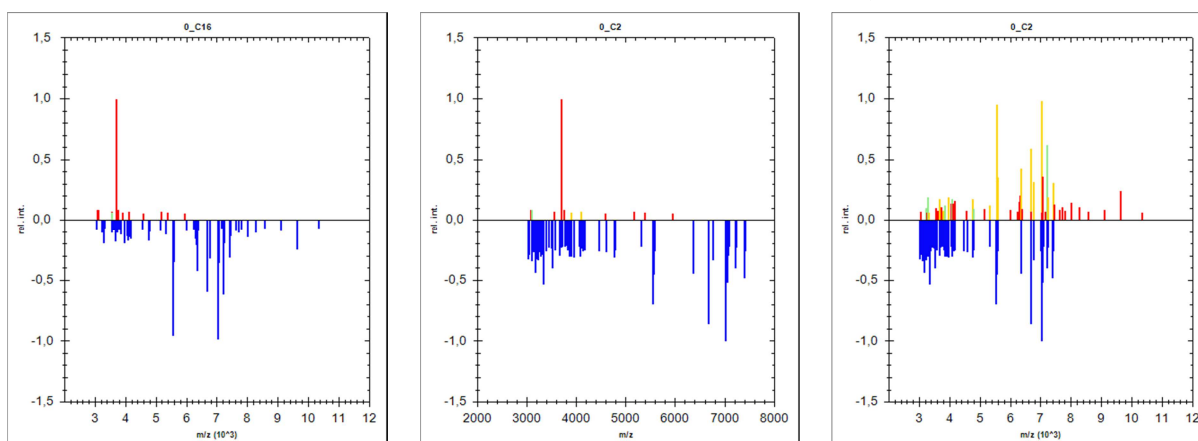
9.2.1 Kmen *Cr. laurentii* CCY 17-3-9



Obrázek 35 Sabouraudův agar po přeočkování ze sladivového agaru; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 1,198; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,034; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,376

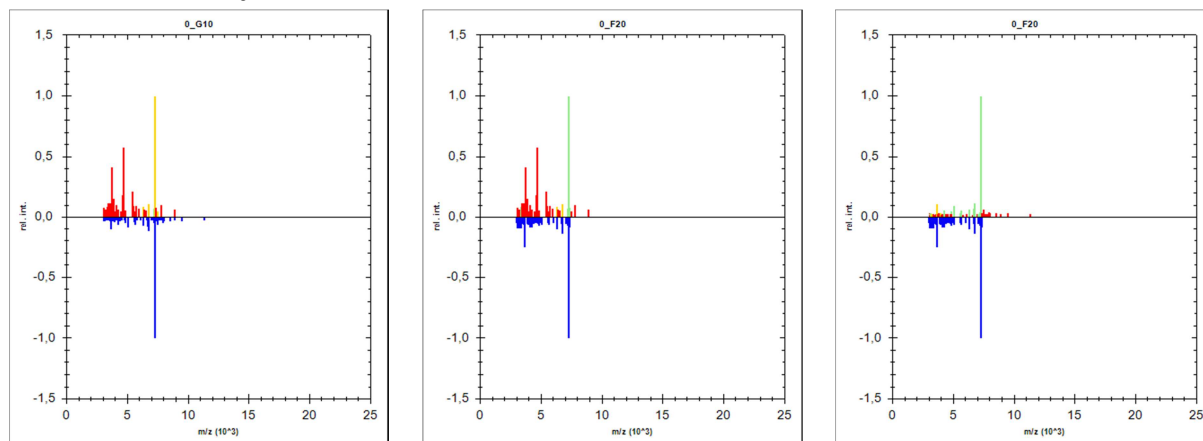


Obrázek 36 YPD agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,074; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,610; vpravo srovnání EtOH CHCA a EtOH SA:FA skóre 1,562

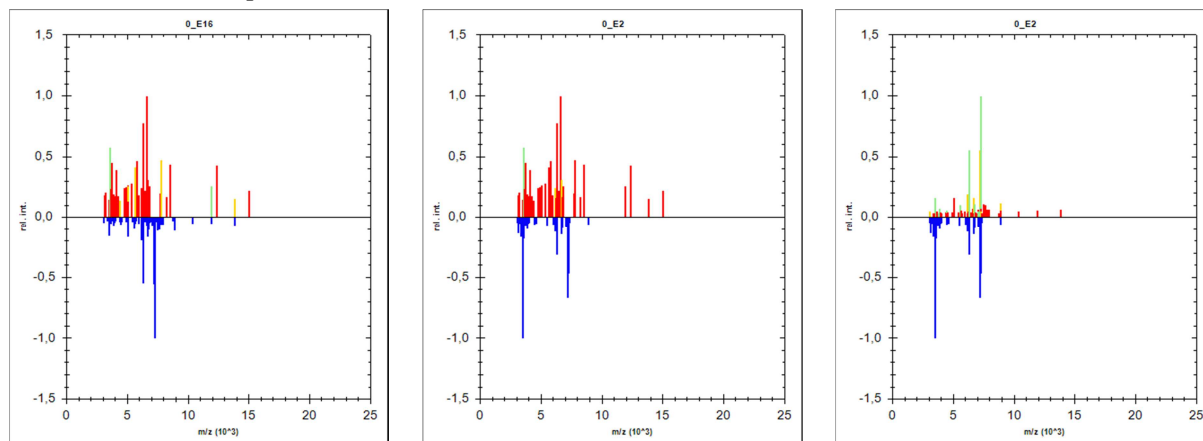


Obrázek 37 Bramborový agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre < 0 ; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre < 0 ; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,510

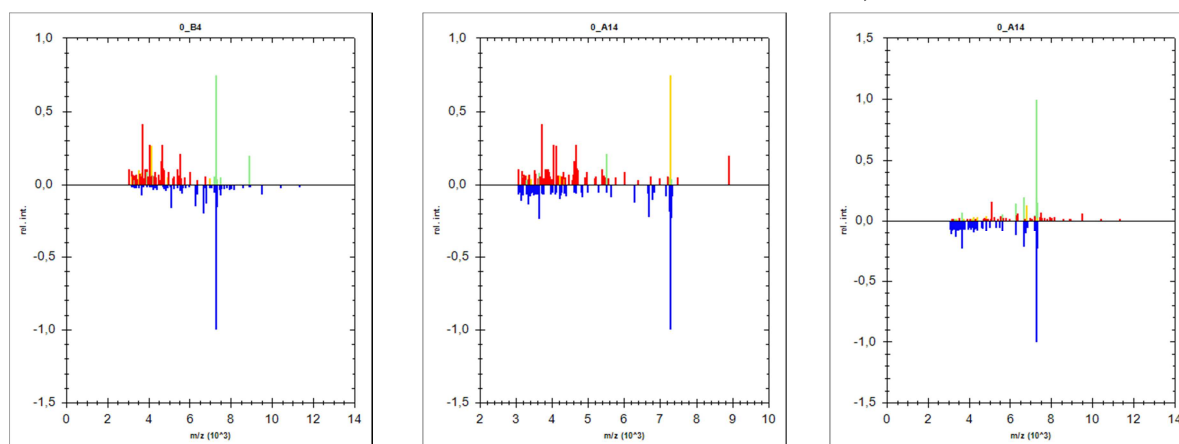
9.2.2 Kmen *Cr. flavescens* CCY 17-3-34



Obrázek 38 Sabouraudův agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,305; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,827; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,973

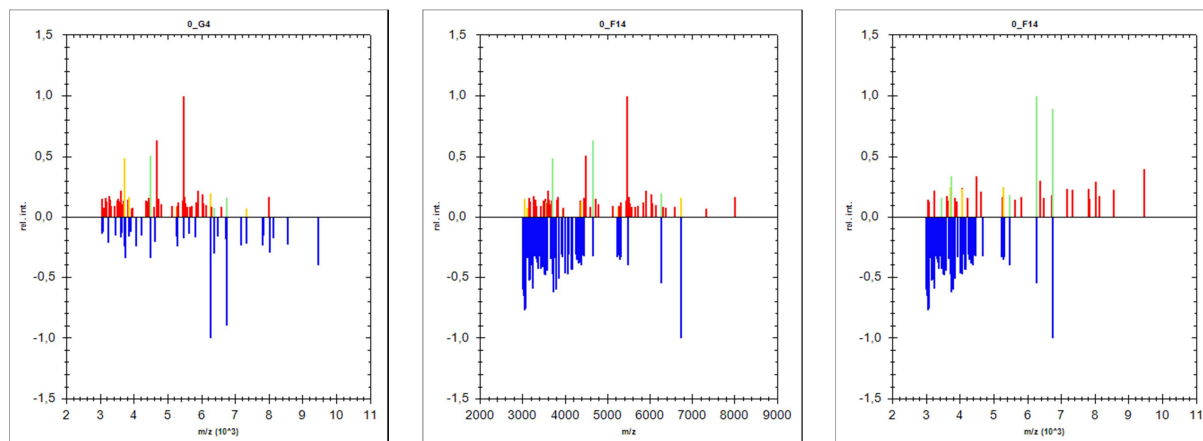


Obrázek 39 YPD agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,568; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre < 0; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,984

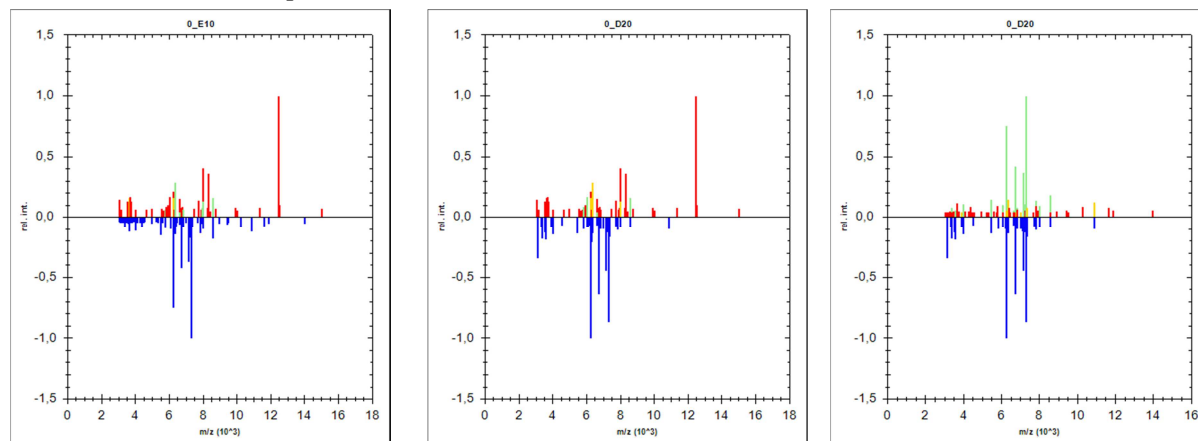


Obrázek 40 Bramborový agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 1,334; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,868; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,683

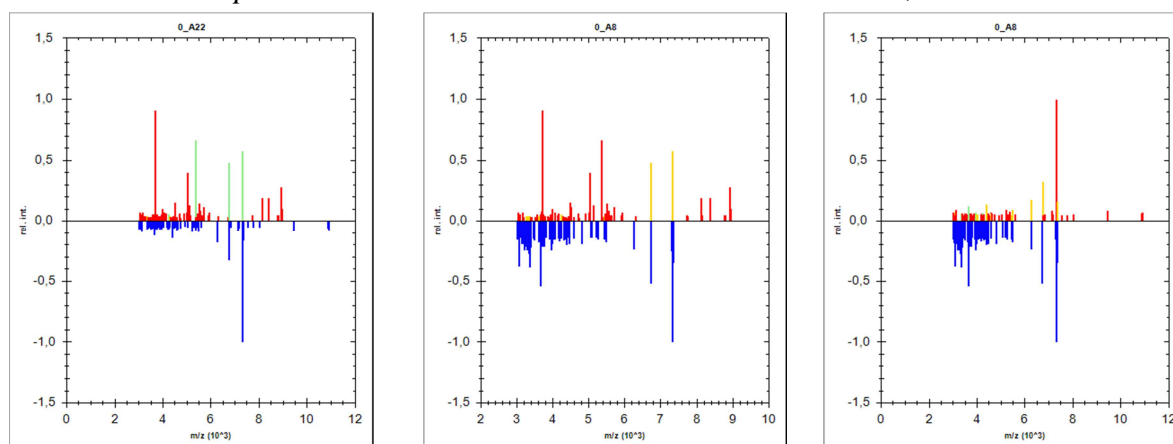
9.2.3 Kmen *Cr. victoriae* CCY 17-3-26



Obrázek 41 Sabouraudův agar po přeočkování ze sladivového agaru; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,930; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,740; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,846

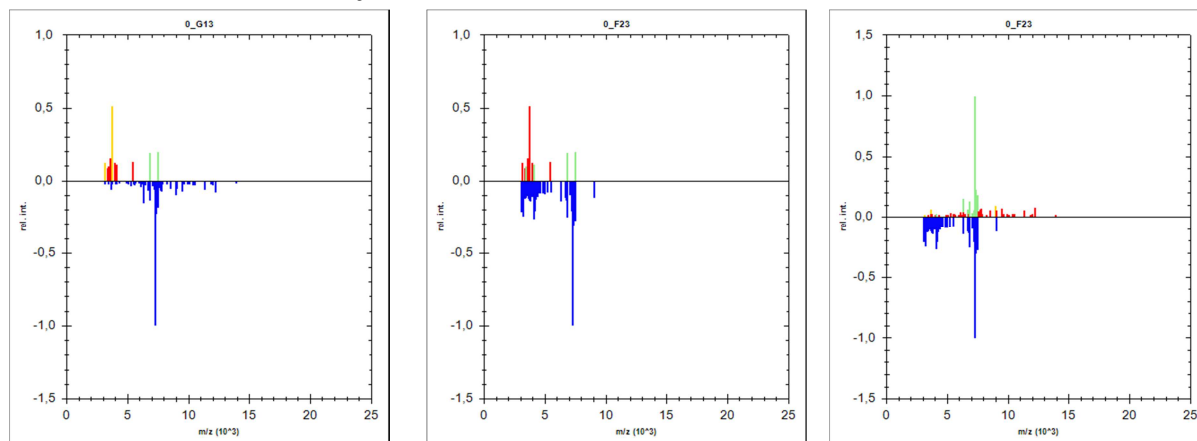


Obrázek 42 YPD agar po přeočkování ze sladivového agaru; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,837; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,736; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 2,151

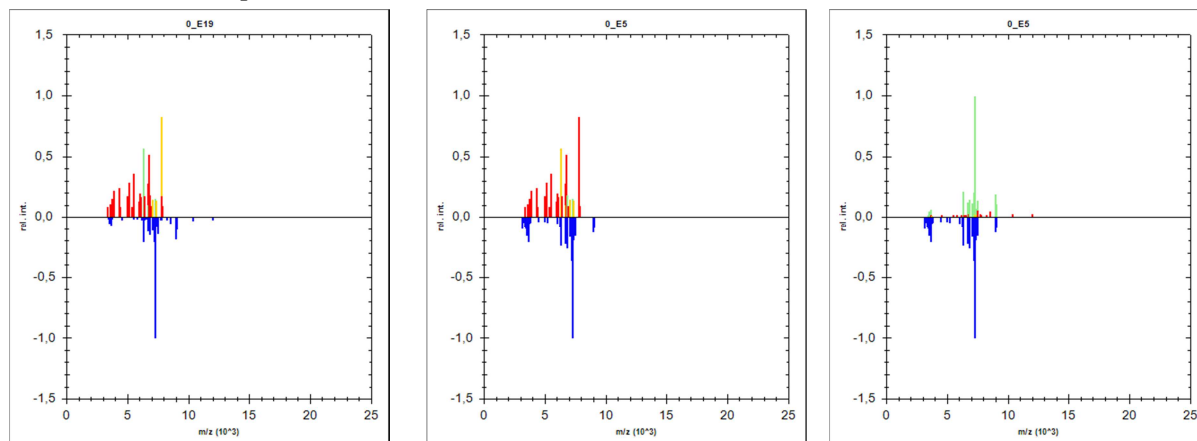


Obrázek 43 Bramborový agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,547; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,397; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,160

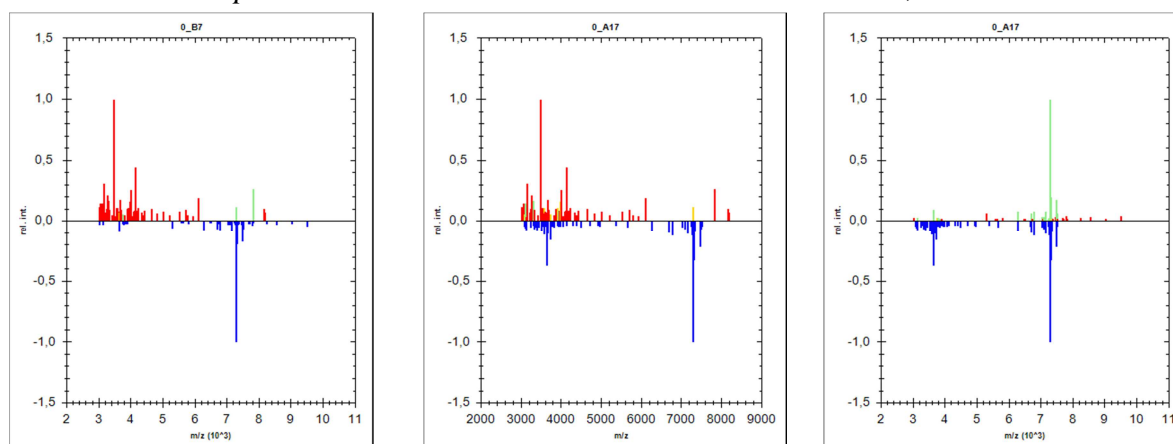
9.2.4 Kmen *Cr. laurentii flavescens* CCY 17-3-43 = 17-27-4



Obrázek 44 Sabouraudův agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,252; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,715; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,588

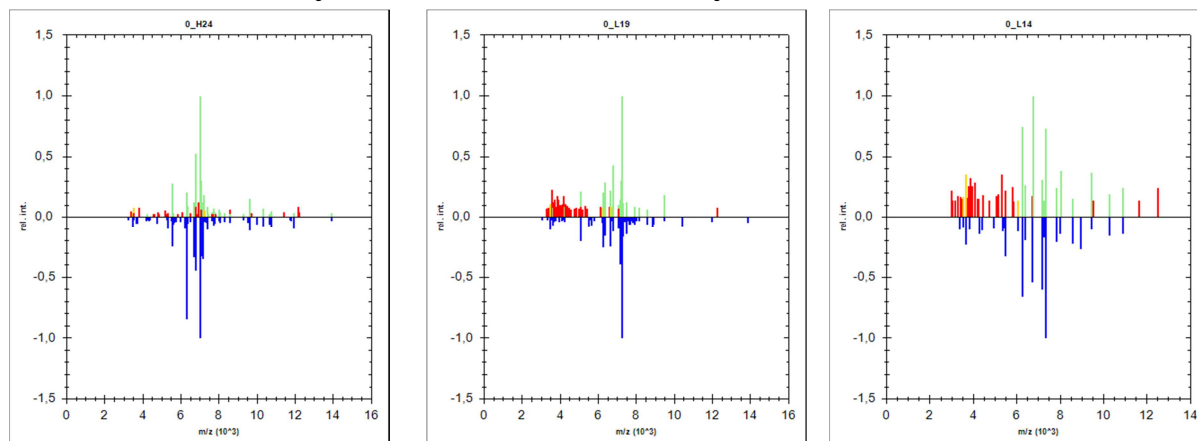


Obrázek 45 YPD agar po přeočkování ze sladivového agaru; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre 0,511; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,785; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 2,296

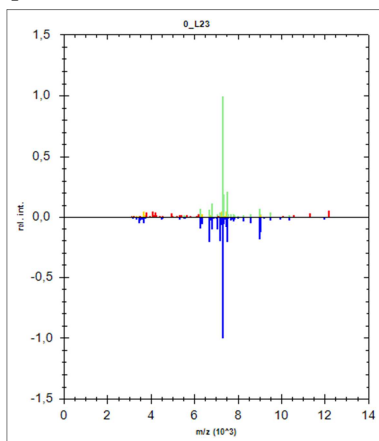


Obrázek 46 Bramborový agar po přeočkování ze sladiny; vlevo srovnání H_2O SA:FA a EtOH SA:FA skóre < 0; uprostřed srovnání H_2O SA:FA a EtOH CHCA skóre 0,319; vpravo srovnání EtOH SA:FA a EtOH CHCA skóre 1,918

9.3 Srovnání metody 2 (EtOH SA:FA) na různých médiích

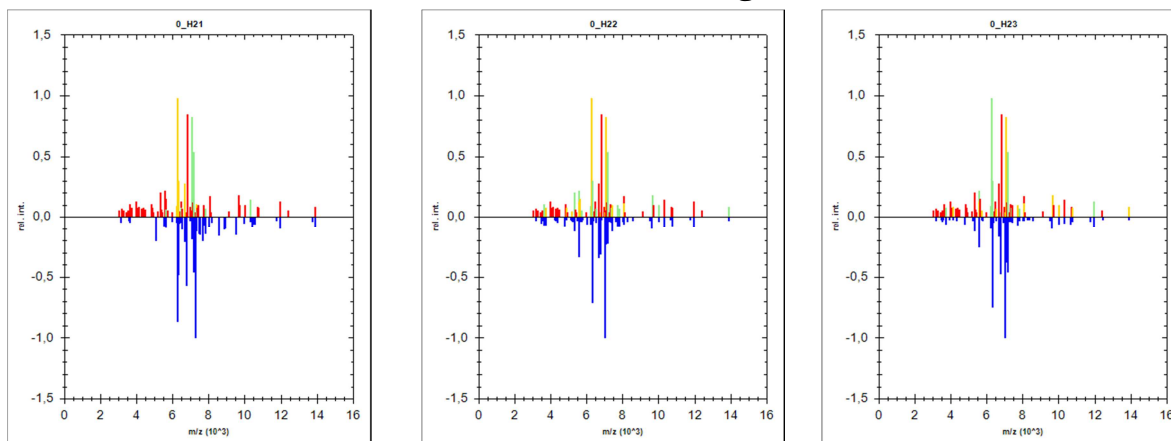


Obrázek 47 Srovnání EtOH SA:FA mezi Sabouraudův-Sabouraudův agar a YPD-YPD agar; vlevo *Cr. laurentii* CCY 17-3-9 skóre 2,387; uprostřed *Cr. flavescens* CCY 17-3-33 skóre 1,774; vpravo *Cr. victoriae* 17-3-26 skóre 2,209

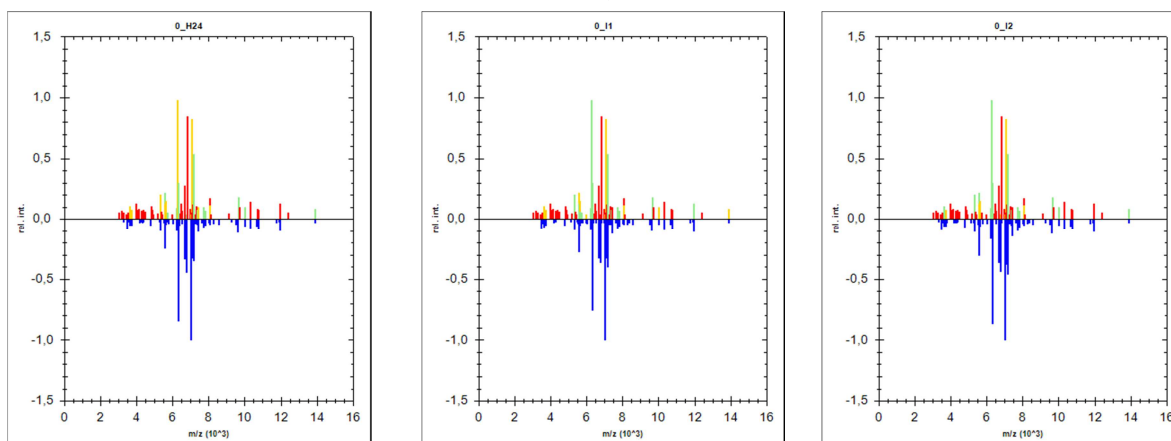


Obrázek 48 Srovnání EtOH SA:FA mezi Sabouraudův-Sabouraudův agar a YPD-YPD agar; kmen *Cr. laurentii* flavescens CCY 17-3-43 = 17-27-4 skóre 2,319

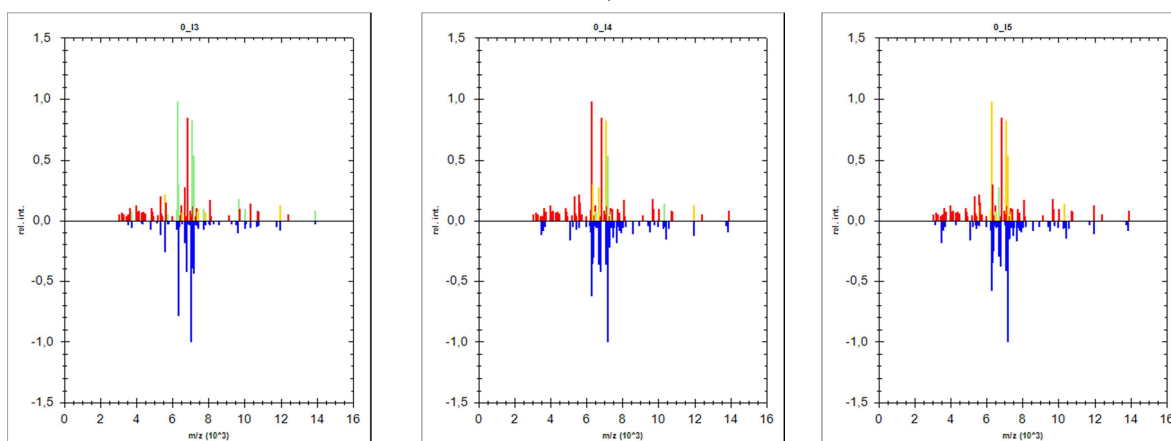
9.4 Srovnání všech kmenů s CCY 17-3-2 - YPD agar a metoda EtOH SA:FA



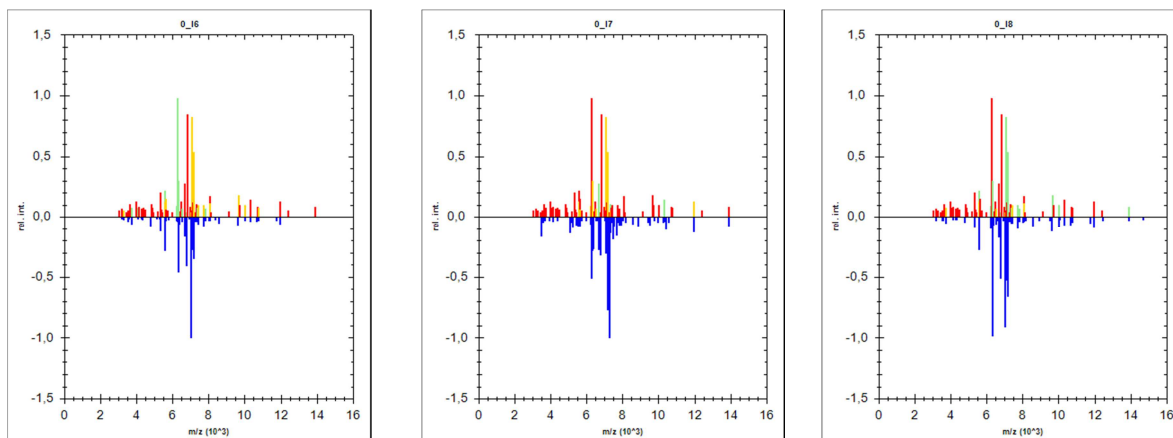
Obrázek 49 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-6 skóre 1,053; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-7 skóre 1,766; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-8 skóre 1,587



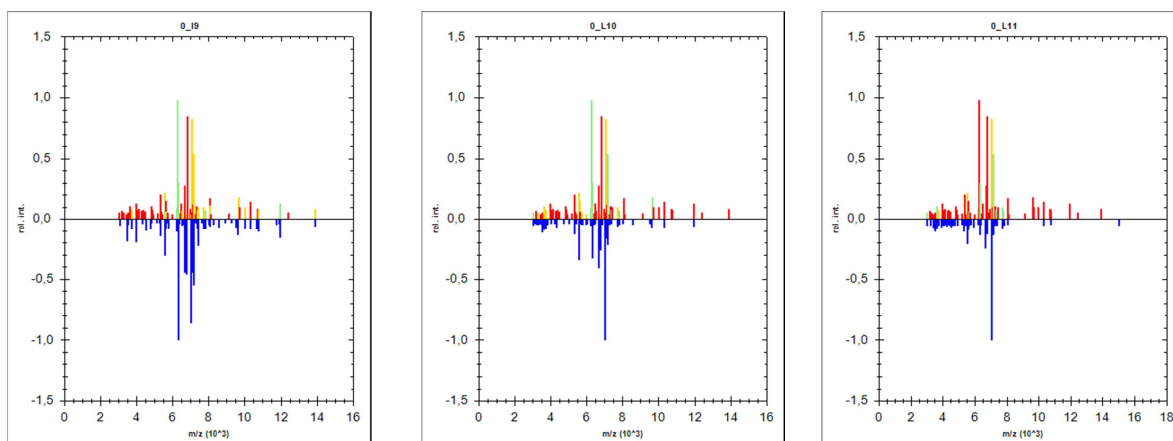
Obrázek 50 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-9 skóre 1,623; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-10 skóre 1,693; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-11 skóre 1,608



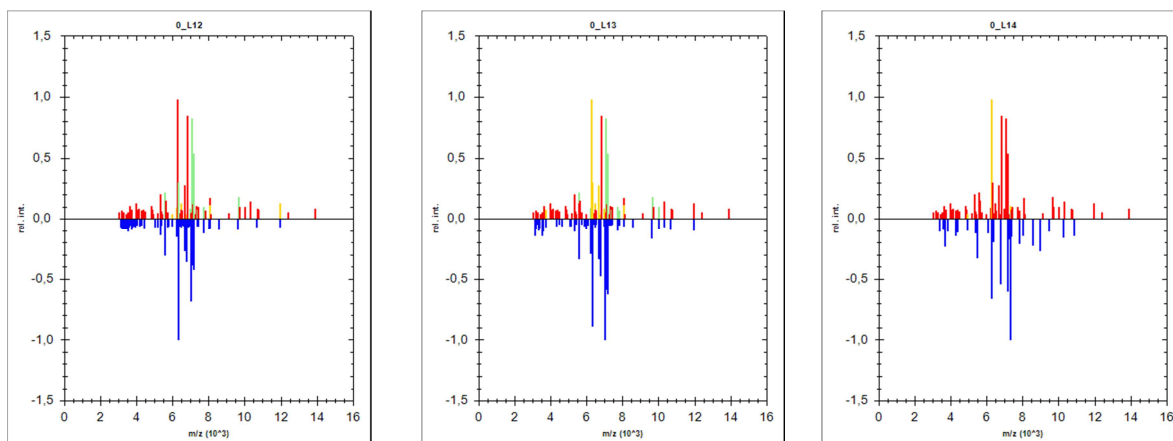
Obrázek 51 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-14 skóre 1,577; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-15 skóre 0,944; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-16 skóre 0,630



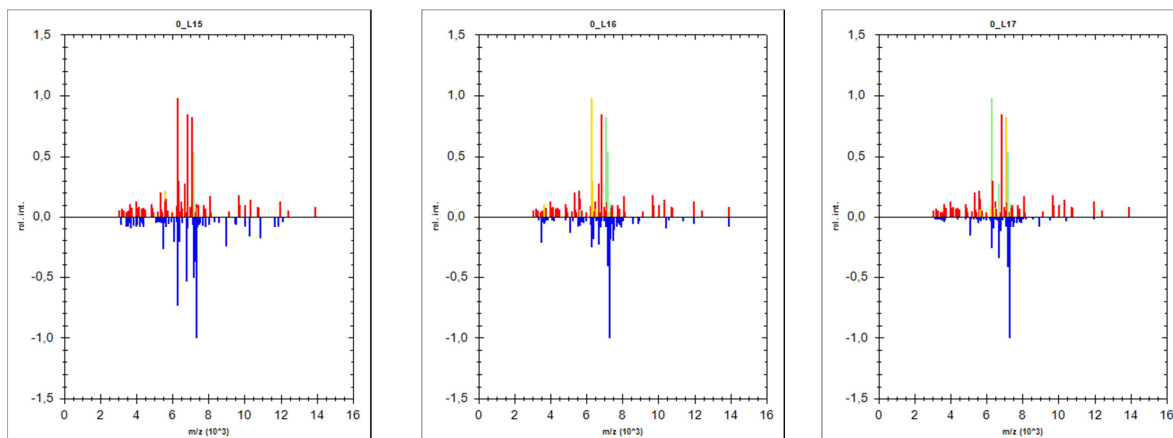
Obrázek 52 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-17 skóre 1,551; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-19 skóre 0,626; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-20 skóre 1,510



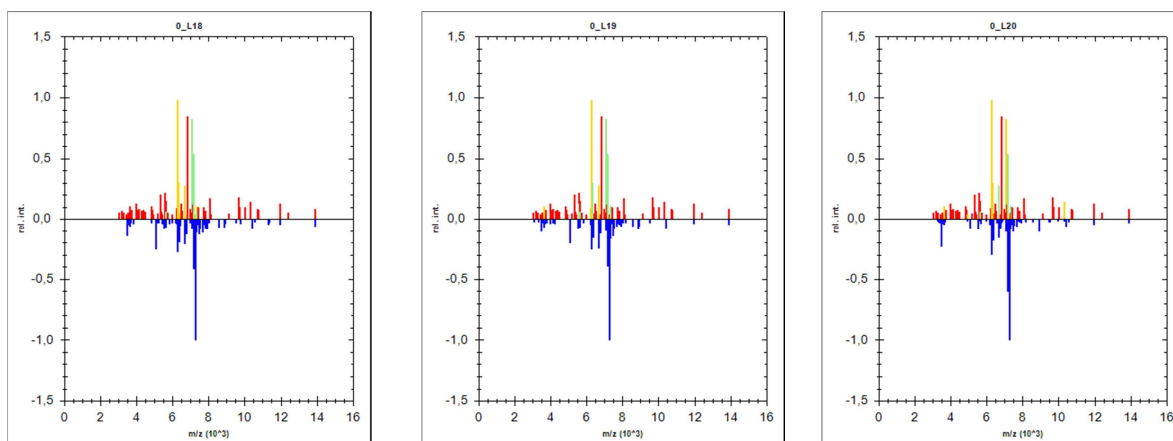
Obrázek 53 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-21 skóre 1,493; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-22 skóre 1,388; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-23 skóre 1,330



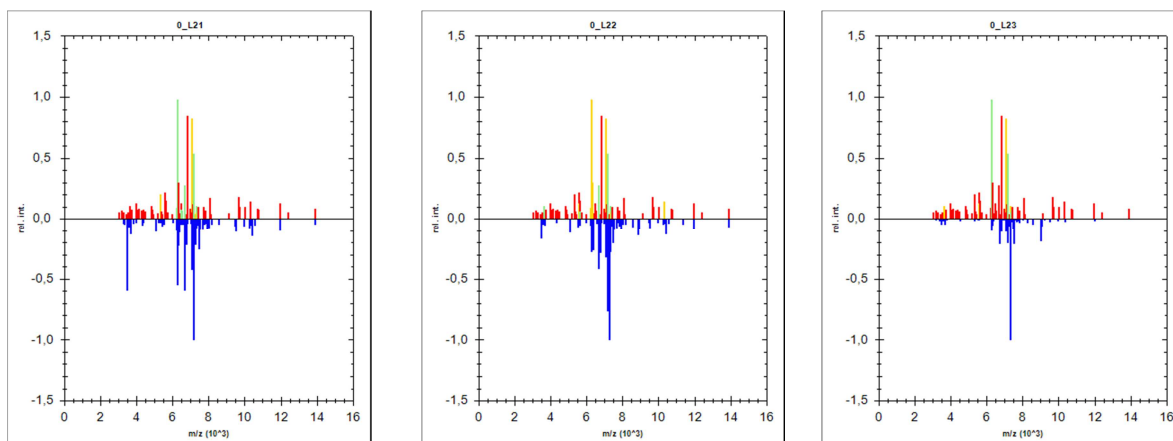
Obrázek 54 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-24 skóre 1,254; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-25 skóre 1,335; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-26 skóre < 0



Obrázek 55 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-27 skóre <0; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-29 skóre 0,852; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-31 skóre 0,818



Obrázek 56 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-32 skóre 0,919; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-33 skóre 1,016; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-34 skóre 0,909



Obrázek 57 Vlevo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-38 skóre 1,020; uprostřed srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-39 skóre 0,961; vpravo srovnání CCY 17-3-2 a CCY 17-3-43 = 17-27-4 skóre 0,001