

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Identifikace hub pomocí hmotnostní spektrometrie
MALDI TOF**

Bakalářská práce

Autor práce: Matouš Kotrbatý

Obor studia: Kvalita produkce

Vedoucí práce: Ing. Matěj Božik, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci „Identifikace hub pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF“ jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 7. 2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Matějovi Bozikovi, Ph.D. za ochotnou pomoc a trpělivost při vedení práce. Dále děkuji celé své rodině a kamarádce Kačce za podporu při studiu.

Identifikace hub pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF

Souhrn

Práce se zabývala metodou MALDI TOF, kterou lze využít k identifikaci mykromycet, a přinesla její srovnání s ostatními metodami využívanými v laboratořích. K rozšíření povědomí o vlastnostech hub napomáhají laboratorní diagnostiky, které jsou založeny na rozpoznání a následném určení houby s důrazem na přesnost metody a její citlivost. Důležitou vlastností je i rychlost a spolehlivost diagnostiky. V laboratořích jsou využívány rozdílné metody založené na makroskopickém a mikroskopickém vzhladu. U makromycet nejčastěji probíhá identifikace založená na vnějším vzhladu, nicméně u mikromycet, jako jsou vláknité houby, plísňe nebo kvasinky, by rozpoznání druhu houby na základně vnějšího vzhladu bylo obtížné ba dokonce nemožné. Z těchto důvodů se v laboratorních podmínkách využívá moderních molekulárně-biologických metod. Mezi nejvíce využívané patří metoda PCR, která patří mezi ty rychleji proveditelné. Zatím nejkratší čas vyhodnocení vzorku má MALDI TOF. Metody FISH a NASBA patří již spíše mezi metody zastaralé.

Metoda MALDI-TOF MS funguje na principu tzv. měkké ionizace. Jedná se o stále se rozvíjející metodu. Pomocí MALDI TOF hmotnostní spektrometrie je možné identifikovat bakterie, kvasinky, mykobakterie, ale též lze i určit rod a druh vláknitých mikromycet. Vysoká výhoda této metody spočívá v tom, že je rychlá a vyžaduje nízkou pracnost.

Mezi často používané identifikační systémy pro vyhodnocování výsledků v laboratořích patří Biotyper, VITEK a SAMARIS.

Tato práce se dále zabývala základním představením hub a jejich využití člověkem, konkrétně v potravinářství a lékařství. Tato odvětví nejsou stále zcela prozkoumána, proto je zapotřebí neustálé podpory vědy a výzkumu. Člověk se již od minulosti zabýval tím, co může zapojit do svého jídelníčku. Postupným vývojem a rozvojem vědy a techniky, zjistil, že i malé organismy mohou mít prospěšný vliv na zdraví člověka.

Klíčová slova: MALDI TOF MS, Biotyper, Vitek MS, kvasinky, plísňe

Fungus identification by mass spectrometry MALDI TOF

Summary

The thesis dealt with the MALDI TOF method, which can be used to identify mykromycetes and brought its comparison with other methods used in laboratories. Laboratory diagnostics, which are based on the recognition and subsequent identification of the fungus with an accuracy of its sensitivity, help to increase awareness of the properties of fungi. An important feature is the speed and reliability of diagnostics. The laboratories use advantageous methodological procedures on macroscopic and microscopic appearance. In the case of macromycetes, identification based on appearance is most common, however, in the case of micromycetes such as fibrous fungi, moulds, or yeasts, it would be difficult or even impossible to recognize the type of fungus on the basis of appearance. For these reasons, modern molecular biological methods are used in laboratory conditions. One of the most widely used is the still widely used PCR method, which is one of the faster ones. Therefore far, MALDI TOF has the shortest sample evaluation time. FISH and NASBA methods are already among the obsolete methods.

The MALDI-TOF MS method works on the principle of so-called soft ionization. This is an ever-evolving method. Using MALDI TOF mass spectrometry, it is possible to identify bacteria, yeast, mycobacteria, but it is also possible to determine the genus and species of fibrous micromycetes. The high advantage of this method is that it is fast and requires low labor.

Among the frequently used identification systems, Biotyper, VITEK and SAMARIS are used in the laboratories to evaluate the results.

This thesis also dealt with the basic introduction of mushrooms and their use by humans, specifically in food and medicine. These sectors are still not fully explored, so support for science and research is welcome. From the past, man has been concerned with what he can include in his menu. Through the gradual development and advancement of science and technology, he found that even small organisms can have a beneficial effect on human health.

Keywords: MALDI TOF MS, Biotyper, Vitek MS, yeast, mold

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍL PRÁCE	9
3	HOUBY	10
3.1	STRUKTURA HUB	11
3.2	KLASIFIKACE POTRAVINÁŘSKÝ A LÉKAŘSKY VÝZNAMNÝCH HUB	11
3.2.1	<i>Houby spájkivé (Zygomycetes)</i>	11
3.2.1.1	Rod <i>Mucor</i>	12
3.2.1.2	Rod <i>Rhizopus</i>	13
3.2.2	<i>Vyšší houby</i>	13
3.2.2.1	Vřeckovýtusné houby (<i>Ascomycota</i>)	14
3.2.2.2	Rod <i>Aspergillus</i>	14
3.2.2.3	Rod <i>Penicillium</i>	15
3.2.2.4	Stopkovýtusné houby (<i>Basidiomycota</i>)	16
3.2.2.5	Kvasinky	16
3.2.3	<i>Houby nedokonalé (Fungi Imperfecti)</i>	17
3.2.3.1	Rod <i>Fusarium</i>	17
3.3	VLIV HUB NA ZDRAVÍ ČLOVĚKA A JEJICH VYUŽITÍ V POTRAVINÁŘSTVÍ	18
3.3.1	<i>Kombucha</i>	18
3.3.2	<i>Sýry Camembert a Brie</i>	19
3.3.3	<i>Hlíva ústřičná</i>	20
3.3.4	<i>Lanýž černý</i>	20
4	ANALYTICKÉ METODY	21
4.1	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE MALDI TOF	21
4.1.1	<i>Historie MALDI TOF MS</i>	21
4.1.2	<i>Princip MALDI TOF MS</i>	22
4.1.3	<i>Kultivace</i>	23
4.1.4	<i>Extrakce</i>	23
4.1.5	<i>Techniky přípravy vzorků</i>	23
4.1.5.1	Dried – Droplet	23
4.1.5.2	Rychlá krystalizace	24
4.1.5.3	Spin coating	24
4.1.5.4	Layer-by-layer	25
4.1.5.5	Nanesení vzorku elektrosprejem	25
4.1.6	<i>Matrice</i>	26
4.1.7	<i>Ionizace</i>	27
4.1.8	<i>Systémy pro identifikaci mikroorganismů</i>	27
4.1.8.1	Biotyper	27
4.1.8.2	VITEK MS	28
4.1.8.3	SARAMIS	28
4.1.9	<i>Provozní cena MALDI TOF</i>	29
4.1.10	<i>Výhody MALDI TOF MS</i>	29
4.1.11	<i>Nevýhody MALDI TOF MS</i>	30
4.2	DALŠÍ IDENTIFIKAČNÍ METODY	30
4.2.1	<i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	30
4.2.1.1	<i>Výhody PCR</i>	30

4.2.1.2	Nevýhody PCR.....	30
4.2.2	<i>NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)</i>	30
4.2.2.1	Výhody NASBA.....	31
4.2.2.2	Nevýhody NASBA.....	31
4.2.3	<i>FISH (fluorescence in situ hybridization)</i>	31
4.2.3.1	Výhody FISH.....	31
4.2.3.2	Nevýhody FISH.....	31
5	ZÁVĚR	33
6	LITERATURA	34

1 Úvod

Na Zemi roste přibližně 120 000 známých druhů hub, jejichž využití člověkem je intenzivní ve všech možných odvětvích průmyslu. Tato práce se zaměřuje na význam hub ve zdravotnictví, kde například díky objevení penicilínu prodělalo lékařství ohromný skok dopředu.

Dále lze uplatnit využití hub v potravinářském průmyslu. V České republice se sbírání hub považuje za významnou tradici a tím pádem jsou houby považovány za jeden z hlavních pilířů české kuchyně.

K využití vlastností hub na plno napomáhají laboratorní diagnostiky hub, které jsou založeny na detekci a následné identifikaci houby s důrazem na citlivost a přesnost metody.

V poslední řadě je důležitou vlastností i rychlost a spolehlivost diagnostiky. V laboratořích se nejčastěji využívá různých metod založených na makroskopickém a mikroskopickém vzhledu. Makromycety se většinou určují podle vnějšího vzhledu (fenotypu), avšak u mikromycety, jako jsou vláknité houby, plísňe nebo kvasinky, bývá rozpoznání druhu na základě vnějšího vzhledu obtížné a zdlouhavé. Z těchto důvodů se v laboratorních podmínkách využívá moderních molekulárně-biologických metod. Některé metody analyzují mikrobiální genom, jako jsou PCR (polymerázová řetězová reakce), FISH (fluorescenční hybridizace in situ), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), a jiné zas proteom, pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy proteinových map (MALDI TOF – Matrix Assisted Laser Desorption /Ionisation – Time of Flight).

Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF je analytická metoda, která dokáže rychle a přesně identifikovat neznámý vzorek houby. Zprvu byla určena na identifikaci bakterií ale dnes lze pomocí této metody určit i druh u vláknitých hub.

2 Cíl práce

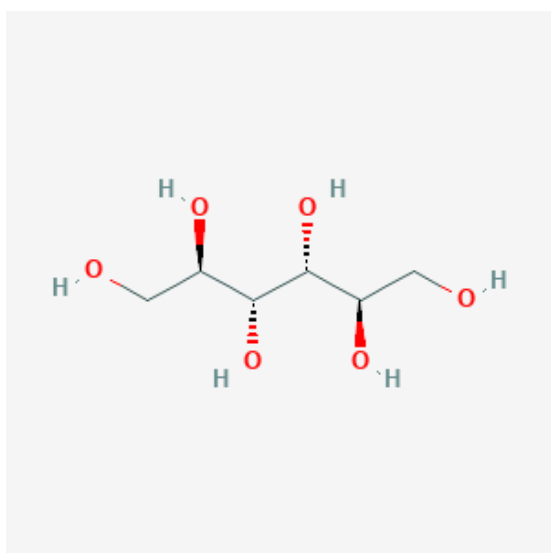
Cílem bakalářské práce je vypracovat literární rešerši zaměřenou na identifikaci hub pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF s důrazem na porovnání této metody s jinými způsoby identifikace, zejména průmyslově využívaných jedlých a léčivých hub. Jelikož mají houby významnou roli v lékařství a potravinářství, je dalším cílem práce zaměření na nejvyužívanější a nejčastější rody hub.

3 Houby

Houby jsou rozšířené nefotosyntetické mikroorganismy, které hrají zásadní roli v životním prostředí, zejména v biodegradaci organického materiálu. Studium jejich metabolitů a metabolismu velmi přispělo k celkovému vývoji chemie.

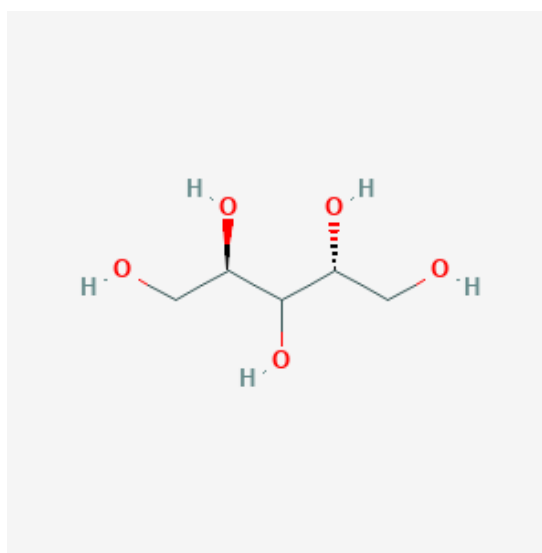
Jelikož houby nemají chlorofyl, nejsou fotosyntetickými organismy jako rostliny. Získávají své živiny rozkladem rostlin a jiných organismů. Jedná se tedy o heterotrofní organismy, které přijímají živiny štěpením substrátu na menší části vylučováním hydrolytických enzymů. Houby se liší od rostlin i v transportních a zásobních látkách. Hlavními transportními látkami v rostlinách jsou glukóza, sacharóza a fruktóza. Zásobní látkou je pak škrob. U hub se však sacharidy transportují ve formě cukerných alkoholů (manitolu a arabitolu, jejichž chemický vzorec je vyobrazen na obrázcích 1 a 2), zásobními látkami jsou glykogen a tuky (Jablonský & Šašek 2006; Hanson 2008).

Obr. č. 1: Chemický vzorec manitolu



<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6251#section=2D-Structure>

Obr. č. 2: Chemický vzorec arabitolu



<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/94154#section=2D-Structure>

Houby jsou eukaryotické organismy se zřetelným jádrem, na rozdíl od bakterií, které jsou prokaryotické. Kvasinky se považují za jednobuněčnou formu houby. Některé houby rostou v symbiotickém vztahu s fotosyntetickými řasami nebo sinicemi ve formě lišejníků. Některé napadají rostliny, hmyz a savce jako patogeny, zatímco jiné jsou saprofytické a rostou na neživém materiálu. Některé žijí v pozitivním symbiotickém vztahu s hostitelským organismem, ale existují i mykorrhizní houby, které jsou spojeny s kořeny rostlin a usnadňují si příjem živin rostlinou. Jiné jsou endofytické organismy, které rostou ve vaskulárním systému rostliny.

Chemie hub ovlivňuje mnoho aspektů našeho každodenního života, ať už jde o roli kvasinek při výrobě chleba a vína, jedlých hub nebo při výrobě antibiotik, jako je například penicilin. Plísněvé onemocnění plodin, okrasných rostlin a stromů a hnití skladovaných potravin jsou vážnými ekonomickými problémy.

Mikrobiologie se zajímá o strukturu, chemii a biologickou aktivitu fungálních metabolitů. Biosyntéza těchto metabolitů, jejich sekvence, stereochemie a mechanismus jednotlivých kroků, spolu se strukturou a regulací zúčastněných enzymů, je hlavní oblastí výzkumu.

Existuje celá řada odhadů a výzkumů na počty všech druhů hub na Zemi. Tyto rozsahy se pohybují od 100 000 do 250 000. Kromě toho často existují různé kmeny stejného druhu. I když mohou být morfologicky podobné, jejich metabolity mohou být rozmanité. Chemie organismu se také může lišit podle podmínek, za kterých je pěstován a zkoumán. Není tedy překvapivé, že některé druhy hub hospodářského významu, např. *Penicillium chrysogenum* vyvolaly obrovský zájem o jejich produkci a zároveň způsobily i rozvoj ve farmaceutickém oboru. Díky tomuto rozmachu se mnoho vědců zasloužilo za záchranu mnoha lidských životů hlavně během 2. světové války (Jablonský & Šašek 2006; Hanson, 2008).

3.1 Struktura hub

Základními strukturálními jednotkami většiny hub jsou vlákna známá jako hyfy, které se mohou agregovat do formy plsti – mycelia. U vyšších hub se hyfy shlukují do dlouhých pramenů a mohou vytvořit strukturu krajky, která je známá jako rizomorf.

Vyšší houby, houby a muchomůrky vytvářejí komplexní a snadno pozorovatelné struktury známé jako plodnice. Vyrážejí z jejich mycelia a produkují spory. Ty jsou oproti některým sporám jednobuněčným mikrohub (např. kvasinek) větší. Kvasinky produkují malé kulovité nebo elipsoidní buňky, jež jsou viditelné pouze pod mikroskopem (Hanson 2008).

3.2 Klasifikace potravinářský a lékařsky významných hub

V obecné klasifikaci jsou houby seskupeny podle následujících řad: dělení, třída, řád, rodina, kmen, rod, sekce a druh. Struktura reprodukčních orgánů a mechanismy reprodukce tvoří základ klasifikace hub. Tyto organismy mohou být široce seskupeny následujícím způsobem (Hanson 2008).

3.2.1 Houby spájkivé (*Zygomycetes*)

První skupinou hub jsou houby spájkivé neboli *Zygomycetes*. Houby spájkivé jsou vláknité, neflagelované houby, které mají jednoduché rostlinné tělo zvané thallus. V této části houby jsou uchovávány spory. Thallus tvoří jednobuněčné aseptované hyfy. Některé zygomycety významně prospějí lidem produkcí sloučenin, jako je lykopen, mastné kyseliny a bionafta, ale mohou způsobovat i smrtelná lidská onemocnění, jako je zygomykosa.

Typickými příklady jsou *Peronosporales*, které zahrnují rostlinné patogeny, jako jsou druhy *Pythium* a *Phytophthora* a *Mucorales*, které zahrnují běžné druhy *Mucor*, *Phycomyces* a *Rhizopus*. *Rhizopus* způsobuje ekonomicky významné nemoci ovoce před i po sklizni (Spatafora et al. 2016).

3.2.1.1 Rod *Mucor*

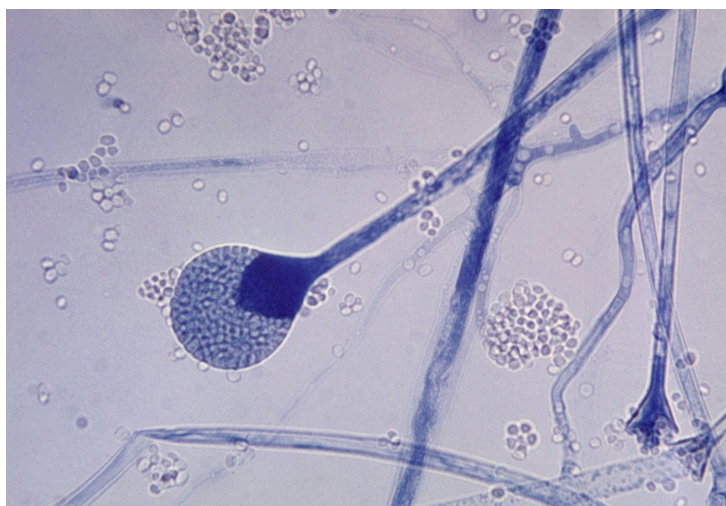
Rod *Mucor* je zařazován mezi vláknité mikromycety, též nazývané jako pravé plísně. Jeho fotografie, jenž je pořízena mikroskopem, je vyobrazena na obrázku č. 3. *Mucor* je vláknitá houba nacházející se hlavně v půdě, na rostlinách a na hnilícím se ovoci a zelenině. *Mucor spp.* se vyskytuje běžně v přírodě a je to i častý laboratorní kontaminant. Může způsobovat infekce u člověka, žab, obojživelníků, skotu a prasat.

Kolonie rodu *Mucor* rostou nejrychleji při 25 – 30 °C a pokrývají povrch živného povlaku. Nadýchaný vzhled s výškou několika cm připomíná cukrovou vatu. Ze začátku je barva bílá a časem se stává šedavě hnědou. *Mucor indicus* může růst při teplotách až 40 °C. *Mucor racemosus* a *Mucor ramosissimus* rostou špatně nebo vůbec pouze do teploty 37 °C (Fungus 2000)

Členové rodu *Mucor* jsou saprotrofytické houby, které se vyskytují všudypřítomně v životního prostředí, jako je půda, vzduch a prach.

Některé druhy *Mucor* produkují enzymy, jako jsou lipázy nebo proteázy, které zlepšují strukturu, chuť a nutriční kvalitu sýrů. Druhy *Mucor* mohou být také použity při fermentaci potravin, zejména fermentovaných asijských potravin, jako je sufu, ragi a mureha, a ve zrajících sýrech. Ve studii (Barrios et al. 1998) byla analyzována plísňová rozmanitost zrajících plísni, u 52 sýrů a *Mucor* byl po *Penicillium* hlášen jako druhý nejvýznamnější rod. *Mucor spp.* se používají zejména jako kultury zrání pro výrobu nevařených tvrdých sýrů, včetně Saint Nectaire, Tomme de Savoie a Taleggio. Mohou také odpovídat za organoleptické vady ve vyráběných potravinách, jako jsou mléčné výrobky nebo příze. Například tzv. „Vady kočičích vlasů“ mohou být pozorované na měkkých sýrech (Hermet et al. 2012).

Obr. č. 3: Mikroskopický snímek houby z rodu *Mucor*



https://cs.wikipedia.org/wiki/Houby_sp%C3%A1jiv%C3%A9#/media/Soubor:Mature_sporangium_of_a_Mucor_sp._fungus.jpg

3.2.1.2 Rod *Rhizopus*

Rod *Rhizopus* (viz obr. č. 4) patří mezi *Mucorales*, který zahrnuje mnoho organismů, často používaných pro fermentaci potravin, zejména ve východní a jihovýchodní Asii (Abe et al. 2014).

Jedná se o velmi rychle rostoucí a rozšiřující se druh plísní, který má bílé mycelium a černé sporangie. Druhy *Rhizopus* tvoří rhizoidy na bázi sporangioforů a columell ve sporangiu. Mladé sporangie jsou bílé, které postupem času ztmavnou. Tento rod je saprofyt a nejčastěji jej nalezneme na mrtvých organismech nebo v půdě, kde pomáhá právě s rozkladem organického materiálu (Bullerman 2003; Lennartsson et al. 2014).

Používá se zejména pro fermentaci luštěnin a obilnin do tradičního tempehu či sójové omáčky (Feng et al. 2005).

Obr. č. 4: Snímek houby z rodu *Rhizopus*



<https://www.flickr.com/photos/superegnum/36754554130>

3.2.2 Vyšší houby

Druhou skupinou jsou vyšší houby (makromycety), které mají septované hyfy a ty lze rozdělit na vřecovýtrusné (*Ascomycota*) a stopkovýtrusné (*Basidiomycota*). V *Ascomycota* jsou spory nesené ve vakovité struktuře známé jako vřecko (ascus). Ve vřecku dochází k meióze a vznikají ascospory. Tento druh plodu se vyskytuje například u druhů *Monascus*. Příkladem je houba *Monascus ruber*, která produkuje červenou barvu v čínské červené rýži. Rod *Penicillium* a *Aspergillus* patří též do třídy *Ascomycota*. Vyšší houby, které mají spory drženy v hruškovitém periteciu patří do třídy známé jako *Pyrenomycetes*. Členy této skupiny jsou také saprofytiční rostlinní paraziti rodu *Hypocreales*. Některé z nejznámějších vyšších hub jsou *Basidiomycota*, u kterých jsou spory nesené basidiích (Hanson 2008).

3.2.2.1 Vřeckovýtrusné houby (*Ascomycota*)

Ascomycetes jsou největší skupinou pravých hub. Většina z nich je saprofytická a žije na mrtvém organickém materiálu, který pomáhá rozkládat. Ascomycetes však také způsobují choroby rostlin, od plísní přes hniloby až po rakovinu a cévní vady (Viebahn et al. 2005). Mezi vřeckovýtrusné houby patří například smrž kuželovitý (*Morchella conica*) (viz obr. č. 5), který se v lesích hojně vyskytuje.

Obr. č. 5: smrž kuželovitý z kmenu Ascomycota



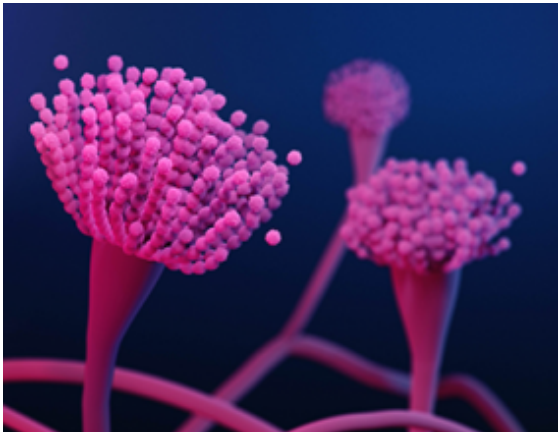
<https://houby.naturatlas.cz/smrz-kuzelovity>

3.2.2.2 Rod Aspergillus

Rod Aspergillus byl poprvé popsán italským biologem Pietrem Michelem v roce 1729 v italské Florencii. Zbarvení kolonií je jedním ze základních rozlišovacích znaků různých druhů. Barva se většinou pohybuje od zelené, žluté, hnědé, bílé, černé až po lehkou šedou. Tento druh se rozmnožuje pouze asexuálně. Spory jsou roznášeny vzduchem na krátké i dlouhé vzdálenosti a pokud najdou vhodný substrát, začnou klíčit. Ideální živná půda představuje optimální teplotu v širokém rozmezí mezi 6 – 55 °C s vlhkostí již od 7 % (Krijgsheld et al. 2013).

Vyskytují se na spoustě substrátů, tím pádem hojně ovlivňují život zvířat a lidí. Pokud se rod Aspergillus objeví v zemědělském systému, dokáže napáchat velmi vysoké ekonomické ztráty. Napadá rostliny jak na poli, tak i následně plodiny po sklizni ve skladovacích halách. Pokud se neřeší jeho odstranění, začnou se tvořit nebezpečné mykotoxiny, které jsou zdravotně nebezpečné pro člověka, ale i pro zvířata (Baker & Bennett 2007; Visagie & Houbraken 2020) Tento rod se mnohdy nachází na špatně uskladněných potravinách, jako je například kukuřice, chléb, rýže, pšenice, oves, čirok, ořechy (arašidy, pistácie, vlašské) či sója (Malíř & Ostrý 2003). Na obrázku č. 6 je vyobrazen mikroskopický snímek rodu Aspergillus.

Obr. č. 6: Snímek zástupce z rodu *Aspergillus*



<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/aspergillosis/definition.html>

3.2.2.3 Rod *Penicillium*

Druhy rodu *Penicillium* se hojně vyskytují ve většině rozpadajících se organismech, čímž tvoří běžnou součást našeho ekosystému, a jsou často označovány jako „modrá“ nebo „zelená“ plíseň. Optimální teplota pro jejich růst je mezi 5 – 37°C. Zástupci tohoto početného rodu mají ekologický význam, protože jsou široce rozšířeni v životním prostředí; jsou znehodnocovači ovoce a významně přispívají ke snížení posklizňové hnití. Houby u rodu *Penicillium* hojně využívají v potravinářském průmyslu, například při výrobě sýrů typu Camembert. Produkují ale i sekundární metabolity a nebezpečné mykotoxiny, proto by se měla hlídat jejich koncentrace a v případě objevení nežádoucích plísní na potravinách, je zlikvidovat. Rod *Penicillium* má i další jedno užitečné využití, a to při výrobě antibiotik, konkrétně Penicilinu (Schutte 1992).

Název *Penicillium* je odvozen od slova penicillus, což v českém překladu znamená malý štětec, proto někdy tento rod můžeme najít pod názvem štětičkovec (Houbraken & Samson 2011). Na obr. č. 7 je vyobrazen *Penicillium* spp.

Obr. č. 7: Mikroskopický snímek *Penicillium* spp



<https://www.sciencephoto.com/media/904543/view/penicillium-fungus-illustration>

3.2.2.4 Stopkovýtrusné houby (*Basidiomycota*)

Basidiomycota zahrnuje asi 35 000 druhů. Skutečný počet druhů na světě je však pravděpodobně mnohem vyšší. U stopkovýtrusných hub jsou spory nesený ve zvláštních plodových tělech – basidiích (Hanson 2008). Výsledné spory (bazidiospory) jsou, na rozdíl od vřeckovýtrusných hub, produkovány mimo buňku. (Hermet et al. 2012). Mnoho druhů rodu *Basidiomycota*, zejména třída *Agaricomycetes*, produkuje jedlé plodnice, které jsou jedním z hlavních zdrojů potravy člověka již od rané lidské civilizace. Vzhledem k tomu, že jedlé druhy jsou často zaměňovány s morfologicky podobnými a jedovatými houbami, může konzumace těchto druhů vést k úmrtím (Sandargo et al. 2019). Na obrázku č. 8 je vyobrazena muchomůrka červená (*Amanita muscaria*), která spadá do kategorie nejedlých hub.

Obr. č. 8: Muchomůrka červená z oddělení hub *Basidiomycota*



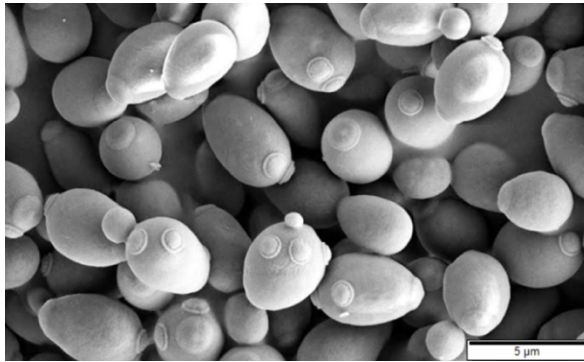
<https://avopix.com/photo/14494-agaric-basidiomycete-fungus>

3.2.2.5 Kvasinky

Saccharomyces je zástupcem askosporogenních kvasinek a historicky je nejznámějším mikroorganismem pro člověka. Tento rod poprvé popsal Meyen, když v roce 1838 popsal pивní kvasinky jako *Saccharomyces cerevisiae*. Název *Saccharomyces* je odvozen od řeckých slov sakcharon (cukr) a mykes (houba) (Stewart 2014).

Biotechnologická užitečnost *Saccharomyces cerevisiae* spočívá v jejich jedinečných biologických vlastnostech, tj. v jejich fermentační kapacitě, doprovázené produkcí alkoholu a CO₂ a jejich odolností vůči nepříznivým podmínkám osmolarity a nízkého pH. Mezi nejvýznamnější aplikace týkající se použití *Saccharomyces cerevisiae* patří využití v potravinářském, nápojovém průmyslu, zejména v odvětví výroby vína, kombuchy, kimchi a pekárenských výrobků (Parapouli et al. 2020). Na obrázku č. 9 je vyobrazen mikroskopický snímek kvasinek.

Obr. č. 9: Mikroskopický snímek kvasinky *Saccharomyces cer.*



https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae#/media/File:Saccharomyces_cerevisiae_SEM.jpg

3.2.3 Houby nedokonalé (*Fungi Imperfecti*)

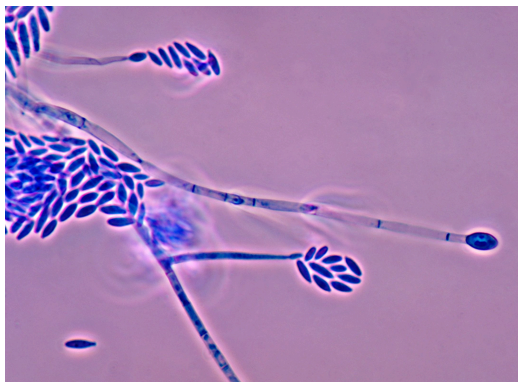
Poslední velkou skupinou jsou houby nedokonalé. U těchto organismů je dokonalé (generativní = pohlavní) stádium reprodukce vzácné nebo neznámé a z velké části se rozmnožují nepohlavně. K rozmnožování využívají konidie, které vznikají na hyfách, zvané konidiofory. Rod *Fusarium* je z nich nejznámější. Toto rozdělení však může být matoucí, protože některé houby původně klasifikované jako *Fungi Imperfecti*, mají jak asexuální nedokonalou fázi, tak fázi dokonalou. (Hanson 2008).

3.2.3.1 Rod *Fusarium*

Rod *Fusarium* je hojně se vyskytující houba, která se živí jako saprofyt na rozpadajících se rostlinách nebo jako parazit na většině částech rostliny. Jelikož napadají i semena a plody rostlin, mají často ekonomický dopad na nižší výnosy sklizně (Christensen 1975).

Často parazituje pouze na rostlinách, ale najdou se i zástupci tohoto rodu, kteří mohou být i cizopasníky zvířat, dokonce i člověka. U člověka způsobují mykózy. Při jejich neléčení se mohou přeměnit v cysty nebo i abscesy (Malíř & Ostrý 2003). Na obrázku č. 10 je vyobrazen zástupce rodu *Fusarium*, konkrétně *Fusarium verticillioides*.

Obr. č. 10: Mikroskopický snímek zástupce z rodu *Fusarium*



https://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium#/media/File:Fusarium_verticillioides_01.jpg

3.3 Vliv hub na zdraví člověka a jejich využití v potravinářství

Houby měly, ale i stále mají důležitý význam v lidské historii. Jako potrava, součást náboženství, léčitelství, rituálů, ale v mnoha kulturách i jako zbraň, díky svým jedovatým vlastnostem.

K léčebným účelům se využívají jak sušené, tak i čerstvé houby. Nejvíce měly využití ve staré Číně, kde se nejčastěji využívaly houby Shiitake, hlíva ústříčná, ucho Jidášovo nebo václavka.

Velmi důležitý ekonomický význam mají preparáty získané z hub, které se používají jako léky. Mezi ně patří lentinan, schizophyllan a krestin. Vysoce purifikovaný polysacharid lentinan je izolován z houby Shiitake a je využíván zejména díky svým protinádorovým účinkům. Lentinan nepůsobí na samotné nádory přímo, ale dokáže zaktivovat u pacientů s rakovinou různé imunitní odpovědi. Proto se využívá zejména jako podpora při chemoterapiích. Krestin se využívá v dosti obdobných situacích, akorát je tento polysaccharidovo–proteinový komplex získán z outkovky pestré. Stejně tomu tak i je u klanolistiky obecné, ze které se získává schizophyllan (Jablonský & Šašek 2006).

3.3.1 Kombucha

Kombucha je nápoj vyráběný tradičně osvědčenou fermentační technikou zahrnující fermentaci černého čaje rozpuštěného v cukru symbiotickou kulturou bakterií a kvasinek (SCOBY, symbiotic culture of bacteria and yeast). Tato zvonkovitá celulózová houba SCOBY se nazývá „čajová houba“. Právě na obrázku č. 11 je vyobrazena vyfermentovaná kombucha společně s SCOBY, která tomuto nápoji napomohla vzniknout. Tento čerstvý kvašený nápoj chutná jako čerstvý jablečný mošt.

Obr. č. 11: Kombucha a SCOBY



<https://vsezaodvoz.cz/inzerat/160885/kombucha-k-pestovani>

Mezi hlavní bakteriální rody identifikované tradiční SCOBY patří *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter aceti* a *Acetobacter pasteurianus*. Kvasinky, jmenovitě *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces lambicus*, *Candida* a *Pichia*. Druhy *Acetobacter*

údajně tvoří celulóзовou síť, která je fyzikální základnu pro vývoj symbiózy. Kumulační kvašení cukru kvasinkami a bakteriálními druhy vede k tvorbě etanolu a kyselin, které jsou přírodními konzervačními činidly odpovědnými za dlouhou skladovatelnost fermentovaného nápoje (Dutta & Paul 2019).

Kromě toho je známo mnoho dalších biologicky aktivních složek podporujících zdraví, které se v průběhu fermentace vytvářejí v louhu. Ty právě zvyšují nutriční úroveň čajového nápoje.

O Kombuche se tvrdí, že má antibiotické vlastnosti, pozitivní cholesterolemické účinky, zlepšuje gastrointestinální a žlázoové funkce, zmírňuje revmatismus kloubů, a detoxikuje krev. Složení a její funkčnost si nedávno získala náležitou vědeckou a komerční popularitu a stala se tak populárním nápojem v současné společnosti (Dufresne & Farnworth 2000; Dutta & Paul 2019).

3.3.2 Sýry Camembert a Brie

Mezi speciální sýry, o které mají spotřebitelé velký zájem, patří zrající sýry povrchové formy Brie a Camembert. Sýry Brie a Camembert, které se nacházejí na obrázku č. 12, se v současnosti vyrábí pomocí plísně *Penicillium camemberti*. Inokulace plísní sýra se inkubují při nízkých teplotách a vysoké vlhkosti, tj. 10 – 15 °C a 80 – 95 % relativní vlhkosti. Tyto vhodné podmínky pro růst podporují proliferaci mycelií *Penicillium*, které prorostou sýr z jeho vnitřku na povrch během čtyř týdnů zrání. Růst plísně hraje jednu z hlavních rolí pro produkci typické textury sýrů a aromatických látek. Plíseň dozrávajících sýrů je zarostlá bakterií *Brevibacterium linens*, čímž se získá zažloutlá kůrka, výrazná a charakteristická sírová chuť a měkká textura (Karahadian et al. 1985).

Obr. č. 12: Sýry Camembert (vlevo) a Brie (vpravo)



<https://culturecheesemag.com/cheese-iq/cheese-showdown-brie-vs-camembert>

3.3.3 Hlíva ústříčná

Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*) patří do oddělení hub *Basidiomycota*. Je to jedlá houba s vynikající chutí, která roste na polenech nebo pařezech ve vrstvách nad sebou. Hlíva ústříčná (viz obr. č. 13) má vysoký obsah bílkovin a může obsahovat další složky, jako je vitamín B1 a B2, minerální látky, esenciální aminokyseliny a má i nízkou kalorickou hladinu, což z ní dělá velmi populární houbu pro lidi na dietách. Lovastatin izolován z hlívy, se používá v San Franciscu ke snížení „špatného“ cholesterolu (LDL) u hypercholesterolemických pacientů (Johnny & Okon 2013).

Obr. č. 14: Hlíva ústříčná



<https://houby.naturatlas.cz/hliva-ustricna>

3.3.4 Lanýž černý

Po celém světě je nejméně 180 druhů hlíz lanýžů, ale pouze asi 13 se jich komerčně využívá. Nejčastěji zpracovávanými lanýži jsou evropský lanýž černý (*Tuber melanosporum* Vittad.) a italský lanýž bílý (*Tuber magnatum* Pico) (Reyna & Garcia-Barreda 2014).

Lanýž černý (obrázek č. 14), je ektomykorhizní houba z oddělení hub *Ascomycota*. Jeho plodové tělo (sporocarp) se nachází v podzemí a je vysoce ceněné v mezinárodní kuchyni, díky své rafinované a všudypřítomné chuti. Současná produkce černých lanýžů pochází téměř výhradně z Francie, Španělska, Itálie a Austrálie. Tyto země tvoří většinu celosvětové přírodní oblasti distribuce černých lanýžů (Reyna & García-Barreda 2008).

V současné době je pěstování lanýžů odvětvím s několika milionovým obratem ve Francii, Itálii, Španělsku a Austrálii. V prvních třech zemích se lanýže sklízí nejen v osázených lanýžových sadech (pěstované lanýže), ale také v přírodních lesích (divoké lanýže). Hodnota produkce lanýže černého ve Francii se odhaduje na přibližně 20 milionů EUR ročně, 7,5 milionu EUR ve Španělsku a 4 miliony EUR v Austrálii (Reyna & Garcia-Barreda 2014).

Obr. č. 14: lanýž černý



<https://www.svetlanyzu.cz/co-je-lanyz/>

4 Analytické metody

U identifikace hub záleží na mnoha aspektech využívaných metod, jakou jsou rychlost a přesnost měření ale i finanční náročnost. Tradiční diagnostické metody hub jsou založeny na makroskopické a mikroskopickém vzhladu. Identifikační metody lze obecně rozdělit na rychlostní metody, které jsou ale méně přesné a slouží spíše k předběžné identifikaci. Přesnější výsledky pak vykazují specifické analýzy, které jsou i spolehlivější (Buchta et. al 2010). Tato kapitola se zaměřuje na hlavně na metodu MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation – Time of Flight) a na její porovnání s dalšími metodami, jakou jsou PCR (polymerázová řetězová reakce), FISH (fluorescenční hybridizace in situ), NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) (Patel 2015).

4.1 Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF

Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF je analytická metoda založena na ionizaci molekul vzorku, která generuje ionty. Ty se poté od sebe oddělí na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z) a nakonec jsou tyto ionty detekovány v detektoru. Touto hmotnostní spektrometrií lze identifikovat neznámý vzorek během několika minut.

Zprvu byla určena na analýzu bakterií. V posledních letech však došlo k rozmachu možností a způsobů aplikování této metody. MALDI TOF totiž představuje i spolehlivou alternativu pro rychlou identifikaci kvasinek, plísní a hub v klinickém prostředí. V budoucnu by se MALDI TOF mohl využívat na test citlivosti antibiotik. Díky kombinaci širokého využití a rychlosti určení vzorku se z MALDI TOFu stává populární diagnostická metoda po celém světě (Angeletti 2017; Lima & Santos 2017).

4.1.1 Historie MALDI TOF MS

Hmotnostní spektrometrie byla objevena na počátku 20. století, avšak její využití na poli vědy bylo omezeno převážně na chemické odvětví. V roce 1975 se MALDI TOF začal využívat pro rozbor bakterií, ačkoli tento způsob měl nedostatky, jelikož v té době nebylo možné analyzovat intaktní proteiny bez toho, aniž by nedošlo k jejich porušení během procesu. Tento

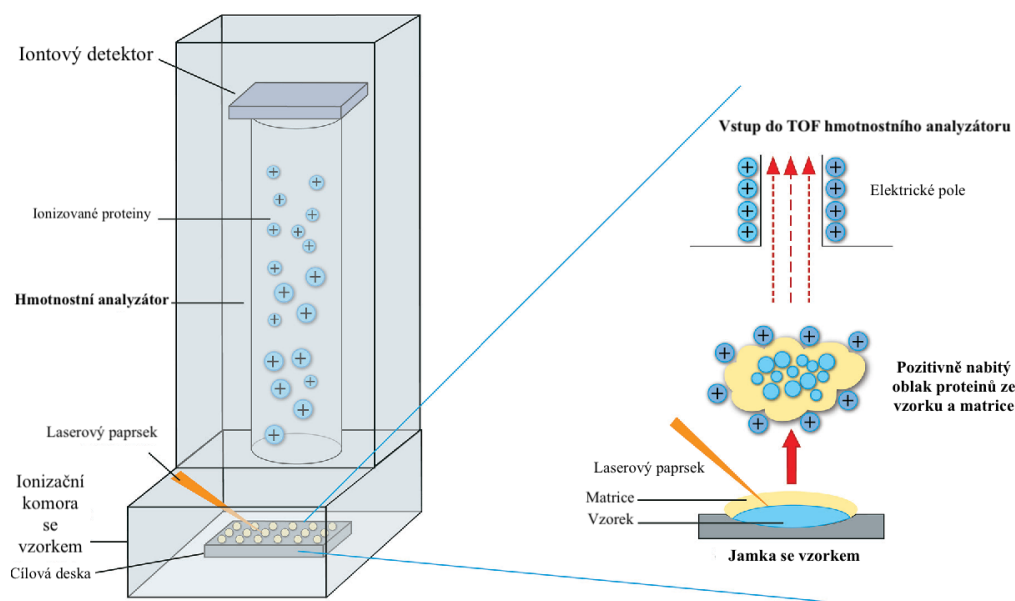
problém vyřešil vědec jménem Koichi Tanaka, který v roce 1985 popsal metodu „měkké desorpční ionizace“ s použitím ultra jemného kovového prášku a glycerolu. Tato metoda umožnila použití MS i na velké biologické molekuly jako jsou proteiny nebo peptidy. Základem je tedy „měkká desorpční ionizace“, u které nedochází k významné ztrátě integrity vzorku během tvorby iontu. Zhruba ve stejnou dobu Franz Hillenkamp a Michael Karas představili ionizaci měkké desorpce pomocí matrice organické sloučeniny. Díky velkému pokroku v oblasti informačních a výpočetních technologií bylo možné vytvoření databází spekter různých typů mikroorganismů, na jejichž základě se může MALDI-TOF MS využívat v rutinních laboratořích. K širšímu využití této hmotní spektrometrie napomáhá neustálá aktualizace těchto databází spekter (Patel 2015).

4.1.2 Princip MALDI TOF MS

Proces analýzy hmotnostní spektrometrie MALDI TOF, který je znázorněn na obrázku č. 15 probíhá ve dvou základních fázích. V první fázi – MALDI se musí vzorek připravit na analýzu tím, že se smíchá nebo pokryje matricí. Matrice je roztok organické sloučeniny, která absorbuje energii dodanou laserem. Poté se vzniklá matrice vysuší, tím dojde k její krystalizaci s analytem. Vzorek v matrici je ionizován laserovým paprskem a následná desorpce a ionizace generuje jednotlivé protonované ionty. Vyzářené protonované ionty se pak rovnoměrně zrychlují a na základě poměru hmotnosti ku náboji (m/z) se navzájem od sebe oddělují

Následuje druhá fáze – TOF ve které se měří poměr (m/z) iontu prostřednictvím stanovení času, který potřebuje k překonání celé délky letové trubice. Některé analyzátoři TOF mají na zadním konci letové trubice iontové zrcadlo, které slouží k odražení iontů zpět přes letovou trubici k detektoru. Tímto zrcadlem se nejen prodlužuje délka letové trubice, ale zároveň vyrovnává malé rozdíly mezi ionty. Na základě výsledků z TOFu je pro analyt ve vzorku generováno charakteristické spektrum zvané PMF (Peptide Mass Fingerprint) neboli peptidový hmotnostní otisk prstu (Singhal et. al 2015).

Obr. č. 15: Schéma metody MALDI TOF



(Patel 2015)

4.1.3 Kultivace

Kultivace je základní laboratorní technikou, která je využívána k detekci, izolaci a identifikaci hub. Kvasinky potřebují k dostatečnému nárůstu několik dnů a u vláknitých hub trvá délka kultivace 3–10 dní. Důležitým znakem, který napomáhá k určení druhu vláknitých mikromycet je sporulace. U většiny případů je doba potřebná k izolaci výrazně kratší než identifikace. Například u hub spájivých (*Zygomycetes*) trvá jejich kultivace 3–5 dní ale následné určení kmene zabere 7–14 dní (Buchta et al. 2010). K rychlejší identifikaci se tedy poté využívá metody MALDI – TOF. U hub je zapotřebí, kvůli jejich silné buněčné stěně, ještě jednoho kroku – extrakce.

4.1.4 Extrakce

U mikroorganismů, které je obtížné analyzovat, jako jsou např. vláknité houby, je zapotřebí před analýzou extrakce proteinu pomocí kyselých rozpouštědel (např. kyselina mravenčí). Buněčná stěna hub je primárně složena z polysacharidů (např. Chitin, beta-glukany, manany, galaktomanany), které se mohou lišit v závislosti na taxonomické skupině, a menší podíl proteinů, lipidů a polyfosfátů. Toto konkrétní složení, které se liší od složení stěn bakterií, částečně vysvětluje potřebu onoho kroku před analytickou extrakcí proteinu, která uvolní potřebné proteiny pro generování charakteristického spektra vzorku.

Pro kvasinky se používá „Technika přímé extrakce kolonií“, při které se mikroby přímo aplikují na tenký film na cílovém sklíčku. Vzorek se nechá vyschnout při pokojové teplotě, následuje přidání 1 μ l HCCA matrice na každé místo vzorku. Opět se před následnou analýzou MS nechá při pokojové teplotě vysušit.

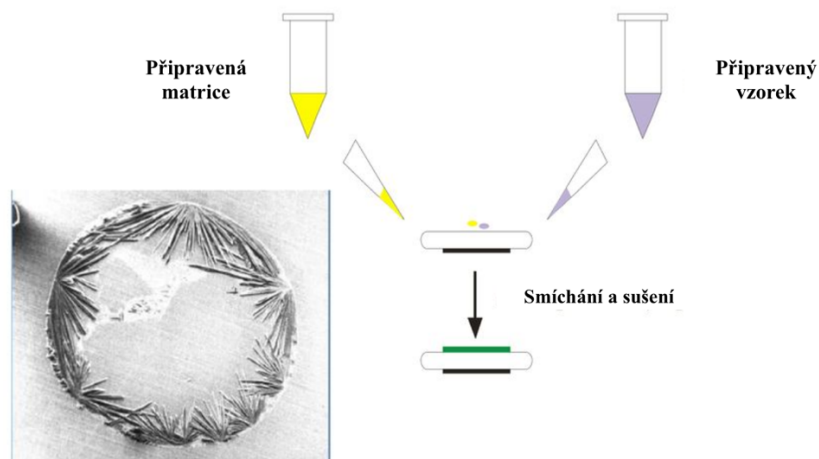
Technika extrakce kyselinou mravenčí spočívá v přidání 1 μ l 70% kyseliny mravenčí, přímo na sušenou kvasinkovou skvrnu, která byla ještě jednou sušena před přidáním matrice HCCA. Tato technika se využívá u obtížně analyzovatelných vzorků, kdy kyselina mravenčí usnadňuje extrakci potřebných proteinů. Buňky plísní jsou větší než bakteriální buňky a mají tuhou buněčnou stěnu. U plísní se tedy vzorek připravuje technikou spin coatingu (L'Ollivier & Ranque 2017)

4.1.5 Techniky přípravy vzorků

4.1.5.1 Dried – Droplet

Tato metoda je nejstarší technika přípravy vzorků. Při této technice je připraven roztok matrice a analytu (viz obr. Č. 16). Poté je namíchán na potřebný objem. Analýza MALDI se provádí nanesením kapiček směsi roztoku na MALDI desku a poté se kapky směsi usuší při okolní teplotě (Hosseini & Martinez-Chapa 2017).

Obr. č. 16: Schéma metody Dried – droplet a foto výsledného vzorku



<https://slideplayer.com/slide/14405442/>

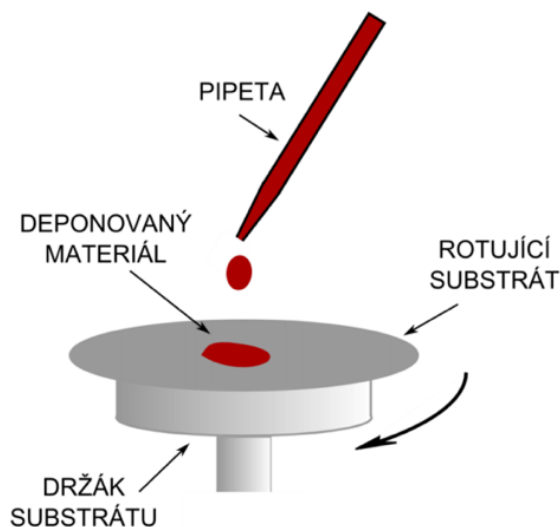
4.1.5.2 Rychlá krystalizace

Tato technika je založena na rychlé krystalizaci, která obvykle probíhá během několika sekund (< 20 s). Krystalizace se provádí za pomoci vakuové komory, která je vybavena rotační pumpou. Uvádí se, že rychlá krystalizace zvyšuje ionizační účinnost peptidů. Vznikají totiž menší krystalky, které následně způsobují menší segregaci a dochází k výraznému zlepšení reprodukovatelnosti signálů a rozlišení spektra (Hosseini & Martinez-Chapa 2017; O'Rourke et al. 2018).

4.1.5.3 Spin coating

Jedná se o metodu, jejíž základem je zařízení, které se nazývá spin coaster nebo spinner. Nejdříve musí být vzorek rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle a poté se nanáší na substrát, který je horizontálně uchycen v držáku (viz obr. č. 17). Principem spin coatingu je, že se kapka deponovaného materiálu vlivem odstředivé síly rovnoměrně roznese po povrchu substrátu a vznikne tak tenká vrstva roztoku vzorku (Kopecký 2015).

Obr. č. 17: Princip spin coatingu



<https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/SC.pdf?redirected>

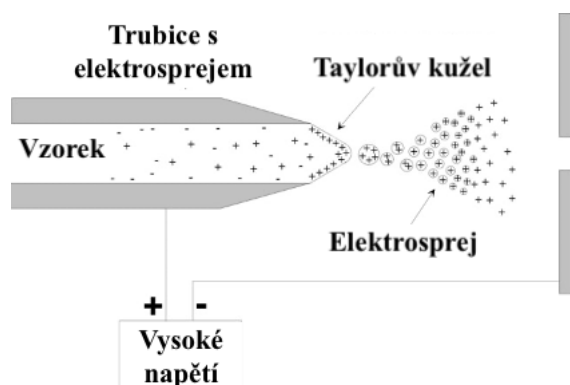
4.1.5.4 Layer-by-layer

V této běžně používané metodě se jako první vrstva nanese kapička roztoku matrice a poté druhá vrstva, která slouží jako ionizační činidlo. Druhá vrstva napomáhá matici k její měkké ionizaci. Mezi každým ponořením substrátu do roztoku zkoumaného materiálu, se usazené vzorky nechají krystalizovat, promývat a sušit při pokojové teplotě. Tyto kroky se mohou opakovat i několikrát po sobě. Díky této technice je signál spekter silnější a snadněji detekovatelný. (Richardson et al. 2016; Hosseini & Martinez-Chapa 2017).

4.1.5.5 Nanesení vzorku elektrosprejem

Elektrosprej je technika, která jemně rozpraší roztok se vzorkem pomocí kapilární trubice nebo papírového hrotu s aplikovaným elektrickým polem. V typické elektrosprejové technice je vodivá kapalina s rozpuštěnými molekulami vzorku čerpána kapilárou s kovovou elektrodou připojenou k vysokonapěťovému zdroji. Mechanický náčrt je znázorněn na obrázku č. 18. Při nízkém napětí dominuje povrchové napětí kapaliny nad elektrickým polem a proudění kapaliny klesá. Se zvyšujícím se napětím se elektrické pole stává silnějším a protahuje proud do tvaru kuželu, jehož vrchol se rozpíná v trysku. Tento kužel byl poprvé objeven Taylorem, proto se tento provozní režim nazývá Taylorův kužel.

Obr. č. 18: Princip elektrospreje



https://www.researchgate.net/publication/267241113_Miniaturized_Techniques_for_Protein_Analysis/figures?lo=1

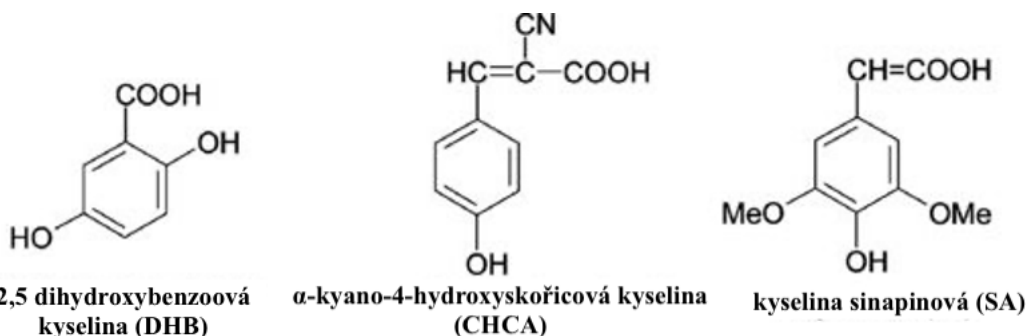
4.1.6 Matrice

Matricový roztok se skládá z vody a směsi organických rozpouštědel obsahujících etanol / metanol nebo acetonitril a silné organické kyseliny. Mezi tyto organické kyseliny patří trifluoroctová kyselina (TFA) nebo mravenčí kyselina, které rozpouštějí matrici a snižují pH prostředí analytu. Rozpouštědla pronikají buněčnou stěnou mikroorganismů a extrahují intracelulární proteiny. K následné krystalizaci proteinových molekul a dalších buněčných sloučenin zachycených v roztoku matrice dochází odpařením rozpouštědel (Patel 2015). Na obrázku č. 19 jsou vyobrazeny chemické vzorce nejvíce používaných organických kyselin, jako matrice.

Nejpoužívanější organické kyseliny jako matrice:

- α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA)
- 2,5 dihydroxybenzoová kyselina (DHB)
- kyselina ferulová (FA)
- kyselina sinapinová (SA) (Opota et al. 2016)

Obr. č. 19: Chemické vzorce některých nejpoužívanějších matric



https://www.researchgate.net/publication/283691366_Sample_Preparation_for_Matrix-Assisted_Laser_Desorption/Ionization_Mass_Spectrometry/figures?lo=1

4.1.7 Ionizace

Během ionizace laserový paprsek dodává energii, která desorbuje mikrobiální a maticové molekuly. Matrice absorbuje většinu této energie a dochází k její ionizaci. Následně se uvolní proton, který v plynné fázi náhodnou kolizí přenáší náboj z matrice na molekuly analyzovaného vzorku. Tímto dochází k ionizaci molekul vzorku, které zrychlují a putují do hmotnostního analyzátoru TOF (Time Of Flying) na základě jejich poměru hmotnosti ku náboji (Patel 2015).

Ionizace za přítomnosti matrice je nečastější metodou při identifikaci hub. Existují však i jiné techniky, jak ionizovat vzorek:

- desorpce plazmou (DP),
- bombardování atomy (FAB),
- chemická ionizace (CI),
- elektrosprej (ESI),
- desorpce laserem (LD) (Croxatto et al. 2012)

4.1.8 Systémy pro identifikaci mikroorganismů.

4.1.8.1 Biotyper

Jak bylo uvedeno dříve, každý vzorek houby během analýzy uvolňuje charakteristické spektrum látek – PMF. Toto spektrum neznámého vzorku je porovnáno s databází MBL (MALDI Biotyper Library). Vygenerovaná spektra z MALDI TOF MS jsou analyzována pomocí softwaru MALDI Biotyper automation controland Software Bruker Biotyper 3.1. Tento software automaticky generuje číselné skóre v intervalu 0 – 3,000 (viz tab. č.1). Výsledné číslo značí podobnost výsledného spektra se spektrem v MBL a jak moc byla daná identifikace úspěšná. Pokud je výsledek 2,000 a více podařilo se identifikovat druh i rod houby (zelená barva). Výsledek mezi 1,999 a 1,700 značí, že se povedlo identifikovat pouze druh (žlutá barva). Neúspěšná shoda nastává, pokud je výsledné skóre menší než 1,700 (červená barva). U každého vzorku mikroorganismu probíhá dvojí měření. Pro měření, kalibraci přístroje a validaci běhu se využívá bakteriální testovací standard, Bruker Daltonics (Lévesque et al. 2015).

Tab. č. 1: Popisy číselných hodnot identifikace (Shell 2017)

skóre	popis	symboly	barva
2,300 - 3,000	rod i druh je s vysokou pravděpodobností identifikován	(+++)	zelená
2,000 - 2,299	rod je identifikován s jistotou, druh pravděpodobně	(++)	zelená
1,700 - 1,999	rod je identifikován pravděpodobně	(+)	žlutá
0,000 - 1,699	nespolehlivá identifikace	(-)	červená

4.1.8.2 VITEK MS

Kolonie jsou nanесeny na dvoje jednorázové cílové destičky a do obou nátěrů je přidán 1 ul roztoku matrice (kyselina a-kyano-4-hydroxycinnamová, VITEK® MS CHCA). Ke kalibraci přístroje a k vnitřní kontrole pro každou akviziční skupinu se využívá kmen *Escherichia coli* ATCC 8739.

Po vysušení je cílová deska umístěna do zařízení a analyzována pomocí binmatrix v databázi VITEK® MS v2.0 IVD. V tomto procesu je každému píku přiřazena hmotnost, která je specifická pro každý druh. Analyzováno je 1300 přihrádek nebo oblastí píku. Ke každé identifikaci je přiřazen zelený čtverec, žlutý trojúhelník nebo červený kruh, což označuje vysokou, střední nebo nízkou spolehlivost (viz obr. č. 20). Identifikace, která je považována za úspěšnou na úrovni rodu a druhu je označena zeleným čtvercem a výsledek je v souladu s výsledky získanými konvenčními metodami. Jako částečná identifikace jsou označeny izoláty, jejichž výsledkem je žlutý trojúhelník a nesouhlasí s konvenčními metodami. Izoláty, které jsou klasifikovány jako bez identifikace označuje červený kruh (Deak et al. 2015).

Obr. č. 20: Snímek výsledků ze systému VITEK MS

<input type="checkbox"/>	26810	DIEZ RICHARD	G10746080-1	Urine	<i>Escherichia coli</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	26811	ONCE GABRIEL	G10746081-1	Urine	<i>Staphylococcus aureus</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	26812	DOCE JULIE	G10746082-1	Fluids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	2601	ALPHA JANE	G10746091-1	Blood	<i>Listeria monocytogenes</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	2602	BETA MARY	G10746092-1	Urine	<i>Escherichia coli</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	2603	GAMMA KATE	G10746093-1	Urine	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	2603	GAMMA KATE	G10746093-2	Urine	<i>Escherichia coli</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	2605	EPSILON SAM	G10746095-1	Stool	<i>Campylobacter jejuni</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	2606	STIGMA BRIAN	G10746096-1	Skin - Wound - Soft tissues and Abscess	<i>Pasteurella multocida</i>	99.9		To Review
<input type="checkbox"/>	2607	DZETA TRUDY	G10746097-1	Blood	<i>Streptococcus dysgalactiae ssp dysgalactiae</i>	50.0		To Review

https://www.smvn.scot.nhs.uk/wp-content/uploads/2014/06/Brian_van_der_Vliet.pdf

4.1.8.3 SARAMIS

MS spektra mikroorganismů, které vygeneroval MALDI – TOF jsou přeneseny do softwaru SARAMIS (Spectral ARchive And Microbial Identification System), který je vyobrazen na obrázku č. 22. Zde jsou MS spektra porovnávána s databází obsahující referenční spektra hub.

Databáze SARAMIS obsahuje více než 25 000 spekter z 586 bakteriálních a houbových druhů. Každý kmen je analyzován třikrát v samostatných pokusech. Softwarovým algoritmem je vypočtena procentuální pravděpodobnost neboli úroveň spolehlivosti (viz obr. č. 21). Tato hodnota představuje podobnost specifických píků mezi generovaným spektrem a databázovým spektrem. Pokud je podobnost mezi spektrem organismu a spektrem z databáze 99,9 % jedná

se o dokonalou shodu (excellent ID). Pokud je úroveň spolehlivosti v rozsahu od 60 do 99,8 % byla identifikace považována za dobrou (good ID), jelikož spektrum bylo dostatečně blízké k referenčnímu spektru. Pokud je však úroveň podobnosti pod 60 % je identifikace vyhodnocena jako neúspěšná (no ID) (Ziino et al. 2019).

Obr. č. 21: Snímek výsledků ze systému SAMARIS

name	sample	%	genus	species	export to LIMS
ANAS_001_0564_383[c]	014	99,90	Candida	glabrata	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0525_404[c]	043-2	95,00	Propionibacterium	acnes	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0525_481[c]	039-1	99,90	Clostridium	perfringens	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0525_3C2[c]	022-2	99,90	Enterococcus	faecalis	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0525_383[c]	021-1	99,90	Staphylococcus	capitis	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0521_2_3[c]	019-1	99,90	Staphylococcus	aureus	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0520_2F1[c]	009-1	99,90	Bordetella	bronchiseptica	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0520_2E1[c]	007-1	99,90	Stenotrophomonas	malophilia	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0520_201[c]	005-1	99,90	Pseudomonas	aeruginosa	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0520_2C1[c]	003-1	99,90	Escherichia	coli	<input checked="" type="checkbox"/>
ANAS_001_0520_2B1[c]	001-1	95,40	Acinetobacter	lwoffii	<input checked="" type="checkbox"/>

<https://www.pharmaceutical-technology.com/wp-content/uploads/sites/10/2017/09/3-anagnostec.jpg>

4.1.9 Provozní cena MALDI TOF

V roce 2015 vyšla studie katedry Klinických mikrobiologicko-imunologických laboratoří na Univerzitě Severní Karolíny. Od 1. dubna 2013 do 31. března 2014 vedli studii analýzy nákladů.

Potvrdili, že bylo ušetřeno přes 92 % nákladů potřebných na provedení testů. MALDI TOF MS vyhodnotili jako rychlejší oproti tradičním metodám a výsledek znali do hodiny (čas se odvíjí podle náročnosti identifikace daného vzorku). Laboratoř využila přes 21 900 vzorků od pacientů, jež se skládaly převážně z kvasinek, streptokoků a enterokoků.

Při běžné identifikaci, rozbor v laboratoři za přítomnosti laborantního technologa, by náklady při 21 900 vzorcích, činily 142 532 USD (3 420 768 Kč – kurz k 8.7. 2020). Při použití MALDI TOF MS se náklady vyšplhaly pouze na 68 886 USD (1 653 264 Kč). Celková roční úspora byla tedy 73 646 USD (1 767 504 Kč). Náklady vynaložené na koupi tohoto přístroje se vrátí do tří let provozu. Pořizovací cena byla asi 250 000 USD (6 000 000 Kč) (Tran et al. 2015).

4.1.10 Výhody MALDI TOF MS

Velkou výhodou této metody je její přesnost, kdy (Cassagne et al. 2016) uvádí míru správné identifikace plísní v rozmezí od 72,0 % do 98,8 %. Dalšími výhodami jsou vysoká specifita a rozlišení, které umožňují nejen identifikaci hub, archea či bakterií, které se obtížně kultivují ale i peptidů a proteinů. Příprava vzorku je snadná a pracovní postup analýzy flexibilní. Následná analýza pak probíhá rychle, na základně vysoké propustnosti vzorku a spojení s TOF či TOF MS (Rahi et al. 2016; Sanguinetti & Posteraro 2017).

4.1.11 Nevýhody MALDI TOF MS

Přesnost detekce může být ovlivněna dobou kultivace analyzovaných hub. Další nevýhodou, která může souviset s kultivací, je nedostatek standardizovaného vzorku pro analýzu. Při ionizaci vzorku pak dochází k nerovnoměrné distribuci analytů a jeho potlačení společně s potlačením matice. U vláknitých hub je hlavním omezením identifikace MALDI TOF MS referenční spektrum. Neustálá modernizace spektrálních databází a optimální obohacování vzorků v systému zvýší výkon a potenciální aplikaci MALDI-TOF MS. Poslední nevýhodou jsou pak její provozní náklady (Wong et al. 2015; Hou et al. 2019).

4.2 Další identifikační metody

4.2.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR je metoda, která je využívána v mnoha laboratořích pro diagnostické a potravinářské analýzy. Tato technologie je založena na polymerázové řetězové reakci, kterou doplňuje použití fluorescenčních reportérových molekul. Tyto molekuly slouží k monitorování nově vniklých produktů amplifikace během každého cyklu PCR reakce. (Lopes et al. 2018).

4.2.1.1 Výhody PCR

Hlavními výhodami qPCR je její vysoká rychlost, efektivita a citlivost, díky čemuž dokáže v reálném čase detekovat a kvantifikovat houbovou DNA, a to nejen na úrovni rodu ale i druhu. Dále nevyžaduje zpracování produktů po amplifikaci a je možné rychlé opakování analýzy vzorku (Du et al. 2016).

4.2.1.2 Nevýhody PCR

Metoda qPCR je složitý způsob identifikace s vysokými provozními náklady na vybavení a při které je zapotřebí kvalifikovaného personálu. V porovnání s FISH neumí PCR rozlišit mrtvé a živé buňky. Poslední nevýhodou je, že při analýze dochází ke konkurenční amplifikaci a tím dochází ke snížení citlivosti a účinnosti multiplexní reakce (Aslam et al. 2017).

4.2.2 NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)

NASBA je molekulární metoda pro amplifikaci cílových segmentů RNA, ve které není zapotřebí termocykleru, jelikož nedochází teplotním změnám v reakčním prostředí. Tato metoda je velmi citlivý, izotermní a transkripční amplifikační systém, který je speciálně navržen pro detekci RNA. Některé systémy NASBA mohou také amplifikovat DNA (Hønsvall & Robertson 2017).

4.2.2.1 Výhody NASBA

K amplifikaci genu se využívá mnoho metod, jako jsou PCR, LAMP a RCA. Žádná z těchto metod však nemůže s tak vysokou citlivostí přímo amplifikovat RNA jako je tomu u metody NASBA. Tato metoda tak poskytuje mnoho výhod oproti jiným technikám amplifikace RNA. NASBA je schopna díky působení tří enzymů během 90 minut amplifikovat více než 10⁹ kopií dané sekvence nukleové kyseliny. NASBA je izotermická reakce, která se provádí při 41 °C a není tak zapotřebí termálního cyklovače, který je například u PCR využíván k urychlení reakce. Důležitou výhodou NASBA je i produkce jednořetězcových RNA amplikonů, které mohou být použity přímo v dalším cyklu amplifikace nebo mohou být využity pro detekci bez denaturace či separace vláken. Několik studií uvádí, že amplifikační výkon NASBA je srovnatelný nebo dokonce lepší než výkon RT – PCR (Aslam et al. 2017).

4.2.2.2 Nevýhody NASBA

Existují také některé nevýhody NASBA. Za prvé, nedělitelnost RNA je nejčastější příčinou obav pro identifikaci touto metodou. I když je amplifikační reakce sama o sobě izotermická při 41 °C, je před amplifikační reakcí vyžadován pouze jeden krok tání. Navíc specifita reakce na tepelně labilní enzymy může být ohrožena, pokud reakční teplota překročí 42 °C. Délka cílové amplifikované RNA sekvence by měla být mezi 120 a 250 nukleotidy (Aslam et al. 2017).

4.2.3 FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňuje identifikaci mikrobiálních organismů (bakterií, kvasinek a prvoků) na úrovni rodů nebo druhů díky vazbě krátkých, obvykle 18 až 25 bázových párů, přesně specifických oligonukleotidových sond na ribozomální RNA, které jsou fluorescenčně značené s následnou analýzou pod fluorescenčním mikroskopem (Frickmann et al. 2017).

4.2.3.1 Výhody FISH

Výhodami této metody jsou univerzálnost a vysoká citlivost. Tradiční techniky identifikace mikroorganismů vyžadují, aby se buňky aktivně dělily. Nicméně, FISH lze použít pro nedělící se buňky. Nedělící se buňky lze rozeznat podle jejich nízké úrovně intenzity fluorescence. FISH dále umožňuje identifikaci na úrovni rodů a druhů. Proto ve smíšených vzorcích může identifikovat jednotlivé druhy hub (Fang & Ramasamy 2015)

4.2.3.2 Nevýhody FISH

Technika FISH má i některá úskalí. Ve FISH je proces přípravy sondy velmi komplikovaný, protože je nutné přizpůsobit sondy tak, aby detekovaly specifické sekvence DNA. Praktický výkon FISH tedy vyžaduje zkušeného a vysoce vyškoleného jedince. A to

nejen kvůli složitosti přípravy sond. Jedná se totiž o mikroskopickou techniku, která je špatně standardizovaná a vyžaduje zkušenosti se správnou interpretací výsledků (Fang & Ramasamy 2015)

Tab. č. 2: Výhody a nevýhody analytických metod

Výhody a nevýhody analytických metod		
Metody	Výhody	Nevýhody
MALDI TOF	<ul style="list-style-type: none"> • Rychlost • Přesnost • Vysoká specifita • Rozlišení • Snadná příprava vzorku • Flexibilní pracovní postup 	<ul style="list-style-type: none"> • Drahé provozní náklady • Možné ovlivnění detekce špatnou kultivací hub • Nedostatek standardizovaného vzorku • Nerovnoměrná distribuce analytů • Potlačení matice
qPCR	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoká rychlost • Efektivita • Citlivost • Rychlé opakování analýzy 	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoké provozní náklady • Potřeba kvalifikovaného personálu • Neumí rozeznat mrtvé buňky od živých (v porovnání s FISH)
NASBA	<ul style="list-style-type: none"> • Vyšší citlivost než PCR • Není potřeba termálního cyklovače • Produkce jednořetězcových RNA amplikonů • Amplifikace výkonnější než u qPCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Pouze jeden kro tání • Špatná dělitelnost RNA • Omezená délka cílové sekvence RNA • Ohrožení specifity vyšší teplotou (> 42 °C)
FISH	<ul style="list-style-type: none"> • Rychlost • Univerzálnost • využití i pro nedělicí se buňky 	<ul style="list-style-type: none"> • Komplikovaná příprava sondy • Potřeba kvalifikovaného personálu • Špatně standardizovaná

5 Závěr

Metoda MALDI TOF MS přinesla velkou revoluci do mikrobiologických laboratoří. Jelikož je v nich zapotřebí správná a rychlá identifikace kvasinek, hub nebo vláknitých mikromycet, je tato metoda pro ně průlomová. Dříve se identifikace prováděla pomocí mikroskopické a makroskopické metody, kdy přesnost určení se odvíjela od zkušeností laboranta a trvala i několik dní. Dnešní testování pomocí MALDI TOF MS urychlilo identifikaci a zkrátilo tak čas strávený v laboratoři.

MALDI TOF dokáže i od sebe rozlišit směsné vzorky a k samotné analýze dostačuje i velmi malé množství biomasy. Díky jeho přesnosti lze identifikovat u daného vzorku druh a kmen.

V současné době je důležité rozšiřovat a aktualizovat dosavadní databáze vzorků, které jsou nezbytnou součástí identifikace pomocí metody MALDI TOF. Tyto aktualizace napomohou k zefektivnění analýzy, jejímu častějšímu používání v laboratořích a rozšíření využití oblasti v lékařství – testy citlivosti na antibiotika

I když je metoda MALDI TOF finančně náročná na pořízení, její rychlost a přesnost detekce vzorku je nesrovnatelná s ostatními metodami. Proto bude do budoucna její využití v laboratořích a jiných podobných zařízeních velmi žádané.

Houby nejsou zcela prozkoumaný svět i přesto, že se vyskytují blízkosti člověka. Jejich potenciál na uplatnění v potravinářství či lékařství zcela jistě nevyužíváme na plno. Pokus při využití kvasinek a bakterií dal vzniknout známému nápoji Kombucha. Vláknité mikromycety se využívají při výrobě plísňových sýrů či antibiotik a v čínské medicíně se stále používá houba shiitake.

Houby a kvasinky neodmyslitelně patří do gastronomického prostředí, které by se bez nich neobešlo. Jejich frekvence používání v potravinářství se v budoucnu jistě nesníží. Právě naopak, s neustálým zhoršováním životního prostředí a se zvyšující se obtížností pěstování plodin, by mohly houby, díky své dostupnosti a jednoduchému způsobu pěstování, postupně zaujmout jejich místo. Ale na to je potřeba ještě mnoho let výzkumů, ve kterých bude zcela jistě velice nápomocná metoda MALDI TOF.

6 Literatura

Abe A, Asano K, Sone T. 2010. A Molecular Phylogeny-Based Taxonomy of the Genus *Rhizopus* **74**:1325–1331. Informa UK Limited. Available from <http://10.0.4.247/bbb.90718>.

Angeletti S. 2017. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *Journal of Microbiological Methods* **138**:20–29. Elsevier BV. Available from <http://10.0.3.248/j.mimet.2016.09.003>.

Aslam S, Tahir A, Aslam MF, Alam MW, Shedayi AA, Sadia S. 2017. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *Journal of Plant Interactions* **12**:493–504. Informa UK Limited. Available from <http://10.0.4.56/17429145.2017.1397205>.

Baker SE, Bennett JW. 2007. An overview of the genus *Aspergillus*. Page *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*.

Barrios MJ, Medina LM, Lopez MC, Jordano R. 1998. FUNGAL BIOTA ISOLATED FROM SPANISH CHEESES **18**:151–157. Wiley-Blackwell. Available from <http://10.0.4.87/j.1745-4565.1998.tb00210.x>.

Buchta V, Hamal P, Mallátová N, Kocmanová I, Chrenková V, Roubalová M OP. 2010. Nepodkročitelné minimum laboratorní diagnostiky invazivních mykotických infekcí – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM JEP. Available from <https://docplayer.cz/4056307-Nepodkrocitelne-minimum.html> (accessed July 6, 2020).

Bullerman LB. 2003. SPOILAGE | Fungi in Food – An Overview. Page *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*.

Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. 2016. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* **59**:678–690. Wiley. Available from <http://10.0.4.87/myc.12506>.

Croxatto A, Prod'Hom G, Greub G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* **36**:380–407. Oxford University Press (OUP). Available from <http://10.0.4.87/j.1574-6976.2011.00298.x>.

Deak E, Charlton CL, Bobenchik AM, Miller SA, Pollett S, Mchardy IH, Wu MT, Garner OB. 2015. Comparison of the Vitek MS and Bruker Microflex LT MALDI-TOF MS platforms for routine identification of commonly isolated bacteria and yeast in the clinical

- microbiology laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **81**:27–33. Elsevier BV. Available from <http://10.0.3.248/j.diagmicrobio.2014.09.018>.
- Du L, Xia Y, He Y, Pu Q, Hua R, Wu W. 2016. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay of nucleic acid sequence-based amplification for diagnosis of invasive aspergillosis. *AMB Express* **6**. Springer Nature. Available from <http://10.0.4.162/s13568-016-0266-0>.
- Dufresne C, Farnworth E. 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* **33**:409–421. Elsevier BV. Available from [http://10.0.3.248/s0963-9969\(00\)00067-3](http://10.0.3.248/s0963-9969(00)00067-3).
- Dutta H, Paul SK. 2019. *Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects*. Page Production and Management of Beverages.
- Fang Y, Ramasamy RP. 2015. Current and prospective methods for plant disease detection.
- Feng XM, Eriksson ARB, Schnürer J. 2005. Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley tempeh fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **104**:249–256. Elsevier BV. Available from <http://10.0.3.248/j.ijfoodmicro.2005.03.005>.
- Frickmann H, Zautner AE, Moter A, Kikhney J, Hagen RM, Stender H, Poppert S. 2017. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology* **43**:263–293. Informa UK Limited. Available from <http://10.0.12.37/1040841x.2016.1169990>.
- Fungus D. 2000. *Mucor Species*. Available from <https://drfungus.org/knowledge-base/mucor-species/> (accessed July 6, 2020).
- Hajduk J, Matysiak J, Kokot ZJ. 2016. Challenges in biomarker discovery with MALDI-TOF MS **458**:84–98. Elsevier BV. Available from <http://10.0.3.248/j.cca.2016.04.033>.
- Hanson JR. 2008. *The chemistry of fungi*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
- Hermet A, Méheust D, Mounier J, Barbier G, Jany J-L. 2012. Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology* **116**:692–705. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878614612000670>.
- Hønsvall BK, Robertson LJ. 2017. From research lab to standard environmental analysis tool: Will NASBA make the leap? **109**:389–397. Elsevier BV. Available from <http://10.0.3.248/j.watres.2016.11.052>.
- Hosseini S, Martinez-Chapa SO. 2017. Principles and mechanism of MALDI-ToF-MS analysis. Pages 1–19 *SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology*. Springer Verlag.

Available from https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-2356-9_1 (accessed July 11, 2020).

Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. 2019, April 1. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. Elsevier Taiwan LLC.

Jablonský I, Šašek V. 2006. Jedlé a léčivé houby: pěstování a využití. Brázda, Praha.

Johnny I, Okon J. 2013. Antidiabetic Effect of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.ex Fr) kumm.Mushroom on Alloxan-induced Diabetic Rat. Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research.

Karahadian C, Josephson DB, Lindsay RC. 1985. Contribution of *Penicillium* sp. to the Flavors of Brie and Camembert Cheese. *Journal of Dairy Science* **68**:1865–1877. American Dairy Science Association. Available from [http://10.0.12.96/jds.s0022-0302\(85\)81043-2](http://10.0.12.96/jds.s0022-0302(85)81043-2).

Kavadiya S, Biswas P. 2018. Electrospray deposition of biomolecules: Applications, challenges, and recommendations. *Journal of Aerosol Science* **125**:182–207. Elsevier BV. Available from <http://10.0.3.248/j.jaerosci.2018.04.009>.

Kopecký D. 2015. Návod na laboratorní práci Spin Coating. Available from <https://fchi.vscht.cz/files/uzel/0010367/SC.pdf?redirected> (accessed July 13, 2020).

Krijgsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HAB. 2013. Development in aspergillus. *Studies in Mycology*.

L'Ollivier C, Ranque S. 2017. MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia* **182**:183–192.

Lennartsson PR, Taherzadeh MJ, Edebo L. 2014. *Rhizopus*. Pages 284–290 *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Elsevier Inc.

Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo M-C, Bekal S, Lefebvre B, Tremblay C. 2015. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. *PLOS ONE* **10**:e0144878. Public Library of Science (PLoS). Available from <http://10.0.5.91/journal.pone.0144878>.

Lima N, Santos C. 2017, February 1. MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. Elsevier Ltd.

Lopes ATS, Albuquerque GR, Maciel BM. 2018. Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Quantification of *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* in Different Food Matrices: Advantages and Disadvantages.

BioMed Research International:1–12. Hindawi Limited. Available from <http://10.0.4.131/2018/6104015>.

Malíř F, Ostrý V. 2003. Vlákňité mikromycety (plísňě), mykotoxiny a zdraví člověka. Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno.

O'Rourke MB, Djordjevic SP, Padula MP. 2018. The quest for improved reproducibility in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **37**:217–228. Wiley. Available from <http://10.0.3.234/mas.21515>.

Opota O, Prod'hom G, Greub G. 2016. Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Diagnostic Microbiology. Pages 55–92 *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*.

Parapouli M, Vasileiadis A, Afendra AS, Hatziloukas E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications.

Patel R. 2015. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry* **61**:100–111. Available from <https://academic.oup.com/clinchem/article/61/1/100/5611480>.

Rahi P, Prakash O, Shouche YS. 2016. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: Challenges and scopes for microbial ecologists.

Reyna S, Garcia-Barreda S. 2014. Black truffle cultivation: A global reality. *Forest Systems*.

Reyna-Domenech S, García-Barreda S. 2008. European Black Truffle: Its Potential Role in Agroforestry Development in the Marginal Lands of Mediterranean Calcareous Mountains. Page *Agroforestry in Europe*.

Richardson JJ, Bjornmalm M, Caruso F. 2015. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. *Science* **348**:aaa2491–aaa2491. American Association for the Advancement of Science (AAAS). Available from <http://10.0.4.102/science.aaa2491>.

Sandargo B, Chepkirui C, Cheng T, Chaverra-Muñoz L, Thongbai B, Stadler M, Hüttel S. 2019. Biological and chemical diversity go hand in hand: Basidiomycota as source of new pharmaceuticals and agrochemicals.

Sanguinetti M, Posteraro B. 2017. Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*.

Schutte AL. 1992. An overview of *Penicillium* (Hyphomycetes) and associated teleomorphs in southern Africa **22**. *AOSIS*. Available from <http://10.0.16.6/abc.v22i1.827>.

Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis.

Spatafora JW et al. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia* **108**:1028–1046. Informa UK Limited. Available from <http://10.0.15.12/16-042>.

Stewart GG. 2014. *Saccharomyces: Saccharomyces cerevisiae*. Page Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition.

Viebahn M, Veenman C, Wernars K, Loon LC, Smit E, Bakker PAHM. 2005. Assessment of differences in ascomycete communities in the rhizosphere of field-grown wheat and potato **53**:245–253. Oxford University Press (OUP). Available from <http://10.0.3.248/j.femsec.2004.12.014>.

Visagie CM, Houbraken J. 2020. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. *Studies in Mycology*.

Wong G, Wong I, Chan K, Hsieh Y, Wong S. 2015. A Rapid and Low-Cost PCR Thermal Cycler for Low Resource Settings. *PLOS ONE* **10**:e0131701. Public Library of Science (PLOS). Available from <http://10.0.5.91/journal.pone.0131701>.

