



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOŽNOSTI IDENTIFIKACE PATOGENŮ POMOCÍ MALDI-TOF HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

POSSIBILITIES OF PATHOGEN IDENTIFICATION USING MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lucie Fusková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Šalplachta, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1740/2021 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Lucie Fusková**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biochemická technologie
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Šalplachta, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Možnosti identifikace patogenů pomocí MALDI–TOF hmotnostní spektrometrie

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše – MALDI–TOF MS rostlinných patogenů se zaměřením na plísně
2. Optimalizace metody MALDI–TOF MS na vybraných kultivovaných kmenech plísní
3. Ověření možnosti identifikace plísní v napadeném obilí pomocí vypracované metody

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2024:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Lucie Fusková
studentka

Ing. Jiří Šalplachta, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zaměřuje na využití techniky MALDI-TOF MS k identifikaci rostlinných patogenů, konkrétně k identifikaci plísní rodu *Fusarium* napadajících obiloviny. Plísně představují vážnou hrozbu pro zemědělství a potravinářský průmysl. Stávající metody identifikace jsou časově náročné a často nedokážou poskytnout přesné výsledky. Hmotnostní spektrometrie nabízí rychlou a spolehlivou alternativu. Identifikace pomocí MALDI je charakteristická svou vysokou přesností, citlivostí a rychlostí ve srovnání s běžně používanými metodami. Práce se věnuje optimalizaci metody na kultivovaných kmenech plísní a identifikaci plísní v napadeném obilí. Výsledky práce ukazují potenciál využití techniky MALDI pro identifikaci rostlinných patogenů.

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the utilization of MALDI-TOF MS technique for the identification of plant pathogens, specifically targeting molds of the genus *Fusarium* affecting cereals. Molds pose a serious threat to agriculture and the food industry. Current identification methods are time-consuming and often fail to provide precise results. Mass spectrometry offers a rapid and reliable alternative. Identification via MALDI is characterized by its high accuracy, sensitivity, and speed compared to commonly used methods. The thesis addresses the optimization of the method using cultured fungal strains and the identification of molds in infected cereals. The results of the study demonstrate the potential of utilizing MALDI technique for the identification of plant pathogens.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biomolekuly, *Fusarium*, Hmotnostní spektrometrie, Identifikace, Ionizace, MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), Plísně, Rostlinné patogeny, Spektrum

KEYWORDS

Biomolecules, *Fusarium*, Mass Spectrometry, Identification, Ionization, MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), Molds, Plant pathogens, Spectrum

FUSKOVÁ, Lucie. *Možnosti identifikace patogenů pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie* [online]. Brno, 2024 [cit. 2024-05-27]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/140967>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jiří Šalplachta.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych velmi ráda poděkovala svému vedoucímu panu Ing. Jiřímu Šalplachtovi, Ph.D. za jeho odborný dozor, vedení mé bakalářské práce, neustálou podporu a pomoc při řešení problematiky dané práce. Vážím si příležitosti pracovat pod jeho vedením a jsem vděčná za všechny cenné zkušenosti a rady, které jsem získala během naší spolupráce. Dále děkuji panu Ing. Milošovi Dvořákovi, Ph.D., za jeho pomoc v propojení s naší fakultou.

A v neposlední řadě mockrát děkuji mé rodině za jejich každodenní nenahraditelnou podporu, optimismus a pochopení, kterou mi při psaní bakalářské práce poskytovali.

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1	Rostlinné patogeny.....	7
2.2	Plísně rodu <i>Fusarium</i>	8
2.2.1	Morfologie rodu <i>Fusarium</i>	8
2.2.2	Rožmnořování plísni rodu <i>Fusarium</i>	9
2.2.3	Patogenita rodu <i>Fusarium</i>	10
2.3	Mořnosti identifikace plísni rodu <i>Fusarium</i>	15
2.4	Hmotnostní spektrometrie.....	15
2.4.1	Princip hmotnostní spektrometrie.....	16
2.4.2	Iontový zdroj.....	16
2.4.3	Hmotnostní analyzátor.....	17
2.4.4	Detektor.....	17
2.5	Technika MALDI-TOF MS.....	18
2.5.1	Historie MALDI.....	18
2.5.2	Princip MALDI.....	18
2.5.3	Matrice v MALDI.....	19
2.5.4	Hmotnostní analyzátor TOF.....	20
2.5.5	Detektory v MALDI-TOF MS.....	21
2.6	Identifikace mikroorganismů technikou MALDI-TOF MS.....	21
2.6.1	Identifikace plísni.....	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1	Vzorky plísni a obilí.....	23
3.2	Pouřité chemikálie.....	23
3.3	Přístroje.....	23
3.4	Laboratorní pomůcky a materiál.....	23
3.5	Příprava vzorku.....	24
3.5.1	Příprava roztoků matic.....	24
3.6	Optimalizace metody.....	24
3.7	Příprava vzorků plísni rodu <i>Fusarium</i>	25
3.8	MALDI analýza.....	26
3.8.1	Analýza napadeného sladu.....	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	28
4.1	Vyhodnocení použitých matic.....	28
4.2	Vyhodnocení vhodného způsobu nanášení.....	31
4.3	Vyhodnocení různých způsobů přípravy a ověření použití vhodné matrice.....	33
4.4	Vyhodnocení identifikace plísni rodu <i>Fusarium</i>	35
5	ZÁVĚR.....	38
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	43
8	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ.....	45

1 ÚVOD

Rostlinné patogeny, zejména plísně, představují vážnou hrozbu pro zemědělství a potravinářský průmysl po celém světě. Identifikace těchto patogenů je klíčovým krokem pro účinnou ochranu rostlin a minimalizaci škod způsobených jejich infekcemi. Stávající používané metody identifikace, jako je morfologické a biochemické hodnocení, jsou časově náročné, náchylné k chybám a často nedokážou poskytnout přesné výsledky. V tomto kontextu nabízí hmotnostní spektrometrie rychlou a spolehlivou alternativu. Nedávné studie naznačují, že technika hmotnostní spektrometrie MALDI představuje velmi účinný nástroj pro identifikaci různých mikroorganismů. Uvedená technika má potenciál doplnit, případně nahradit běžně používané metody.

Vypracovaná bakalářská práce se zaměřuje na zkoumání možnosti využití techniky MALDI-TOF MS k identifikaci plísní rodu *Fusarium*, která je významným patogenem napadajícím obiloviny. Práce je strukturována do tří hlavních částí, které odpovídají stanoveným cílům.

První část práce je věnována literární rešerši, která poskytuje přehled současných poznatků o využití techniky MALDI-TOF MS pro identifikaci plísní. Rešerše analyzuje dosavadní výsledky v této oblasti včetně použitých metod, přístrojového vybavení, aplikací a dosažených úspěchů.

Druhá část práce se zaměřuje na optimalizaci metody MALDI-TOF MS na vybraných kultivovaných kmenech plísní, kde jsou zkoumány různé přípravy vzorků a podmínky MS analýzy za účelem maximalizace rozlišení mezi jednotlivými druhy plísní.

Třetí část práce se zabývá ověřením možnosti identifikace plísní v napadeném obilí pomocí vypracované metody MALDI-TOF MS a aplikuje optimalizovanou metodu na reálné vzorky napadeného obilí.

Výsledky předložené bakalářské práce dokazují potenciál využití techniky MALDI pro identifikaci rostlinných patogenů v napadeném obilí.

Identifikace plísní je velmi důležitým prvkem v ochraně zemědělských plodin a zajištění potravinové bezpečnosti. Plísně mohou způsobovat závažné škody na zemědělských produktech, snižovat kvalitu potravin a představovat zdravotní rizika pro člověka. Plísně rodu *Fusarium*, mohou způsobit významné ekonomické ztráty a ohrozit kvalitu potravinářských produktů. Proto je nezbytné mít k dispozici rychlé, spolehlivé a přesné metody pro jejich detekci a identifikaci. S rostoucími nároky na rychlou a přesnou diagnostiku plísnových patogenů se proto stále více zkoumají moderní analytické techniky.

Předložená bakalářská práce se zaměřila na tři klíčové cíle, které byly stanoveny kvůli porozumění a seznámení s problematikou využití metody MALDI-TOF MS při identifikaci rostlinných patogenů, se specifickým zaměřením na plísně rodu *Fusarium*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rostlinné patogeny

Některé organismy žijí s rostlinami v symbiotickém vztahu, který je pro oba účastníky výhodný. Na druhé straně existují organismy, které napadají rostliny a využívají jejich metabolity pro vlastní prospěch. Některé organismy jsou přirozeně patogenní pouze pro určitý druh, proto závisí jak na druhu napadeného organismu, tak na druhu hostitele. Mezi hlavní druhy patogenů patří viry, priony, prvoci, bakterie, houby a členovci [1; 2].

Organismy, které napadají rostliny, jsou označovány jako rostlinné patogeny. Mohou infikovat různé části rostlin, například listy, stonky, kořeny nebo plody [2; 3]. Základními typy rostlinných patogenů jsou houbové, bakteriální a virové organismy, mezi nejrozšířenější patří houbové patogeny. Většina hub se řadí mezi parazity, kteří se živí na živých rostlinách a způsobují různé stupně poškození [4]. Velmi rozšířenými známými houbovými patogeny u rostlin jsou například rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, a *Mucor*. Parazitické druhy plísní rodu *Fusarium* patří mezi nejvýznamnější rostlinné patogeny, které napadají zejména obiloviny, cukrovou řepu a brambory [3; 4; 5].

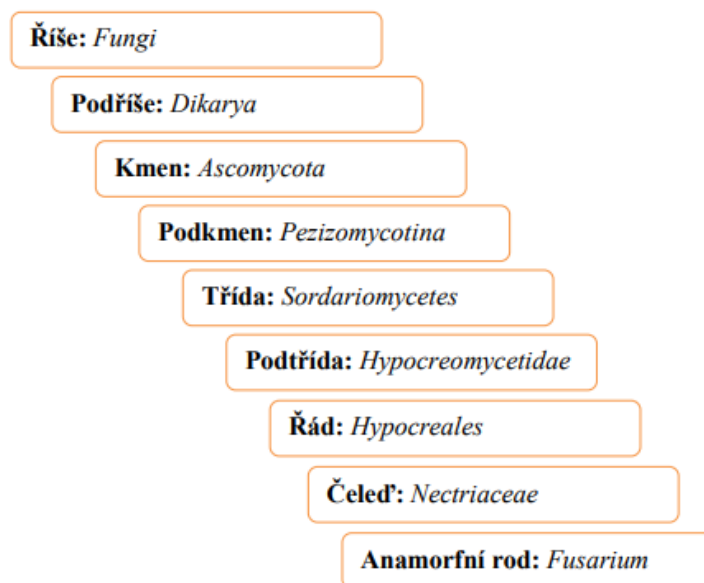
Patogenita představuje schopnost patogenu zahájit procesy, které vedou k poškození a onemocnění napadených organismů, tzv. hostitelů. Jedná se o dynamický proces, který zahrnuje interakci mezi patogenem a obrannými mechanismy rostliny. Úspěšné napadení závisí na schopnosti patogenu překonat obranné mechanismy rostliny a získat potřebné zdroje pro svůj růst a reprodukci [3].

Poranění nebo infekce rostlin způsobuje nahromadění specifických proteinů v buněčné stěně, především glykoproteinů. Enzymy rostlinných patogenů mají schopnost narušovat rostlinné buněčné stěny, což má za následek rozpad makromolekulárních složek buněk rostlin. Tyto makromolekuly jsou následně využity pro výstavbu buněčných komponent patogenů [4]. Důsledkem jejich napadení je často zhoršená vitalita rostlin. Způsobené choroby napadených kulturních rostlin mohou zapříčinit snížení jejich výnosu. Vzniklé škody představují značný problém pro zemědělství a mohou mít významný ekologický dopad [6; 7; 8].

2.2 Plísně rodu *Fusarium*

Rod *Fusarium* (srpnovička) byl poprvé popsán a pojmenován v roce 1809 německým botanikem Johannem H. F. Linkem. Plísně rodu *Fusarium* představují rozmanitou skupinu mikroskopických vláknitých hub, tzv. mikromycet [6].

Rod *Fusarium* je znám svou komplexní taxonomií, což znamená, že jeho systematizace a klasifikace je poměrně složitá a náročná. Leslie a Summerell v rámci své experimentální studie [9] na základě těchto kritérií identifikovali přes 70 druhů plísní rodu *Fusarium*, nicméně jejich taxonomická klasifikace se neustále mění [7]. Taxonomické zařazení je uvedeno níže (Obrázek 1).



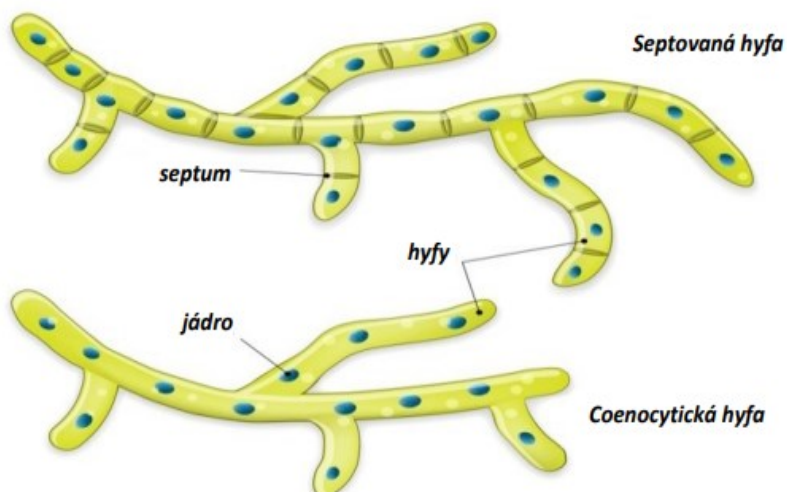
Obrázek 1: Taxonomické zařazení rodu *Fusarium* [9]

Plísně rodu *Fusarium* se řadí mezi saprofyty, které jsou běžně přítomné v prostředí a rostou na rozmanitých substrátech, jako je rostlinná hmota, půda a obiloviny. Optimální teplota pro jejich růst je mezi 25 až 30 °C a vlhkost vzduchu by se měla pohybovat nad 70 %. Platí, že čím vyšší vlhkost, tím rychlejší růst. Jedná se o plíseň, která není příliš závislá na světle [7].

2.2.1 Morfologie rodu *Fusarium*

Plísně zastávají důležitou roli v ekosystémech, pomocí enzymů se podílejí na rozkladu organické hmoty na jednodušší látky a napomáhají koloběhu látek v naší přírodě. Pro plísně se již používá hromadné označení vláknité mikroskopické houby. Jedná se o vícebuněčné, vláknité, eukaryotní mikroskopické organismy [6].

Plísně jsou tvořeny dutými vláknitými útvary nazývanými hyfy, které bývají většinou lidským okem neviditelné. Hyfy mohou být rozděleny přehrádkami (septy), nebo nemají přehrádky (coenocytické) (Obrázek 2). Hyfy se rozrůstají a splétají, vytváří tím husté síťovité struktury označované jako mycelium. Mycelium je složené ze dvou částí, vzdušné a substrátové. Vzdušné mycelium roste na povrchu substrátu a substrátové jím prorůstá. Plísně mohou mít různé zbarvení i tvar, některé mají vláknité nebo chlupaté povrchy, oproti tomu jsou jiné vlhké a lepkavé [5, 10].



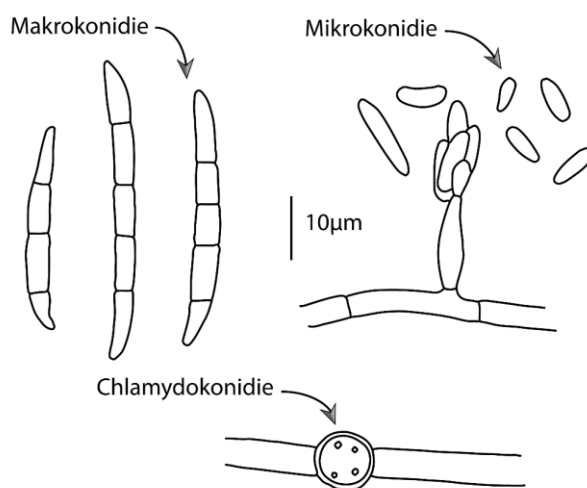
Obrázek 2: Druhy hyf [3]

Plíseň rodu *Fusarium* vytváří na kultivačních půdách bohaté vzdušné vatovité mycelium, které se rozrůstá od povrchu půdy směrem k víčku kultivační misky. Spodní strana narostlé kultury bývá pestře zbarvená a vrchní část mycelia bývá zbarvena do světlých odstínů. Makroskopický vzhled kolonií je pro určité druhy nebo skupiny plísní charakteristický a slouží jako kritérium pro jejich identifikaci [11].

2.2.2 Rozmnožování plísní rodu *Fusarium*

Plísně rodu *Fusarium* se nejčastěji rozmnožují prostřednictvím nepohlavních spor, které jsou nazývány jako konidie. Některé druhy vytváří za určitých podmínek i pohlavní stádium, které je charakteristické tvorbou askospor [6].

Plísně rodu *Fusarium* mohou produkovat tři typy konidií: makrokonidie, mikrokonidie a chlamydokonidie (Obrázek 3).



Obrázek 3: Typy konidií produkované plísní rodu *Fusarium* [6]

- **Makrokonidie** představují významný morfologický znak pro taxonomickou identifikaci druhů rodu *Fusarium*. Tyto struktury jsou tvořeny dvou až vícebuněčnými konidii. V průběhu dlouhé kultivace může docházet k útlumu tvorby makrokonidií.
- **Mikrokonidie** jsou obvykle jednobuněčné a mají různorodý tvar, velikost a způsob vzniku. Jejich tvar může být klíčový při identifikaci jednotlivých druhů rodu *Fusarium*. Neprodukují je všechny druhy rodu *Fusarium*.
- **Chlamydokonidie** se vyskytují pouze u některých druhů rodu *Fusarium*, mají různý tvar a velikost. Zpravidla mívají výrazně zbarvenou silnou stěnu, která může mít drsný nebo hladký charakter. Vznikají mezi buňkami vláknů nebo na konci vláknů.

Některé druhy produkují všechny typy konidií, zatímco jiné druhy nikoliv. Pro identifikaci je důležitý především tvar makrokonidií, přítomnost nebo nepřítomnost mikrokonidií a jejich tvar [6].

2.2.3 Patogenita rodu *Fusarium*

Patogenita plísně rodu *Fusarium* je dána jejich schopností produkovat řadu sekundárních metabolitů, převážně toxinů, které jsou nazývané jako mykotoxiny a jsou toxické pro rostliny, zvířata i lidi. Schopnost produkovat mykotoxiny patří mezi jejich důležitou charakteristickou vlastnost. Nejvýznamnějšími mykotoxiny, které tyto plísně produkují, jsou trichotheceny, fumonisiny a zearalenony, a mohou se dostat do potravinových produktů nebo krmiv a představovat riziko pro zdraví lidí a zvířat. Mohou vyvolat různé zdravotní problémy, jako jsou poruchy imunitního systému, a dokonce i možnost vzniku rakoviny [11; 12].

Plísně rodu *Fusarium* jsou často známé jako "polní plísně", které napadají zemědělské plodiny. *Fusarium* k jednomu z nejrozšířenějších patogenů obilí, které napadají zejména pšenici, ječmen a kukuřici [12]. Mohou způsobovat například vadnutí, hniloby a rakoviny zahradních, polních, okrasných a lesních plodin [13]. Infekce rostlin ve většině případů začíná od jejich kořenů, odkud se postupně rozšiřuje cévními svazky do nadzemních částí rostliny, plísně tímto způsobem blokuje transport vody a živin, což způsobuje vadnutí a odumírání rostlin. Choroby způsobené druhy *Fusarium*, jako je *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. proliferatum* a *F. subglutinans* vykazují příznaky skvrnitosti listů a květů, plísně listů, hniloby stonku, hniloby kořenů a suchou hnilobu [13]. Klasy obilovin po napadení těmito druhy plísní vykazují pobleďlou barvu v oblasti kolem středu, kde začíná kvetení. Silně infikovaná zrna mají růžové zbarvení a postupně uvadají [14].

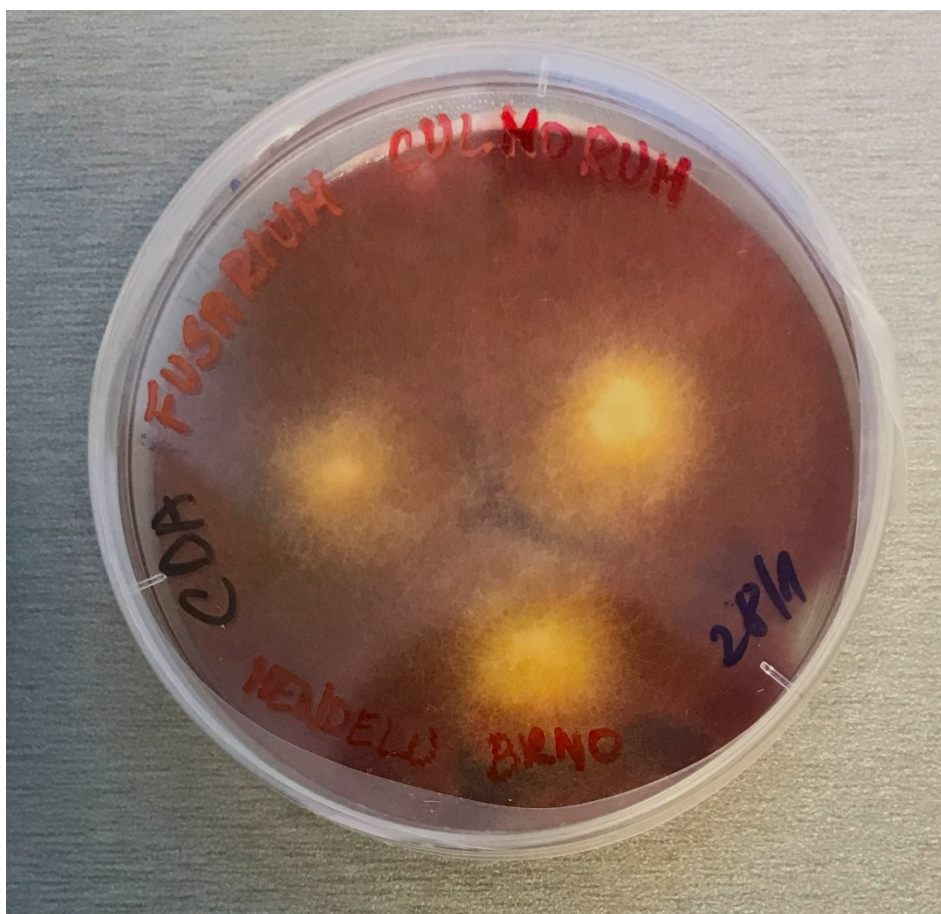
Je důležité zmínit, že některé druhy rodu *Fusarium* mohou být také patogenní pro člověka. Některé druhy rodu *Fusarium* mohou lidem způsobovat povrchové mykózy a život ohrožující invazivní infekce [15]. Zástupci plísně rodu *Fusarium* způsobují infekce, které jsou označovány jako fuzariózy. Fuzariózy vyvolávají široké spektrum infekcí od povrchových infekcí, až po různé invazivní infekce [11].

Mezi všemi patogenními druhy rodu *Fusarium*, se jako největší původce infekcí uplatňuje *F. solani*, která způsobuje přibližně polovinu infekcí. Následují *F. oxysporum* a *F. verticillioides*. Tyto plísně jsou klasifikovány jako klasické oportunní patogeny, což znamená, že napadají pouze osoby s oslabeným imunitním systémem. Pro zdravé jedince představují minimální riziko infekce [11; 12; 8].

Plísně rodu *Fusarium* napomáhají rozkladu organické hmoty v půdním ekosystému. Tyto vláknité houby mají schopnost rychle se šířit v půdě. Řadí se mezi pokročile heterotrofní mikroskopické organismy, které se vyznačují převážně saprofytickým, nebo méně často parazitickým způsobem výživy [16].

Fusarium culmorum

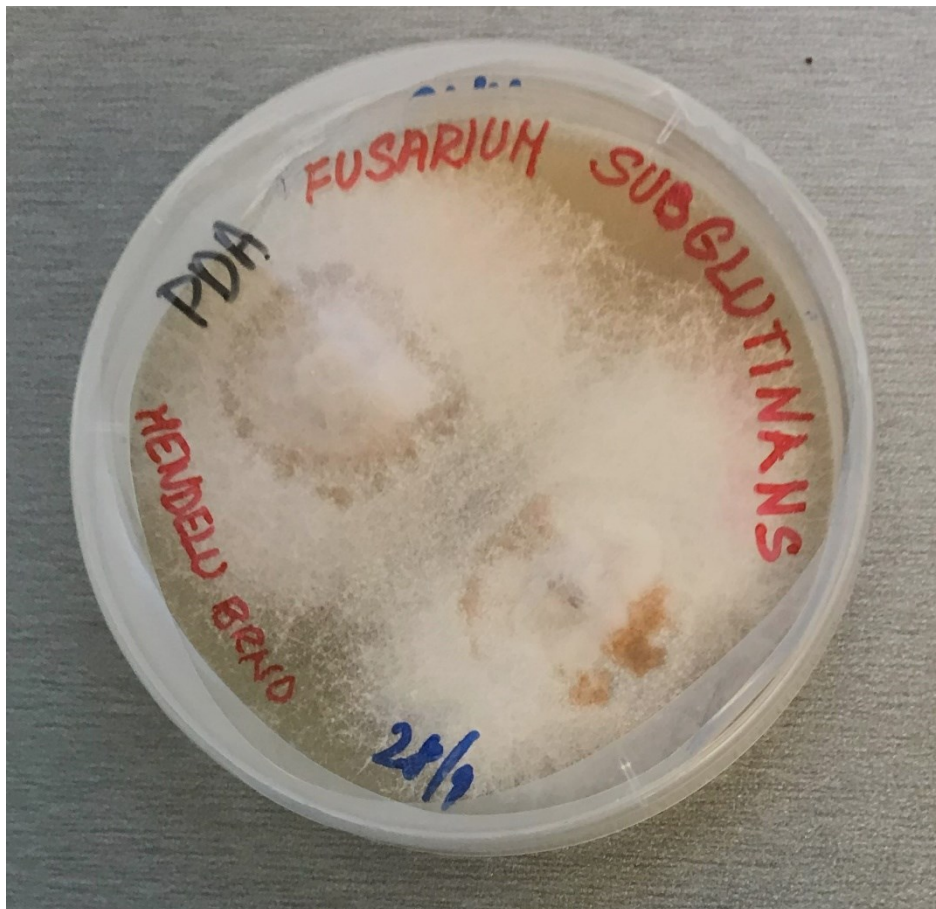
Vytváří červené, tmavě rudé až hnědé mycelium (Obrázek 4), které vyrůstá na živném médiu obsahujícím sacharózu, zdroje dusíku a oligobiogenní prvky, nazývané Czapek-Dox agar (CDA). Plíseň *F. culmorum* tvoří srpovité relativně robusní makrokonidie, tvořené typicky 3 až 5 přepážkami, které jsou jedním z hlavních diagnostických znaků tohoto druhu. U plísně *F. culmorum* je velmi vzácný výskyt mikrokonidií, což představuje další typický diagnostický znak při jejich identifikaci. Chlamydospory se často vytváří ve starších koloniích nebo v půdě. Nejčastějšími hostiteli jsou pšenice, ječmen, kukuřice a jiné obilniny, způsobuje různé choroby, jako je fuzarióza klasů (*Fusarium* head blight), hniloba kořenů a stonků. Produkují mykotoxiny, obvykle deoxynivalenol (DON) a zearalenon, které jsou původci zdravotních problémů lidí a zvířat, včetně imunosuprese a hormonálních dysregulací [6; 17].



Obrázek 4: *Fusarium culmorum* v CDA

Fusarium subglutinans

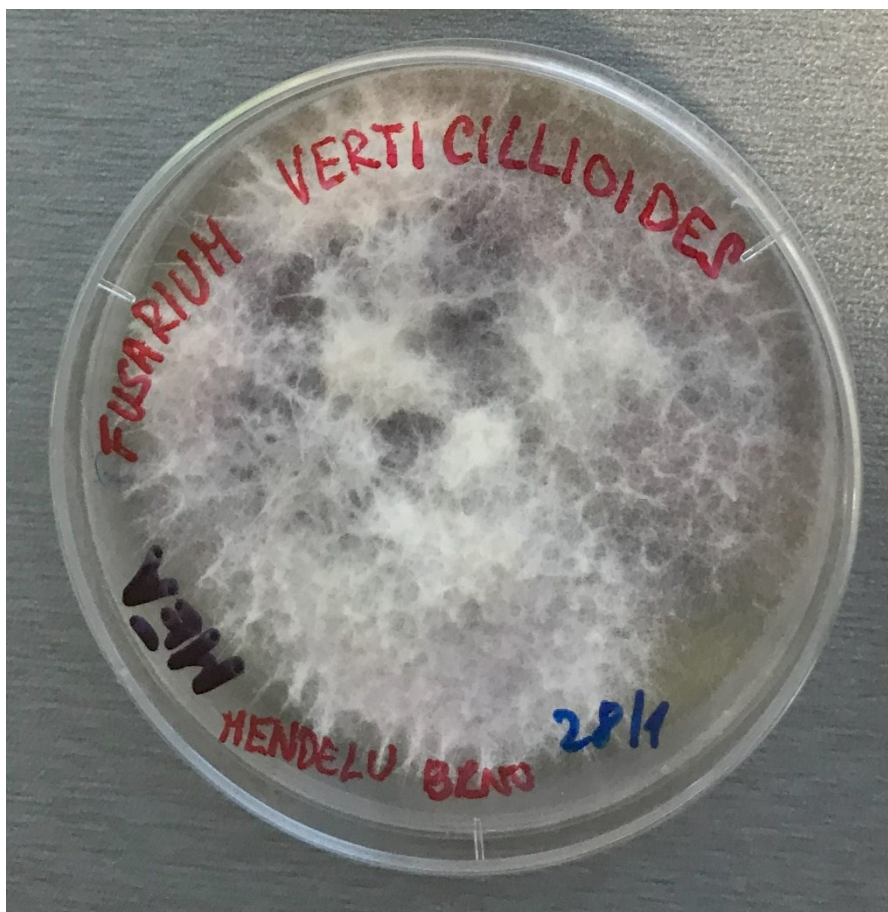
Vytváří bělavé až šedorůžové hladké mycelium (Obrázek 5), které má krémový vzhled. Běžně se kultivuje na bramborovo-dextrózovém agar (potato dextrose agar, PDA), vyskytují se spíše v chladnějších oblastech. Tvoří typické srpovité makrokonidie, které mají 3 až 5 přepážek, mikrokonidie jsou malé, elipsoidní až kulovité a obvykle jednobuněčné. Méně často jsou také produkovány chlamydospory, sloužící jako stádium pro přežití v nepříznivých podmínkách. Plíseň *F. subglutinans* infikuje různé hostitelské rostliny, především obilniny, kukuřici, ananas a některé ovocné stromy a způsobují hnilobu semen, kořenů, stonků a choroby klasů. Zmíněný druh patogenů produkuje mykotoxiny, například fusariny, které mohou být toxické pro lidi a mohou mít karcinogenní účinky [16; 18; 5].



Obrázek 5: *Fusarium subglutinans* v PDA

Fusarium verticillioides

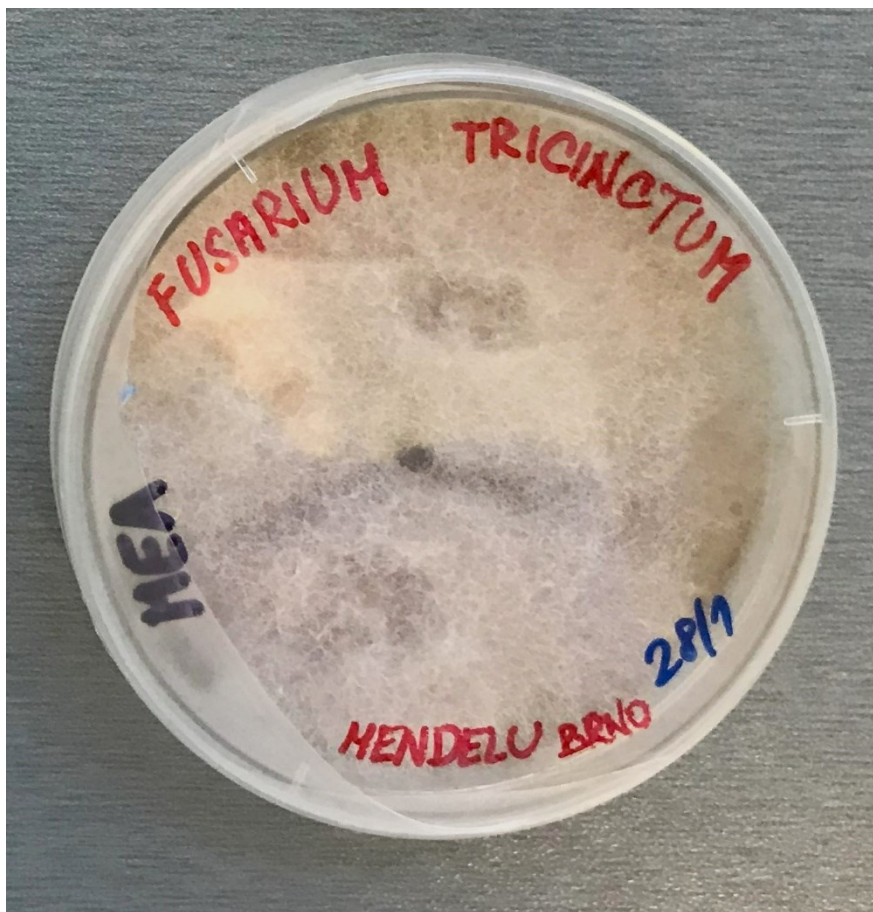
Mycelium uvedeného druhu je světle bílé až růžové a má jemný vatový vzhled (Obrázek 6). Běžně je kultivováno na agaru se sladovým extraktem (malt extract agar, MEA). *F. verticillioides* produkuje srpovité makrokonidie, které mají typicky 3 až 5 přepážek. Mikrokonidie jsou produkovány ve velkém množství. Důležitým diagnostickým znakem při identifikaci je, že plíseň *F. verticillioides* obvykle neprodukuje chlamydospory. Představuje široce rozšířený patogen, který primárně napadá kukuřici, ale i jiné obilniny a traviny. Způsobuje choroby jako je hniloba semen, stonků a klasů. Produkuje fumonisiny, které jsou nebezpečnými mykotoxiny [15; 8].



Obrázek 6: *Fusarium verticillioides* v MEA

Fusarium tricinctum

Mycelium zmíněného druhu je jemné bílé pěnitého charakteru (Obrázek 7) se žlutavým nádechem, rychle se rozrůstá a je běžně se kultivováno na agaru se sladovým extraktem (malt extract agar, MEA). *F. tricinctum* produkuje dva typy spor: makrokonidie a mikrokonidie. Některé kmeny mohou produkovat chlamydospory, které slouží k přežití v nepříznivých podmínkách. Nejčastěji napadají obilniny, zeleninu, kukuřici a okrasné rostliny. Plíseň *F. tricinctum* způsobuje choroby jako je hniloba kořenů, stonků a semen. Uvedený patogen je známý produkcí mykotoxinů, zejména trichothecenů a zearalenonu, které představují riziko pro lidské zdraví i zdraví zvířat při konzumaci kontaminovaných potravin a krmiv [17; 18].



Obrázek 7: *Fusarium tricinctum* v MEA

2.3 Možnosti identifikace plísní rodu *Fusarium*

Trendy ve způsobu identifikace patogenů se rychle mění a v průběhu posledních let došlo k vývoji řady metod, které významně zkrátily čas a zvýšily přesnost identifikace. K identifikaci patogenů se v současnosti používá řada různých metod, jako jsou kultivační metody, molekulárně biologické metody, imunologické metody, biochemické testy a spektrometrické metody [7; 19; 14].

- **Kultivační metody identifikace** představují vyhodnocení makroskopického a mikroskopického vzhledu vláknitých hub, které jsou kultivovány za optimálních podmínek na speciálních médiích. Uvedené metody jsou levné a spolehlivé, ale jejich hlavní nevýhodou je délka stanovení, která se obvykle pohybuje v řádu několika dní nebo i týdnů.
- **Molekulárně biologické metody** umožňují identifikaci na základě jejich genetických charakteristik, patří mezi ně například polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR), sekvenování DNA a DNA mikročipy. Jedná se o velmi přesné metody, které umožňují identifikovat patogeny i v malých koncentracích. Nicméně vyžadují nákladná speciální laboratorní vybavení a odborné znalosti.
- **Imunologické metody** využívají protilátky k detekci specifických antigenů nebo protilátek spojených s patogeny. Mezi uvedené metody se řadí například enzymatická imunotestovací analýza (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) a imunofluorescenční testy. Jsou to rychlé a citlivé metody, které mohou být prováděny přímo ze zkoumaných vzorků bez nutnosti kultivace. Nevýhodou představuje nutná znalost antigenů a možnost falešné positivity.
- **Biochemické testy** fungují na principu detekce specifických enzymů, metabolických drah, nebo typických reakcí, což umožňuje identifikaci na základě charakteristických vlastností pro dané patogeny. Výsledky biochemických testů mohou poskytnout rychlé výsledky, ale oproti ostatním metodám jsou obvykle méně specifické.
- **Spektrometrické metody** umožňují identifikaci patogenů na základě jejich charakteristických profilů např. proteinů, které patogeny vyprodukují. Patří sem například hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která vykazuje potenciál zastoupit nebo doplnit stávající využívané metody. Představují rychlé a citlivé metody, které ale vyžadují finančně nákladné vybavení.

Výše zmíněné metody identifikace patogenů mohou být v praxi použity samostatně nebo libovolně v kombinaci podle potřeb konkrétní analýzy a typu patogenu [7; 19; 14].

2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (Mass spektrometry, MS) se řadí mezi separační metody. MS představuje vysoce pokročilou analytickou techniku v oblasti fyzikálně-chemického výzkumu, která je charakterizována vysokou rychlostí, mimořádnou citlivostí a dynamickým vývojem. Uvedená technika nachází široké možnosti uplatnění, například v mikrobiologii, biochemii, farmakologii a medicíně. Ve farmacii hmotnostní spektrometrie poskytuje potřebné informace pro monitorování a charakterizaci léčivých látek a metabolitů v těle. V medicíně je využívána k diagnostice a výzkumu biomarkerů, což zvyšuje její důležitost jako klíčového nástroje v laboratorní analýze [1; 20]. Hmotnostní spektrometrie se neustále vyvíjí, což vede k neustálému zvyšování efektivity a schopností zmiňované analytické techniky. V dnešní době je hmotnostní spektrometrie na vysoké úrovni, systémy jsou díky automatizaci schopné vyprodukovat i tisíce spekter za den [19; 21].

2.4.1 Princip hmotnostní spektrometrie

Základním principem hmotnostní spektrometrie je tvorba iontů analytu (anorganické nebo organické sloučeniny) v plynném stavu, jejich následná separace na základě poměrů hmotností iontů k náboji těchto iontů (m/z) a jejich následná detekce. Daný proces zahrnuje několik kroků. Nejprve dochází k ionizaci analytu, vzniklé ionty jsou urychleny a vstupují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány a poté dopadají na detektor, který zaznamenává tento dopad a umožňuje kvantitativní a kvalitativní analýzu [22; 23].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí – zdroje iontů, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Další nedílnou součástí zařízení představuje systém vakuových pump, který zajišťuje vysoké vakuum pro správnou funkci přístroje a počítač s příslušným softwarem a řídí celý proces a vyhodnocení dat [1]. Schéma hmotnostního spektrometru je znázorněno níže (Obrázek 8).



Obrázek 8: Schéma hmotnostního spektrometru

2.4.2 Iontový zdroj

Iontový zdroj zajišťuje ionizaci neboli převod neutrálních molekul analytů na nabitě částice – ionty, které mohou být kladně i záporně nabitě [22; 24].

Každá látka má své charakteristické chemické vlastnosti a strukturu, které mohou ovlivnit účinnost různých ionizačních technik. V současné době není k dispozici univerzální ionizační technika a je nutné pečlivě vybírat optimální techniku ionizace pro každou konkrétní látku v závislosti na fyzikálně - chemických vlastnostech analytu. V hmotnostní spektrometrii se využívá několik druhů iontových zdrojů, například chemická ionizace, elektronová ionizace, ionizace elektrosprejem, ionizace laserem za účasti matrice a chemická ionizace za atmosférického tlaku [25].

- **Chemická ionizace (Chemical Ionization, CI)** – Ionizace molekul analytu v plynném stavu interakcí s tzv. reakčními ionty, kdy je kromě vzorku do iontového zdroje zaveden pomocný ionizační plyn, např. methan nebo amoniak. Nejprve jsou ionizovány molekuly reakčního plynu elektronovým nárazem a poté molekuly analytu. Poměrně měkká ionizační technika, která se používá pro citlivější analýzy. Tato technika je často kombinována s plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS).
- **Elektronová ionizace (Electron Ionization, EI)** – Žhavené vlákno katody emituje elektrony, které mají vysokou energii. Při srážkách těchto elektronů s atomy nebo molekulami dochází ke vzniku iontů. Vhodné pro malé těkavé molekuly a často využívaná v GC-MS.
- **Ionizace elektrosprejem (Elektrospray ionizace, ESI)** – Analyt je přiváděn kapilárou, na kterou je vloženo napětí. Vzniká proud nabitých kapiček, které díky zmlžujícímu plynu nesou na svém povrchu množství nábojů. Rozpouštědlo se postupně odpařuje, což vede ke zvýšení povrchového náboje kapiček. Následně se kapičky rozpadají na menší kapénky, které rozdělují

původní náboje. Tento cyklus se opakuje, dokud nezůstanou pouze ionty analytu. Jde o měkkou ionizační techniku vhodnou pro makromolekuly, protože fragmentace molekul analytu je zde minimální. Uvedená technika se často používá ve spojení s HPLC.

- **Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)** – Analyty jsou ionizovány pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice. Ionizace spočívá v interakci směsi analytu s matricí a laserovým paprskem. Laserový paprsek zasáhne matrici, energie paprsku způsobí desorpci molekul matrice a vzorku za vzniku iontů. Ionty přechází dále do hmotnostního analyzátoru. Ideální pro analýzu velkých biomolekul a polymerů.
- **Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)** – U této techniky je analyt převeden do plynné fáze a následně je zasažen proudem ionizujících plynů za atmosférického tlaku. Daný proces vytváří ionty analytu. Představuje jemnější způsob ionizace než např. EI, což vede k citlivější identifikaci.

Různé druhy iontových zdrojů umožňují analýzu široké škály látek v různých typech vzorků a každý má své výhody a omezení v závislosti na jejich použití [22; 25; 26; 27;]

2.4.3 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor je zodpovědný za separaci iontů podle hodnoty m/z . Mezi možné analyzátory, které se využívají v hmotnostní spektrometrii, patří iontová past, kvadrupólový analyzátor, analyzátor doby letu nebo orbitální past [22; 28].

- **Iontová past (Ion trap, IT)** - Je tvořena prstencovou elektrodou a dalšími elektrodami. Dochází ke zvyšování frekvence prstencové elektrody, tím se ionty s určitými hodnotami m/z vychýlí ze své dráhy a začnou být nestabilní. Změna napětí elektrody způsobí vypuzení iontů podle jejich m/z z IT.
- **Kvadrupólový analyzátor** – Složený ze soustavy čtyř tyčí, mezi kterými ionty oscilují. V daném okamžiku ionty s určitou hodnotou m/z dosáhnou stabilní oscilace, projdou kvadrupólem a dosáhnou detektoru. Všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu, jedná se o tzv. hmotnostní filtr.
- **Orbitální past (orbitrap)** - Ionty se pohybují okolo středové elektrody. Svazek iontů s určitým potenciálem začne oscilovat. Po určité době v prostoru orbitální pasti jsou ionty vypuzeny. Snímá se frekvence oscilace iontů a z ní se pomocí Fourierovy transformace vytváří hmotnostní spektrum.
- **Analyzátor doby letu (Time-of-Flight, TOF)** byl představený L. G. Stevensonem v roce 1946 Měří se doba letu iontů od iontového zdroje k detektoru. Princip TOF analyzátoru je postaven na tom, že ionty s různými hodnotami m/z překonají dráhu od iontového zdroje po detektor za různý čas.

Právě analyzátor TOF je nejčastěji spojován s technikou MALDI, jedná se pak o techniku MALDI - TOF MS [20; 25; 29; 30].

2.4.4 Detektor

Rozdělené ionty opouští hmotnostní analyzátor a dopadají na detektor, který slouží k zachycení a kvantifikaci iontů. Rozlišují se tři základní typy detektorů. Prvním typem jsou bodové iontové kolektory, které detekují všechny dopadající ionty v jednom místě, ale v různém čase. Řadí se sem elektronový násobič a fotonásobič. Druhým typem jsou polové kolektory, které detekují všechny

dopadající ionty ve stejném čase, ale na různých místech. Patří sem mikrokanálový destičkový detektor (microchannel plate detector, MCP), který se využívá zejména u zařízení s analyzátozem TOF. Třetím typem jsou detektory využívané pro FT-ICR MS a MS s orbitrapem, které generují slabý elektrický proud při přiblížení iontů ke dvěma kovovým deskám umístěným v analyzátoru [1; 31; 27].

Výsledné hmotnostní spektrum je vytvořeno pomocí počítačového softwaru. Jedná se o grafické zobrazení, které ukazuje, jaké typy iontů jsou ve vzorku přítomny. Každý pík v hmotnostním spektru reprezentuje jednu hodnotu m/z [1; 28; 31].

2.5 Technika MALDI-TOF MS

Zkratka MALDI-TOF pochází z anglického překladu Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, tedy desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice s analyzátozem doby letu TOF. MALDI-TOF MS představuje spojení měkké ionizační techniky MALDI s analyzátozem doby letu TOF [22; 32].

Je to pulzní ionizační technika, kde vznikají kladně a záporně nabitě částice, mohou vznikat i vícenásobně nabitě ionty. Tato technika se používá k určení molekulové hmotnosti látek.

Jedná se o poměrně mladou techniku, která je schopna poskytnout analytické informace z velmi malého množství vzorku a je možné detekovat molekuly o velké molekulové hmotnosti – desítky až stovky tisíc Da, např. bílkoviny, sacharidy, lipidy, syntetické polymery atd. [20].

2.5.1 Historie MALDI

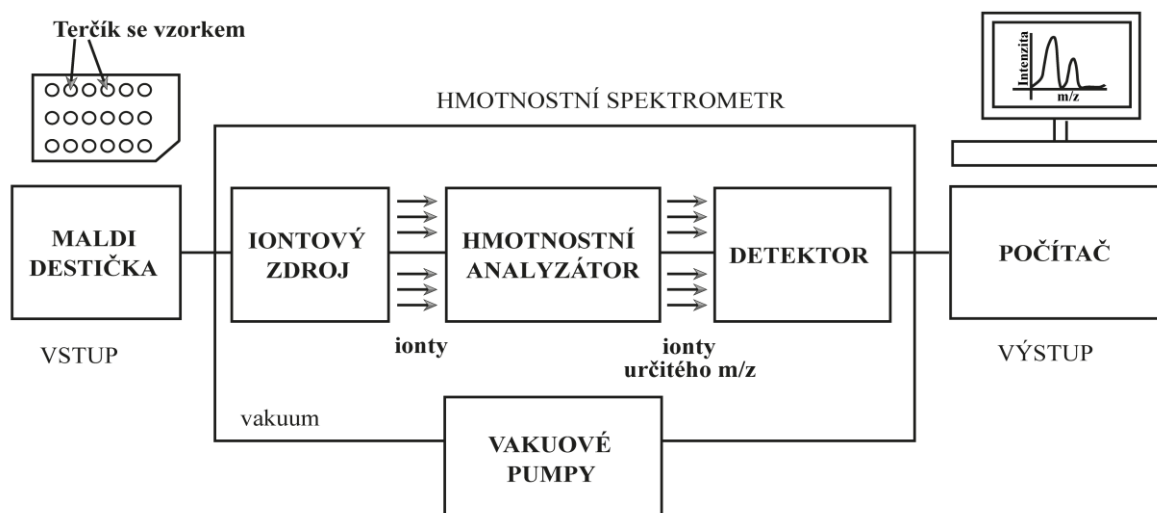
Průkopníky techniky MALDI byli němečtí vědci Franz Hillenkamp a Michael Karas, kteří v roce 1985 představili techniku měkké ionizace. Zjistili, že aminokyselina alanin může být snadno ionizována, pokud je smíchána s aminokyselinou tryptofanem a ozářena laserovým paprskem, kdy tryptofan absorboval energii laseru a umožnil tak šetrnou ionizaci alaninu. Hillenkamp a Karas techniku měkké ionizace dále zdokonalovali a v roce 1987 představili její inovaci, kdy díky použití matrice provedli ionizaci velkých molekul. Pro zmiňovanou techniku zavedli název MALDI [33].

Současně se o techniku měkké ionizace zajímal japonský vědec Koichi Tanaka se svým týmem s cílem vylepšit ionizaci velkých molekul pomocí dusíkového laseru. Výsledkem jejich práce byla úspěšná ionizace proteinu karboxypeptidázy A o velikosti 35 kDa. Tanaka pro ionizaci použil jiný přístup než Karas a Hillenkamp [34]. K ionizaci analytu využil nanočástice kobaltu suspendované v glycerolu. Přestože se v současnosti téměř výhradně používá přístup zavedený Karasem a Hillenkampem, byla Koichi Tanakovi v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii právě za přínos v oblasti vývoje měkkých ionizačních technik

pro hmotnostně-spektrometrickou analýzu makromolekul [21, 33].

2.5.2 Princip MALDI

MALDI je měkká ionizační technika, kdy ionizovaná molekula získává pouze malé množství energie a vzniká malé množství fragmentů oproti tzv. tvrdým ionizačním technikám. Princip techniky MALDI (Obrázek 9) je založen na ozáření vzorku smíchaného s matricí laserem. Matrice, která je v nadbytku oproti vzorku, absorbuje většinu energie dopadajícího laserového paprsku a tím chrání analyt před jeho rozkladem (fragmentací). Zároveň umožňuje přeměnit energii laserového paprsku na excitační energii, která vede k desorpci analytu a matrice z povrchu směsi. Matrice umožňuje ionizaci molekul analytu buď jejich protonací (vznikají kationty) nebo deprotonací (vznikají anionty). V MALDI je možná i tvorba jiných než protonovaných iontů (např. vznik Na^+ nebo K^+ iontů), případně i více typů iontů, což je ovlivněno složením analyzovaného vzorku [22; 30; 21].



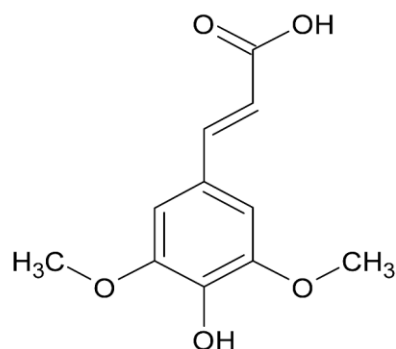
Obrázek 9: Schéma přístroje MALDI-TOF

2.5.3 Matrice v MALDI

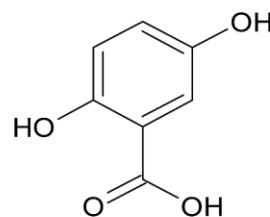
Matrice je zpravidla nízkomolekulární organická molekula, jejíž hlavní úlohou je absorbovat energii laserového paprsku při určité vlnové délce. Energie fotonů laseru musí tedy odpovídat energii potřebné k excitaci matrice. Matrice musí být oproti analytu v nadbytku a chrání tak analyt před rozkladem neboli fragmentací. Zároveň přeměňuje energii laseru na excitační energii. Excitační energie umožňuje směsi analytu s matricí desorpci z povrchu této směsi. Matrice musí být stabilní, netěkavá, rozpustná ve stejných rozpouštědlech jako analyt a nesmí reagovat s daným analytem [1; 22].

V technice MALDI se používá celá řada matric, výběr vhodné matrice závisí na typu analytu. Každá matrice je vhodná pro různé druhy molekul. Volba vhodné matrice může např. výrazně zlepšit ionizační výtěžek, lze podpořit nebo naopak potlačit tvorbu určitých typů iontů atd. Mezi nejznámější matrice patří kyselina sinapová (SA), α -kyano-4-hydroxyskořicová (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoová (DHB) a ferulová (FA) (Obrázek 10) [20].

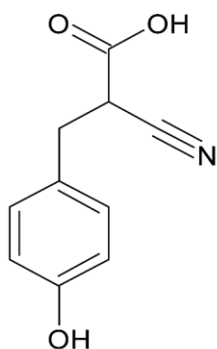
Studie ukázaly, že matrice SA, CHCA a FA jsou užitečné pro detekci proteinů, zatímco matrice jako je DHB je vhodnější pro analýzu glykoproteinů a glykopeptidů. Výběr matrice ovlivňuje i velikosti analyzovaných molekul. Matrice CHCA a DHB je běžně používána pro detekci iontů o nižší molekulové hmotnosti. Pro detekci molekul o vyšší molekulové hmotnosti je nejčastěji používána SA [22; 23; 35; 36].



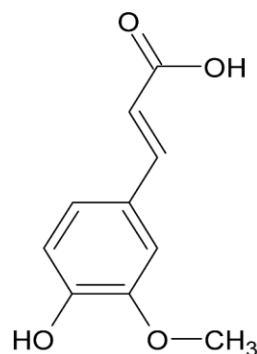
Kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxybenzoová
Kyselina sinapová, SA



Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DHB



Kyselina α -kyano-4-hydroxybenzoová
CHCA



Kyselina 4-hydroxy-3-metoxyskořicová
FA

Obrázek 10: Nejčastěji využívané matrice v MALDI

2.5.4 Hmotnostní analyzátor TOF

MALDI lze spojit s prakticky všemi hmotnostními analyzátory. Nejčastěji je však spojeno s TOF analyzátozem [28]. TOF je tvořen vakuovanou trubicí o určité délce a separuje ionty podle poměru m/z [23]. Molekuly, které jsou desorbované a ionizované, jsou urychleny vlivem silného elektrického pole (20–30 kV) přes urychlovací mřížku do analyzátoru a jakmile doletí na konec letové trubice, narazí na detektor [31; 36].

Iontům s vyšší hodnotou m/z trvá déle, než dorazí k detektoru, proti tomu ionty s nižší hodnotou m/z urazí stejnou vzdálenost za kratší dobu [37]. Hodnotu m/z lze spolehlivě určit na základě zaznamenané doby letu podle následující rovnice:

$$m/z = 2V \left(\frac{t}{l} \right)^2$$

Kde m je hmotnost ionizované molekuly a z je velikost náboje, V je potenciál (urychlovací napětí), t je doba letu iontu a l je délka letové trubice (dráha letu iontu).

Výhody TOF spočívají například v teoreticky neomezeném rozsahu m/z , extrémně krátké době záznamu spektra ($\sim 10^{-4}$ s), v jednoduchosti a vysoké propustnosti iontů, což vede k vysoké citlivosti detekce. Analyzátor TOF umožňuje zaznamenávání celého spektra pro každý pulz laseru [22; 28; 31].

2.5.5 Detektory v MALDI-TOF MS

Pro analýzu pomocí MALDI-TOF se běžně využívají dva druhy detektorů. Používá se mikrokanálový destičkový detektor (MCP) nebo detektor se sekundárním elektronovým násobičem (SEM – secondary electron multiplier). Letící ionty vyvolají uvolnění elektronů z povrchu detektoru, tyto elektrony jsou poté znásobeny buď pomocí mikrokanálek nebo soustavou dynod [1, 31; 27].

V praxi se spektrum získává průměrováním spekter generovaných z určitého počtu laserových pulzů [1; 28; 31].

2.6 Identifikace mikroorganismů technikou MALDI-TOF MS

Jedním z možných využití MALDI-TOF MS je identifikace mikroorganismů (MO). Každý mikroorganismus má charakteristické hmotnostní spektrum, které se využívá k identifikaci jeho určitého rodu, druhu i kmene stejného druhu [38].

Každý MO uvolňuje ze své buňky specifické spektrum vysokomolekulárních látek, převážně bílkoviny, dále to mohou být glykoproteiny, polysacharidy atd., které jsou charakteristické pro daný rod, druh, či kmen a vytvářejí charakteristické identifikační molekulární otisky, takzvané fingerprinty (tzv. otisky prstů). Hmotnostní spektrum získané ze vzorku MO obsahuje soubor signálů s různou intenzitou, tzv. peak list. Tento soubor (peak list) je následně srovnáván pomocí softwaru s referenčními kmeny v databázi. Na základě shody naměřených dat s daty v databázi a je identifikován daný mikroorganismus s určitou pravděpodobností, která je vyjádřena číselnou hodnotou (tzv. identifikační skóre) [37; 24; 39].

Hmotnostní spektra zachycují přítomnost biomolekul, například proteinů, které jsou v MO přítomny. Vliv na výsledky může v malé míře mít i druh použitého kultivačního média k jejich pěstování, délka kultivace. Značný vliv má pak to, jakým způsobem byl vzorek připraven. Základním problémem při používání metody MALDI-TOF MS k identifikaci mikroorganismů je reprodukovatelnost [22; 29; 15].

Výhodou MALDI je, že umožňuje velmi rychlou identifikaci patogenů, často během několika minut až hodin, což je mnohem efektivnější než využívané tradiční kultivační metody, které mohou trvat několik dní nebo dokonce týdnů. Je schopná detekovat i nízké koncentrace patogenů ve vzorku, což je užitečné při diagnostice infekcí v raných stádiích. Dále poskytuje detailní informace o identifikovaných patogenech, včetně jejich specifických biomarkerů a charakteristik. Technika MALDI má však i své nevýhody, nedokáže spolehlivě identifikovat více mikroorganismů v jedné směsi. Dalším problémem může být identifikace některých blízkých příbuzných druhů MO [22; 23; 37].

2.6.1 Identifikace plísní

Jednou z prvních studií, které použily MALDI k identifikaci vláknitých hub, byla práce týmu Welham et al. Ve zmiňované studii byly zkoumány plísňe rodu *Penicillium*, *Scytilidium* a *Trichophyton* či *Aspergillus*. Hmotnostní spektra byla získána pomocí laserové ablace buněčné stěny spor, což bylo způsobeno vlivem působení kyselých roztoků matric. Dále se diskutovalo o potenciálním využití této metody v oblastech medicíny, fytopatologie a biotechnologie [35].

Problematika analýzy vláknitých hub pomocí MALDI-TOF MS je přehledně popsána v článku Santose a spol. (2010). Využití MALDI bylo navrženo pro optimalizaci kontroly kvality čínských léčivých hub a pro výhody, které MALDI nabízí oproti PCR [39].

Studie od Penghou Gou a spol. (2022) poukazují na vynikající výkon identifikace rodu *Fusarium* pomocí MALDI-TOF MS s úspěšností 91,6 %, a zaměřují se na identifikaci klinických kmenů rodu *Fusarium* [18].

Správná identifikace plísní je klíčová pro provádění preventivních opatření k minimalizaci rizika kontaminace potravin, ochraně životního prostředí nebo zamezení vzniku zdravotních problémů. Nachází uplatnění například v potravinářství, ekologii nebo v biotechnologii [40]. Identifikaci patogenů plísní znesnadňuje mnoho faktorů, zejména jejich složitá taxonomie. V současné době se odhaduje, že říše hub zahrnuje asi 1,5 milionu druhů, z nichž byla identifikována méně než jedna třetina a jejich rozmanitost se neustále zvyšuje [6; 15].

Identifikace plísní zahrnuje několik kroků, kdy celý proces začíná odběrem vzorku. Důležitou roli hraje kvalitní odběr vzorku. Část mycelia plísně se přenáší do roztoku, následně se používají různé postupy při přípravě vzorku, jako je například centrifugace, třepání, promytí a odstranění nadbytečného materiálu. Po předchozích úpravách se ze směsi zpravidla odebere supernatant, který se spolu s matricí aplikuje na MALDI destičku [15; 40; 29].

MALDI-TOF MS patří v současné době mezi nejrozšířenější ionizační techniky pro analýzu MO [23].

Hmotnostní spektra buněk a proteinů mohou být využity pro rychlou identifikaci řady rostlinných patogenů a pro pravidelnou kontrolu plodin na přítomnost patogenů [41].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vzorky plísní a obilí

Kmeny a vzorky obilí, které byly použité k analýzám v bakalářské práci byly získány v rámci spolupráce Ústavu analytické chemie AV ČR a Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Konkrétně byly použity 4 druhy z rodu *Fusarium*.

- Plíseň *Fusarium culmorum*, CDA
- Plíseň *Fusarium subglutinans*, PDA
- Plíseň *Fusarium verticillioides*, MEA
- Plíseň *Fusarium tricinctum*, MEA
- Napadený sladovaný ječmen

3.2 Použité chemikálie

- Kyselina 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzová (kyselina sinapová, SA, LaserBio Labs, Francie)
- Kyselina 2,5-dihydroxybenzoová (DHB, LaserBio Labs, Francie)
- Kyselina α -kyano-4-hydroxybenzová (CHCA, LaserBio Labs, Francie)
- Kalibrační směs pro MALDI-TOF Mix2 (LaserBio Labs, Francie)
- Acetonitril, ACN (Darmstadt, Německo)
- Kyselina trifluoroctová, TFA (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hemoglobin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Transferin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Cytochrom c (Sigma-Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda

3.3 Přístroje

- Analytické váhy (Steinberg Systems)
- Jednokanálové pipety s variabilním objemem (Eppendorf)
- Mikrocentrifuga (Hettich MIKRO 185)
- Hmotnostní spektrometr MALDI-TOF/TOF (AB Sciex TOF/TOF 5800 System) se softwarem Data Explorer
- Počítač s programem Adobe Illustrator
- Třepačka (Velp Scientifica)
- Ultrazvuková lázeň (Elmasonic)
- Vortex ZX3 (Velp Scientifica)

3.4 Laboratorní pomůcky a materiál

- MALDI destička
- kádinky, skleněné vialky, Eppendorf zkumavky, stojany na zkumavky, váženky, lodičky, sterilní kličky
- Pipetovací špičky (Eppendorf)

3.5 Příprava vzorku

Příprava vzorků před samotnou analýzou je nejdůležitějším krokem v celé analýze, kdy výběr vhodné matice hraje klíčovou roli. Existuje celá řada způsobů přípravy vzorků pro MALDI analýzy včetně jejich nanášení na destičku [1; 31].

3.5.1 Příprava roztoků matric

- **Roztok kyseliny sinapové (3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová, SA)**

Byl připraven roztok SA o koncentraci 20 mg/ml. Matrice byla rozpuštěna v roztoku obsahujícím 60 % ACN, 39,9 % vody a 0,1 % TFA.

- **Roztok kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové (CHCA)**

Byl připraven roztok CHCA o koncentraci 10 mg/ml. Matrice byla rozpuštěna v roztoku obsahujícím 50 % ACN, 49,9 % vody a 0,1 % TFA.

- **Roztok kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové (DHB)**

Byl připraven roztok DHB o koncentraci 10 mg/ml. Matrice byla rozpuštěna v roztoku obsahujícím 20 % ACN, 79,9 % vody a 0,1 % TFA.

3.6 Optimalizace metody

V tomto experimentu byly použity tři matrice: matrice SA, CHCA a DHB. Pro analýzu byly zvoleny čtyři standardní proteiny: hovězí sérový albumin (BSA), hemoglobin, transferin a cytochrom c (viz. Tabulka 1). Vzorky zmíněných proteinů byly připraveny o koncentraci 1 mg/ml. Nanášení vzorků na MALDI destičku bylo provedeno pomocí sendvičového způsobu nanášení (viz dále), přičemž bylo aplikováno 0,5 μ l každého vzorku.

Tabulka 1 : Podrobnější informace o použitých proteinech

standard	Izolováno z tkáně	Molekulová hmotnost [kDa].
Albumin (BSA, bovine serum albumin)	Hovězí sérum	66,5
Hemoglobin	Hovězí krev	64,5
Transferin	Hovězí plazma	79,6
Cytochrom c	Koňské srdce	12,4

3.7 Příprava vzorků plísni rodu *Fusarium*

Příprava vzorků pro analýzu byla jednoduchá a efektivní. Pomocí sterilní očkovací kličky byla odebrána část vykultivovaného mycelia plísně rodu *Fusarium*, která byla následně rozsuspendována v 50 μ l roztoku SA. Obsah mikrozkuhavky byl důkladně promíchán pomocí vortexu a následně umístěn na 5 minut do ultrazvukové lázně, aby došlo k důkladné extrakci proteinů z buněk plísni. Na MALDI destičku bylo následně aplikováno 0,5 μ l připraveného vzorku.

Pro dosažení co nejlepších výsledků při analýze vzorků plísně *Fusarium* byly v rámci optimalizace testovány tři způsoby nanášení vzorku plísně a matrice:

- **Sendvičového nanášení**

Princip tohoto způsobu nanášení spočívá ve vrstvení, což zahrnuje několik kroků. Nejdříve byl na terčík nanesen roztok čisté matrice, který vytvořil základní vrstvu a následně po zaschnutí byl připraven roztok směsi matrice a vzorku, který byl smíchán v poměru 1:1. Vytvořená směs byla nanesena znovu na stejný terčík a po zaschnutí terčíku bylo provedeno finální překrytí roztokem čisté matrice. Daný postup zajišťoval rovnoměrné a spolehlivé pokrytí terčíku. Sendvičová metoda nanášení byla v rámci provádění dané práce využívána ve většině případů, protože umožňovala získat stabilní a reprodukovatelné výsledky.

- **Nanášení v poměru 1:1 matrice ku vzorku**

Nejprve byly stejné objemy matrice a vzorku smíchány v mikrozkuhavce eppendorf. Poté byly oba roztoky důkladně promíchány. Vzniklý roztok obsahující v poměru 1:1 jak matici, tak vzorek, byl nanášen na MALDI destičku. Tímto postupem bylo zajištěno rovnoměrné rozložení matrice a vzorku na terčíku, což bylo klíčové pro získání spolehlivých výsledků analýzy.

- **Překrytí vzorku maticí**

Posledním způsobem nanášení matrice a vzorku bylo překrytí vzorku maticí. Nejprve byl nanesen roztok analyzovaného vzorku na terčík umístěný na MALDI destičce. Po zaschnutí roztoku vzorku na něj byla aplikována další vrstva roztoku obsahujícího čistou matici. Uvedený postup umožnil vytvoření ochranné vrstvy matrice nad vzorkem, což bylo užitečné při optimalizaci podmínek ionizace a snižování možného vlivu okolních faktorů na získané výsledky analýzy.

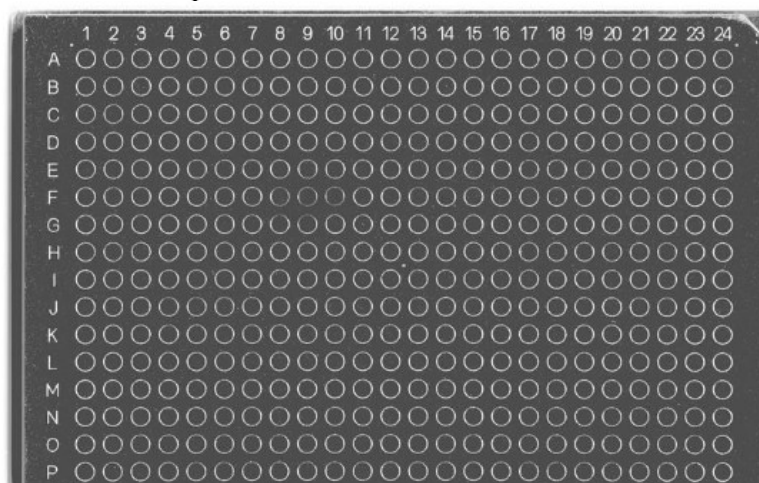
3.8 MALDI analýza

Měření probíhalo pomocí hmotnostního spektrometru AB Sciex TOF/TOF 5800 Systém (Obrázek 11). Měření bylo uskutečněno v pozitivním iontovém módu při lineárním uspořádání. Každý vzorek byl aplikován na dva terčíky na MALDI destičce a bylo provedeno několik měření z každého terčíku. Na terčíky se nanášelo 0,5 μ l roztoků.



Obrázek 11: Hmotnostní spektrometr AB Sciex TOF

Vzorek analytu s matricí byl nanášen na MALDI destičku způsobem uvedeným výše. Na jejím povrchu byly vyznačeny kruhové zářezy, tzv. terčíky, které ohraničují místo kam byl aplikován vzorek a matrice. Jednotlivé terčíky udržují vzorek na přesně definovaném místě a tím brání rozlití nebo smíchání sousedních vzorků. Vzorek se nechal zaschnout, kdy došlo ke společné krystalizaci vzorku a matrice. MALDI destička (Obrázek 12) bývá nejčastěji vyrobena z nerezové oceli, musí být inertní vůči nanesené matrici a použitým rozpouštědlům. Destička byla před nanesením vzorku vždy důkladně vyčištěna od prachu a jiných nečistot, které by mohly ovlivnit výsledek analýzy. Po nanesení vzorku byla destička se vzorkem vložena do hmotnostního spektrometru.



Obrázek 12: Používaná MALDI destička

Před analýzou vzorků byl hmotnostní spektrometr kalibrován pomocí kalibrační směsi proteinů ProMix2, podrobné složení je uvedeno v Tabulka 2. Naměřená data byla vyhodnocena pomocí softwaru Data Explorer.

Tabulka 2: Složení kalibrační směsi ProMix2

ProMix 2 (standard)	Náboj (n)	[M + nH]ⁿ⁺
Cytochrom c	+1	12361,12
	+2	6181,06
Myoglobin	+1	16952,50
	+2	8476,75
Trypsinogen	+1	23981,99
	+2	11991,50

3.8.1 Analýza napadeného sladu

Nakonec byly připraveny vzorky z napadeného sladovaného ječmene plísní rodu *Fusarium* pro analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Bylo naváženo 0,5 g napadeného sladovaného ječmene. K navážce bylo přidáno 0,9 ml ACN a 0,6 ml TFA o koncentraci 0,1 %. Vzniklý roztok byl po dobu jedné minuty promíchán pomocí vortexu. Byly provedeny dva způsoby přípravy vzorku. První vzorek byl po promíchání umístěn na 5 minut na třepačku. Druhý vzorek byl připraven stejným způsobem, ale po promíchání na vortexu byl umístěn na 5 minut do ultrazvukové lázně. Na analýzu bylo použito 0,5 µl supernatantu, který byl získán po centrifugaci obou vzorků po dobu 3 minut při 5000 g, který byl na MALDI destičku aplikován sendvičovým způsobem.

Další experiment byl založený na porovnání stanovení dvou vzorků napadeného sladovaného ječmene za pomoci matrice SA a CHCA. Na analýzu bylo použito 0,5 µl supernatantu, který byl získán po centrifugaci obou vzorků po dobu 3 minut při 5000 g a byl na MALDI destičku aplikován sendvičovým způsobem.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

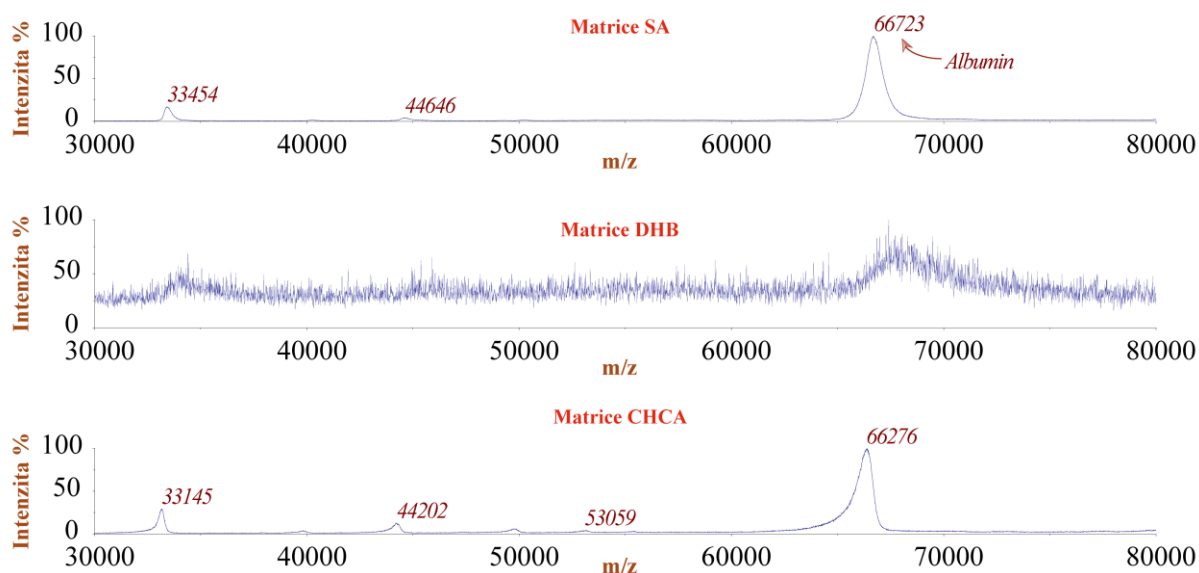
Identifikace metodou MALDI-TOF MS byla provedena u celkem 4 druhů plísně rodu *Fusarium*, konkrétně u *F. culmorum*, *F. tricinctum*, *F. subglutinans* a *F. verticillioide*. Proteiny plísní rodu *Fusarium* byly při provedených MALDI analýzách detekovány v rozmezí od 2 do 35 kDa

Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum. Na ose y je intenzita signálu a osa x znázorňuje hodnotu m/z. Výsledné hmotnostní spektrum obsahuje píky, které odpovídají molekulovým hmotnostem iontů přítomných ve vzorku. Identifikace molekul neznámého vzorku probíhá porovnáním získaných hmotnostních spekter s hmotnostními spektry známých látek, která mohou být buď uložena v databázích, nebo získána pomocí experimentálních měření. V této studii byla identifikace plísní rodu *Fusarium* ve vzorcích napadeného obilí a sladu provedena na základě porovnání referenčních spekter, která byla získána analýzou čtyř uvedených druhů kultivovaných plísní.

4.1 Vyhodnocení použitých matic

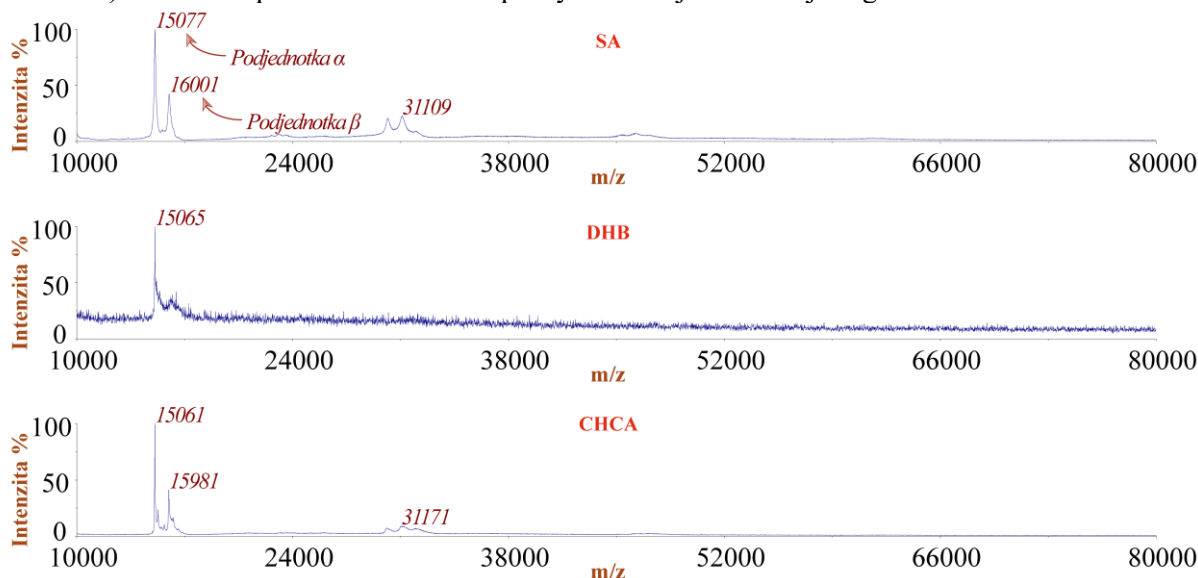
Použitý druh matrice a styl nanášení matrice a vzorku má zásadní vliv na kvalitu hmotnostních spekter získaných pomocí MALDI-TOF, proto se část experimentů věnovala i optimalizaci použité matrice a optimalizaci metody nanášení. V této bakalářské práci byla provedena analýza čtyř standardních proteinů za použití tří různých matic: SA, DHB a CHCA, kde bylo porovnán jejich vliv na MALDI analýzu vybraných proteinů. Pro všechny tyto experimenty byl použit stejný postup přípravy matic, proteinů a způsobů nanášení vzorků, aby byly zajištěny srovnatelné podmínky mezi jednotlivými analýzami.

Matrice SA se prokázala jako nejefektivnější pro analýzu hovězího sérového albuminu (Obrázek 13). Signál byl intenzivní, jasně detekovaný, což umožnilo jasnou identifikaci albuminu. V případě použití matrice DHB se nepodařilo albumin detekovat, spektrum obsahovalo pouze šum. CHCA matrice poskytla spektrum, které bylo kvalitativně srovnatelné s SA, ale signál dosahoval nižší intenzity.



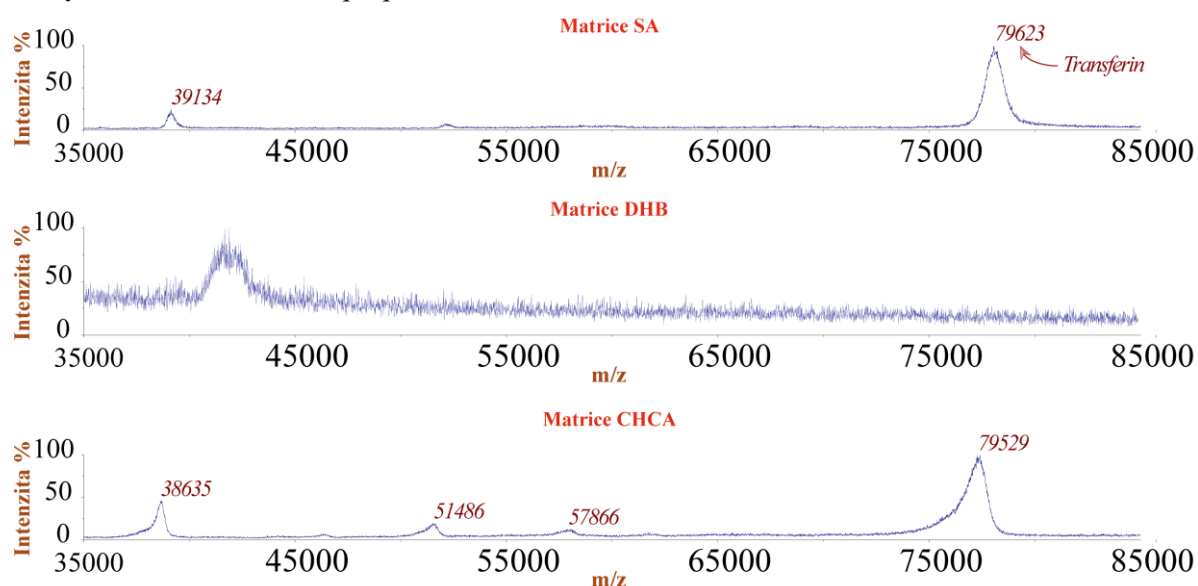
Obrázek 13: Porovnání použití různých matic u albuminu

Další byla analýza hemoglobinu, která byla úspěšná, jelikož se při každé z těchto analýz se podařilo hemoglobin detekovat, respektive jeho podjednotky. Hemoglobin je velký protein o molekulové hmotnosti přibližně 64,5 kDa, který je na hmotnostním spektrometru detekován jako dvě podjednotky, alfa a beta, na které se během ionizace rozpadá. Uvedené podjednotky mají molekulové hmotnosti přibližně 15,1 kDa pro alfa podjednotku a 15,9 kDa pro beta podjednotku. U analýzy s SA a CHCA byly identifikovány obě podjednotky a u měření za použití DHB byla identifikována jedna podjednotka (Obrázek 14). Detekce s použitou maticí SA poskytovala nejintenzivnější signál.



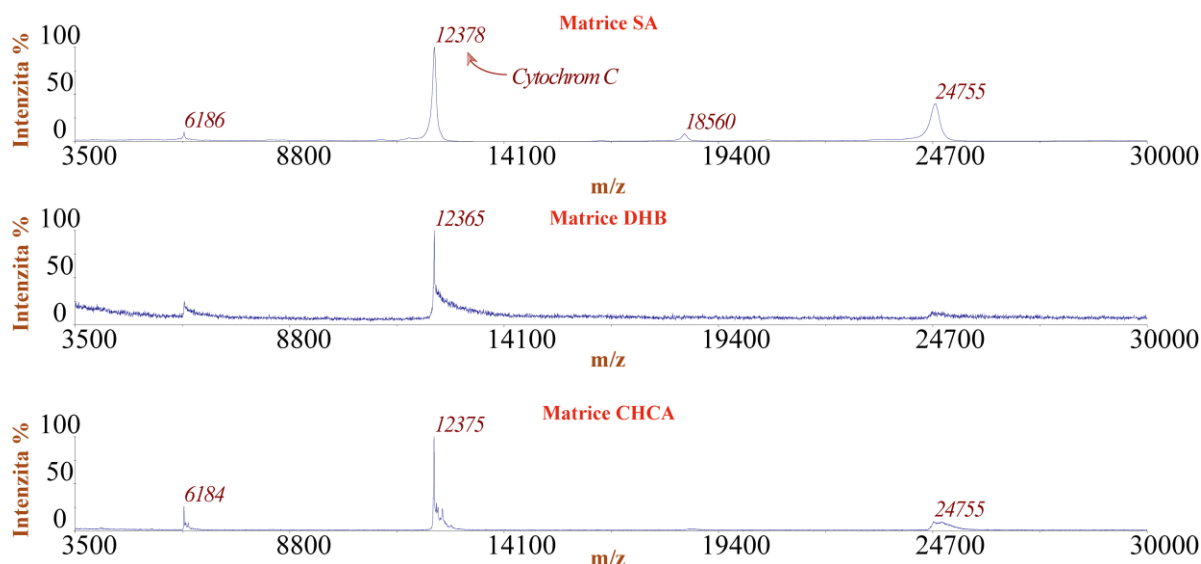
Obrázek 14: Porovnání použití různých matic u hemoglobinu

Transferin byl detekován při použití matic SA a CHCA, u matrice DHB došlo k úplné absenci měřitelných signálů (Obrázek 15). Matrice SA poskytla spektrum s dobře detekovaným signálem transferinu, který odpovídal molekulové hmotnosti daného proteinu. Analýza s maticí CHCA také detekovala transferin, nicméně jeho intenzita nebyla tak vysoká jako při použití SA. Proces krystalizace vzorku s DHB nemusí být optimální pro proteiny velikosti transferinu, což může být důvod, proč nebyl transferin detekován při použití této matrice.



Obrázek 15: Porovnání použití různých matic u transferinu

Standardní protein cytochrom c představuje menší protein, který je obvykle dobře ionizován a detekován s vyšší účinností než větší proteiny. Uvedený fakt potvrzuje i srovnání jeho detekce za použití třech rozdílných matic, kdy byl jasně detekován ve všech třech případech (Obrázek 16). Cytochrom c je kompatibilní s mnoha maticemi používanými v technice MALDI-TOF a vykazuje schopnost poskytovat snadno identifikovatelný, ostrý a intenzivní signál, proto bývá často součástí komerčních kalibračních směsí.

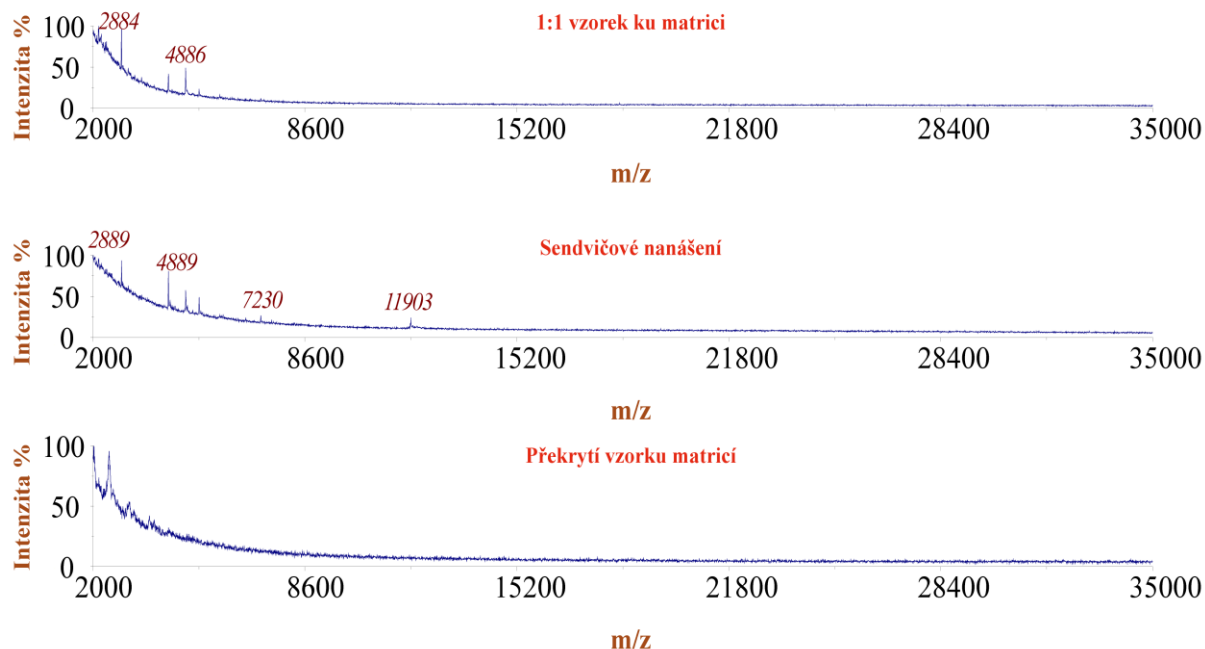


Obrázek 16: Porovnání použití různých matic u cytochromu c

Matrice SA se ukázala jako nejvhodnější pro analýzu, poskytovala nejkvalitnější spektra, což je v souladu s předpoklady. Spektra vykazovala vysokou intenzitu signálu. SA je často preferovaná díky své schopnosti poskytovat čistá a dobře definovaná spektra. Použití ostatních matic nevedlo k tak kvalitním spektrům. Analýzy provedené za použití matrice DHB byly nejméně úspěšné, identifikace proteinu byla možná pouze pro cytochrom C a podjednotku alfa u hemoglobinu. Spektra obsahovala pouze minimální množství detekovaného proteinu a často obsahovala pouze šum, proto se ukázala pro potřebnou analýzu jako nevhodná. Matrice CHCA poskytovala poměrně kvalitní výsledky. Spektra byla lepší než při použití DHB, ale stále nedosahovala kvality spekter získaných s SA maticí, signál byl méně intenzivní. CHCA je často používána pro analýzu peptidů a menších proteinů, což může vysvětlovat lepší výsledky, které ale nejsou v tomto experimentu optimální. Při porovnání výsledků analýzy standardních proteinů v různých maticích bylo potvrzeno, nejvyšší kvalitu spekter poskytovala matrice SA, jak bylo předpokládáno. Matrice DHB vykazovala nejnižší efektivitu s minimálním množstvím detekovaného proteinu a matrice CHCA poskytovala středně kvalitní výsledky. Použití stejný způsob nanášení zajistil, že rozdíly v kvalitě spekter byly způsobeny pouze vlastnostmi jednotlivých matic. Tento experiment potvrzuje důležitý význam výběru vhodné matrice pro dosažení optimálních výsledků v analýzách pomocí MALDI-TOF. Na základě uvedeného vyhodnocení byla pro identifikaci patogenů v rámci této bakalářské práce vybrána matrice SA.

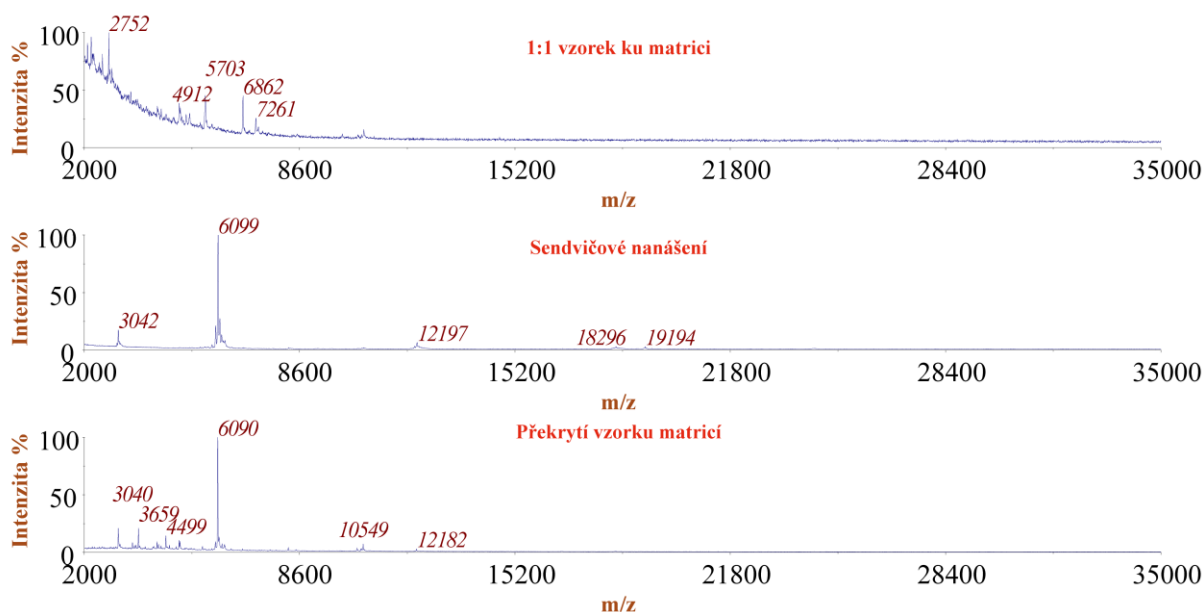
4.2 Vyhodnocení vhodného způsobu nanášení

Byla porovnána získaná hmotnostní spektra pro jednotlivé způsoby nanášení vzorku plísní na MALDI destičku. V prvním srovnání jsou znázorněna hmotnostní spektra plísně *F. culmorum* (Obrázek 17), získaná při použití všech tří způsobů nanášení vzorku, přičemž jako matrice byla použita SA vybraná na základě nejlepších výsledků, které poskytla při optimalizaci matric v analýze proteinů.



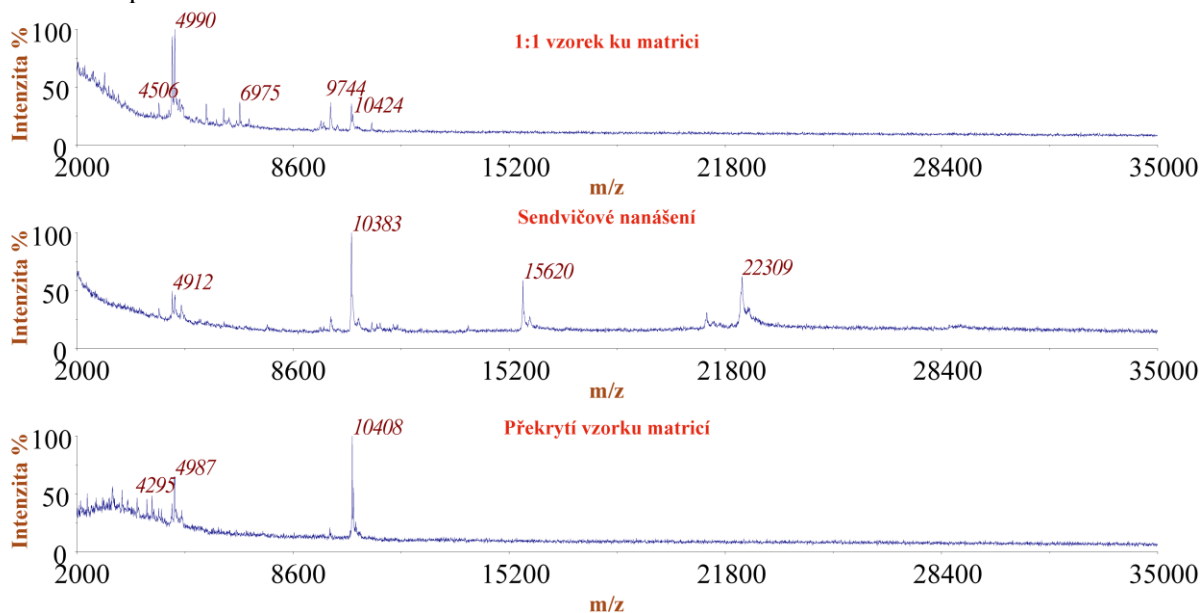
Obrázek 17: Porovnání různých způsobů nanášení pro *Fusarium culmorum*

V následujícím experimentu jsou znázorněna hmotnostní spektra plísně *F. tricinctum*, kde byla získána podobná spektra pro všechny tři metody nanášení (Obrázek 18). Hmotnostní spektra, které byly použity metody nanášení 1:1 vzorek s matricí a překryv vzorku matricí, vykazovala podobnou kvalitu. Sendvičový způsob nanášení zajistil homogenní pokrytí, efektivní ionizaci molekul vzorku a poskytl nejlepší výsledky z hlediska počtu detekovaných signálů a jejich intenzity, tedy bylo detekováno více signálů s vyšší intenzitou. Díky sendvičovému způsobu nanášení je možné detekovat i látky, které jsou ve vzorku přítomny ve velmi nízkých koncentracích, používá se pro zvýšení citlivosti a kvality získaných spekter.



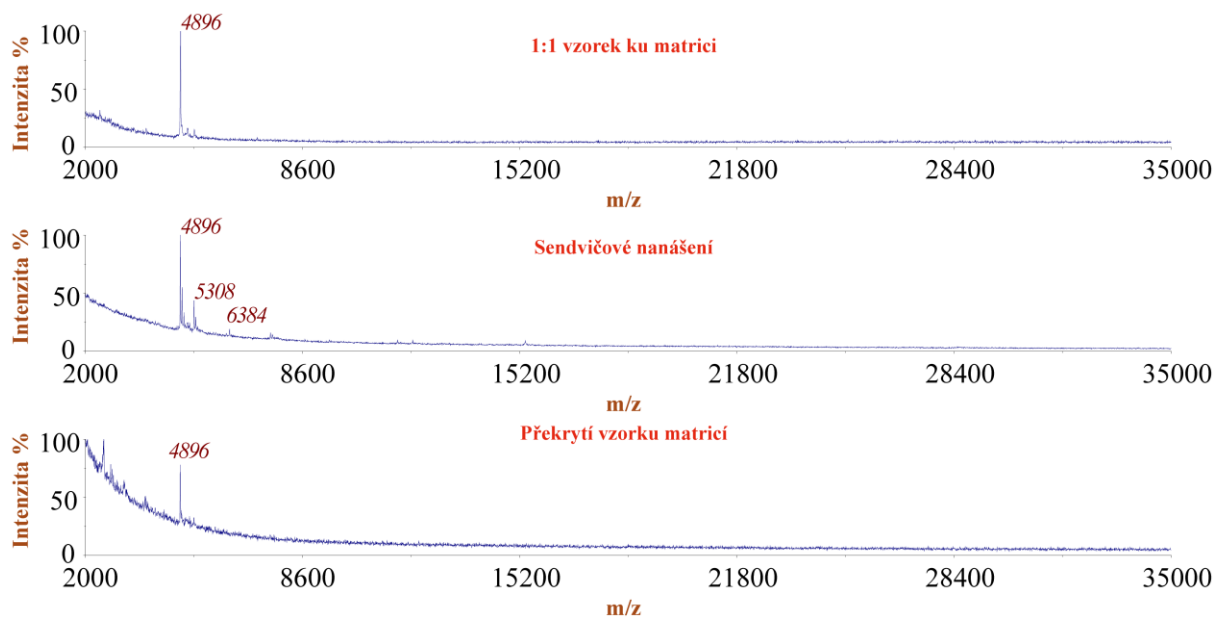
Obrázek 18: Porovnání různých způsobů nanášení pro *Fusarium tricinctum*

Další srovnání metod nanášení vzorku bylo provedeno pro plíseň *F. subglutinans* (Obrázek 19). Experiment byl úspěšný ve všech třech případech, jelikož v každém spektru byl identifikovaný hlavní pík s velmi podobnou hodnotou m/z.



Obrázek 19: Porovnání způsobů nanášení pro *Fusarium subglutinans*

V případě optimalizace nanášení s plísní *F. verticillioides* byla získána relativně kvalitní spektra za použití všech třech metod nanášení (Obrázek 20), což pravděpodobně naznačuje, že tento druh plísní má dobré vlastnosti, které jsou méně závislé na použité metodě nanášení vzorku. První a poslední způsob nanášení však poskytuje méně kvalitní spektrum, co se týká množství detekovaných signálů a jejich intenzity oproti sendvičovému způsobu nanášení.

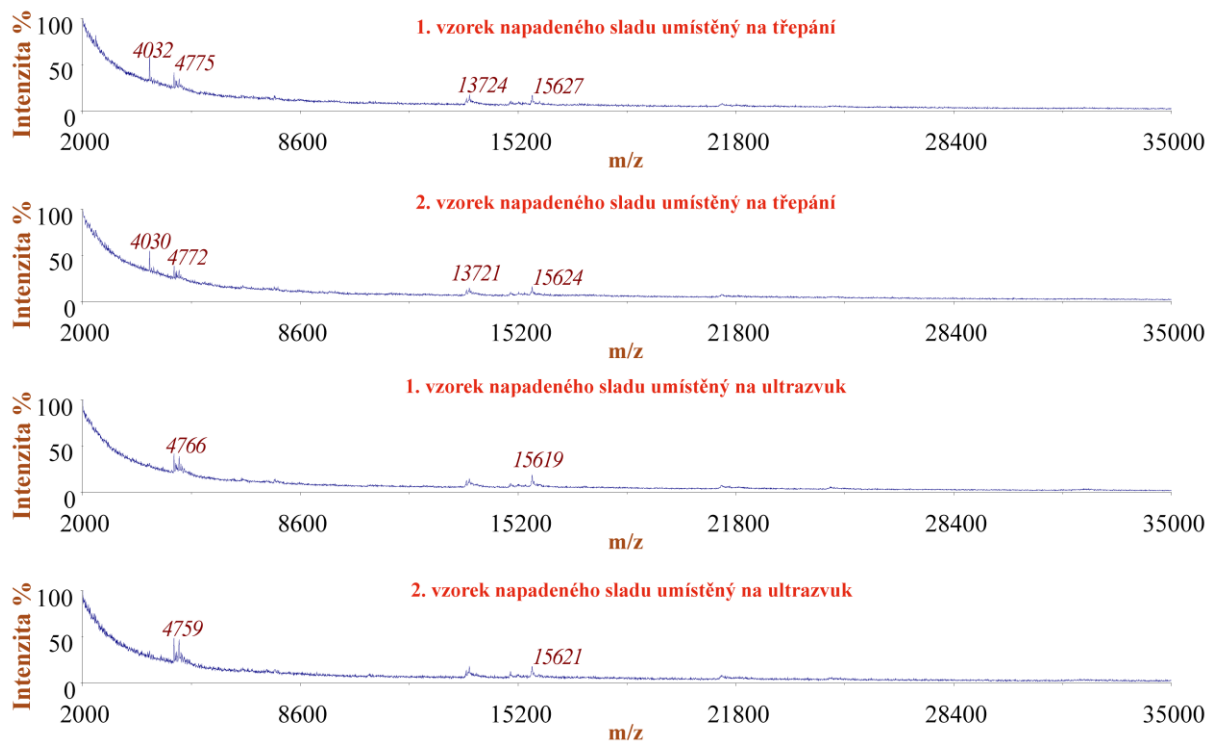


Obrázek 20: Porovnání způsobů nanášení pro *Fusarium verticillioides*

Výběr metody nanášení vzorku v hmotnostní spektrometrii by měl vždy být uzpůsoben specifickým požadavkům konkrétní analýzy. Metoda nanášení v poměru 1:1 matrice ku vzorku, která by měla být vhodná pro analýzu vysokomolekulárních látek, poskytovala méně kvalitní spektra, než bylo očekáváno. Vzorky nanesené metodou překrytí vzorku maticí poskytly hmotnostní spektra s velmi slabým signálem, proto byla tato metoda vyhodnocena jako nevhodná pro analýzu plísní pomocí MALDI-TOF MS. Sendvičové nanášení bylo vyhodnoceno jako nejefektivnější metoda nanášení vzorku a matrice z hlediska kvality, množství detekovaných píků a jejich intenzity. Homogenní rozložení matrice a vzorku zlepšuje ionizační proces, což vede k vyšší intenzitě signálů. Díky tomu sendvičová metoda minimalizuje vlivy matrice a poskytuje kvalitnější hmotnostní spektra. Na základě výsledků optimalizace způsobu nanášení vzorku byl v dalších experimentech využíván sendvičový způsob nanášení.

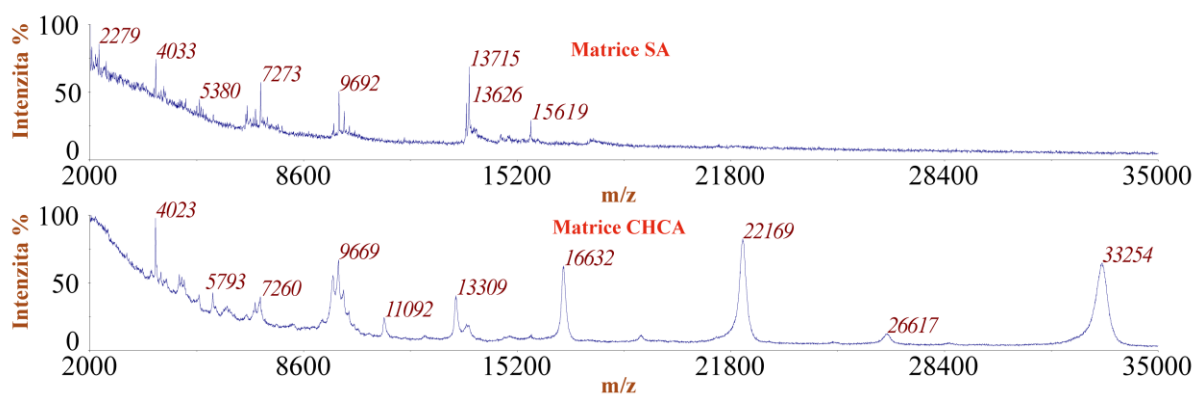
4.3 Vyhodnocení různých způsobů přípravy a ověření použití vhodné matrice

V této studii byla analyzována hmotnostní spektra plísně rodu *Fusarium*, kde byl otestován různý vliv na podporu uvolňování proteinů z buněk plísní (Obrázek 21). Spektra získaná ze vzorků připravených na třepačce obsahovala větší počet detekovatelných signálů a mechanické třepání bylo účinnější při uvolňování proteinů, což vedlo k rozmanitějšímu spektru. Vzorky, které oproti tomu byly umístěny do ultrazvukové lázně a byly vystaveny ultrazvukovým vlnám poskytovaly menší množství detekovatelných signálů.



Obrázek 21: Porovnání přípravy vzorků plísně rodu *Fusarium*

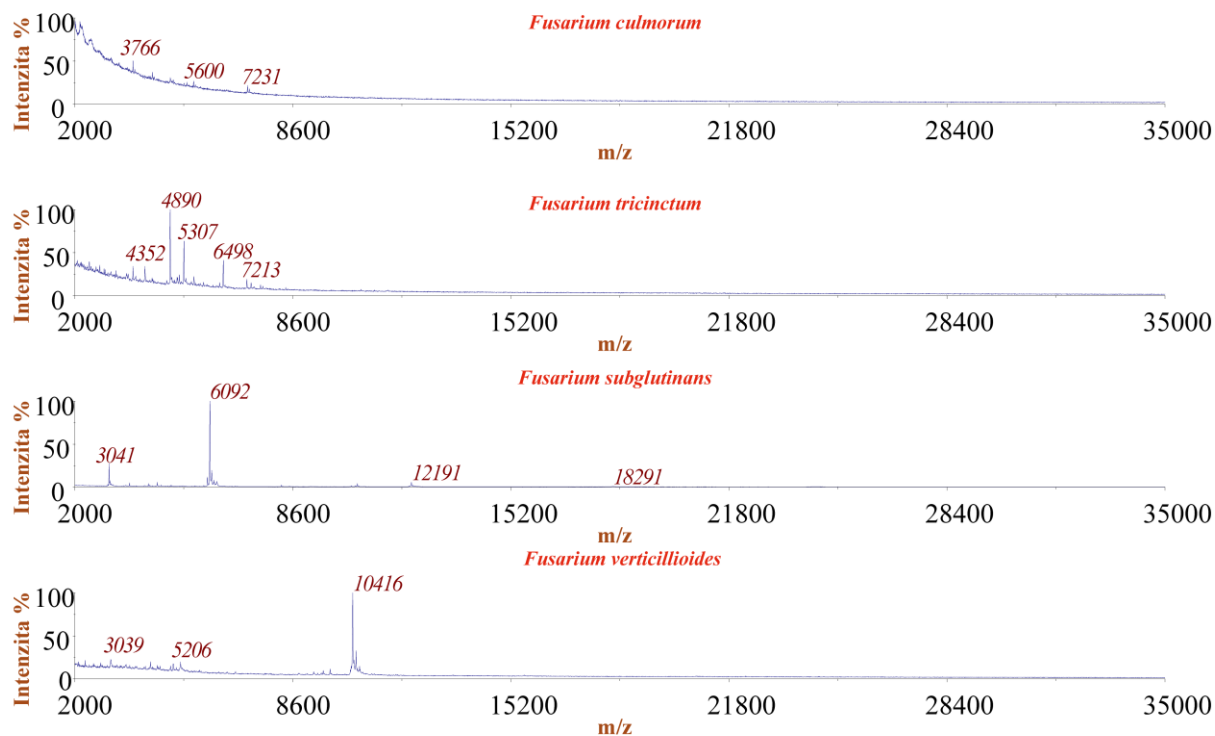
Pro srovnání byla analyzována dvě hmotnostní spektra napadeného sladovaného ječmene pomocí dvou matic SA a CHCA (Obrázek 22). Cílem bylo posoudit vliv těchto matic na kvalitu a intenzitu získaných spekter a jejich vhodnost pro detekci napadení plísní. Spektra získaná pomocí matrice SA vykazují nízkou úroveň šumu, pozadí je čisté a píky jsou ostré. Spektra získaná analýzou za použití matrice CHCA obsahují vyšší množství šumu, což může ztížit detekci menších nebo méně intenzivních píků, protože tyto mohou být maskovány šumem pozadí. Intenzivní a ostré píky v případě matrice CHCA mohly představovat uvolněné proteiny z obiliek napadeného sladového ječmene. Daný experiment potvrdil, že byla na základě optimalizace použité matrice správně zvolená jako nevhodnější matrice SA



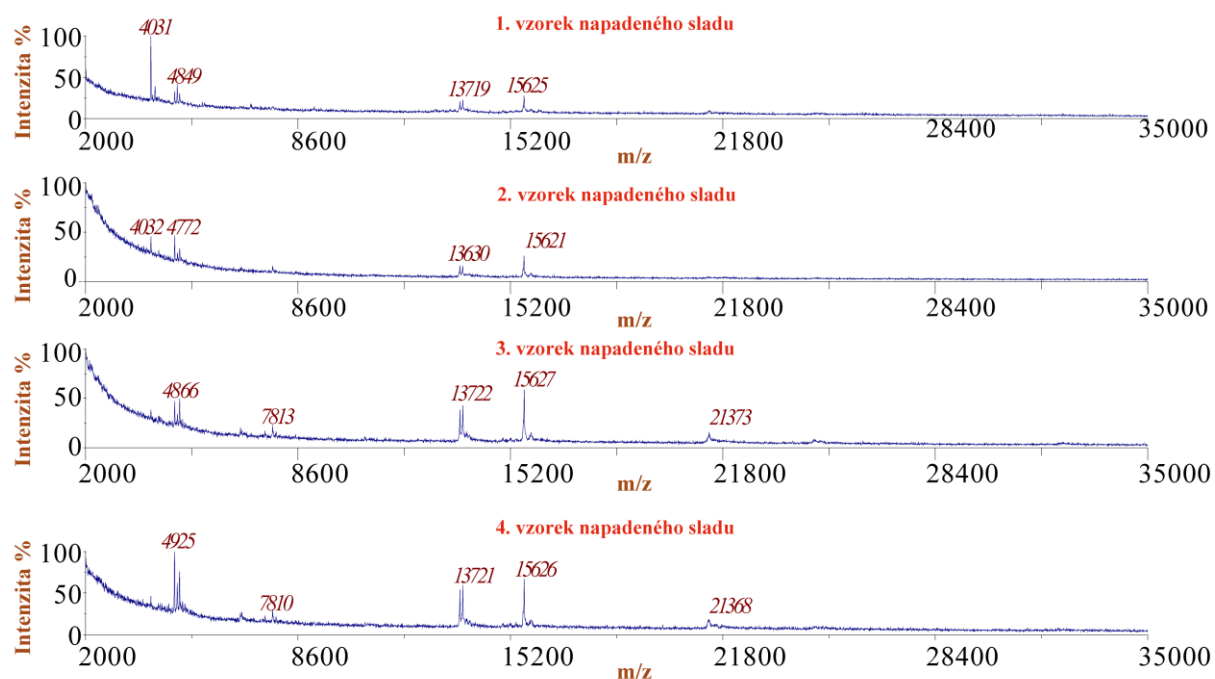
Obrázek 22: Hmotnostní spektra napadeného ječného sladu získaný pomocí různých matic

4.4 Vyhodnocení identifikace plísní rodu *Fusarium*

Byla porovnávána hmotnostní spektra čtyř plísní rodu *Fusarium*: *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. tricinctum* a *F. culmorum* (Obrázek 23). Spektra byla získána za použití sendvičového nanášení s maticí SA a byla použita jako referenční spektra. Každý druh plísně vykazoval specifické charakteristické píky v hmotnostním spektru, které byly použity k přesné identifikaci patogenů v analyzovaných vzorcích.



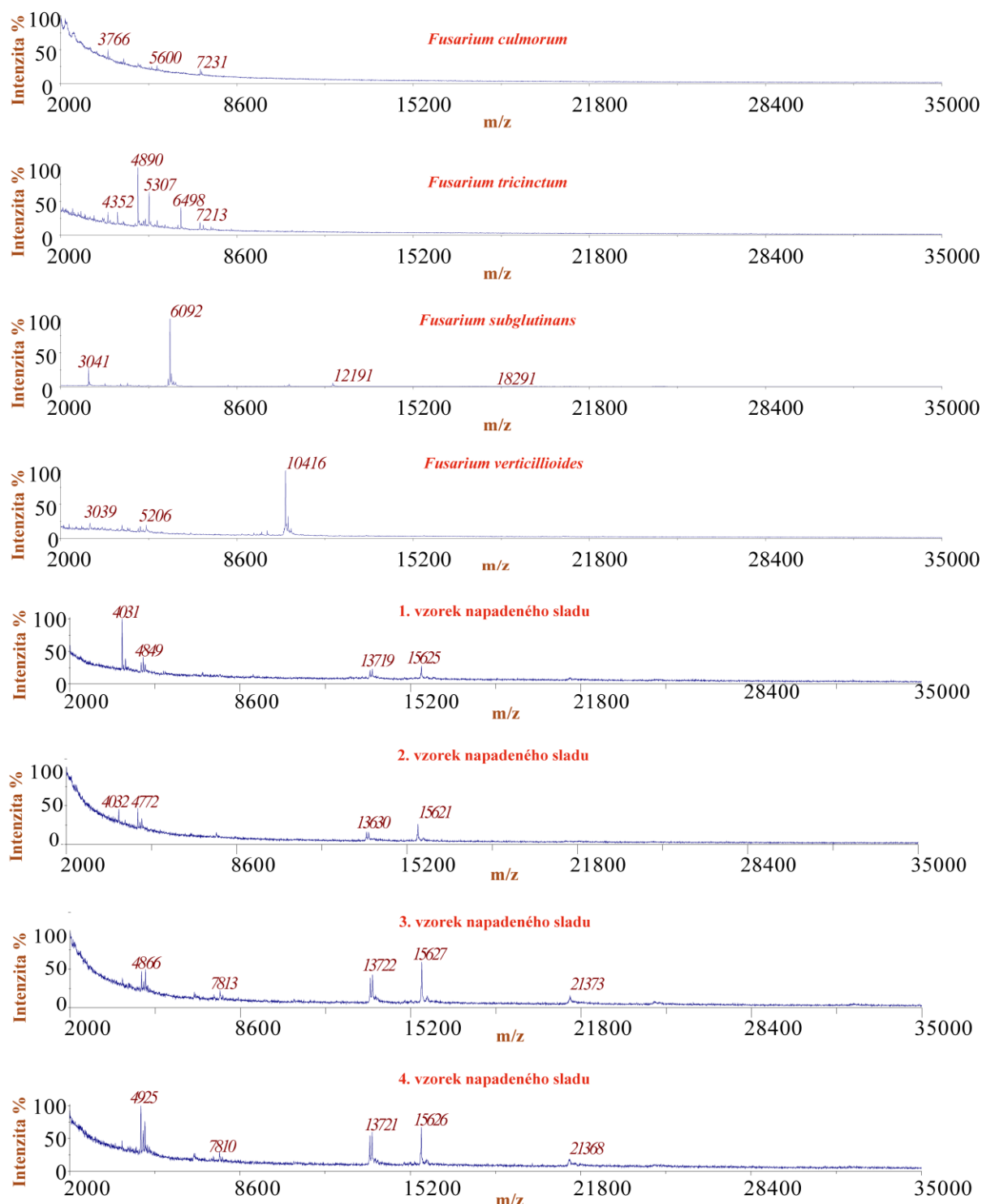
Obrázek 23: Použité plísně rodu *Fusarium*



Obrázek 24: Porovnání hmotnostních spekter napadeného sladovaného ječmene

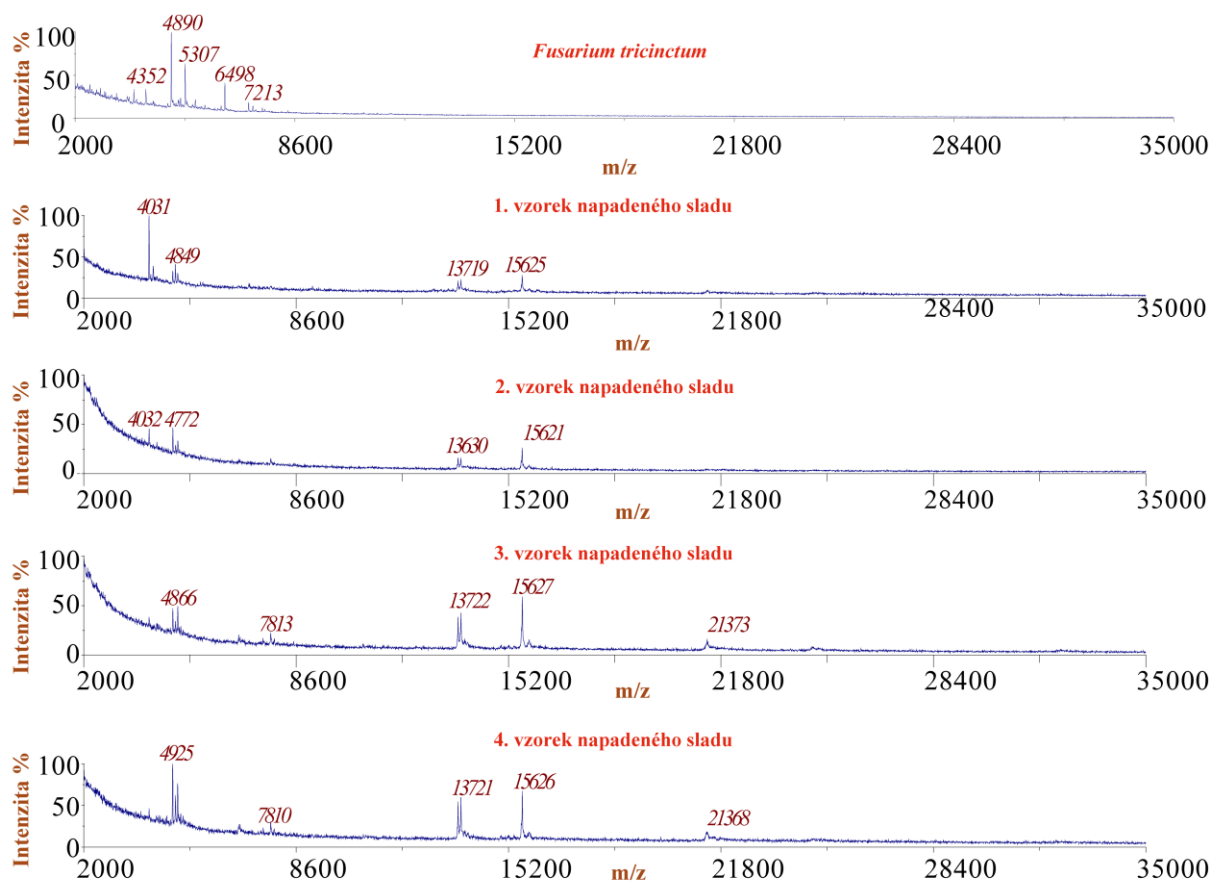
V této studii byla hmotnostní spektra napadeného sladovaného ječmene analyzována pomocí sendvičového způsobu nanášení vzorků. Tato metoda byla zvolena pro svou schopnost zajištění kvalitního spektra a byla také použita při analýze referenčních spekter čtyř druhů plísní rodu *Fusarium*. Výsledky získaných hmotnostních spekter ze čtyř vzorků napadeného sladovaného ječmene odhalily intenzivní signály (Obrázek 24). Podařilo se získat kvalitní spektra s minimálním šumem a píky byly relativně ostré.

Intenzivní signály v hmotnostních spektrech byly porovnány s referenčními spektry čtyř druhů plísní rodu *Fusarium* (Obrázek 25).



Obrázek 25: Kompletní srovnání referenčních a získaných spekter

Hmotnostní spektra všech čtyř vzorků napadeného ječmene vykazovala intenzivní pík, který byl nejvíce odpovídající pro identifikaci plísně *F. tricinctum* (Obrázek 26). Na základě tohoto srovnání bylo předpokládáno, že sladovaný ječmen byl napaden tímto druhem plísně. Oproti tomu se nepodařilo přiřadit signály žádnému z referenčních spekter pro plísně *F. culmorum*, *F. subglutinans*, ani *F. verticillioides*, což naznačuje možnost přítomnosti dalších plísňových druhů, které nebyly zahrnuty v referenční databázi. Detekované píky, které se nepodařilo přiřadit k žádnému ze známých referenčních spekter, mohou být důsledkem neidentifikovanými variantami plísně rodu *Fusarium*, nebo kontaminací vzorku jinými MO.



Obrázek 26: Identifikace napadeného sladovaného ječmene

Pro přesnou identifikaci plísní v napadeném sladovaném ječmenu by proto bylo nezbytné získat výrazně větší soubor referenčních spekter pokrývající mnohem širší okruh rodů a druhů plísní. Vytvoření rozsáhlejší databáze referenčních spekter by významně zlepšilo přesnost a spolehlivost identifikace různých plísňových patogenů. V rámci této bakalářské práce bylo k dispozici omezené množství referenčních spekter, což výrazně ovlivnilo možnost přesně identifikovat všechny přítomné druhy plísní rodu *Fusarium*. Nicméně, i přes tato omezení výsledky experimentu ukazují, že technika MALDI-TOF MS má velký potenciál pro rychlou a efektivní identifikaci plísňových patogenů. Získané výsledky naznačují, že MALDI-TOF MS dokáže poskytovat rychlou a spolehlivou odezvu analýzy, což je zásadní pro včasnou diagnostiku a kontrolu šíření plísní v zemědělských rostlinách.

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala identifikací plísní pomocí techniky MALDI-TOF MS a zahrnovala experimentální analýzu plísně rodu *Fusarium*. Byl popsán základní princip hmotnostní spektrometrie, přičemž byl důraz kladen na techniku MALDI TOF-MS. Literární rešerše může posloužit jako základ pro další zkoumání v rámci diplomové práce, která bude dále rozšířena. Rychlá, jednoduchá a spolehlivá identifikace mikroorganismů je v současné době nepostradatelnou součástí mnoha odvětví, včetně zemědělství, kde patogeny plísní rodu *Fusarium* představují významné riziko. Úspěšná a efektivní identifikace zmíněných patogenů vyžaduje použití vhodných technik.

Experimentální část práce se proto zaměřovala na aplikaci metody MALDI-TOF MS pro identifikaci rostlinných patogenů, konkrétně plísní rodu *Fusarium*. Cílem experimentální části bylo aplikovat teoretické poznatky z literární rešerše do praxe a ověřit účinnost metody MALDI-TOF MS při identifikaci plísní rodu *Fusarium* v rostlinných vzorcích. Byly porovnány tři způsoby nanášení – nanášení v poměru 1:1 (vzorek s matricí), metoda překryvu vzorku roztokem matricí a sendvičový způsob. Výsledky ukázaly, že sendvičový způsob nanášení poskytuje nejkvalitnější hmotnostní spektra, která jsou charakteristická vyšším počtem detekovaných signálů a jejich vyšší intenzitou. Na základě optimalizace pro analýzu proteinů byla vybrána jako matrice kyselina sinapová (SA), která se ukázala jako nejvhodnější pro identifikaci plísní. Nicméně pro dosažení přesné identifikace plísní v napadeném obilí by bylo nezbytné vytvořit rozsáhlejší databázi referenčních spekter, jelikož se z použitých vzorků napadeného sladovaného ječmene podařilo identifikovat pouze jeden druh plísně, konkrétně *F. tricinctum*, kterou byl napaden a zbylé tři druhy *F. culmorum*, *F. subglutinans* a *F. verticillioide* se nepodařilo identifikovat.

Výsledky experimentů byly analyzovány a diskutovány s cílem přinést nové poznatky v oblasti diagnostiky rostlinných patogenů. Vyhodnocení experimentálních dat poskytlo informace o úspěšnosti a spolehlivosti metody MALDI-TOF MS v identifikaci plísní rodu *Fusarium*. Mezi klíčové faktory, které přímo ovlivňují analýzu se řadí například typ a koncentrace použité matrice a rozpouštědla v analýze, které mají zásadní roli při uvolňování proteinů z buněk plísní, což následně ovlivňuje celkovou spolehlivost identifikace. Optimalizace podmínek je nezbytná, aby byla zajištěna přesná identifikace patogenů plísní rodu *Fusarium*. Výsledky naznačují, že technika MALDI – TOF MS má velký potenciál pro rychlou a efektivní identifikaci plísňových patogenů. Tato metoda nabízí významné výhody oproti tradičním diagnostickým technikám, včetně rychlé analýzy a schopnosti detekovat nízké koncentrace analytů. Implementace MALDI-TOF MS v praxi by mohla zahrnovat pravidelný monitoring zemědělských produktů na přítomnost plísní, což by umožnilo včasnou reakci na infekce a snížení ekonomických ztrát způsobených plísňovými infekcemi.

Tato technologie nabízí významné výhody oproti tradičním metodám, jako jsou kultivační techniky nebo molekulární diagnostika, protože umožňuje získání výsledků bez nutnosti mnohdy dlouhé kultivace. Využití MALDI-TOF MS v praxi by mohlo zahrnovat pravidelnou kontrolu obilí a dalších zemědělských produktů na přítomnost plísní, což by umožnilo rychlou reakci na infekce a snížilo ekonomické ztráty způsobené plísňovými nákazami. Rozšíření referenční databáze a zdokonalení metodiky by v budoucnosti mohly dále zvýšit přesnost uvedené technologie a její využitelnost v různých oblastech zemědělství a potravinářského průmyslu. V budoucnosti by další rozšíření referenční databáze a vylepšení metodiky mohly dále zvýšit spolehlivost této technologie a její využitelnost v širokém spektru aplikací v oblasti zemědělství a potravinářství. Celkově tato práce přispěla k lepšímu pochopení potenciálu MALDI-TOF MS pro identifikaci plísní a naznačila směr pro další výzkum a aplikace této technologie.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CASSOUBHOY, MD, Murtaza. *What to Know About Pathogens* [online]. WebMD Editorial Contributor, 2023, 5 [cit. 2024-05-10]. Dostupné z: <https://www.webmd.com/a-to-z-guides/what-to-know-about-pathogens>
- [2] BALLOUX, Francois a Lucy VAN DORP. *Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us?: What are pathogens, and what have they done to and for us?* [online]. [cit. 2024-05-09]. Dostupné z: doi:10.1186/s12915-017-0433-z
- [3] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell* [online]. 4th ed. New York: Garland Science, 2002 [cit. 2024-05-10]. ISBN 08-153-3218-1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26917/>
- [4] ŘEPKOVÁ, Jana. *Odolnost rostlin k patogenům* [Genetika rostlin]. Brno, 2013. Dostupné také z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/07-rezistence-k-patogenum.html>
- [5] MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-701-3395-3.
- [6] WAGACHA, J.M. a J.W. MUTHOMI. *Fusarium culmorum: Infection process, mechanisms of mycotoxin production and their role in pathogenesis in wheat*. *Crop Protection* [online]. 2007, 26(7), 877-885 [cit. 2024-05-01]. ISSN 02612194. Dostupné z: doi:10.1016/j.cropro.2006.09.003
- [7] JAMAL, Wafaa, Rola SALEEM a Vincent O. ROTIMI. Rapid identification of pathogens directly from blood culture bottles by Bruker matrix-assisted laser desorption laser ionization-time of flight mass spectrometry versus routine methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. 2013, 76(4), 404-408 [cit. 2024-05-01]. ISSN 07328893. Dostupné z: doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.013
- [8] NUCCI, Marcio a Elias ANAÏSSIE. *Fusarium Infections in Immunocompromised Patients*. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2007, 20(4), 695-704 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00014-07
- [9] NCBI, TAXONOMY BROWSER. *Fusarium* [online]. 2020 [cit. 2024-05-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5506>
- [10] KOUKOL, Ondřej. *Živa - Ach ty houby... Živa* [online]. Nakladatelství Academia, SSČ AV ČR, 02/2014n. 1., 2014(XXXVIII), 1 [cit. 2024-05-01]. Dostupné z: ziva.avcr.cz
- [11] ŠIMŮNEK, Jan, Miroslav POLSTER a Pavel BŘEZINA. *Plísně a mykotoxiny* [online]. Brno, 2021 [cit. 2024-05-04]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/med/podzim2020/BVMI0322c/107015621/T.pdf>. Skripta. MUNI.
- [12] SUCHÝ, Pavel a Ivan HERZIG. *PLÍSNĚ A MYKOTOXINY, PREVENCE JEJICH VZNIKU A DEKONTAMINACE V KRMIVECH* [online]. Výzkumný ústav živočišné výroby, 2005 [cit. 2024-05-04]. Dostupné z: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/04/Hezig-Such%C3%BD-Plisne-a-mykotoxiny-2005.pdf>

- [13] RUAN, Ruoxin, Xiaoying ZHANG, Chunnan LI, Fukang ZHAO, Mingshuang WANG a Qiaojuan FU. First report of *Fusarium* subglutinans causing heart rot on *Cymbidium hybridum* in China. *Crop Protection* [online]. 2021, **144** [cit. 2024-05-01]. ISSN 02612194. Dostupné z: doi:10.1016/j.cropro.2021.105603
- [14] MOO-YOUNG, Murray, BUTLER DR, Michael, ed. *Comprehensive Biotechnology* [online]. Kanada: Pergamon Press, 2011, 688 s. [cit. 2024-05-12]. ISBN 978-0444533524.
- [15] MARINACH-PATRICE, C., A. LETHUILLIER, A. MARLY, et al. Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2009, **15**(7), 634-642 [cit. 2024-05-01]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02758.x
- [16] CAMPOS-MACÍAS, Pablo, Roberto ARENAS-GUZMÁN a Francisca HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ. *Fusarium* subglutinans: A new eumycetoma agent. *Medical Mycology Case Reports* [online]. 2013, **2**, 128-131 [cit. 2024-05-01]. ISSN 22117539. Dostupné z: doi:10.1016/j.mmcr.2013.06.004
- [17] LESLIE, John F. a Brett A. SUMMERELL. *The Fusarium Laboratory Manual*. 2008. Wiley, 2008. ISBN 08-138-1919-9.
- [18] GUO, Penghao, Jianlong CHEN, Yiwei TAN, et al. Comparison of molecular and MALDI-TOF MS identification and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* isolates in Southern China. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2022, 2022-9-20, **13** [cit. 2024-05-14]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2022.992582
- [19] DARE, Diane. Rapid Bacterial Characterization and Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* [online]. Boston, MA: Springer US, 2006, 117-133 [cit. 2024-05-01]. ISBN 978-0-387-29741-5. Dostupné z: doi:10.1007/0-387-32892-0_7
- [20] CLARK, Andrew E., Erin J. KALETA, Amit ARORA a Donna M. WOLK. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2013, **26**(3), 547-603 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00072-12
- [21] HOSSEINI, Samira a Sergio O. MARTINEZ-CHAPA. Principles and Mechanism of MALDI-ToF-MS Analysis. *Fundamentals of MALDI-ToF-MS Analysis* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2017, 2017-08-19, 1-19 [cit. 2024-05-01]. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. ISBN 978-981-10-2355-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-2356-9_1
- [22] B. COLE, Richard, ed. *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*. April 2010. WILEY, 2010. ISBN 978-0-471-74107-7.
- [23] SHAH, Haroun N. a Saheer E. GHARBIA, ed. *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics* [online]. 2010. John Wiley & Sons, 2010. ISBN 9781119991922. Dostupné z: doi:10.1002/9780470665497
- [24] PURKRTOVÁ, Sabina, Lenka ZDENĚKOVÁ, Petr FANTA, Petra JUNKOVÁ, Šárka HAVLÍKOVÁ, Irena NĚMEČKOVÁ a Kateřina DEMNEROVÁ. VYUŽITÍ MALDI-TOF MS PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÍ ZPŮSOBUJÍCÍCH KAŽENÍ MLÉKÁRENSKÝCH

- VÝROBKŮ. *MLÉKAŘSKÉ LISTY* [online]. 2018, **29**(171), 25-31 [cit. 2024-05-04]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2018/170-171/veda_171_s.25-31.pdf
- [25] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [26] NORKOVÁ, RENÁTA a JANA JAKLOVÁ. CHEMICKÉ LISTY. *IONIZAČNÍ TECHNIKY A ROZHRANÍ PRO SPOJENÍ KAPILÁRNÍCH ELEKTRO- MIGRAČNÍCH METOD S HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKOU DETEKČÍ* [<http://www.chemicke-listy.cz/>]. 107. Praha, 2013, 7 s. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_12_949-955.pdf
- [27] JAMES, Peter. *Proteome Research: Mass Spectrometry* [online]. Springer Berlin, Heidelberg, 2000 [cit. 2024-05-04]. ISBN 978-3-642-56895-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-56895-4
- [28] MELLMANN, Alexander a Johannes MÜTHING. MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Microbial Identification. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* [online]. Boston, MA: Springer US, 2013, 2013-08-06, 187-207 [cit. 2024-05-01]. ISBN 978-1-4614-3969-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-3970-7_10
- [29] GIEBEL, R., C. WORDEN, S.M. RUST, G.T. KLEINHEINZ, M. ROBBINS a T.R. SANDRIN. *Microbial Fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)* [online]. Elsevier, 2010, 149-184 [cit. 2024-05-01]. Advances in Applied Microbiology. ISBN 9780123809933. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2164(10)71006-6
- [30] RAHI, Praveen, Om PRAKASH a Yogesh S. SHOUCHE. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, 2016-08-30, **7** [cit. 2024-05-01]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01359
- [31] EIDHAMMER, Ingvar, Kristian FLIKKA, Lennart MARTENS a Svein-Ole MIKALSEN. *Computational Methods for Mass Spectrometry Proteomics* [online]. 2007, 2007-11-30 [cit. 2024-05-01]. Dostupné z: doi:10.1002/9780470724309
- [32] AMIRI-ELIASI, Bijan a Catherine FENSELAU. Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells. *Analytical Chemistry* [online]. 2001, 2001-11-01, **73**(21), 5228-5231 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac010651t
- [33] GRIFFITHS, Jennifer. A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, 2008-08-01, **80**(15), 5678-5683 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac8013065
- [34] TANAKA, Koichi, Hiroaki WAKI, Yutaka IDO, Satoshi AKITA, Yoshikazu YOSHIDA, Tamio YOSHIDA a T. MATSUO. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 1988, **2**(8), 151-153 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0951-4198. Dostupné z: doi:10.1002/rcm.1290020802

- [35] DIGNANI, M.C. a E. ANAISSIE. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2004, **10**, 67-75 [cit. 2024-05-01]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1470-9465.2004.00845.x
- [36] WILLIAMS, Tracie L., Denis ANDRZEJEWSKI, Jackson O. LAY a Steven M. MUSSER. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* [online]. 2003, 2003-04-01, **14**(4), 342-351 [cit. 2024-05-01]. ISSN 1044-0305. Dostupné z: doi:10.1016/S1044-0305(03)00065-5
- [37] WILKINS, Charles L. a Jackson O. LAY, ed. *Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry* [online]. 2005. 2005 [cit. 2024-05-01]. ISBN 978-0-471-74863-2. Dostupné z: <https://www.wiley.com/en-ic/Identification+of+Microorganisms+by+Mass+Spectrometry-p-9780471748632>
- [38] SANGUINETTI, Maurizio, Brunella POSTERARO a Colleen Suzanne KRAFT. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2017, **55**(2), 369-379 [cit. 2024-05-01]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01640-16
- [39] SANTOS, C., R.R.M. PATERSON, A. VENÃŁNCIO a N. LIMA. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2010, **108**(2), 375-385 [cit. 2024-05-14]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04448.x
- [40] FREY-KLETT, P., P. BURLINSON, A. DEVEAU, M. BARRET, M. TARKKA a A. SARNIGUET. Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2011, **75**(4), 583-609 [cit. 2024-05-01]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00020-11
- [41] CHALUPOVÁ, Jana, Martin RAUS, Michaela SEDLÁŘOVÁ a Marek ŠEBELA. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances* [online]. 2014, **32**(1), 230-241 [cit. 2024-05-26]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.002

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Označení	Legenda
ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization Chemická ionizace za atmosférického tlaku,
CDA	Czapek-Dox agar
CHCA	Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
CI	Chemická ionizace, Chemical Ionization
DHB	Kyselina 2,5 – dihydroxybenzoová
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DON	deoxynivalenol
EI	Elektronová ionizace, Electron Ionization
ELISA	enzyme-Linked Immunosorbent Assay enzymatická imunotestovací analýza
Er:YAG	Yttrium aluminium granát dopovaný ionty erbia
ESI	Ionizace elektrosprejem, Elektrospray ionizace
FA	Kyselina ferulová
FC	<i>Fusarium Culmorum</i>
FS	<i>Fusarium Subglutinans</i>
FT	<i>Fusarium Tricinctum</i>
FV	<i>Fusarium Verticilloides</i>
H ₂ O	Deionizovaná voda
IR	Infračervený
IT	Iontová past, Ion trap
MALDI	Matricí asistovaná laserová desorpce a ionizace
MALDI TOF MS	Matricí asistovaná laserová desorpce a ionizace s analyzátozem doby letu
MCP	Micro channel plate, mikrokanálová destička
MEA	sladový extrakt, malt extract agar
MO	Mikroorganismy
MS	Hmotnostní spektrometrie
Nd:YAG	Yttrium aluminium granát dopovaný ionty neodymu
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

PDA	bramorovo-dextrózový agar, potato dextrose agar
SA	Kyselina sinapová, kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicová
SEM	secondary electron multiplier detektor se sekundárním elektronovým násobičem
spp	Subspecie, taxonomické poddruhy
TFA	Kyselina trifluoroctová
TOF	Time of flight, analyzátor doby letu
UV	Ultrafialový

8 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Taxonomické zařazení rodu <i>Fusarium</i> [9]	8
Obrázek 2: Druhy hyf [3]	9
Obrázek 3: Typy konidii produkované plísní rodu <i>Fusarium</i> [6]	9
Obrázek 4: <i>Fusarium culmorum</i> v CDA	11
Obrázek 5: <i>Fusarium subglutinans</i> v PDA	12
Obrázek 6: <i>Fusarium verticillioides</i> v MEA	13
Obrázek 7: <i>Fusarium tricinctum</i> v MEA	14
Obrázek 8: Schéma hmotnostního spektrometru.....	16
Obrázek 9: Schéma přístroje MALDI-TOF	19
Obrázek 10: Nejčastěji využívané matrice v MALDI.....	20
Obrázek 11: Hmotnostní spektrometr AB Sciex TOF	26
Obrázek 12: Používaná MALDI destička	26
Obrázek 13: Porovnání použití různých matric u albuminu.....	28
Obrázek 14: Porovnání použití různých matric u hemoglobinu.....	29
Obrázek 15: Porovnání použití různých matric u transferinu	29
Obrázek 16: Porovnání použití různých matric u cytochromu c.....	30
Obrázek 17: Porovnání různých způsobů nanášení pro <i>Fusarium culmorum</i>	31
Obrázek 18: Porovnání různých způsobů nanášení pro <i>Fusarium tricinctum</i>	32
Obrázek 19: Porovnání způsobů nanášení pro <i>Fusarium subglutinans</i>	32
Obrázek 20: Porovnání způsobů nanášení pro <i>Fusarium verticillioides</i>	33
Obrázek 21: Porovnání přípravy vzorků plísně rodu <i>Fusarium</i>	34
Obrázek 22: Hmotnostní spektra napadeného ječného sladu získaný pomocí různých matric	34
Obrázek 23: Použité plísně rodu <i>Fusarium</i>	35
Obrázek 24: Porovnání hmotnostních spekter napadeného sladovaného ječmene	35
Obrázek 25: Kompletní srovnání referenčních a získaných spekter	36
Obrázek 26: Identifikace napadeného sladovaného ječmene.....	37