

z růstového media má také tu výhodu, že všechny bakterie rostou za shodných podmínek. Jelikož identická bakterie může poskytnout různá hmotnostní spektra v závislosti na různých podmínkách kultivace (teplota, doba růstu, použité medium), anebo může být ovlivněna použitými chemikáliemi, je nutné před samotnou analýzou zajistit standardizaci přípravy vzorku a tím umožnit dobrou reprodukovatelnost. Pochopitelně je možné srovnávat jen spektra, která byla měřena stejným postupem. Dnes existuje několik softwarových vybavení, která celé stanovení usnadňují, jako jsou MALDI Biotyper (Bruker Daltonics), Samaris (AngnosTec-Shimadzu) nebo MicrobeLynx (Waters). Tyto programy bohužel pracují na odlišných algoritmech, a proto není možné srovnávat spektra mezi databázemi. Všechny softwary tedy umožňují tvorbu vlastních knihoven spekter. Naše laboratoř využívá tuto metodu k identifikaci bakterií izolovaných z kontaminovaných zemín, identifikaci patogenních bakterií z potravinářských surovin. K analýze je využíván hmotnostní spektrometr od firmy Bruker Daltonics, také software pro analýzu pochází od této firmy. Při měření pak postupujeme dle standardního protokolu dodaného výrobcem. Tento protokol je založen na metodě celých buněk, viz výše. V případě izolace bakterií ze životního prostředí je nejdříve nutné izolovat jednotlivé bakteriální druhy, které jsou reprezentovány jednotlivými koloniemi narostlými např. na agarovém mediu. Dříve bylo nutné tyto jednotlivé kolonie individuálně testovat buď biochemickými testy nebo později po izolaci a sekvenaci 16SrDNA. V řadě případů však bylo po delší době zjištěno,

že se jedná o stejné druhy. V případě MS MALDI-TOF lze měřit spektra několika desítek bakterií najednou a srovnáním spekter lze velmi rychle vyloučit identické druhy. Kromě identifikace neznámých vzorků jsme také zkoumali vliv použitých médií, teplot růstu a doby růstu na výsledky analýzy. Bylo zjištěno, že např. různé typy media pro kultivaci bakterií mohou ovlivnit výsledek stanovení, naopak teplota a doba růstu měly minimální vliv.

*Poděkování: Tato práce byla vypracována s podporou grantů MSM 6046137305, MŠMT č. 21/2010, NPV II 2B08031.*

### **Štursa P., Junková P., Střežek M., Macek T., Macková M.: MALDI-TOF MS simple and rapid tool for identification of bacteria isolated from the environment**

This paper is focused on the use of mass spectrometry in the biological sciences, especially the possibility of using this method for the identification of microorganisms particularly bacteria and not only from clinical or food material but also from the environment. Article also offers a brief comparison of some methods that are used for identification of microorganisms.

**Key words:** Mass spectrometry, MALDI-TOF MS, bacteria, protein, identification.

#### **Kontaktní adresa – Contact address:**

Ing. Petr Štursa, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6 Dejvice, Česká republika, e-mail: stursap@vscht.cz

## **Biosenzory pro detekci těžkých kovů**

### BIOSENSORS FOR DETECTION OF HEAVY METALS

Petr Majzlík<sup>1</sup>, Jan Prášek<sup>2</sup>, Libuše Trnková<sup>3</sup>, Josef Zehnálek<sup>1</sup>, Vojtěch Adam<sup>1</sup>, Ladislav Havel<sup>1</sup>, Jaromír Hubálek<sup>2</sup>, René Kizek<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Mendelova univerzita v Brně; <sup>2</sup>Masarykova univerzita; <sup>3</sup>Vysoké učení technické v Brně

Těžké kovy jsou skupinou látek, které, dle řady různých definicí, zahrnují jak prvky prospěšné a nutné pro organismy, tak prvky, o jejichž biologické potřebnosti je jen velmi málo důkazů a působí převážně toxicky na většinu organismů. Řada výzkumných pracovišť po celém světě se věnuje studiu přímého působení těžkých kovů na různé organismy. Jejich toxicita souvisí především s možností vazeb na různé typy biomolekul, které ztrácejí svou přirozenou funkci a tím narušují životně důležité biochemické procesy, což může mít za následek i smrt celého organismu. Na základě hrozby, kterou představují, je jejich přesná, rychlá a cenově dostupná detekce stále velmi aktuální. Spolu s miniaturizací a novými materiály je neustále vyvíjen tlak na nové přístroje, které by byly schopny měřit na místě při zachování dostatečné citlivosti, která by se blížila typickým laboratorním stanovením. Elektrochemie je pro svou vysokou citlivost, metodou velmi vhodnou pro stanovení těžkých kovů. Druhým důvodem, proč uvažovat o elektrochemii, je možnost zmenšení měřicí instrumentace do takových rozměrů, které by byly snadno přenosné a schopné mimo-laboratorních měření. V neposlední řadě nesmíme opomenout možnosti kombinovat fyzikálně-chemický převodník v podobě elektrody s biologickou

složkou, kdy získáme biosenzor, který oproti výše zmíněným výhodám elektrochemie přináší do analytického systému prvek zvýšené selektivity. Další možností je využití optických materiálů v podobě optod, popř. analýzy povrchu, či dalších senzorů, které detekují změny teploty, hmotnosti či pH.

#### *Enzymové biosenzory*

Pro detekci iontů kovů byla použita řada různých enzymů, přičemž samotná detekce je založena na aktivaci či inhibici enzymové aktivity. Detekovaný ion těžkého kovu aktivuje enzym, pokud tvoří nedílnou součást struktury, anebo jej inhibuje v případě, že je schopen se vázat do aktivního centra použitého enzymu a tak jej inaktivovat. Biosenzory pro detekci iontů těžkých kovů založené na inhibici enzymové aktivity jsou používány několikrát násobně více ve srovnání s aktivními. Mezi nejběžněji používané enzymy patří oxidázy a dehydrogenázy. Tyto enzymy jsou imobilizovány pomocí síťování v želatinovém filmu, anebo afinitní interakcí se speciálním typem membrány. Další velkou skupinu enzymových biosenzorů tvoří ty založené na enzymu ureáze. Optický biosenzor založený na ureáze imobilizované

na skleněných pórech byl vyvinut pro stanovení rtuťnatých iontů. Detekční interval byl pouze v řádu jednotek až desítek  $\mu\text{M}$ . Jeden z jednorázových přístupů využívajících ureázu byl založen na kombinaci čpavek citlivé optody a optody citlivé na amonné ionty. Kromě optod byly v kombinaci s ureázou využity tranzistorové elektrody ISFET (ion-sensitive field-effect transistor). Takto navržený systém dosáhl detekčního limitu v řádech jednotek  $\mu\text{M}$ . Inhibice ureázy rtuťí byla také studována pomocí potenciometrického biosenzoru. Interakce ureázy s nikelnatými ionty patří mezi další velmi slibné možnosti v navrhování biosenzorů pro detekci těžkých kovů. Nedávno bylo ukázáno, že systém ureázy a glutamové dehydrogenázy je možné použít pro detekci rtuťnatých, měďnatých, kademnatých a zinečnatých iontů pomocí amperometrické detekce.

*Poděkování: tato práce byla podpořena granty INCHEMBIOL MSM0021622402, GA ČR 102/09/P640, NANIMEL GA ČR 102/08/1546 a REMEDTECH GA ČR 522/07/0692.*

### **Majzlik P., Prášek J., Trnková L., Zehnálek J., Adam V., Havel L., Hubálek J., Kizek R.: Biosensors for detection of heavy metals**

Current development of miniature analytical instruments for detecting heavy metals in varying samples is very dynamic. One of the most interesting representatives of these instruments are biosensors, which combine the physico-chemical transducer with biological components. Biosensors can operate on different principles and their preparation can lead to the acquisition of tools, which can achieve high sensitivity and selectivity against individual heavy metal ions or their mixtures. Our paper discusses the various types of biosensors divided according to their biological components for the detection of heavy metals ions.

**Key words:** heavy metals, biosensor, enzyme biosensor, affinity biosensor.

### **Kontaktní adresa – Contact address:**

Ing. Petr Majzlik, Ph. D., Mendelova univerzita, Ústav chemie a biochemie, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: petr.majzlik@email.cz