

Cvičení laboratorní technologie – mikroskopické houby

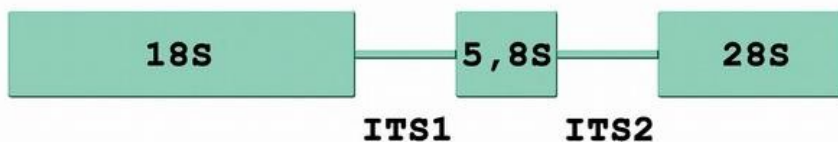
Charakteristika houbových mikroorganismů

v širším slova smyslu je tento termín používán pro velkou polyfyletickou skupinu eukaryotických, heterotrofních organismů. Převážná skupina hub je tvořena stélkou - trubicovitými, přehrádkovanými či nepřehrádkovanými vlákny – **hyfami**, které se mohou dále větvit a splétat v **mycelium**.

Jak studovat mikroskopické houby

1. Zběžné pozorování pod binokulární lupou. Pod lupou prohlédneme větší struktury (charakter mycelia, sklerocií, plodniček apod.).
2. Detailní studie mikroskopických struktur (nativní preparát, mikrokultura).
3. Zhotovení přesného popisu struktur s nákresem a fotografií.
4. Získání axenické (čisté) kultury a DNA sekvence (ITS - Internal Transcribed Spacer region) pro počáteční porovnání s online databází jako je GenBank, databáze CBS, Fungal Barcoding Database.
5. Srovnání výsledků s literaturou pro identifikaci.
6. V mnoha případech je nezbytné pro správnou identifikaci srovnání se správně identifikovanou sbírkovou kulturou nebo srovnání výsledků DNA sekvencí.

Schéma části genu pro ribozomální RNA



1. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

Materiál: rozinky, datle, arašídy, bylinné čaje

Pomůcky: pinzeta, kultivační médium (MA2% – Malt Extrakt Agar s chloramfenikolem), termostat na 25 °C

Pracovní postup:

1. Vyžíhanou (ne horkou) pinzetou přeneseme kousky vzorku na povrch kultivačního média.
2. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 25 °C po dobu 7 dnů.

2. Izolace kvasinek – stanovení počtu živých buněk v 1 g vzorku - metodou desetinásobného ředění

Materiál: pekařské droždí

Pomůcky: sterilní fyziologický roztok, špičky, automatická pipeta, L-klička, kultivační médium GYPA (Glukose-Yeast-Pepton Agar)

Pracovní postup:

1. 1 g pekařského droždí rozmícháme v 9 g fyziologickém roztoku. Dobře promícháme!
2. Pomocí pipety z výchozí suspenze (10^{-1}) přeneseme 1 ml do 9 ml fyziologického roztoku. Dobře promícháme! Tento postup opakujeme až k dosažení ředění 10^{-9} (obr. 1).
3. Z ředění 10^{-7} až 10^{-9} vykápneme pomocí pipety 20 μ l suspenze na povrch kultivačního média ve třech opakováních (obr. 1).
4. Zároveň z ředění 10^{-9} vykápneme pomocí pipety 100 μ l suspenze na povrch kultivačního média a rozetřeme L-kličkou
5. Kultivujeme při teplotě 30 °C po dobu 2 dnů.
6. Vyhodnocení

STANOVENÍ CFU V 1 g VZORKU – KAPKOVÁ METODA

Výpočet:

CFU/1 g vzorku = průměrný počet kolonií x 500 x 10^x

STANOVENÍ CFU V 1 g VZORKU –METODA ROZTĚREM NA POVRCH MÉDIA

Výpočet:

CFU/1 g vzorku = počet kolonií x 100 x 10^x

3. Izolace vláknitých hub ze stěru z prostředí

Materiál: stěr z prostředí (např. odpadkový koš, stěny, klávesnice počítače aj.)

Pomůcky: sterilní vatový tampon, Petriho miska s DRBC (Dichloran–Rose Bengal–Chloramphenicol Agar), termostat na 25 °C

Pracovní postup:

1. Sterilním vatovým tampónem přetřeme odběrové místo.
2. Vatovým tampónem přetřeme celou plochu Petriho misky s DRBC.
3. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 °C.

4. Příprava čisté kultury – izolace ze stěrů z potravin

Materiál: Petriho misky s kulturami

Pomůcky: preparační jehla, Petriho miska s MA2%, termostat na 25 °C

Pracovní postup:

1. Povrch příslušných médií inokulujeme konidii vláknité houby formou vpichu na třech místech tvořících vrcholy rovnoramenného trojúhelníka (body mají být vzdáleny asi 3 cm od kraje misky). Aby se spory při očkování nerozptýlily po celé půdě, očkujeme misky zespoda, otočené dnem vzhůru.
2. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 °C.
- 3.

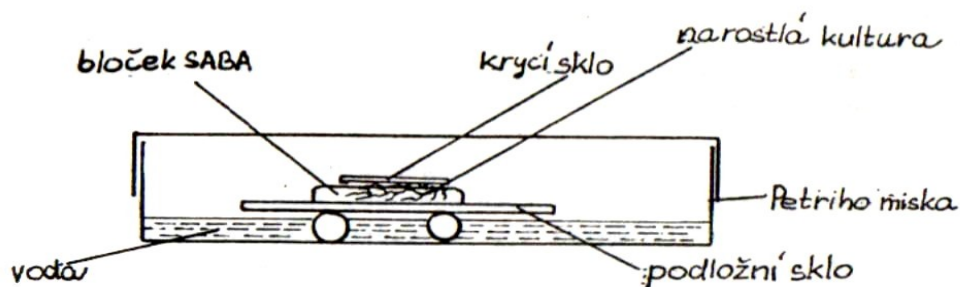
5. Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury) - demonstrační ukázka

Materiál: Petriho misky s kulturou

Pomůcky: preparační jehla, Petriho miska s vhodným kultivačním médiem, sterilní pinzeta, sterilní destilovaná voda, sterilní krycí a podložní sklo, sterilní Petriho miska s filtračním papírem, termostat na 25 °C

Pracovní postup:

1. Z tenké vrstvy kultivačního média připravíme bloček o velikosti 1x1 cm.
2. Bloček přeneseme na sterilní podložní sklo umístěné v Petriho misce s filtračním papírem (vlhká komůrka).
3. Vpichem do čtyř stran naočkujeme kulturu a překryjeme krycím sklem.
4. Kultivujeme 2 – 5 dní při teplotě 25 °C.
5. Průběžně sledujeme růst suchým objektivem při zvětšení 60x – 450x.



6. Nativní preparát:

Princip: mikroskopické morfologické znaky vláknitých hub sledujeme v nativním preparátu. Protože se však jejich vlákna špatně smáčejí a v preparátu často bývají vzduchové bubliny, je lépe použít místo vody 10 až 20% vodný roztok glycerolu, který nevysychá tak rychle. Místo glycerolu lze použít i roztok laktofenolu nebo kyseliny mléčné.

Materiál: kultury vláknitých hub

Pomůcky: podložní a krycí sklo, preparační jehla, kyselina mléčná

Pracovní postup:

1. Na podložní sklo nanese kapku kyseliny mléčné.

2. Sterilní preparační jehlou přeneseme z kolonie mikromycety malé množství mycelia s fruktifikačními orgány do kapky kyseliny mléčné (nejlépe dvěma preparačními jehlami). U plísni silně sporulujících odebíráme mycelium na rozhraní mezi zbarvenou částí kolonie a bílým okrajem, aby v preparátu nebylo příliš mnoho spor. Mycelium neroztíráme, abychom nepoškodili fruktifikační orgány – pouze jehlami uvolníme jednotlivá vlákna do kapaliny.
3. Opatrně přikryjeme krycím sklem (nepřítiskujeme!) a přebytečnou kapalinu odsajeme ze strany filtračním papírem.
4. Preparát bez další úpravy prohlédneme suchým objektivem, nejprve slabým zvětšením (objektiv 10x), postupně pak silnějším zvětšením (objektiv 40x)

Sledujeme:

- charakter mycelia (šířku vláken, barvu a strukturu mycelia, přepážky (septa) – přítomnost a rozložení, způsob větvení)
- charakter, způsob tvoření (konidiogeneze) a uspořádání fruktifikačních orgánů (např. sporangiofory, konidiofory, sporangia, kolumela, fialidy, konidie, zygospory, askospory aj.)
- přítomnost a charakter jiných útvarů (chlamydospory).

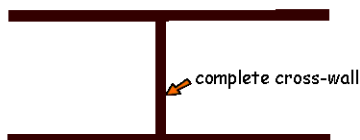
Mikroskopování

Říše: **FUNGI**

Pododdělení: **MUCOROMYCOTINA**

Řád: **MUCORALES**

- mnohojaderné **coenocytické** mycelium, přehrádky se tvoří pro oddělení rozmnožovacích orgánů nebo ve starších myceliích
- **sporangia** vznikají na větvených či nevětvených **sporangioforech**, jsou většinou mnohosporová (až 1000 spor), u odvozenějších typů vznikají sporangia s malým počtem spor (až jednosporové - nesprávně označované za "konidii")
- **zygospora** vzniká při pohlavním rozmnožování splynutím dvou různých gametangií



přepážka - *Mucoromycotina*

Rod *Mucor*

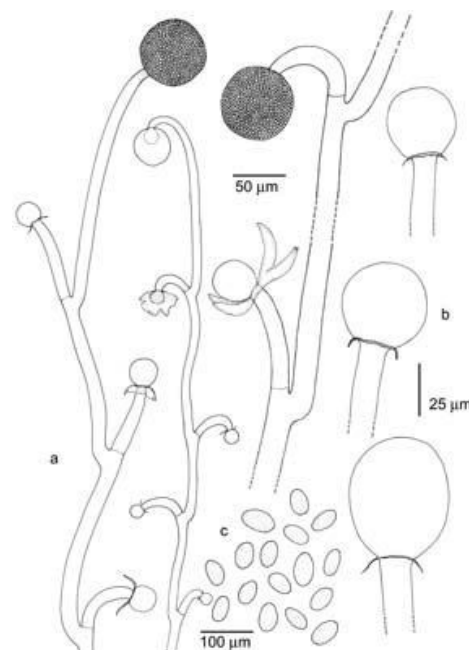
- sporangiofory větvené či nevětvené, bez rhizoidů a ukončeny mnohosporovými sporangii bez apofýzy, s kolumelou kulovitou, oválnou nebo hruškovitou

stolonů,

Preparát č.1: *Mucor circinelloides* CCM 8328

[Fungi](#), [Zygomycota](#), [Mucoromycotina](#), [Mucorales](#), [Mucoraceae](#), [Mucor](#)

- a. sympodiálně větvený circinální sporangiofory
- b. kulovitá kolumela
- c. sporangiospory

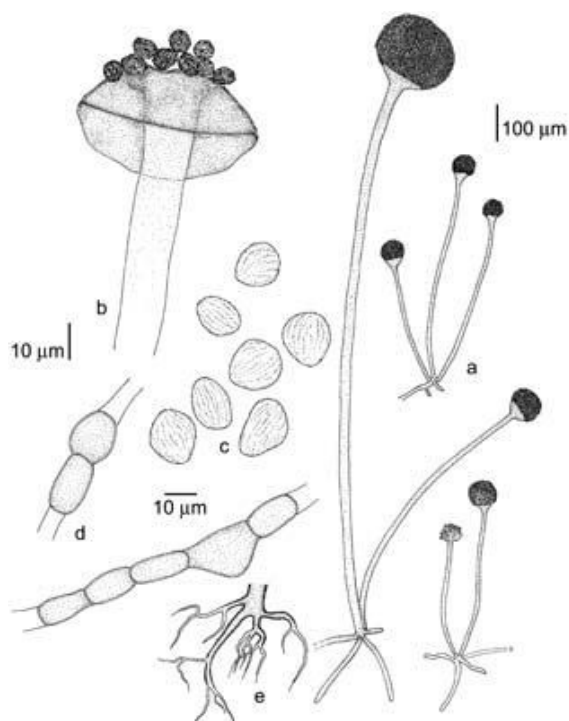


Rod *Rhizopus*

– sporangiofory se tvoří obvykle ve svazcích a nebývají větvené. Vznikají na stolonech (výhoncích), které tvoří velmi často na pevném podkladu rozvětvené, tmavě hnědé rhizoidy. Kolumela má vyvinutou apofýzu (nálevkovité rozšíření sporangioforu pod sporangiem). Po prasknutí sporangiální stěny se kolumela s apofýzou kloboukovitě obrací.

Preparát č. 2: *Rhizopus oryzae* CCM 8284

[Fungi](#), [Zygomycota](#), [Mucoromycotina](#), [Mucorales](#), [Mucoraceae](#), [Rhizopus](#)

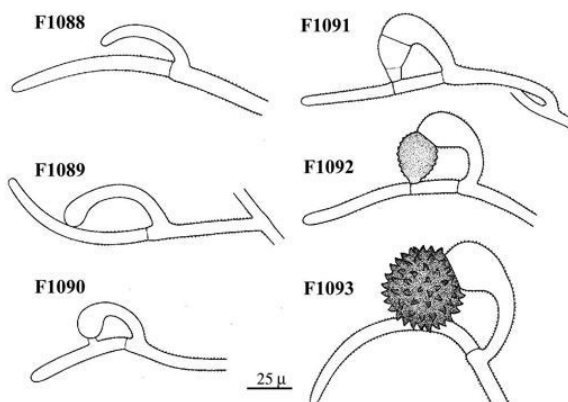


- a. nevětvené sporangiofory s rhizoidy
- b. kolumela s apofýzou
- c. sporangiospory
- d. chlamydospory
- e. rhizoidy

Preparát č. 3: *Zygorhynchus moelleri* CCM 8022 - zygospory

[Fungi](#), [Zygomycota](#), [Mucoromycotina](#), [Mucorales](#), [Mucoraceae](#), [Zygorhynchus](#)

2-655 *Zygorhynchus moelleri*

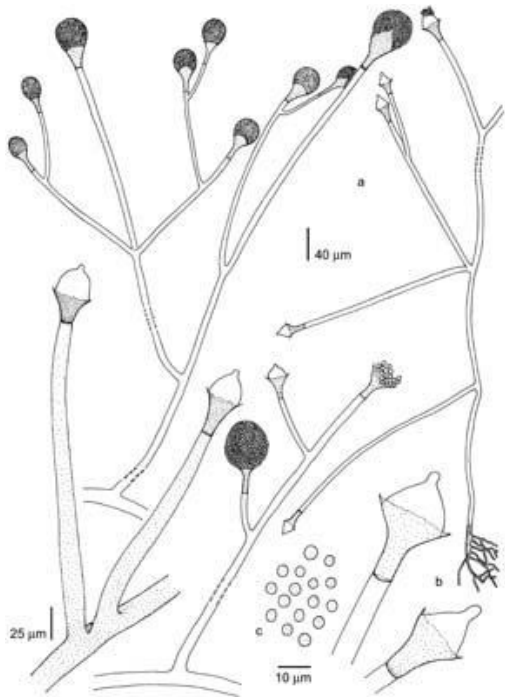


Rod *Absidia*

– sporangiofory vyrůstají ve svazcích na výhoncích s rhizoidy. Kolumela kuželovitá, často má na vrcholu papilu nebo ostřejší výčnělek. Sporangiofor přechází do sporangia širokou apofýzou.

Preparát č. 4: *Absidia coerulea* CCM 8230

[Fungi](#), [Zygomycota](#), [Mucoromycotina](#), [Mucorales](#), [Mucoraceae](#), [Absidia](#)



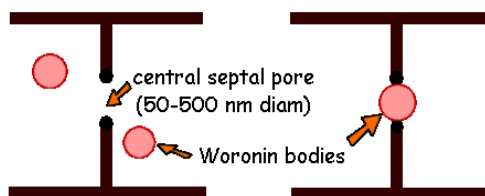
- a. větvené sporangiofory s rhizoidy
- b. kolumela s apofýzou
- c. sporangiospory

Říše: FUNGI

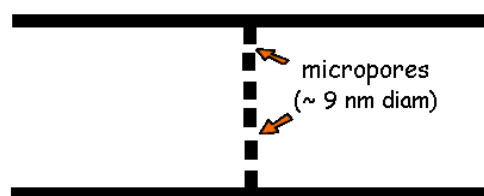
Oddělení: ASCOMYCOTA

- vegetativní stélku tvoří přehrádkované mycelium nebo pučivé buňky či pseudomycelium
- tvorba sept je centripetální, začíná u stěny hyf a pokračuje ke středu kde ponechá volný pór

přepážka - *Ascomycota*



přepážka - *Sccharomycetes*



Rozmnožování: pohlavní i nepohlavní nebo jen nepohlavní

- stadium, kdy houba vytváří nepohlavní **mitospory**, se nazývá stadium **imperfektní (anamorfa)**
- stadium, kdy houba vytváří pohlavní **meiospory**, se nazývá stadium **perfektní (teleomorfa)**

Nepohlavní rozmnožování

- nejjednodušším způsobem je fragmentace hyf

- buňky vznikající exogenně na specializovaných hyfách - **konidioforech** nazýváme **konidie**
- buňky, které dávají vznik konidiím nazýváme **konidiogenní buňky**

Základní typy konidiogeneze (vzniku konidií):

1. Thalická: již předem vytvořené buňky hyf se rozdělí přehrádkami a rozpadnou se na jednotlivé části. K formování definitivního tvaru dochází po oddělení.

a) Thalicko - arthrická: arthrokonidie

b) Holothalická: thalikonidie (thalokonidiami jsou v jistém smyslu i **chlamydostry** - tlustostěnné přetrvávající buňky vznikající na myceliu)

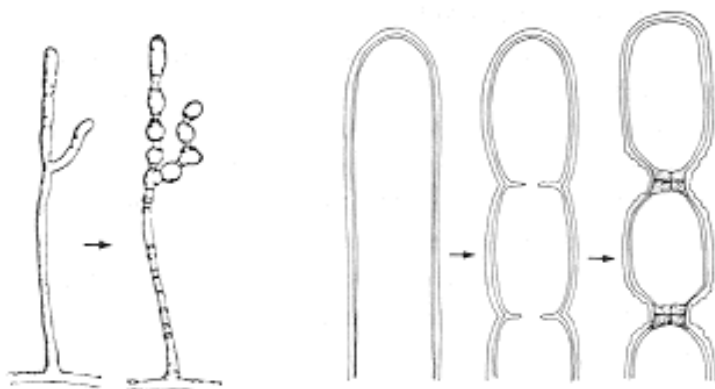
Preparát č.5: *Geotrichum candidum* CCM 8228 – arthrokonidie v rozpadajících se řetězcích

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Saccharomycotina](#), [Saccharomycetes](#), [Saccharomycetidae](#), [Saccharomycetales](#), [Dipodascaceae](#), [Geotrichum](#)



Preparát č.6: *Oidiodendron griseum* CCM 8323 - arthrokonidie

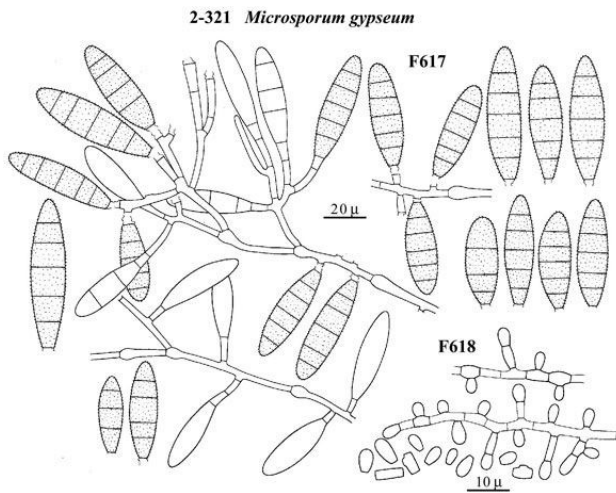
[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Ascomycetes](#), [Myxotrichaceae](#), [Oidiodendron](#)



Oidiodendron — thallic-arthric

Preparát č.7: *Microsporium gypseum* CCM 8342 – thalokonidie (makrokonidie a mikrokonidie)

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#), [Eurotiomycetidae](#), [Onygenales](#), [Arthrodermataceae](#), [Microsporium](#)



2. Blastická: konidie se formuje dříve než je oddělena přepážkou od konidiogenní buňky

a) Holoblastická - účast všech vrstev buněčné stěny

- a) synchronní - produkce více konidií na měchýřku
- b) sympodiální - proliferace konidiogenní buňky

b) Enteroblastická - vnější stěna se protrhne, konidii utváří vnitřní vrstva

- a) tretická - vznik **porokonidií**, často s výraznou jizvou na konidiogenní buňce
- b) phialidická - konidiogenní buňky **fialidy**
- c) annelidická - konidiogenní buňky **anelidy** (límeček)

Preparát č.8.: *Candida albicans* CCM 8215

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Saccharomycotina](#), [Saccharomycetes](#), [Saccharomycetidae](#), [Saccharomycetales](#), [Candida](#)

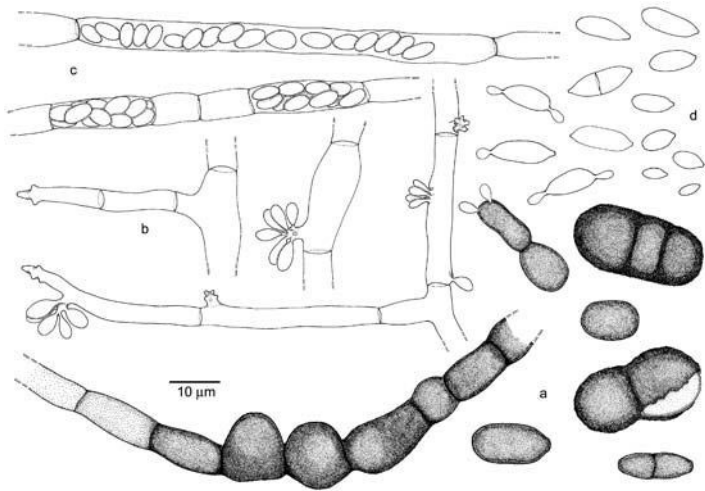
- stélka tvořena jednotlivými kulovitými až elipsoidními buňkami (**blastokonidii**) se schopností tvorby pučivého **pseudomycelia**

Kultivací na agaru s rýžovým nebo kukuřičným extraktem lze identifikovat druh *Candida albicans* a *Candida dubliniensis* podle kulovitých **chlamydozor** na koncích vláken



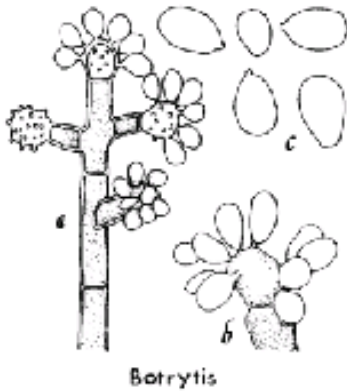
Preparát č.9.: *Aureobasidium pullulans* CCM F-148

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Dothideomycetes](#), [Dothideomycetidae](#), [Dothideales](#), [Dothioraceae](#), [Aureobasidium](#)

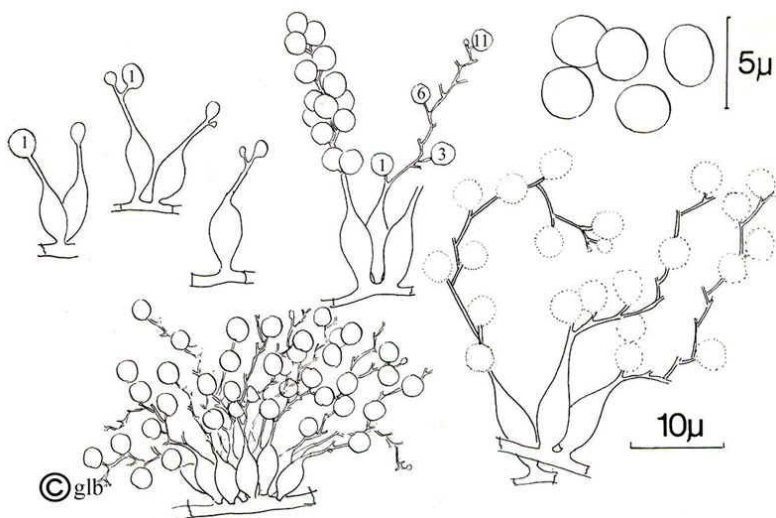


- a) interkalární tmavě pigmentované chlamydospory
- b) konidie vznikající synchronně na nediferencovaných konidiogenních buňkách
- c) endokonidie
- d) pučící buňky

Preparát č.10: *Botrytis cinerea* CCM F-16 – synchronní produkce více konidií na měchýřku
 Fungi, [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Leotiomyces](#), [Leotiomycetidae](#), [Helotiales](#), [Sclerotiniaceae](#), [Botrytis](#)

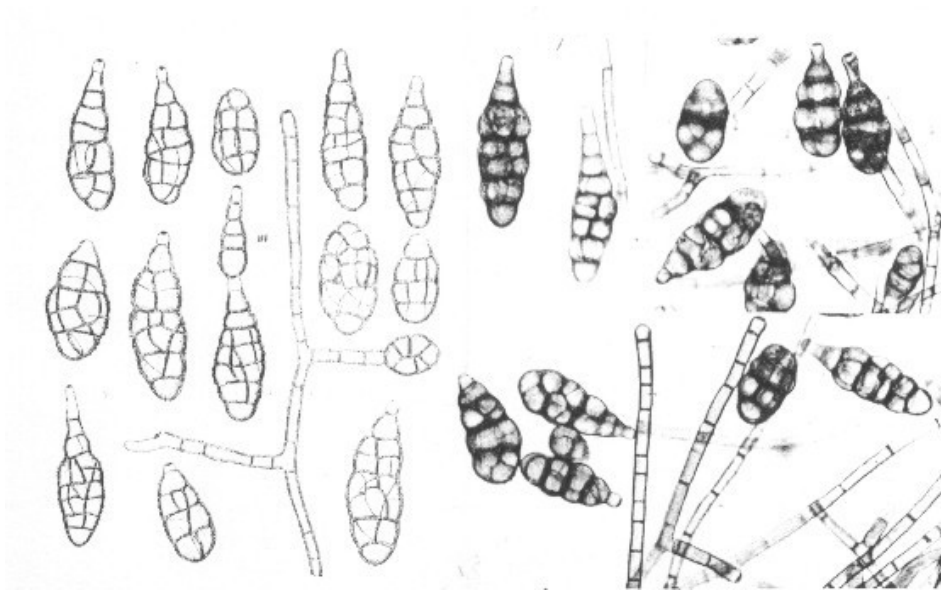


Preparát č.11: *Beauveria bassiana* CCM F-295 - sympodiální proliferace konidiogenní buňky
 Fungi, [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Sordariomyces](#), [Hypocreomycetidae](#), [Hypocreales](#), [Cordycipitaceae](#), [Beauveria](#)



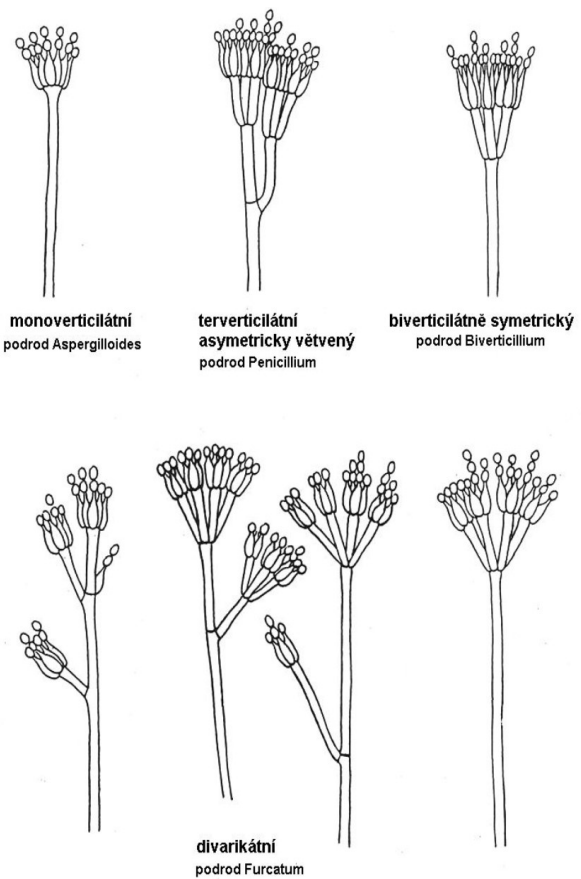
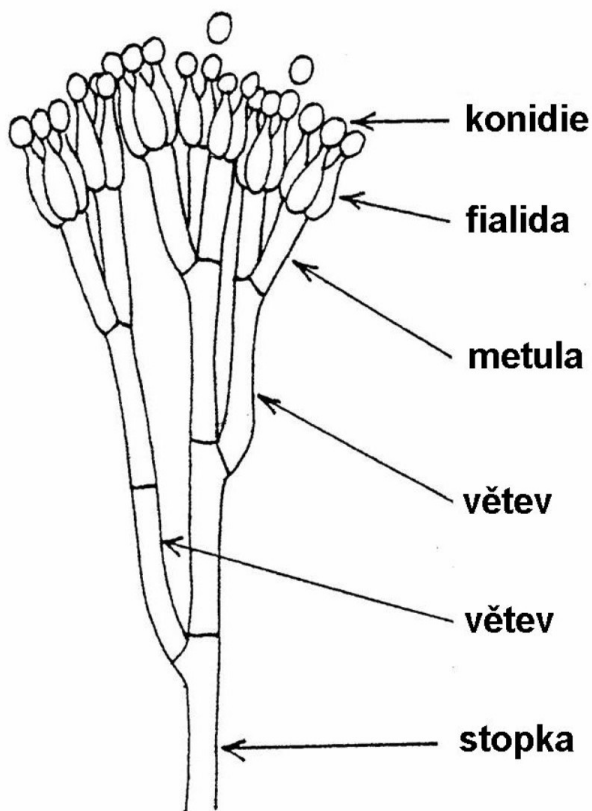
konidie (porokonidie)

Fungi, [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Dothideomyces](#), [Pleosporomycetidae](#), [Pleosporales](#), [Pleosporaceae](#), [Alternaria](#)



Rod *Penicillium*

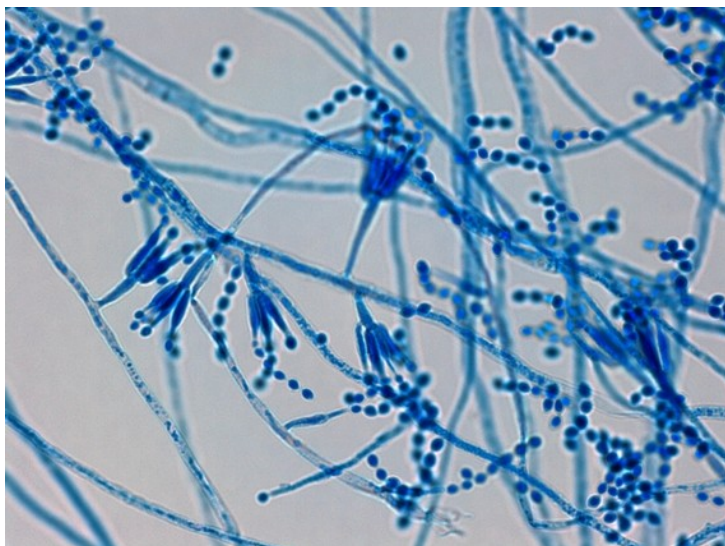
Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Trichocomaceae



- Preparát č.13: *Penicillium citreonigrum* CCM F-627 – monoverciliální
 Preparát č.14: *Penicillium vulpinum* CCM F-639 – terverticiliální, synemata
 Preparát č.15: *Penicillium minioluteum* CCM 8047 – biverciliálně symetrický
 Preparát č.16: *Penicillium daleae* CCM 8032 – divarikační

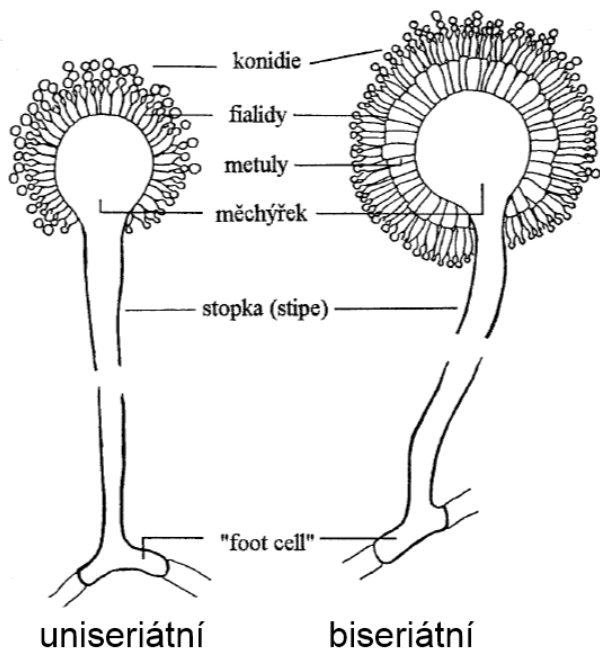
Preparát č.17: *Paecilomyces lilacinus* CCM F-589 - konidiofory méně pravidelně větvené, fialidy protáhlé v dlouhý krček, konidie

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#), [Eurotiomycetidae](#), [Eurotiales](#), [Trichocomaceae](#), [Paecilomyces](#)



Rod *Aspergillus*

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#), [Eurotiomycetidae](#), [Eurotiales](#), [Trichocomaceae](#)



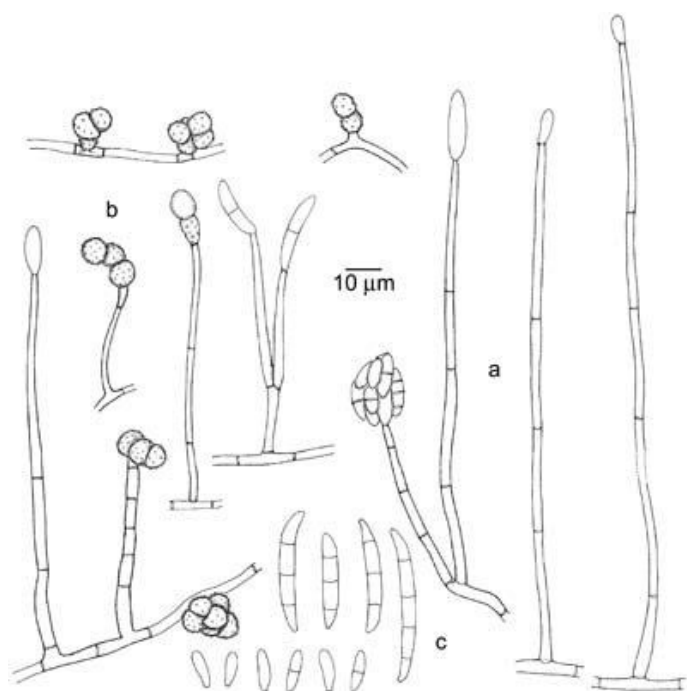
2 typy konidioforů



Preparát č.18: *Aspergillus flavus* CCM 8363 - konidiofor biseriální i uniseriální, fialidy, konidie

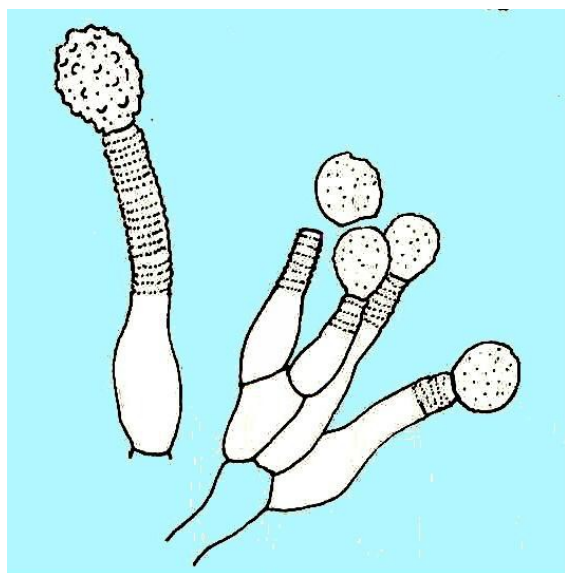
Preparát č.19: ***Fusarium solani* CCM 8014** - konidiofory s monofialidami, makro- a mikrokonidie, chlamydospory, sporochia (palisáda konidioforů v ložisku na povrchu substrátu)

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Sordariomycetes](#), [Hypocreomycetidae](#), [Hypocreales](#), [Nectriaceae](#), [Fusarium](#)



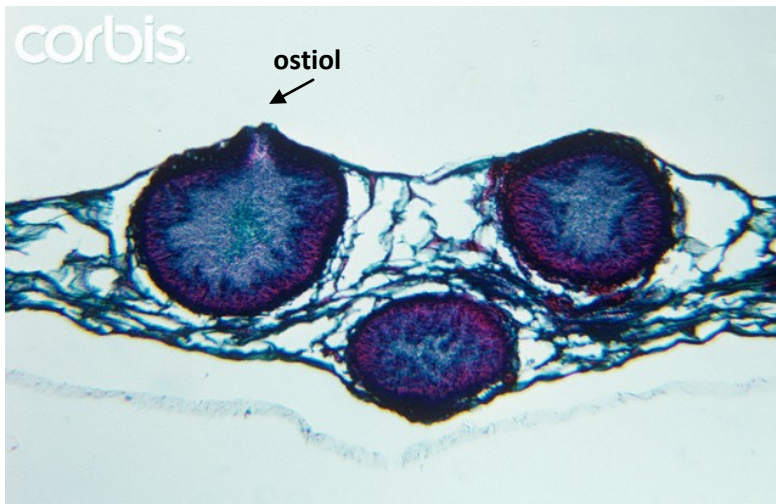
Preparát č.20: ***Scopulariopsis brevicaulis* CCM F-388** - konidiogenní buňky - anelidy

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Sordariomycetes](#), [Hypocreomycetidae](#), [Microascales](#), [Microascaceae](#), [Scopulariopsis](#)



Preparát č.21: ***Phoma lingam* CCM F-700** - pyknidy (kulovitý nebo lahvicovitý útvar s ostiolem, uvnitř vystlaný konidiofory)

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Dothideomycetes](#), [Pleosporomycetidae](#), [Pleosporales](#), [Phoma](#)



Pohlavní rozmnožování

- při pohlavním procesu vznikají **plodnice (askomata)** => v plodnicích pak dochází ke karyogamii v koncových buňkách tzv. **askogenních hyfách** - z nich vznikají vřečka
- spory (**askospory**) vznikají ve **vřecku** (latinsky **ascus**, množné číslo **asci**) obvykle v počtu 8 v jednom vřecku

Typy plodnic:

1) Askohymeniální typ

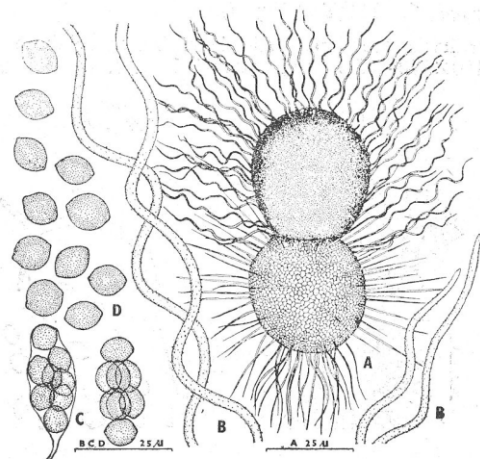
- **kleistothecium** je uzavřená plodnice s vytvořenou stěnou, otvírá se rozpadem; vřečka nejsou nijak uspořádána
- **perithecium** je kulovitá nebo protáhlá plodnice s úzkým ústím (ostiolem) vystlaným perifýzami, vřečka jsou uspořádána v hymeniu, mezi nimi se tvoří sterilní hyfová zakončení – parafýzy
- **apothecium** je miskovitá plodnice; vřečka jsou uspořádána v hymeniu na povrchu plodnice, parafýzy vytvořeny

2) Askolokulární typ

- **askostroma** - v pseudoparenchymatickém útvaru se diferencují pohlavní orgány, askogenní hyfy a vřečka vrůstají do sekundárně vytvořené lyzigenní dutiny (lokulu)

Preparát č. 22: *Chaetomium globosum* CCM F-275

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Sordariomycetes](#), [Sordariomycetidae](#), [Sordariales](#), [Chaetomiaceae](#), [Chaetomium](#)

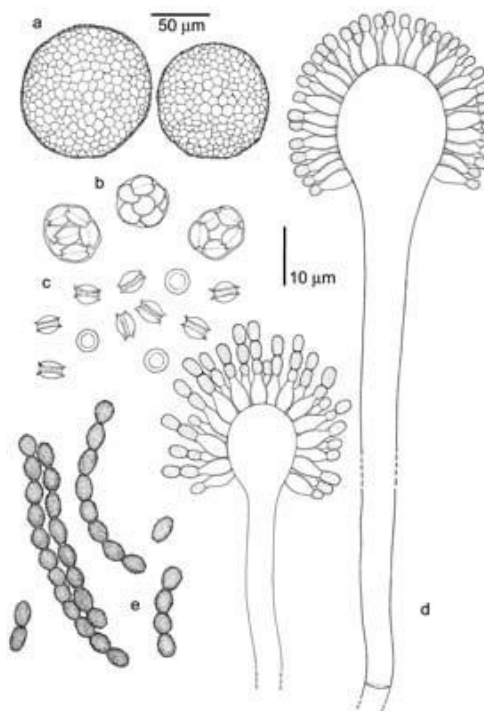


- A - perithecium
- B - zvlněná nvětvená vlákna (trichomy)
- C - vřecko (ascus)
- D - askospory

Preparát č. 23: *Eurotium chevalieri* CCM F-6

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#),
[Eurotiomycetidae](#), [Eurotiales](#), [Trichocomaceae](#), [Eurotium](#)

- a. kleistothecium
- b. vřecka
- c. askospory s ekvatoriálními prstenci
- d. konidiofory
- e. konidie



Říše: FUNGI

Oddělení: BASIDIOMYCOTA

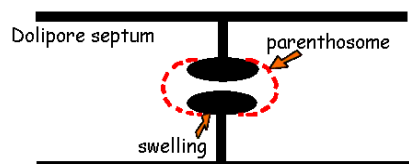
společným znakem je tvorba **bazidie** (meiosporangium) a **bazidiospor** (meiospor) tvořících exogenně na **sterigmatech** (stopečkách)

- vegetativní stélku tvoří přehrádkované mycelium, ve stěně přehrádek jsou vytvořeny **dolipóry** (podoba pláště soudku) s **parentozómem**

- **primární mycelium** – vzniká klíčením bazidiospory, jednojaderné, u některých zástupců může chybět

- **sekundární mycelium** – dikaryotické, jeho vznik souvisí se somatogamickou kopulací dvou buněk primárního mycelia, v něm probíhají konjugované mitózy spojené s tvorbou **přezek** (*Uredinales* a někteří zástupci dalších skupin přezky netvoří)

- nepohlavní rozmnožování – uskutečňuje se nejčastěji pomocí fragmentace mycelia (blastospory, arthrospory), vzácněji i dalšími typy konidií



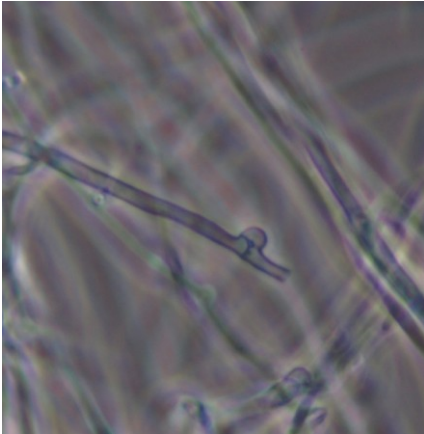
přepážka - Basidiomycota

Preparát č.24: *Rhizoctonia solani* CCM F-1 – přehrádkované mycelium (hyfy) větví se téměř v pravém úhlu

[Fungi](#), [Basidiomycota](#), [Agaricomycotina](#), [Agaricomycetes](#), [Cantharellales](#), [Ceratobasidiaceae](#), [Rhizoctonia](#)



Preparát č.25: *Schizophyllum commune* CCM F-795 - hyfy s přezkami



Použitá literatura:

1. Váňa, J.: Systém a vývoj hub a houbových organismů. Karolinum, Praha, 1996.
2. MycoBank, <http://www.mycobank.org/>
3. De Hoog G.S.: et al.: Atlas of clinical fungi. Utrecht, Reus, 2000.
4. P.W. Crous, G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, R.A. Samson. CBS Laboratory Manual Series 1, Fungal Biodiversity. CBS, Utrecht, 2009.

Obr. 1 Stanovení hodnoty CFU (Colony Forming Unit) - KAPKOVÁ METODA

