

## **Bi3390c Lékařská mykologie - cvičení**

### **Obsah:**

- 1. Nativní preparát**
- 2. Izolace kvasinek stěrem z dutiny ústní**
- 3. Identifikace kvasinek**
  - I. Mikroskopický průkaz**
    - Gramovo barvení
    - Germ tube test
    - Negativní barvení nigrosinem
  - II. Kultivační průkaz**
    - Průkaz *Cryptococcus neoformans* na Bird seed agaru
    - Mikromorfologie na kukuřičném agaru
    - Agar podle Nickersona pro izolaci a identifikaci kvasinek rodu *Candida*
  - III. Biochemický průkaz**
    - Asimilace cukrů
    - Fermentace cukrů
- 4. Identifikace vláknitých hub rodu *Aspergillus***
- 5. Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)**
- 6. Vlasový perforační test**
- 7. Stanovení celkového počtu směsné populace plísní v ovzduší vnitřního prostředí sedimentační metodou**

## 1. Nativní preparát:

Mikroskopické morfologické znaky vláknitých hub sledujeme v nativním preparátu. Pro krátkodobé pozorování se jako uzavírací médium používá voda. Pro dlouhodobější sledování používáme pomalu vysychající kapaliny např. 10 až 20 % roztok glycerolu. Místo glycerolu lze použít i roztok laktofenolu nebo kyselinu mléčnou.

**Materiál:** kultury vláknitých hub

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

### 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 kultur silně sporulujících odebíráme mycelium na rozhraní mezi zbarvenou částí kolonie a bílým okrajem, aby v preparátu nebylo příliš mnoho konidií. 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 a 100x) u hyalinních mikromycet s fázovým kontrastem

### 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).

### Hodnocení:

*Popište struktury viditelné pod mikroskopem u jednotlivých kultur*

## 2. Izolace kvasinek stěrem z dutiny ústní

**Materiál:** stěr z dutiny ústní

**Pomůcky:** sterilní vatové tampóny, Sabouraudův agar s glukózou a chloramfenikolem (SAB), krevní agar (KA) a agar dle Nickersona, očkovací klička, termostat na 30°C a 37°C

### Pracovní postup:

1. Sterilním vatovým tamponem provedeme krouživým pohybem stěry z dutiny ústní.
2. Provedeme křížový roztěr stěru na KA, SAB s chloramfenikolem a agar dle Nickersona.
3. Kultivujeme ve tmě, KA při teplotě 37 °C, SAB s chloramfenikolem a agar dle Nickersona při teplotě 30 °C po dobu 24 - 48 hodin.
4. V případě růstu kolonií zhotovíme preparát barvený podle Grama a kulturu kvasinky naočkujeme krátkým řezem do středu tenké vrstvy kukuřičného agaru.

### Sabouraudův agar

Sabouraudův agar s 2% glukózy příp. dextrózy je univerzální kultivační půdou pro záchyt patogenních i nepatogenních mikromycet, zejména dermatofytů a kvasinek. Původní recept obsahoval 4% glukózy. Použití pouze 2% glukózy omezuje rychlost přechodu kultury do pleomorfního stavu, kdy obsahuje pouze vlákna bez diagnosticky cenných reprodukčních struktur.

### 3. Identifikace kvasinek

#### **Kultivační průkaz**

- I. morfologie na agaru s rýžovým extraktem nebo kukuřičném agaru
- II. Bird Seed Agar
- III. agar podle Nickersona
- IV. agar pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu

#### **Mikroskopický průkaz**

- V. Germ tube test
- VI. Gramovo barvení
- VII. negativní barvení nigrosinem

#### **Biochemický průkaz**

- VIII. asimilace cukrů
- IX. fermentace cukrů

#### **Kultivační průkaz**

##### **I. Mikromorfologie na agaru s kukuřičným extraktem:**

Rýžový agar stejně jako kukuřičný agar poskytuje vhodné podmínky pro růst *Candida* spp. na kterém tvoří chlamydospory společně s druhem *C. dubliniensis*.

**Pomůcky:** kultura kvasinky *Candida albicans* CCM 8215 nebo vlastní izolát, Petriho miska s rýžovým agarem, sterilní krycí skla, preparační jehla, pinzeta sterilizovaná vypálením, termostat, světelný mikroskop

##### **Pracovní postup:**

1. Kulturu kvasinky naočkujeme krátkým řezem do středu tenké vrstvy agaru.
2. Přikryjeme sterilním krycím sklem.
3. Kultivujeme 24 – 48 hodin při teplotě 25°C.
4. Poté kulturu prohlížíme přímo na misce pod mikroskopem.

##### **Hodnocení:**

*Popište útvary pozorované v mikroskopu.*

##### **II. Průkaz druhu *Cryptococcus neoformans* na Bird seed agaru:**

Bird seed agar je médium pro diferenciaci *Cryptococcus neoformans* na základě produkce vysoce specifické aktivity fenoloxidázy, vedoucí k tvorbě charakteristického tmavohnědého melaninu, *C. albicans* tvoří bílé kolonie.

**Pomůcky:** kultura kvasinky *Cryptococcus neoformans* CCM 8312, Bird Seed Agar (Niger Seed Agar), očkovací klička, termostat

##### **Pracovní postup:**

1. Kulturu kvasinky naočkujeme křížovým roztěrem.
2. Kultivujeme max. 7 dní při teplotě 30°C.
3. Poté hodnotíme makromorfologii.

##### **Hodnocení:**

*Popište morfologii kolonií na agaru.*

### III. Agar podle Nickersona pro izolaci a průkaz kvasinek rodu *Candida*

BiGGY (Bismuth Sulphite Glucose Glycine Yeast Agar) – agar podle Nickersona využívá schopnosti kvasinek rodu *Candida* extracelulárně redukovat siřičitan. Schopnost redukovat siřičitan bismutitý obsažený v kyselém nebo neutrálním médiu na sulfid se projeví tvorbou různě zbarvených kolonií. Siřičitan bismutitý zároveň inhibuje případný růst bakterií. Silně redukční schopnosti mají zejména druhy *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*.

**Pomůcky:** kultury kvasinek, BiGGY agar, očkovací klička (tampon), termostat

#### **Pracovní postup:**

1. Kulturu kvasinky naočkujeme křížovým roztěrem.
2. Kultivujeme 48 hod. při teplotě 30°C.
3. Poté hodnotíme makromorfologii.

#### **Hodnocení:**

Vzhled kolonií:

*C. albicans* – hladké, kulaté, černohnědé, bez lesku, tmavé zbarvení nedifunduje do okolí

*C. tropicalis* – hladké, tmavě hnědé s černým vyvýšeným středem, kovově lesklé, okolí kolonie hnědočerně zbarvené v důsledku šíření redukujících enzymů do okolí

*C. krusei* – velké, ploché, zvrásněné, hnědočerné, žluté haló

*Popište morfologii kolonií na agaru a proveďte presumptivní identifikaci kvasinek.*

### IV. Agar pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu

**Pomůcky:** kultura kvasinky *Cryptococcus neoformans* CCM 8312, agar pro kultivaci, očkovací klička, termostat, Lugolův roztok

#### **Pracovní postup:**

1. Kulturu kvasinky naočkujeme hádkem na povrch kultivačního média.
2. Kultivujeme 48 hod. při teplotě 30°C.
3. Povrch nátěru na misce přelijeme Lugolovým roztokem..

#### **Hodnocení:**

Přítomnost polysacharidu se projeví zmodráním nátěru.

*Určete, zda kultura Cryptococcus neoformans CCM 8312 tvoří polysacharidová pouzdra.*

## Hodnocení makromorfologie:

**Barva** - bílá, krémová, lososová

**Textura** – hladká, drsná

**Vzhled** – lesklé, matné

**Povrch kolonie** - 1. centrálně pruhovaný (v koncentrických kruzích); 2. radiálně pruhovaný (radiálně zvrásněný)

**Okraje kolonie** - 3. ucelený okraj; 4. lalokovitý okraj; 5. pilovitý okraj; 6. cípovitý okraj; 7. rhizoidní



1



2



3



4



5



6



7

**Profil kolonie** - 1. hladká, vypouklá kolonie; 2. hladká kolonie s vyvýšeným středem; 3. hladká kolonie, kráterovitá; 4. plochá kolonie; 5. kráterovitá kolonie ve středu zvlněná; 6. vyvýšená, zvlněná kolonie; 7. plochá, zvlněná kolonie; 8. rhizoidní kolonie s pseudomyceliem



1



2



3



4



5



6



7



8

(Kocková-Kratochvílová, 1982, upraveno)

## Hodnocení:

*Popište makromorfologii kultury na SAB*

## Mikroskopický průkaz

**Materiál:** kultura kvasinek

### **V. Germ tube test:**

Germ tube test, nebo-li test na přítomnost klíčících hyf, je jedním ze základních identifikačních testů pro identifikaci *C. albicans*. *C. albicans* společně s *C. dubliniensis* jsou jediné kvasinky z rodu *Candida*, které tvoří tyto klíčící hyfy.

**Materiál:** *Candida albicans* CCM 8215, *Candida tropicalis* CCM 8223

**Pomůcky:** zkumavka s bovinním sérem, bakteriologická klička, pipeta, zkumavka se sterilním fyziologickým roztokem, termostat, podložní a krycí sklo, mikroskop

### **Pracovní postup:**

1. Připravte slabou suspenzi kvasinek v 0,5 - 1,0 ml sterilního séra, optimální hustota inokula je  $10^5$  -  $10^6$  buněk/ml, vyšší koncentrace často vede ke snížení tvorby klíčících hyf a tedy k falešně negativnímu výsledku.
2. Kultivujeme ne déle jak 3 hod. při teplotě 35 - 37°C.
3. Umístíme 1 kapku inokulovaného séra na podložní sklo a zakryjeme krycím sklem, v mikroskopu hodnotíme tvorbu klíčících vláken.

### **Hodnocení:**

Určete, který ze vzorků je druh *Candida albicans*.

### **VI. Preparát barvený podle Grama:**

Umožňuje podrobné pozorování mykotických organismů při velkých zvětšeních a odlišení bakteriální kontaminace.

**Pomůcky:** podložní skla, kahan, barvicí roztoky, očkovací klička, mikroskop, imerzní olej

### **Pracovní postup:**

1. Na podložní sklo nanese kapku sterilní destilované vody.
2. Sterilní kličkou nabere kulturu a rozmícháme v kapce vody.
3. Preparát usušíme na vzduchu a fixujeme teplem, opakovaným protažením plamenem kahanu.
4. Fixovaný preparát přelijeme krystalovou violetí a necháme působit 30".
5. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
6. Převrstvíme Lugolovým roztokem na 30".
7. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
8. Odbarvujeme 95% etanolem, dokud odchází modrá barva (cca 20 - 30").
9. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
10. Dobarvíme zředěným roztokem safraninu 1 min.
11. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat) a necháme oschnout na vzduchu.
12. Preparát prohlédneme imerzním objektivem při zvětšení 1000x a více.

### **Hodnocení:**

*Jak se barví kvasinky?*

*Jak se liší v preparátu kvasinky od bakterií?*

*Popište mikromorfologii kultury v preparátu.*

## VII. Negativní barvení nigrosinem:

Metoda spočívá v obarvení pozadí, buňky zůstávají nezbarvené. Používá se ke stanovení pouzder a slizů.

**Pomůcky:** kultura CCM 8312 *Cryptococcus neoformans*, podložní skla, krycí skla, nigrosin, očkovací klička, mikroskop, imerzní směs

### Pracovní postup:

1. Klička kultury kvasinky se suspenduje v kapce vody na podložním sklíčku a přidáme kapku nigrosinu.
2. Hranou druhého podložního skla suspenzi rozetřeme a necháme uschnout na vzduchu. Nefixujeme!!!

### Hodnocení:

*Tvoří kultura polysacharidová pouzdra?*

## Biochemický průkaz

**Materiál:** kultury kvasinek

## VIII. Asimilace cukrů

Schopnost využívat za aerobních podmínek cukry jako zdroj energie a materiál pro syntézu buněčné hmoty - cukerný **auxanogram**. Běžně se sleduje schopnost asimilace glukózy, galaktózy, sacharózy, maltózy, laktózy a rafinózy.

**Pomůcky:** médium pro testování asimilace uhlíku ve zkumavkách po 5 ml, 20% sterilní roztoky testovaných cukrů, pipety, termostat

### Pracovní postup:

1. Do média pro testování asimilace uhlíku přidáme testované cukry, aby výsledná koncentrace byla 1-2%.
2. Jako kontrolu použijeme medium bez zdroje uhlíku.
3. Kličkou slabě inokulujeme všechny typy medií
4. Zkumavky kultivujeme při 30°C po dobu jednoho týdne.

### Hodnocení:

*Zjistíme, ve kterých typech medií kultura roste srovnáním s kontrolou.*

## IX. Fermentace cukrů

Schopnost kvasinek zkvašovat některé jednoduché cukry za vzniku etanolu a oxidu uhličitého v anaerobním prostředí - **zymogram**. Běžně se sleduje schopnost fermentace glukózy, galaktózy, sacharózy, maltózy, laktózy a rafinózy.

**Pomůcky:** médium pro fermentaci cukrů ve zkumavkách po 9 ml s Durmanovou plynovkou, 10% sterilní roztoky testovaných cukrů, pipety, termostat

### Pracovní postup:

1. Do média pro fermentaci cukrů přidáme testované cukry, aby výsledná koncentrace byla 1%.
2. Masivní kličkou inokulujeme všechny typy medií
3. Zkumavky kultivujeme při 25°C po dobu 5 dnů.

### Hodnocení:

*Hodnotíme tvorbu plynu – objeví se v plynovce a tvorbu kyselin – projeví se žlutým zbarvením. Podle výsledné kombinace testů identifikujeme kvasinku.*

## 4. Identifikace vláknitých hub rodu *Aspergillus*

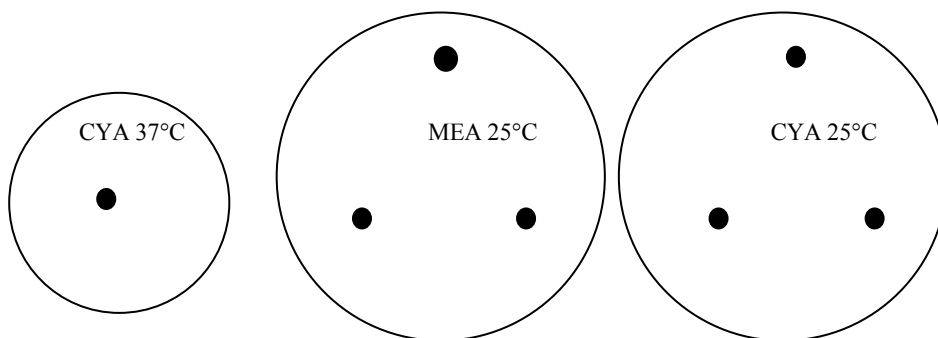
**Materiál:** Petriho misky s kulturou

**Pomůcky:** preparační jehla, CYA (Czapkův agar s kvasničním extraktem), MEA (Agar se sladovým extraktem), CY20S (Czapkův agar s kvasničním extraktem a 20% sacharózy), termostat

### 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 zespodu, otočené dnem vzhůru.
2. Kultivujeme 7 dnů při teplotě 25 a 37 °C.

### Schéma inokulace:



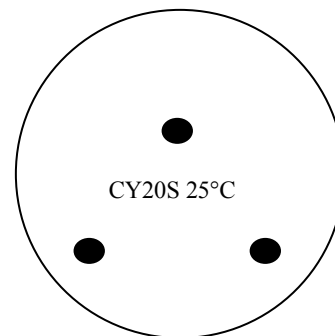
### Hodnocení:

po 7 dnech kultivace provedeme vyhodnocení růstu vláknitých hub.

Sledujeme:

#### znaky makroskopické

- rychlost růstu
- charakter povrchu kolonií
- barvu kolonie
- barvu spodní strany kolonie
- přítomnost pigmentu difundujícího do agaru
- přítomnost a barvu výpotku (exudát)
- přítomnost zvláštních útvarů viditelných okem (plodničky, sklerocia, aj.)
- charakteristický zápach.

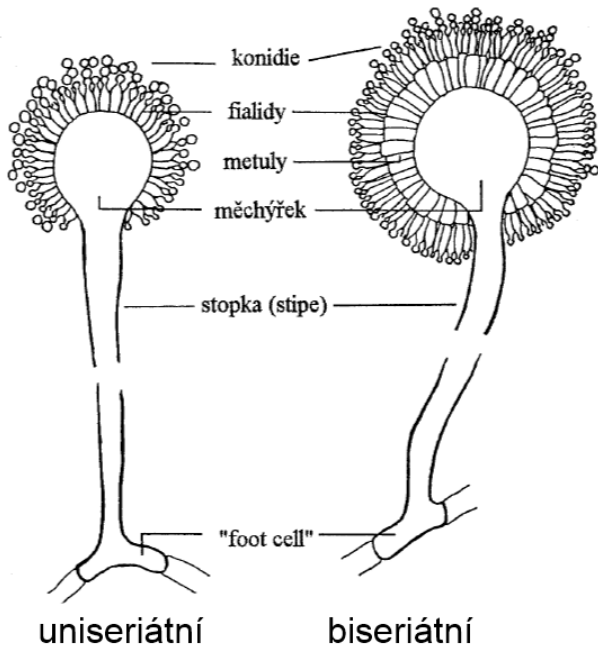


V hodnocení vždy uvedeme stáří kultury a použitou kultivační půdu, neboť různé půdy mnohdy modifikují a značně mění charakteristické znaky (jak makroskopické, tak mikroskopické). Čisté kultury připravujeme zpravidla na půdě, na které je popis rodu autorem uveden.

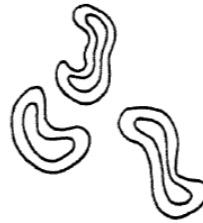
#### znaky mikroskopické

Ke zjištění mikroskopických znaků nutných pro identifikaci vláknitých hub potřebujeme kromě mikroskopu i binokulární lupu. Pod lupou prohlédneme větší struktury (charakter mycelia, sklerocií, plodniček apod.), pro studium dalších struktur, na nichž je založena identifikace, připravíme mikroskopický preparát. Jeho příprava a správné posouzení a zhodnocení je mimořádně důležité, neboť morfologické znaky u vláknitých hub jsou základním diagnostickým kritériem při určování rodů a druhů. Identifikace do rodu či druhu na základě makroskopických a mikroskopických morfologických znaků se provádí podle klíčů vypracovaných pro určité taxonomické skupiny.





## 2 typy konidioforů



"hülle - cells"



konidiální hlavice paprscité



konidiální hlavice sloupcovité

### Hodnocení:

*Vyplňte identifikační protokol*

*Podle identifikačního klíče proveďte identifikaci do rodu.*

### *Eurotium chevalieri* CCM F-6

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

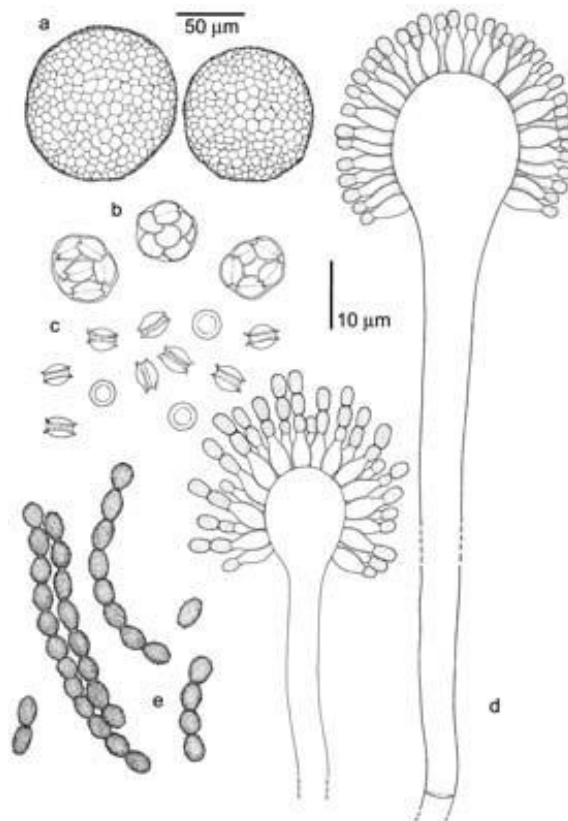
kleistothecium

vřecka

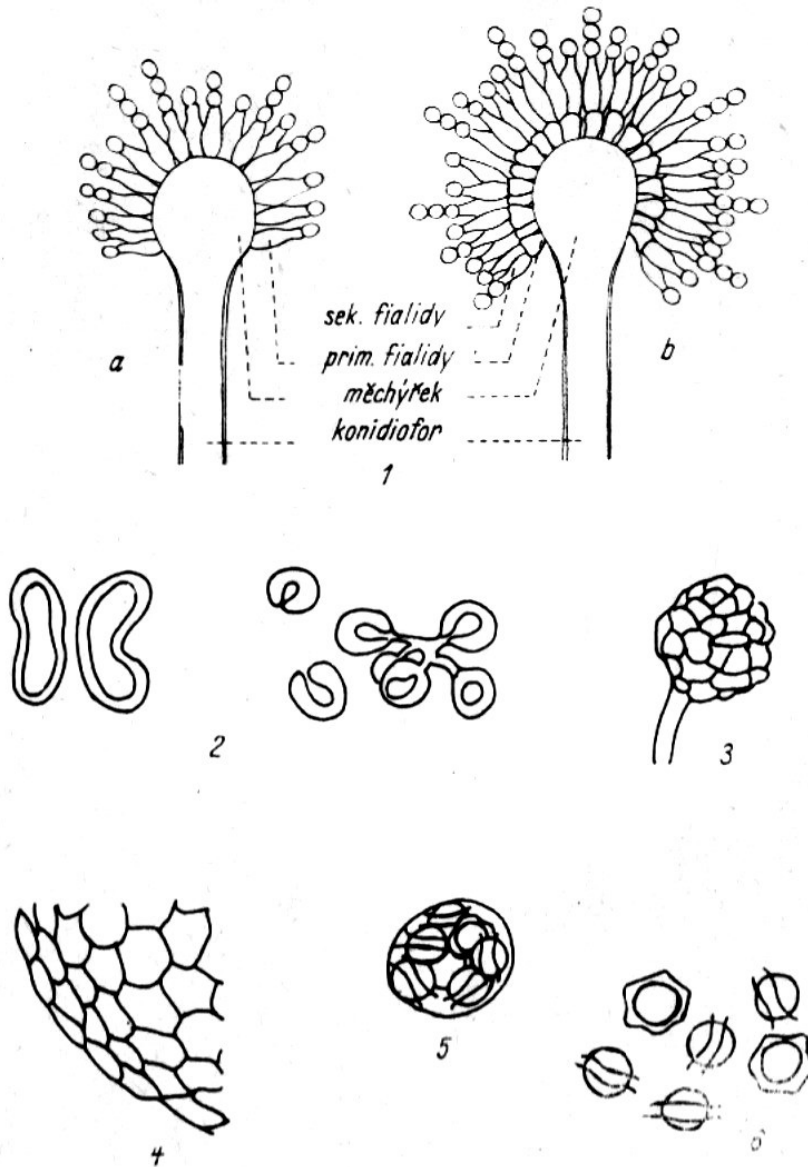
askospory s ekvatoriálními prstenci

uniseriální konidiofory

konidie



**Příloha VI Aspergillus**



**Obr. 1.** Konidiofory u rodu *Aspergillus* (podle Rapera a Fennellové)

*a* — ukončení konidioforu s jednou řadou fialid, *b* — ukončení konidioforu se dvěma řadami fialid

**Obr. 2.** „Hülle cells“ (prázdné buňky) u rodu *Aspergillus* (orig.)

**Obr. 3.** Mladá plodnička u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)

**Obr. 4.** Část povrchu zralé plodničky u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)

**Obr. 5.** Vřecko u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)

**Obr. 6.** Askospory u rodu *Aspergillus* (podle Arxe)

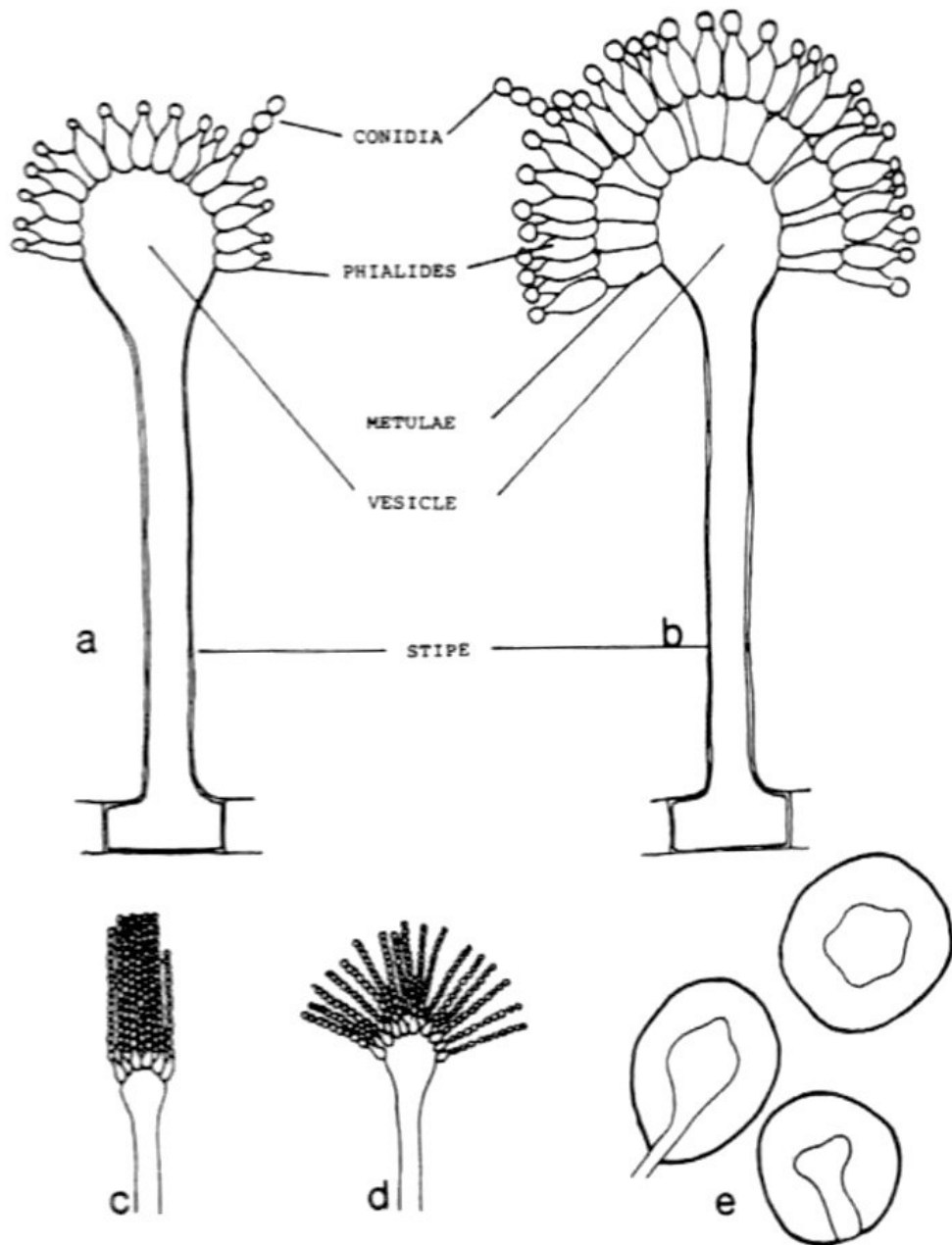


Fig. 67. Morphology of *Aspergillus*. a. uniseriate and b. biseriata conidiophores, c. columnar and d. radiating conidial chains, e. Hülle cells.

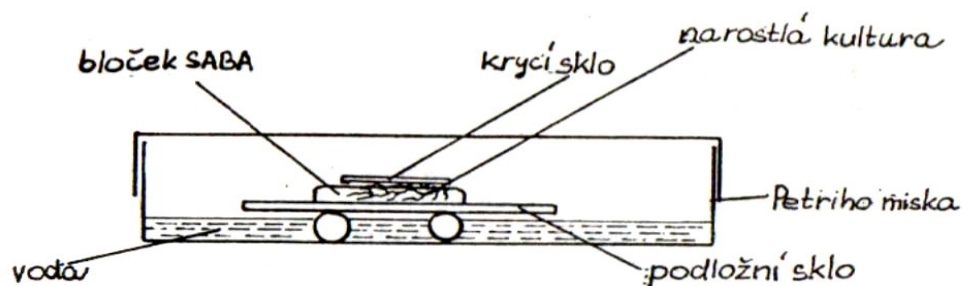
## 5. Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)

**Materiál:** Petriho misky s kulturou vláknité houby

**Pomůcky:** preparační jehla, Petriho miska s vhodným kultivačním médiem (Malt Extrakt Agar nebo Sabouraudův glukozový agar), sterilní pinzeta, sterilní destilovaná voda, sterilní krycí a podložní skla, sterilní Petriho miska (vlhká komůrka).

### Pracovní postup:

4. Z tenké vrstvy kultivačního média připravíme bloček o velikosti 1x1 cm.
5. Bloček přeneseme na sterilní podložní sklo umístěné ve vlhké komůrce.
6. Vpichem do čtyř stran naočkujeme kulturu a překryjeme krycím sklem.
7. Kultivujeme 2 – 5 dní při teplotě 25 °C.
8. Průběžně sledujeme růst suchým objektivem při zvětšení 60x – 450x.



### Hodnocení:

*Popište struktury viditelné v mikroskopu.*

## 6. Vlasový perforační test

Test využívá schopnosti některých druhů perforovat vlas *in vitro* za vzniku perforačních kanálků.

**Materiál:** kultura vláknité houby

**Pomůcky:** sterilní dětské vlasy (nejlépe blondáté), sterilní dest. voda, 50 µl 10% kvasničního extraktu, pinzeta, termostat, podložní a krycí sklo, preparační jehla, kyselina mléčná, mikroskop

### Pracovní postup:

1. Do lahvičky obsahující 10 ml ster. dest. vody přidáme 50 µl 10% kvasničního extraktu a očkovací jehlou přeneseme část mycelia.
2. Kultivujeme při 24 °C 1-3 týdny.
3. Zhotovíme nativní preparát.

### Hodnocení:

*Trychophyton interdigitale* - přítomnost perforačních kanálků

*Trychophyton rubrum* - perforační kanálky netvoří

*Na základě mikroskopického nálezu zjistěte, zda se jedná o druh Trychophyton interdigitale.*

## 7. Stanovení celkového počtu směsné populace plísňí v ovzduší vnitřního prostředí sedimentační metodou

**Princip:** Sedimentační (gravitační) metoda využívá schopnost mikroorganismů sedimentovat na pevné povrchy. Tato metoda by neměla být používána při hodnocení prostor, které využívají oběhový vzduch. Jedná se o všechny typy klimatizačních zařízení s turbulentním či laminárním prouděním vzduchu. Pokud se využívá pro mikrobiologicko-hygienické hodnocení prostředí tato metoda, mělo by vždy být vyjádřeno i relativní znečištění, tj. provést i stanovení mikroorganismů ve venkovním ovzduší.

**Pomůcky:** 4x Petriho miska s médiem (DRBC – Chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení) o průměru 84 - 90 mm.

### **Pracovní postup:**

3. Ve středu místnosti, v inhalační zóně ve výšce 160 cm nad zemí se umístí dvě uzavřené Petriho misky s médiem. Vzdálenost mezi miskami je nejméně 10, maximálně 30 cm. Pro odběry je možno zvolit i jiné místo (nadzemní výška) podle účelu vyšetření.
4. Poté se misky otevřou a osoba, která provádí odběr, opustí interiér. Přítomnost a pohyb dalších osob ve sledovaném interiéru je vyloučen.
5. Dvě Petriho misky s médiem umístíme do venkovního prostředí před objekt nebo z okna
6. Po 1 hodině se Petriho misky uzavřou.
7. Inkubace se provádí při teplotě  $25 \pm 1$  °C po dobu 3-5 dnů.
8. Po inkubaci se spočítají vyrostlé kolonie mikroskopických vláknitých hub.

**Stanovení relativního znečištění:** u/v (koncentrace uvnitř/ koncentrace venku), tj. porovnáním stanovené koncentrace ve vnitřním prostředí s koncentrací ve venkovním ovzduší.

Vypočte se aritmetický průměr počtu kolonií z obou Petriho misek. Tento počet se přepočítá na dobu expozice 1 hodina. Výsledek je tedy vyjádřen jako celkový počet plísňí, které sedimentovaly na misku za jednu hodinu ve vnitřním prostředí / celkový počet plísňí, které sedimentovaly na misku za jednu hodinu ve venkovním prostředí

**Hodnocení:** Pro obytné místnosti se považují hodnoty 50 KTJ plísňí / Petriho misku / hod. za hodnoty, které přibližně odpovídají kategorii znečištění střední dle EUR 14988.

Za hygienicky závažné znečištění se považuje hodnota u/v vyšší než 2,0. Hodnota u/v = 2,0 znamená, že koncentrace mikroorganismů je uvnitř objektu dvakrát vyšší než ve venkovním vzduchu.

Odhad doby expozice otevřených agarových misek při sedimentační metodě

Odběrové místo	Doba expozice (hodiny)
Prostory se zvýšeným požadavkem na čistotu	4
Prostory s běžnými nároky na kvalitu prostředí	1
Prostory s předpokládaným znečištěním ovzduší bioaerosolem	0,3 - 0,5

**Literatura:**

1. EUR 14988 (Report No. 12: Biological Particles in Indoor Environments, Commission of the European Communities, Report No. 12, Luxembourg, 1994)
2. Standardní operační postupy pro vyšetřování mikroorganismů v ovzduší a pro hodnocení mikrobiologického znečištění ovzduší ve vnitřním prostředí. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica. Příloha č. 1/2002

**Hodnocení:**

*Spočítejte kolonie na Petriho miskách a vypočítejte relativní znečištění.*

*Jaké rody mikromycet byly izolovány?*

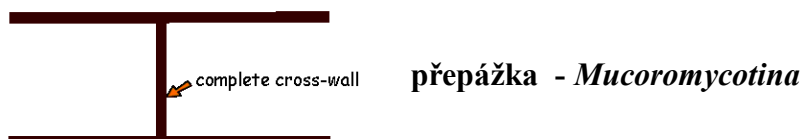
## Mikroskopování

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



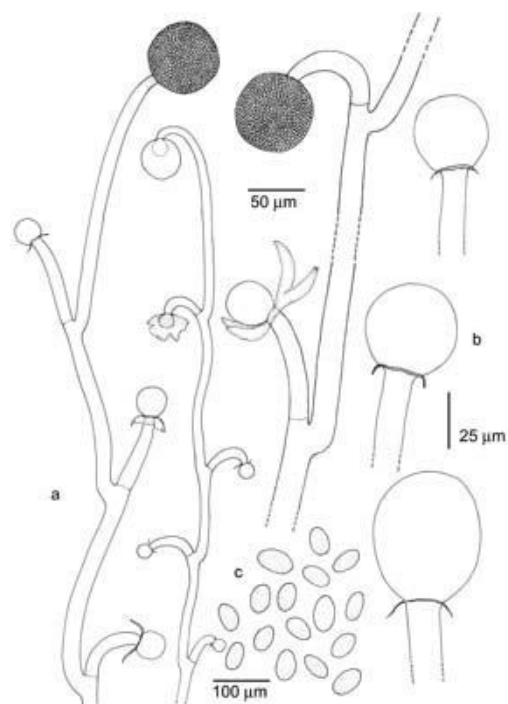
### Rod *Mucor*

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

#### *Mucor circinelloides* CCM 8328

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

- sympodiálně větvený circinátní sporangiofory
- kulovitá kolumela
- sporangiospory



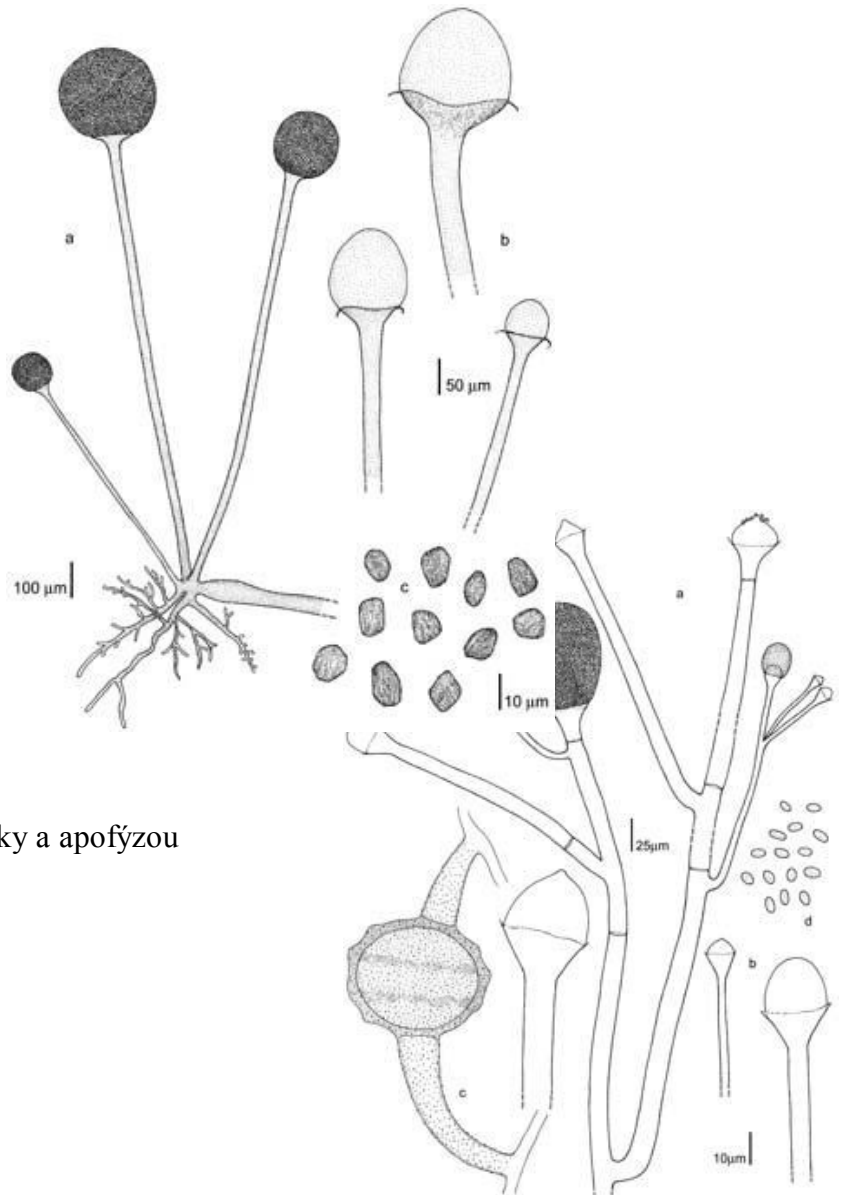
## Rod *Rhizopus*

– 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.

### *Rhizopus stolonifer* CCM F-445

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

nevětvené sporangiofory s rhizoidy  
kolumela s apofýzou  
sporangiospory



## Rod *Lichtheimia*

### *Lichtheimia corymbifera* CCM 8077

[Fungi](#), [Zygomycota](#), [Mucoromycotina](#),  
[Mucoraceae](#), [Lichtheimia](#)

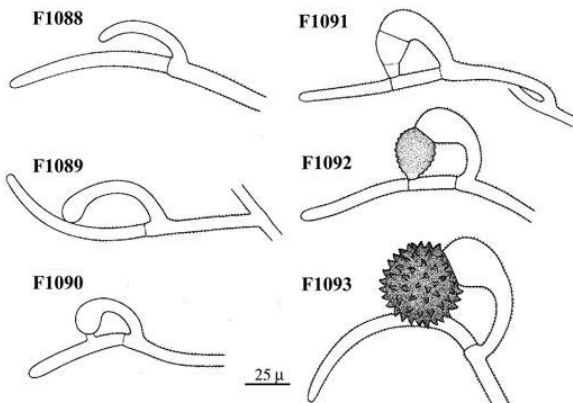
větvené sporangiofory  
kolumela kuželovitá s 1 nebo několika výběžky a apofýzou  
obří buňky  
sporangiospory  
rhizoidy a stolony nezřetelné



***Zygorhynchus moelleri* CCM 8022** - zygospora

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

2-655 *Zygorhynchus moelleri*



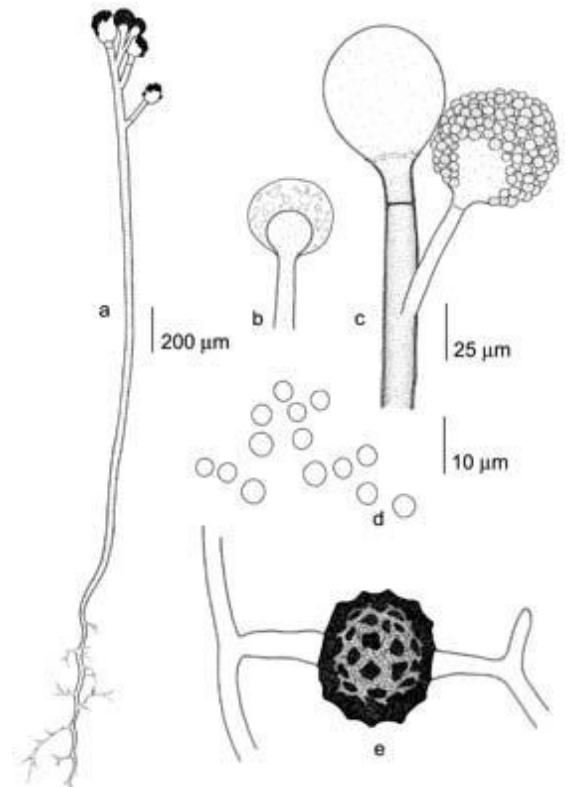
**Rod *Rhizomucor***

– od rodu *Rhizopus* se liší tvorbou větvených sporangioforů a méně vyvinutými rhizoidy

***Rhizomucor pusillus* CCM F-211**

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

- sporangiofory větvené většinou pod vrcholkem
- sporangium
- kolumela
- sporangiospory
- zygospora



## Rod *Cunninghamella*

- větvené sporangiofory ukončené jednosporovými sporangii (sporangioley), rhizoidy vyvinuté, stolony chybí

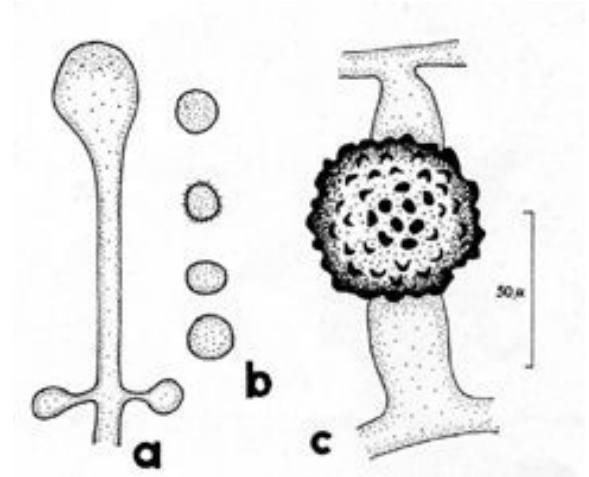
### *Cunninghamella blakeslean* CCM F-705

[Fungi](#), [Zygomycota](#), [Mucoromycotina](#), [Mucorales](#), [Cunninghamellaceae](#), [Cunninghamella](#)

zygospora

sporangioley (jednosporová sporangia)

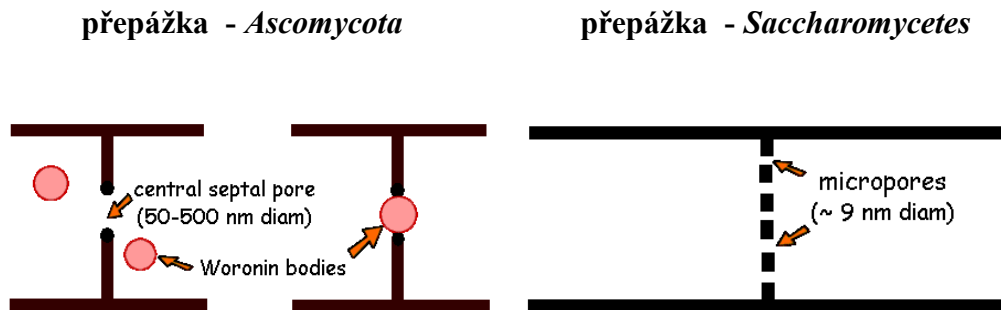
větvený sporangiofor zakončený sporogenními hlavicemi



# 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



**Rozmnožování:** pohlavní i nepohlavní nebo jen nepohlavní

- stádium, kdy houba vytváří nepohlavní **mitospory**, se nazývá stádium **imperfektní (anamorfa)**
- stádium, kdy houba vytváří pohlavní **meiospory**, se nazývá stádium **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: thalokonidie** (thalokonidiemi jsou v jistém smyslu i **chlamydo-spory** - tlustostěnné přetrvávající buňky vznikající na myceliu)

**2. Blastická:** konidie se formuje dříve než je oddělena přeprážkou 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) třetická - vznik **porokonidií**, často s výraznou jizvou na konidiogenní buňce
- b) phialidická - konidiogenní buňky **fialidy**
- c) annelidická - konidiogenní buňky **anelidy** (límeček)

***Geotrichum candidum* CCM 8228** – arthrokonidie v rozpadajících se řetězcích

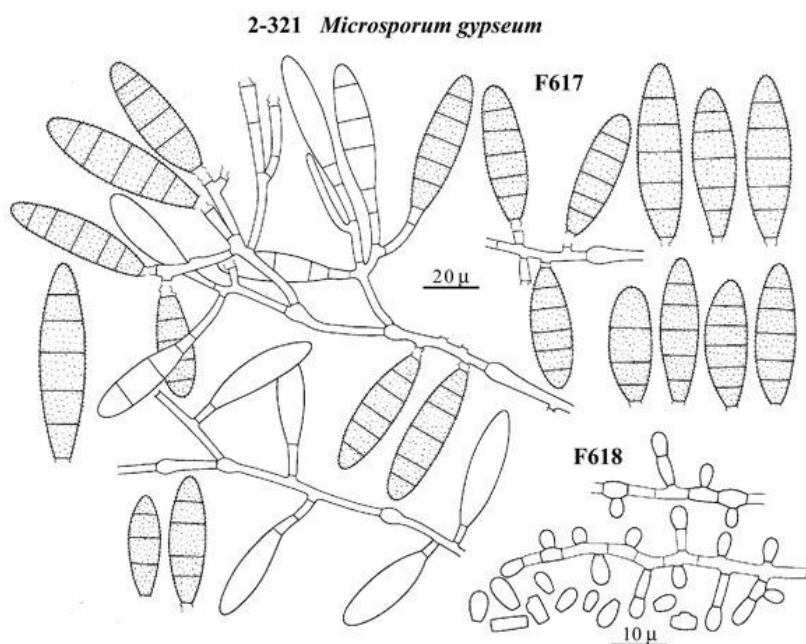
[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Saccharomycotina](#), [Saccharomycetes](#), [Saccharomycetidae](#), [Saccharomycetales](#), [Dipodascaceae](#), [Geotrichum](#)



## Dermatofyta

***Microsporum gypseum* CCM 8342** – thalokonidie (makrokonidie a mikrokonidie)

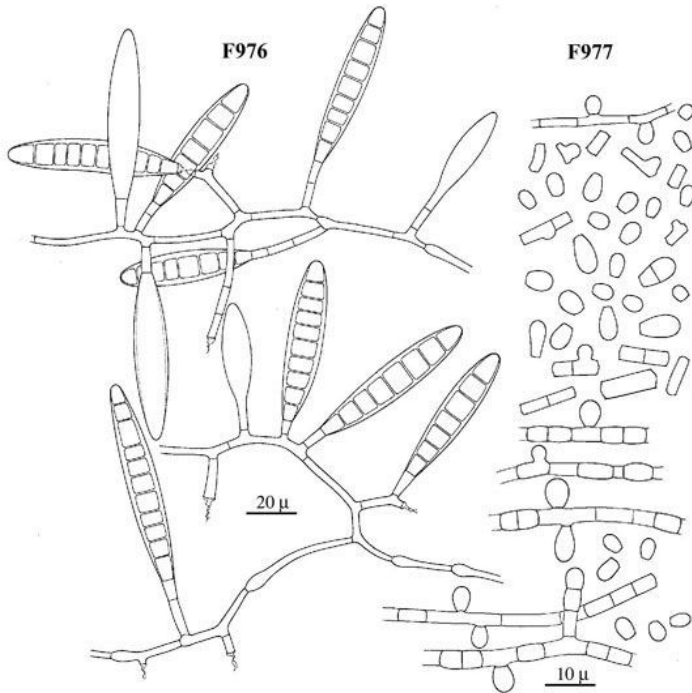
[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#), [Eurotiomycetidae](#), [Onygenales](#), [Arthrodermataceae](#), [Microsporum](#)



***Trichophyton ajelloi* CCM 8351** – makrokonidie a mikrokonidie

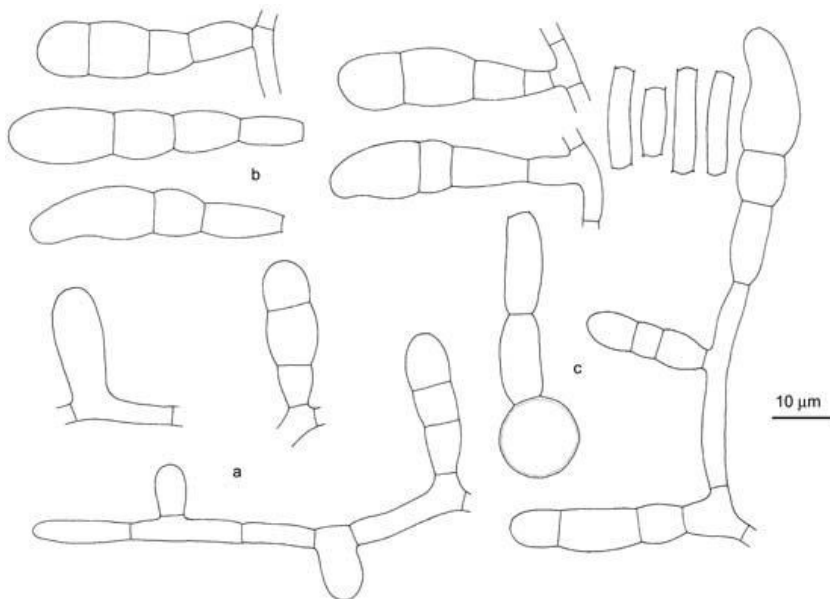
[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#), [Eurotiomycetidae](#), [Onygenales](#), [Arthrodermataceae](#), [Trichophyton](#)

2-532 (2) *Trichophyton ajelloi*



***Epidermophyton floccosum* CCM 8339** – makrokonidie

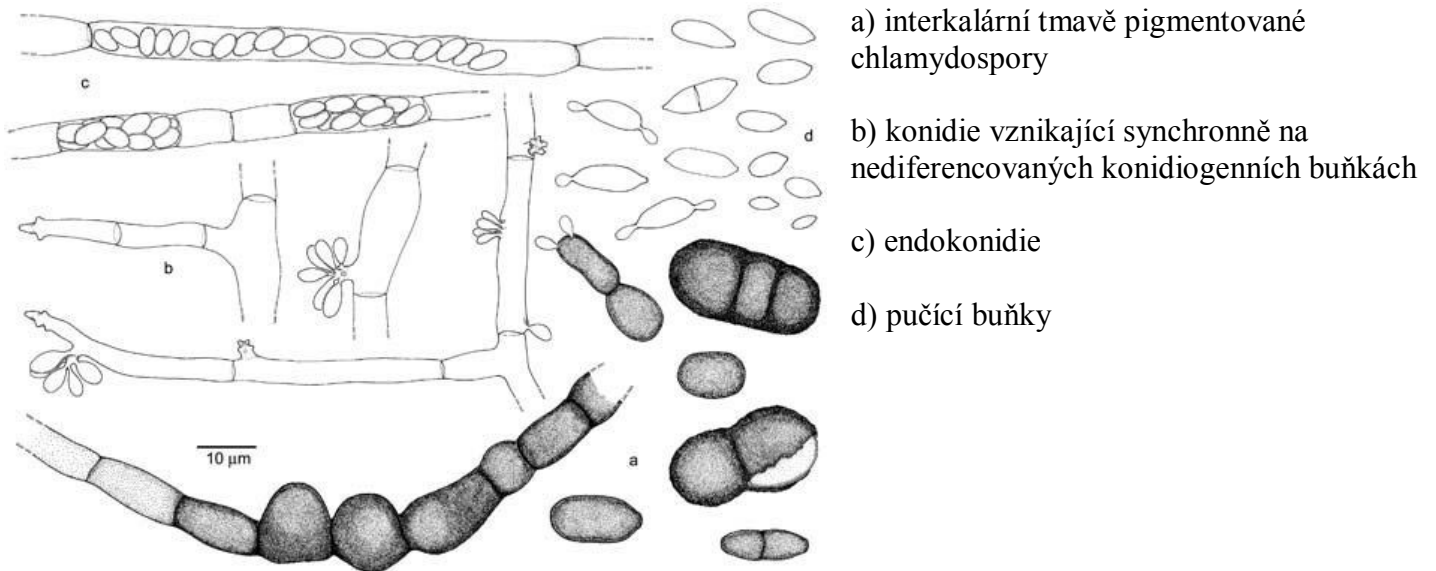
[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#), [Eurotiomycetidae](#), [Onygenales](#), [Arthrodermataceae](#), [Epidermophyton](#)



## Melanizované mikromycety (Dematiaceae)

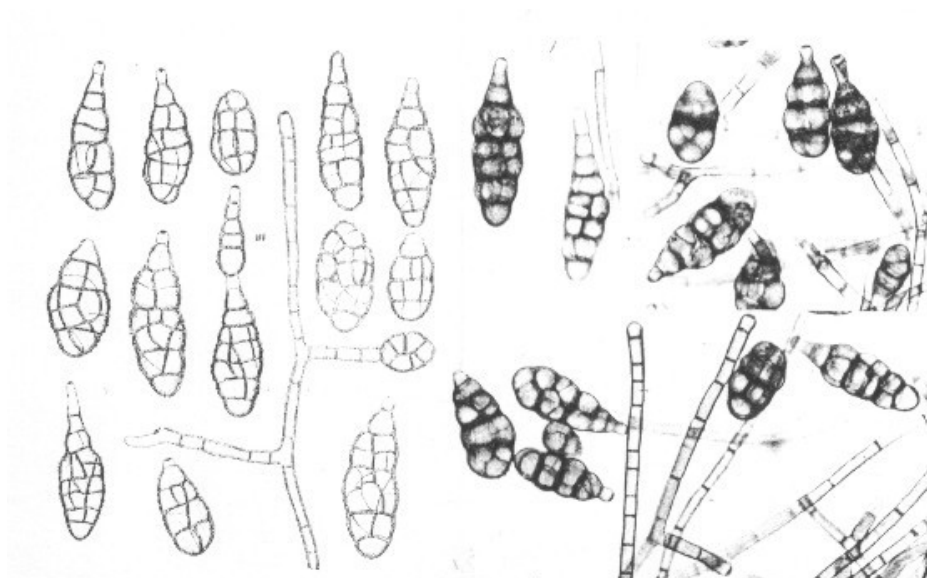
### *Aureobasidium pullulans* CCM F-148

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



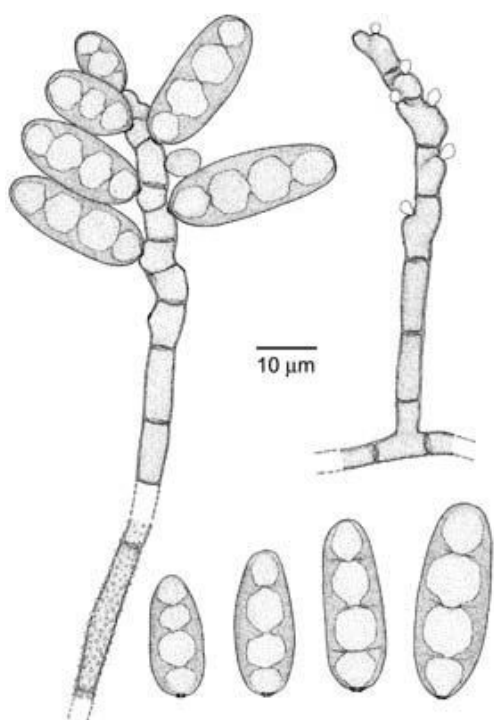
### *Alternaria alternata* CCM F-397 – vícebuněčné konidie (porokonidie)

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



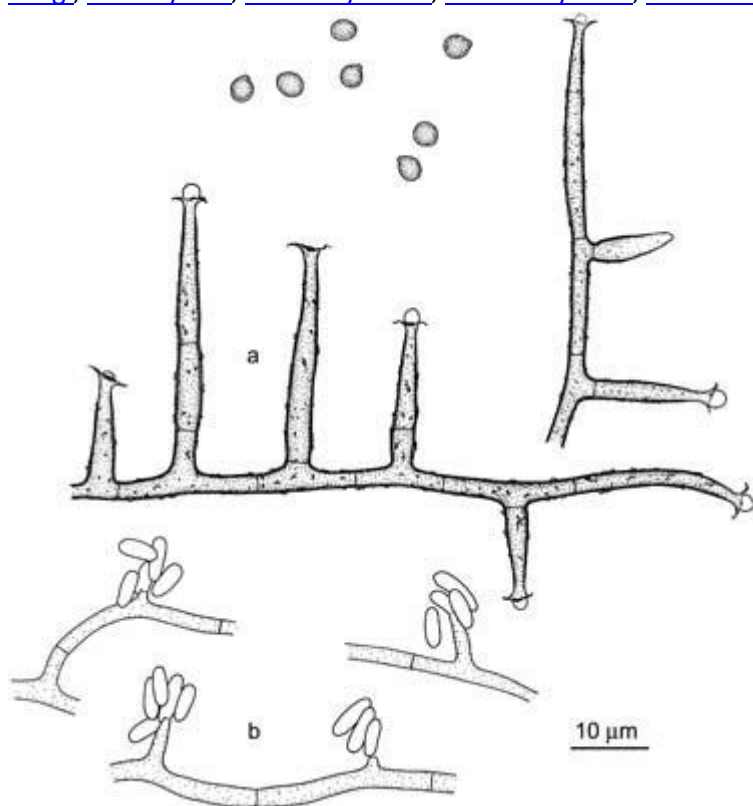
***Bipolaris spicifera* CCM F-29** – pseudoseptované konidie (porokonidie)

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



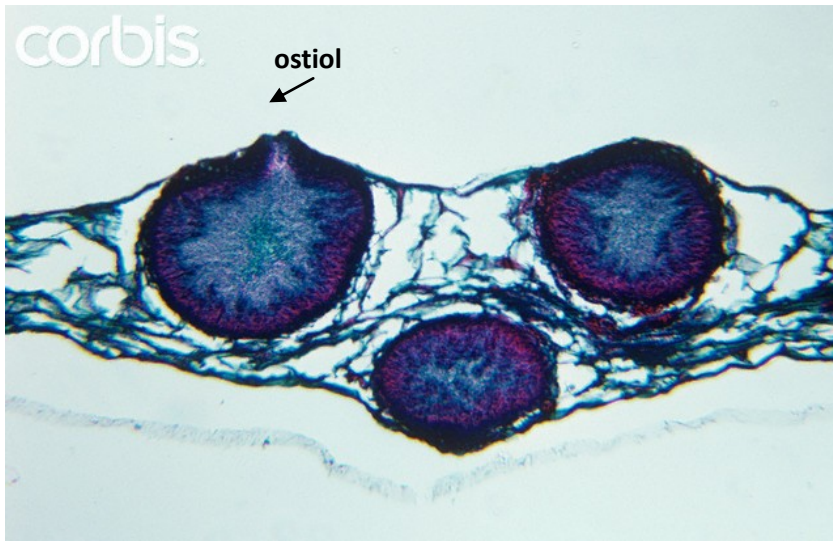
***Pleurostomophora richardsiae* CCM F-395** – fialidy s talířovitým límečkem

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Eurotiomycetes](#), [Chaetothyriomycetidae](#), [Chaetothyriales](#), [Herpotrichiellaceae](#)



***Phoma lingam* CCM F-608** - pyknidy (kulovitý nebo lahvicovitý útvar s ostiolem, uvnitř vystlaný konidiofory na nichž se tvoří konidie) - nepohlavní rozmnožování

[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 (např. teleomorfa rodu *Aspergillus*)
- **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 (např. *Chaetomium*)
- **apothecium** je miskovitá plodnice; vřečka jsou uspořádána v hymeniu na povrchu plodnice, parafýzy vytvořeny

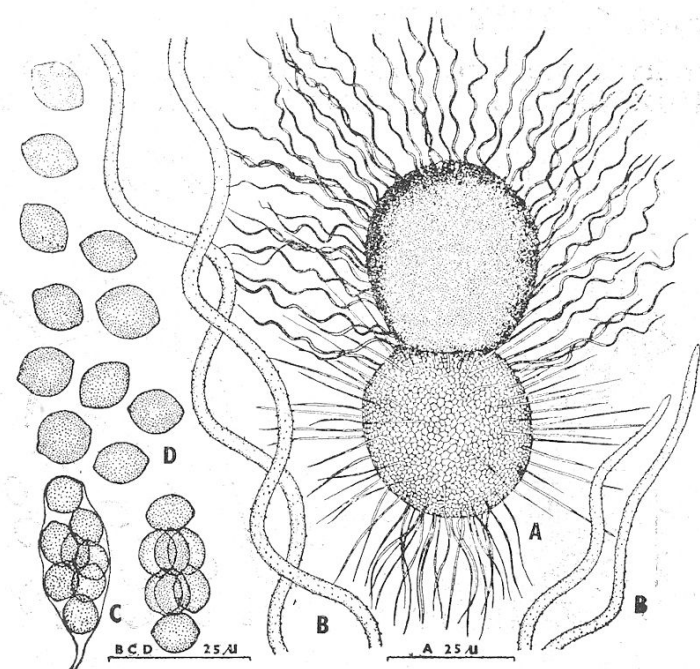
#### 2) Askolokulární typ

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



## *Chaetomium globosum* CCM F-275

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

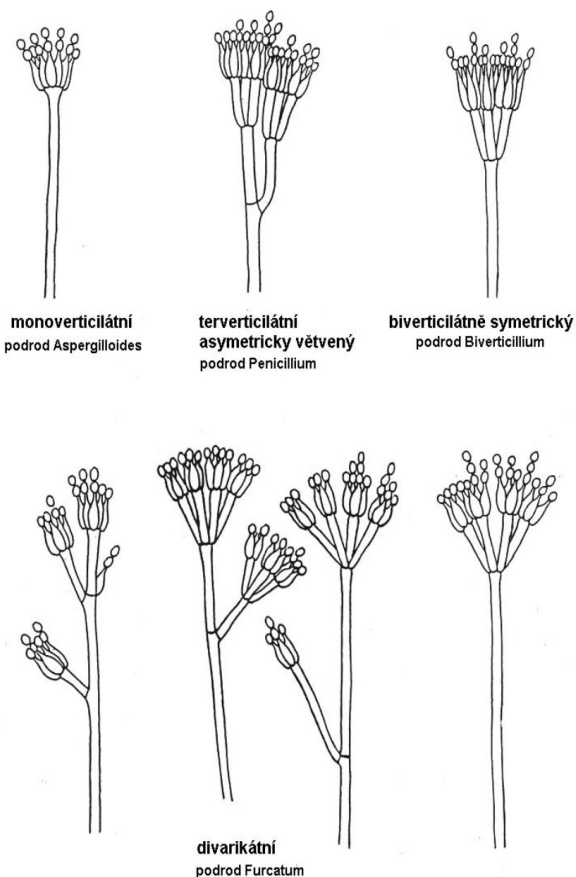
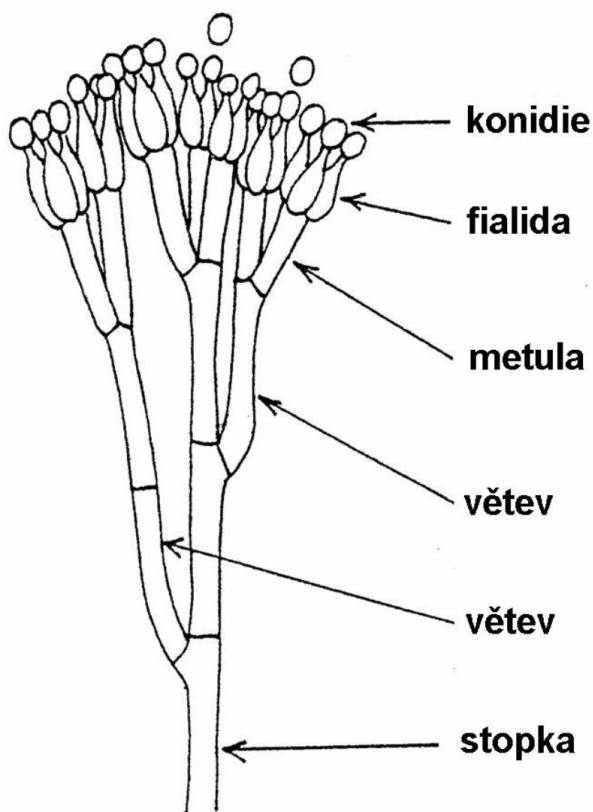


- A - perithecium
- B - zvlňená něvětvená vlákna (trichomy)
- C - vřecko (ascus)
- D - askospory

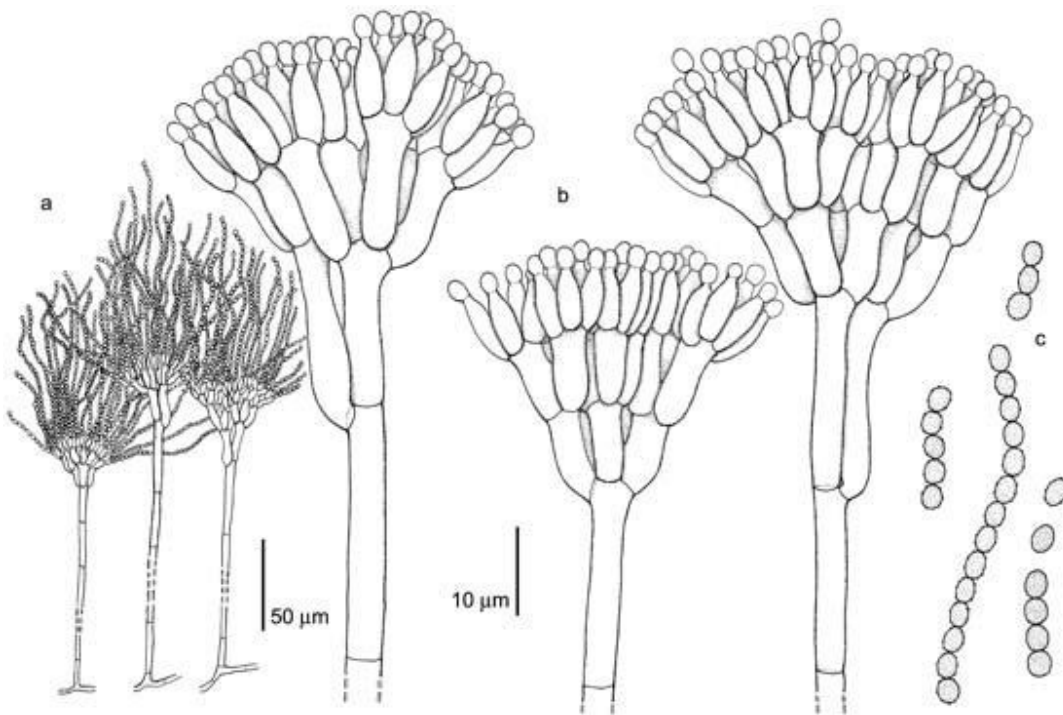
## Hyalinní mikromycety

### Rod *Penicillium*

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

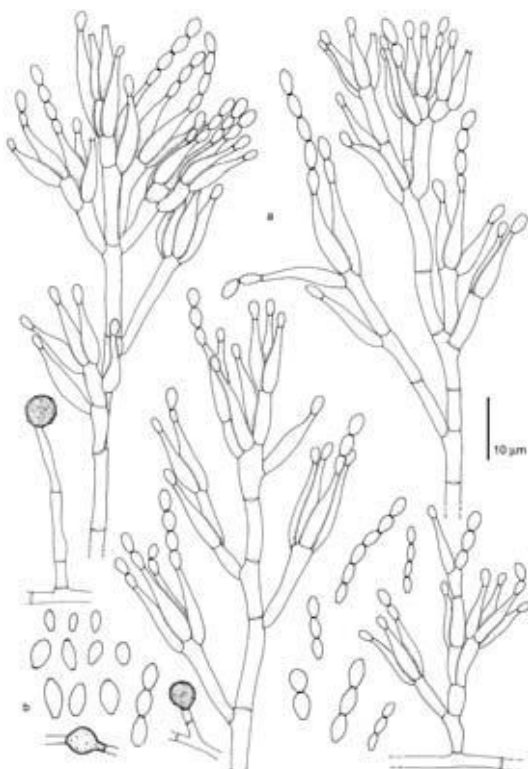


**Penicillium** – terverticilátní konidiofory



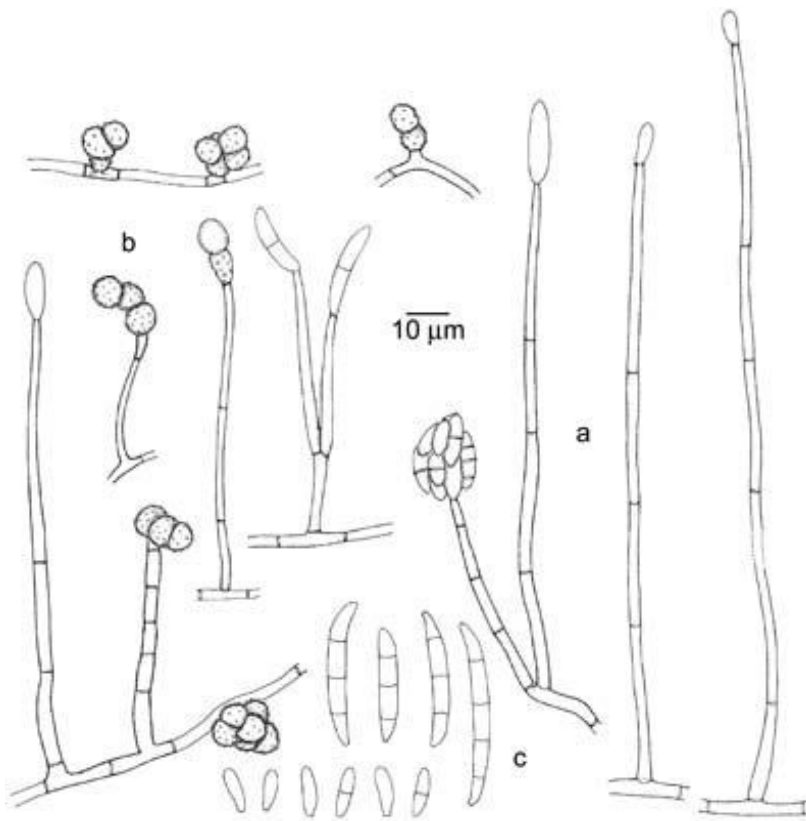
**Paecilomyces variotii CCM F-398** - konidiofory méně pravidelně větvené, fialidy protáhlé v dlouhý krček, konidie

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



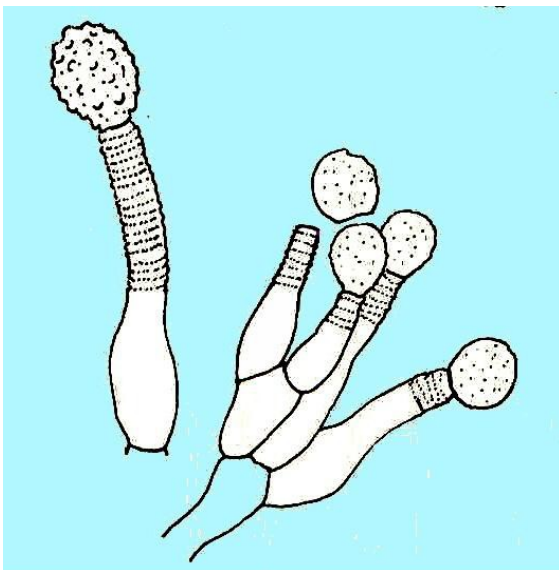
***Fusarium sporotrichioides* CCM 8014** - konidiofory s monofialidami, makro- a mikrokonidie, chlamydospory, sporodochia (palisáda konidioforů v ložisku na povrchu substrátu)

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

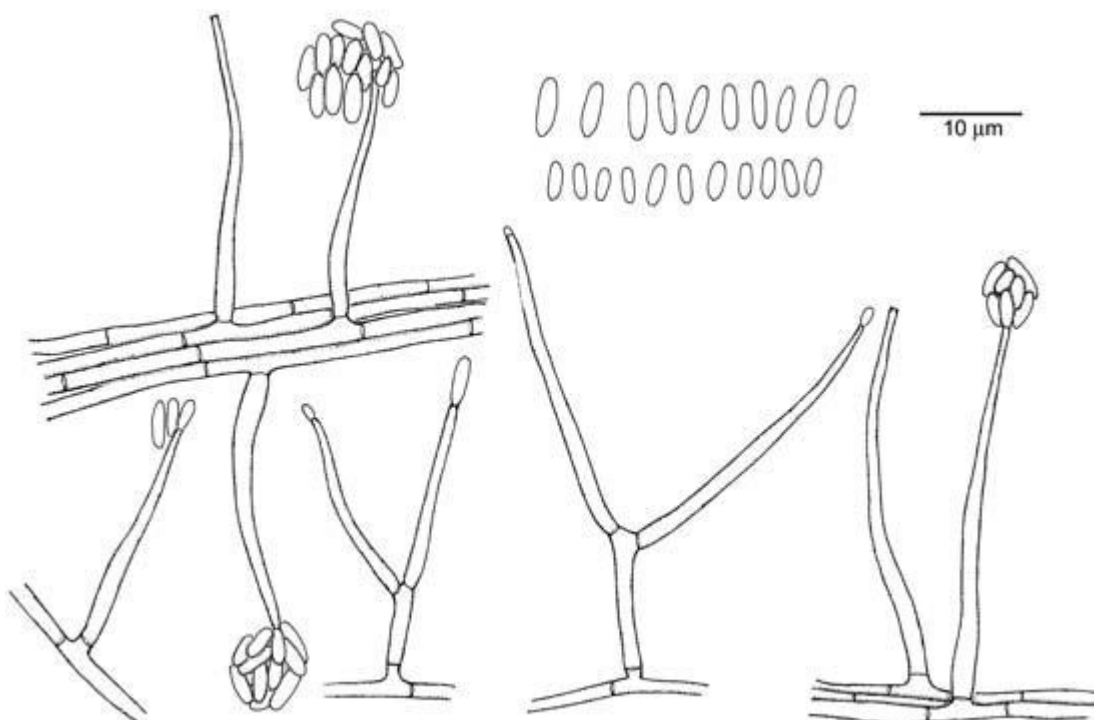


***Scopulariopsis brevicaulis* CCM F-388** - konidiogenní buňky - anelidy, konidie

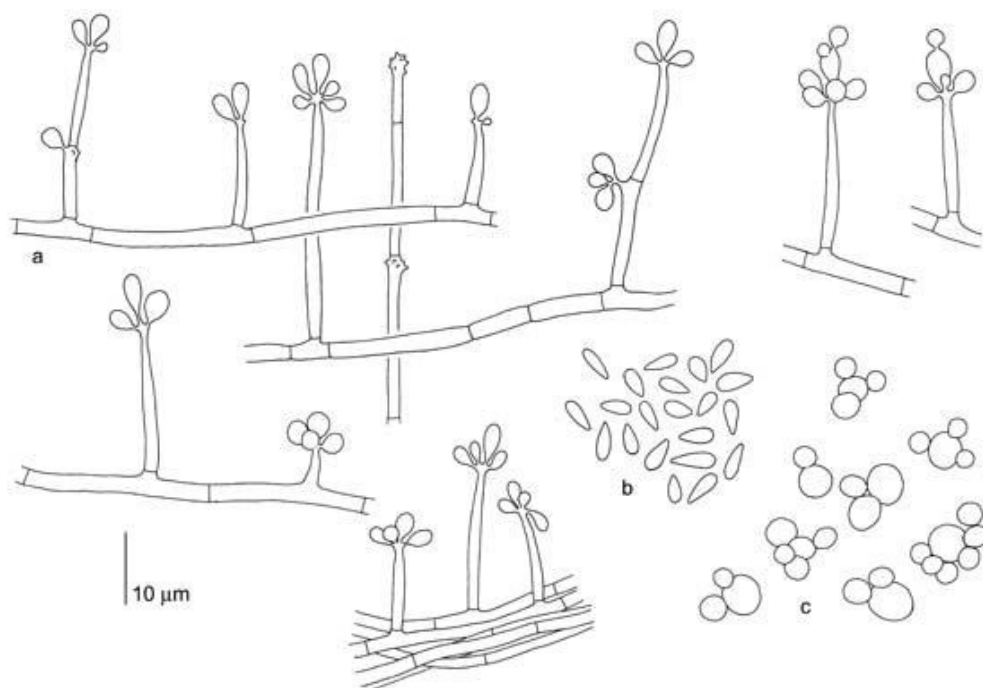
[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Peizizomycotina](#), [Sordariomycetes](#), [Hypocreomycetidae](#), [Microascales](#), [Microascaceae](#), [Scopulariopsis](#)



**Acremonium furcatum CCM F-735** - tvorba synnemat, fialidy většinou jednotlivé, k vrcholu se zužující (jehlicovité), septum na bázi, konidie jednobuněčné, hladké, hyalinní  
 Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Acremonium



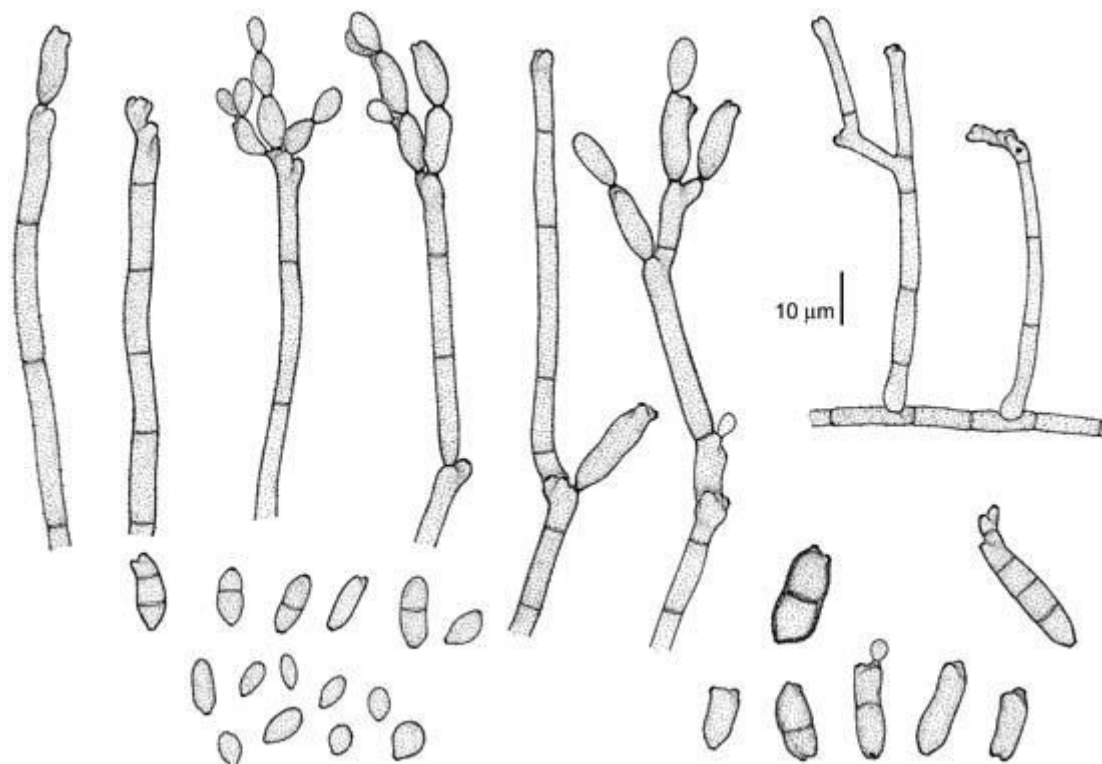
**Sporothrix sp.**- konidiofory vyrůstají jednotlivě ze septovaného mycelia, konidie se tvoří ve shlucích na krátkých výbězcích  
 Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Ophiostomatales, Ophiostomataceae, Sporothrix



## Houby vnitřního prostředí „indoor fungi“

### *Cladosporium herbarum* CCM F-159

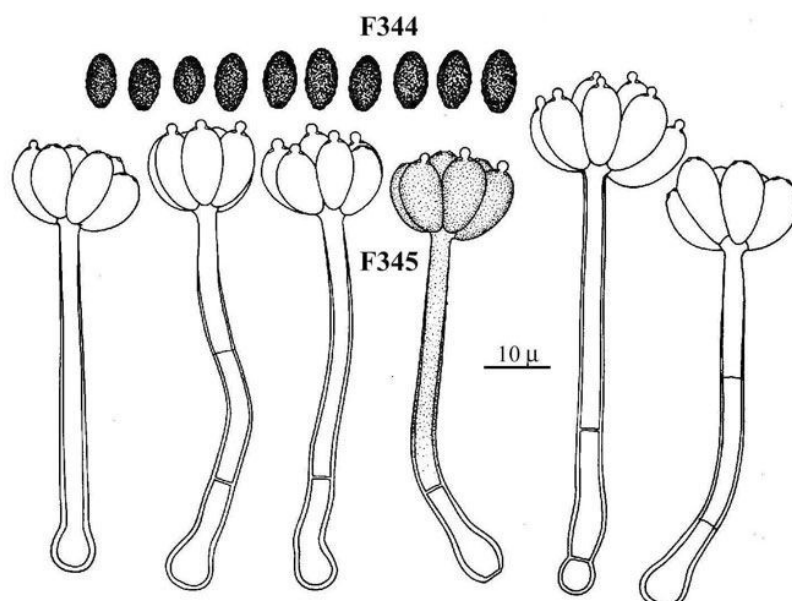
[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Dothideomycetes](#), [Dothideomycetidae](#), [Capnodiales](#), [Cladosporiaceae](#), [Cladosporium](#)



### *Stachybotrys chartarum* CCM F-237

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Sordariomycetes](#), [Hypocreomycetidae](#), [Hypocreales](#), [Stachybotryaceae](#), [Stachybotrys](#)

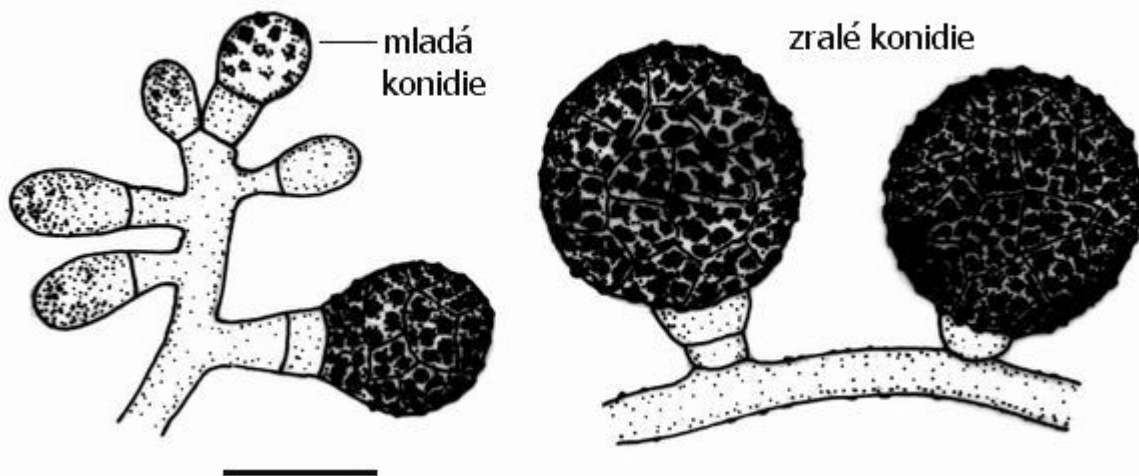
1-170 *Stachybotrys chartarum*



## *Epicoccum nigrum* CCM F-185

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

### Epicoccum nigrum



#### 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
5. Jandová, B., Kotoučková, L.: Praktikum z mikrobiologie. Masarykova univerzita v Brně, 1996.

## **MEDIA**

### **Agar dle Nickersona**

bismut-amónium citrát	5,0 g/l
siřičitan sodný	3,0 g/l
dextróza	10,0 g/l
glycin	10,0 g/l
kvasničný extrakt	1,0 g/l
agar	16,0 g/l
pH 6,8 ± 0,2	

### **Sabouraudův agar s glukózou**

glukóza	40 g/l
pepton	10 g/l
agar	15 g/l
pH 6,9	

### **Rýžový agar**

rýžový extrakt	5,0 g/l
agar	20,0 g/l

### **Kukuřičný agar**

kukuřičná mouka	40,0 g/l
agar	20,0 g/l
Tween 80	10,0g/l
pH 6,6 - 6,8. Přidání Tween 80 podporuje tvorbu chlamydospor.	

### **Bird Seed Agar**

<i>Guizotia abyssinica</i> (niger seed, masťnák habešský)	50 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
kreatin	1 g /l
agar	15 g/l

### **Agar pro důkaz tvorby pouzdrového polysacharidu**

(NH <sub>4</sub> ) <sup>2</sup> SO <sup>4</sup>	5,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g/l
glukóza	10g/l
kvasniční extrakt	0,5 g/l
agar	20,0 g/l

### **Médium pro zjištění asimilace cukrů**

(NH <sub>4</sub> ) <sup>2</sup> SO <sup>4</sup>	5,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 g/l
glukóza	10g/l
kvasniční extrakt	0,5 g/l
(agar 20,0 g/l)	

### **Médium pro fermentaci cukrů**

masový výtazek	3,0 g/l
pepton	10,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
bromkresolová červeň	1,0 g/l
pH 7.2	

### **DRBC (Agar s dichloranem, bengálskou červení a chloramfenikolem)**

pepton	5,0g/l
glukóza	10,0g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,5g/l
dichloran	0,002g/l
bengálská červeně	0,025g/l
agar	15,0g/l
pH 5.6 ± 0.2	

### **Agar se sladovým extraktem**

Malt extract	20 g/l
Agar	20 g/l
pH 5.6 min.	

### **Media pro identifikace rodu *Aspergillus***

#### **CYA (Czapkův agar s kvasničným extraktem) Pitt, 1973**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/l
Czapkův koncentrát*	10 ml/l
kvasniční extrakt	5 g/l
sacharóza	30 g/l
agar	15 g/l
pH 6 - 6,5	

\*Czapkův koncentrát:

NaNO <sub>3</sub>	30 g
KCl	5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
ZnSO <sub>4</sub>	0,1 g
CuSO <sub>4</sub>	0,05 g
destilovaná voda	100 ml

#### **MEA (Agar se sladovým extraktem) Blakeslee, 1915**

malt extrakt	20 g/l
pepton	1 g/l
glukóza	20g/l
agar	20 g/l
pH 5 - 5,5	

#### **CY20S (Czapkův agar s kvasničným extraktem a 20% sacharózy) Pitt a Hocking, 1985**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l

Czapkův koncentrát*	10 ml/l
kvasniční extrakt	5 g/l
sacharóza	200 g/l
agar	20 g/l