



MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

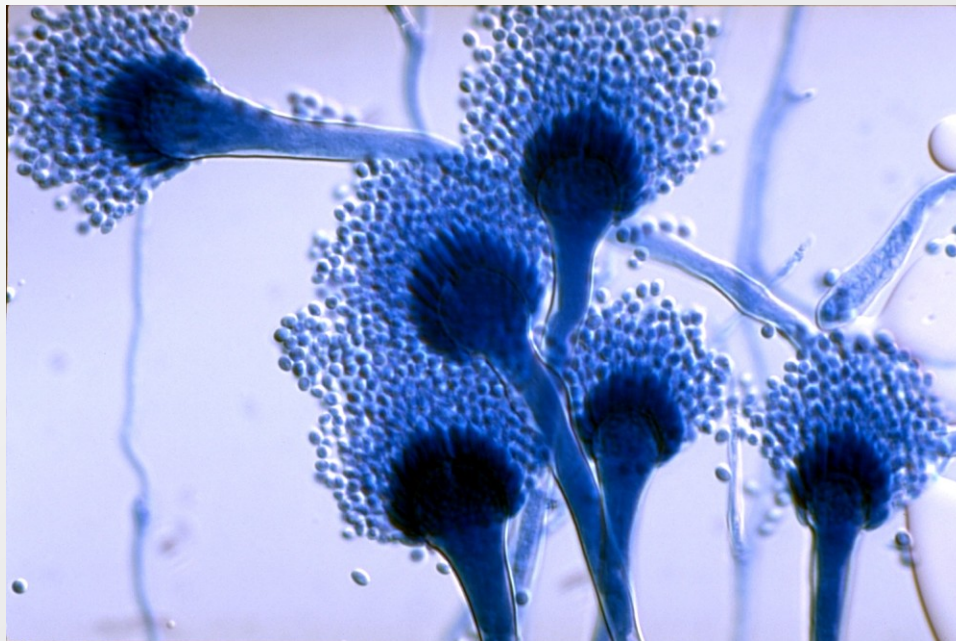
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

ČESKÁ SBÍRKA MIKROORGANISMŮ

<http://www.sci.muni.cz/ccm>



Mikroskopické houby – cvičení (Bi6620c) Identifikace – rod *Aspergillus*



Aspergillus

- ❏ zástupci rodu *Aspergillus* - popsáno přes 200 druhů, kolem 40 druhů popsáno jako původci mykotických infekcí u člověka
- ❏ ubikvitní saprofyté celosvětově rozšíření, jsou přítomny v půdě, ve vzduchu, v rostlinných i živočišných zbytcích
- ❏ častý kontaminant potravin a krmiv
- ❏ **Aspergilózy** - postižení respiračního systému má 3 základní formy: alergickou plicní aspergilózu, plicní aspergilom, invazivní aspergilózu (IA)
- ❏ původci povrchových infekcí – **onychomykózy, otomykózy**
- ❏ **producenti mykotoxinů** (aflatoxin) poškozujících ledviny a játra, zdrojem jsou zejména arašídý, oříšky kešu, pistácie a sušené plody
- ❏ *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*

Aspergillus

Identifikace druhů rodu *Aspergillus*

polyfázická taxonomie:

- ☒ morfologie
- ☒ sledování produkce sekundárních metabolitů
- ☒ molekulární genetika

Identifikace do rodu a druhu – části genu pro rRNA (18S, 5,8S a 28S) nebo sekvence mezerníků (ITS)

Vnitrodruhová typizace aspergilů

- ☒ PCR-RFLP s následnou sekvenční analýzou genu pro β -tubulin či genu rodlet A - pro rozlišení druhů fenotypicky podobných *A. fumigatus*
- ☒ Multilokusová sekvenční typizace (MLST) – sekvenování fragmentů „referenčních“ genů

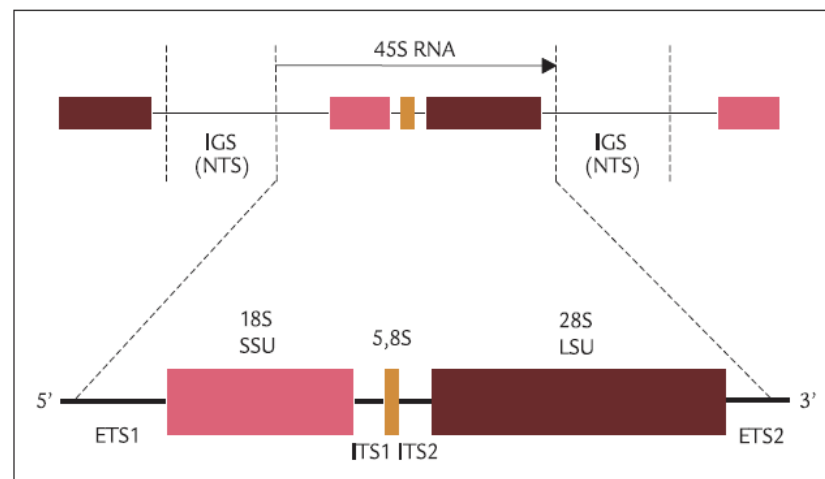


Schéma 1. Schéma rRNA genu.

SSU – malá podjednotka; LSU – velká podjednotka; IGS – mezigenový NTS – non-transcribed spacer; ETS – external transcribed spacer; ITS – internal transcribed spacer.

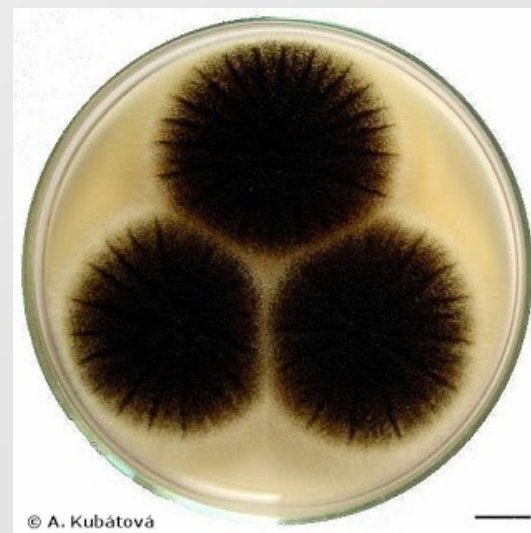
Aspergillus - morfologie

Makroskopické znaky

- rychle rostoucí, plně vybarvené kolonie do pěti dnů
- kolonie bohatě pigmentované (v odstínech žluté, žlutozelené, zelené, zelenomodré, hnědé a černošedé)
- pigmentace je výrazná na Czapek-Doxově agaru (CZ)
- kolonie se hodnotí na standardních živných médiích: Czapkův agar s kvasničným extraktem (CYA), agar se sladovým extraktem (MEA), CZ při standardní kultivační teplotě: 25 C, 37 C

Makroskopické znaky:

- rychlost růstu
- zbarvení kolonií, spodní strany kolonií
- povrchová struktura kolonií
- velikost kolonií po 7, 10, 14 dnech
- vzhled konidiální hlavice pod binokulární lupou



Aspergillus

Makroskopické znaky



Aspergillus

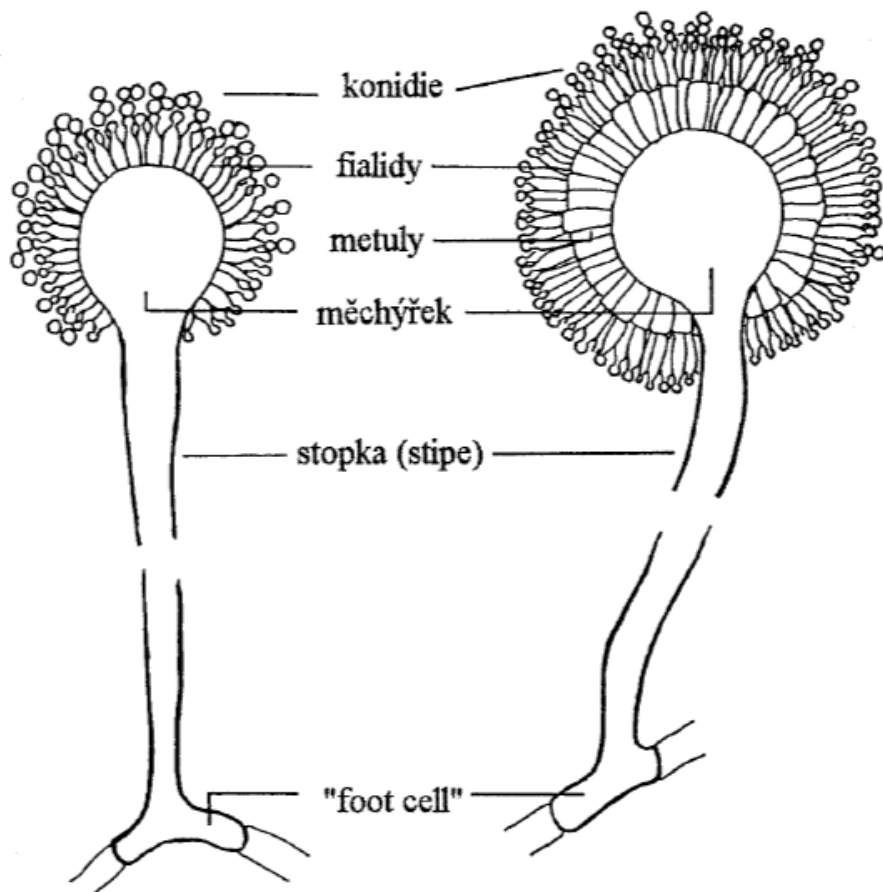
Mikroskopické znaky

Nepohlavní stádium

- konidiofor vyrůstá přímo ze substrátu nebo ze vzdušných hyf
- měchýřek (kolumelu)
- fialidy (konidiogenní buňky) v jedné nebo ve dvou řadách nad sebou (uniseriátní a biseriátní)
- konidiální hlavice - měchýřek s fialidami a řetězci konidií
- tlustostěnné buňky zvané „Hülle cells“ se vytvářejí na konci vláken nebo interkalárně

Aspergillus

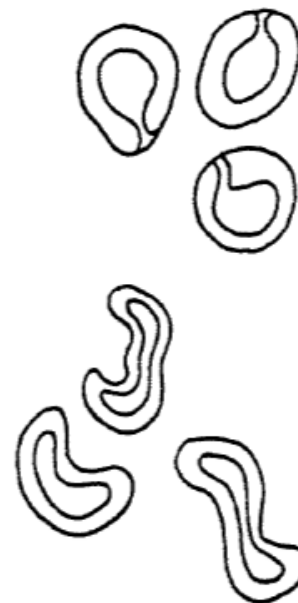
Mikroskopické znaky



uniseriátní

biseriátní

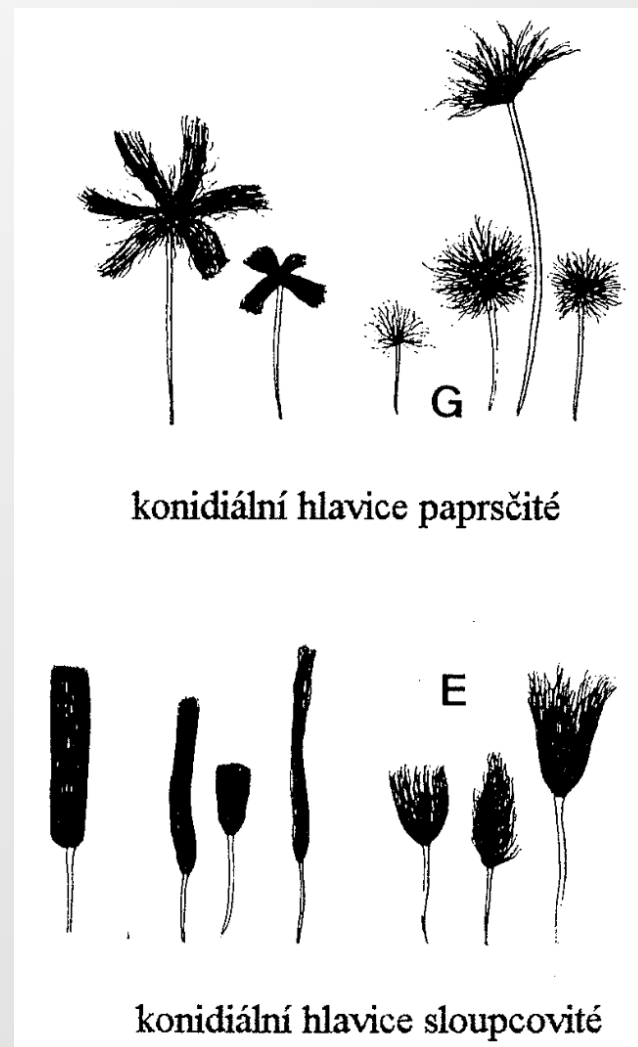
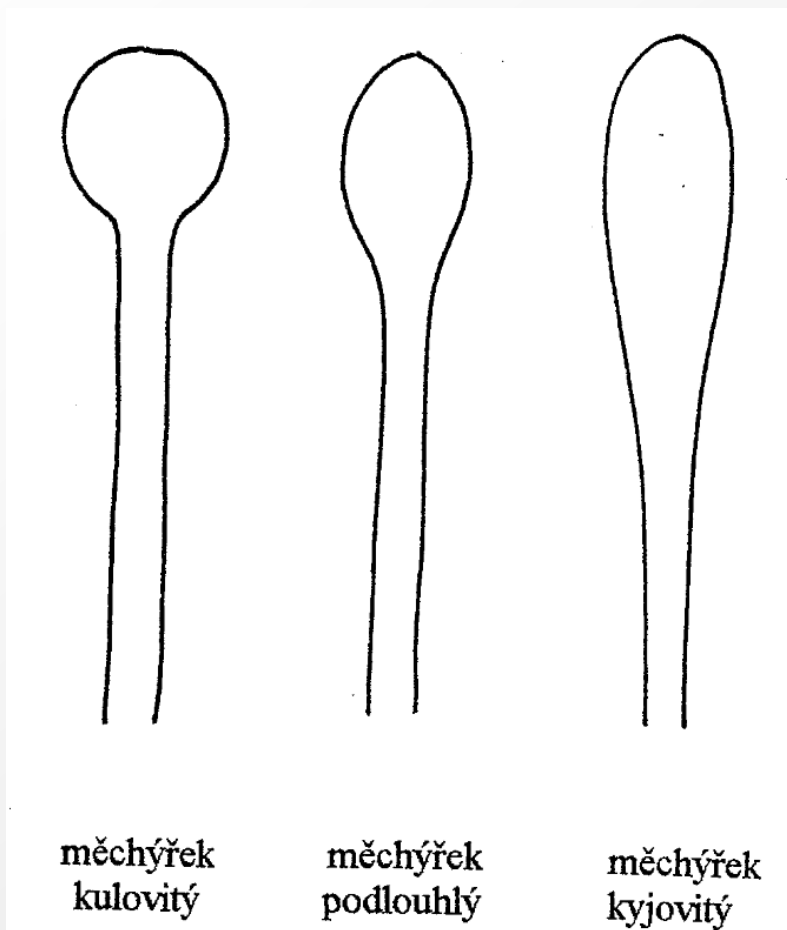
2 typy konidioforů



"hülle - cells"

Aspergillus

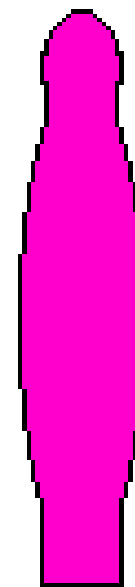
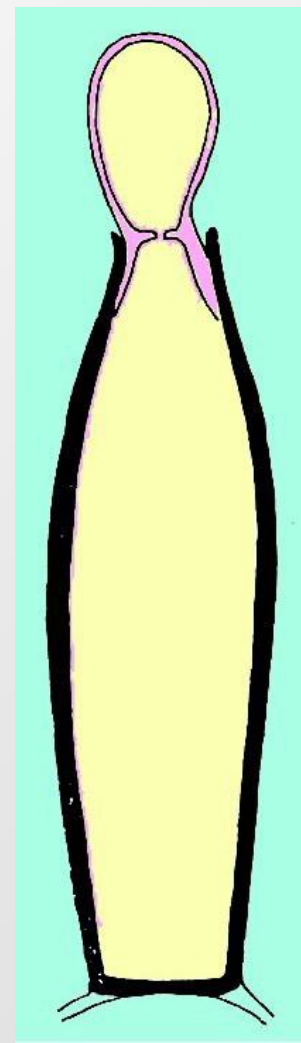
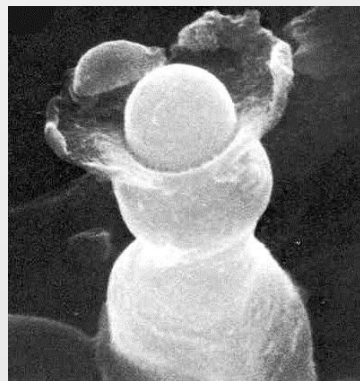
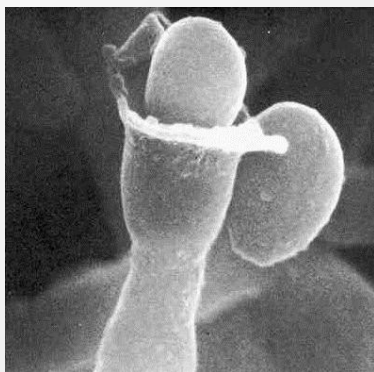
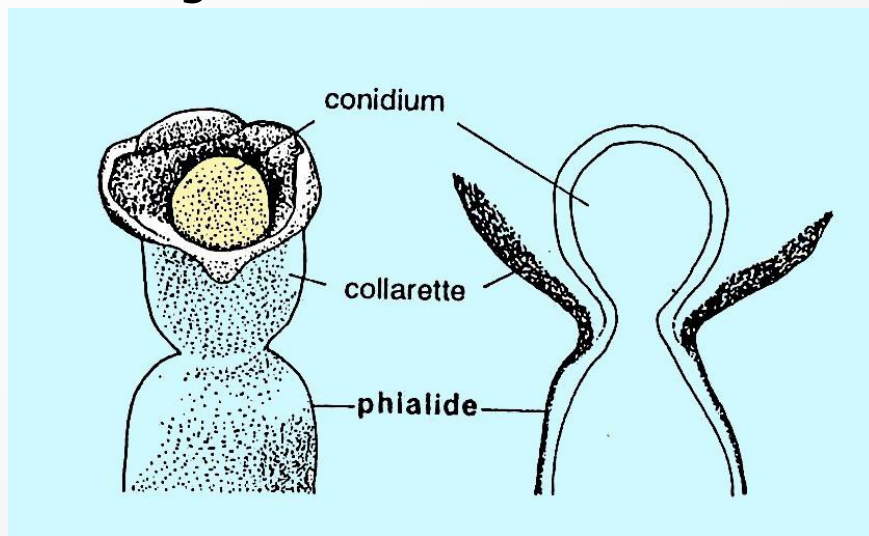
Mikroskopické znaky



Aspergillus - konidiogeneze

ENTEROBLASTICKÁ PHIALIDICKÁ KONIDIOGENEZE

☒ konidiogenní buňka - **fialida**

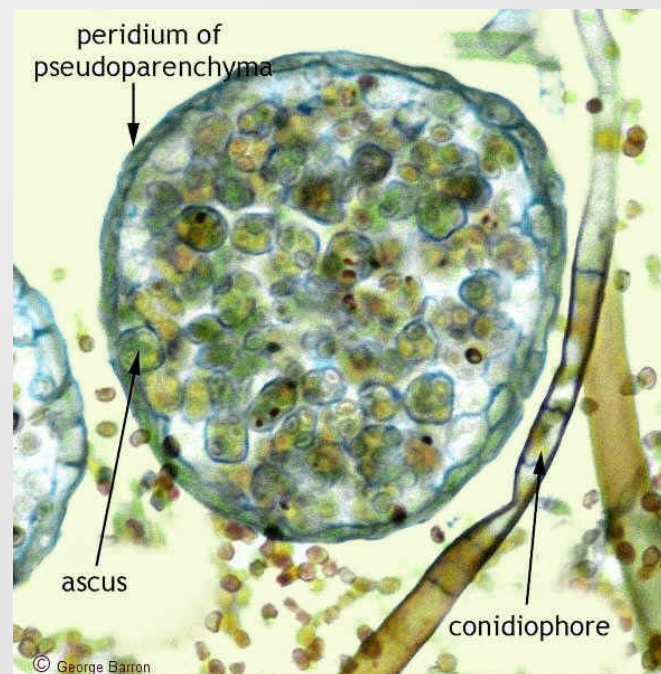
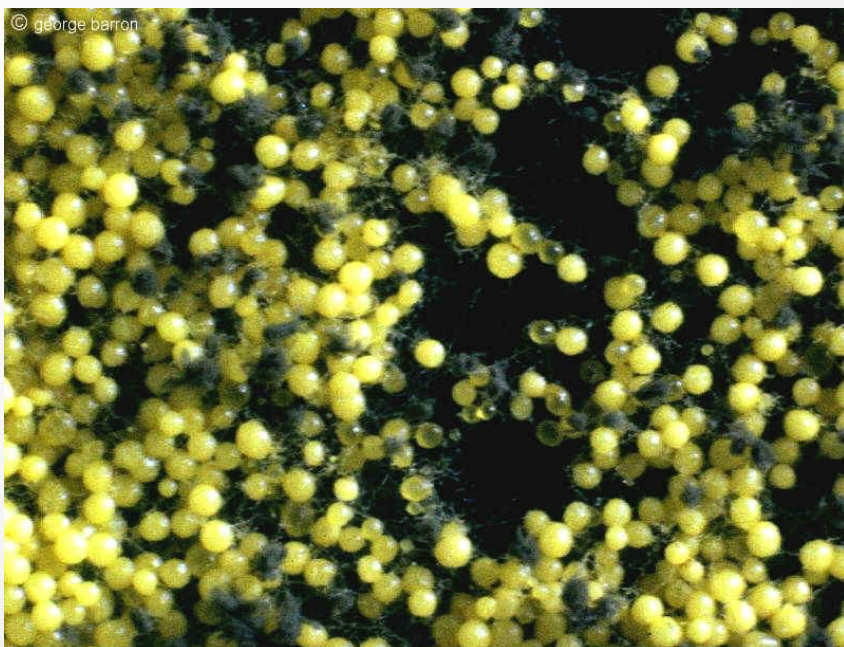


Aspergillus

Mikroskopické znaky

Pohlavní stádium

- tvorba drobných plodnic (menších než 1 mm) typu kleistothecium
- tyto druhy se řadí do rodu *Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya*



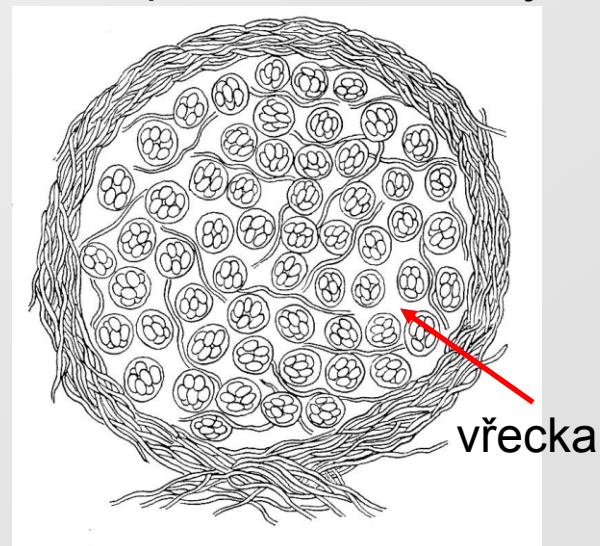
Aspergillus

Plodnice (askokarpy, askomata) – askohymeniální typ

- ☒ nejdříve dojde k pohlavnímu procesu (gametangiogamie, deuteroogamie nebo somatogamie) a spolu s růstem askogenních hyf se vytvářejí i stěny plodnice
- ☒ tímto způsobem vznikají plodnice typu kleistothecium, apothecium a perithecium

Kleistothecium

- ☒ uzavřená plodnice s vytvořenou stěnou, otvírá se rozpadem; vřečka nejsou nijak uspořádána



Aspergillus

Aspergillus fumigatus

- ☒ kontaminant potravin, oportunní patogen člověka a jiných živočichů
- ☒ častý ve vlhkém teplém prostředí (kompost, ale i zvlhčovací systémy, obytné prostory)
- ☒ zodpovědný za 90% všech případů IA
- ☒ termotolerantní - roste i při 55 C
- ☒ adaptace na nedostatek kyslíku je podmínkou pro jeho přežití v zánětlivé tkáni a umožňuje šíření do jiných orgánů
- ☒ produkuje mykotoxiny gliotoxin, verruculogen, fumitremorginy aj.
- ☒ dvě podskupiny – ve vzduchu a ve vodě
- ☒ druhy fenotypicky podobné: *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *Neosartorya fischeri*, *N. pseudofischeri*, *N. undagawae*
- ☒ diagnostický znak: *A. fumigatus* roste při teplotě 50 C a neroste při 10 C, kdy ostatní zaměnitelné druhy rostou (výjimkou je *A. viridinutans*)

Aspergillus

Aspergillus fumigatus

- ☒ kolonie rychle rostoucí při 25 i 37 °C, zelené, sametové



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C

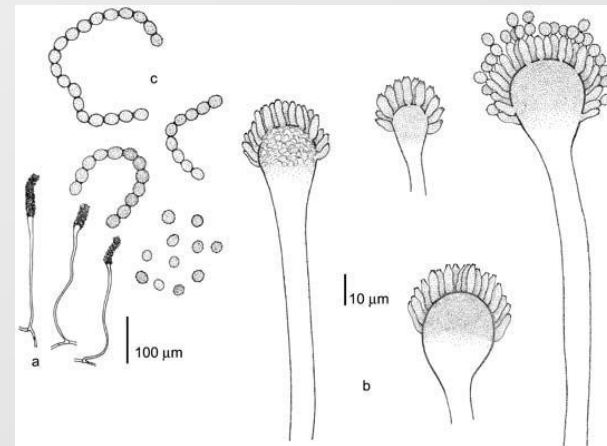


MEA 7 dní, 25 °C

Aspergillus

Aspergillus fumigatus

- konidiofory uniseriátní s široce kyjovitým měchýřkem
- konidiální hlavice typicky sloupcovité
- konidie kulovité nebo téměř kulovité, zelené, bradavčité, 2,5-3 μm v průměru



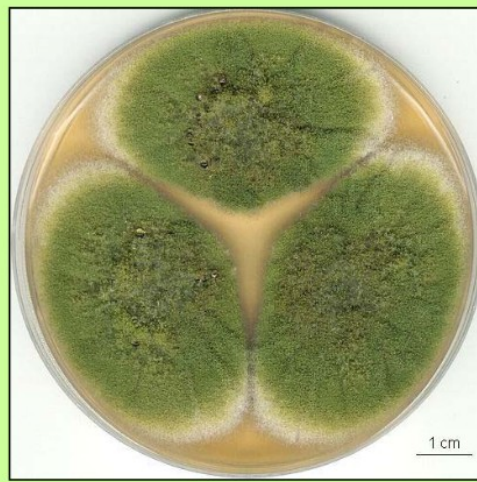
Aspergillus

Aspergillus flavus

- kolonie rychle rostoucí, žlutozelené, roste i při teplotě až 48 °C
- výskyt v půdě, na potravinách (arašídy, koření, obiloviny apod.)
- produkuje mykotoxin aflatoxin B1, 3-nitropropionovou kyselinu, kojovou, aspergilovou a cyklopiazonovou kyselinu
- z 10% původce bronchopulmonárních infekcí



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C



MEA 7 dní, 25 °C

Aspergillus

Aspergillus flavus

- ☒ konidiofory biseriátní i uniseriátní, bradavičnaté s kulovitým nebo téměř kulovitým měchýřkem
- ☒ konidiální hlavice paprscité
- ☒ konidie kulovité nebo téměř kulovité, bradavčité

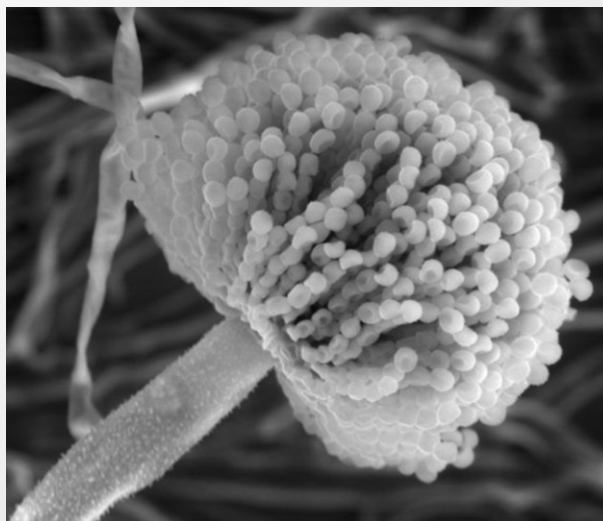


Foto.: J. Machač

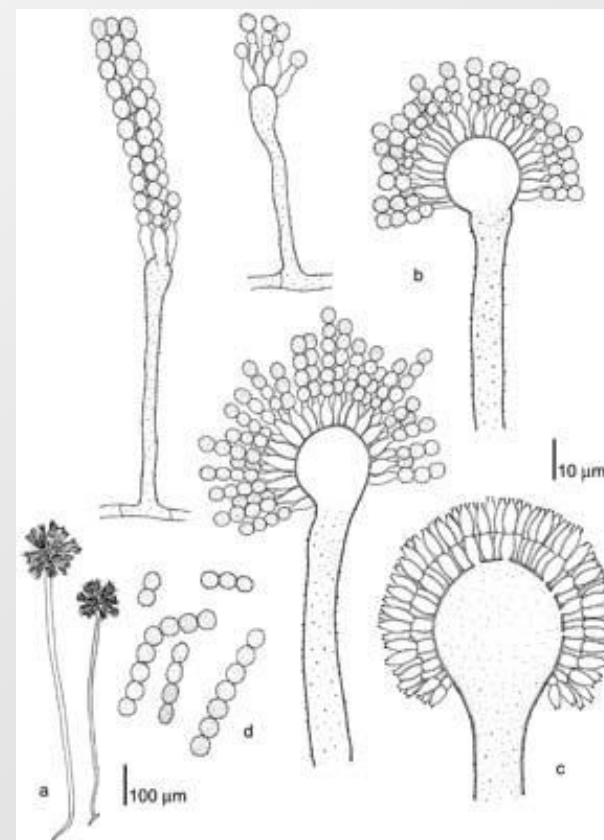


Foto.: A. Kubátová

Aspergillus

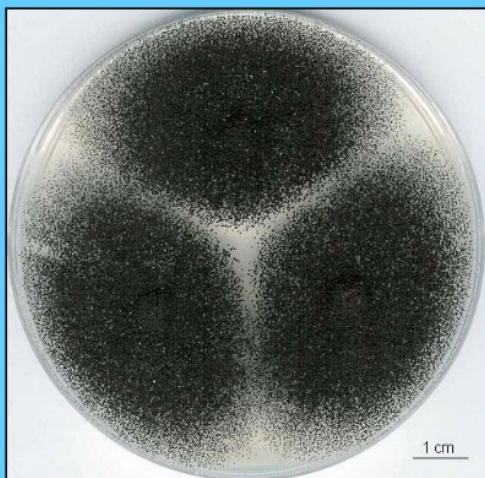
Aspergillus niger

- ☒ často nacházen v černém čaji (podílí se na jeho fermentaci), kontaminant potravin rostlinného tak i živočišného původu
- ☒ produkuje naphtho-4-pyrony, malforminy a u několika kmenů byla zaznamenána produkce ochratoxinu A
- ☒ z 5% původcem IA, otomykózy
- ☒ optimální klíčivost konidií v acidofilním prostředí
- ☒ teplotní optimu je 30 C
- ☒ specifickým diagnostický znakem infekcí způsobených *A. niger* je přítomnost kalcium oxalátum ve formě krystalů v patologickém vzorku

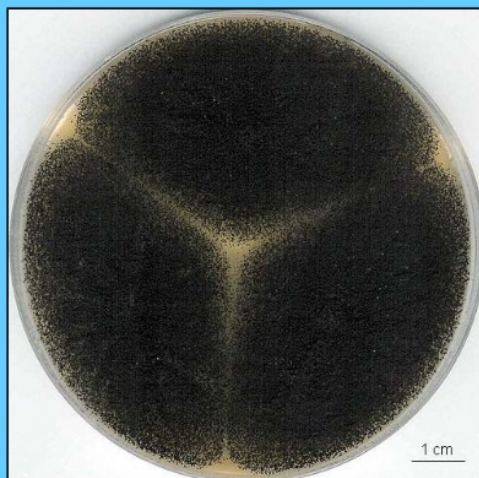
Aspergillus

Aspergillus niger

- ☞ kolonie rychle rostoucí, černé, zrnité, často produkuje žlutý pigment do agaru



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C

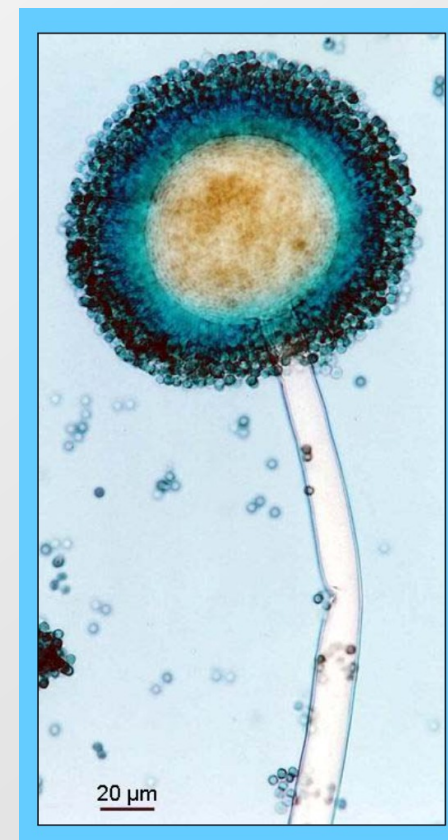
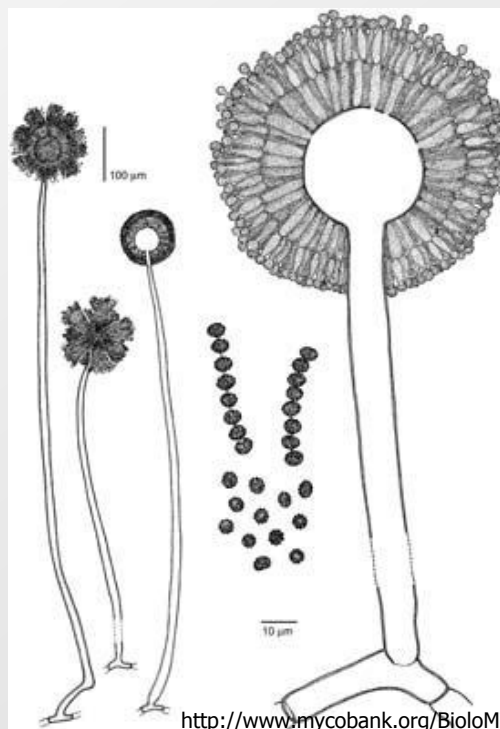
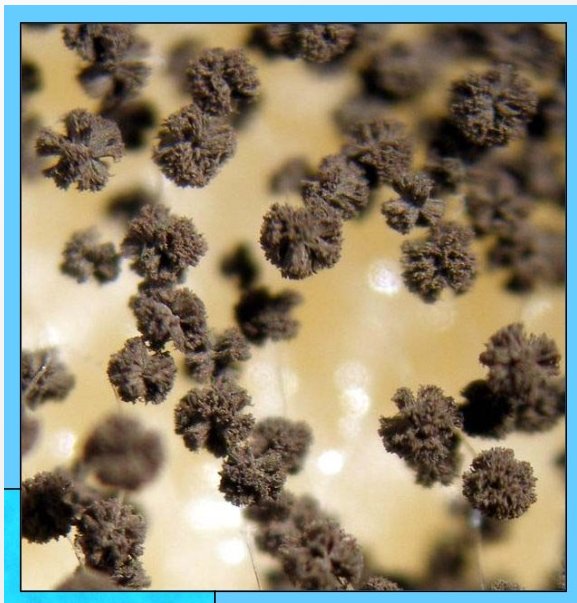


MEA 7 dní, 25 °C

Aspergillus

Aspergillus niger

- konidiofory biseriální, hladké s kulovitým měchýřkem
- konidiální hlavice paprsčité
- konidie kulovité nebo téměř kulovité, černé, nepravidelně bradavčité, 3,5-5 μm v průměru



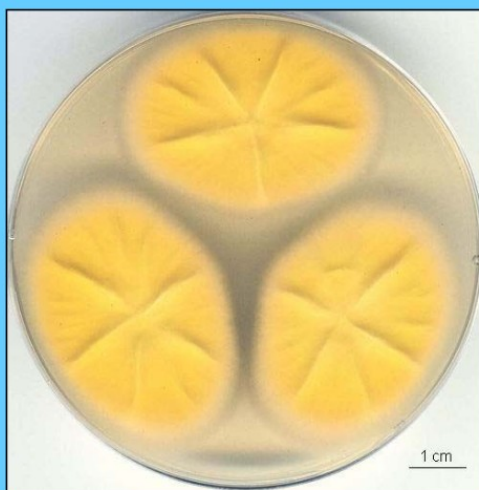
Aspergillus

Aspergillus terreus

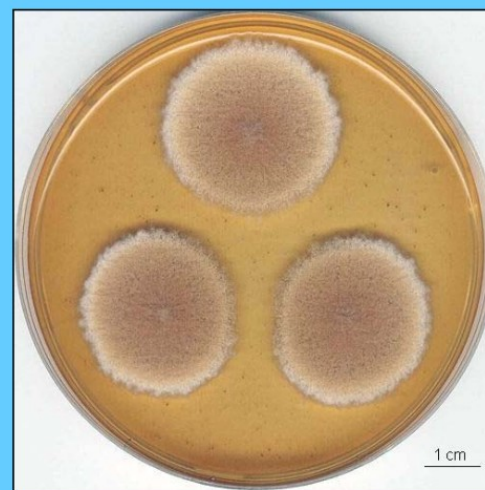
- kolonie rychle rostoucí, okrové, sametové, roste i při 37 °C
- výskyt na potravinách a v prostředí budov, bývá izolován i z půdy
- původce IA se sklonem k diseminaci, sekundární kožní infekce



CYA 7 dní, 25 °C



**CYA 7 dní, 25 °C,
revers**



MEA 7 dní, 25 °C

Aspergillus

Aspergillus terreus

- konidiofory biseriátní, hladké s téměř kulovitým měchýřkem
- konidiální hlavice sloupcovité
- konidie kulovité až elipsoidní, hladké, malé, 1,5 - 2,5 μm v průměru
- na substrátovém myceliu se tvoří kulovité buňky

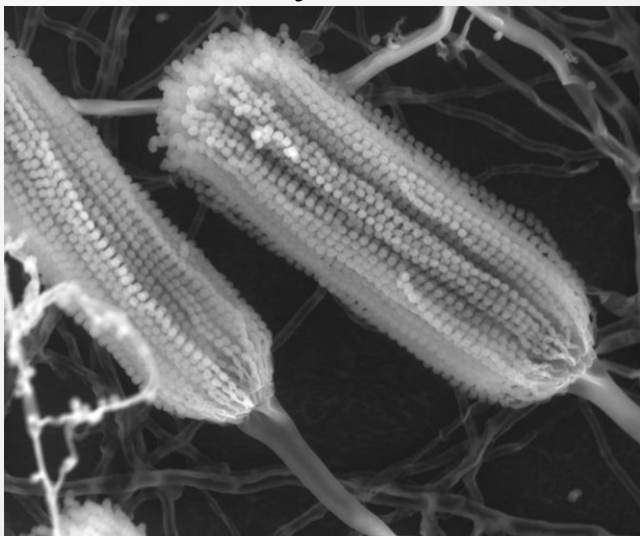
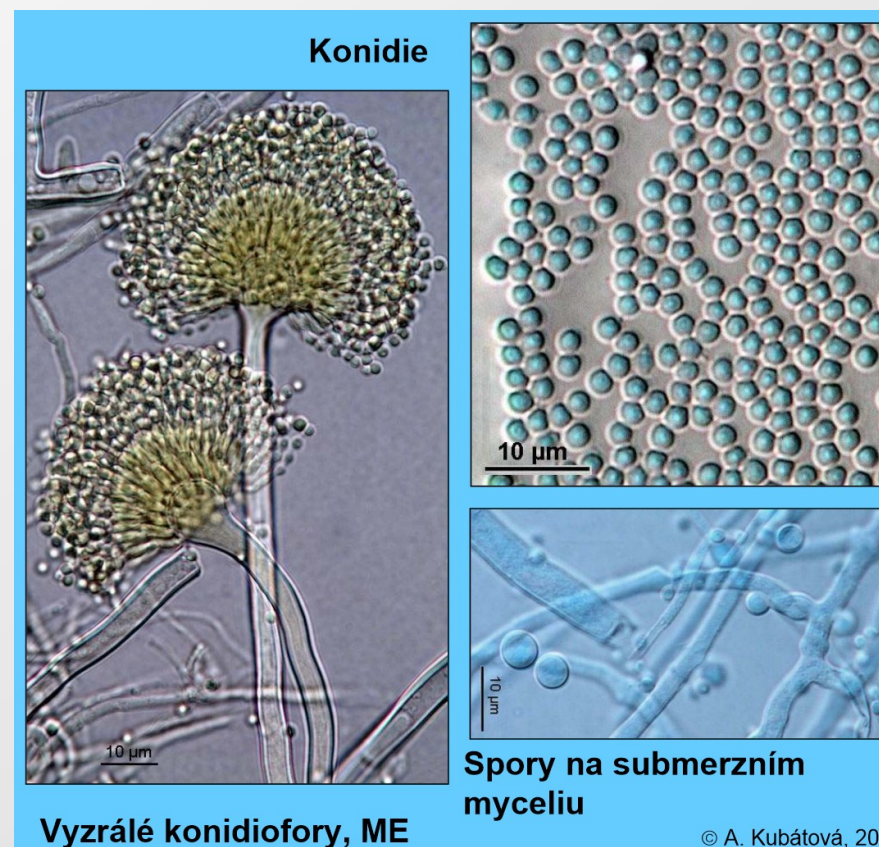


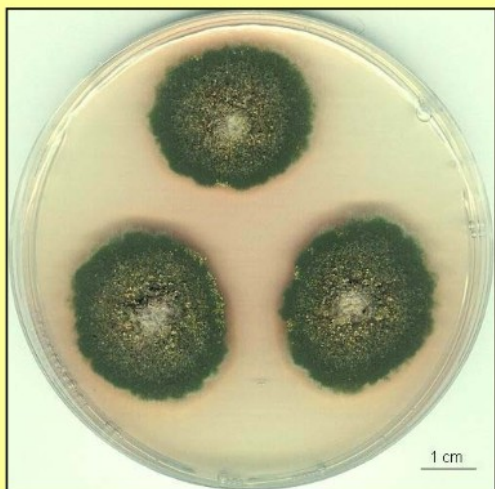
Foto.: J. Machač



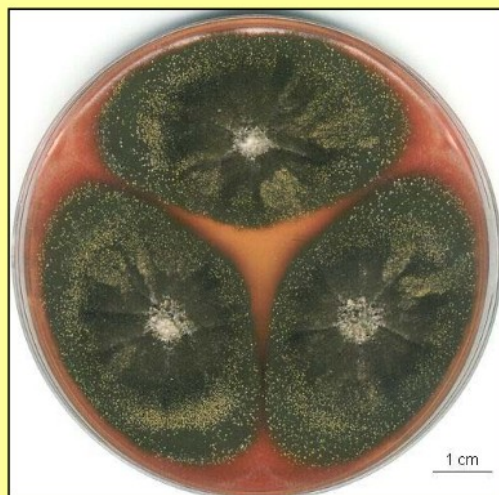
Aspergillus

Aspergillus nidulans

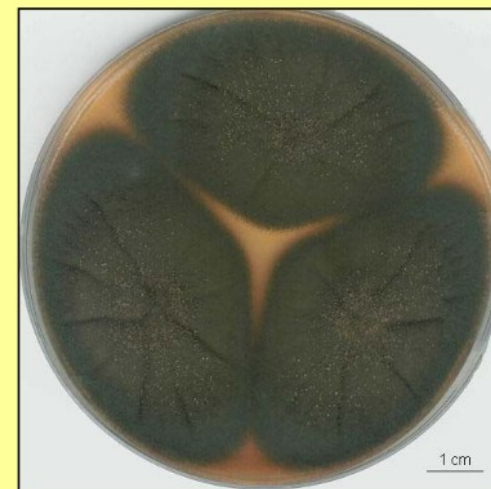
- ❏ kolonie rychle rostoucí při 25 i 37 °C, sametové, zelené
- ❏ tvorba plodnic - *Emericella nidulans*
- ❏ kontaminant potravin
- ❏ produkuje mykotoxin sterigmatocystin aj.
- ❏ vyskytuje se vzácně, virulentnější než *A. fumigatus*, vyšší rezistence k některým antimykotikům



CZ 7 dní, 25 °C



CYA 7 dní, 25 °C

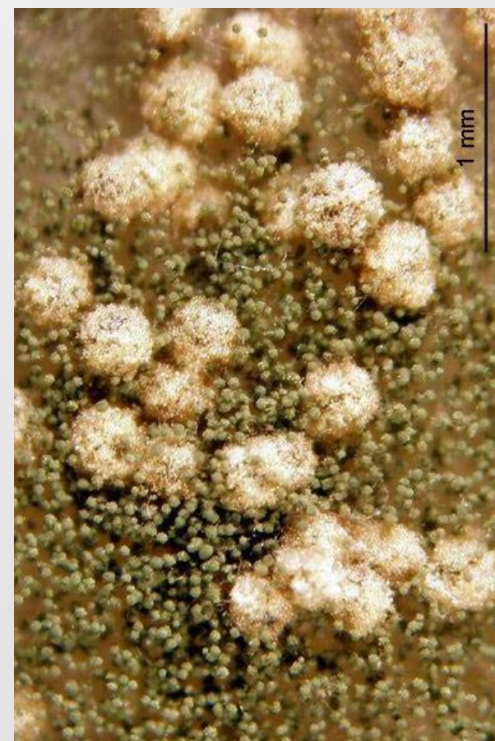
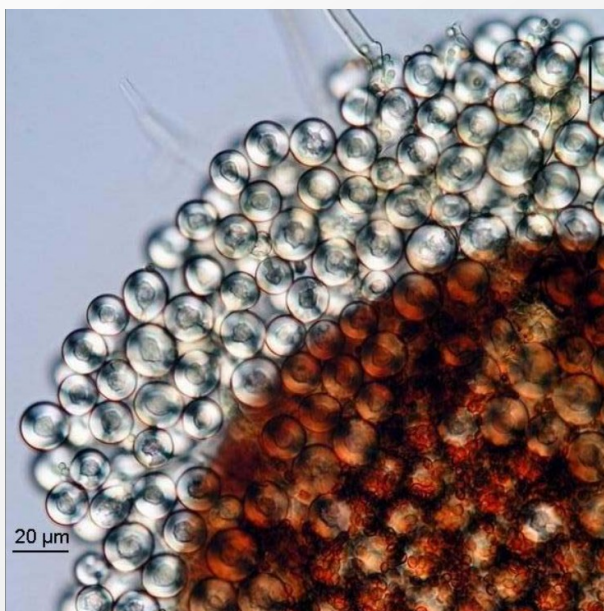


CYA 7 dní, 37 °C

Aspergillus

Aspergillus nidulans

- plodnice kulovité, 100-300 μm v průměru, obalené vrstvou světle žlutých až béžových „hülle cells“
- vřecka kulovitá, s 8 askosporami, askospory červené, čočkovitě zploštělé, hladké, se 2 obvodovými hřebínky



Aspergillus

Aspergillus nidulans

- konidiofory biseriátní, hladké, nahnědlé s kulovitým měchýřkem
- konidie v řetězcích, kulovité, bradavčité

