

# Lékařská mykologie - cvičení

## 1. Izolace mikroskopických hub ze stěru

**Materiál:** stěr z dutiny ústní

**Pomůcky:** sterilní vatový tampon, tekuté médium (GPYA - Glucose Peptone Yeast Extract Agar), pevné médium (MA2% – Malt Extrakt Agar nebo Sabouraudův glukozový agar s chloramfenikolem), očkovací klička, podložní skla, kahan, barvicí roztoky, termostat na 30 °C

### **Pracovní postup:**

1. Sterilním vatovým tamponem provedeme krouživým pohybem stěry z dutiny ústní.
2. Vatový tampón zanoříme do tekutého média a vymyjeme.
3. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 30 °C po dobu 24 - 48 hodin.
4. V případě zákalu zhotovíme preparát barvený podle Grama (úloha č.3).
5. Křížový roztěr pomocí inokulační kličky na pevné médium (MA2% – Malt Extrakt Agar nebo Sabouraudův glukozový agar s chloramfenikolem).
6. Kultivujeme ve tmě, při teplotě 30 °C po dobu 24 - 48 hodin.

### **Úkoly:**

*Jak zjistíte, že se jedná o smíšenou kulturu?*

*Popište makromorfologii kultury na PM*

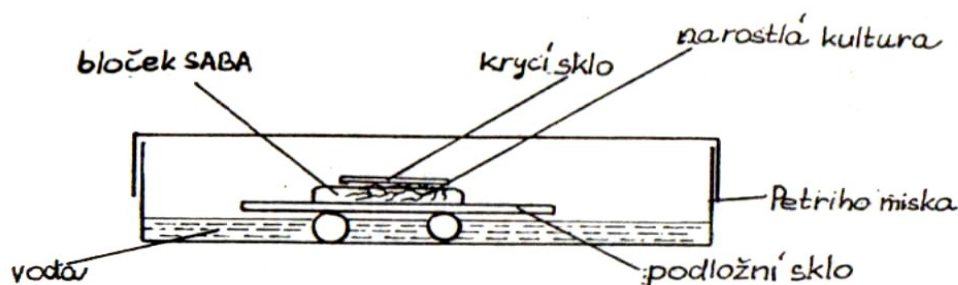
## 2. Příprava mikrokultury (sklíčkové kultury)

**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 s filtračním papírem.

### **Pracovní postup:**

1. Z tenké vrstvy kultivačního média připravíme bloček o velikosti 1x1 cm.
2. Bloček přeneseme na sterilní podložní sklo umístěné ve vlhké komůrce.
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.



### **Úkoly:**

*K čemu slouží mikrokultivace?*

*Popiš struktury viditelné v mikroskopu*

## **3. Identifikace kvasinek**

Kvasinky můžeme identifikovat na základě makromorfologie (vzhled kolonie, tvorba pigmentu), mikromorfologie na agaru s rýžovým extraktem (tvorba pseudomycelia, pravého mycelia, chlamydospor) a na základě utilizace substrátů v biochemických testech (např. Auxacolor2, CANDIDAtest 21, API Candida).

**Materiál:** kultura kvasinky

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

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

**Pomůcky:** podložní skla, kahan, barvicí roztoky, očkovací klička

### **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 1 min.
5. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
6. Převrstvíme Lugolovým roztokem na 1 min.
7. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
8. Odbarvujeme 95% etanolem, dokud odchází modrá barva (cca 20 – 30 sec.).
9. Opláchneme vodou (zbytek vody důkladně setřepat).
10. Dobarvíme zředěným roztokem safraninu 1 – 2 min.
11. Preparát prohlédneme imerzním objektivem při zvětšení 1000x a více.

### **Úkoly:**

*Jak se barví kvasinky?*

*Jak se liší v preparátu kvasinky od bakterií?*

*Popište mikromorfologii kultury v preparátu*

### **II. Mikromorfologie na agaru s rýžovým extraktem:**

**Pomůcky:** kultura kvasinky *Candida albicans* CCM 8215, Petriho miska s rýžovým agarem, sterilní krycí skla, paračnická 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 v termostatu při teplotě 30°C.

4. Poté kulturu prohlédneme pod mikroskopem.

#### **Úkoly:**

Které druhy kvasinek lze na základě kultivace na rýžovém agaru identifikovat a na základě čeho?

### **4. Identifikace vláknitých hub rodu *Aspergillus***

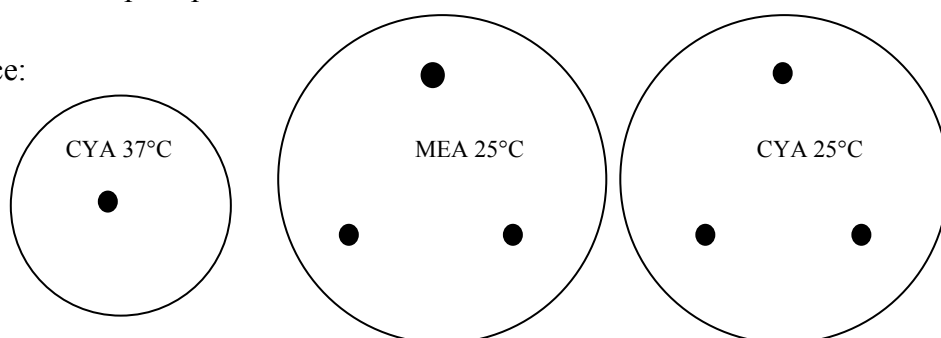
**Materiál:** Petriho misky s kulturou

**Pomůcky:** preparační jehla, Petriho miska s CYA (Czapek Yeast Autolysate agar), MEA (Malt Extract Autolysate agar), 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.

#### **Úkoly:**

*Vyplňte identifikační protokol, proveďte nákres a popis kultury pod mikroskopem  
Podle identifikačního klíče proveďte identifikaci do rodu.*

### **5. Nativní preparát:**

**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 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)

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).

#### **Úkoly:**

*Proč pro přípravu nativního preparátu používáme kyselinu mléčnou, roztok laktofenolu nebo glycerolu?  
Proveďte nákres a popis kultur pod mikroskopem*

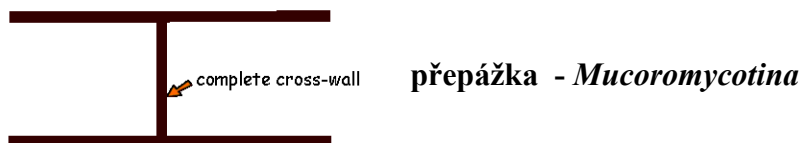
## Mikroskopování

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")
- **zygospóra** vzniká při pohlavním rozmnožování splynutím dvou různých gametangií



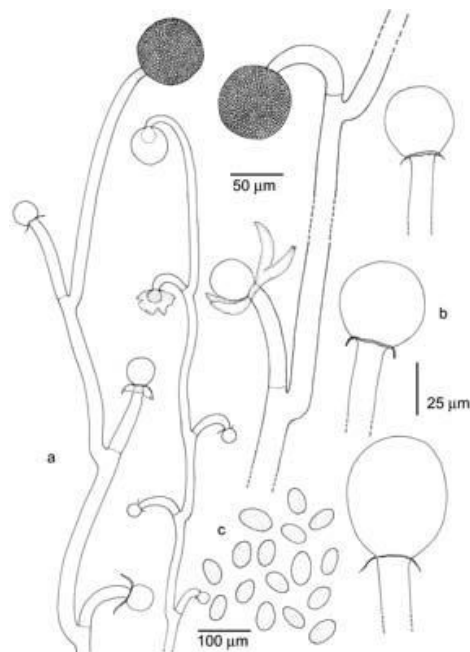
### Rod *Mucor*

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

#### Preparát č. 1: *Mucor circinelloides* CCM 8328

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

- symptodiálně větvený circinátní sporangiofory
- kulovitá kolumela
- sporangiospory

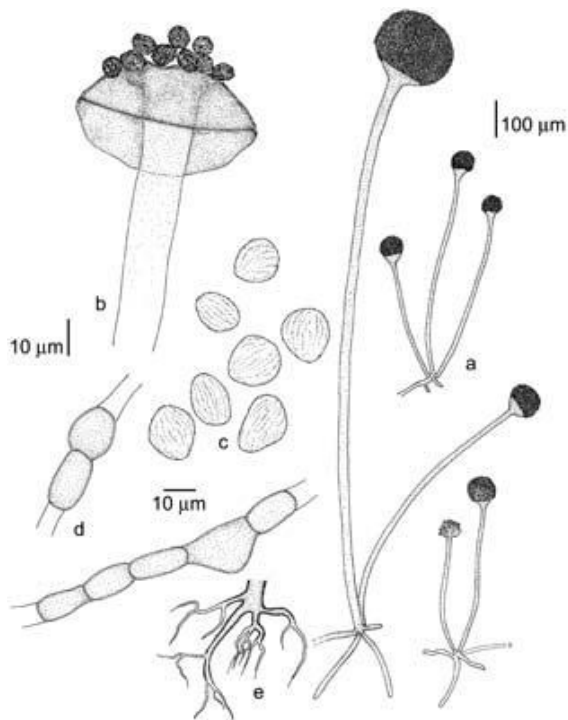


### Rod *Rhizopus*

- 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.

#### 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

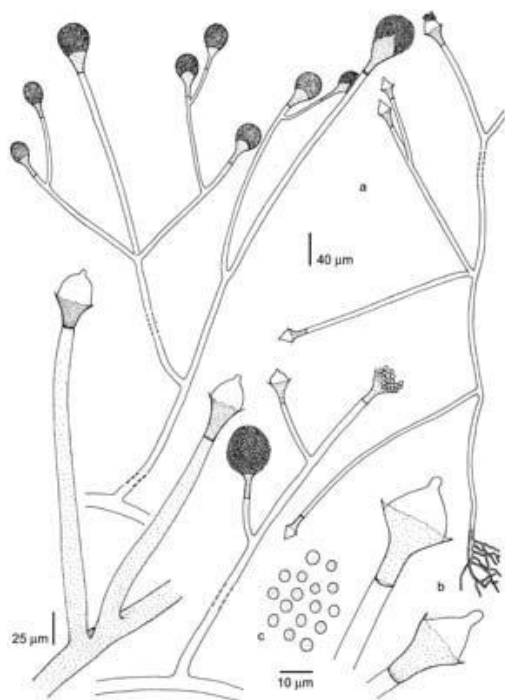
### Rod *Absidia*

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

širokou apofýzou.

### Preparát č. 3: *Absidia coerulea* CCM 8230

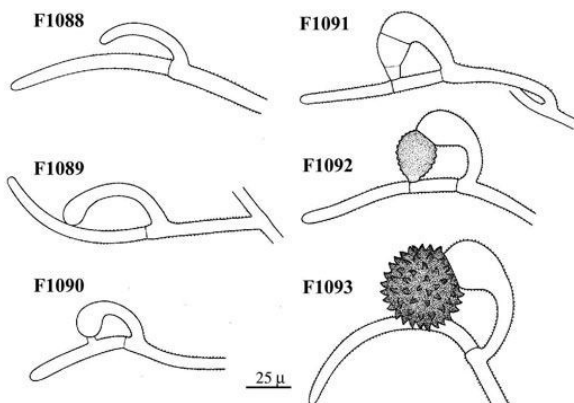
[Fungi](#), [Zygomycota](#), [Mucoromycotina](#), [Mucorales](#), [Mucoraceae](#), [Absidia](#)



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

Preparát č. 4: *Zygorhynchus moelleri* CCM 8022 - zygospory  
 Fungi, Zygomycota, Mucoromycotina, Mucorales, Mucoraceae, Zygorhynchus

2-655 *Zygorhynchus moelleri*



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

- 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 **chlamydospory** - tlustostěnné přežívající buňky vznikající na myceliu)

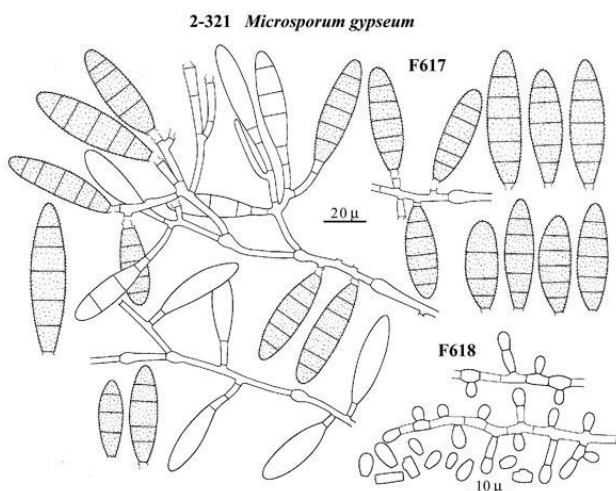
Preparát č.5: *Geotrichum candidum* CCM 8228 – arthrokonidie v rozpadajících se řetízích

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



Preparát č.6: *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

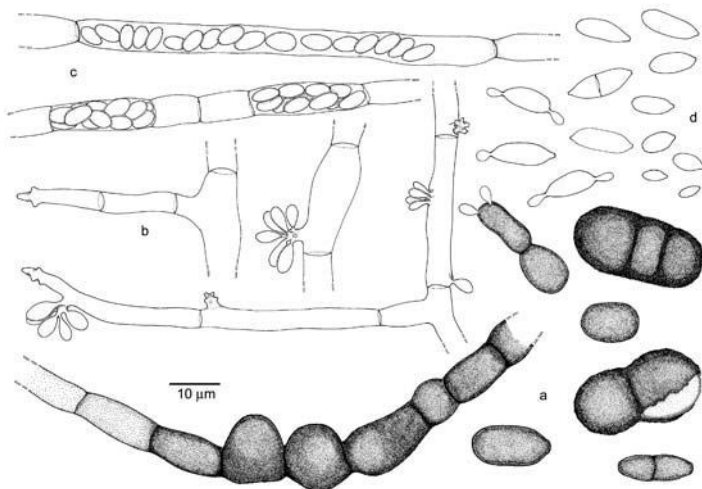
a) tretická - vznik **porokonidií**, často s výraznou jizvou na konidiogenní buňce

b) phialidická - konidiogenní buňky **fialidy**

c) annelidická - konidiogenní buňky **anelidy** (límeček)

Preparát č.7.: ***Aureobasidium pullulans* CCM F-148**

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



a) interkalární tmavě pigmentované chlamydospory

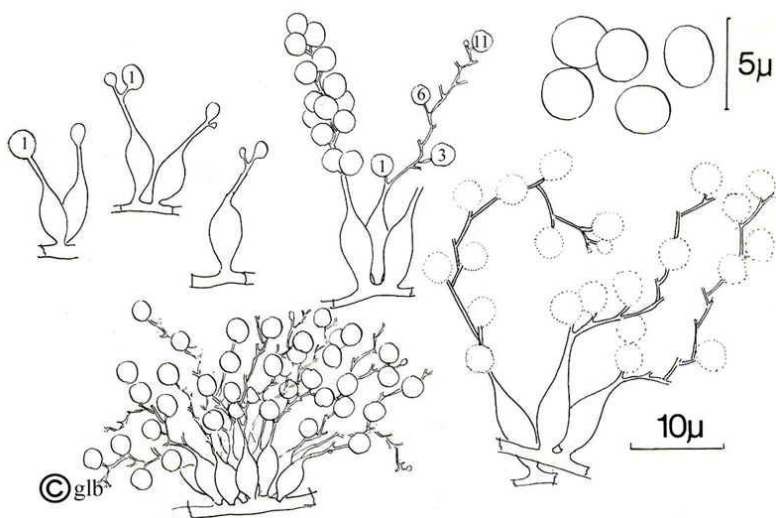
b) konidie vznikající synchronně na nediferencovaných konidiogenních buňkách

c) endokonidie

d) pučící buňky

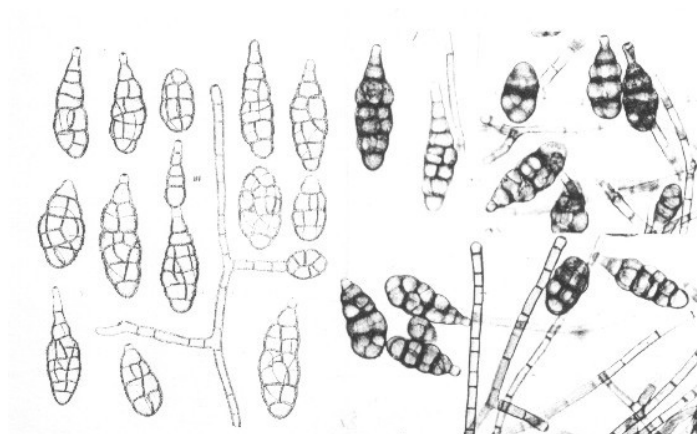
Preparát č.8: ***Beauveria bassiana* CCM F-295** - sympodiální proliferace konidiogenní buňky

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Pezizomycotina](#), [Sordariomycetes](#), [Hypocreomycetidae](#), [Hypocreales](#), [Cordycipitaceae](#), [Beauveria](#)



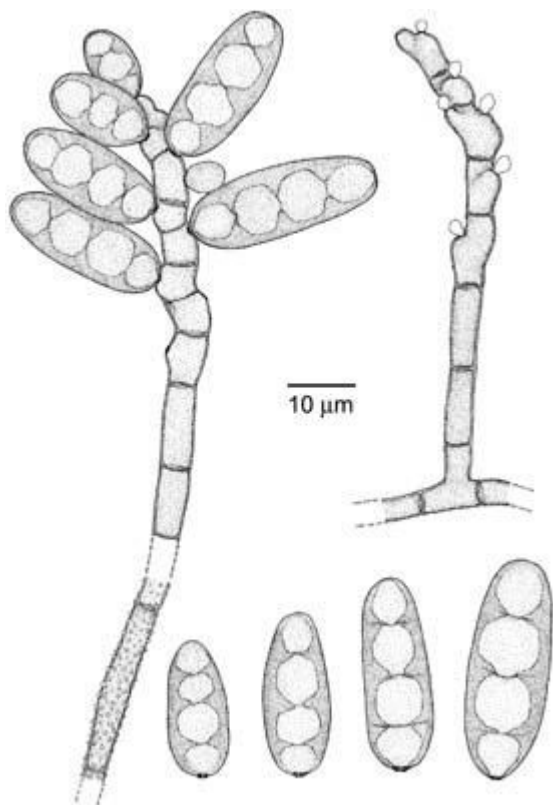
Preparát č.9: *Alternaria citri* CCM F-178 – vícebuněčné konidie (porokonidie)

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



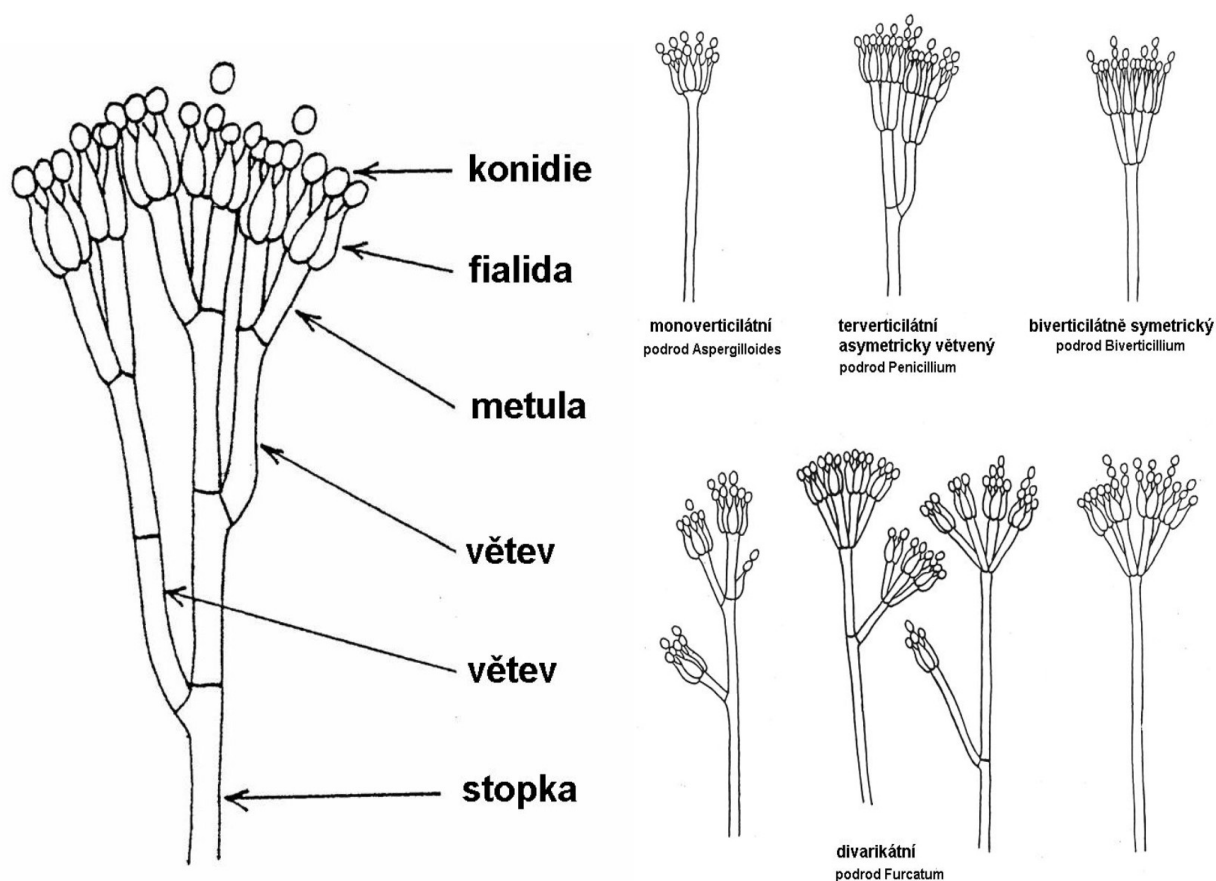
Preparát č.10: *Bipolaris spicifera* CCM F-29 – pseudoseptované konidie (porokonidie)

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



## Rod *Penicillium*

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

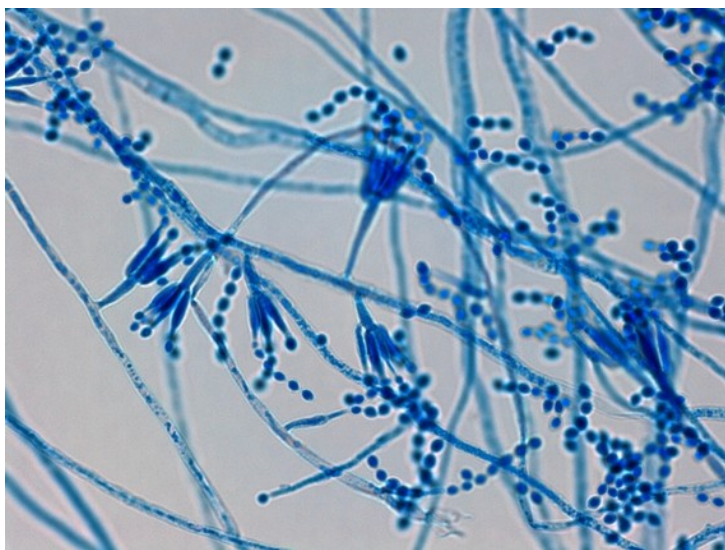


Preparát č.11: *Penicillium vulpinum* CCM F-639 – tervercilátní, synemata

Preparát č.12: *Penicillium minioluteum* CCM 8047 – biverciliálně symetrický

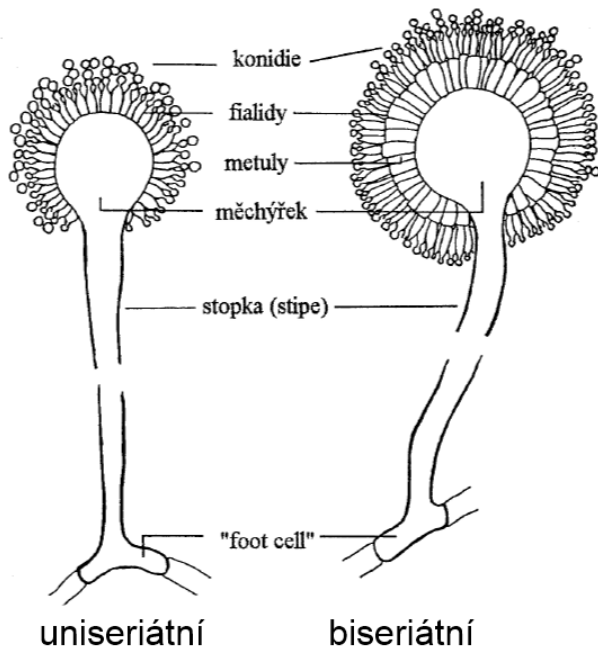
Preparát č.13: *Paecilomyces lilacinus* CCM F-589 - konidiofory méně pravidelně větvené, fialidy protáhlé v dlouhý krček, konidie

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

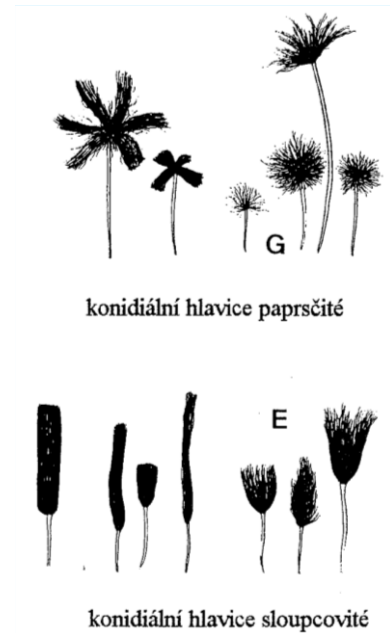


## Rod *Aspergillus*

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

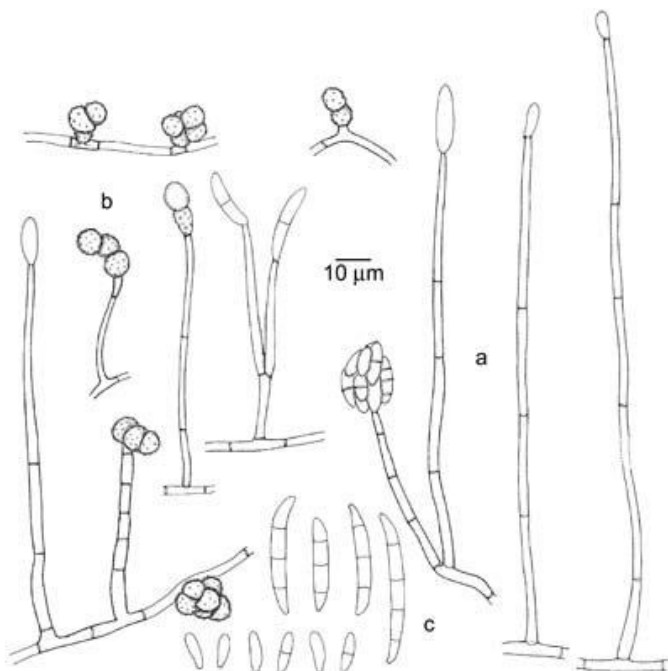


2 typy konidioforů



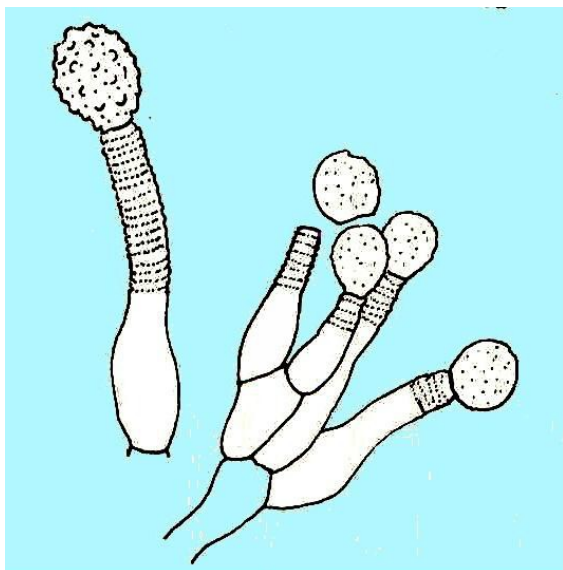
Preparát č.14: *Fusarium solani* CCM 8014 - konidiofory s monofialidami, makro- a mikrokonidie, chlamydospory, sporodochia (palisáda konidioforů v ložisku na povrchu substrátu)

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

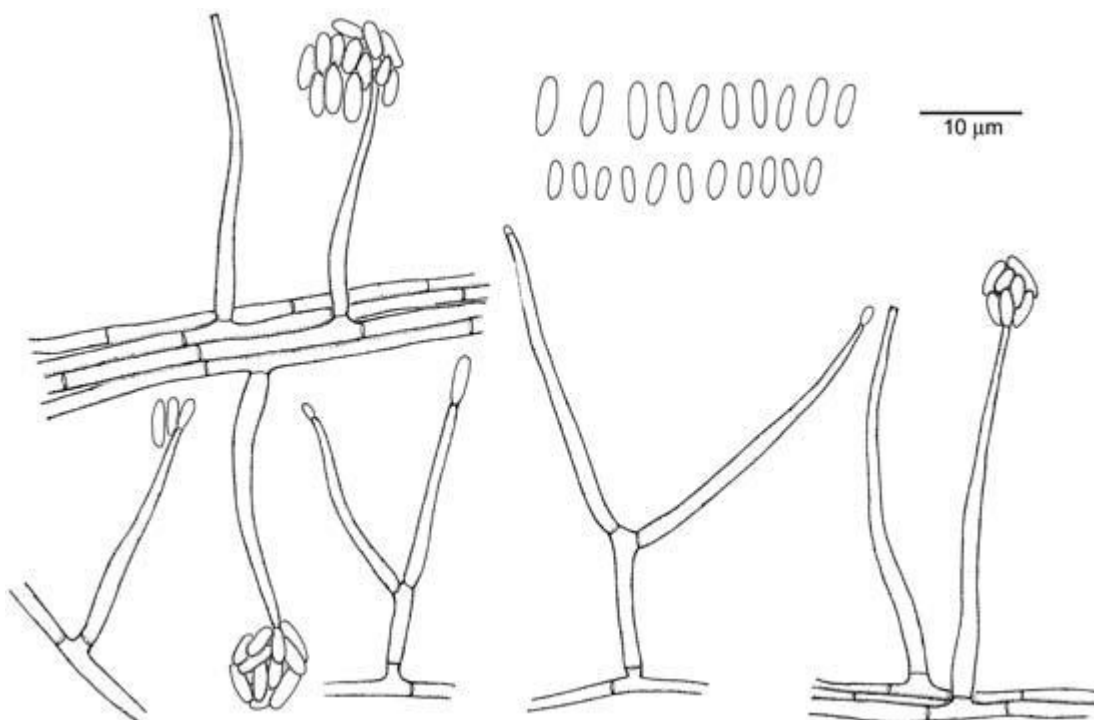


Preparát č.15: *Scopulariopsis brevicaulis* CCM F-388 - konidiogenní buňky - anelidy, konidie

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



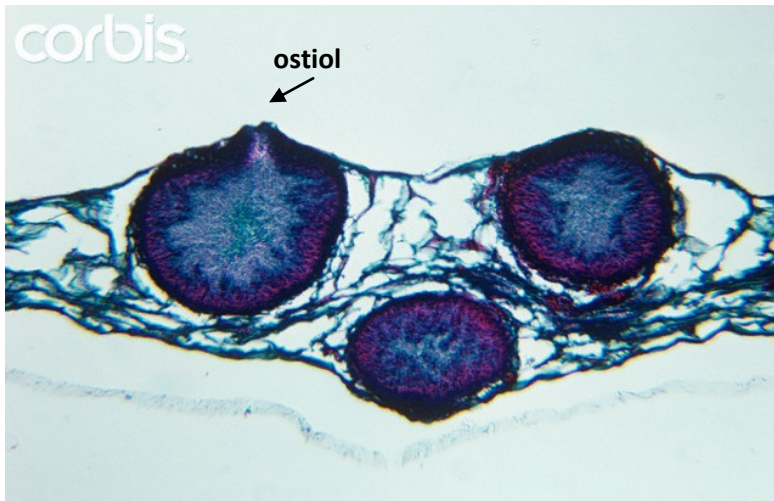
Preparát č.16: *Acremonium strictum* CCM F-280 - tvorba synnemat, fialidy většinou jednotlivé, k vrcholu se zužující (jehlicovité), septum na bázi, konidie jednobuněčné, hladké, hyalinní





Preparát č.17: ***Phoma lingam* CCM F-700** - pyknidy (kulovitý nebo lahvicovitý útvar s ostiolem, uvnitř vystlaný konidiofory)

[Fungi](#), [Ascomycota](#), [Peizomycotina](#), [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

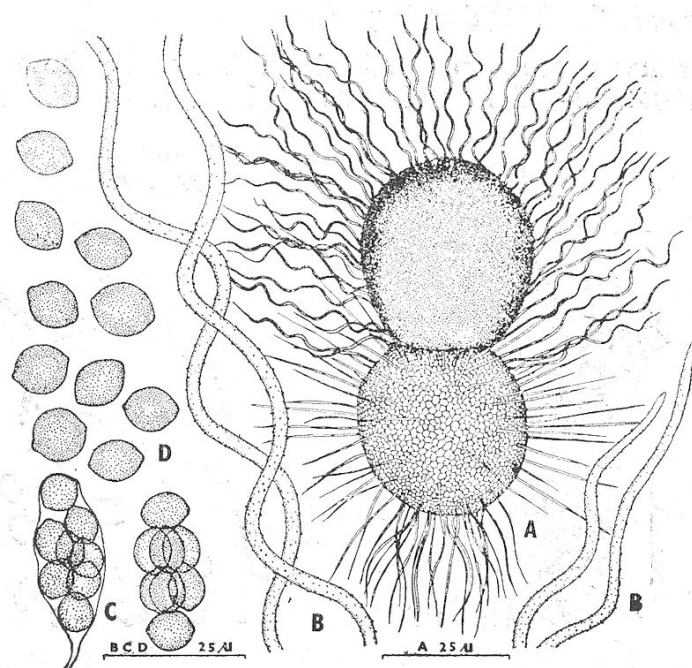
- **kleistothecium** je uzavřená plodnice s vytvořenou stěnou, otvírá se rozpadem; vřečka nejsou nijak uspořádána
- **perithecium** je kulovitá nebo protáhlá plodnice s úzkým ústím (ostiolem) vystlaným perifýzami, vřečka jsou uspořádána v hymeniu, mezi nimi se tvoří sterilní hyfová zakončení – parafýzy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

**Preparát č. 18: *Chaetomium globosum* CCM F-275**

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

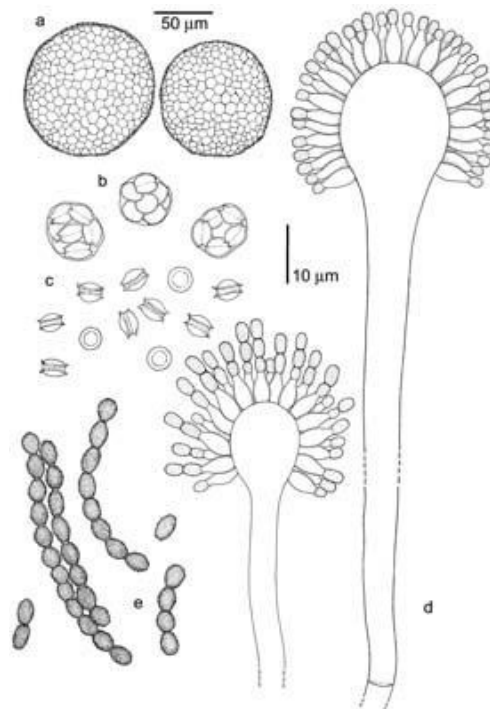


- A - perithecium
- B - zvlňená nřvětvená vlákna (trichomy)
- C - vřecko (ascus)
- D - askospory

**Preparát č. 19: *Eurotium chevalieri* CCM F-6**

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

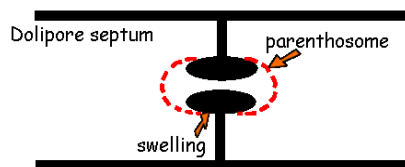
- a. kleistothecium
- b. vřecka
- c. askospory s ekvatoriálními prstenci
- d. konidiofory
- e. konidie



## Říše: *FUNGI*

### Oddělení: *BASIDIOMYCOTA*

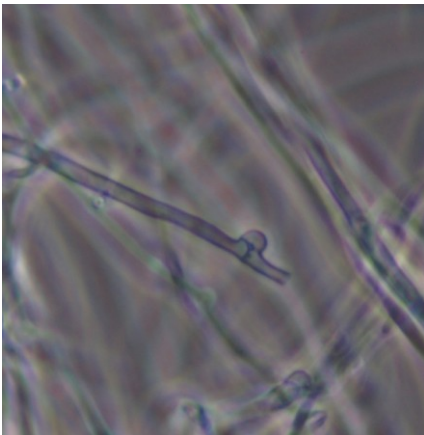
- společným znakem je tvorba **bazidie** (meiosporangium) a **bazidiospor** (meiospor) tvořících se exogenně na **sterigmatech** (stopečkách)
- vegetativní stélku tvoří přehrádkované mycelium, ve stěně přehrádek jsou vytvořeny **dolipóry** (podoba pláště soudku) s **parentozómem**
- **primární mycelium** – 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.20: *Schizophyllum commune* CCM F-795 - hyfy s přezkami

[Fungi](#), [Basidiomycota](#), [Agaricomycotina](#), [Agaricomycetes](#), [Agaricomycetidae](#), [Agaricales](#), [Schizophyllaceae](#), [Schizophyllum](#)



#### 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