



MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

ČESKÁ SBÍRKA MIKROORGANISMŮ

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



Mikroskopické houby – cvičení 1 (Bi6620c) Izolace mikroskopických hub



Metody izolace mikroskopických hub

Izolace mikroskopických hub z ovzduší vnitřního prostředí

- ⑩ člověk je adaptován na existenci mikroorganismů v ovzduší a jejich vdechnutí zůstává v mnoha případech bez odezvy.
- ⑩ **alergeny** hned za roztoči, prachem a alergeny domácích živočichů
- ⑩ alergická plicní aspergilóza - způsobená hypersenzitivitou k aspergilovým antigenům při kolonizaci dolních dýchacích cest aspergily
- ⑩ **produkce mykotoxinů** způsobujících mykotoxikózy (především po konzumaci kontaminovaných poživatin). Mykotoxiny se mohou vyskytovat ve velmi malých koncentracích ve sporách mikroskopických hub, které je produkují a s nimi být vdechnuty.

Metody izolace mikroskopických hub z ovzduší vnitřního prostředí

Princip metody: postupem zkoušení se zjišťuje celková koncentrace všech mikroskopických hub, které vyrostou na kultivační půdě za daných podmínek aerobní inkubace při 25 ± 1 °C za 3-5 dnů.

Metody s aktivním nasáváním vzduchu

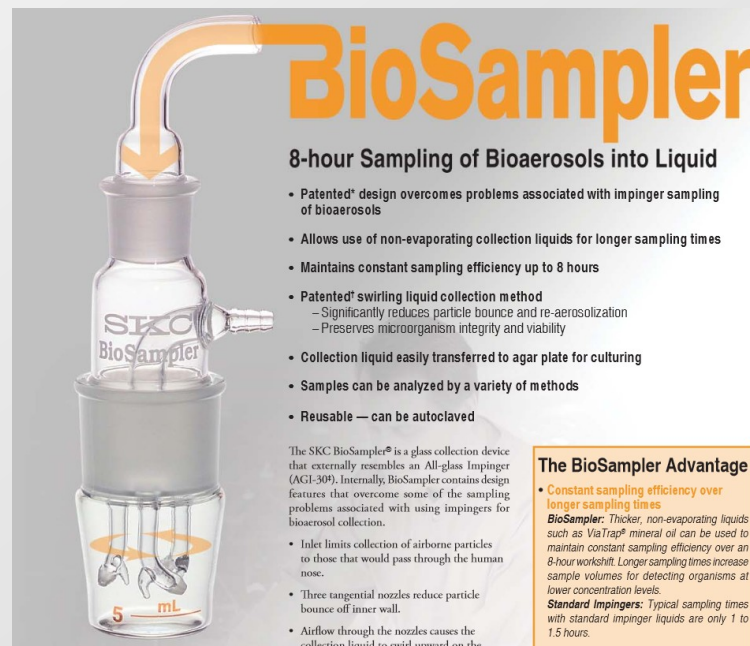
- ⑩ **metody impakční** využívají pro průchod vzduchu sací hlavu s otvory, mikroorganismy jsou zachycovány na agarová média v Petriho miskách (aeroskop)



Metody izolace mikroskopických hub z ovzduší vnitřního prostředí

Metody s aktivním nasáváním vzduchu

- 10 **metody filtrační** zachycují mikroorganismy na filtry, které jsou dále vkládány na Petriho misky s agary (např. Sartorius MD 8)
- 10 **metody** označované jako **impigement** využívají pro zachycení mikroorganismů tekutá média či pohybující se tekutá média (např. Biosampler)

BioSampler

8-hour Sampling of Bioaerosols into Liquid

- Patented* design overcomes problems associated with impinger sampling of bioaerosols
- Allows use of non-evaporating collection liquids for longer sampling times
- Maintains constant sampling efficiency up to 8 hours
- Patented* swirling liquid collection method
 - Significantly reduces particle bounce and re-aerosolization
 - Preserves microorganism integrity and viability
- Collection liquid easily transferred to agar plate for culturing
- Samples can be analyzed by a variety of methods
- Reusable — can be autoclaved

The SKC BioSampler® is a glass collection device that externally resembles an All-glass Impinger (AGI-30). Internally, BioSampler contains design features that overcome some of the sampling problems associated with using impingers for bioaerosol collection.

- Inlet limits collection of airborne particles to those that would pass through the human nose.
- Three tangential nozzles reduce particle bounce off inner wall.
- Airflow through the nozzles causes the collection liquid to swirl upward on the

The BioSampler Advantage

- **Constant sampling efficiency over longer sampling times**

BioSampler: Thicker, non-evaporating liquids such as Via Trap® mineral oil can be used to maintain constant sampling efficiency over an 8-hour workshift. Longer sampling times increase sample volumes for detecting organisms at lower concentration levels.

Standard Impingers: Typical sampling times with standard impinger liquids are only 1 to 1.5 hours.

Metody izolace mikroskopických hub z ovzduší vnitřního prostředí Kultivačními půdy a podmínky inkubace dle ČSN ISO 7954

Hodnocení výsledků koncentrací mikroorganismů v ovzduší je prováděno porovnáním s hodnotami dle EUR 14988. Kategorie znečištění ovzduší uvedené v tomto doporučení byly vytvořeny na základě průměrných naměřených hodnot v ovzduší vnitřního prostředí a nikoli podle odhadu zdravotních rizik.

Table 4 : Categories of CFU/m³ (mixed populations of fungi) obtained with the Andersen six-stage sampler in combination with MEA, and with the N6-Andersen one-stage sampler in combination with MEA and DG18.

category	houses (CFU/m ³)	non-industrial indoor environments (CFU/m ³)
very low	< 50	< 25
low	< 200*	< 100
intermediate	< 1 000	< 500
high	< 10 000	< 2 000
very high	> 10 000	> 2 000

* : 500 CFU/m³ for DG18

ČSN ISO 7954 Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu plísní a kvasinek - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C

EUR 14988 (Report No. 12: Biological Particles in Indoor Environments, Commission of the European Communities, Report No. 12, Luxembourg, 1994)

Metody izolace mikroskopických hub z ovzduší vnitřního prostředí

Metody využívající schopnost částic sedimentovat

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.

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

Metody izolace mikroskopických hub

- ❏ **Metoda přímého výsevu** - rozložení malého množství vzorku přímo na izolační médium v Petriho misce
- ❏ **Metoda zřed'ovací** (dilution plate isolation method– Garrett, 1981; Parkinson et al., 1971) - ředění se provádí u vzorků s vysokým obsahem mikroorganismů, (např. zeminy, odpadní vody, kaly, sedimenty, některé potraviny apod.)
- ❏ **Metoda izolace z osiva** – povrchová dezinfekce osiva (chlornan sodný) a následné umístění na zvlhčený sterilní filtrační papír

Kultivační média

Přirozené živné půdy: sterilované a vodou navlhčené řízky brambor, mrkve, rýže, chléb, semena, lodyhy bylin, bukové špalíky, kukuřičná sláma, obilky pšenice, jehličí, mrtvý hmyz, vlasy...

Polopřirozené živné půdy: sladinkový agar (1000 ml pivovarské sladiny zředěné na polovinu, 20 g agaru), agar z ovesných vloček (60 g ovesných vloček, 1 l vody, 15 g agaru), bramborovo-mrkvový agar (20g mrkve a 20 g brambor, nastrouhat, povařit s vodou, doplnit na 1 l, přidat 20 g agaru)

Syntetické živné půdy: Sabouraudův agar, Czapek-Doxův agar...

- ⑩ při izolaci používáme obvykle **selektivní živné půdy**, jež nejvíce vyhovují izolovanému druhu houby
- ⑩ selektivnost podmíněna látkovým složením půdy, teplotou...
- ⑩ v každém případě je nutno přidat antibakteriální antibiotikum...