

MASARYKOVA UNIVERZITA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

ČESKÁ SBÍRKA MIKROORGANISMŮ

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



Bi7529 Metody mykologického výzkumu Izolace mikroskopických hub



Výsledky

Metody izolace mikroskopických hub

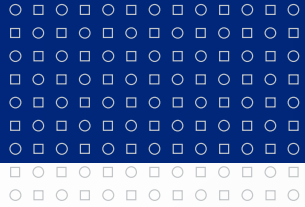
1. Stanovení celkového počtu směsné populace plísní v ovzduší vnitřního prostředí sedimentační metodou

	místnost	vnitřní pr.	vnější pr.	izolovaná populace hub
VS	pokoj	2	11	
ZK	pokoj	13	37	<i>Cladosporium sp.</i>
VB	pokoj/zahrada	13	35	<i>Cladosporium sp.</i>

- ☒ k nejhojnějším mikromycetám šířících se vzduchem patří zástupci rodů ***Cladosporium***, ***Alternaria***, ***Aureobasidium***, ***Botrytis***, ***Epicoccum*** a ***Penicillium***
- ☒ nepohlavní stadia vřeckovýtrusných hub (*Ascomycota*)
- ☒ druhy kosmopolitně rozšířené, vyskytující se zejména v půdě a na rostlinných zbytcích

Hodnocení: Pro bytové místnosti se považují hodnoty 50 KTJ plísní / 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.



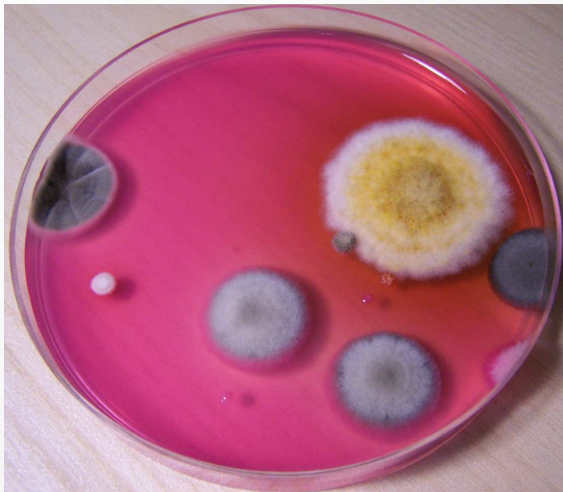
1. Stanovení celkového počtu směsné populace plísní v ovzduší vnitřního prostředí sedimentační metodou

VS

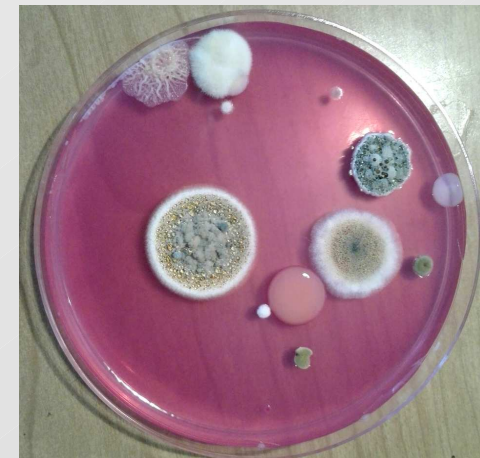
VB

ZK

venku



uvnitř



Cladosporium

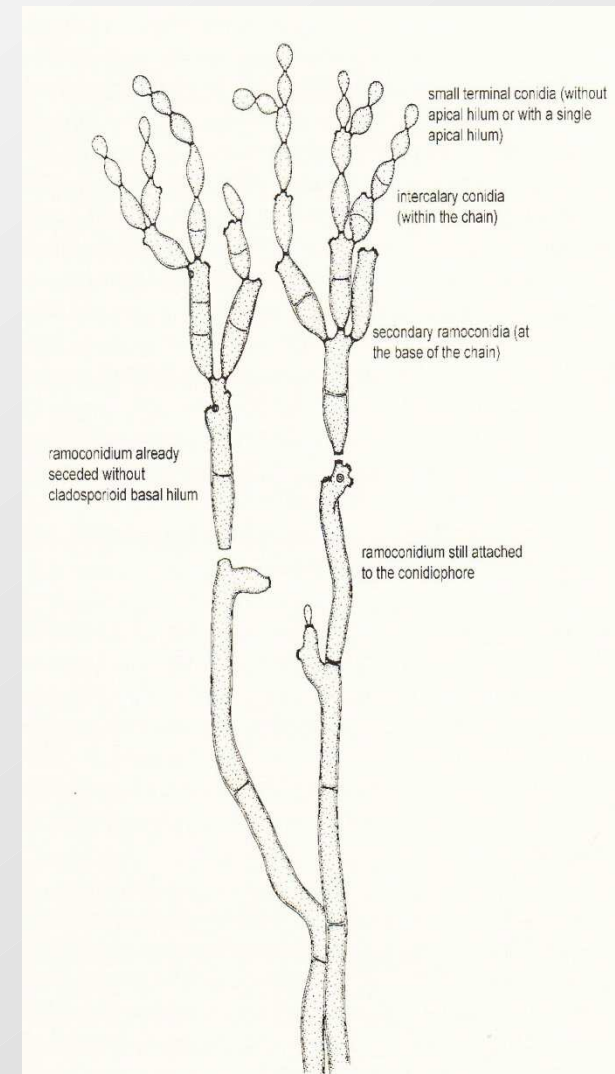
Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Cladosporiales, Cladosporiaceae

- ❏ cca 100 druhů
- ❏ saprofytické druhy s kosmopolitním rozšířením (*C. herbarum*, *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*)
- ❏ parazitické druhy na rostlinných hostitelích
- ❏ „Indoor fungi“
- ❏ biodegradace – olejomalby
- ❏ rozkládají polyethylen, polypropylen, epoxid)
- ❏ mykoremediace – *C. sphaerospermum*
(monocyklické aromatické uhlovodíky)

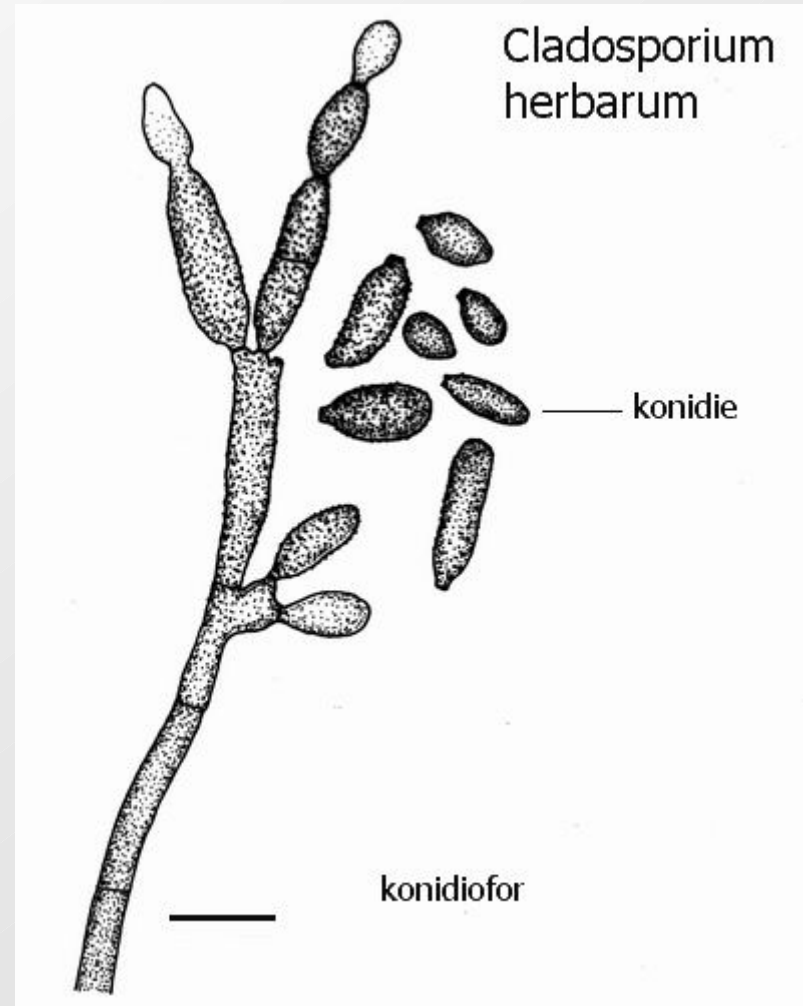
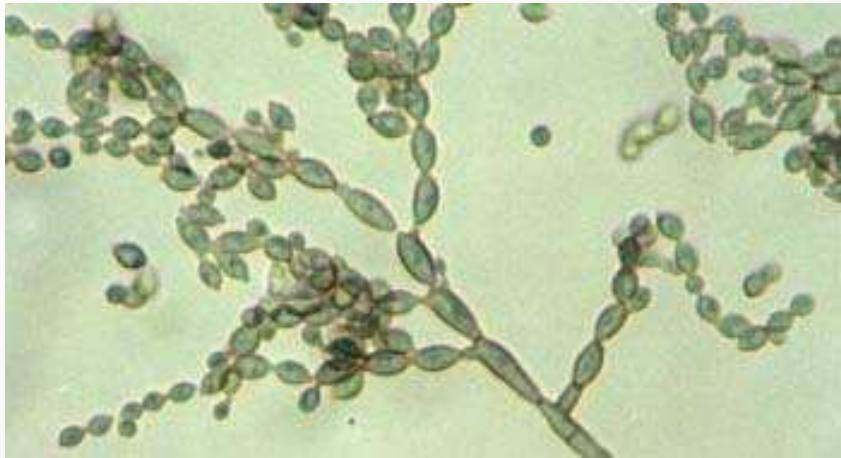


Cladosporium

- ☒ konidiofory semi- a mikronematózní, rovné nebo zakřivené, nevětvené či větvené (ramokonidie) s dobře viditelnými jizvami po odpadlých konidiích
- ☒ ramokonidie – koncové části větveného konidioforu
- ☒ konidiogeneze hloblastická
- ☒ konidie se tvoří v jednoduchých nebo větvených akropetálních řetězcích (amero, didymo nebo fragmokonidie), hnědé



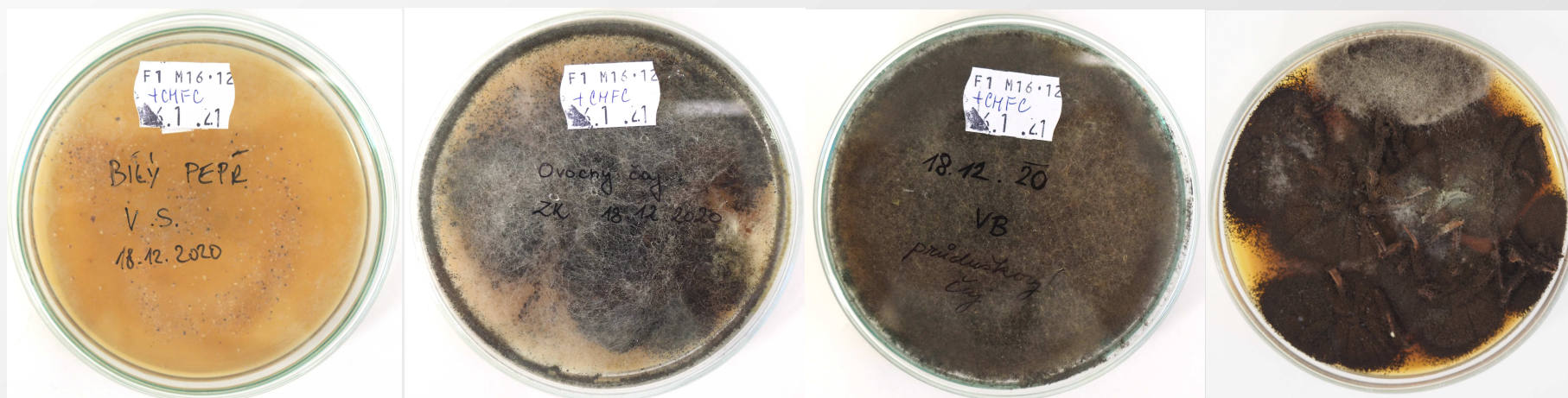
Cladosporium

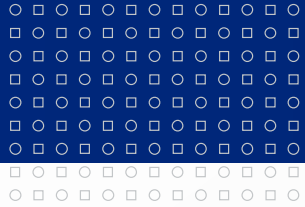


Metody izolace a mikroskopických hub

2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

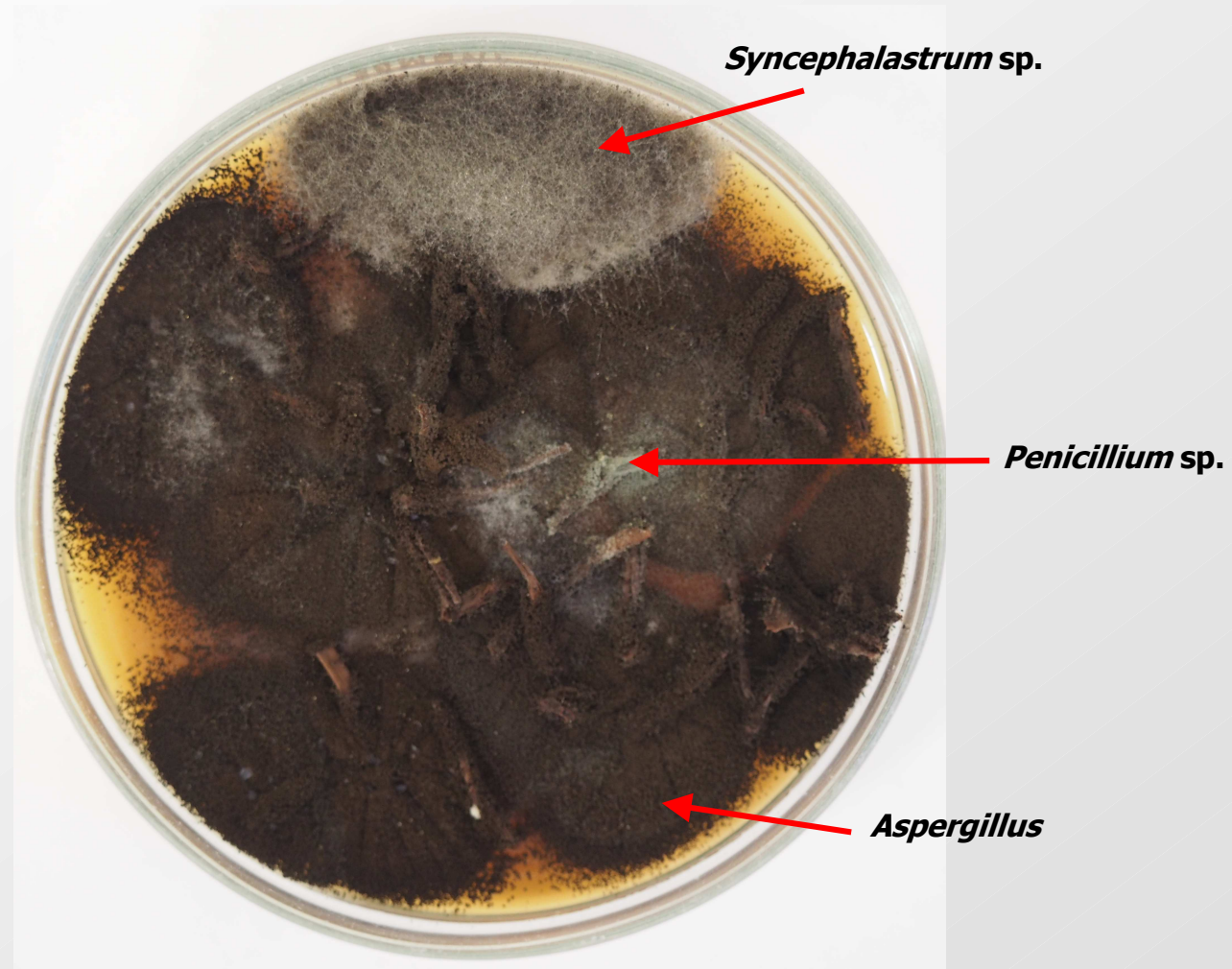
VS	bílý pepř	-
ZK	ovocný čaj	<i>Rhizopus sp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>
VB	průduškový čaj	<i>Rhizopus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>
ML	černý čaj (sypaný)	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Syncephalastrum sp.</i>





2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

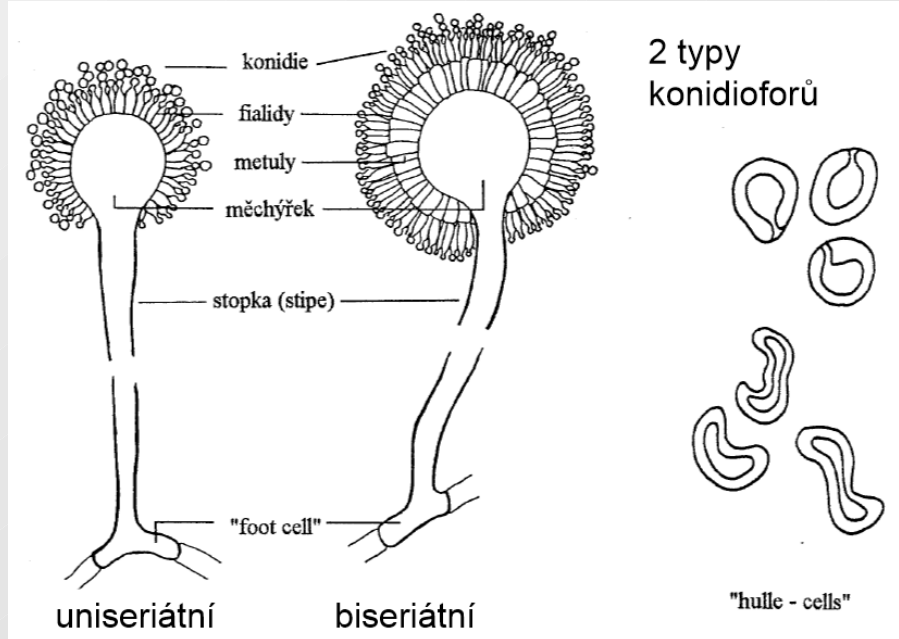
černý čaj (sypaný)



Aspergillus

Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae

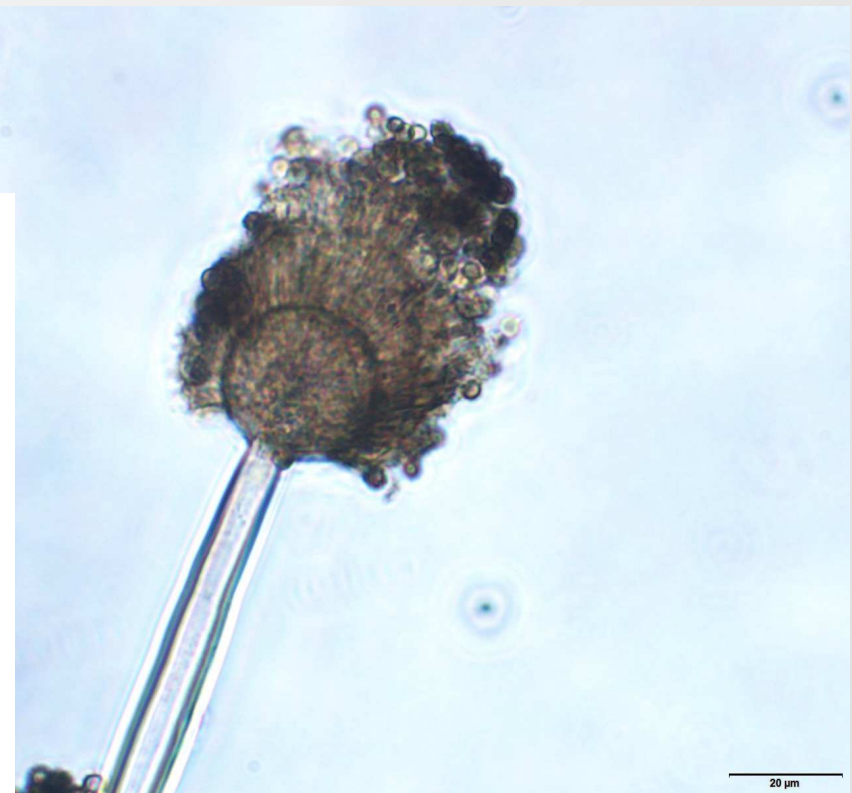
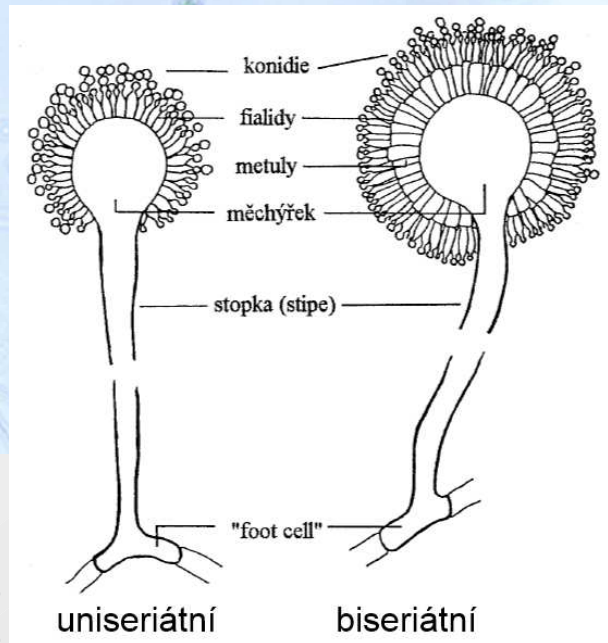
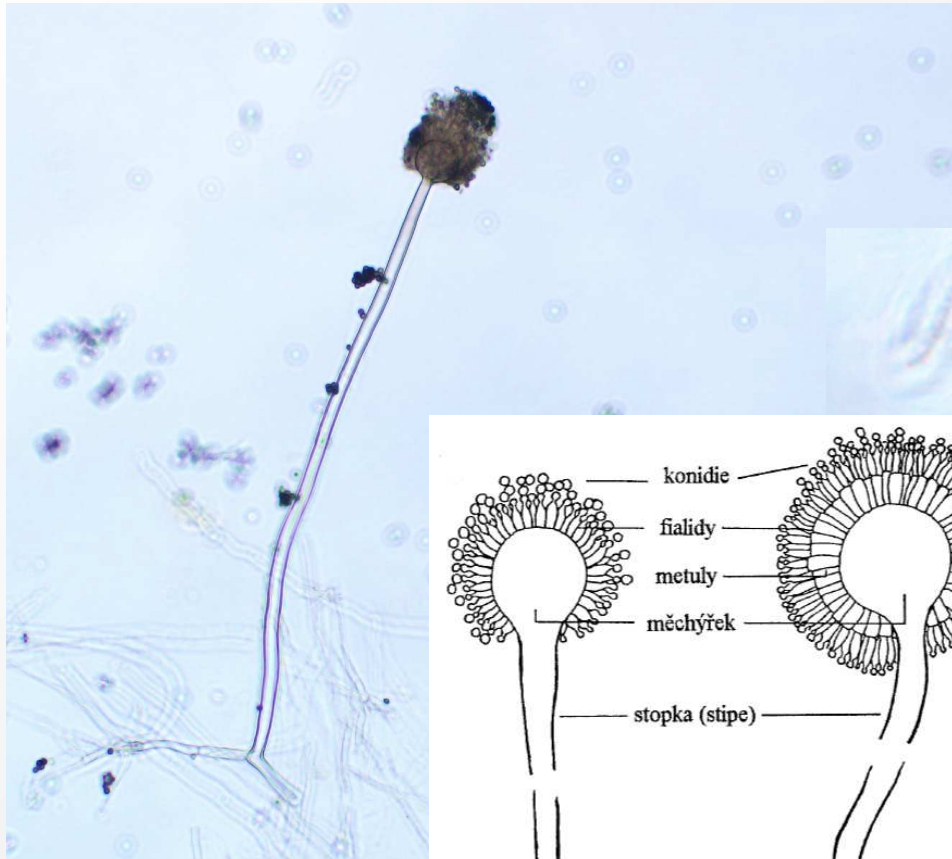
- zástupci rodu *Aspergillus* - popsáno 362 druhů
- ubikvitní saprofyté rozšíření zejména v teplejších oblastech světa (půda)
- častý kontaminant **potravin** a krmiv
- řada druhů osmofilní
- producenti **mykotoxinů** (aflatoxin) poškozujících ledviny a játra, zdrojem jsou zejména arašídý, oříšky kešu, pistácie a sušené plody
- *Aspergillus acidus* - fermentace černého čaje



2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

černý čaj (sypaný)

Aspergillus



Aspergillus niger komplex

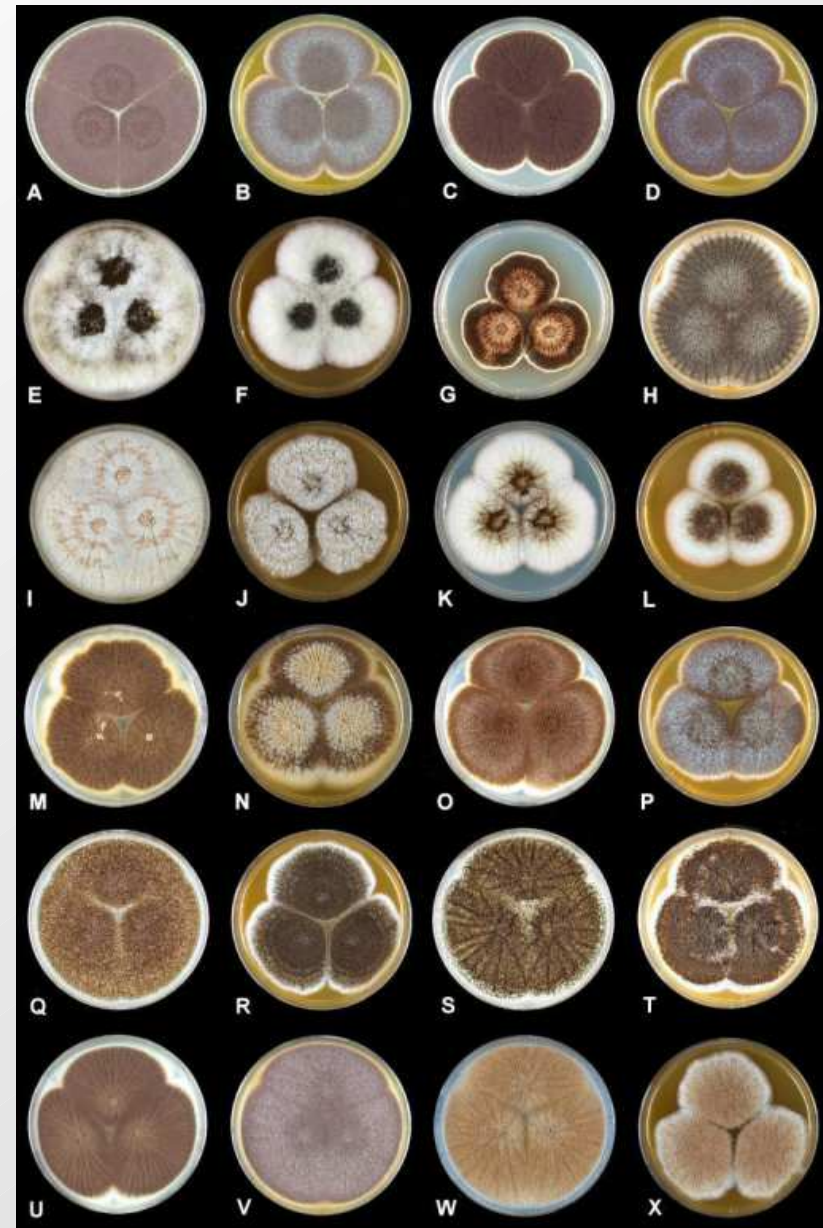


fig1: Colony morphologies of type strains of species assigned to *Aspergillus* section *Nigri* grown on CYA and MEA plates at 25 °C for 7 d. (A-B) *A. aculeatinus*, (C-D) *A. aculeatus*, (E-F) *A. brasiliensis*, (G-H) *A. carbonarius*, (I-J) *A. costaricensis*, (K-L) *A. ellipticus*, (M-N) *A. foetidus*, (O-P) *A. japonicus*, (Q-R) *A. heteromorphus*, (S-T) *A. homomorphus*, (U-V) *A. ibericus*, (W-X) *A. lacticoffeatus*.

2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

Syncephalastrum

Fungi, Mucoromyceta, Mucoromycota, Mucoromycotina, Mucoromycetes, Mucorales, Syncephalastraceae



černý čaj (sypaný)



sporogenní hlavice

c) merosporangia



Penicillium

Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae

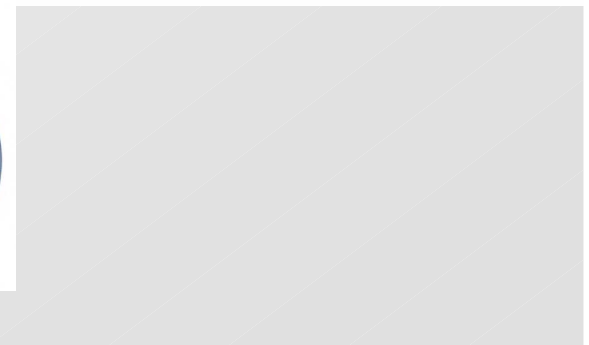
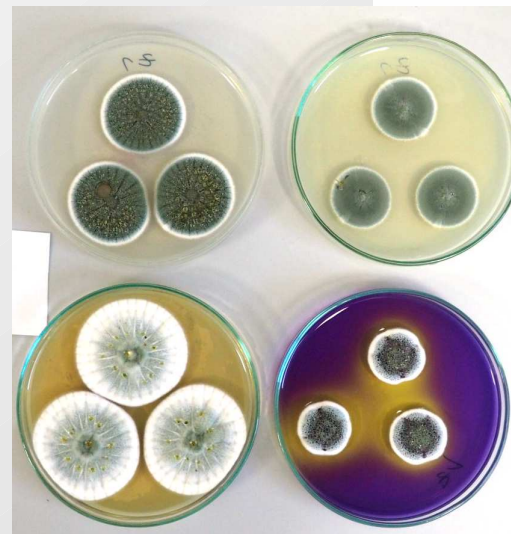
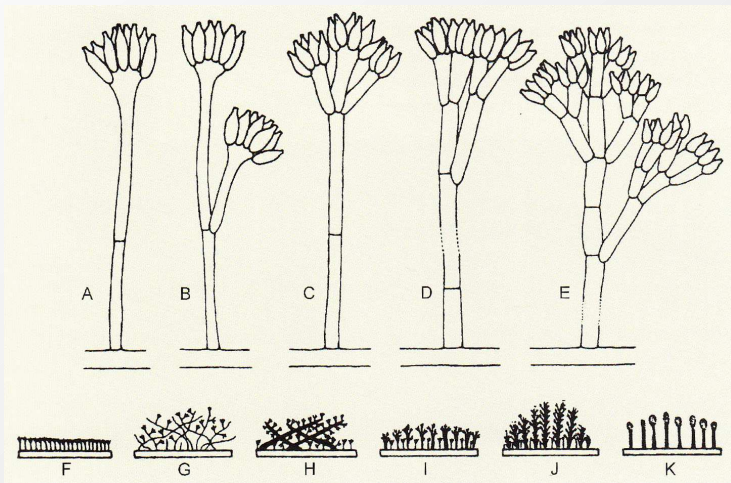
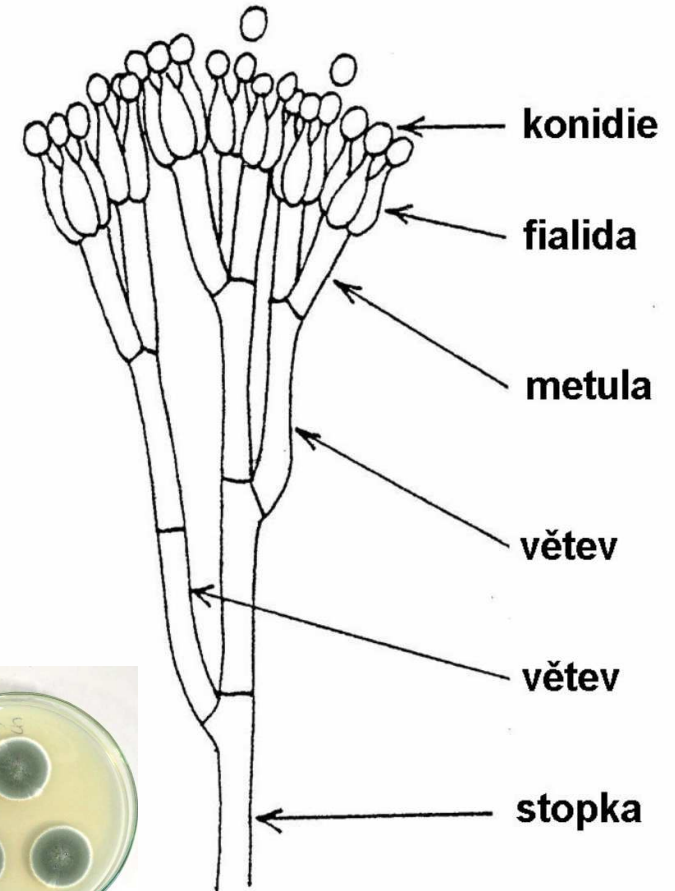
- cca 350 druhů
- ubikvitní saprofyté celosvětově rozšíření, jsou přítomny v půdě, ve vzduchu, v rostlinných i živočišných zbytcích
- producent mykotoxinů a mnoha dalších extrolitů (ochratoxin A, citrinin, patulin)
- alergenní
- využití: startovací kultury k výrobě sýrů (*P. camemberti* syn. *P. candidum*, *P. roqueforti*), výroba antibiotika penicilínu, *P. nalgiovense* – fermentované uzeniny

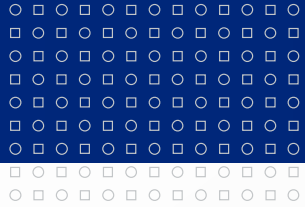


Penicillium

Mikroskopické znaky

- ❏ nepohlavní stádium – štětičkovité konidiofory, konidie
- ❏ pohlavní stádium - charakteristické tvorbou drobných plodnic
- ❏ hodnotí se stavba konidioforu

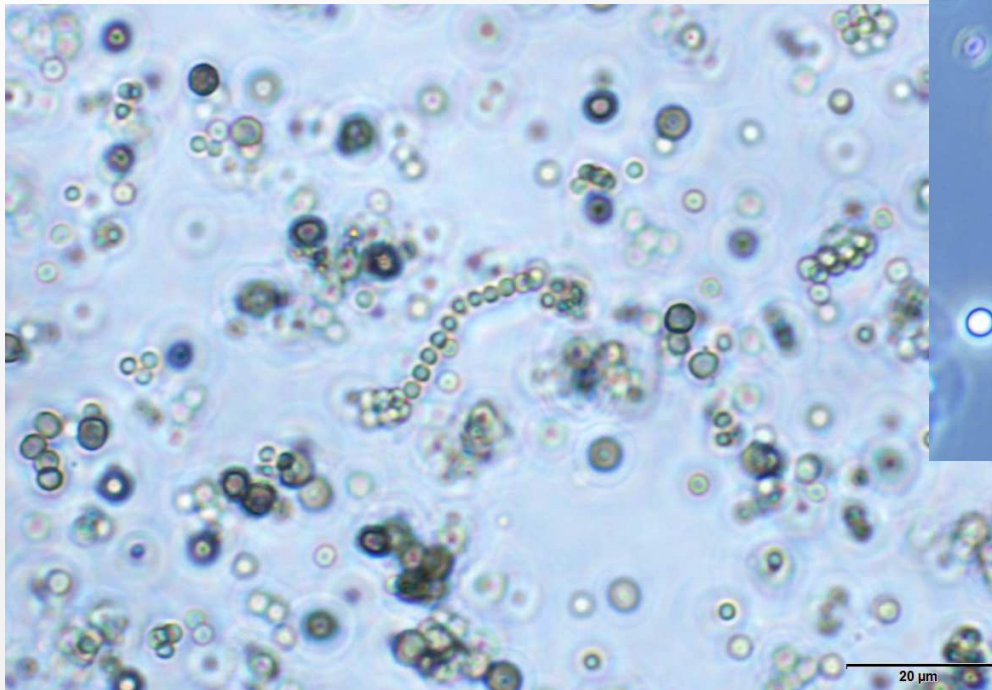




2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

černý čaj (sypaný)

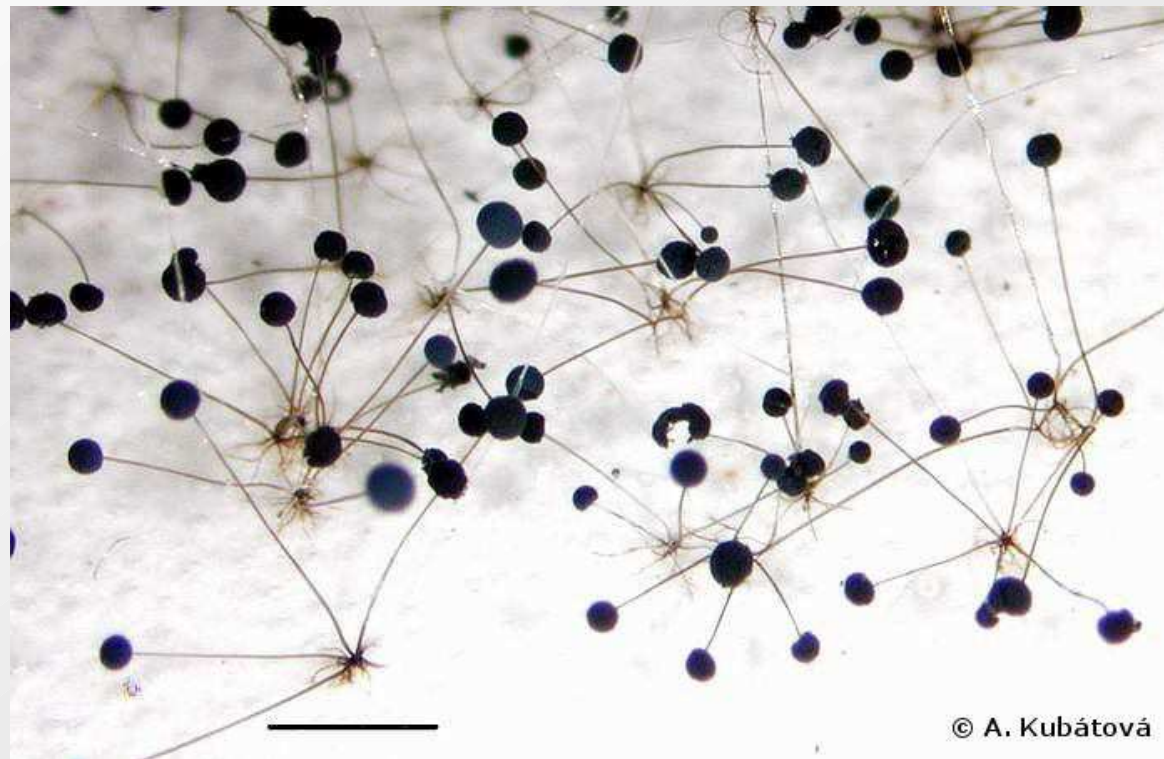
Penicillium sp.



Rhizopus

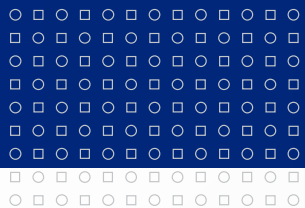
Fungi, Mucoromyceta, Mucoromycota, Mucoromycotina, Mucoromycetes, Mucorales, Mucoraceae

- ☒ stolony, svazečky nevětvených sporangioforů, rhizoidy
- ☒ deštníkový tvar kolumely po rozpadu sporangia

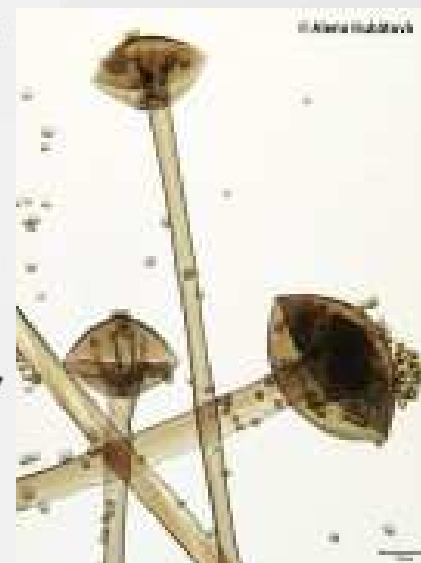
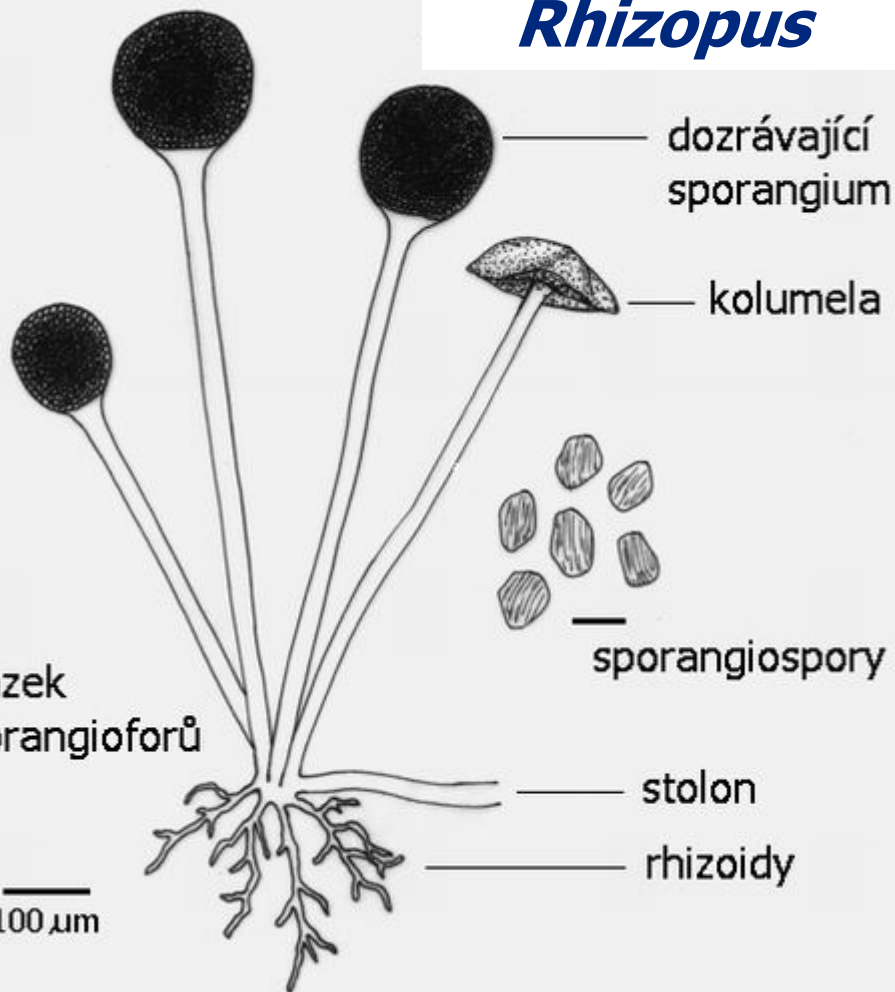


© A. Kubátová

<http://botany.natur.cuni.cz/en/taxonomy/term/121>



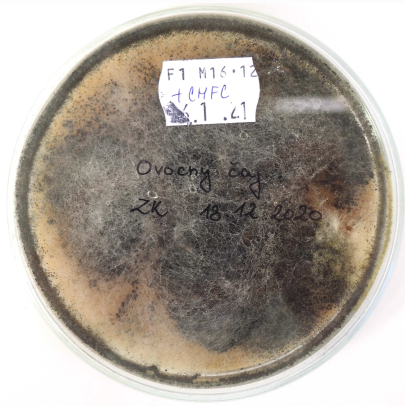
Rhizopus



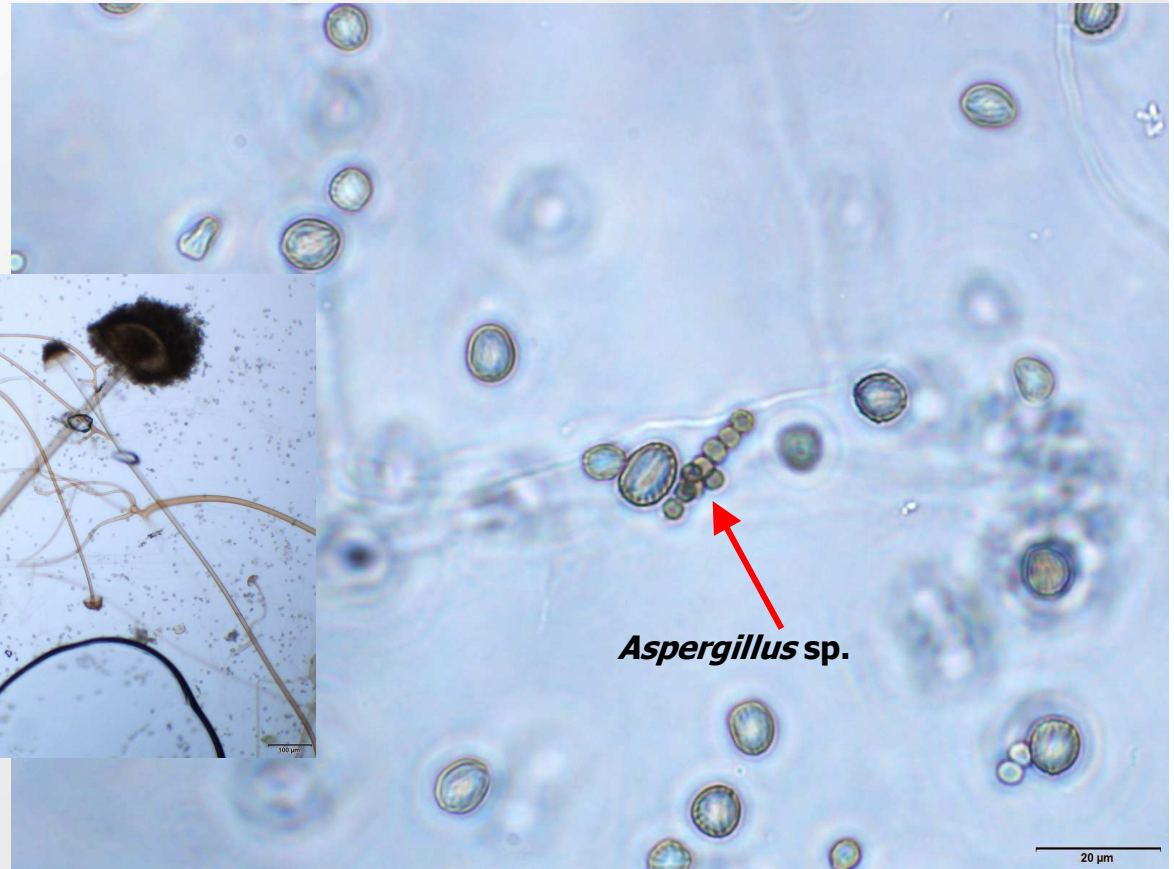
<http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniAtlas/rhi.htm>

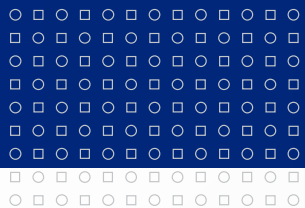
FOTO: <http://botany.natur.cuni.cz/en/taxonomy/term/121>

2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu



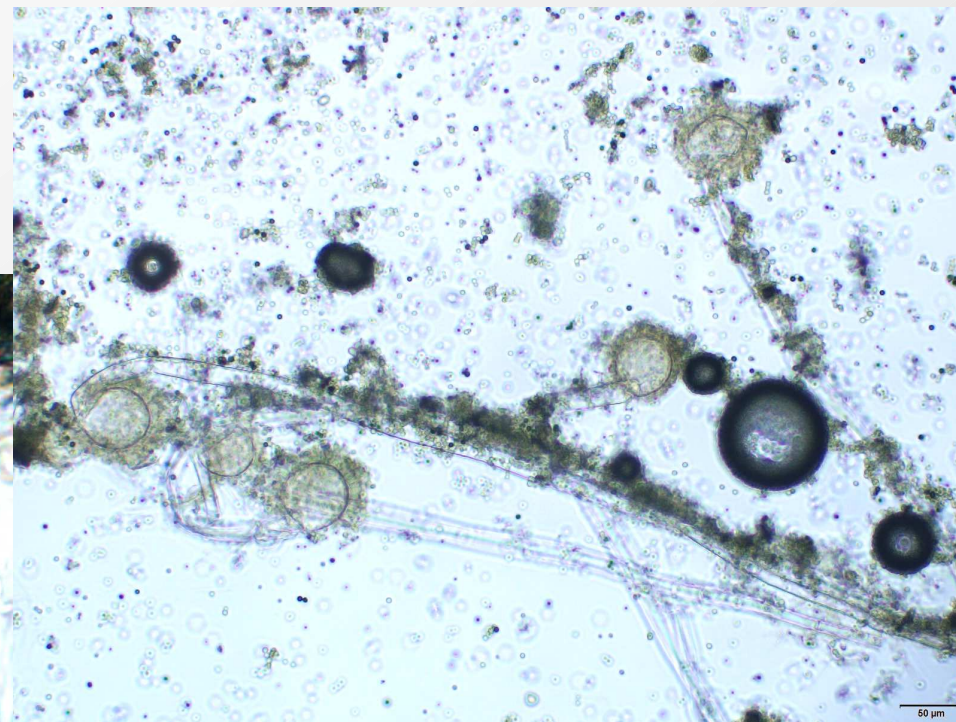
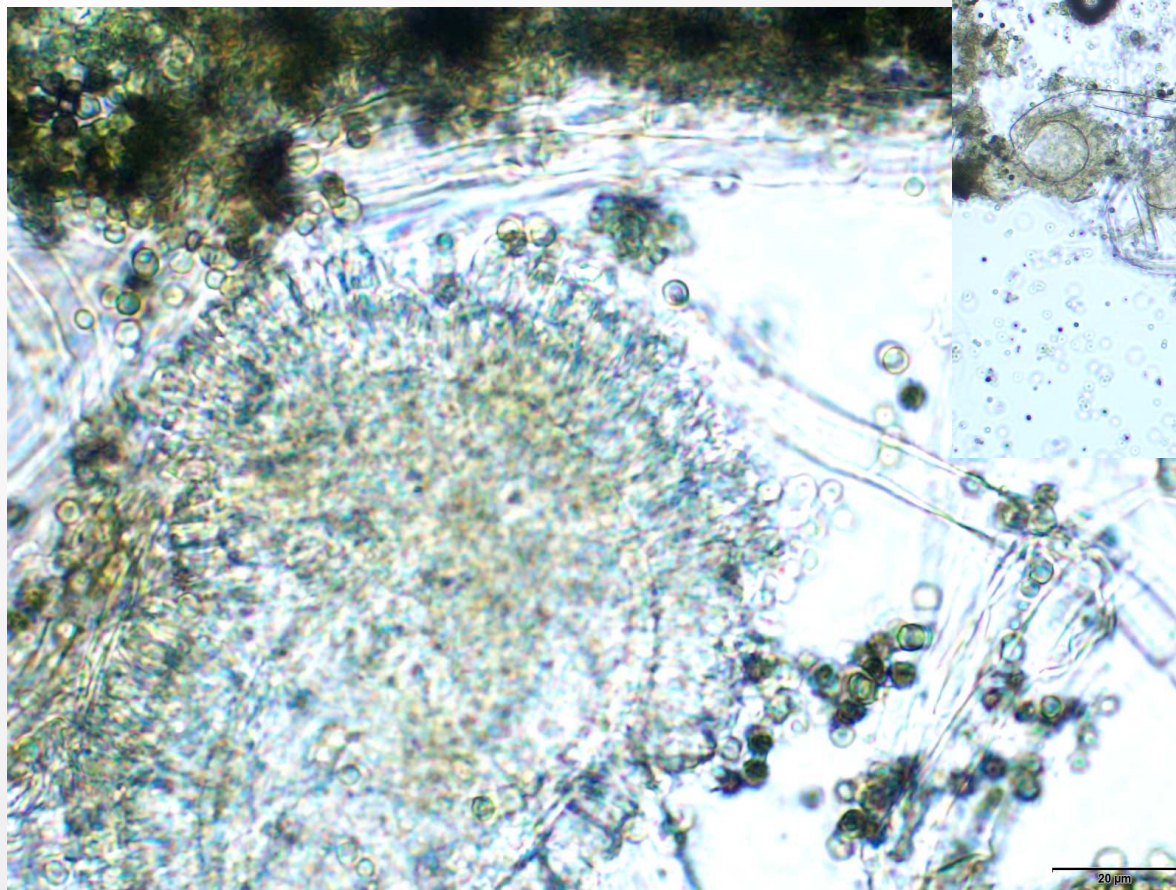
ovocný čaj





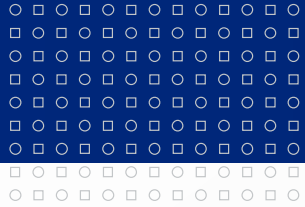
2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

Aspergillus sp.



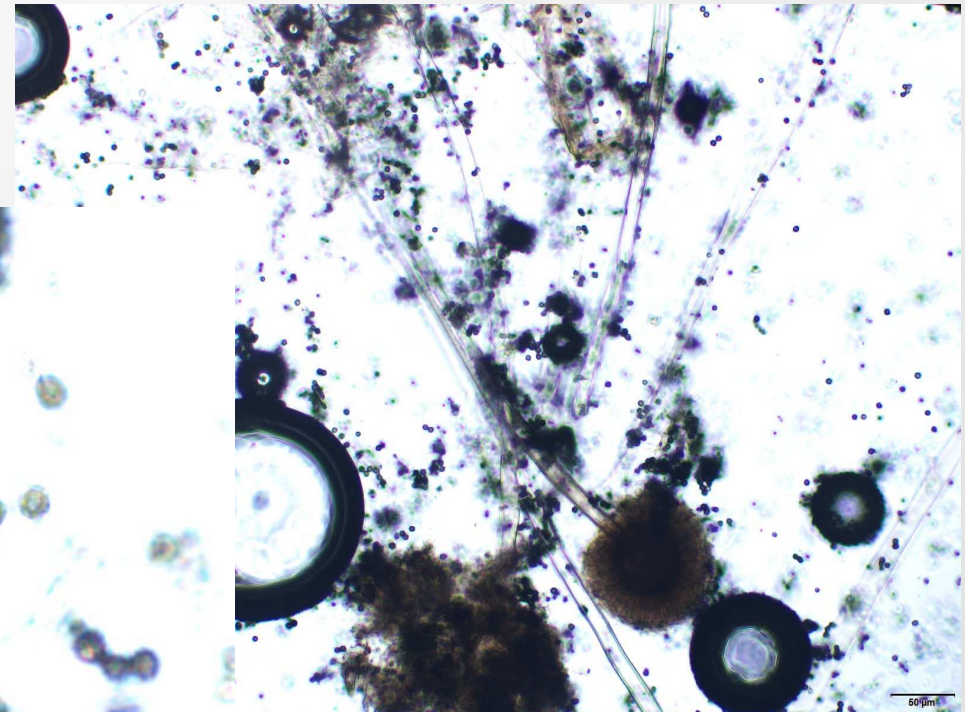
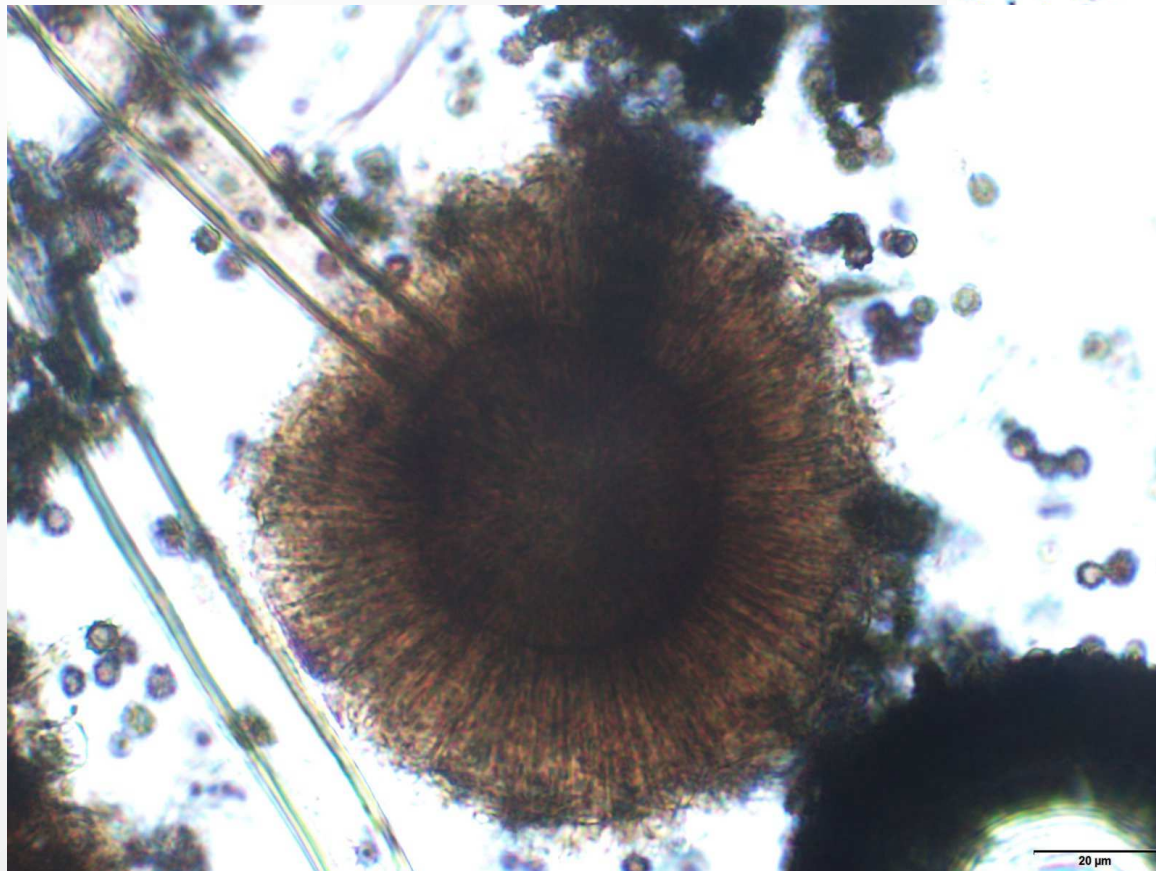
ovocný čaj





2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

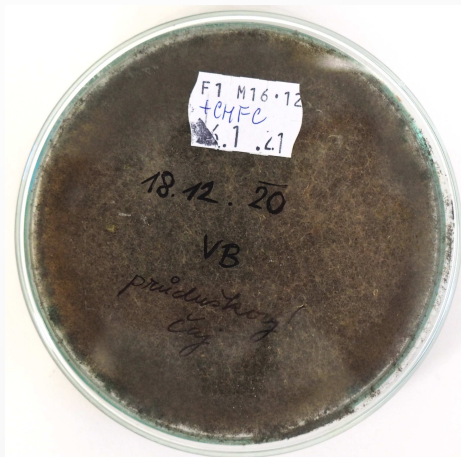
Aspergillus sp.



ovocný čaj



2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

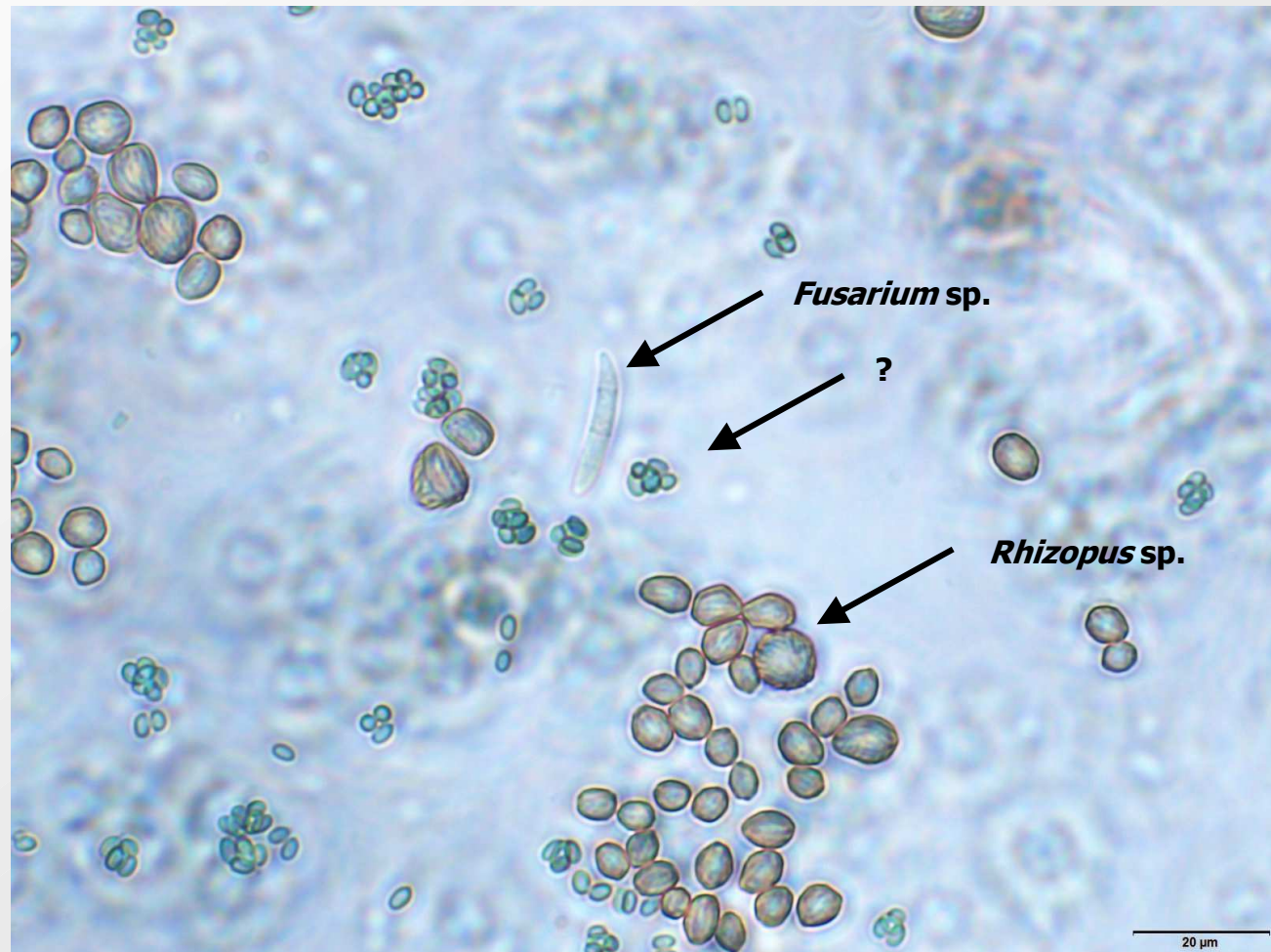
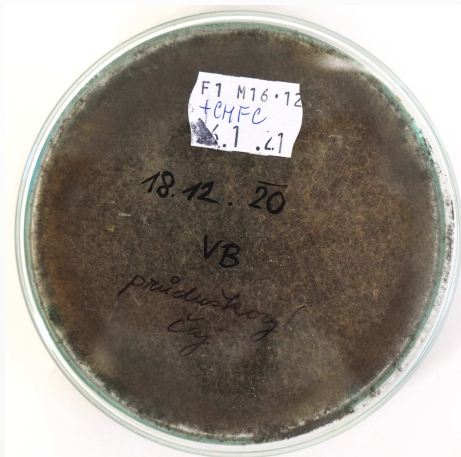


průduškový čaj



2. Izolace mikroskopických hub – metoda přímého výsevu

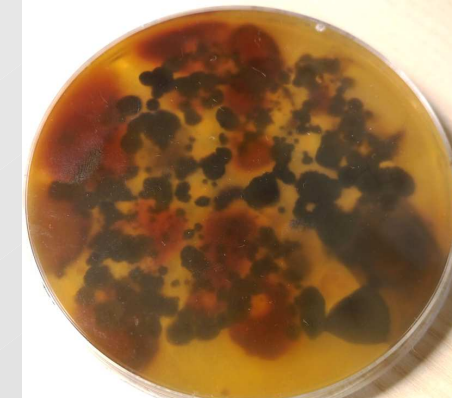
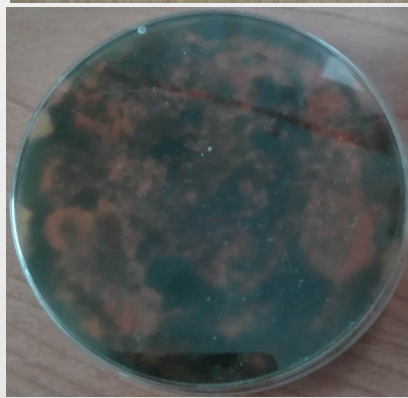
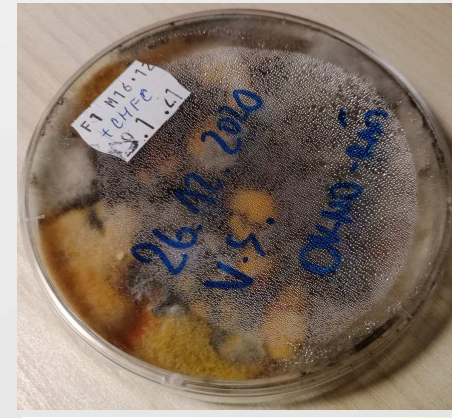
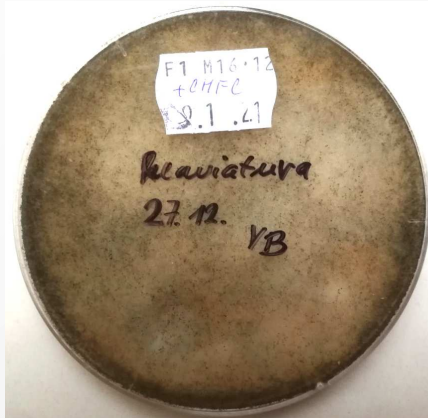
průduškový čaj



Metody izolace mikroskopických hub

3. Izolace mikroskopických hub stěrem z prostředí

VS	okenní rám	žlutooranžové kolonie – <i>Epicoccum</i> ?
ZK	okenní rám	světle zelené kolonie – <i>Penicillium</i>
VB	klaviatura	<i>Rhizopus</i> sp.

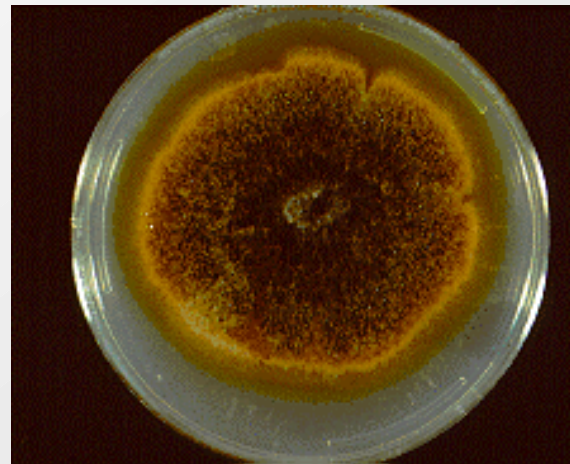
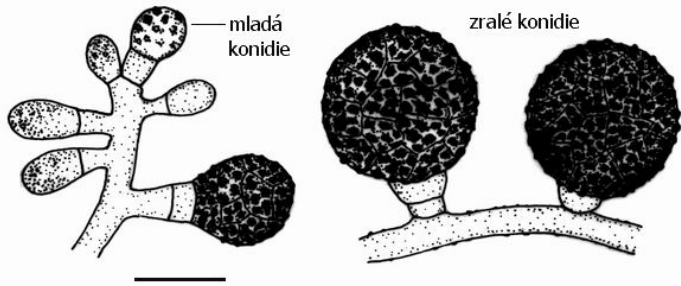


Houby vnitřního prostředí „indoor fungi“

Epicoccum

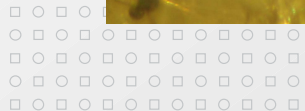
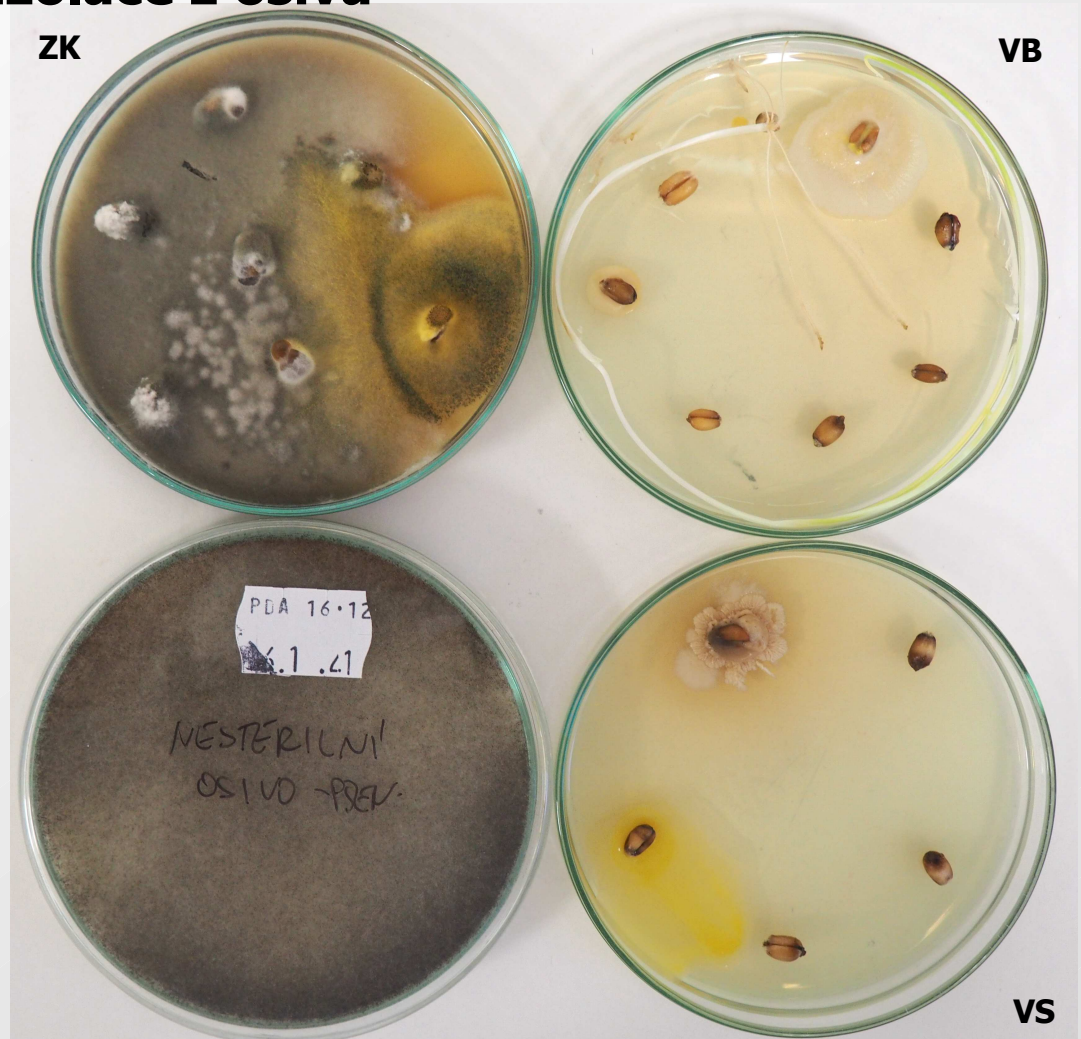
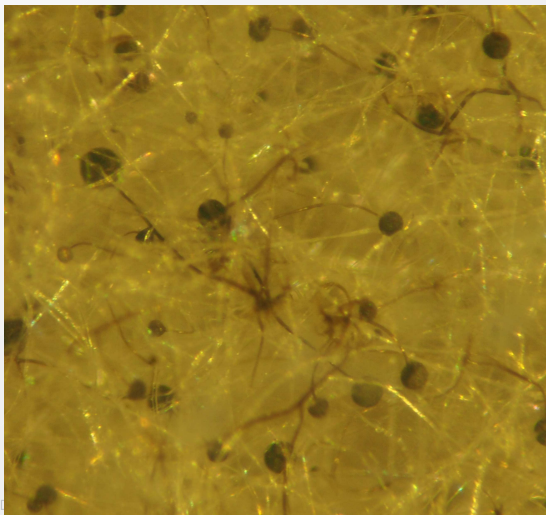
Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Didymellaceae

Epicoccum nigrum



Metody izolace mikroskopických hub

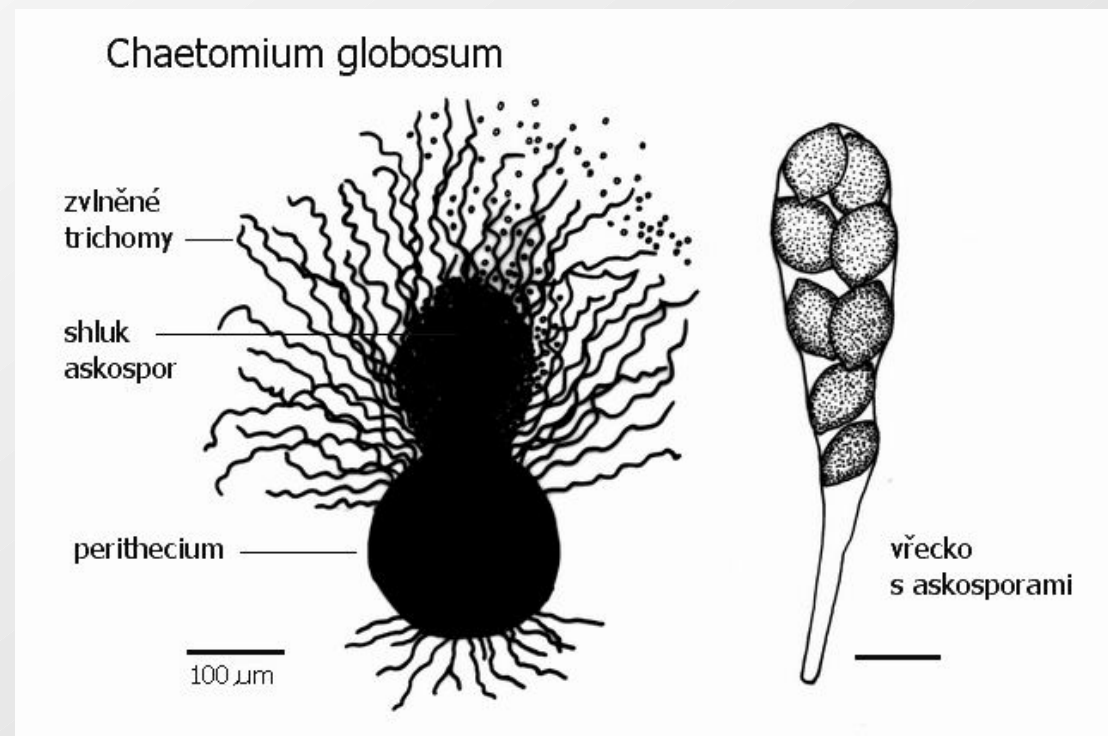
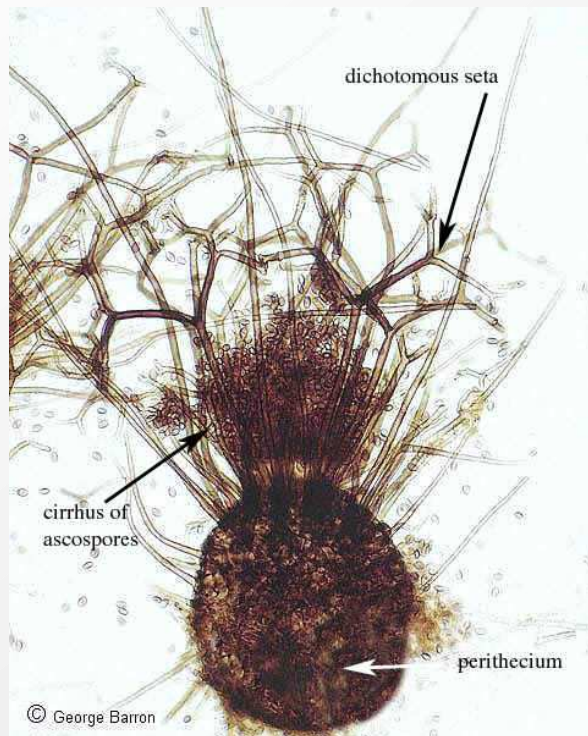
4. Izolace z osiva



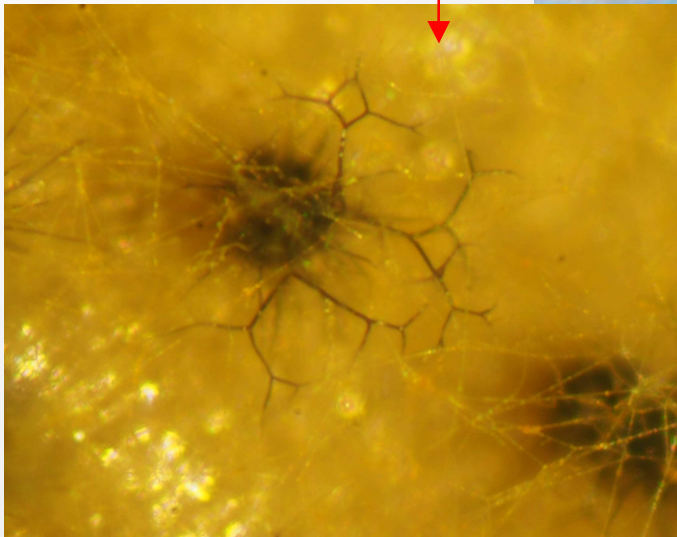
Chaetomium

Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Sordariomycetidae, Sordariales, Chaetomiaceae

- ☒ výskyt na potravinách a krmivech rostlinného původu, na výrobcích s celulózou a v půdě
- ☒ plodnice – perithecia s trichomy (sety)



4. Izolace z osiva



Fusarium

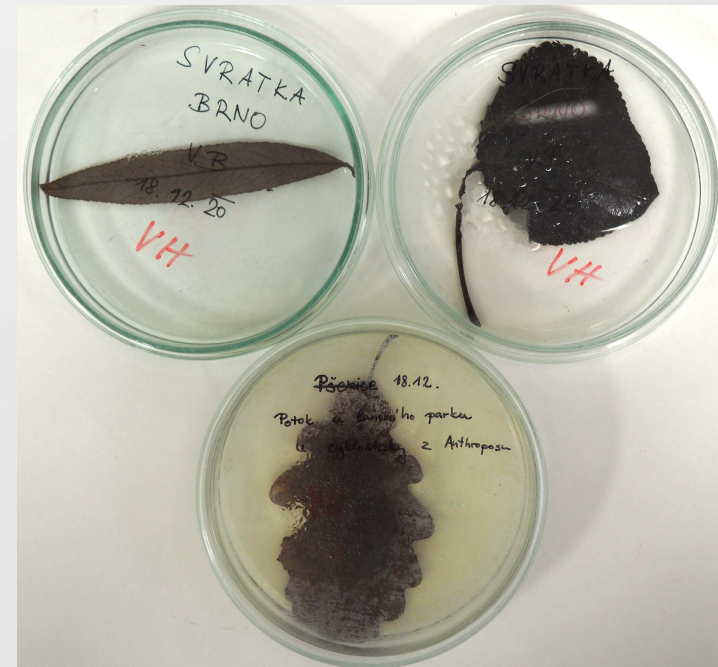
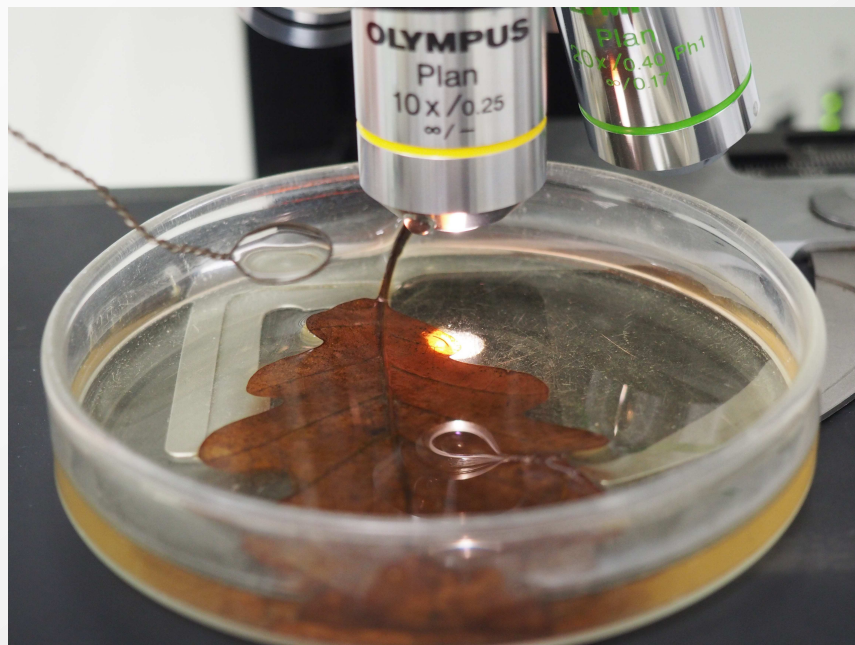
Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Hypocreales, Nectriaceae



Metody izolace mikroskopických hub

5. Izolace vodních hyfomycet

VS		-
ZK	Potok u lanového centra (cyklostezka u Anthroposu)	<i>Tetracladium marchalianum</i> , <i>Tricladium sp.</i>
VB	Svratka	<i>Tetracladium sp.</i> , <i>Tricladium sp.</i> , <i>Lemonniera sp.</i> , <i>Tetrachaetum elegans</i>



Vodní hyfomycety

– druhy rostoucí i fruktifikující na substrátech (detrit, dřevo) ponořeném ve vodě (vodní hyfomycety *Anguillospora*, *Articulospora*, *Flagellospora*, *Lunulospora*, *Tetracladium*



http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%95%E3%82%A1%E3%82%A4%E3%83%AB:Clavariopsis_aquatica_01.jpg

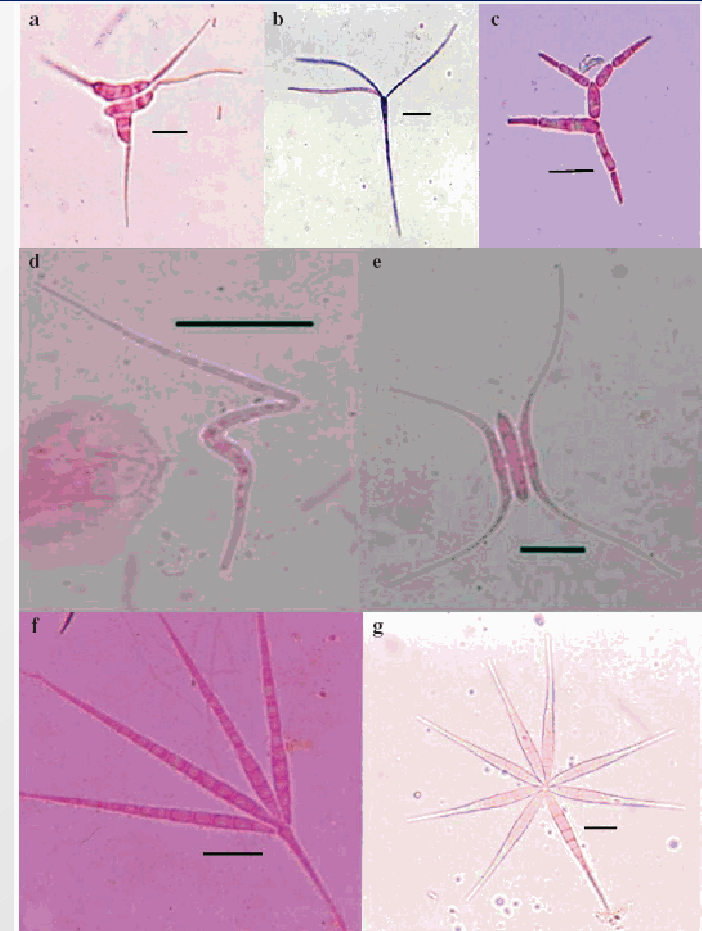
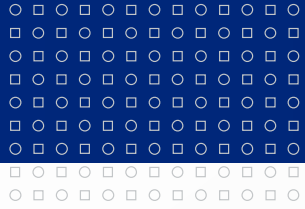


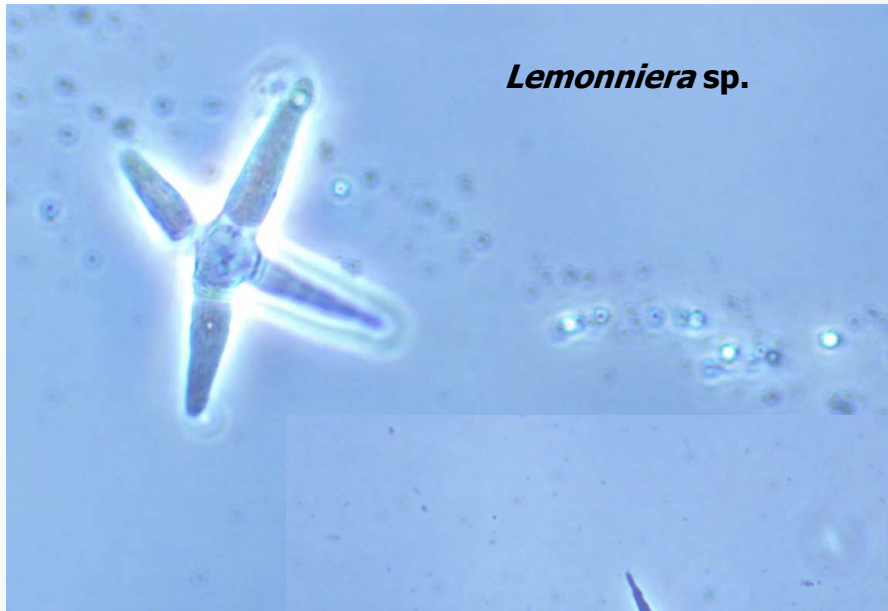
Fig. 1. Conidia of some of the hyphomycetes studied. a. *Campylospora chaetocladia* from Río Tocomo. b. *Clavatospora tentacula*. c. *Phalangispora nawawi* from Río Los Castillos. d. *Condylospora flexuosa* from Quebrada Guatopo. e. *Hydrometrospora symmetrica* from Quebrada Guatopo. f. *Isthmotricladia gombakiensis* from Quebrada Martinera. g. *Flabellospora verticillata* from Río Tocomo. Scale = 10 µm.

http://www.scielo.org/ve/scielo.php?pid=S0084-59062007000200005&script=sci_arttext



Svratka

5. Izolace vodních hyfomycet



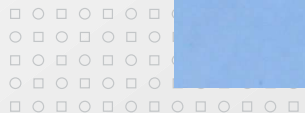
Lemonnierea sp.

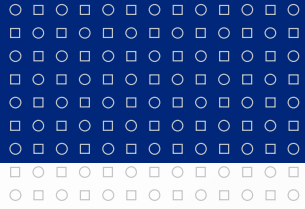


Tetrachaetum sp.



Tetracladium sp.





Svratka

5. Izolace vodních hyfomycet



***Alternaria* sp.**
– nepatří mezi vodní hyfomycety

20 µm



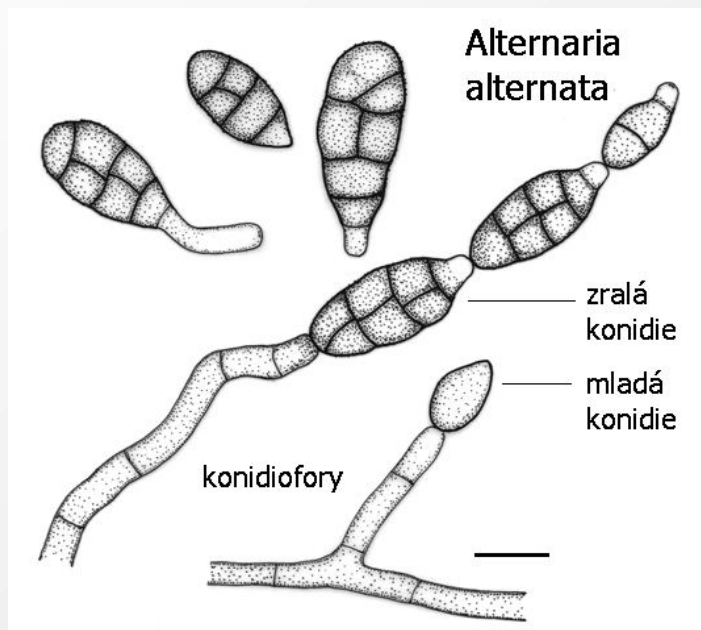
***Tricladium* sp.**

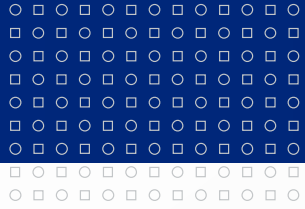
20 µm

Alternaria

Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Pleosporaceae

- ▣ ubikvitní, saprofytický rod
- ▣ ***Alternaria alternata***
- ▣ kolonie olivově šedé, šedobílé, šedé až černé, reverz šedý až černý
- ▣ vícebuněčné, hnědé konidie (porokonidie) uspořádány v řetězcích, hladké nebo bradavičnaté

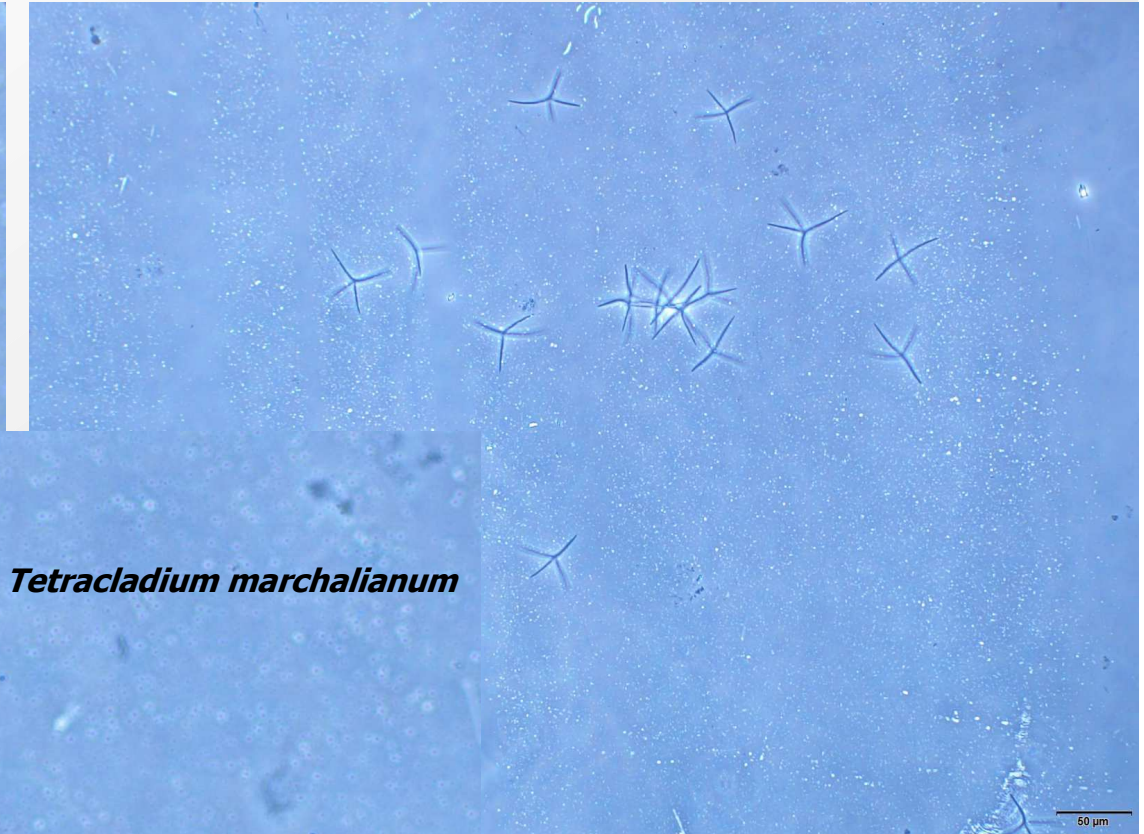
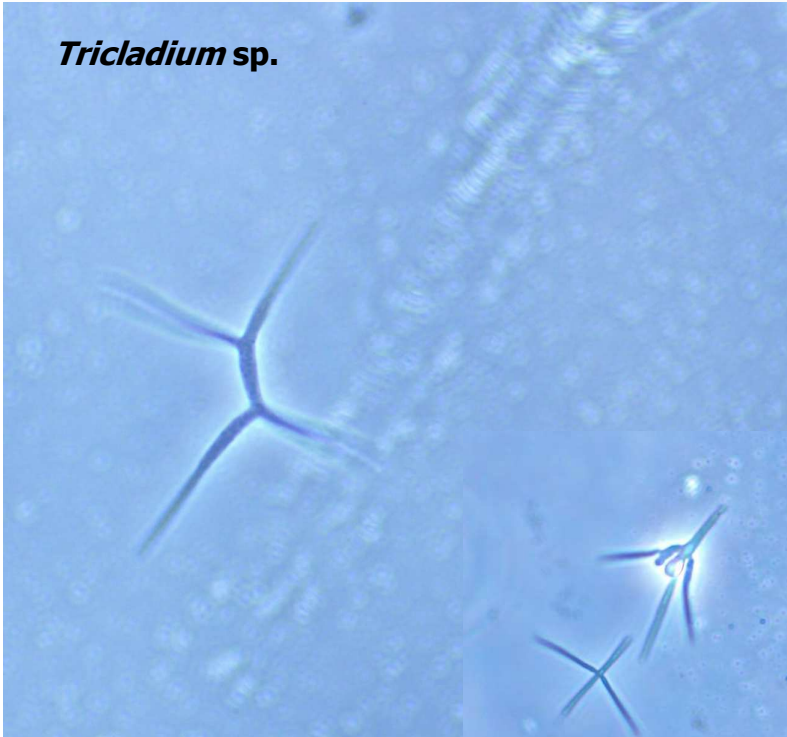




park Anthropos

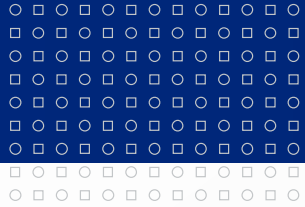
5. Izolace vodních hyfomycet

Tricladium sp.

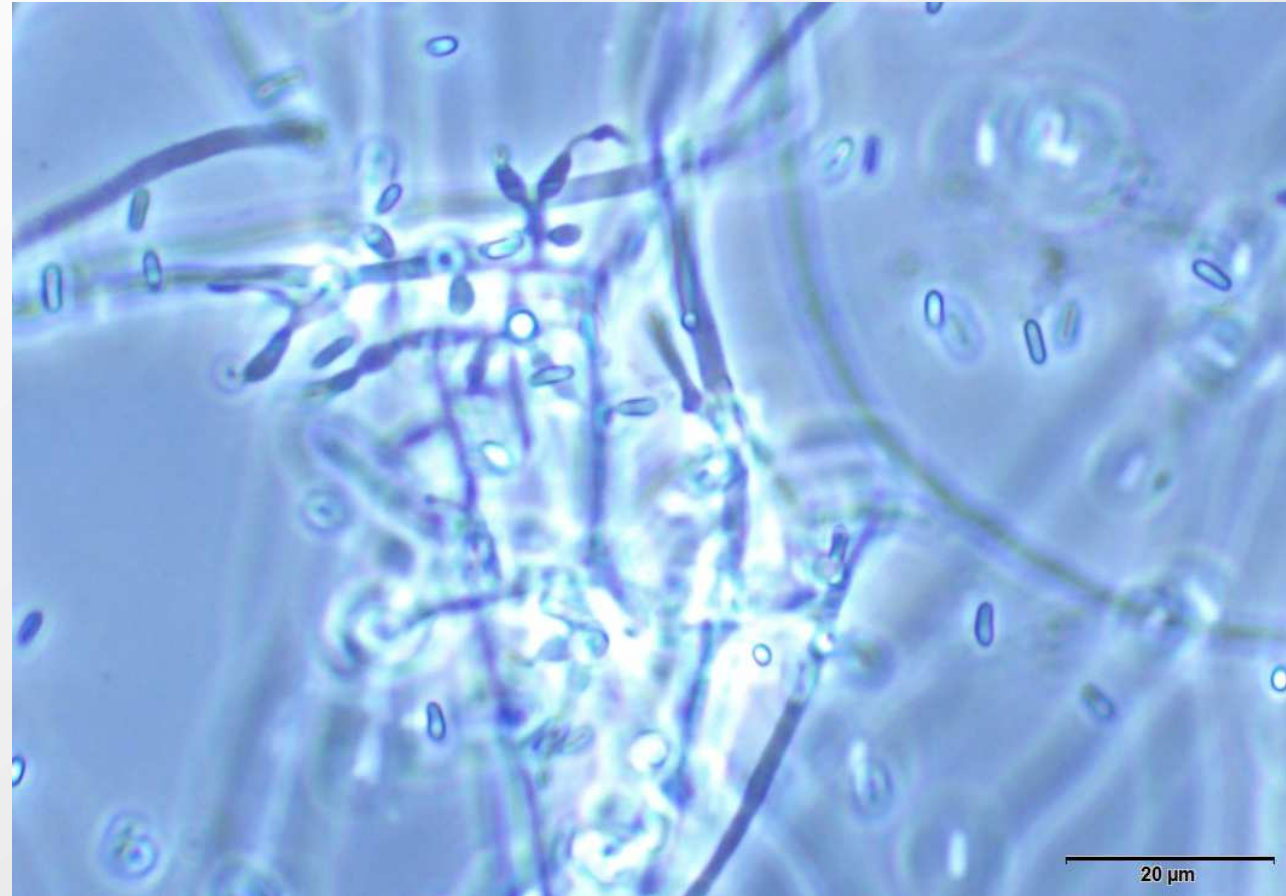
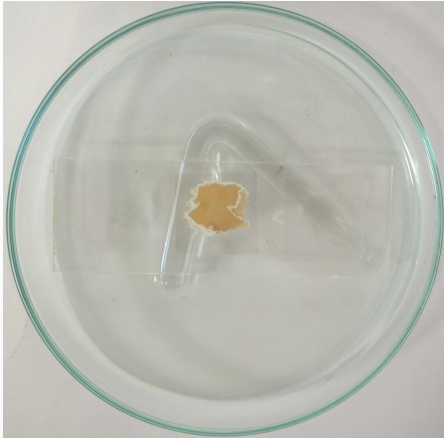


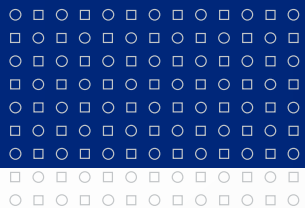
Tetracladium marchalianum



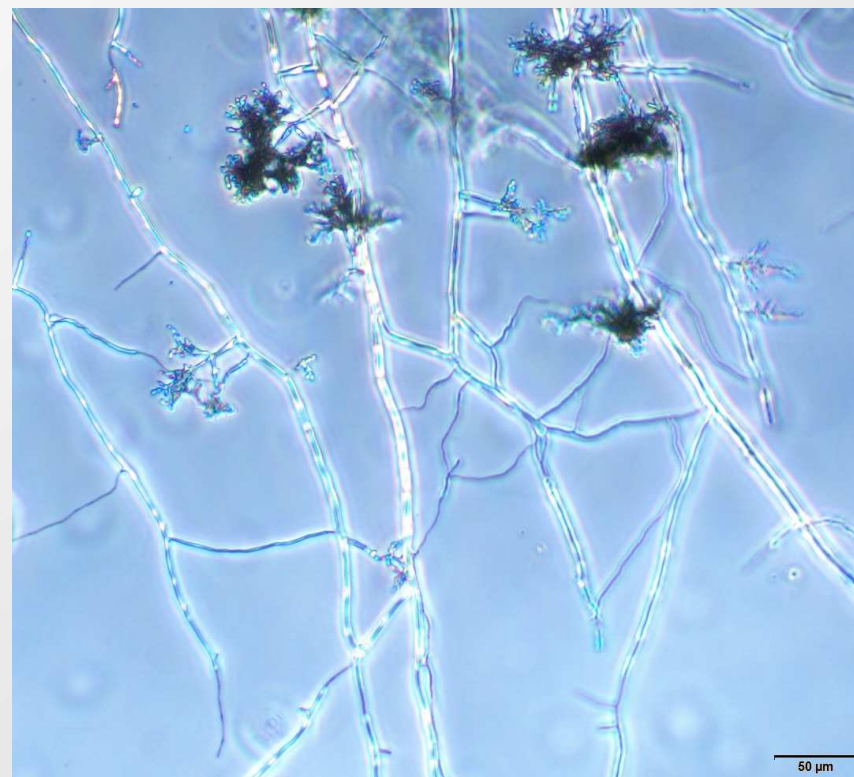
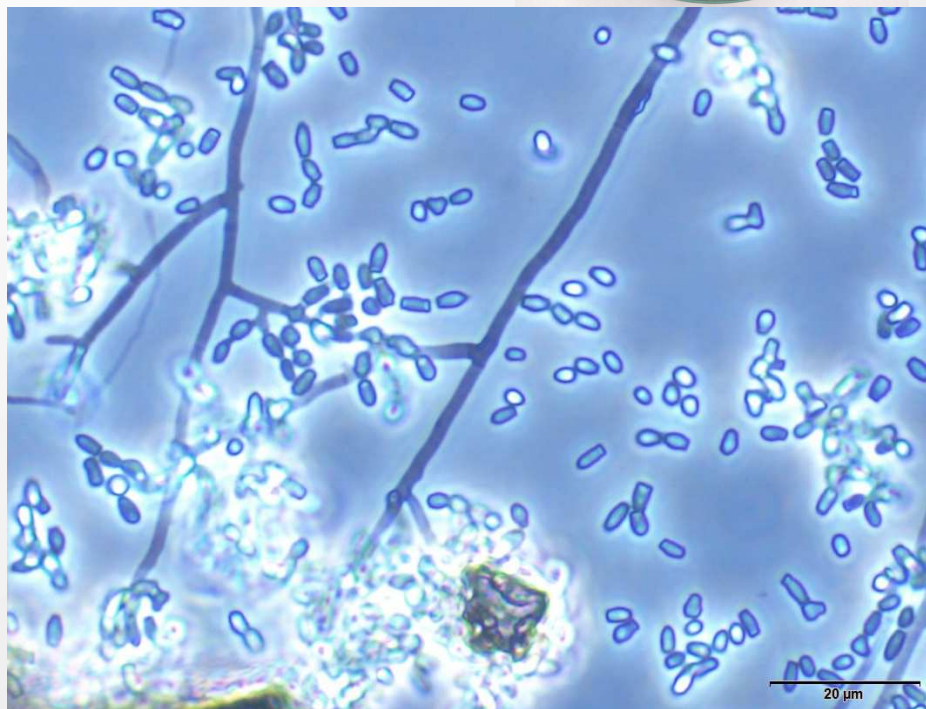
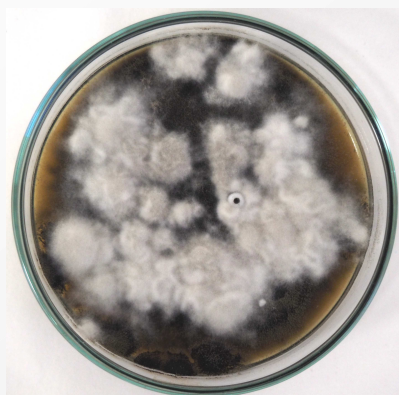
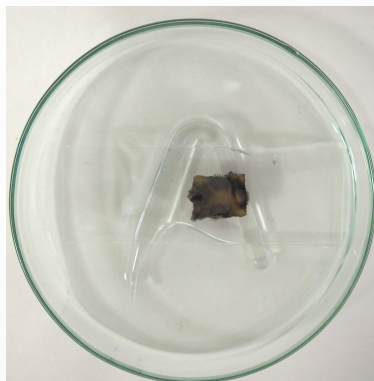


6. Mikrokultura (sklíčková kultura č.1)

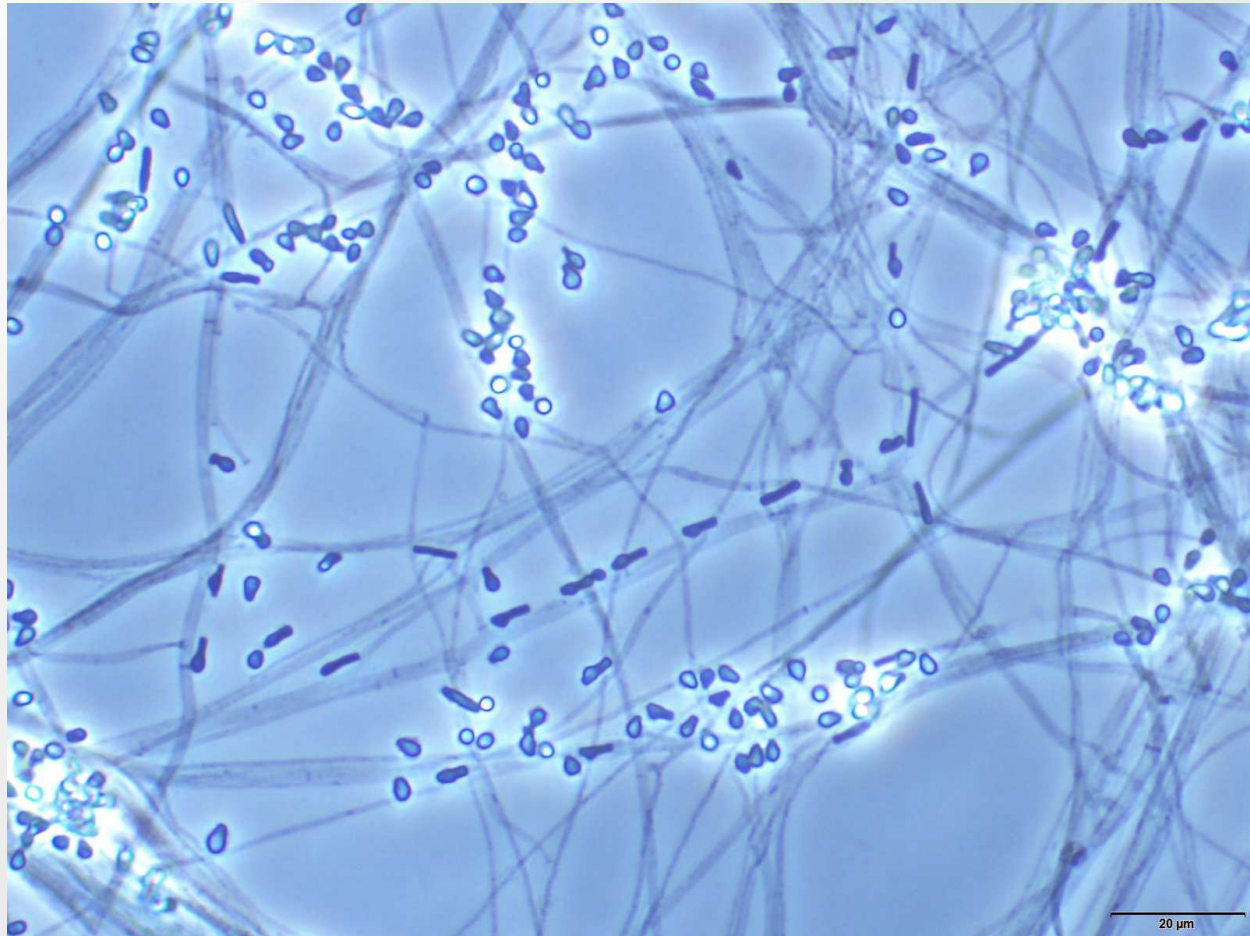
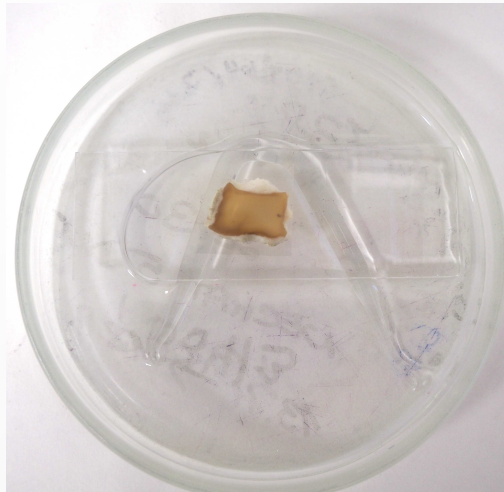


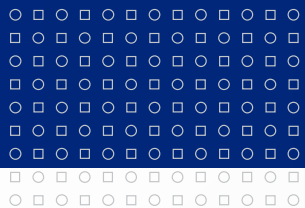


6. Mikrokultura (sklíčková kultura č.2)



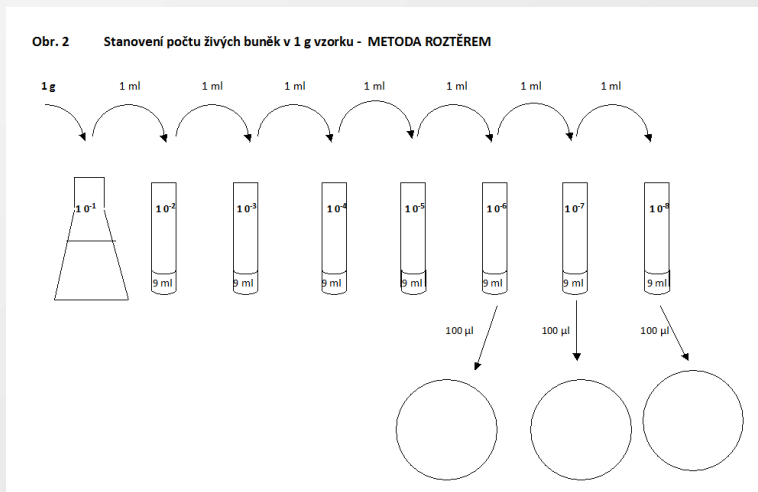
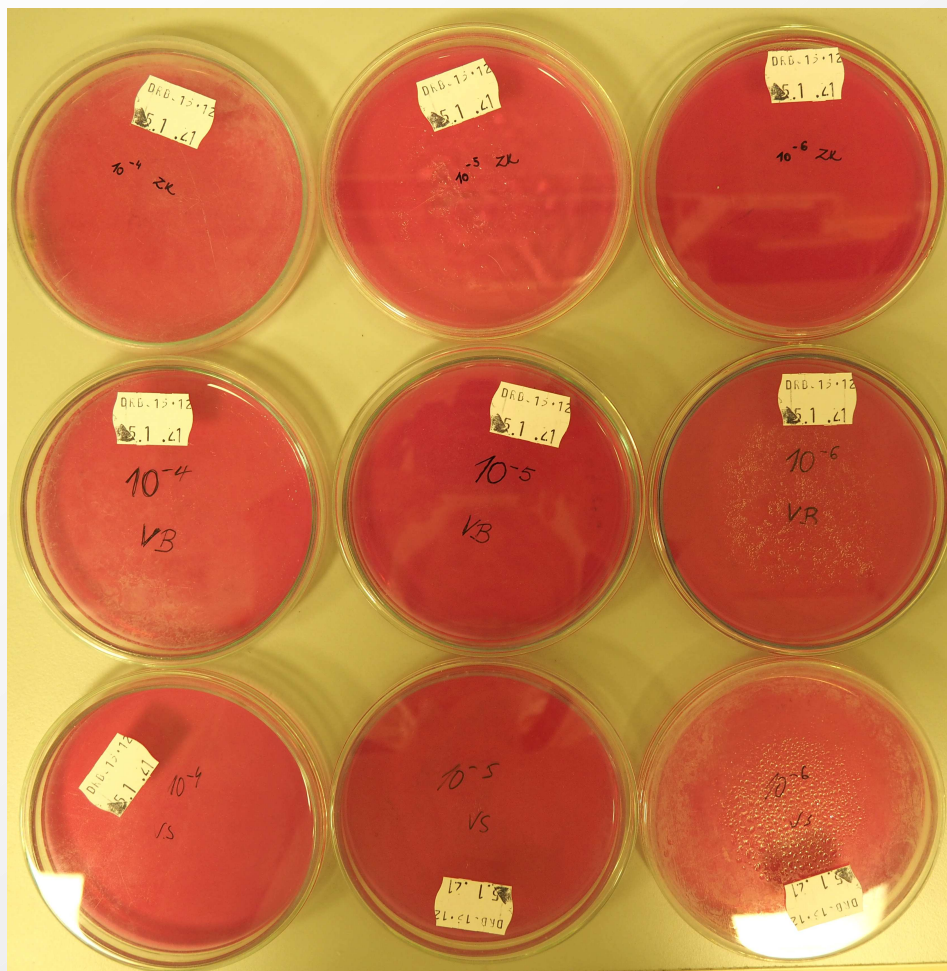
6. Mikrokultura (sklíčková kultura č.3)



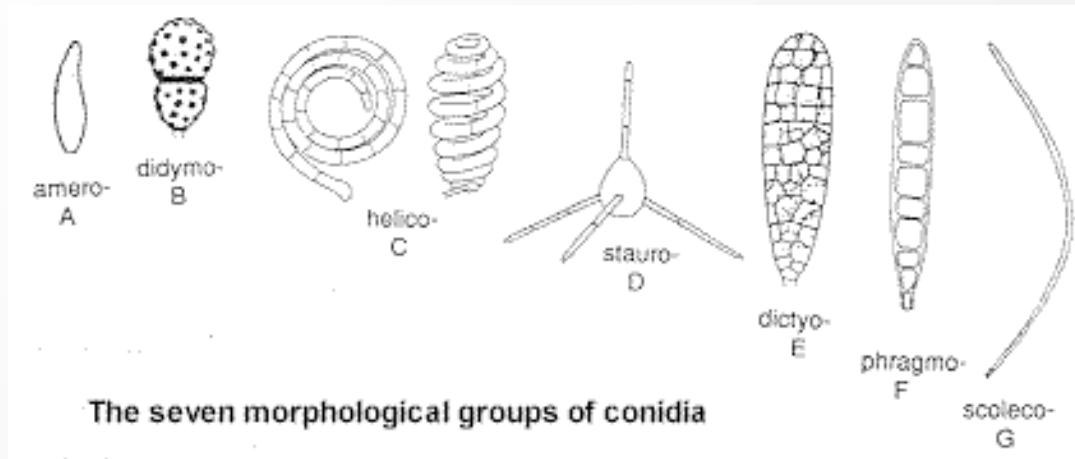


Metody izolace mikroskopických hub

7. Rozbor vzorku půdy metodou desetinasobného ředění

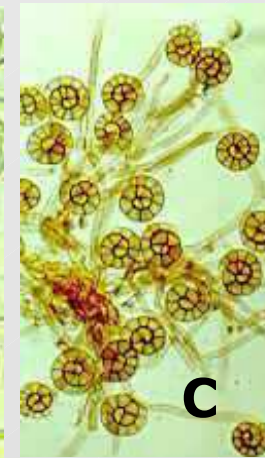
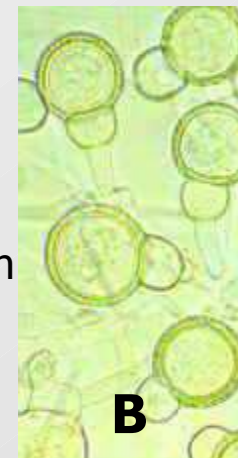


Morfologické skupiny konidií



- A) Amerokonidie** – jednobuněčné
- B) Didymokonidie** – dvoubuněčné
- C) Helikokonidie** – stočené do spirály
- D) Staurokonidie** – hvězdicovité
- E) Diktyokonidie** – vícebuněčné, dělené ve více směrech
- F) Fragmokonidie** – vícebuněčné v jedné řadě
- G) Skolekokonidie** – dlouhé, tenké

<http://www.mycolog.com/CHAP4a.htm>



Techniky přípravy mikroskopických preparátů

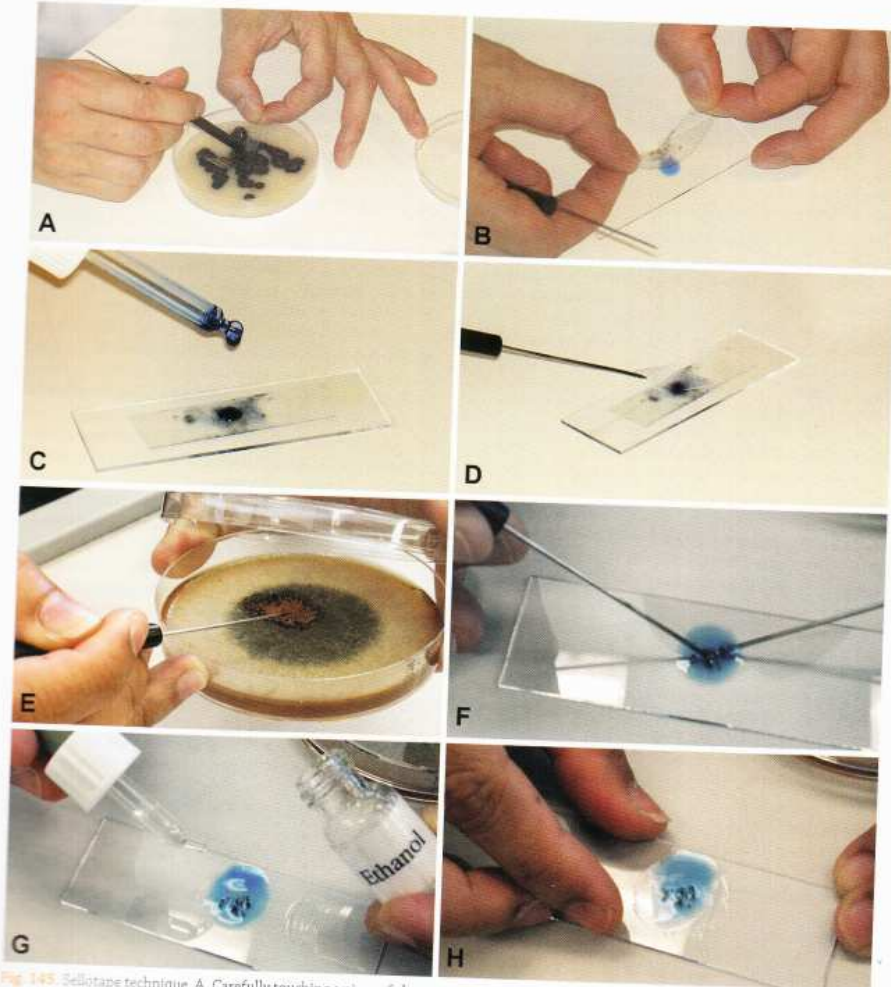


Fig. 145. Sellotape technique. A. Carefully touching a piece of clean tape to the young, sporulating colony. B. Mounting the tape in cotton blue (best in Shear's mountant). C. Adding a second drop of mountant. D. Adding a cover slip (also try this without steps C & D for better microscopic clarity, but be sure to use a larger piece of tape). E. Removing conidiophores from the edge of the colony. F. Mounting in cotton blue. G. Adding a drop of ethanol to disperse conidia. H. Covering with a cover slip.

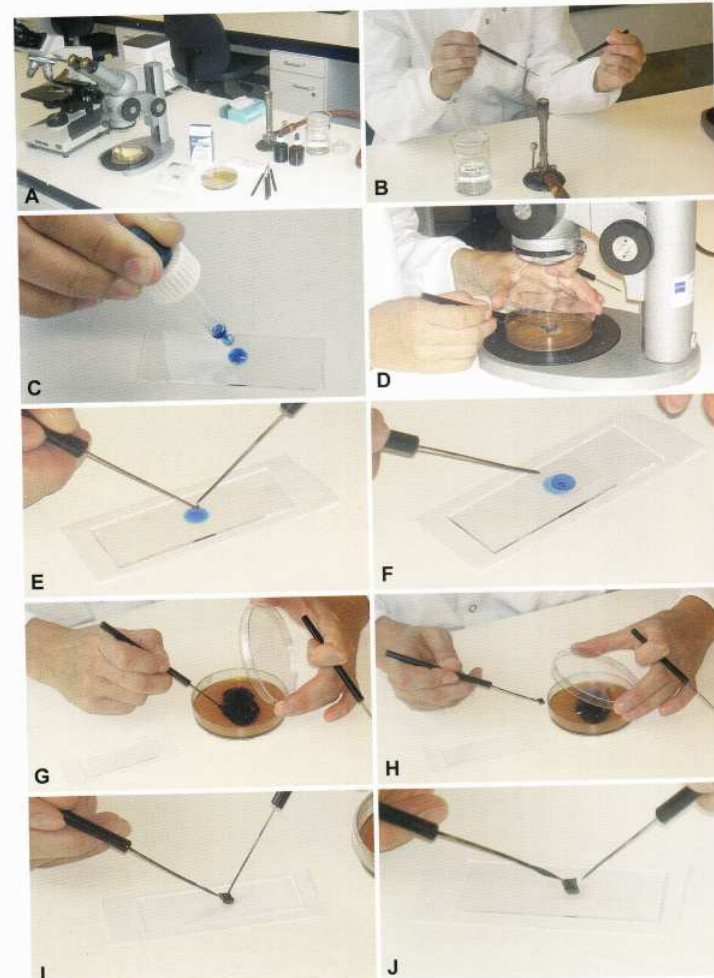


Fig. 144. Slide preparation for microscopic examination. A. Dissection microscope, needles, slides and stains. B. Sterilisation of needles. C. Adding a drop of stain to a microscope slide. D. Carefully removing fungal material from the culture to be investigated. E. Placing material in the stain. F. Carefully lowering the cover slip. G, H. Removing an agar block. I. Mounting the agar block. J. Covering the block with a cover slip.

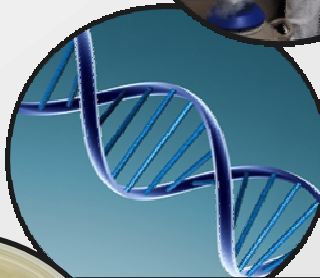
Jak studovat mikroskopické houby

- ☐ izolace
- ☐ získání axenické (čisté) kultury
- ☐ detailní studie mikroskopických struktur hub
- ☐ zhotovení přesného popisu struktur s nákresem
- ☐ získání DNA sekvence (ITS - Internal Transcribed Spacer region) pro počáteční porovnání s on-line databázemi
- ☐ srovnání výsledků s literaturou pro identifikaci
- ☐ v mnoha případech je nezbytné pro správnou identifikaci srovnání se správně identifikovanou sbírkovou kulturou

Uchovávání



Analýza DNA



Makromorfologie



Mikromorfologie



Mikroskopie



Nativní preparát

Izolace

