

Prírodovedecká fakulta

Základné prístupy v identifikácii mikroskopických húb

doc. RNDr. Helena Bujdáková, CSc.



Univerzita Komenského v Bratislave

2017

Adresa autora:
doc. RNDr. Helena Bujdaková, CSc.
Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta
Katedra mikrobiológie a virológie
Ilkovičova 6
842 15 Bratislava

E-mail: helena.bujdakova@uniba.sk

© Helena Bujdaková, 2017

ISBN 978-80-223-4378-7

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave vo Vydavateľstve UK

Táto učebnica je výsledkom realizácie projektu (ITMS 26240120027) podporeného operačným programom Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Obsah

Úvod	4
1. História štúdia mikroskopických húb a ich rozšírenie	5
2. Izolácia, transport, uchovávanie a zásady bezpečnosti práce s mikroskopickými hubami	15
3. Základy systematiky	19
4. Rozmnožovanie nižších a vyšších mikroskopických húb	25
5. Morfológia a tvorba fruktifikačných orgánov kvasiniek	30
6. Morfológia a tvorba fruktifikačných orgánov mikroskopických vláknitých húb	35
7. Dermatofyty	41
8. Základy lekárskej mykológie	48
9. Rozpisy pôd a roztokov	56
10. Literatúra	60

Úvod

Učebné texty "Základné prístupy v identifikácii mikroskopických húb" obsahujú základnú charakteristiku mikroskopických húb z oddelení *Glomeromycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. Okrem nepatogénnych druhov sú učebné texty zamerané na podmienené patogénne mikroskopické huby, a to nielen na všeobecnú charakteristiku, ale aj možnosti rutinej identifikácie. Veľký priestor je venovaný mikroskopickým hubám, pri ktorých sa doteraz nepodarilo potvrdiť pohlavné rozmnožovanie a v systéme sú zaradené na základe výsledkov sekvenačných analýz DNA a RNA. Texty obsahujú aj praktické návody a postupy na identifikáciu kvasiniek, vláknitých húb a dermatofytov. Tvoria súčasť prednášok a praktických cvičení v rámci predmetu „Mikroskopické huby“, ktorý sa prednáša na Katedre mikrobiológie a virológie Prírodovedeckej fakulty UK. Sú určené hlavne pre študentov biológie prírodovedných odborov. Teoretické základy z mykológie, ako aj niektoré praktické prístupy zhrnuté v textoch sú použiteľné aj v iných biologických alebo technických disciplínach. Učebné texty poskytujú dobrý základ pre prácu v rutinnom mykologickom laboratóriu.

Za odbornú stránku učebných textov zodpovedá autorka.

1. História štúdia mikroskopických húb a ich rozšírenie

Mikroskopické huby sú eukaryotické stielkaté mikroorganizmy (*Thallophyta*). Zahŕňajú približne 100 000 známych druhov. Patria medzi najrozšírenejšie organizmy na Zemi, pričom sú významnou zložkou environmentu, ale majú aj medicínsky význam. Sú voľne žijúce v pôde alebo vo vode ako saprofyty, niektoré sú parazitické, iné prežívajú v symbióze s rastlinami či živočíchmi. Huby sú eukaryotické organizmy; ich bunky majú jadro a organely obalené dvojistou membránou. Historicky boli zahrnuté v rámci ríše rastlín. Keďže nemajú chlorofyl a vyznačujú sa niektorými štruktúrnymi či fyziologickými znakmi, ktoré sú charakteristické len pre huby, boli oddelené od rastlín. Okrem toho sa huby jasne odlišujú od všetkých ostatných živých organizmov. Ich stavebnou jednotkou je vlákno (hýfa), ktorých spleť tvorí mycélium. Hýfy sú delené priehradkami alebo sú bez priehradiek. Niektoré mikroskopické huby tvoria plodnice (sporokarp), v ktorých sa tvoria výtrusy. Výtrusy (konídie) môžu vznikáť pri pohlavnom procese alebo majú nepohlavný charakter. Medzi huby patria aj kvasinky, ktoré netvoria mycéliovú formu a sú reprezentované jednotlivými bunkami. Tie môžu pučať rôznym spôsobom. Niektoré kvasinky však môžu formovať aj hýfy. Tieto kvasinky sa považujú za dimorfné. Spôsob života pri väčšine mikroskopických húb je saprofytický alebo parazitický, prípadne zástupcovia niektorých rodov žijú v symbióze s inými organizmami. Okrem pravých húb existujú aj organizmy im príbuzné, napríklad slizovky z oddelenia *Oomycetes* (prežívajú vo vodnom prostredí), ktoré sú zaradené do ríše *Chromista*. V období na konci 19. a začiatku 20. storočia, ktoré sa považuje za zlatý vek mikrobiológie, rozvoj mykológie zaostával. Príčinou bolo tradičné začleňovanie húb do ríše rastlín a praktické potreby spoločnosti boli orientované len na „klobúkaté“ huby ako pochutiny. Z tohto dôvodu je Mykológia ako veda o organizmoch odlišných od rastlín a živočíchov veľmi mladá. V súčasnosti má Mykológia 4 hlavné smery: systematický, technický medicínsky a fytopatologický. Filamentujúce huby a kvasinky sú komerčne využívané pri výrobe potravín a nápojov. Najviac sú známe druhy *Penicillium camembertii* a *Penicillium roquefortii*, ktoré sú dôležité pri dozrievaní syrov. Známa je aj sójová omáčka, ktorá je produktom kvasenia sójových zŕn *Aspergillus oryzae*. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* sa využíva pri výrobe chleba, vína a *Saccharomyces carlsbergensis* je hlavnou kvasinkou vo výrobe piva. V rámci Fytopatológie - náuke o ochoreniach rastlín sa študujú huby, ktoré sú pôvodcami ochorení rastlín, hlavne hospodárskych plodín (*Ustilago maydis* – parazit kukurice). Medicínsky smer v Mykológii zahŕňa Veterinárnu Mykológiu, ktorá

študuje ochorenia zvierat. Ďalším samostatným odborom je Lekárska Mykológia, ktorá skúma ochorenia ľudí a zvierat, ktoré sú prenosné zo zvierat'a na človeka.

Fosílné nálezy mikroskopických húb sú zaujímavé. Hubové vlákna v pletivách najstarších rastlinných fosílií dokazujú, že huby sú veľmi starobylé organizmy. Niektoré z najstarších suchozemských skamenelín podobné rastlinám, známe ako Prototaxites, ktoré boli bežne rozšírené vo všetkých častiach sveta počas obdobia devónu (pred 419,2 - až 358,9 mil. rokov), sú považované za gigantické saphofytické huby (pravdepodobne *Basidiomycota*). Kanadský geológ a archeológ John William Dawson (1820-1899), ktorý ich objavil v r. 1859, ich opísal ako stromy. Za najstaršie fosílie vláknitej huby sa považuje *Tortotubus protuberans*, pochádzajúci zo začiatku silúru (pred 440 mil. rokov). Sú to aj najstaršie známe fosílie pozemského organizmu vôbec, sú oveľa staršie ako rastliny a živočíchy. Tieto informácie sú jedinečné, nakoľko neexistuje dostatok záznamov o fosíliách húb. Dôvodom je pravdepodobne pomerne krehká a komplikovaná štruktúra stielky mikroskopických húb. Pri väčšine nálezov sa zachovali len spóry, a preto je zostavovanie evolučného stromu komplikované. Fylogenetické analýzy využívajúce molekulárne metódy, ktoré sa začali publikovať od 90-tych rokov min. storočia, výrazne prispeli k pochopeniu pôvodu a vývoja mikroskopických húb. Spočiatku tieto analýzy brali do úvahy hlavne výsledky sekvenácie RNA malej ribozomálnej podjednotky (ss-rRNA). Dnes sú k dispozícii informácie zo sekvenácie z niekoľkých génov, čo pomáha presnejšiemu zaradeniu mikroskopických húb do evolučného stromu.

Ľudia využívajú huby už veľmi dlho, prakticky ako začali piecť chlieb, či používať hroznový mušt na prípravu vína. Staroveké národy dokonca poznali huby ako škodcov v poľnohospodárstve. Huby sa nachádzajú v pôde, vo vzduchu, v riekach, v moriach na rastlinách, v potravinách, kolonizujú ľudské telo a živočíchy. Spolu s baktériami sú huby významnými dekompozérmi organickej hmoty, pričom dôležité prvky ako uhlík, dusík, či fosfor, uvoľňujú do pôdy. Huby sú nevyhnutné pre mnoho priemyselných procesov, najmä na výrobu chleba, vína, piva a niektorých syrov, ale aj kyseliny citrónovej, či octovej. Štúdium húb významne prispelo k rozšíreniu základných poznatkov v biológii. Huby sú relatívne jednoduché organizmy, ktoré sú schopné rásť ako čisté kultúry rýchlo a vo veľkej kvantite. Vďaka týmto vlastnostiam sú huby atraktívnym materiálom pre vedcov, ktorí sa zaujímajú o fundamentálne biologické procesy, ako sú napríklad tvorba a využívanie energie či riadenie metabolizmu.

Napriek tomu, že pravdepodobne prvým človekom, ktorý pozoroval výtrusy húb jednoduchým mikroskopom bol Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), za zakladateľa

Mykológie sa považuje Pier Antonio Micheli (1679-1737), ktorý sa ako prvý zaoberal štúdiom húb na vedeckej báze. Pozoroval hlavne výtrusy húb a popísal ich úlohu v rozmnožovaní. Svoje pozorovania popísal v diele „Nova plantarum genera“. Pomenoval niektoré huby, ako napríklad *Mucor* či *Aspergillus*. Botanik Carl von Linné (1707-1778) je zakladateľom binomickej nomenklatúry, ktorú uplatnil aj pri hubách v diele „Species Plantarum“. Giovanni Targioni-Tozzetti (1712-1783) a Felice Fontana (1730-1805) študovali výtrusy *Claviceps purpurea* (Kyjaničky purpurovej) na obilninách a opísali túto hubu ako parazita. Obidvaja autori sa považujú za „otcov“ fytopatológie. Jean Baqtista Francois Bulliard (1752-1793) bol francúzsky botanik, ktorý vypracoval detailný bibliografický katalóg, ktorý obsahoval aj huby. Christian Hendrick Persoon (1755-1878) napísal diela „Systema Mycologium“, „Synopsis methodica fungorum“ a „Mycologica Europea“ a mnohé iné. Položil základy systematickej mykológie a ako prvý použil termín „Mycology“ (v angličtine). Elias Magnus Fries (1794-1878) napísal „Systema Mycologica“, „Elenchus fungorum“. Čech Augustus Karel Jozef Corda (1809-1849) položil základy štúdia húb pomocou mikroskopu, venoval sa hospodársky škodlivým hubám. Bratia Louis Rene Tulasne (1815-1885) a Charles Tulasne (1816-1884) popísali životné cykly niektorých húb a priradili konídiové formy ku vreckatým hubám, vydali 6 čísiel „Icones Fungorum“ a „Selecta fungorum carpologia“. Britský mykológ Mordecai Cubitt Cooke (1825-1914) vydal dielo „Handbook of British Fungi“. Francúz Louis Pasteur (1822-1895) študoval mikroskopické huby na umelých pôdach, pričom sa zamerlal na ich morfológiu a životné cykly. Dokázal, že víno môžu kontaminovať baktérie, preto zvýšil teplotu počas fermentácie kvasiniek. Tento spôsob sterilizácie – pasterizácia sa využíva pri potravinách citlivých na vysoké teploty. Michail Stepanovič Woronin (1838-1903) sa venoval všeobecnému štúdiu húb a objavil Woroninove teliesko, ktoré je spojené s funkciou septa pri niektorých hubách. Sir Alexander Fleming (1881-1955) urobil prelomový objav penicilínu, účinného antibakteriálneho antibiotika v roku 1929. Izoloval ho z mikroskopickej huby *Penicillium notatum*, ktorá produkovala do prostredia, v ktorom sa huba kultivovala, penicilín. Za tento objav dostal v roku 1945 spolu s Howardom Walterom Florey (1898-1968) a Erstom Borisom Chainom (1906-1979) Nobelovu cenu za fyziológiu a medicínu. Tento objav odštartoval hľadanie nových producentov antibiotík medzi hubami, čo viedlo k hlbšiemu štúdiu fyziologických a biochemických vlastností vláknitých húb.

Huby sú biologickým materiálom, na ktorom boli urobené niektoré významné objavy, napríklad, na konci 19. storočia Eduard Buchner (1860-1917) dokázal, že kvasinkový extrakt premieňa cukor na alkohol, čo bolo dovtedy popísané len pri neporušených bunkách.

Objasnenie metabolických dráh zahrnutých do tohto procesu bolo hlavnou náplňou výskumu v biochémií na začiatku 20. storočia. Štúdium kvasinky *S. cerevisiae* významne prispelo k základným objavom o metabolizme bunky a biochemických procesoch v nej prebiehajúcich. Tieto objavy boli urobené na konci 19. storočia a pokračovali začiatkom 20. storočia. V 40-tych rokoch 20. storočia na základe práce s nutričným mutantom *Neurospora crassa*, vypracovali George Wells Beadle (1903-1989) a Edward Lawrie Tatum (1909-1975) koncepciu, ktorá hovorí, že každý enzým je kódovaný špecifickým génom, čím položili základ pre biochemickú genetiku. V 50-tych rokoch 20. storočia Guido Pontecorvo (1907-1999) dokázal na modelovom organizme *Aspergillus nidulans*, že genetická analýza môže byť urobená aj v prípade absencie sexuálnych procesov a metóda vyvinutá na tomto organizme sa úspešne použila pri mapovaní ľudských chromozómov. V súčasnosti sa huby využívajú ako modelové organizmy na štúdium štruktúry a funkcie génov. Sekvenácia génomu *S. cerevisiae* v roku 1996 prispela nielen k poznaniu mnohých génov, ale aj k poznaniu ich bunkovej funkcie, ktorá bola zovšeobecnená nielen pre ďalšie huby, ale aj pre živočíchy. Významný pokrok sa urobil aj v sekvenovaní patogénnych mikroskopických húb (*Candida albicans*), ktoré sú častými vyvolávatelmi mykotických ochorení.

Objavenie a uplatnenie DNA technológie (genetická manipulácia a klonovanie) na hubách viedla k tvorbe produktov (hormónov, vakcín), ktoré tvoria len cicavčie bunky. Takže huby možno celkovo považovať za veľmi atraktívne pre rôzne oblasti výskumu. V období rokov 1920 – 1940 genetici a biochemici študovali rod *Neurospora* a prispeli k založeniu modernej genetiky. Alexander Fleming izoloval substanciu, ktorú nazval penicilín. Tento objav úplne zmenil klinickú medicínu a „odštartoval“ éru antibiotík. Ďalšou medicínsky významnou hubou je *Claviceps purpurea*, ktorá produkuje ergotické alkaloidy. Táto huba rastie na trávach, hlavne však na žite. Námel' je zdrojom rôznych chemických látok používaných v liečivách a drogách, či už na vyvolanie pôrodu u tehotných žien, kontrolu krvácania po pôrode, na liečbu migrén v kombinácii s kofeínom. Námel' je tiež zdrojom kyseliny lysergovej, účinnej látky v psychedelickej droge (LSD - lysergic acid diethylamide). Iné druhy húb obsahujú látky, ktoré sú súčasťou skupiny liečiv – statínov, používaných na liečbu ochorení spojených s vysokým cholesterolom a koronárnymi ochoreniami. Huby produkujú aj organické kyseliny, enzýmy a vitamíny.

Huby sú buď terestriálne alebo vodné. Vodné prežívajú v čistých chladných vodách alebo moriach, nie však v prostredí s vysokým obsahom soli. Niektoré druhy sú schopné existovať aj v silne znečistených tokoch. Terestriálne huby prežívajú najčastejšie v pôde bohatej na organické látky, čím je ideálnym prostredím pre veľký počet druhov; malý počet

druhov možno nájsť v suchších oblastiach alebo v lokalitách s nízkym zastúpením organickej hmoty. Huby sa nachádzajú v miernych ale aj v tropických oblastiach sveta, všade tam, kde je dostatočná vlhkosť, ktorá im umožňuje rásť. Niekoľko druhov žije v arktických a antarktických oblastiach. Sú však zriedkavé a častejšie prežívajú v symbióze s riasami vo forme lišajníkov. Okolo 100 000 druhov húb bolo identifikovaných a popísaných, ale mykológovia odhadujú, že druhov húb môže byť až 5,1 milióna. Pomerne málo je známe o vplyve životného prostredia na distribúciu húb. Väčšina húb sú saprofyty, ktoré využívajú mŕtvu organickú hmotu ako zdroj výživy. Dostupnosť organických látok je jedným z faktorov ovplyvňujúcich distribúciu húb. Veľké množstvo húb môže spracovať väčšinu druhov organických látok, ako je napríklad lignín, celulóza alebo iné polysacharidy, ktoré sa v pôde alebo vo vode vyskytujú v podobe „mŕtvej“ vegetácie. Okrem výživy na prežívanie húb majú vplyv vlhkosť a teplota prostredia. Laboratórne štúdie ukázali, že väčšina húb sú mesofilné, čo znamená, že majú optimálnu rastovú teplotu 20-30 °C. Patogénne huby sú schopné rásť pri 37 °C, pričom mnohé prežívajú v prostredí aj pri nižších teplotách. Termofilné druhy sú schopné rásť pri 50 °C alebo vyššie, ale prežívajú aj pri teplote do 30 °C. Aj keď je optimálna teplota pre rast väčšiny environmentálnych druhov okolo 20 °C, veľký počet druhov rastie aj okolo 0 °C.

Z hľadiska výživy patria huby medzi heterotrofné organizmy. Huby zvyčajne majú rovnaké morfológické vlastnosti v kultivačných médiách, ktoré obsahujú všetky nutričné zložky, ako v prírode. Asimilujú organickú hmotu, rozkladajú nerozpustné polysacharidy ako škrob, celulózu, hemicelulózu, ale aj komplexné polysacharidy, napríklad lignín na jednoduchšie cukry ako sú glukóza, xylóza, sacharóza či fruktóza. Huby rozkladajú aj proteíny na jednoduchšie látky, z ktorých získavajú nukleové kyseliny, prípadne sú zdrojom uhlíka a dusíka. Chemické prvky ako je fosfor, síra, draslík, horčík a malé množstvá oxidu železitého, zinok a mangán sú potrebné pre rýchly rast pri väčšine húb; prvky, ako je vápnik, molybdén a gálium sú dôležité len pre niektoré druhy. Kyslík a vodík sú absolútne nevyhnutné; sú dodávané vo forme vody, alebo sú získané zo sacharidov. Huby trpia na nedostatok tiamínu a biotínu, a preto musia tieto vitamíny získavať z prostredia. Ostatné vitamíny nevyhnutné pre ich rast a rozmnožovanie si väčšina húb dokáže syntetizovať sama.

Huby sú fakultatívne anaeróbne organizmy, potrebujú voľný kyslík, aby mohli žiť. Avšak v prípade jeho nedostatku využívajú aj fermentatívny metabolizmus, ktorý prebieha v anaeróbných podmienkach.

Krátky prehľad často používaných termínov z oblasti mykológie:

Alternaria - askomycétna huba produkujúca mykotoxíny, častý patogén rastlín. Najčastejším zástupcom je *Alternaria alternans*.

anizogaméty – gaméty opačných párovacích typov, ktoré sú morfológicky odlišené

anterídium – samčie gametangium

antifungálne látky - látky, ktoré spôsobujú potlačenie alebo úplnú inhibíciu rastu húb. Rozdeľujú sa do niekoľkých skupín na základe mechanizmu účinku.

apofýza - svetlý útvar sporangioly nad kolumelou

apotécium - miskovitá plodnica askomycét

artrospóra - výtrus vzniknutý fragmentáciou hýfy

askospóra - sexuálna spóra tvoriaca sa v asku

askus - vrečko, bunka, v ktorej nastáva karyogamia, meióza a tvorba určitého počtu jadier, okolo ktorého sa diferencujú askospóry

Aspergillus – askomycétna huba, má viac ako 100 zástupcov. Častý producent mykotoxínov. Pôvodca aspergilózy. Častými sú druhy *Aspergillus niger* a *Aspergillus fumigatus*

artrospóra – nepohlavná spóra vzniknutá fragmentáciou hýfy

asporogénny - nevytvárajúci výtrusy

balistospóra - exogénny výtrus, ktorý je v zrelosti odmrštený

bazídiospóra - výtrus vzniknutý na bazídiách

Candida – kvasinka patriaca medzi askomycéty. Niektoré druhy ako napr. *Candida albicans*, majú diploidné jadro a sú schopné tvoriť filamenty. Okrem *Candida albicans*, ďalšími zástupcami rodu *Candida* sú *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parakrusei*, *C. dubliniensis*.

coenocytická stielka - stielka bez priehradiek, ktorá je mnohojadrová

Cryptococcus – kvasinka, ktorá formuje mukopolysacharidovú kapsulu. Hlavným zástupcom je *Cryptococcus neoformans*.

cysta (cystospóra) – encystovaná spóra, ktorá sa vyskytuje pri nižších hubách, predstavuje kľudové štádium.

dikaryon – dvojica priblížených jadier, pričom jedno je samčie a druhé samičie haploidné jadro, pochádzajúce z rozdielnych vegetatívnych buniek. Priblíženie jadier vzniká po spojení dvoch haploidných mycélií, kt. vznikli z výtrusov mikroorganizmov opačného pohlavia.

dimorfizmus - schopnosť vytvoriť dve odlišné morfológické formy. Väčšinou u húb ide o tvorbu kvasinkovej (sférickej) formy a mycéliovej (hýfovej) formy. Niektoré mikroorganizmy sú schopné tvoriť viaceré morfológických foriem – polymorfizmus.

endospóra - výtrus vzniknutý vo vnútri materskej bunky alebo špecializovaného orgánu – sporangia

exospóra - výtrus v dobe zrelosti vytváraný na povrchu materskej bunky alebo špecializovaného orgánu

Epidermophyton – askomycétna mikroskopická vláknitá huba, pôvodca dematomykóz, hlavným zástupcom je *Epidermophyton floccosum*.

fenotypová variabilita – schopnosť rásť vo viacerých morfológicky odlišných kolóniách. Pri mikroskopických hubách je morfológia kolónií daná kombináciou pomerov kvasinkovej a mycéliovej alebo pseudomycélievej formy. Výsledkom je forma kolónií hladká, zvráskavená, vlasovitá, kruhová a pod. Táto vlastnosť je individuálnou vlastnosťou mikroorganizmu a prejavuje sa hlavne pri toho, ktorý sa nerozmnožuje pohlavne. Variabilita vo fenotype je ovplyvňovaná aj kultivačnými podmienkami v danom prostredí mikroorganizmu.

feromóny – hormóny podieľajúce sa na regulácii pohlavného rozmnožovania.

fialida - štruktúra, ktorá produkuje fialokonídie

Fusarium – patrí medzi askomycétny huby. Častý producent toxínov. Najznámejšími zástupcami sú *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* a *Fusarium moniliforme*.

gaméta - bunka určená na pohlavné rozmnožovanie.

gametogamia – pohlavný proces, pri ktorom splývajú plazmy alebo jadrá dvoch gametangií.

gametangium – orgán, v ktorom vznikajú gaméty

Geotrichum – kvasinka patriaca medzi askomycétny huby. Častý pôvodca kvasinkových infekcií. Najčastejším zástupcom je *Geotrichum candidum*.

heterotalizmus – jav, kedy pri pohlavnom procese splývajú gaméty (gametangiá alebo celé mycéliá), ktoré vznikli na rôznych jedincoch napriek tomu, že tento jedinec môže tvoriť pohlavné orgány obidvoch pohlaví.

Histoplasma - mikroskopická huba, ktorá je striktným patogénom. Zaraďuje sa do skupiny askomycétnych húb. Hlavným predstaviteľom je *Histoplasma capsulatum*.

homotalizmus - jav, kedy pri pohlavnom procese splývajú gaméty (gametangiá alebo celé mycéliá), ktoré sa vytvorili na tom istom jedincovi.

hýfa – základná stavebná jednotka mycélia

hyménium - výtrusorodé lôžko (thecium)

hymenofór - časť plodnice, ktorá nesie hyménium

chlamydospóra - hrubostenná, nápadná spóra, vzniknutá endogénne z bunky mycélia

izogaméty - pohlavné spóry, ktoré sú morfológicky odlišné

karyogamia - splynutie dvoch jadier

kleistotécium - guľatá, uzavretá plodnica askomycét

kolumela - sterilný, pologuľatý vrchol vsunutý do sporangia

konídie - nepohlavné výtrusy tvoriace sa na konídiófore. Delia sa na makrokonídie a mikrokonídie.

konídiófór - špecializovaná, tvarovo odlišná hýfa – špecializované vlákno, na ktorom sa vytvárajú nepohlavné spóry

krížové väzby - spojenie medzi glukánom a chitínom v bunkových stenách mikroskopických húb

lomazómy - organely eukaryotických buniek u húb, ktoré sú obalené len jednoduchou membránou. Vyskytujú sa na apexe hýf a pri septách a ich funkcia nie je presne známa

melaníny - pigmenty vyskytujúce sa v bunkovej stene spór. Spĺňajú ochrannú funkciu mikroorganizmu a pri patogénnych mikroorganizmoch zvyšujú ich virulenciu

metuly – metličkovité útvary vyskytujúce sa u niektorých mikroskopických húb, napríklad pri rodoch *Penicillium* a *Paecilomyces*.

Microsporium – zástupcovia sa zaraďujú medzi askomycétne mikroskopické huby. Patria k vyvolávateľom mykóz u zvierat, ktoré sú prenosné na človeka. Hlavnými zástupcami sú *Microsporium canis* a *Microsporium gypseum*

mycélium – spleť vlákien (hýf). Niektoré druhy húb tvoria aj pseudomycélium, ktoré sa odlišuje od pravého mycélia v tom, že jeho články tvoria samostatné bunky s jedným jadrom a nemajú póry.

myxomonáda – protoplast slizoviek, ktorý je obvykle pohyblivý.

Neurospora – patrí medzi askomycétne huby, ktoré sa rozmnožujú pohlavne. Najznámejším zástupcom je *Neurospora crassa*.

nozokomiálne infekcie – infekcie vyvolané mikroorganizmami, ktoré kolujú v danej nemocnici alebo na oddelení a sekundárne infikujú pacientov

oogónium – samičie gametangium

oportunistické patogény - sú to príležitostné patogény. Sú schopné vyvolať ochorenie len za určitých podmienok, a to hlavne u imunitne oslabeného jedinca

parasexualita – proces výmeny genetického materiálu pri mikroskopických hubách, ktoré nemajú pohlavné rozmnožovanie. V heterokaryotických hýfach, ktoré vznikajú fúziou sa nachádzajú odlišné jadrá. V rámci jadier dochádza k výmene časti chromozómov rekombináciou. Haploidný stav sa obnoví stratou jadra.

Penicillium – zástupcovia patria medzi askomycétne huby, rozšírené v environmente, majú významnú úlohu v potravinárskom a chemickom priemysle. Zástupcami sú *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*.

peritécium - fľaškovitá plodnica askomycét

plazmódium – mnohojadrová masa plazmy, ktorá vzniká spojením myxoamoeb. Obsahuje myxomyozín a aktomyozín, ktoré zabezpečujú pohyb.

plazmogamia - splynutie cytoplazmy dvoch buniek

plodnica – časť stielky u vyšších húb, v ktorej sa tvoria spóry

polymorfizmus - schopnosť tvoriť viacero morfológických foriem súčasne, ale za určitých podmienok niektorá forma môže prevládať

pseudomycélium - vlákno, ktoré vzniklo postupným vypučením materských buniek

pyknida - fľaškovitý ponorený útvar

pyknospóra - výtrus vzniknutý v pyknide

Rhodotorula – kvasinka, ktorá sa nerozmnožuje pohlavne, ale pučaním blastospór. Tvorí pigmenty karotenoidnej povahy. Typickým zástupcom je *Rhodotorula rubra*. Pohlavné štádium tohto rodu reprezentuje rod *Rhodospiridium*, ktorý patrí medzi bazídiomycétne huby

rizoid – tenká časť stielky mikroskopických húb, ktorou sú huby uchytené v substráte pripomínajúce koreň.

sklerócium - tvrdý, na povrchu kôrou potiahnutý útvar

sporangium – útvar, ktorý obsahuje jednu alebo viacero sprangiospór (endospóry)

sporangiofór - vlákno nesúce sporangium

sporokarp – mnohobunkový útvar, v ktorom sa tvoria výtrusy. Známy je aj ako plodnica.

spóra - špecializovaná bunka, ktorá zabezpečuje šírenie alebo prežívanie húb. Môže byť výsledkom pohlavného ale aj nepohlavného rozmnožovania.

stolón - horizontálna hýfa pri zygomycétnych hubách, ktorá rastie pozdĺž povrchu média

teliospóra – pohlavná bunka

thalus – vegetatívna stielka huby

vezikulum - predĺžená štruktúra na konci konídiofóru alebo sporangiofóru

zygospóra - hrubovrstevná, diploidná spóra u zygomycétnych húb, vzniknutá po splynutí izogamét

zygota - bunka alebo protoplast, v ktorom splynuli dve pohlavne rozdielne jadrá

Trichoderma – mikroskopická huba patriaca medzi askomycéty. Je typickým nepatogénnym symbiontom rastlín. Najznámejším zástupcom je *Trichoderma viride*.

Trichosporon - patrí medzi askomycétne huby. Častý pôvodca mykóz. Najznámejšími zástupcami sú *Trichosporon beigeli* a *T. capitatum*

vezikulum – rozšírená koncová časť konidiofóru u zygomycétnych húb

vezikuly – pravé organely eukaryotických buniek. Sú to malé útvary, ktoré sú dôležité na transport rôznych látok medzi organelami.

Woroninove telieska – organely, ktoré sa vyskytujú pri askomycétnych hubách. Ich hlavnou úlohou je zabránenie pohybu cytoplazmy a organel medzi článkami mycélia

2. Izolácia, transport, uchovávanie a zásady bezpečnosti

práce s mikroskopickými hubami

Izolácia mikroskopických húb si vyžaduje dodržiavanie zásad aseptického práce, pričom sa sledujú niektoré faktory: infekčnosť, patogenita a virulencia, toxigenicita a alergenicita materiálu. Z tohto hľadiska sa mikroorganizmy delia na oportúnne (podmienečne patogénne), ktoré vyvolávajú ochorenia príležitostne, predovšetkým u imunokompromitovaných ľudí. Avšak pri nesprávnej manipulácii môžu spôsobiť ochorenia aj u zdravého jedinca. Ďalšiu skupinu tvoria vysoko rizikové mikroskopické huby - obligátne patogény, s ktorými sa môže pracovať len v prípade dodržiavania špeciálnych podmienok. Cesty infekcie sú rôzne: dotyk, injekčne, inhaláciou, inváziou do poškodených a odkrytých častí tela - nechty, oči, urogenitálny systém. Prevenciou proti infekcii je dôsledná hygiena a dodržiavanie bezpečnostných opatrení.

Pre úplnú diagnostiku vzorky je potrebné správne a rýchle odobratie vzorky, transport, jej spracovanie a následná kultivácia. Ak sa vzorka musí uchovať určitý čas, jej uchovávanie musí spĺňať isté kritériá. Odobratie, ale aj transport vzorky je rôzne, záleží od materiálu a druhu mikroskopických húb, ktoré sú z tohto materiálu izolované. Na uchovávanie kultúr mikroskopických húb sa používa agarová pôda obohatená glukózou, huby sú uchovávané pri 2-4 °C po dobu 1-2 rokov. Ďalší spôsob je zaliatie agarovej pôdy parafínom (1cm), pričom kultúra húb vydrží pri teplote -20° C po dobu 5-10 rokov, alebo ak je agarová pôda zmiešaná so sterilným glycerolom, huby sa môžu uchovať pri -60 až -80 °C. Najlepším spôsobom je však lyofylizácia, pretože takto uchovávaná kultúra húb nestráca svoje vlastnosti ani po mnohých rokoch uchovávaní. Výnimku pri uchovávaní tvoria zástupcovia rodu *Epidermophyton* a niektorých druhov zygomycét, ktoré sú citlivé na zamrazovanie. Pri oživovaní sa kultúra naočkuje do YPD pôdy (kvasničný autolyzát, mykologický peptón, glukóza) alebo Sabouradovej tekutej pôdy, a následne sa kultivuje pri 28 °C 10-18 h. Potom sa takto narastená kultúra preočkuje na agarovú pôdu. Kultivácia mikroskopických húb musí byť zabezpečená podľa charakteru materiálu, t.j. musí byť zabezpečený správny výber pôdy, dĺžky a teploty kultivácie.

Izolácia z pôdy.

Z pôdy sú najčastejšie izolované mikroskopické huby z radov *Peronosporales*, (oddelenie *Oomycota*) *Mucorales* (poddelenie *Zygomycotina*, oddelenie *Glomerulomycota*), z oddelení *Ascomycota* a *Basidiomycota*. Majú významné miesto v prírode, lebo zabezpečujú rozklad celulózy, chitínu, lignínu a pod. Do tejto skupiny patrí veľa saprofytických a parazitujúcich mikroskopických húb, ktoré prežívajú na koreňových systémoch. Zaraďuje sa tu aj veľa endosymbiontov patriacich hlavne medzi *Basidiomycota*. Pôdne huby rastú v pôde prevažne v mycéliovej forme, ktorá predstavuje aktívne štádium. V pôde sa nachádza aj ich dormatívne štádium, ktoré je tvorené špeciálnymi spórmi. Toto štádium mikroskopickej huby je minimálne aktívne a zabezpečuje jej prežívanie. Saprofytické a povrchovo rastúce huby sa z vybranej lokality odoberajú sterilnou ihlou alebo očkom a prenášajú sa na sterilnú tuhú pôdu alebo do vody, kde sa vzorka riedi, pričom optimálne riedenie sa nanáša na tuhú pôdu. Poloparazitujúce a parazitujúce huby sa získavajú čerstvé z hostiteľa, prenášajú sa na špeciálnu pôdu a povrchovo sa dezinfikujú v slabom roztoku formaldehydu, potom sa preniesú do 70 % etanolu a nakoniec do sterilnej vody. Potom je už postup podobný ako v predchádzajúcom prípade.

Pri oboch typoch izolácie sa postupuje neselektívne alebo selektívne podľa toho, či sa použijú špeciálne pôdy a antibiotiká. Podľa charakteru materiálu sa môže použiť viacero postupov:

- a) vysievanie pôdnych zŕn - používajú sa pôdne zrná do veľkosti 1 cm
- b) suspenzná metóda - pôda sa roztrepe a nariedi do sterilnej vody alebo pôdy (tento postup je veľmi častý, využíva princíp Kochovej zried'ovacej metódy)
- c) izolácia húb rozkladajúcich celulózu - sú to väčšinou bazídiomycétne huby, ale patria tu aj askomycétne huby, ktoré často tvoria špeciálne útvary podobné hubám "fruit bodies". Na ich izoláciu sa používajú kúsky sterilného papiera, ktoré sa vložia na nejaký čas do pôdy, potom sa postrihajú a vložia sa na pôdu s celulózu
- d) izolácia keratinofilných húb - pôda na kultiváciu týchto húb je prevrstvená nastrihanými vlasmi alebo nechtami, ktoré zabezpečujú zdroj keratínu
- e) izolácia koprofilných húb - zástupcom je rod *Coprinus*, ktorý sa izoluje na sterilnom králičom truse

Izolácia z vody.

Do skupiny vodných mikroorganizmov, ktoré sa študujú aj v rámci mykológie patria predovšetkým slizovky. Tie sa zaraďujú medzi Protozoa, ale vo svojom životnom cykle

prechádzajú aj štádiami, ktoré sú podobné mikroskopickým hubám. Žijú vo vodnom prostredí a tvoria zoospóry, ktoré sú pohyblivé (planospóry) a majú jeden alebo viac bičíkov. Izolujú sa v sterilnej vode, najlepšie prírodnej, riedenej v pomere 1:2 s destilovanou vodou. Rastú 1-4 dni a sú veľmi citlivé na prítomnosť rôznych chemických látok. Teplota kultivácie sa dodržiava podľa pôvodnej teploty prostredia.

Izolácia z potravín.

Do tejto skupiny patria mikroskopické huby z oddelenia *Ascomycota*. Vzorka potraviny sa rozseká alebo rozsuspenduje a nariedi v sterilnej vode. Takto pripravená sa naniesie na kultivačnú pôdu. Identifikácia narastených kolónií sa robí o 6-10 dní. Často sa používajú selektívne médiá. Stanovuje sa nielen druh, ale aj počet mikroorganizmov na g vzorky.

Izolácia zo vzduchu.

Do tejto skupiny patria predovšetkým mikroskopické huby z oddelenia *Ascomycota* a mitospórických húb ako sú rody *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys* a pod. Tieto huby sa nachádzajú tiež vo ventilačných systémoch a vo vlhkých miestnostiach s nedostatočným vetraním. Izolujú sa spóry alebo mycéliové fragmenty, robia sa stery zo stien a pod.

Izolácia termofilných a termotolerantných húb.

Pri ich kultivácii je potrebné dodržiavať zvýšenú teplotu, lebo optimum ich rastu je pri 40 °C -50 °C. Nerastú pri teplote pod 20 °C.

Izolácia patogénnych húb.

Patogénne huby môžu byť rozdelené do 5 skupín podľa toho, na akom organizme parazitujú:

- patogénne huby rastlín - z napadnutých rastlín sa izolujú spóry, mycélia alebo rôzne telieska - peritécia a pyknidy
- patogénne huby zvierat a hmyzu - u zvierat sa rozlišujú huby patogénne, oportúnne a kurmatotrofné, ktoré využívajú na svoj život exkréty, odumreté bunky a pod.. Všetky tri skupiny väčšinou predstavujú mitospórické huby. Odber materiálu je rôzny vzhľadom na infekcie (chlpy, koža, exkréty a pod). K hubovým patogénom hmyzu patria zástupcovia

radu *Entomophthorales* (*Glomeromycota*) . Ide o vnútroorganismové parazity, ktoré je možné po uhynutí hmyzu pozorovať ako biely poprašok na ich povrchu.

- fungikolózne huby - sú to parazity samotných húb
- huby patogénne pre človeka - patria tu mikroskopické huby z oddelení *Glomeromycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* (ríša *Fungi*) a oddelenia *Oomycota* (ríša *Chromista*). Odoberá sa rôzny materiál - vlasy, nechty, koža, vaginálny sekrét, stolica, respiračný sekrét, krv, tkanivo orgánov.

3. Základy systematiky

Ríša mikroskopických húb zahŕňa eukaryotické organizmy celulárne, acelulárne, unicelulárne alebo multiceulárne. V minulosti boli považované za rastliny. Avšak, takmer všetky huby obsahujú v bunkovej stene chitín, ktorý bol tiež nájdený v exoskeletoch mnohých bezstavovcov. Okrem toho chitridiové zoospóry, podobne ako ľudské spermie, majú jeden zadný bičík. Na základe týchto podobností, ale aj rozsiahlych porovnaní molekulárnych sekvencií, sú huby a živočíchy považované za sesterské skupiny. Dokonca, niektorí vedci určujú v kladogramoch živočíchom a hubám spoločného predka nazvaného „opisthokont clade“ (opistho - prvé a kont - bičík). V období na konci 19. a začiatku 20. storočia, ktoré sa považuje za zlatý vek mikrobiológie, rozvoj mykológie stále zaostával. Príčinou bolo tradičné začleňovanie húb do ríše rastlín a praktické potreby spoločnosti boli orientované len na „klobúkaté“ huby ako pochutiny. Z tohto dôvodu je Mykológii ako veda o organizmoch odlišných od rastlín a živočíchov veľmi mladá. Dnes má Mykológia 4 hlavné smery: systematický, technický medicínsky a fytopatologický. Filamentujúce huby a kvasinky sú komerčne využívané pri výrobe potravín a nápojov. Najviac sú známe druhy *Penicillium camembertii* a *Penicillium roquefortii*, ktoré sú dôležité pri dozrievaní syrov. Známa je aj sójová omáčka, ktorá je produktom kvasenia sójových zŕn *Aspergillus oryzae*. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* sa využíva pri výrobe chleba, vína a piva a *Saccharomyces carlsbergensis* in lager. V rámci Fytopatológie - náuke o ochoreniach rastlín - sa študujú huby, ktoré sú pôvodcovia ochorení týchto rastlín, hlavne hospodárskych plodín (*Ustilago maydis* – parazit kukurice). Veterinárna Mykológia študuje ochorenia zvierat. Ďalším samostatným odborom je Lekárska Mykológia, ktorá skúma ochorenia ľudí a zvierat, ktoré sú prenosné zo zvierat na človeka. Práve Systematike a Lekárskej Mykológii bude venovaná veľká pozornosť v týchto učebných textoch.

Klasifikácia uvedená vyššie, odráža rozdelenie húb na základe fylogenetických vzťahov a je všeobecne akceptovaná. Existuje však veľa sporných zaradení, pri ktorých sa nedosiahla všeobecná zhoda vzhľadom na zaradenia do oddelení, tried, podtried či čeľadí. V roku 1990 došlo k dramatickým zmenám v klasifikácii húb. Lepšie pochopenie vzťahov medzi hubami viedlo k rozpusteniu zastaraných taxónov a vytváraniu nových taxónov umiestnených v oddeleniach *Chytridiomycota* a *Glomeromycota*. Oddelenie *Chytridiomycota* bolo zachované, ale v obmedzenom zmysle. Typickými príkladmi sú *Chytridiomycota* v rámci radu *Blastocladales*, ktorý bol povýšený do oddelenia *Blastocladiomycota*. Rovnako

tak skupina anaeróbných húb zaradených do radu *Neocallimastigales* bola preradená do oddelenia *Neocallimastigomycota*. Oddelenie *Zygomycota* sa už nenachádza v klasifikácii, pretože neboli dostatočne preukázané vzťahy medzi skupinami, ktoré boli tradične umiestnené v tomto oddelení. Výsledkom je uznanie oddelenia *Glomeromycota*, ktoré sa skladá zo 4 pododdelení nazvaných „*incertae sedis*“ (z latinčiny "neisté pozície"): *Mucoromycotina*, *Kickxellomycotina*, *Zoopagomycotina* a *Entomophthoromycotina*. Právě huby sú rozdelené do siedmich oddelení: *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota*. Fylogeneticky najstaršie mikroskopické huby sú zaradené do *Chytridiomycota*, ale aj *Microsporidia* a veľa z nich preživa vo vodnom prostredí aspoň v niektorých fázach vývojového cyklu. Prvým významným rozdielom týchto fylogeneticky starších húb bola strata bičíkov a vývoj septovaných hýf, ku ktorému došlo už v suchozemských podmienkach asi pred 600 miliónmi až 800 miliónmi rokov. Huby so septovanými hýfami patriace do *Glomeromycota* sa oddelili od pre-*Basidiomycota* a pre-*Ascomycota* húb, ktoré mali spoločného predka asi pred asi 500 miliónmi rokov. Hýfy s charakteristickým vzhľadom typickým pre *Basidiomycota* je možné nájsť v niektorých veľmi starých vzorkách rastlinných fosílií. *Ascomycota* a *Basidiomycota* sa rozišli do tzv. „sesterských skupín“, ktoré sú umiestnené spoločne v podriši *Dikarya*, pred asi 300 miliónmi rokov. Definitívna diverzifikácia húb prebehla pravdepodobne pred 130 až 200 miliónmi rokov, krátko po objavení sa kvitnúcich rastlín, ktoré sa stali dôležitou súčasťou flóry, dokonca ešte pred érou dinosaurov. Asi pred 60 až 80 miliónmi rokov sa počty voľne žijúcich anaeróbných *Chytridiomycota* redukovali a boli spásane prežúvavcami spolu s trávou. V ich bachore začali prežívať ako symbionti, a preto prežúvavce dokážu spracovať trávnatú potravu.

Fylogenetické usporiadanie podľa najnovších poznatkov bolo spracované v slovníku Ainswortha a Bisbyho „*Dictionary of Fungi*“. 10. ed. (2008). Tie skupiny, ktoré je stále problematické jednoznačne zaradiť, vystupujú pod názvom *incertae sedis*, čo znamená "neisté pozície". Spomenutá klasifikácia rozdeľuje ríšu húb do 7 oddelení, 10 pododdelení, 35 tried, 12 podtried a 129 radov.

Prehľad najčastejšie používanej terminológie v systematike

Skrátená terminológia systematickej menoglatúrnej hierarchie

Doména	<i>Eukaryota</i>
Ríša	<i>Fungi</i>
Oddelenie	<i>Basidiomycota</i>
Pododdelenie	<i>Basidiomycotina</i>

Trieda	<i>Teliomycetes</i>
Podtrieda	<i>Teliomycetidae</i>
Rad	<i>Uredinales</i>
Čeľaď	<i>Pucciniaceae</i>
Rod	<i>Puccinia</i>
Druh	<i>Puccinia graminis</i>

Ríša Huby

Oddelenie *Chytridiomycota*

Sú to hlavne vodné huby, niektoré z nich sú parazitné alebo saprofytické; jednobunkové alebo vláknité. V bunkovej stene obsahujú chitín a glukán. Nepohlavne sa rozmnožujú pomocou pohyblivých spór (zoospór), tvoria aj mycélia; obsahujú 2 triedy.

Oddelenie *Neocallimastigomycota*

Nachádzajú sa v zažívacom trakte byľinožravcov, tvoria anaeróbne; zoospóry s jedným alebo viacerými bičikmi, nemajú mitochondrie, ale obsahujú hydrogenozómy (produkuje vodík, je to organela viazaná na cytoplazmovú membránu, na ktorej sa generuje energia vo forme ADP alebo ATP); oddelenie má 1 triedu.

Oddelenie *Blastocladiomycota*

Parazitujú na rastlinách a zvieratách, niektoré z nich sú saprotrofy; vodné aj suchozemské. Huby žijúce vo vodnom prostredí tvoria zoospóry, ktoré sú bičíkaté; oddelenie má 1 triedu.

Oddelenie *Microsporidia*

Parazitujú na zvieratách a prvokoch; sú jednobunkové; majú redukované mitochondrie. Oddelenie nie je rozdelené, keďže nie je dostatok dobre definovaných fylogenetických vzťahov v rámci skupiny.

Oddelenie *Glomeromycota*

Do oddelenia patria zástupcovia, ktorí sú považovaní za obligátne patogénnych, ale aj také druhy, ktoré prežívajú v mutualistickom alebo symbiotickom vzťahu. Hýfy môžu prenikať do buniek koreňov rastlín a stromov. Majú cenocytické hýfy a množia sa asexuálne. V bunkovej

stene prevažuje chitín. Majú 4 poddelenia: *Mucoromycotina*, *Entomophthoromycotina*, *Zoopagomycotina*, *Kickxellomycotina*

Pododdelenie *Mucoromycotina* (incertae sedis)

Huby z tohto pododdelenia sú parazitárne, saprofytické, alebo aj ektomykorrhízne (formy vzájomnej symbiotickej asociácie s rastlinami). Rozmnožujú sa asexuálne, alebo majú aj pohlavné rozmnožovanie. Mycélium je rozvetvené. Pododdelenie obsahuje 3 rady, ktoré predstavujú tradičné *Zygomycota*.

Pododdelenie *Entomophthoromycotina* (incertae sedis)

Do tejto skupiny patria huby patogénne, saprotrofické alebo aj parazitárne. Stielky majú coenocytické alebo aj septované, niektoré druhy tvoria rizoidy; konídiofór môže byť rozvetvený alebo nerozvetvený; majú 1 rad.

Pododdelenie *Zoopagomycotina* (incertae sedis)

Patria sem endoparazitické alebo parazitické druhy. Parazitujú na háďatkách, prvokoch a iných hubách. Stielka je rozvetvená alebo nerozvetvená; rozmnožujú sa pohlavne alebo nepohlavne; obsahujú 1 rad.

Pododdelenie *Kickxellomycotina* (incertae sedis)

Do tejto skupiny sa zaraďujú saprotrofitné huby, ale aj huby parazitujúce na iných hubách. Môžu však prežívať aj v symbióze, mycélium je rozvetvené alebo nerozvetvené; rozmnožovanie má nepohlavné, ale aj pohlavné; obsahuje štyri rady.

Oddelenie *Ascomycota* (vreckaté huby)

Veľa zástupcov je saprofytických, niektoré žijú v symbióze s rastlinami a tvoria spoločný organizmus - lišajník, niektoré sú parazity rastlín, zvierat alebo ľudí; niektoré sú jednobunkové - kvasinky, ale väčšinou sú vláknité, septami s pórmi, cez ktoré migruje cytoplazma, jadrá a malé mitochondrie. Askomycétne huby sa rozmnožujú nepohlavne, väčšinou pučaním alebo rozpadom stielky, prípadne sú konídie uvoľňované z konídiofórov. Pohlavné rozmnožovanie vedie k produkcii haploidných askospór, ktoré sú uložené v askoch. Asky môžu byť formované priamo alebo nepriamo – po splynutí sporogénnych hýf. Toto oddelenie je zahrnuté v pododdelení *Dikarya* spolu so sesterskou skupinou, *Basidiomycota*.

Pododdelenie *Taphrinomycotina*.

Zástupcovia sú patogénne pre niektoré rastliny; unicelulárne alebo filamentujúce; asky formuje na povrchu rastlín. Obsahuje 4 triedy.

Pododdelenie *Saccharomycotina* (pravé kvasinky)

Zástupcovia sú saprotrofy na rastlinách a zvieratách, vrátane ľudí; príležitostne sú patogénne pre rastliny a ľudí; môžu byť jednobunkové; niekedy sa vyskytujú v krátkych retiach; nepohlavne sa rozmnožujú pučaním alebo rozpadom; patria tu kvasinky významné pre priemysel, ale aj také, ktoré spôsobujú infekcie u ľudí. Zaradujú sa tu kvasinky, ktoré stratili schopnosť meiózy. Niektoré z týchto kvasiniek nie je možné presne zaradiť (*incertae sedis*). Obsahuje 1 triedu.

Pododdelenie *Pezizomycotina*

Niektorí zástupcovia žijú v symbióze s riasami a tvoria lišajníky; niektoré stratili schopnosť meiózy a neprodukujú asky (predtým *Deuteromycota*); Obsahuje 10 tried. Patria tu aj huby, ktoré nie je možné presne zaradiť (*incertae sedis*).

Oddelenie *Basidiomycota*

V tomto oddelení sú zaradené parazitické alebo saprofytické huby, ktoré prežívajú na rastlinách alebo hmyze. Sú to pravé vláknité huby, hýfy majú priehradky s typickými centrálnymi uloženými dolipórmami. Mycélium môže byť jednobunkové, ale aj dikaryontné, čiže huba môže v istom štádiu vývoja mať mycélium obsahujúce dve jadrá v každom článku. Nepohlavné rozmnožovanie sa uskutočňuje fragmentáciou mycélia alebo uvoľňovaním konídií; pohlavné rozmnožovanie sa môže uskutočniť fúziou hýf (*somatogamia*), alebo spojením spermíí (*spermácia*), kedy splyývajú jadrá opačných párovacích typov, na ktorých sú špecializované štruktúry. Počas spermácie vznikajú dikaryontné hýfy, ktoré nakoniec vedú k formovaniu bazídií, a to buď jednotlivito na hýfách alebo v rôzne tvarovaných bazídiokarpoch. Po redukčnom delení vznikajú bazídiospóry. Niektorí zástupcovia tvoria hrubostenné pohlavné spóry - teliospóry, ktoré podliehajú redukčnému deleniu. Huby z tejto skupiny majú veľké plodnice, niektoré sú jedlé. Niektoré huby sú zaradené do podriše *Dikarya* spolu s niektorými predstaviteľmi zo sesterskej skupiny *Ascomycota*.

Pododdelenie *Pucciniomycotina*

Sú to hlavne patogény rastlín, obsahujú osem tried.

Pododdelenie *Ustilaginomycotina*

Spôsobujú parazitárne ochorenia na rastlinách, tvoria dikaryotické hýfy, obsahujú aj haploidné kvasinky; delia sa do 2 tried.

Pododdelenie *Agaricomycotina*

Parazitické alebo symbiotické huby na rastlinách alebo živočíchoch, prípadne iných hubách. Sú to saprofyti alebo mykorrhízne huby, mnohé z nich tvoria veľké plodnice a sú to jedlé huby; obsahujú 3 triedy.

Samostatne sú zaradené *Basidiomycota* (incertae sedis), ktoré obsahujú huby, ktoré nebolo možné zaradiť do pododdelenia; obsahujú 2 triedy.

Ríša *Chromista*

Bežné mikroorganizmy, ktoré zahŕňajú významné rastlinné patogény, napríklad spôsobujúce ochorenie zemiakov (*Phytophthora*). Spóry sú pohyblivé, prežívajú vo vodnom prostredí, majú 2 bičíky. Bunkové steny hýf obsahujú celulózu, patrí sem hlavne oddelenie *Oomycota*. Toto oddelenie obsahuje celkom asi 110 rodov a 900 druhov.

Oddelenie *Hyphochytriumycota*

Mikroskopické organizmy, ktoré sú parazitické alebo saprofytické na riasach a iných hubách v sladkej vode a v pôde; tvoria malé stielky, často s rozvetveným rizoidami. Celá stielka sa mení na reprodukčné štruktúry; patrí sem 23 druhov v 6. rodoch.

Oddelenie *Labyrinthulomycota*

Prežívajú v sladkej aj v slanej vode v symbióze s riasami a inými zástupcami z ríše *Chromista*. Medzi zástupcov patria organizmy známe ako slizovky; do oddelenia sa zaraďuje asi 45 druhov zadených v 10. rodoch.

Oddelenie *Oomycota*

Prežívajú v sladkej aj slanej vode, vo vlhkej pôde, a sú súčasťou aj morských biotopov, niektoré sú patogénne (ako *Saprolegnia* a *Phytophthora*); oddelenie obsahuje asi 600 druhov v 90. rodoch.

Ríša *Protozoa*

Obsahujú minimálne 16 oddelení, ale mykológia študuje len jednu skupinu – slizovky, ktoré sa v poslednom 9. vydaní Dictionary of the Fungi delí na 4 oddelenia: *Acrasiomycota*, *Dictyosteliomycota*, *Myxomycota*, *Plasmodiophoromycota*. Najnovšie molekulárne analýzy potvrdzujú, že slizovky sa vyvíjali v 5. nezávislých líniách a to: i) *Ramicristates* ameboidné protozoa s rozvetvenými mitochondriálnymi kristami, ktoré obsahujú 3 triedy *Protostelea* (*Protosteliomycetes*), *Myxogastrea* (*Myxomycetes*), *Dictylostelea* (*Dictyosteliomycetes*); ii) *Heterolobosea* sú charakteristické prítomnosťou mitochondriálnych kríst a mitochondrie sú asociované s endoplazmatickým retikulom, patrí tu rad *Acrasida* (*Acrasiales*); iii) *Copromyxida*, ktoré boli predtým zaradené do *Acrasiales*, avšak v trofickéj fáze stratili bičíky a mitochondriálne kristy sú tubulárne; iv) *Fonticulida* boli tiež predtým zaradené medzi *Acrasiales*, tieto nemajú tubulárne mitochondriálne kristy, žiadne bičíky ani panôžky; v) *Plasmodiophorids* sú charakteristické prekríženým profilom chromozómov a jadier počas mitózy. Obsahujú jednu triedu *Plasmodiophorea* (*Plasmodiophoromycetes*).

4. Rozmnožovanie nižších a vyšších mikroskopických húb.

Mikroskopické huby sa z fylogenetického hľadiska delia na nižšie a vyššie. Obidve skupiny sú schopné sa rozmnožovať pohlavne aj nepohlavne. Medzi nižšie huby patria skupiny oomycétnych a zygomycétnych húb, ktoré sú v súčasnosti v oddelení *Glomeromycota*. Pre zygomycétne huby je charakteristické, že sú jednobunkové a hýfy nie sú delené priehradkami (septami), bunky sú mnohojadrové (coenocytické). Podľa pohlavného rozmnožovania sa vyššie huby neformálne zaraďujú do kategórií *Ascomycota* - vrekaté huby, tvoria askospóry, *Basidiomycota* - bazídiomycétne huby, tvoria bazídiá a neformálne *Deuteromycota* (mitospórické huby - Fungi Imperfecti), pri ktorých nie je známy proces pohlavného rozmnožovania. Vzhľadom na súčasné poznatky (výsledky sekvenčných analýz), boli aj huby bez pohlavného rozmnožovania zaradené v systéme (Ainsworth a Bisby: „Dictionary of Fungi“. 10. ed., 2008) do skupiny *Ascomycota* alebo *Basidiomycota*. Pre vyššie huby je charakteristické viacbunkové (septované) mycélium, pričom septá majú póry.

Najvyšší podiel študovaných mikroskopických húb je zaradený medzi zygomycétne, a askomycétne huby. Do skupiny oomycétnych mikroskopických húb sú zaraďované organizmy na fylogenetickom rozhraní ríš Huby, Riasy a Protozoa. Na druhej strane väčšina bazídiomycétnych húb je študovaná v rámci Botaniky. Typickými zástupcami bazídiomycétnych mikroskopických húb sú, napríklad: *Rhodospodium toruloides* (pohlavná forma kvasinky *Rhodotorula rubra*) a *Filobasidiella neoformans* (pohlavná forma kvasinky *Cryptococcus neoformans*).

V nepriaznivých podmienkach môžu vytvoriť huby zvláštne štruktúry ako chlamydospóry, ktoré majú zahustenú cytoplazmu a sú obalené hrubými ochrannými obalmi. Sú to odpočívajúce útvary, umiestnené môžu byť interkalárne alebo terminálne, sklerócium (hustá spleť hýf zamotaná do tvrdého kľbka alebo stromu (lôžko - tvrdý kompaktný útvar), ktorý je typický pre parazitické huby.

4.1 Nepohlavné rozmnožovanie mikroskopických húb

Mikroskopické huby sa nepohlavne (vegetatívne) rozmnožujú rozrastaním sa mycélia, apikálnymi úločkami hýf, chlamydospórmi, artrospórmi, sporangiospórmi, alebo pri kvasinkách pučaním. Počas tohto rozmnožovania sa môžu tvoriť rôzne typy exospór alebo endospóry. Sporangiospóry (endospóry) vznikajú vo vnútri sporangia, sú jednobunkové a majú rôzny tvar - guľatý, vajcovitý, vretenovitý, trojuholníkový, pričom povrch môžu mať hladký, drsný, ryhovaný, ostnatý, obalený zväzkami chĺpkov. Hýfa, ktorá nesie sporangium sa

nazýva sporangiofór. Ak je pod sporangiolou lievikovite rozšírený, tato časť sa nazýva apofýza. Sporangiospóry sa líšia charakteristickým vetvením, hrúbkou, ohraničeným rastom a sfarbením. Sporangia môžu mať 1-4 spóry (sporangiole). Nemajú kolumelu a ich povrch tvorí blanka (hymen), ktorá môže byť kutizovaná (rod *Rhizopus*) alebo nekutizovaná (rod *Mucor*). Sporangia sú zvyčajne mnohospórové. Sú charakteristické pre skupinu zygomycétnych húb.

Pri askomycétnych mikroskopických hubách sa počas vegetatívneho rozmnožovania (konidiácie) tvoria nepohlavné bunky – konídie. Konídie - konidiospóry (exospóry) pri vyšších hubách vznikajú na fruktifikačných štruktúrach alebo špeciálnych hýfach – konidiofóroch. Delia sa na mikrokonídie (1-2 bunkové) a makrokonídie (viac ako 2-bunkové). Majú rôzny tvar, veľkosť a uloženie (v retiazke, sesilné, laterálne, na stopkách, vo zväzku, v hlavičke).

Konidiofóry vznikajú špecializáciou hýf vzdušného mycélia, na ktorých sa tvoria jednotlivé konídie alebo celé fruktifikačné štruktúry. Konidiofór môže byť septovaný alebo neseptovaný, pričom vetvenie a tvar konidiofórov je dôležitý diagnostický znak. Charakteristickými predstaviteľmi tejto skupiny sú rody *Aspergillus* a *Penicillium*.

Ak sa konídie tvoria jednotlivo, sú to primárne konídie, ktoré môžu pučať na sekundárne konídie. Primárne konídie sú väčšie a vytvárajú sa na osobitných miestach - konidiogénnych lokusoch alebo na určitých hýfach - konidiofóroch. Môžu sa tvoriť v retiazkach:

- akropetálne - na vrchole konidiofóru, pričom najmladšia konidia je v retiazke posledná
- sympodiálne - vytvárajúca sa konidia sa posunie z laterálnej polohy do terminálnej, a potom rastie a vytvára článok mycélia
- bazipetálne - najmladšia konidia je na báze retiazky

Typy blastickéj konidiácie:

- blastická - a/ akropetálna b/ synchronna (tvoria sa naraz a nevznikajú sekundárne konidiá)
- blastická sympodiálna - púčiky vznikajú vedľa seba súčasne (rod *Beauveria*)
- blastická anelidová - konídie vznikajú krátkymi priebežnými proliferáciami (*Scopulariopsis*)
- blastická fialidová - konídie vznikajú otvorom v bunkovej stene na osobitných bunkách - fialidách, ktoré majú rôzny tvar - člnkovité, fľaškovité, hruškovité, s golierikom, cez otvorenú bunkovú stenu vznikajú ďalšie púčiky v bazipetálnom poriadku (rody *Aspergillus*, *Penicillium*)

- blastická retrogresívna – konídie vznikajú v bazipetálnom poriadku, pričom najmladšia konídia je na báze konídiogénnej hýhy (*Trichothecium*)

Talusová – artritická konídiácia je charakteristická rozpadom hýf na pravidelné valčekovité (cylindrické) bunky – artrokonídie sú typické pre rody *Geotrichum* a *Trichosporon*.

4.2. Pohlavné rozmnožovanie

Druhým typom rozmnožovania je pohlavné (generatívne) rozmnožovanie mikroskopických húb, ktoré je rôzne pri zástupcoch oomycétnych, zygomycétnych askomycétnych aj bazídiomycétnych húb. Väčšina mikroskopických húb je haploidná, teda má jednu sadu chromozómov. Počas pohlavného rozmnožovania však prechodne môže nastať diploidný stav po splynutí jadier opačných párovacích typov húb. Haploidný stav sa obnoví po meióze. Nastať však môže aj prípad, kedy jadrá hneď nesplyvajú a takéto mycélium sa označuje ako dikaryotické. Neskôršie jadrá splynú a opäť prebieha redukčné delenie. Niektoré mikroskopické huby, ako kvasinka *Candida albicans* sú prirodzene diploidné, teda majú 2 kompletne sady chromozómov. V takomto prípade počas párovania vzniká zygota s genetickou výbavou $4n$, tá sa redukčne delí a nový jedinec je opäť diploidný.

Zástupcovia z oomycétnych húb tvoria odlišné gametangiá, a to samčie (anterídium) a samičie (oogónium). Pred oplodnením obsahuje oogónium veľa jadier, časť degeneruje, od centrálnej vakuoly sa radiálne delí cytoplazma a tvoria sa vajíčka - oosféry, ich počet je variabilný. Samčie anterídiá sú mnohojadrové, časť jadier zaniká, anterídium sa vetví smerom ku oogóniu. Proces je riadený chemotropicky. Vrchol anterídiá sa odtrhne a vytvorí sa fertilizačný mostík, ktorý preniká do oogónia, oplodní jednu oosféru, jadro sa spája s jadrom vajíčka. Oplodnené vajíčko - oospóra - prechádza zmenami - sú typické pre jednotlivé druhy, vajíčko dospeje a dochádza ku germinácii, počas ktorej prebieha meióza a vzniká nový haploidný jedinec (rod *Saprolegnia*).

Zygomycétne huby tvoria odlišné gametangiá, avšak zástupcovia tejto skupiny môžu byť homotalickí (samčí aj samičí pohlavný orgán je na jednej stielke) alebo heterotalickí (samčí a samičí pohlavný orgán je na rozdielnych stielkach). Pri heterotalických zygomycétnych hubách sa tvoria geneticky kompatibilné hýfy (+) a (-) – zygofoéry, ktoré sa kontaktujú a vznikajú dve progametangiá, medzi nimi je najskôr septum. Z nich sa formujú gametangiá, v ktorých septum zaniká a vzniká mladá diploidná zygošpora. Tá dozrieva do zygošpóry s hrubou bunkovou stenou, ktorá melanizuje. Farbivo melanín ju chráni pred

vonkajšími nepriaznivými vplyvmi. Pred jej klíčením prebieha redukčné delenie (rody *Zygorhynchus*, *Mucor*) a formujú sa haploidní jedinci.

Pri *Ascomycota* dochádza ku splývaniu samčích a samičích jadier v asku, ktoré vzniká buď priamo, splynutím buniek, alebo nepriamo, na konci askogénnej hýfy. Po ich splynutí vzniká zygota, ktorá sa meioticky delí na askospóry, pričom niekedy delenie pokračuje mitoticky a vznikajú viacbunkové askospóry. Ich uloženie v asku, počet a tvar je rôzny (guľatý, ovoidný, klobúčikovitý, elipsoiditý, vretenovitý, šošovkovitý). Asky môžu byť uložené voľne alebo do técia (výtrusorodej vrstvy). Podľa tvaru sa asky delia na apotécium, ktoré je otvorené a miskové; peritécium, ktoré je dovnútra uzatvorené otvorom (ostiola); kleistotécium, ktoré je podobné, ale bez ostioly (*Neosartorya fisheri*). Tvorba askospór je názorne dokumentovaná na životnom cykle *Saccharomyces cerevisiae*. Haploidné bunky opačného párovacieho typu α a α pučia a za istých podmienok dochádza k ich priblíženiu a tvorbe konjugačného mostíka, pričom vzniká diploidná bunka, ktorá môže prechádzať štádiom diploidného pučania. Potom vzniká askus, v ktorom dochádza ku meióze; vzniknuté askospóry sa uvoľnia a znova nastáva pučanie kvasiniek.

Tvary askospór môžu byť rôzne: guľovitý, elipsoidický, obličkovitý, polguľatý, kyjakovitý, klobúčikovitý a pod. Tvary askov tiež môžu byť rôzne: guľovitý, elipsoidický, romboedrický, lineárne usporiadanie askospór, s tubulom, s prívieskami.

Asky môžu vznikať aj nepriamym spôsobom. Príkladom je askogénna mikroskopická huba *Neurospora crassa*. V asexuálnom cykle sa tvoria rozdielne typy konídií, a to makrokonídiá (veľké, mnohoadrové) a mikrokonídiá (malé, jednojadrové). Asexuálny cyklus je rozdelený do dvoch fáz, a to na rast a reprodukciu. Pri pohlavnom rozmnožovaní haploidné mycéliá tvoria nezrelé plodnice – protoperitécia, pričom špirálovitá hýfa splynie s bunkou opačného párovacieho typu, jadrá v pároch splynú, vznikajú diploidné jadrá, ktoré sa meioticky delia a dávajú základ askospóram.

Basidiomycota - bazídiomycétne huby tvoria zygotu iným spôsobom ako askomycéty. Zygota sa predlžuje a vzniká bazídium. V ňom sa uskutoční meióza diploidného jadra, netvoria sa spóry, ale vyrastajú z neho výbežky – sterigmy, ktoré sa zväčšia, potom do nich putuje haploidné jadro, horný koniec sterigmy sa oddelí a vzniká bazídiospóra. Po dozretí bazídiospóry sa v mieste jej pripojenia objaví kvapôčka kvapaliny, ktorá narastá až do veľkosti 1/5 veľkosti spóry. Potom sa bazídiospóra aj s kvapôčkou odstreľí.

Tvorba bazídiospór je názorne opísaná na životnom cykle kvasinky *Rhodospidium toruloides*. Haploidné bunky opačných párovacích typov α a α konjugujú pomocou výpučkov a vznikajú zygoty, ktoré vyzerajú ako spojené s mostíkom. Jedna z nich klíči do pravého

mycélia s dvoma jadrami - dikaryotické mycélium, v ktorom sa migrácia jadier a tvorba priehradiek uskutočňuje pomocou spriažok. Na dikaryotickom mycéliu sa vytvárajú teliospóry, v nich nastáva karyogamia a meiotické delenie. Teliospóra klíči do štvorbunkového promycélia a každá bunka pučí do haploidného sporídia, tie sa ďalej rozmnožujú pučaním do haploidných kultúr, ktoré predstavuje rod *Rhodotorula*. Promycélium predstavuje bazídium a sporídie bazídiospóry. Po prebehnutí karyogamie nemusí hneď dôjsť k meióze a na promycéliu môžu vznikáť diploidné bunky, ktoré pučia do diploidnej kultúry. Tieto nevstupujú do párovacích interakcií.

5. Morfológia a tvorba fruktifikačných orgánov kvasiniek

Charakteristika rastu a morfológie kvasiniek zahŕňa:

- rast v tekutej pôde: zákal a usadenina (sediment), usadenina a prstenec, usadenina a miazdra (ostrovčeky), usadenina, zákal a šplhajúca sa kožka, usadenina, slabý zákal a hrubá kožka
- prvky vegetatívnej fruktifikácie: predstavujú tvorbu rôznych filamentov a nepohlavných spór, ktoré sú najčastejšie reprezentované:
 - a) blastokonídie (blastospóry) - pučiace kvasinky alebo pučiace bunky na koncoch a bokoch pravých hýf
 - b) artrokonídie - valčekovité bunky, na ktoré sa hýfa rozpadne (*Geotrichum*, *Trichosporon*)
 - c) chlamydospóry - veľké bunky s hrubou stenou, umiestnené väčšinou na koncoch hýf - koncové (*Candida albicans*)
 - d) balistospóry - vytvárajú sa na stopkách
- morfológia kultúry - tvorba výpučku a pravého mycélia, ktoré má viacjadrové články, hýfy sú delené septami, ktoré majú póry; pseudomycélia nepredstavuje diagnostický znak, lebo sa objavuje pri obmedzenej výžive
- tvorba špeciálnych produktov - tukových kvapôčok, vezikúl, kapsúl a pod.
- makrovzhľad a mikrovzhľad kolónie:
 - a) tvar – kolónia môže byť hladká plochá, hladká a v strede vyvýšená, hladká kráterovitá, plochá, drsne kráterovitá, vysoká drsná kučeravá, rozšírená plochá - hladká alebo múčna, korienkovitá
 - b) pruhovanie - zonálne- radiálne, sektorované
 - c) okraj - rovný - ucelený, laločnatý, pílovitý, cípovitý, korienkovitý
 - d) tvorba pseudomycélia na okraji kolónií - neprítomné, rudimentárne, stromčekovité, diferencované v pretiahnuté bunky v reťazcoch s blastokonídiami

Polymorfizmus - schopnosť tvoriť viacero morfologických foriem, ktoré spolu koexistujú.

Pomôcky - mikroskop, imerzný olej, štvorce buničitej vaty, nastaviteľné mikropipety, jednorazové špičky na pipety, podložné a krycie sklíčka, súprava pre prípravu sklíčkových kultúr, sterilné Petriho misky, pinzety, preparačné ihly, mikrobiologické očka, rukavice, mikrobiologické rúška, denaturovaný alkohol, dezinfekčný roztok

Kultivačné pôdy a iný materiál - Sabouraudova pôda, Sabouraudov agar, cibuľový agar, ryžový agar, YPD pôda, tekutá pôda RPMI 1640 -MOPS, sterilný fyziologický roztok, roztok N-acetylglukózamínu, roztok gentamicínu, roztok KOH, atrament

Mikroorganizmy - z oddelenia *Ascomycota* (pododdelenia *Saccharomycotina*) - *Saccharomyces cerevisiae*, *Picha anomala* (predtým *Hansenula anomala*), *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces javanensis* (predtým *Endomycoopsis javanensis*), *Kluyveromyces marxianus*

zo skupiny, ktorá nemá pohlavné rozmnožovanie - *Aureobasidium pullulans* (*Pezizomycotina*), *Candida albicans* (*Saccharomycotina*), *Geotrichum candidum* (*Saccharomycotina*), *Trigonopsis variabilis* (*Saccharomycotina*), z oddelenia *Basidiomycota* (pododdelenie *Ustilaginomycotina*) - *Rhodospidium toruloides* typ α

zo skupiny, ktorá nemá pohlavné rozmnožovanie *Rhodotorula glutinis* (*Pucciniomycotina*) *R. mucilaginosa* (predtým *Rhodotorula rubra*, *Pucciniomycotina*), *Trichosporon cutaneum* (alebo *Trichosporon beigeli*, *Agaricomycotina*), *Cryptococcus albidus* (*Agaricomycotina*).

Saccharomyces cerevisiae

makroskopia - tvorí bielo-krémové kolónie, optimálna teplota rastu je 25-28° C

mikroskopia - tvorí kvasinkové bunky rôzneho tvaru s multilaterárnym pučaním, niekedy tvorí malé pseudohýfy, askospóry umiestnené v askoch

patogenita - nie je patogénny, ale výnimočne môže spôsobiť infekcie u imunokompromitovaných pacientov

Picha anomala (predtým *Hansenula anomala*)

makroskopia - tvorí krémové kolónie, optimálna teplota rastu je 25-28 °C

mikroskopia - tvorí pseudohýfy a klobúčikovité askospóry

patogenita - považuje sa za saprofyt, fermentačná kvasinka

Kluyveromyces marxianus

makroskopia - tvorí krémové kolónie, v tekutej pôde vytvára miazdu alebo kožku

mikroskopia – vytvára elipsoidné alebo cylindrické bunky, niekedy v pároch alebo v retiazkach, tvorí pseudomycélium a asky s askospórami

patogenita - považuje sa za saprofyt, nie je patogén

Schizosaccharomyces javanensis (predtým *Endomycoopsis javanensis*)

makroskopia - tvorí žltobiele, veľké kolónie, po celom povrchu jemne kučeravé

mikroskopia – bunky sú citrónikovitého tvaru, nepučia, vytvára aj artrokonídie, ktoré sú pretiahnuté, tvorí pravé mycélium

patogenita - považuje sa za saprofyt, nie je patogén

Aureobasidium pullulans

makroskopia - tvorí tmavé nepriehľadné kolónie, slizovité, mycélium produkuje melanín

mikroskopia – blastokonídie sú rôzneho tvaru (elipsoidické, guľaté, vretenovité), tvorí dlhé tenké hýfy s interkalárnymi chlamydospórami, prípadne chlamydospóry, ktoré klíčia ako konídiové bunky

patogenita - považuje sa za saprofyt, ale vyskytuje sa aj ako parazit na rastlinách, chronická expozícia môže vyvolať alergické ochorenia pľúc

Candida albicans

makroskopia - tvorí krémové, hladké, lesklé kolónie, ktoré môžu byť korenkovité alebo kučeravé, v kvapalnom prostredí tvorí sediment a prstenec

mikroskopia – blastokonídie sú rôzneho tvaru (elipsoidické, guľaté, pretiahnuté), formuje výpučok s následnou tvorbou pravého mycélia, tvorí aj pseudomycélium a koncové chlamydospóry

patogenita - považuje sa za podmienený patogén, aj keď u časti populácie sa bežne nachádza v ústnej dutine, v tráviacom alebo urogenitálnom trakte

Geotrichum candidum

makroskopia - tvorí biele pápernaté kolónie, na kvapalných médiách tvorí kožku, ktorá je tiež biela

mikroskopia – hýfy sa rozpadajú na artrokonídie, ktorými sa rozmnožujú

patogenita – v prírode sa vyskytuje ako saprofyt, ale je to aj patogén rastlín, môže vyvolať infekcie u imunokompromitovaných pacientov

Trichosporon cutaneum (alebo *Trichosporon beigeli*)

makroskopia - tvorí biele až krémové kolónie, najskôr hladké, neskôr kučeravé až drsné, niekedy vytvára vzdušné mycélium na kvapalných médiách, v skúmavke tvorí šplhajúcu sa kožku, ktorá po určitej dobe zhrubne a spadne na dno

mikroskopia – tvorí pučiace blastokonídie rôznych tvarov a veľkostí, mycélium sa rozpadá na artrokonídie

patogenita – spôsobuje povrchové infekcie u ľudí, ale vyskytuje sa aj v prírode ako saprofyt

Rhodotorula glutinis

makroskopia – haploidná kultúra je červená, slizovitá, niekedy kučeravá

mikroskopia – je lipotvorná, tvorí malé guľovité alebo elipsoidické bunky, ktoré môžu byť pretiahnuté, okraj kolónie je ucelený, len zriedka tvorí primitívne pseudomycélium

patogenita – je to kontaminant, infekcie spôsobuje zriedkavo

Trigonopsis variabilis

makroskopia – tvorí krémové kolónie

mikroskopia – tvorí triangulárne alebo elipsoidické bunky, okrem nich aj štvorhranné a osemstenové, okraj kolónií je hladký, pseudomycélium nevytvára

patogenita – je to kontaminant

Cryptococcus albidus

makroskopia – tvorí krémové kolónie, náter je hladký a slizovitý

mikroskopia – vytvára guľaté alebo pretiahnuté bunky, má kapsuly, okraj kolónie je ucelený, nevytvára pseudomycélium ani pravé mycélium

patogenita – je to podmienený patogén, môže vyvolať infekcie u imunitne oslabených pacientov

Úloha č. 1 Makroskopická a mikroskopická charakteristika rastu kvasiniek.

Pozorujeme kolónie mikroorganizmov narastené na Sabouraudovom agare v Petriho miske po 24 h kultivácii a charakterizujeme makrovzhľad kolónie - tvar, farbu, vzhľad, okraj kolónií a konzistenciu. Ďalej pozorujeme nárast mikroorganizmov v tekutej 24 h kultúre pripravenej v YPD pôde, sledujeme tvorbu zákalu, kožky, sedimentu, prstenca. Z tekutej 24 h kultúry pripravíme natívny preparát a sledujem tvar buniek a prvky fruktifikácie - spór a filamentov. Na vopred pripravených sklíčkových kultúrach so Sabouraudovým a cibulovým agarom pozorujeme pod mikroskopom okraj kolónií a prvky vegetatívnej a generatívnej fruktifikácie.

Príprava sklíčkových kultúr je nasledovná: do Petriho misky na dno položíme hrubý filtračný papier navlhčený v sterilnej vode, naň položíme sterilné sklené trubičky ohnuté v tvare U. Na túto trubičku položíme sterilné podložné sklíčko, na ktoré prenesieme bločky (1x1) tenkého Sabouraudovho alebo cibulového agaru, na ktoré vlnkovite rozotrieme kultúry mikroorganizmov, neprikrývame krycím sklíčkom. Petriho miskú zakryjeme a kultivujeme 7 – 10 dní pri 28 °C.

Úloha č. 2 Tvorba chlamydospór

Pripravíme natívne preparáty z 10 - dňových kultúr kvasiniek kultivovaných na šikmom ryžovom agare a pozorujeme vytvorené interkalárne, koncové, prípadne konidiálne chlamydospóry.

Úloha č. 3 Tvorba výpučku a pravého mycélia

Pripravíme natívne preparáty zo skúmaviek, v ktorých boli kultúry kvasiniek kultivované v špeciálnych podmienkach na prípravu výpučku a pravého mycélia. Rast kvasiniek v podobe výpučku dosiahneme nasledovne: kvasinkovú kultúru kultivovanú celonočne na trepačke pri 28 ° C v pôde RPMI 1640-MOPS centrifugujeme pri 4000 g pri 4 ° C a premyjeme 2 krát fyziologickým roztokom. Po poslednom centrifugovaní kvasinky spočítame a pripravíme na hustotu 10^7 buniek/ml. Takto pripravenú suspenziu necháme hladovať vo fyziologickom roztoku 24 h pri 4 ° C staticky alebo kultivujeme na trepačke pri 150 RPM pri 28 ° C počas 2h. Potom bunky centrifugujeme a kultivujeme na trepačke (150 RPM) pri 37 ° C v RPMI 1640-MOPS médiu obohatenom o 300 mg/l N-acetylglukózoamínom až do vytvorenia výpučkov (2–3 h). Rast kvasiniek v podobe pravého mycélia pripravujeme tým istým spôsobom ale s tým rozdielom, že posledná kultivácia je 24 h na trepačke. Kvôli nežiaducemu rastu baktérií je do pôdy vhodné pridať 10 mg/l antibakteriálneho antibiotika gentamicín.

Úloha č. 4 Pozorovanie kultúry *Rhodosporidium toruloides*

Opačné párovacie typy *R. toruloides* typ α a α naočkujeme krížovým spôsobom na Saboraudov agar v Petriho miske. Kultúru necháme kultivovať 10 dní pri 28 °C. Pripravíme natívne preparáty zo stredu naočkovanej čiary (stará časť kultúry), z okraja (mladá časť kultúry) a z miesta prekríženia (miesto pohlavného rozmnožovania). Časť kultúry, ktorá sa pohlavne nerozmnožila, je červeno pigmentovaná, slizovitá a mäkká. Dikaryotická kultúra, v ktorej prebehlo pohlavné rozmnožovanie, je drsná, suchá, hnedá až čierna. V mikroskope je možné pozorovať prítomnosť teliospór, ktoré sú melanizované. Ak sa na okrajoch drsnej kultúry objavia červené, slizovité miesta, vytvorili sa sporídie, ktoré sa rozmnožujú.

6. Morfológia a tvorba fruktifikačných orgánov mikroskopických vláknitých húb.

Mikroskopické vláknité huby majú stielku tvorenú vláknami (hýfy), ktorých spleť tvorí mycélium. Mycélium môže byť vzdušné (generatívne), alebo vegetatívne. Generatívne mycélium nesie fruktifikačné orgány. Preto má hrubšie steny, hýfy majú apikálny rast, pričom môžu byť vetvené alebo nevetvené. Spôsob vetvenia je nepravidelný, práslenovitý, sympodiálny alebo dichotomický. Druhým typom mycélia je substrátové mycélium (vegetatívne), ktoré zabezpečuje výživu, a preto má tenké chitínové steny.

V nepriaznivých podmienkach huby môžu vytvoriť zvláštne štruktúry:

- chlamydospóry - majú zahustenú cytoplazmu a sú obalené hrubými ochrannými obalmi, sú to odpočívajúce útvary, umiestnené môžu byť interkalárne alebo terminálne.
- sklerócium - hustá spleť hýf zamotaná do tvrdého klobka
- stroma (lôžko) - tvrdý kompaktný útvar, ktorý je typický pre parazitické huby

Konídie - konídiospóry (exospóry) u vyšších húb vznikajú na fruktifikačných štruktúrach alebo špeciálnych hýfách – konídiofóroch. Delia sa na mikrokonídie (1-2 bunkové) a makrokonídie (viac ako 2-bunkové). Majú rôzny tvar, veľkosť a uloženie (v retiazke, sesilné, laterálne, na stopkách, vo zväzku, v hlavičke. Spôsob tvorby exospór môže byť bazipetálny (odškrcovanie) a bazifugálny (pučanie).

Konídiofóry vznikajú špecializáciou hýf vzdušného mycélia, na ktorých sa tvoria jednotlivé konídie alebo celé fruktifikačné štruktúry. Konídiofór môže byť septovaný alebo neseptovaný, pričom vetvenie a tvar konídiofórov je dôležitý diagnostický znak. Charakteristickými predstaviteľmi tejto skupiny sú rody *Aspergillus* a *Penicillium*.

Pomôcky - mikroskop, imerzný olej, štvorce buničitej vaty, nastaviteľné mikropipety, jednorazové špičky na pipety, podložné a krycie sklíčka, súprava pre prípravu sklíčkových kultúr, sterilné Petriho misky, pinzety, preparačné ihly, mikrobiologické očka, rukavice, mikrobiologické rúška, denaturovaný alkohol, dezinfekčný roztok

Kultivačné pôdy a iný materiál - Sabouraudova pôda, Sabouraudov agar, roztok laktofenolu, sterilný fyziologický roztok

Mikroorganizmy - z oddelenia *Glomerulomycota*, pododdelenia *Zygomycotina* – rody *Mucor*, *Rhizopus*, *Zygorhynchus*, *Absidia*, *Cunninghamella* a z oddelenia *Ascomycota* - rody *Byssochamys*, *Chaetomium*

Zo skupiny húb, ktoré nemajú pohlavné rozmnožovanie - rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Scedosporium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Trichoderma*, *Phoma*, *Trichothecium*, *Cladosporium*, *Humicola*, *Stachybotrys*, *Sepedonium*, *Scopulariopsis*

Mucor

makroskopia - biely až sivastý vatovitý vyšší rast

mikroskopia - hýfy široké, neseptované, veľké sporangium, sporangionosiče sa opakovane delia (typický znak), prítomná kolumela, po dozretí sa tvorí blanka, niektoré tvoria zygospóry, ktoré sú výsledkom pohlavného rozmnožovania

patogenita - výnimočne spôsobuje zygomýkózy, väčšinou kontaminant

Rhizopus

makroskopia - tmavý nižší rast, najskôr biele, neskôr sivé, až tmavohnedé mycélium

mikroskopia - tvorí rizoidy, široký neseptovaný, prípadne málo septovaný konídiofór, prítomná apofýza a kolumela

patogenita - výnimočne spôsobuje zygomýkózy, väčšinou kontaminant

Zygorhynchus

makroskopia - sivastý až zelenkavý rast kolónií

mikroskopia - tvorí zygospóru (veľká čierna bunka), homotalický, odlišné gametandiá (makro a mikro), môže formovať aj chlamydospóry

patogenita - pôdny mikroorganizmus

Lichtheimia (starší názov Absidia)

makroskopia - biele až svetlosivé kolónie, vysoké, rizoidné výrastky

mikroskopia - dlhé neseptované hýfy, hruškovité sporangiá, majú apofýzu, tvoria zygospóru

patogenita - vyvoláva systémové mykózy, zasahujú centrálny nervový systém, cievy, pľúca, tráviaci trakt, subkutánne infekcie, ale mnohé sú iba saprofyty v pôde alebo v odpadoch

Cunninghamella

makroskopia - svetlé až biele kolónie tvoriace výhonky, niekedy sfarbené do zelena

mikroskopia - neseptované hýfy, konídiofór hlavičkovite rozšírený, nesie na drobných stopkách konídie, niekedy tvorí zygospóry a chlamydospóry

patogenita - hlavne pôdny mikroorganizmus, zriedkavo vyvoláva infekcie u imunokompromitovaných pacientov

Neosartorya fisheri

makroskopia - modrozelený rast, neskôr hnedý

mikroskopia - tvorba askov typu kleistotécia, konídiové hlavičky sú stĺpcovité, konídie sú guľovité

patogenita - kontaminant, príležitostný patogén

Byssoschlamys nivea - jeho nepohlavná forma *Paecilomyces*

makroskopia - tvorí tmavé kolónie

mikroskopia - počas vegetatívnej fázy vytvára fialidy a aleuriospóry, tvorí asky s askospórami

patogenita - pôdny mikroorganizmus, vyskytuje sa v kaziacich sa potravinách alebo v krmivách, niektoré izoláty môžu produkovať mykotoxín patulín

Chaetomium sp.

makroskopia - biele kolónie so zelenkavým nádychom, opak kolónie je tmavý

mikroskopia - dlhé septované hýfy s veľkými peritéciami, olivovozeleňé až hnedé, asky obsahujú 4-8 spór

patogenita - kontaminant, príležitostne spôsobuje mykózy

Aspergillus sp.

makroskopia - najskôr biely vzhľad, potom dožltá, zelena, hnedá až čierna v závislosti od druhu

mikroskopia - tvorí septované hýfy, nerozvetvené konídiofóry, má vezikuly, fialidy sú fľaškovité, môžu byť samostatné alebo po dvoch - vtedy vyrastajú na metule

patogenita - pôvodca aspergilózy, ale vyskytuje sa aj ako pôdny a vzdušný kontaminant

Aspergillus niger - mycélium biele, žlté, neskôr čierne, dlhý konídiofór, pôvodca aspergilózy u oslabených pacientov, väčšinou je kontaminant

Aspergillus flavus - mycélium žlté, neskôr dozelená až hnedá, producent aflatoxínov a pôvodca aspergilózy u oslabených pacientov, väčšinou je kontaminant

Aspergillus fumigatus - mycélium biele, tmavozelené až zelené, pôvodca aspergilózy, je to obligátny patogén

Aspergillus clavatus - mycélium modré až dozelená, tvorí veľkú klavátnu vezikulu, nemá metuly, väčšinou je kontaminant, ale môže vyvolať aj ochorenia

Aspergillus ochraceus - mycélium žlté až okrovožlté, má dva rady fialíd, niekedy tvorí ružové, oranžové alebo červené sklerócia, zriedkavo býva patogénny, väčšinou kontaminant, producent ochratoxínu

Aspergillus versicolor – zeleno sfarbené mycélium s bielym okrajom, niekedy tvorí béžové až oranžové mycélium. Niektoré druhy produkujú do agaru ružový až červený pigment. Formuje metuly, na ktorých sú fialidy s konídiami – často tvorí redukované penicilátne konídiofóry. Vyskytuje sa v krmivách ale i v potravinách, môže byť izolovaný z klinického materiálu, môže produkovať mykotoxín sterigmatocystín.

Penicillium spp.

makroskopia - kolónie biele až zelené, na rozhraní biele, červené až hnedé

mikroskopia - vetvenie konídiofóru na ramy a metuly je významné pre diagnostiku, konídie často v retiazkach

patogenita - zriedkavo, väčšinou kontaminant

Fusarium spp.

makroskopia - kolónie biele vatovité, majú ružové až fialové centrum, niekedy sú čisto biele

mikroskopia - vetvenie konídiofóru na ramy a metuly je významné pre diagnostiku, konídie sú často v retiazkach, tvorí aj makrokonídie rožtekovitého tvaru, niektoré druhy tvoria chlamydospóry

patogenita - väčšinou kontaminant, spôsobuje mykózy u imunosuprimovaných pacientov

Paecilomyces varioti

makroskopia - kolónie biele, práškovité, niekedy žltohnedé až tmavoolivové

mikroskopia - septované hýfy, fialidy sú umiestnené v praslenoch, konídie v retiazkach, niekedy sa koncovo aj interkalárne tvoria chlamydospóry - jednotlivo alebo v retiazkach

patogenita - výnimočne spôsobuje keratinózy, väčšinou kontaminant

Scedosporium apiospermum - asexuálna forma druhu Pseudallescheria apiosperma

makroskopia - biele kolónie, bohaté vzdušné mycélium, neskôr až hnedé

mikroskopia - septované hýfy s krátkymi konídiofórmami

patogenita - ochorenia chronického charakteru - nechťov, vlasov, kože, očí, pľúc

Alternaria alternata

makroskopia - biele kolónie, neskôr až tmavohnedé s bielou kontúrou

mikroskopia - krátke hýfy, tvorí makrokonídie - septované v rôznych smeroch a nápadne sfarbené - diktyospóry

patogenita - kontaminant, zriedkavo spôsobuje infekcie, produkuje mykotoxíny

Botrytis cinerea

makroskopia - biele kolónie, neskôr zelenkavohnedé, vatovitý porast

mikroskopia - konídiofóry sú stromčekovité, konídie sa vytrusujú na malých zdurených konídiofóroch v podobe kvetu

patogenita - kontaminant, má pektinolytickú aktivitu

Trichoderma viride

makroskopia - biele vatovité kolónie, neskôr sfarbené do zelena, septované hýfy

mikroskopia - má septované hýfy, fialidy s konídiami, ktoré sú okrúhle, ale vyskytujú sa v klastroch

patogenita - kontaminant, ale zriedkavo môže byť aj pôvodca infekcie

Phoma sp.

makroskopia - práškovité kolónie zelené, hnedé až dočierna

mikroskopia - dlhé septované hýfy, asexuálna forma - pyknida - býva okrúhla, otvorená cez ostiolu, konídie sa formujú vo vnútri pyknidy

patogenita - kontaminant, príležitostne spôsobuje mykózy

Trichothecium roseum

makroskopia - najskôr svetlý, neskôr ružový až oranžový porast

mikroskopia - dlhé septované hýfy, konídiofóry sú dlhé, nevetvené, konídie hruškovité a dvojbunkové - aleuriospóry

patogenita - kontaminant, príležitostne spôsobuje mykózy, produkuje toxín trichotecín

Cladosporium apiospermum

makroskopia - povrch kolónie so zelenkavým nádychom, hnedý až čierny

mikroskopia - septované hýfy, konídie vynikajú pučaním (blastospóry), konídiofóry sú tmavé vo zväzkoch, niekedy tvorí 1 - 3 bunkové konídie

patogenita - nie je patogénny, saprofytický kontaminant

Humicola sp.

makroskopia - biele, šedé až šedočierna kolónie

mikroskopia - tvorí aleuriospóry v krátkych retiazkach, tvorí interkalárne chlamydospóry

patogenita - pôdny mikroorganizmus, rozkladá celulózu

Stachybotrys alternans

makroskopia - biele kolónie, neskôr čierne

mikroskopia - dlhé septované hýfy, konídiofóry vetvené, pigmentované, obsahujú 3-10 fialíd, konídie sú tmavé, oválne

patogenita - všeobecne sa považuje za kontaminant, produkuje toxín

Sepedonium sp.

makroskopia - pri 25 ° C sú kolónie najskôr biele a vatovité, neskôr dožltá, pri 37 ° C narastú so zelenkavým nádychom, opak kolónie je oranžový

mikroskopia - septované hýfy s jednotlivými alebo rozvetvenými konídiofórmami, tvorí aj chlamydospóry, netvorí mikrokonídie

patogenita - kontaminant, parazity vyšších húb

Scopulariopsis brevicaulis

makroskopia - kolónie sú najskôr biele plstnaté, neskôr vytvárajú nízky zamatový porast - žltohnedý, škoricový, až čokoládový s tenkým druhotným mycéliom

mikroskopia - septované hýfy, na konídiofóroch sú anelidy, konídie sú veľké a okrúhle

patogenita - kontaminant, príležitostne spôsobuje hĺbkové infekcie nechtov

Úloha č. 1 Makroskopická charakteristika rastu.

Pozorujeme kolónie mikroorganizmov narastené na Sabouraudovom agare v Petriho miske po 10-dňovej kultivácii a charakterizujeme makrovzhľad kolónie - tvar, farbu, vzhľad, konzistenciu.

Úloha č. 2 Mikroskopická charakteristika rastu.

Pozorujeme nárast mikroorganizmov na vopred pripravených sklíčkových kultúrach so Sabouraudovým agarom, všímame si okraj kolónií a prvky vegetatívnej a generatívnej fruktifikácie. Príprava sklíčkových kultúr je podobná ako pri kvasinkách, len očkovaná kultúra sa prikryje krycím sklíčkom a dĺžka kultivácie je až 10 dní.

Z pevnej pôdy pripravíme pomocou preparačnej ihly natívne preparáty húb v laktofenolovom roztoku a sledujeme morfológiu a prvky fruktifikácie - prítomnosť rôznych druhov spór a spôsob filamentácie.

7. Dermatofyty

Dermatofyty - tvoria osobitnú skupinu mikroskopických húb, ktoré sú pôvodcami infekcií rohovej vrstvy kože, vlasov, ochlpených častí tela a nechtov. Infekcie sú známe pod názvom „dermatomykózy“ alebo v angloamerickej lekárskej literatúre sú označované ako „tinea“, čo znamená kožné mykotické ochorenie. Dermatofyty môžu invadovať aj do subkutánných vrstiev. Kolonizujú tkanivá alebo štruktúry, ktoré obsahujú keratín. Rozširujú sa priamym kontaktom s infikovaným hosťiteľom (človek alebo zviera), ale aj nepriamo, a to vlasmi, kožou, hrebeňmi, posteľným prádlom, uterákmi, obuvou a podobne. Pôvodne obsahovali tri rody, a to *Epidermophyton*, *Trichophyton* a *Microsporum*. Pohlavné štádium niektorých druhov zo spomenutých rodov predstavuje rod *Arthroderma*. V systéme boli spomenuté dermatofyty zaradené do ríše Fungi, oddelenia *Ascomycota*, triedy *Eurotiomycetes*, radu *Onygenales* a čeľade *Arthrodermataceae*. Nedávna multilokusové fylogenetické štúdie zmenili taxonómiu dermatofytov. V súčasnosti obsahujú niekoľko rodov: rod *Arthroderma* obsahuje 21 druhov; *Ctenomyces* má jeden druh; *Epidermophyton* má jeden druh (*Epidermophyton floccosum*); *Lophophyton* má jeden druh (*Lophophyton gallinae*, predtým *Microsporum gallinae*); *Microsporum* obsahuje tri druhy - *Microsporum audouinii*, *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum*; *Nannizzia* obsahuje deväť druhov (*Nannizzia fulva*, *Nannizzia gypsea*, *Nannizzia nana* a *Nannizzia persicolor* boli preradené z rodu *Microsporum*) a *Trichophyton* obsahuje 16 druhov ako napríklad *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*. Okrem toho boli zavedené dva nové rody: *Guarromyces* obsahujúci jeden druh a *Paraphyton* s tromi druhmi.

Dermatofyty sa rozdeľujú podľa miesta ich prirodzeného výskytu:

- antropofilné – spôsobujú infekcie ľudí a zvierat, pričom infekcie zvierat sú zriedkavé
Medzi antropofilné dermatofyty patria *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum ferrugineum*, z rodu *Trichophyton*, napríklad, *Trichophyton interdigitale* (pôvodne *T. mentagrophytes* varieta *interdigitale* alebo varieta *nodulare*), *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum*.
- zoofilné - patogénne pre zvieratá, človek sa môže nakaziť s infikovanými mačkami, psami, dobytkom, koňmi, vtákmi a inými zvieratami
Medzi zoofilné dermatofyty boli zaradené *Microsporum canis* (mačky, psy), *Microsporum equinum* (kone), *Nannizzia nana* (pôvodne *Microsporum nanum* - prasatá), *Nannizzia*

persicolor (pôvodne *Microsporum persicolor* - hlodavce), *Trichophyton equinum* (kone), *Trichophyton mentagrophytes* (predtým *Trichophyton mentagrophytes* varieta *mentagrophytes* alebo varieta *granulosum*, hlodavce, králiky, morčatá), *Arthoderma simii/Trichophyton simii* (opice), *Trichophyton verrucosum* (dobytok)

- geofilné - pôdne, ale môžu infikovať aj ľudí a zvieratá

Medzi geofilné druhy boli zaradené, napríklad *Nannizzia gypsea*, *Nannizzia fulva*, *Nannizzia persicolor*, *Arthoderma racemosum/Microsporum racemosum*, *Arthoderma insingulare* (predtým *Trichopyton terrestre*), *Arthoderma uncinatum* (predtým *Trichopyton ajelloi*).

Ochorenia sú pomenované podľa miesta výskytu – tinea pedis – chodidlo, tinea barbae – brada, fúzy, tinea capitis - čelo, obočie, mihalnice, tinea corporis - tvár, krk, tinea cruris – slabina, oblasti podbruška, tinea unguium - nechty. Tinea pedis býva veľmi často spôsobená *E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. interdigitale*. Tinea barbae je väčšinou spôsobená zoofilnými hubami, ako sú *T. mentagrophytes* a *T. verrucosum*. Tinea capitis je najčastejšie spôsobená *T. tonsurans* a *M. canis*. Tinea corporis je vyvolaná hlavne druhom *T. rubrum*. Tinea cruris je vyvolaná hlavne *T. rubrum* a *E. floccosum*. Tinea pedis sa vyskytuje najčastejšie a jej vyvolávateľmi sú *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* a *T. rubrum*.

Na identifikáciu sa odoberá rôznych materiálov - koža, nechty, vlasy. V diagnostike týchto mikroorganizmov sa uplatňuje mikroskopia, makroskopia, stanovenie rýchlosti rastu, schopnosť tvoriť pigmenty, ale aj niektoré fyziologické a biochemické reakcie.

Makroskopia je založená na charakteristike kolónií - sleduje sa morfológia, farba, povrch, okraj, textúra, ktorá môže byť granulovaná, prachová, vlnovitá. Zároveň sa sleduje dĺžka rastu a pigmentácia. Na rozdielnej dĺžke rastu sa podieľa živná pôda, teplota inkubácie (optimum je 24-26 ° C) a veľkosť inokula. Rýchlorastúce druhy sa dajú určiť už po 5 až 10 dňoch inkubácie, iné po 2 až 3 týždňoch a niektoré ešte neskôr. Veľmi dôležitá je mikroskopia, a to sledovanie tvorby mikrokonídií a makrokonídií a ich tvarov. Väčšinou sa robí natívny preparát v laktofenole.

Veľmi dôležitú úlohu majú fyziologické testy:

- *in vitro* perforácia vlasov - dôkaz pre druhy *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* ale aj pre rody *M. canis* a *M. audouinii*, ktoré tvoria perforačné kanáliky a lytické jamky, kým a *T. rubrum* vlasy nelyzuje.
- nutričné testy – slúžia na odlíšenie dermatofytov, pričom sa tvoria špecifické konídie. Základ tvorí kazeínové bazálne médium bez vitamínov (Trychophyton agar No1), do

ktorého sa pridávajú nasledovné vitamíny a ich kombinácie: histidín, inozitol, inozitol s tiamínom alebo tiamín s kyselinou nikotínovou. Napríklad, *T. equinum* potrebuje pre svoj rast kyselinu nikotínovú, *Trichophyton verrucosum* tiamín a niekedy aj inozitol, tiamín potrebujú aj *Microsporum ferrugineum*, *T. tonsurans* a *Trichophyton verrucosum*. Histidín pre svoj rast v agare vyžaduje *Trichophyton megninii*.

- enzymatické testy
1. ureázový test - *T. mentagrophytes* produkuje ureázu, teda test je pozitívny a *T. rubrum* – neprodukuje ureázu, test je negatívny. Princíp testu spočíva v tom, že rody produkujúce ureu rozkladajú močovinu prítomnú v kultivačnom médiu, v dôsledku čoho sa uvoľňuje čpavok, ktorý alkalizuje pôdu. Výsledkom toho dochádza k zmene zafarbenia pôdy na červeno.
 2. lipázový test - *T. mentagrophytes* produkuje lipázu, teda test je pozitívny a *T. rubrum* – neprodukuje lipázu, test je negatívny. Princíp testu spočíva v tom, že rody produkujúce lipázu rozkladajú olivový olej, ktorý sa pridáva do kultivačnej pôdy, v dôsledku čoho sa pôda alkalizuje a mení zafarbenie zo zelenej na postupne až silno modrú.
 3. tvorba pigmentov – je charakteristická hlavne pre druhy *T. rubrum* a *T. mentagrophytes*. Tieto rody na zemiakovom agare tvoria pigmenty.
 4. rast na ryžovom substráte – slúži na odlíšenie *M. canis*, ktorý rastie veľmi dobre of *M. audouinii*, ktorý buď nerastie alebo je jeho rast veľmi slabý.

Na rýchlu identifikáciu dermatofytov sa môže využiť aj PCR, prípadne MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry - hmotnostná spektrometrie). MALDI-TOF MS slúži k rýchlej a presnej identifikácii. Táto technika pracuje na základe analýzy proteínových spektier, ktoré porovnáva s referenčnými spektrami. Spektrá sú charakteristické pre istý druh. Na analýzu stačí malé množstvo z kolónie a výsledok je za 3-6 dní.

Pomôcky - mikroskop, imerzný olej, štvorce buničitej vaty, automatické pipety, sterilné špičky podložné a krycie sklíčka, pinzety, preparačné ihly, mikrobiologické očka, rukavice, mikrobiologické rúška, denaturovaný alkohol, dezinfekčný roztok

Kultivačné pôdy a iný materiál - Sabouraudov agar obohatený glukózou, agar pre ureázový test, agar pre lipázový test, sterilné Petriho misky s vysterilizovanými vlasmi, roztok laktofenolu, sterilný fyziologický roztok, sterilné špáradlá, sterilné mikroskúmvky 1,5 ml *Trichophyton mentagrophytes* (predtým var. *mentagrophytes* a var. *granulosum*)

makroskopia - biele kolónie, uprostred slabo žlté, práškovité alebo granulárne, stred mierne zdvihnutý, okraj biely, spodná strana neurčito žltkavá, niekedy žltohnedá, pôda nesfarbená

mikroskopia - makrokonídie sú kyjovité, pretiahnuté s priečnymi septami, je ich málo, niekedy chýbajú, mikrokonídie sú guľaté, oválne, jednotlivo alebo v hroznovitých útvaroch, niekedy tvorí chlamyospóry, typické sú aj špirálovité hýfy, hydrofyzuje ureu a perforuje vlasy

patogenita – antropofilný, spôsobuje ochorenia človeka a zvierat, napáda hlavne vlasy, fúzy, kožu, nechty

Trichophyton interdigitale (predtým *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*)

makroskopia - biele vláknité kolónie, uprostred svetložlté, prachovité alebo slabo zrnité rast, okraj biely, vláknitý, spodná strana špinavožltá až žltohnedá, pôda nesfarbená

mikroskopia – zriedkavo tvorí klavátne multiseptované makrokonídie, mikrokonídie sú na vláknach jednotlivo alebo v zhlukoch, tvorí zriedkavo špirálovité hýfy, test na produkciu ureázy a perforáciu vlasov je pozitívny

patogenita - antropofilný, spôsobuje ochorenia človeka a zvierat - tinea pedis, tinea cruris - koža, nechty

Trichophyton rubrum (predtým *T. rubrum* var. *rubrum*)

makroskopia - karmínovo červené až červenofialové nízke kolónie, uprostred zvýšené, okolo stredu býva fialový prstenec, spodná strana má červený odtieň, menej často žltý

mikroskopia - makrokonídie sa nemusia vyskytovať, ale niektoré kmene ich vytvárajú, ak sa netvorí, ich stimulácii pomôže kultivácia na zemiakovom agare, mikrokonídie sú umiestnené v hroznách, menej často bývajú chlamyospóry, test na produkciu ureázy a perforáciu vlasov je negatívny

patogenita - antropofilný, spôsobuje ochorenia človeka a zvierat - tinea cruris, tinea pedis, tinea corporis infikuje hlavne kožu a nechty

Tento rod mal predtým aj ďalšie variety, napríklad, : *T. rubrum* var. *flavum*, *T. rubrum* var. *nigricans*

Trichophyton tonsurans

makroskopia - prachovité alebo zamatovobiele kolónie, stred zvráskavený, gombičkovitý, okraj kruhovitý, vláknitý, spodná strana je sfarbená v koncentrických zónach dožltá, až dohneda

mikroskopia - makrokonídie sú hladké, zakrivené, v malom množstve, mikrokonídie sú guľovité, oválne, hruškovité; v starších kultúrach sa produkujú početné obrovské formy mikrokonidií a chlamyospóry, test na produkciu ureázy a perforáciu vlasov je pozitívny

patogenita - antropofilný, spôsobuje častokrát chronické ochorenia človeka a zvierat - tinea pedis, tinea capitis, postihuje kožu, nechty

Microsporum canis

makroskopia - biele až šedobiele kolónie, uprostred žlté až žltoranžové, prachovité s radiálnymi zárezmi

mikroskopia – makrokonídie sú vretenovité, na oboch koncoch zašpicatené, majú silné steny, mikrokonídie sú hruškovité alebo kyjovité, hladké, jednobunkové, tvoria interkalárne chlamydospóry, test na perforáciu vlasov je pozitívny

patogenita – zoofilný dermatofyt celosvetovej distribúcie, príčina ochorení u ľudí, najmä detí, infikuje vlasy, pokožku spôsobuje granulómy kože a podkožia, zriedkavo nechty, zdrojom sú hlavne domáce zvieratá ako mačky a psy

Microsporum gypseum

makroskopia - biele kolónie so šedo zeleným nádychom, zrnitý až prachovitý, spodná strana je sfarbená do oranžova, na vlasoch tvorí spóry

mikroskopia - makrokonídie sú vretenovité, majú silné steny s výrastkami, mikrokonídie sú v hrozičkách, niekedy tvorí chlamydospóry, test na perforáciu vlasov je pozitívny

patogenita – je geofilný, vyskytuje sa v pôde, spôsobuje ochorenia človeka a zvierat - tinea pedum, tinea capitis

Epidermophyton floccosum

makroskopia - šedobiele kolónie so silným žltozeleným nádychom, stred zdvihnutý so zárezmi, okraj biely alebo šedý, rozbiehajúci sa do lúčov, spodná strana špinavo žltozelená až hne do oranžová, pôda v okolí kolónie je žltá

mikroskopia - makrokonídie sú v skupinkách, s priečnymi septami, interkalárne silné chlamydospóry, mikrokonídie sa nevytvárajú

patogenita – spôsobuje ochorenia človeka - tinea pedis, tinea capitis - koža, nechty, pri zvieratách sa vyskytuje vzácné

Úloha č. 1 Makroskopická a mikroskopická identifikácia

Pri identifikácii dermatofytov pozorujeme makroskopicky nárast, textúru, okraj a zafarbenie kolónií dermatofytov, ktoré rástli 7 –10 dní na Sabouraudovom agare obohatenom glukózou. Z tejto kultúry pripravíme natívne preparáty v laktofenole. Sledujeme prítomnosť makrokonídií a mikrokonídií a ďalších štruktúr typických pre dermatofyty.

Úloha č. 2 Ureázový test

Na tento test sa používa agarová pôda s prídavkom močoviny a fenolovej červene. Pôda je pri pH 6.8 bezfarebná. Do stredu Petriho misky s touto pôdou urobíme jamku sterilnou špičkou. Do tejto jamky kvapneme asi 50 až 100 µl z hustej suspenzie mikroorganizmu v sterilnom fyziologickom roztoku, ktorý bol pripravený v mikroskúmavke pred očkovaním. Naočkovanú pôdu kultivujeme 7 dní pri 25 °C. Ak kmeň produkuje ureázu, zmení sa zafarbenie pôdy na červenú v dôsledku alkalizácie pôdy.

Úloha č. 3 Lipázový test

Na tento test sa používa agarová pôda s prídavkom olivového oleja a roztoku farbičky nílskej modrej. Do stredu Petriho misky s touto pôdou urobíme jamku sterilnou špičkou. Do tejto jamky kvapneme asi 50 až 100 µl z hustej suspenzie mikroorganizmu, ktorú pripravíme ako pri predchádzajúcej úlohe. Naočkovaný mikroorganizmus kultivujeme 35 dní pri 25 °C. Ak kmeň produkuje lipázu, zmení sa zafarbenie pôdy na tmavozelenú až modrú.

Úloha č. 4 Fyziologické testy

Tento test sa nazýva aj test na odlíšenie rodu *Trichophyton*. Základná agarová pôda obsahuje nasledovné kombinácie rastových faktorov:

- agarová pôda bez vitamínov
- agarová pôda s prídavkom inozitolu
- agarová pôda s prídavkom inozitolu a tiamínu
- agarová pôda s prídavkom tiamínu
- agarová pôda s prídavkom kyseliny nikotínovej
- agarová pôda s prídavkom dusičnanu amónneho
- agarová pôda s prídavkom dusičnanu amónneho a histidínu

Očkovanie Petriho misky je podobné ako v predchádzajúcich prípadoch. Naočkovanú pôdu kultivujeme 7 – 14 dní pri 25 °C.

Úloha č. 5 Testovanie tvorby pigmentov

Tento test sa používa na odlíšenie tvorby pigmentov u *T. mentagrophytes* a *T. rubrum*. Používa sa zemiakový agar s obsahom glukózy. Pri očkovaní sa postupuje rovnako ako v predchádzajúcich úlohách. Kultivácia trvá 7 - 14 dní pri 25 °C. *T. rubrum* produkuje na zemiakovom agare červený pigment.

Úloha č. 6 In vitro perforácia vlasov

Do Petriho misky sa nasype 20 – 30 fragmentov detských vlasov, ktoré sa vysterilizujú. Po vychladnutí sa pridá sterilná voda s pár kvapkami sterilného kvasničného extraktu. Vlasý

naočkujeme drobnými kúskami mycélia z 10 – 14 dňovej kultúry a inkubujeme 2 – 4 týždne pri 25 °C. Pozitívnym výsledkom sú kanáliky a lytické jamky vo vlasoch.

8. Základy lekárskej mykológie

8.1 Klasifikácia mykotických infekcií

Fungálne infekcie - mykózy sú všeobecne rozšírené ochorenia človeka, ale aj zvierat. Môžu postihnúť rôzne časti tela od jeho povrchových častí ako koža, sliznice, ale aj vnútorné orgány ako pečeň, obličky, pľúca alebo mozog. Huby sa môžu šíriť krvným riečiskom a vyvolať veľmi závažnú infekciu – fungémiu. Zvlášť ohrozenou skupinou sú pacienti s imunodeficienciami a tí, ktorí sú podrobení onkologickej liečbe, transplantácii alebo iným vážnym operáciám. Keďže populácia rizikových ľudí narastá, rozširuje sa aj spektrum húb vyvolávajúcich ochorenia a narastá aj počet infekcií spôsobených oportúnnymi fungálnymi patogénmi. Mnoho hĺbkových invazívnych infekcií je problematické identifikovať, ako aj liečiť.

Klasifikácia mykotických infekcií

1. podľa miesta výskytu sa delia na povrchové, kutánne, subkutánne a hlbkové
2. podľa spôsobu šírenia
3. podľa virulencie

Povrchové infekcie sú limitované na vrchnú vrstvu pokožky (stratum corneum). Kutánne infekcie postihujú povrchové štruktúry ako sú vlasy či nechty, ale predstavujú aj slizničné infekcie. Infekcie sú lokalizované nielen vo vrchnej vrstve pokožky, ale aj hlbšie v pokožke. Subkutánne infekcie zahŕňajú rôzne mykologické ochorenia subkutánnych tkanív. Pri hĺbkových infekciách sú postihnuté rôzne orgány ako pľúca, kosti, pečeň, centrálny nervový systém. Najčastejším miestom vstupu je dýchací a gastrointestinálny trakt. Nebezpečné je šírenie húb krvnou cestou. Fungémie sú z terapeutického hľadiska problémové a ťažko zvládnuteľné.

Z hľadiska šírenia mikroskopických húb sa rozlišujú viaceré cesty infekcie, pričom sa berie do úvahy, či bol zdroj endogénny alebo exogénny. Pri exogénnom zdroji sa huby môžu šíriť vzduchom alebo priamo kontaktom (z infikovanej kože, nechtov, vlasov). Pri endogénnej infekcii sa berie do úvahy kolonizácia jedinca mikroskopickými hubami, prípadne reaktivácia húb z latentnej infekcie samotného hostiteľa.

Vzhľadom na virulenciu sa mikroskopické huby delia na primárne patogénne a oportúnne patogény. Kým primárny patogén je schopný vyvolať infekciu aj u zdravého jedinca, oportúnne patogény obyčajne spôsobujú ochorenia u jedincov s oslabeným

imutitným systémom alebo v prípade iného ochorenia, ktoré je, napríklad liečené antibiotikami.

Mnohé infekcie sú asociované s používaním medicínskych pomôcok, ako sú katétre, kĺbové náhrady, umelé chlopne a podobne. Biofilm sa líši od planktonických (voľne pohyblivých) buniek. Fungálny biofilm reprezentuje vysoko heterogénnu štruktúru pozostávajúcu z bunkových i nebunkových foriem. Celý tento komplex je tvorený pri kvasinke *Candida albicans* kvasikami, pseudohýfami a pravými hýfami, ktoré sú ponorené v polotekutej hmote produkovanej bunkami - v extracelulárnom matrixe. Pravé hýfy môžu byť prítomné aj pri *Candida dubliniensis* či *Candida tropicalis*. Pri iných kvasinkách, ako *Candida glabrata* či *Candida krusei* je biofilm tvorený výlučne kvasinkami. Pri *Candida parapsilosis* sú prítomné kvasinky a pseudohýfy. Celý proces formovania biofilmu možno rozdeliť do niekoľkých na seba nadväzujúcich krokov. Adherencia je prvá fáza, ktorá v sebe zahŕňa prilnutie buniek či už k cudzím povrchom ako sú medicínske pomôcky alebo k hostiteľskému tkanivu. Následne po adherencii dochádza k proliferácii a bunky filamentujú (ak majú túto schopnosť) a produkujú extracelulárny matrix. Maturačná fáza je charakteristická zvýšenou produkciou hýf a pseudohýf. Poslednou fázou je disperzia, v ktorej sa dcérske bunky uvoľňujú z maturovaného biofilmu a môžu dať základ pre tvorbu nového biofilmu. Bunková stena kvasinky *C. albicans* predstavuje kľúčový krok v iniciácii interakcie medzi kvasinkou a hostiteľom. Základnými komponentmi bunkovej steny tejto kvasinky sú polysacharidy a proteíny, ktoré sú na seba úzko viazané. Trieda polysacharidov je zastúpená glukánmi, manánmi a chitínom, ktoré sú tvorené zložkami glukózy, manózy a N-acetylglukózamínom. Proteíny sú v bunkovej stene glykozylované a najviac zastúpené sú manoproteíny. Hydrofobicita bunkového povrchu sa považuje za významný faktor, ktorý prispieva k virulencii kvasiniek. Bunky, ktoré sú súčasťou biofilmu a spôsobujú kandidózy, sú väčšinou tvorené spleťou kvasiniek a hýf, ktoré sú vysoko hydrofóbne. Vyšší pomer hydrofóbnych buniek prispieva k lepšiemu prilnutiu k endoteliálnemu alebo epiteliálnemu povrchu. Bunková stena hydrofóbnych a hydrofilných buniek je veľmi podobná, líši sa však v ultraštruktúre. V súčasnosti je najlepšie preštudovaný biofilm pri kvasinke *C. albicans*. Tvorba extracelulárneho matrixu je jednou z najcharakteristickejších črt biofilmu. Tvorí ju gélu podobná, vysoko hydratovaná hmota, v ktorej sú mikroorganizmy imobilizované. Obsah a chemické zloženie matrixu sa mení v závislosti od prostredia, v ktorom sa mikroorganizmus vyskytuje. Väčšinou je tvorený exopolysacharidmi. Menší podiel tvoria proteíny, nukleové kyseliny a lipidy. Matrix biofilmu sa výrazne odlišuje od výlučku planktonických buniek. V prípade biofilmu *C. albicans*, bol menší podiel polysacharidov (41 %) a proteínov (5 %),

naproti tomu mal matrix väčší podiel glukózy (16 %) a galaktózy. Infekcie asociované s biofilmom sú problematické aj z hľadiska liečby. Biofilmy sú zvyčajne rezistentné voči konvenčným antifungálnym látkam a v liečbe je nutné použiť kombináciu viacerých látok.

8.2 Antifungálne látky a testovanie citlivosti

Súčasnú antifungálnu látku určenú pre liečbu fungálnych infekcií, sú rozdelené do niekoľkých tried podľa účinku ich pôsobenia na polyény, azoly, echinokandíny, flucytozín, alylamíny a iné terapeutiká (grizeofulvín, tolnaftát). Polyény predstavujú látky s fungicídny účinkom, ktoré majú najširšie spektrum účinku. Do tejto triedy sa zaraďujú amfotericín B a nystatín, ktoré sa interkalujú do membrán obsahujúcich ergosterol a formujú tak kanály, ktorými sa naruší protónový gradient, čo spôsobí smrť bunky. Rezistencia voči polyénovým antimykotikám nie je častá ako napríklad v prípade azolov, avšak môže sa vyskytnúť pri niektorých druhoch ako *C. glabrata*, *C. lusitanae* alebo *C. guilliermondii*. Rezistencia je následkom zmeny v sterolovom zložení membrán, prípadne zmenou orientácie ergosterolu v membráne, následkom ktorej už nedochádza k interakcii s antifungálnou látkou. Tieto zmeny súvisia s mutáciami v génoch ergosterolovej dráhy, hlavne v *ERG2* alebo *ERG3*.

Azoly zahŕňajú druhú skupinu antifungálnych látok. Delia sa na imidazoly (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol) a triazoly (flukonazol, itrakonazol). Účinok azolov spočíva v inhibícii ergosterolovej biosynthetickej dráhy, a to v ich interakcii s enzýmom lanosterol 14-alfa lanosterol demetyláza, ktorý je zodpovedný za konverziu lanosterolu na ergosterol, čo vedie k poškodeniu funkcie membrán v bunkách. Flukonazol predstavuje najefektívnejšiu z látok pri liečbe orofaryngeálnych a vaginálnych kandidóz. Enzým 14-alfa lanosterol demetyláza je kódovaná génom *ERG11*. Blokovaním jeho funkcie dochádza k akumulácii toxických sterolových medziproduktov a spomalenie rastu (fungistatický účinok). Najčastejším mechanizmom rezistencie pri *C. albicans* je nadexpresia alebo mutácie v géne pre cieľový enzým (*ERG11*). Druhým mechanizmom je nadexpresia efluxných púmp zo skupiny ABC transportérov - génov *CDR1*, *CDR2* a zo skupiny MFS – gén *MDR1*.

Echinokandíny sú antibiotiká, ktoré boli objavené v 70-tych rokoch 20. storočia náhodným skrúningom sekundárnych metabolitov rodov *Aspergillus* a *Penicillium*. Ide o molekuly cyklických hexapeptidov, ktorých bočné lipidové reťazce sú rôzne modifikované, a práve bočné reťazce sú esenciálne pre ich antifungálnu aktivitu. Pôsobia ako nekompetitívne inhibítory enzýmu β -1,3-glukán syntázy, ktorá predstavuje kľúčový enzým v syntéze glukánu bunkovej steny húb. Pri väčšine mikroskopických húb je bunková stena tvorená kovalentne viazanými polysacharidmi - β -1,3-glukánom a chitínom, ktoré tvoria

primárnu sieť bunkovej steny, udávajú tvar bunke. Medzi echinokandíny patria kaspofungín, anidulafungín a mikafungín. Kaspofungín bol prvý echinokandín schválený FDA na používanie v praxi v USA (Food and Drug Administration, USA). Echinokandíny bývajú podávané intravenózne a majú účinnosť voči takmer všetkým druhom rodu *Candida*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis* sp., ale sú málo účinné na *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* sp. a *Scedosporium* sp. Pri niektorých izolátoch *C. albicans*, ale hlavne *C. parapsilosis* boli popísané kmene so zníženou citlivosťou na echinokandíny v dôsledku bodových mutácií v géne *FKSI*.

Látka 5-fluorocytosín je nukleozidový analóg. Spôsob jeho účinku spočíva v prerušení DNA syntézy. Táto látka sa primárne používa v kombinácii s amfotericínom B, pretože ak sa aplikuje samostatne, kvasinky rýchlo vyvinú rezistenciu voči nej. Hlavným mechanizmom rezistencie je zmena enzýmov – permeázy a cytosín deaminázy, ktoré sú zodpovedné za transport látky do bunky kvasiniek a ich modifikáciu.

Grizeofulvín je antibiotikum, ktoré pôsobí na úrovni tubulárneho systému. Je účinný hlavne na dermatofyty a rezistencia je veľmi zriedkavá.

Testovanie citlivosti klinických izolátov mikroskopických húb je nevyhnutnou súčasťou medicínskej praxe. Metódy, ktoré sa môžu použiť pre testovanie citlivosti zahŕňajú diskovú a dilučnú metódu štandardizované v dokumentoch CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) a EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Prvý dokument sa využíva v USA a druhý v EÚ. Tieto dve metodiky sa odlišujú v odporúčanom inokule, médiu a odčítavaní výsledkov, takže výsledky získané jednou z metód sa nedajú extrapolovať pre druhú metódu a naopak. Mikrodilučná metóda využíva testovanie v mikrotitračných platničkách. Pre určenie citlivosti/rezistencie, prípadne intermediárnej citlivosti boli pri oboch metodikách stanovené hraničné hodnoty MIC (minimálne inhibičné koncentrácie) pre testované antifungálne terapeutiká.

Pomôcky - mikroskop, imerzný olej, štvorce buničitej vaty, automatické pipety, sterilné špičky, podložné a krycie sklíčka, mikrotitračné platničky, súprava pre prípravu sklíčkových kultúr, sterilné Petriho misky a skúmavky, pinzety, preparačné ihly, mikrobiologické očka, rukavice, mikrobiologické rúška, denaturovaný alkohol, dezinfekčný roztok

Kultivačné pôdy a iný materiál – Sabouraudova pôda, Sabouradov agar, Chromagar Candida, cibul'ový agar, ryžový agar, pôda RPMI1640-MOPS, agarová pôda s močovinou, pôdy s obsahom cukrov glukóza, maltóza, laktóza, inozitol, dulcitol, celobióza, Durhamove skúmavky boli pridané do pôd s obsahom cukrov glukóza, maltóza a laktóza, roztok

laktofenolu, sterilný fyziologický roztok, API 20 C test na rýchlu identifikáciu kvasiniek, alebo API *Candida* (prípadne iný test pre rýchlu diagnostiku), parafínový olej, McFarlandova stupnica, roztok kryštálovej violete, roztok XTT, roztok menadionu, acetón, atrament, kryštáliky KNO₃, antifungálna látka flukonazol

Mikroorganizmy - zástupcovia rodu *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*), *Trichosporon* sp., *Cryptococcus albidus*, *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, kultúra neznámej kvasinky a vláknitej huby

Úloha č. 1 Makroskopická a mikroskopická identifikácia neznámej kvasinky

Pozorujeme nárast neznámej kvasinky v tekutej 24 h kultúre pripravenej v YPD pôde. Sledujeme tvorbu zákalu, kožky, sedimentu. Z tekutej 24 h kultúry pripravíme natívny preparát a sledujeme tvar buniek a prvky fruktifikácie - spór a filamentov.

Ďalej pozorujeme kolónie mikroorganizmov narastené na Sabouraudovom agare v Petriho miske po 24 h kultivácii a charakterizujeme makrovzhľad kolónie - tvar, farbu, konzistenciu, vôňu. Paralelne sledujeme nárast kvasiniek na diagnostickej pôde Chromagar *Candida*, ktorý umožňuje priamu identifikáciu niektorých kvasiniek na základe sfarbenia. Na vopred pripravených sklíčkových kultúrach so Sabouraudovým a cibul'ovým agarom pozorujeme pod mikroskopom okraj kultúry a prvky vegetatívnej a generatívnej fruktifikácie. Na ryžovom agare sledujeme prítomnosť chlamydospór a ich usporiadanie. Ďalej si pripravíme natívny preparát z média na kultiváciu výpučku a pravého mycélia a pozorujeme tvorbu týchto morfológických foriem.

Úloha č. 2 Tvorba kapsúl

Na podložné sklíčko kvapneme kvapku atramentu a suspenzie kvasiniek a pod mikroskopom pozorujeme prítomnosť alebo neprítomnosť kapsuly.

Úloha č. 3 Asimilácia a fermentácia cukrov neznámou kvasinkou klasickými testami

Z 24-h kultúry neznámej kvasinky kultivovanej v YPD pôde pripravíme suspenziu o hustote 10⁷ buniek/ml. Takto pripravenou suspenziou v objeme 20 µl naočkujeme vopred pripravené skúmavky so Sabouraudovou pôdou s obsahom cukrov: glukóza, maltóza, laktóza, inozitol, dulcitol, celobióza, ktoré boli do média pridané v množstve 0,5 %. Kultúry kultivujeme pri 28 °C. Do 24 h odčítame asimiláciu cukrov, ktorá sa prejaví zmenou zafarbenia pôdy.

Podobne naočkujeme aj skúmavky, ktoré obsahujú cukry: glukóza, maltóza, laktóza, ale navyše obsahujú Durhamove plynovky na stanovenie prítomnosti plynu, ktorý je

produktom fermentácie. Kultúry kultivujeme pri 28 ° C. Do 24 - 48 h odčítame fermentáciu cukrov. Pozitívna reakcia sa prejaví tvorbou bubliniek v Durhamovej skúmavke.

Úloha č. 4 Utilizácie KNO₃

Na Petriho misku s pôdou obsahujúcou len premytý agar nalejeme a rozotrieme kľučkou kultúru neznámej kvasinky (McFarland no 1). Potom nasypeme na jednu polovičku Petriho misky do malej jamky pár kryštálikov KNO₃ (okolo 1 mg) a na druhú stranu ako pozitívnu kontrolu nalejeme do jamky pár kvapiek peptónovej vody (10 %). Nárast v okolí KNO₃ odčítame do 48-96 h.

Úloha č. 5 Ureázový test

Na Petriho misku s agarovou pôdou obsahujúcou močovinu naočkujeme kultúru neznámej kvasinky, ktorú rozotrieme sterilným tampónom. Nárast a zmenu zafarbenia odčítame do 24h.

Úloha č. 6 Asimilácia a fermentácia cukrov API 20 testom

Keďže mnohé z postupov použitých na identifikáciu boli už popísané, budeme sa podrobnejšie venovať len API 20 C testu. Do krytu súpravy, ktorá slúži na prikrytie, rovnomerne do každej komôrky napipetujeme sterilnú destilovanú vodu. Mikroorganizmus rozmiešame v 0,85 % roztoku NaCl alebo vo fyziologickom roztoku na hustotu 2. stupňa McFarlanda. Jednu kvapku z tohto média kvapneme na ryžový agar a 2 kvapky do ľudského séra (tento pokus je pre výučbové účely nahradený postupom na tvorbu výpučku a pravého mycélia). Otvoríme fľaštičku s C médiom, ktoré je súčasťou súpravy a naočkujeme 100 µl (3 kvapky) zo suspenzie, rozmiešame bez vytvorenia bublín. Pateurovou pipetou naočkujeme sadu presne po okraj jamky bez bubliniek. Sada sa uloží do krytu so sterilnou destilovanou vodou a uloží sa do termostatu (29 +/- 2 °C). Test sa odčíta do 24 -48 h.

Úloha č. 6 Makroskopická a mikroskopická identifikácia neznámej vláknitej huby

Pri identifikácii neznámej vláknitej huby používame postupy, ktoré sú spomenuté v úvodnej časti tejto témy. Dominantné postavenie má makroskopické a mikroskopické vyšetrenie ako aj kultivácia. Pozorujeme kolónie narastené na 10 dňovom Sabouraudovom agare a charakterizujeme makrovzhľad kolónie - tvar, farbu, konzistenciu, textúru, okraje, tvorbu pigmentov. Na vopred pripravených sklíčkových kultúrach so Sabouraudovým agarom pozorujeme tvorbu filamentov a prvky vegetatívnej a generatívnej fruktifikácie, ako je spomenuté v 5. kapitole. Pri mikroskopickom vyšetrení sa zameriavame na sledovanie prvkov vegetatívnej a generatívnej fruktifikácie.

Úloha č. 7 Stanovenie MIC antifungálnych látok mikrodilučnou metódou

Na stanovenie účinku azolovej látky flukonazol boli vybrané kvasinky *C. albicans* a *S. cerevisiae*. Kvasinky boli očkované na platne so Sabouraudovým agarom a kultivované cez

noc pri 28 °C. Z tejto kultúry kvasiniek si pripravíme inokulum s hustotou $0,5 - 2,5 \cdot 10^3$ buniek/ml v médiu RPMI 1640-MOPS s 2% glukózou. Kvasinky sa spočítajú v Bürkerovej komôrke, alebo sa suspenzia pripraví na 0,5 McFarlanda, a potom sa nariedi na potrebnú hustotu. Inokulum aj zásobné roztoky s požadovanými koncentráciami testovanej antifungálnej látky si pripravíme v médiu RPMI 1640-MOPS s 2% glukózou. Do každej jamky mikrotitračnej platničky pridáme po 100 µl inokula a 100 µl roztoku antifungálnej látky, ktorý bol pripravený tak, aby výsledná koncentrácia v jamke zodpovedala požadovanej koncentrácii antifungálnej látky (64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 µg/ml). Kontrolné jamky obsahujú 100 µl inokula a 100 µl čistej pôdy. Každú koncentráciu látky testujeme v troch paralelných riadkoch mikrotitračnej platničky. Platničky inkubujeme pri 37 °C. Po 24 h sa jamky premiešajú jemným trepaním platničky na trepačke a výsledky odčítame spektrofotometricky pri $\lambda=590$ nm.

Úloha č. 8 Stanovenie schopnosti kvasiniek tvoriť biofilm

Z 24-h kultúry *C. albicans* vyrastenej na YPD platni pri 28 °C odoberieme kolóniu, ktorú rozsuspendujeme a celonočne kultivujeme v médiu YPD za trepania. Suspenzia buniek sa potom centrifuguje 5 min, pri 3000 x g a pri 15 °C. Bunky dvakrát premyjeme 1 ml fyziologického roztoku a následne sa kultúra suspenduje v médiu RPMI 1640-MOPS s 2% glukózou. Z buniek pripravíme inokulum s hustotou 10^6 buniek/ml v médiu RPMI 1640-MOPS s 2% glukózou. Z inokula nanášame po 100 µl do troch paralelných jamiek vysokoadherentnej mikrotitračnej platničky. Po 90 min statickej inkubácie, ktorá predstavuje aderenčnú fázu, jamky dvakrát premyjeme fyziologickým roztokom a následne pridáme čerstvé médium RPMI 1640-MOPS s 2% glukózou po 100 µl do každej z jamiek. Bunky v mikrotitračnej platničke inkubujeme staticky ďalších 48 h. Po 48 h médium odpipetujeme a bunky trikrát premyjeme fyziologickým roztokom. Kvantitu a metabolickú aktivitu biofilmu vyhodnotíme spektrofotometricky, a to po farbení s kryštálovou violeťou alebo pomocou XTT.

Farbenie kryštálovou violeťou: Biofilmy v mikrotitračnej platničke necháme po premytí vyschnúť pri laboratórnej teplote počas 45 min. Potom do každej jamky pridáme po 110 µl 0,4% roztoku KV. Po uplynutí 45 min sa roztok KV odsaje a všetky jamky dôkladne trikrát premyjeme sterilnou destilovanou vodou. Následne do každej jamky pridáme 90% etanol v objeme 200 µl, čím zabezpečíme elúciu farbiva z buniek. Po 45 min odfarbovania prenosieme z každej jamky po 100 µl do novej mikrotitračnej platničky. Intenzitu sfarbenia meriame

spektrofotometricky pri $\lambda=570$ nm oproti čistému etanolu. Ako negatívna kontrola slúži čisté médium RPMI 1640-MOPS s 2% glukózou.

XTT-redukčná metóda: Do každej z jamiek obsahujúcej biofilm pridáme po 100 μ l roztoku XTT s menadionom. Platnička sa inkubuje pri 37 °C počas 2-5 h v tme. Redukcia XTT sa prejaví farebnou zmenou, ktorej intenzitu meriame spektrofotometricky pri $\lambda=490$ nm. Ako negatívnu kontrolu použijeme čisté médium RPMI 1640-MOPS s 2% glukózou. Vzorky aj čisté médium meriame oproti čistému roztoku XTT s menadionom.

fenolová červeň	0,2 mg
dest. voda	50 ml
pH 7,1, ster. 20 min/120 °C	

Po sterilizácii sa pridá 0,25 ml 40% močoviny, ktorá sa sterilizuje filtráciou.

9. Kultivačné médium na dôkaz sacharidov

Základné médium:	kvasničný autolyzát	1%
	bromtymólová modrá	0,25 g sa rozpustí v dest. vode
	pH 7,2, ster. 20 min/120 °C	

pridáva sa roztok cukrov 2 %

glukóza, maltóza, laktóza, inozitol, dulcitol, celobióza, cukry sa sterilizujú filtráciou

10. Nitrát asimilačný test

A. médium:	glukóza	12 g
	premytý agar	20 g
	destilovaná voda	1000 ml, ster. 20 min/120 °C

B. peptónový roztok pre pozitívnu kontrolu:

	peptón	3 g
	kryštáliky KNO ₃	
	destilovaná voda	30 ml, ster. 20 min/120 °C

11. Ureázový agar pre dermatofyty

	Peptón	1 g
	NaCl	5 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	Glukóza	5 g
	Agar	20 g
	Voda	1000 ml
	pH 6,8, ster. 20 min/120 °C	

Po úprave pH sa pridá 6 ml fenolovej červene (0,2 % roztok fenolovej červene v 50 % etanole). Po sterilizácii sa pridá 100 ml prefiltrovanvej 20 % močoviny.

12. Lipázový agar pre dermatofyty

15 ml olivového oleja pridáme k 100 ml 2 % vodného roztoku arabskej gummy pH 8 a zahrejeme za miešania asi na 70 °C. Prelejeme do mixéru, pridáme 900 ml základnej pôdy. Základná pôda: 2 % peptón a 2 % agar zohriate asi na 70 °C mixujeme 5 min pri stredných otáčkach. Potom pridáme 4 ml 1 % vodného roztoku síranu nílskej modrej a mixujeme 1 min.

Potom upravíme pH na 8. Sterilizujeme 30 min/100 °C. Pri rozlievaní krúžime Petriho miskami.

13. Zemiakový agar pre dermatofyty

100 g nastrúhaných, olúpaných zemiakov necháme v 300 ml destilovanej vody extrahovať pri teplote 4° C cez noc. Potom vodu prefiltrujeme a filtrát doplníme do 1l. Potom pridáme 10 g glukózy a 20 g agaru. Upravíme na pH 6,5, ster. 15 min/120 °C.

17. Vlasový agar pre dermatofyty

Do Petriho misiek dáme detské vlasy a sterilizujeme v autokláve 20 min/120 °C. Po sterilizácii pridáme 20 ml sterilnej destilovanej vody a 3 kvapky kvasničného extraktu (10 % vodný roztok).

9.2. Roztoky

1. Fyziologický roztok	NaCl	8,5 g
	dest. voda	1000 ml

ster. 20 min/120 °C

2. Laktofenol	fenol kryštalický	20 g
	kyselina mliečna	20 ml
	glycerín	40 ml
	dest. voda	40 ml

Najskôr sa rozpustí fenol v destilovanej vode, potom sa pridajú ostatné zložky v uvedenom poradí, roztok sa prefiltruje

3. Kyslý alkohol	25 % HCl (H ₂ SO ₄)	3 ml
	etanol 96%	97 ml
4. Lúhový extrakt	40 % vodný roztok KOH	
5. 10x koncentrát PBS	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	11 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	dest. voda	1000 ml
	pracovný roztok má pH 7,3	

ster. 20 min/120 °C

6. Zásobný roztok flukonazolu (2 mg/ml):

Dodaný ako roztok na injekčné podanie Diflucan (Pfizer PharmaceuticALS, USA) s koncentráciou 2 mg/ml

7.	Roztok XTT (1mg/ml)	XTT	1 mg
		1xPBS	1 ml
8.	Roztok menadionu (1 μ M)	menadion	172,18 mg
		acetón	100 μ l
10.	Roztok kryštálovej violete	Kryštálová violet'	0,4 g
		Destilovaná voda	100 ml

10. Literatúra

- Arendrup, M. C., Perlin, D. S., Jensen, R. H., Howard, S. J., Goodwin J., Hope, W. Differential *in vivo* activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* isolates with and without *FKS* resistance mutations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 56, (2012): 2435-2442.
- Carllile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. *The Fungi*. Academic Press. The second edition (2001): pp. 588.
- CLSI 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- Deacon, J. *Fungal Biology*. Blackwell Publishing Ltd. Fourth edition (2006): pp.371.
- EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, valid from 2015-11-16.
- Gow, N. A., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J., Netea, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, 10, (2012): 112-122.
- Johnson, M. E., Katiyar, S. K., Edlind, T. D. New *Fks* hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic resistance of *Scedosporium* species." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55, (2011): 3774-3781.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Stalpers, J.A. *Dictionary of fungi*. CABI Bioscience, CAB International. The ninth edition (2001): pp. 655
- Larone, D.H. *Medically important fungi, a guide to identification*. ASM press Washington D.C. The fourth edition (2002): pp 409.
- Perlin, D. S., Rautemaa-Richardson, R., Alastruey-Izquierdo, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. 2017 Jul 31. pii: S1473-3099(17) 30316-X. doi: 10.1016/S1473-3099
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Messer, S. A., Moet, G. J., Jones, R. N. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009)." *Diagnostic microbiology and infectious disease* 69, no. 1 (2011): 45-50.
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., Lopez-Ribot, J. L. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic cell* 4, no. 4 (2005): 633-638.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., Lass-Flörl, C. "Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58 (S2), (2015): 2-13.
- Silva, S., Henriques, M., Martins, A., Oliveira, R., Williams, D., Azeredo, J.. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition." *Medical Mycology* 47 (2009): 681-689.