

IZOLACE A IDENTIFIKACE PLÍSNÍ

MARCELA PEJCHALOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

*Centralizovaný rozvojový projekt MŠMT č. C29:
„Integrovaný systém vzdělávání v oblasti výskytu a eliminace reziduí léčiv v
životním prostředí“*



Vláknité plísně jako nejvýznamnější eukaryotické mikroorganismy jsou důležitým objektem environmentální i potravinářské mikrobiologie. Základním předpokladem úspěšné identifikace je získání čisté kultury určitého druhu plísně. U této kultury pak sledujeme:

- Znaky makroskopické: které určíme z charakteru růstu v obrovských koloniích.
- Znaky mikroskopické, které zjistíme pomocí mikroskopických preparátů nebo sklíčkových kultur.

Příprava obrovských kolonií plísni

Pomůcky: sladinový agar, Czapek-Dox agar, Sabouraudův agar, DRBC agar na Petriho misce, očkovací jehla, kultura plísně

Postup: spory plísně přeneseme sterilní očkovací jehlou na povrch agarové půdy do třech bodů tvořících vrchol rovnoramenného trojúhelníka, tak aby byly inokulační body vzdáleny minimálně 3 cm od okraje Petriho misky. Aby se spory při očkování nerozptýlily po celém povrchu živné půdy, očkujeme misky zespona, otočené dnem vzhůru. Kultivujeme při 20 – 25°C v termostatu, po několika dnech je vhodné kultury umístit na světlo, protože některé kmeny za tmy nesporelují a jiné zase netvoří pigmenty.

Hodnocení: po 2 až 5-ti dnech (v případě xerofilních plísni až 20-ti) kultivace sledujeme:

- Rychlost růstu
- Charakter povrchu kolonií: kožovitý, sametový, mechovitý, krátce nebo dlouze vláknitý, plstnatý, moučný, vločkovitý, svazkovitý, hladký, zvrásněný
- Barvu mycelia, sporové vrstvy, hyf
- Barvu a vzhled rubu kolonií, přítomnost pigmentu difundujícího do agaru
- Přítomnost a barvu kapek transpirované tekutiny (exudátu) na vzdušném myceliu
- Přítomnost zvláštních útvarů viditelných okem (koremia, sklerotia)

V hodnocení uvedeme vždy stáří kultury a použitou kultivační půdu

Mikroskopický preparát plísni

Základní mikroskopování vláknitých plísni (tvar a přehrádkování hyf, sporulace, tvar konidií aj.) je možné provádět na nativních preparátech, opatrně připravených v kapce laktofenolu na podložním sklíčku nebo na kulturách, narostlých přímo na podložním skle. Detailnější

studia již vyžadují použití speciálních barvicích postupů. Mikroskopie vláknitých plísní je významnou součástí jejich přesné identifikace, tato problematika je však dosti náročná a je vyhrazena spíše specialistům – mykologům. Určení rodu sledované plísně se na základě makroskopických a mikroskopických morfologických znaků provádí podle atlasů vypracovaných pro celé třídy hub nebo pro určité skupiny. Ke zjištění mikroskopických znaků nutných pro identifikaci plísně potřebujeme kromě mikroskopu i speciální lupu.

Pomůcky: kultury plísní, podložní a krycí skla, preparační jehly, roztok laktofenolu s bavlníkovou modří.

Postup: z kolonie plísně asepticky odebereme malé množství mycelia a přeneseme pomocí dvou preparačních jehel do kapky laktofenolu na podložním skle. U silně osporovaných plísní odebíráme mycelium na rozhraní mezi zbarvenou částí kolonie a bílým okrajem. Aby v preparátu nebylo příliš mnoho spor. Mycelium neroztíráme o podložní sklo, aby nedošlo k poškození fruktifikačních orgánů. Opatrně přikryjeme krycím sklem a přebytečnou tekutinu odsajeme buničinou. Mikroskopujeme suchým objektivem při celkovém zvětšení mikroskopu 400x.

Hodnocení: sledujeme následující charakteristiky

- Charakter mycelia (tloušťku vláken, barvu a strukturu mycelia, přítomnost a rozložení, způsob větvení.
- Charakter, způsob tvoření a uspořádání fruktifikačních orgánů (sporangiofory, konidiofory, sporangia, kolumela, metuly, konidie, koremium, zygospory, askospory)
- Přítomnost a charakter jiných útvarů (chlamydospory, sklerotium)

Příprava sklíčkových kultur

Při přípravě preparátů přímým přenesením kousků mycelia s rozmnožovacími orgány někdy dojde k odlámaní konidií nebo porušení konidioforů. Potřebujeme-li sledovat růst a větvení hyf, rozmístění konidioforů, tvorbu spor zhotovíme sklíčkové kultury.

Pomůcky: sterilní Petriho miska s vloženou U-trubicí a podložním sklíčkem, rozežhátá agarová půda MALT, očkovací jehla, kultura plísně, sterilní voda, podložní a krycí sklíčko, očkovací jehla, formaldehyd

Postup: na podložní sklíčko umístěné na U-tyčince ve sterilní Petriho misce kápneme trochu rozežháté agarové půdy. Po zatuhnutí půdu zaočkujeme 4 vpichy z každé strany a na půdu

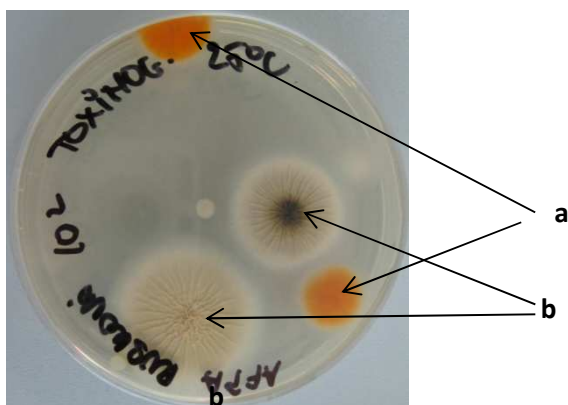
umístíme v ostrém úhlu krycí sklo. Na dno misky nalijeme několik ml sterilní vody, aby kultura při inkubaci nevysychala. Uzavřenou misku inkubujeme při 20 – 25°C po dobu 2 – 5 dní. Po vytvoření mycelia a fruktifikačních orgánů usmrtíme kulturu parami formaldehydu. Podložní sklo s kulturou včetně krycího sklíčka pozorujeme pod mikroskopem při celkovém zvětšení 400x.

Stanovení potenciálně aflatoxinogenních plísní

Toxinogenní vláknité mikromycety (plísně) jsou mikroorganismy, které mají schopnost produkovat mykotoxiny. Patří k významným faktorům, které mohou v negativním smyslu ovlivnit zdraví člověka. Plesnivé potraviny, obsahující toxinogenní mikromycety a mykotoxiny, představují významné nebezpečí pro zdraví populace v ČR, zejména z hlediska tzv. pozdních toxických účinků (např. karcinogenních, vývojové toxicity).

Princip:

Pro rychlou identifikaci potenciálně aflatoxinogenních plísní je hojně využívána půda AFPA (*Aspergillus Flavus Parasiticus Agar*). Je to selektivní chromogenní médium, které navíc obsahuje směs látek chloramfenikolu a dichloranu, které zabraňují rozrůstání cizích plísní a inhibují bakteriální růst. Průkaz je založen na reakci kyseliny aspergilové, produkované toxinogenními plísněmi (především *A. flavus* a *A. parasiticus*) a železitých iontů (Fe^{3+}), které jsou součástí testovacího média. Při této reakci dochází ke vzniku oranžovo-žlutého komplexu, který způsobuje pigmentaci spodní strany kolonie.



a - typické žlutooranžové zbarvení spodní strany kolonií (potenciálně aflatoxinogenní plísně)

b - neaflatoxinogenní plísně

Pomůcky:

Petriho misky, pipety 1 ml, L-hokejka, půda AFPA, fyziologický roztok s peptonem, vzorek potravin.

Postup:

10 g vzorku se asepticky odebere a přidá se 90 ml fyziologického roztoku s peptonem, homogenizace probíhá 2 minuty v peristaltickém homogenizátoru. 0,1 ml takto připraveného homogenátu se roztírá L-hokejkou na povrch utuhlé půdy AFPA. Inkubace se provádí při teplotě 25 - 30 °C po dobu 72 hodin. Po skončení inkubace se spočítají vyrostlé plísně s oranžovým rubem kolonií a přepočítají se na 1 g (1ml) vzorku.

Literatura:

Vytrásová J., Bílková Z.: skriptá Laboartorní cvičení z obecné mikrobiologie, Univerzita Pardubice 2014, 3. vydání. ISBN 978-80-7395-747-6

Poloautomatická identifikace vláknitých hub pomocí systému Biolog III

Identifikační systémy firmy Biolog (Biolog, Inc., USA) slouží k identifikaci a charakterizaci mikrobiologických kultur, na základě vysoce přesných patentovaných chemických testů (96 jamkové destičky). V kombinaci s velice širokou databází, čítající kolem 2000 druhů se jedná o jeden z nejpresnějších identifikačních systémů na světě. V nabídce firmy jsou systémy manuální (Mikrolog M), poloautomatické (Microstation), zahrnující kromě software i identifikační reader a plně automatický systém OmniLog (software, inkubátor/reader). Součástí nabídky jsou i identifikační destičky pro různé kategorie mikroorganismů – aerobní (gram-negativní i gram-pozitivní), anaerobní, plísně, houby (<http://www.biotech.cz>). Na mikrotitračních destičkách jsou v 96 jamkách testovány různé zdroje uhlíku, dusíku, fosforu a síry (případně i schopnosti využívat/vyžadovat i komplikovanější peptidové zdroje dusíku), dále vhodnost různých osmotických podmínek i vlivy pH a identifikace je založena na výměně elektronů uvolněných během respirace, což vede k změně barvy přítomného tetrazolia. Výsledkem je pak tzv. fyziologický nebo metabolický fingerprint-profil daného mikroorganismu.

