

Gymnázium Přírodní škola, o.p.s.
Profilová práce – třída Omíkon
Nižší stupeň studia
2022/2023

Matilda Vyhnálková

Plísně na potravinách aneb co nám roste v kuchyni

Vedoucí práce: Mgr. Anežka Koutníková

Datum odevzdání: 18.11.2022

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí své profilové práce paní učitelce Mgr. Anežce Koutníkové za konzultace a cenné rady. Dále děkuji RNDr. Aleně Kubátové, CSc. z Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze za možnost odborných konzultací a poskytnutí literatury. Velký dík dále patří mému dědovi, Ing. Josefu Mikešovi, CSc. za zaučení v technikách mikroskopie a práce s digitálním obrazem a poskytnutí veškerého vybavení potřebného k obrazové dokumentaci. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu a pomoc při pokusech a zpětnou vazbu.

Obsah

Úvod	1
Cíle	1
Co jsou plísně	2
Taxonomie mikroskopických hub	2
Postup práce	5
Získávání vzorků	5
Živné půdy	5
Rýžová a rýžovo-mrkvová živná půda	6
PDA – Bramborovo-dextrózový agar	7
SDA – Saboraud Dextrose Agar	7
Dokumentace	7
Fotoaparát Olympus	7
Stativ na makroskopické fotografie	7
Kamera	8
Objektiv	8
Sekvenční video	9
Mikroskop	9
Software	10
Pozorované plísně na potravinách	11
Vzorek 1– Jablko	11
Rod Fusarium	11
Vzorek 2 – Chléb	12
Penicillium	12
Mucor (mucedo) a Rhizopus	13
Epiccocum	14
Aspergillus	14
Telemorfa rodu Aspergillus	15

Vzorek 3 - Mrkev	16
Alternarium	16
Další plísně na mrkvi	17
Vzorek 4 - Pomeranč	17
Penicillium	17
Vzorek 5 – Pomazánkové máslo	18
Rod Cladosporium	18
Vzorek 6 – Křen	19
Porovnání růstu plísní za různých podmínek	20
Různé živné půdy	20
Různé množství vody	21
Sekvence fotografií	23
Přehled pozorovaných plísní	24
Závěr	24
Zdroje	25
Přílohy	26

Úvod

Stalo se vám někdy, že jste se vraceli z dovolené, těšili se na vůni domova a místo toho našli dům plný smradlavých a plesnivých potravin? Myslím, že většina z nás to zná. Kolik z vás ale někdy překonalo odpor a kouklo se na plísně blíže? Já to zkusila a zjistila jsem, že nemusí být jen otravné a nechutné. Můžou dokonce být i krásné, a navíc jsou v mnohém užitečné.

Když jsem hledala téma profilové práce, chtěla jsem něco z oblasti biologie, něco, co jsem ještě tak dobře nepoznala. Fascinoval mě svět pod mikroskopem, a tak jsem se dostala k plísním.

Má profilová práce se zabývá studiem a dokumentací běžných plísní nalezených na potravinách.

Mým hlavním cílem bylo izolovat plísně ze šesti co nejodlišnějších vzorků potravin. Ty jsem pak následně přenášela na agarové živné půdy a dokumentovala jak makrofotografiemi, tak i v mikrosvětě. Prací se snažím srozumitelně přiblížit problematiku plísní i možnosti jejich pozorování. Chci ukázat, že pozorovat plísně může každý klidně i v domácím prostředí pomocí běžně dostupných věcí. Práce je cílena hlavně na lidi jako já – nadšené amatérské vědce.

Cíle

- Izolovat plísně ze šesti různých potravin a pokusit se je určit
- Pozorovat a nafotit plísně
 - o pod mikroskopem
 - o makrofotografiemi
- Alespoň tři plísně přenést na živné půdy
- Vytvořit sekvenční video růstu jedné plísně
- Porovnat růst v různých prostředích
- Vytvořit přehled plísní nalezených na potravinách

Co jsou plísně

Vláknité mikromycety (plísně) jsou vláknité vícebuněčné organismy z říše hub (Fungi). Živiny potřebné k životu získávají vstřebáváním (absorbací) z okolního prostředí. Živí se převážně organickou hmotou.

V přírodě plní hlavně roli rozkladačů (destruentů), čímž významně přispívají ke koloběhu látek. Část z nich se přizpůsobila i k napadání (parazitismu) rostlin či živočichů, včetně člověka (tzv. patogenní plísně – způsobující onemocnění).

Plísně se vyskytují prakticky všude. Tyto nenápadné organismy jsou velmi přizpůsobivé a životaschopné. Jejich spory se běžně vyskytují ve vzduchu, vodě, půdě, vlastně prakticky všude na světě. Některé mohou žít v extrémních teplotách, jiné i bez přístupu vzduchu.

Většinu houby tvoří podhoubí (mycelium) tvořené mikroskopickými hyfami. To se mezi různými odděleními liší – může být tvořené jak jednojadernými buňkami, tak i buňkami s více jádry. Často jsou buňky oddělené přepážkami, ale vždy mají společnou cytoplazmu, která může mezi jednotlivými buňkami přecházet. Podhoubí prorůstá substrátem a na napadených předmětech ho nelze snadno rozeznat. Viditelná část houby může být jen malá, nebo nemusí být vůbec patrná, mycelium už přítom může být velmi rozsáhlé.

Jako vedlejší produkt metabolismu plísni mohou vznikat látky zvané mykotoxiny. Celkem je známo přes 350 druhů plísni produkujících mykotoxiny, přičemž některé jich produkují i více typů. Při nadměrné konzumaci mohou mykotoxiny způsobovat poškození některých orgánů, hlavně ledvin a jater, zhoršování imunity, tvorbu rakoviny a některé i halucinace, či poruchy krevního oběhu, vedoucího v extrémních případech i k odumírání končetin. Z tohoto důvodu je jejich obsah v potravinách a krmivech přísně hlídán. Někdy ale mykotoxiny mohou být i prospěšné. Asi nejznámější a nejvýznamnější je mykotoxin produkovaný plísněmi ze skupiny *Penicillium*, který má antibiotické účinky a je známý jako antibiotikum penicilin.

Taxonomie mikroskopických hub

Jak už bylo zmíněno, plísně jsou houby. Říše Fungi je rozsáhlá, a proto je i taxonomie velmi komplikovaná. Plísně se vyskytují převážně v oddělení Zygomycota, nebo Ascomycota, které se liší například způsobem rozmnožování. Někdy jsou také

řazené do nesystematicky uměle vytvořené skupiny mitosporních hub (Deuteromycetes, Fungi imperfecti, houby nedokonalé), které zahrnují pouze nepohlavně se rozmnožující houby, které se rozmnožují pomocí spor tzv. konidií. Ty se tvoří buď na tzv. konidioforech nebo na samotném myceliu.

Mikroskopické houby se mohou vyskytovat ve dvou stádiích vývoje. První se nazývá anamorfa. Ta se rozmnožuje pomocí konidií.

*Druhé, pokročilejší, stadium vývoje hub se nazývá telemorfa. Ty se rozmnožují pohlavně. Tvoří meiospory na výtrusnicích vzniklých kopulací hyf. Některé druhy plísní (např. *Penicillium*) nedokáží tvořit telemorfy a vyskytují se jen jako anamorfy.*

Nejčastěji se vyskytující plísně spadají do oddělení Ascomycetes a Zygomycetes, proto se na ně blíže zaměřím.

Ascomycetes

Ascomycetes neboli houby vřecko-výtrusné tvoří jak anamorfy (rozmnožují se nepohlavně) tak telemorfy (rozmnožují se pohlavně). Při pohlavním rozmnožování vznikají výtrusnice s kapsami zvanými askospory nebo také vřečka. Ty ve většině případů obsahují 8 spor. Mycelium askomycet tvoří jednojaderné buňky propojené přepážkami.

Některé zástupce tohoto oddělení můžeme nalézt i v lese v podobě masitých plodnic (např.: lanýž, ucháč, smrž)

Z běžných plísní k tomuto oddělení hub patří rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Fusarium* a to konkrétně do řádu plesnikotvorných (Eurotiales).

Zygomycetes

Druhy z této skupiny se umí rozmnožovat oběma způsoby (nepohlavní i pohlavní). Nepohlavně se rozmnožují výtrusy uvolňujícími se z výtrusnic, které vyrůstají na povrchu.

Pohlavně se houba rozmnožuje ve chvíli, kdy se setkají mycelia obou pohlaví. Splynutím genetické informace obou mycelií vzniká tzv. zygospora (odpočívající výtrus). Ta se samostatně šíří a v příznivých podmínkách vytvoří výtrusnici s výtrusy oddělených pohlaví a celý cyklus se může opakovat.

Mycelium Zygomycetů je tvořeno mnohjadernými buňkami a ve stáří je nepravidelně přehrádkované.

Do oddělení Zygomycetes se řadí například rod *Mucor* (*Mucor mucedo* – plíseň hlavičková) nebo *Rhizopus* (kropidlovec).

Postup práce

Získávání vzorků

Vzorky plísní jsem odebírala ze zplesnivělých potravin z naší domácnosti. Vybrané vzorky plísní jsem v průběhu celého projektu archivovala a dále přenášela a snažila se zařadit co nejvíce druhů¹. Některé jsem pak přenášela na živné půdy kvůli tomu, aby byla podoba kolonií plísní lépe čitelná. Tento postup má také výhodu při dokumentaci v makro zvětšení, protože plíseň roste v jedné rovině. Některé z živných půd jsem pořídila již připravené v Petriho miskách a některé jsem si vyrobila doma pomocí běžně dostupných surovin. Základní postupy a metodiku přenosu a kultivace mě naučila RNDr. Alena Kubátová, CSc. z Přírodovědecké fakulty UK.

Postup přenosu plísní na živnou půdu

Pomůcky: Petriho miska s agarem, jehla (je možno použít i špendlíky či narovnané kancelářské svorky), svíčka či plynový hořák, sklenice studené vody, vzorek plísně

U tohoto procesu se musí přihlížet k tomu, že živná půda je vytvořená pro růst plísní. Z tohoto důvodu hrozí nebezpečí kontaminace sporami z ovzduší (spory jsou výtrusy plísní, kterými se rozmnožují, viz dále). Proto se při přenášení musí dbát na to, aby byl povrch agarů vystaven ovzduší co nejkratší dobu. Vzorky jsem přenášela jehlou, která byla před pokusem vysterilizována v plameni svíčky. Jehlu jsem zchladila čistou studenou vodou. Pak jsem nabrala na špičku jehly malý vzorek plísně. Teprve v tuto chvíli jsem otevřela Petriho misku, vzorek mírně zabodla do povrchu agarů a misku zase rychle zavřela. Plíseň jsem většinou přenášela na 3 místa na misce, aby rychleji pokryla povrch a byly vidět hranice kolonií. Poté jsem misku ještě uzavřela igelitovou folií, aby nebyl povrch následně kontaminován sporami z vnějšího prostředí nebo např. zanesením roztoči.

Živné půdy

Živné půdy jsou směsi různého složení, utužené pomocí agarů. Slouží k pěstování různých organismů od bakterií, přes kvasinky a plísně až po mycelia hub.

¹ Např.: suché (chléb), sladké (jablko), mléčné (pomazánka)...

Na pěstování plísní se používá mnoho druhů agarů. Některé z nich jsou univerzální, jiné svým složením podporují růst jen některých plísní a používají se na identifikaci určitých rodů, či dokonce jen druhů.

Na základě složení půdy se liší podoba i rychlost růstu kolonií.

Rýžová a rýžovo-mrkvová živná půda

Jelikož jsem zpočátku neměla k dispozici profesionální agar, zkoušela jsem doma vytvořit vlastní živnou půdu bez agaru. Udělala jsem ji z rozvařené a najemno rozmixované rýže a do jedné várky jsem přidala i mrkev. Směs po chvíli ztuhla a vytvořila vrstvu podobné konzistence jako živné půdy s agarem.

Recept na živnou půdu

Ingredience: 100 g rýže, 400 ml vody, případně 1 mrkev

Pomůcky: malý hrnec, mixér, Petriho misky (dají se použít jakékoliv misky s rovným dnem a s víčkem)

Rýži a vodu, případně dále mrkev, necháme vařit asi dvakrát déle, než je obvyklé ke konzumaci (cca 20 min). Rýže by měla být dobře rozvařená a lepkavá, pokud tomu tak není, přilejeme trochu vody a necháme ještě chvíli vařit. Poté ještě teplý obsah hrnce namixujeme dohladka. Pokud není k dispozici mixér můžeme rýži také rozmačkat, výsledný povrch půdy však nebude tak hladký. Rozmixovanou směs pak co nejrychleji, aby nestihla ztuhnout, nalejeme do připravených misek (vrstva 1,5 – 3 cm) a uhladíme povrch směsi.

Směs by měla být co nejvíce uchráněna před možnou kontaminací sporami (nenechávat tuhnoucí směs dlouho neuzavřenou, nedotýkat se jí neočištěnými nástroji). Přes všechnu snahu mi však na jednom nepoužitém rýžovo-mrkvovém agaru skladovaném v lednici a uzavřeném víčkem vyrostla asi po 10 dnech neznámá plíseň.

Na této půdě se daří jen některým druhům plísní.

Je snadno vyrobitelná z běžně dostupných surovin, není však univerzální a kvůli nemožnosti sterilizace může být při výrobě kontaminována. Pro amatérské pokusy však postačí.

PDA – Bramborovo-dextrózový agar

Tento profesionální agar jsem koupila již připravený a vysterilizovaný v Petriho miskách (výrobce Liofilchem). Je považován za univerzální agar pro kultivaci plísní z potravin a dalších materiálů a je jednou z nejrozšířenějších půd pro pěstování plísní a kvasinek. Hlavní přísady jsou bramborový škrob a dextróza². Tyto přísady podporují růst plísní a tvoření spor a pigmentu.

SDA – Saboraud Dextrose Agar

Tento agar jsem také pořídila již připravený (Liofilchem). Je přizpůsobený zejména k pěstování patogenních plísní (plísní způsobujících nemoci u člověka). Proto na něm plísně z potravin často nezačnou produkovat spory. Hlavní přísady jsou slinivkový výtažek z proteinu kasein a peptický výtažek ze zvířecí tkáně. Ty obsahují látky důležité pro růst organismů – aminokyseliny, dusík, uhlík, vitamíny a minerály. Dále obsahuje poměrně velké množství dextrózy, která je zdrojem energie pro růst. Celá směs je utužena agarem.

Velký obsah dextrózy a kyselost půdy (pH 5.6) podmiňuje růst plísní.

Dokumentace

Během práce jsem používala různé způsoby dokumentace. Po zaškolení jsem se naučila pracovat se softwarem digitální analýzy obrazu Lucia (Laboratory Imaging s.r.o.), lépe jsem porozuměla mikroskopu i digitálnímu fotoaparátu.

Fotoaparát Olympus

Jako první způsob dokumentace jsem zvolila makro fotografie pomocí digitálního fotoaparátu Olympus Pen. Fotila jsem buď v režimu Auto, nebo v přednastaveném režimu Makro. Na focení jsem používala makro objektiv M.Zuiko s ohniskovou vzdáleností 45 mm a úhlem záběru 27 stupňů. Minimální vzdálenost zaostření je 50 cm. Objektiv nemá zoom.

Stativ na makroskopické fotografie

Některé makroskopické fotky jsem fotila kamerou připevněnou na stativu. Touto metodou bylo foceno sekvenční video a Petriho misky s agarem.

² Jiný (starý) název pro glukózu – jednoduchý cukr (C⁶H¹²O⁶)

Používala jsem 75 cm vysoký stativ s posuvným držákem pro kameru (Dactyscope, Laboratory Imaging s.r.o.) (viz obr. 1). Kamera byla spojena s objektivem Cosmicar. Na stojanu jsou připevněny 2 LED reflektory, které jsem používala na osvětlení vzorků



Obrázek 1 - Stativ s kamerou, objektivem a zapnutými reflektory zapůjčený z firmy Laboratory Imaging

Kamera

Na dokumentaci pomocí mikroskopu, různých objektivů i na focení sekvence jsem používala barevnou USB kameru Grasshopper (Point Grey Research Inc.). Ta byla připevňována na stativ s objektivy, nebo byla připevněna k mikroskopu, odkud pak USB kabelem přenášela snímání obraz do počítače.

Objektiv

Na focení agarových ploten a sekvence jsem používala USB kameru na stativu propojenou s objektivem. Osvědčil se mi teleobjektiv Cosmicar s maximální ohniskovou vzdáleností 50 mm. Teleobjektivy mají velkou ohniskovou vzdálenost, malý úhel záběru a malou hloubku ostrosti. Zároveň obraz přibližují. Já jsem fotila spíše přehledové fotografie, takže jsem používala menší zvětšení – max. 2x.

Obraz jsem doostřovala ručně posouváním stativu.

Sekvenční video

Sekvenci jsme fotila po dobu 21 dnů vždy ráno a večer, tudíž se sekvence skládá ze 42 snímků. K focení jsem používala již zmíněnou USB kameru s teleobjektivem Cosmicar. Snímky byly foceny na bílém podkladu.

Plíseň jsem měla při focení přenesenou na živnou půdu typu PDA (viz kapitola PDA – Bramborovo-dextrózový agar).

Mikroskop

Na pozorování plísní pod mikroskopem jsem používala světelný mikroskop Leitz Wetzlar se spodním procházejícím světlem. Mikroskop je trinokulární, má dva okuláry a vstup pro připevnění kamery, pomocí které se obraz dá zaznamenávat (viz obr. 2). Okuláry mají zvětšení 10x. Na pozorování jsem poté používala objektivy se zvětšením 10x, 20x, 40x. Použité objektivy jsou vždy uvedeny v popisku fotografie.



Obrázek 2 - Světelný Mikroskop Leitz Wetzlar s připojenou kamerou

Vytváření preparátu

Pomůcky: 2 jehly či kancelářské sponky, podložní a krycí sklíčko, kyselina mléčná (postačí i voda), vzorek plísně

Aby se daly plísně pozorovat ve zvětšení, které nám umožňuje mikroskop, musela jsem nejdříve vytvořit preparát. Ze vzorku plísně jsem odebrala pomocí jehly či narovnané kancelářské sponky co nejmenší kus mycelia, nejlépe i se sporami.

Vzorek jsem přenesla na podložní sklíčko a zakápla tekutinou. Já jsem používala kyselinu mléčnou obarvenou bavlnovou modří, protože jsou v ní vzorky trochu výraznější. Obyčejná voda ale také stačila. Poté jsem vzorek přiklopila krycím sklíčkem a tím byl vzorek připraven k pozorování.

Software

Ke zpracování pořízených fotografií jsem měla k dispozici software Lucia (Laboratory Imaging s.r.o.), který slouží k digitální analýze obrazu se širokým uplatněním od biomedicíny až po kriminalistiku. Používala jsem ho na zpracování veškeré obrazové dokumentace mimo fotoaparát. V tomto programu jsem například upravovala některé fotografie, porovnávala rozdíly mezi fotografiemi a vytvářela sekvenci.

Pozorované plísně na potravinách

Vzorek 1– Jablko

Z jablka jsem izolovala na PDA jeden druh plísně. Podle podoby kolonií lze usuzovat, že jde o rod *Fusarium*, ale plíseň nevytvořila konidie, proto ji nebylo možné určit s jistotou.

Rod *Fusarium*

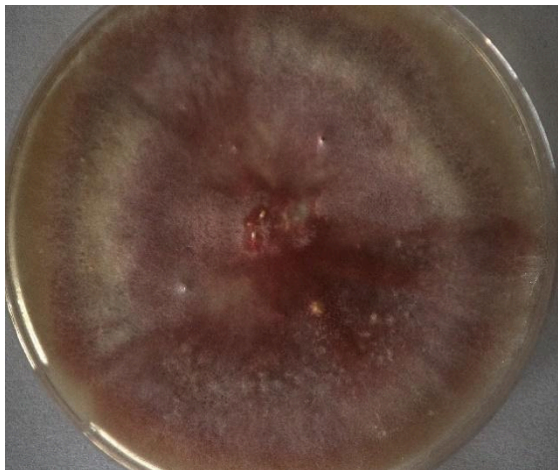
Plísně rodu *Fusarium* se vyskytují převážně v půdních ekosystémech, kde se podílí na rozkladu organické hmoty. Část druhů se ale přizpůsobila i parazitizmu rostlin, některé i živočichů, včetně člověka.

Co se týče potravin a zemědělství, houba nejčastěji kontaminuje různé obilniny. Některé druhy mohou uvolňovat mykotoxiny (fumosiny), které mohou negativně působit na zdraví konzumentů. Pod mikroskopem jsou zřetelné její podlouhlé vícebuněčné konidie tvaru půlměsíce, či srpku, podle kterých dostala i svůj český název – srpovnička

Některé druhy rodu *Fusarium* se dnes používají k získávání mykoproteinu quorn, který se používá jako náhražka masa. Plíseň je také používána v asijské kuchyni k fermentaci.

Tuto plíseň jsem izolovala z natlučeného jablka (viz obr. 4). Jablko bylo vypěstováno na zahradě bez chemického ošetření.

Na agarových miskách vytvořila plíseň růžovočervené kolonie s bílým myceliem (viz obr. 3)



Obrázek 3 - Plíseň izolovaná z jablka na agaru PDA



Obrázek 4 - Původní jablko napadené plísní

Vzorek 2 – Chléb

Penicillium

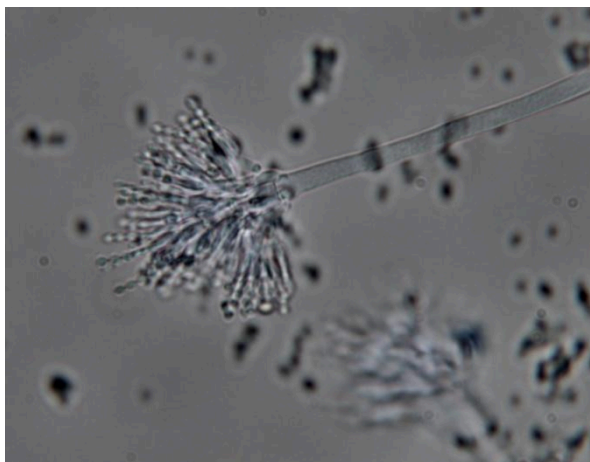
Jedním z nejběžnějších rodů plísní mírného a teplého klimatu je *Penicillium*. Tento rod obsahuje asi 450 druhů a je velmi obtížné je rozeznat a určit. Všechny lze dnes zařadit pouze pomocí molekulárních metod. Rozeznáme ji podle typických konidioforů připomínajících štětec (viz obr.5), podle kterých také plíseň dostala český název – štětičkovec. Konidiofory mohou být jednoduché nebo větvené, podle typu větvení konidioforů se dají plísně zařadit do 4 podrodů. Rozmnožuje se v podstatě jen pomocí nepohlavních spor (netvoří telemorfy). Její konidie se vyskytují skoro všude. Proto na tyto houby můžeme narazit velmi často jako na kontaminanty potravin a prostředí kolem nás. Různé druhy rodu *Penicillium* se používají i v potravinářském a farmaceutickém průmyslu.

Nejznámější je asi *Penicillium camemberti*, tvořící povrch například hermelínu. Rodu *Penicillium* můžeme děkovat i za sýry niva (*Penicillium roqueforti*) nebo gorgonzola. Velmi často se můžeme také setkat s produkty plísně druhu *Penicillium chrysogenum*, která se využívá k izolaci jejího mykotoxinu – penicilinu. Penicilin má antibakteriální efekt a jde o první široce používané antibiotikum.

Nejen tento, ale i mnoho dalších zástupců tohoto rodu produkuje řadu mykotoxinů. Některé mohou být i nebezpečné. Jedním z nejrozšířenějších mykotoxinů je patulin, produkováný většinou plísní *Penicillium expansum*. Tento mykotoxin je většinou

nalézán v ovoci a produktech z něho. Jeho nadměrná konzumace může způsobovat poškození trávicí soustavy. Další významné mykotoxiny jsou ochratoxiny A, B a C. Ty se vyskytují zejména v různých obilninách, ale také v mase konzumentů napadené potravy (např. hospodářská zvířata). Jejich konzumace může opět poškozovat trávicí trakt, ale také například ledviny. Nejcitlivější jsou na něj prasata a drůbež.

Z chlebu jsem izolovala mnoho zástupců rodu *Penicillium*. Tvořili zářivě bílé husté porosty (viz obr 6, plíseň měla na agaru jiné zabarvení), světlé zeleno-růžové a nebo např. zelenomodré prašné povlaky s velkým množstvím spor.



Obrázek 5 - Nevětvený konidiofor rodu *Penicillium*, foceno pod mikroskopem, zvětšení 10x40



Obrázek 6 - Kolonie rodu *Penicillium* na PDA, plíseň očividně vytvořila spory, jak lze usuzovat z četných malých kolonií v okolí

Mucor (mucedo) a Rhizopus

Tyto dva rody jsou zástupci oddělení Zygomycetes, řád Mucorales. Obě tvoří kulovité výtrusnice (sporangia), podepřené rozšířeným, kalíškovitým myceliem – kolumelou. Rod *Rhizopus* je navíc charakteristický tvorbou rhizoidů, což jsou přichytná vlákna.

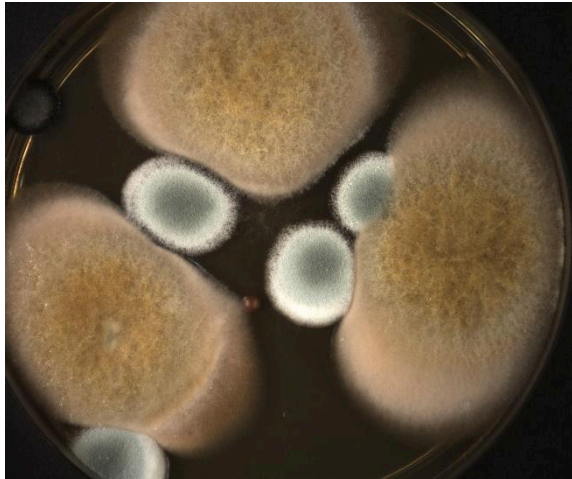
Rod *Mucor* čítá asi 40 druhů. Jeho kolonie tvoří objemné, rychle rostoucí porosty. Tato plíseň je v kuchyni také velmi častá. Setkat se s ní můžete zejména na chlebu. Na napadených potravinách tvoří objemné bílé porosty s plodnicemi, rozeznatelnými i pouhým okem jako malé tmavé tečky.

Rod *Rhizopus* zahrnuje nejméně 8 druhů. V přírodě patří mezi běžné kontaminanty. Některé rody tohoto druhu se využívají na fermentaci, konkrétně k výrobě tempehu nebo asijských alkoholických nápojů. Jiné se využívají např.: na výrobu kyseliny fumarové, používané jako dochucovadlo.

Plíseň mi také vyrostla na chlebu, bohužel se mi ji nepodařilo přenést na agar, protože byl kontaminován rychle rostoucí plísní rodu *Penicillium* a *Epicoccum*.

Epicoccum

Rod *Epicoccum* mi vyrostl na agaru, na který jsem přenášela plíseň rodu *Mucor*. Plísně tohoto rodu tvoří okrové kolonie (viz obr. 7) a pokud vysporulují tvoří červené spory. Nejlépe se jim daří pod UV světlem.



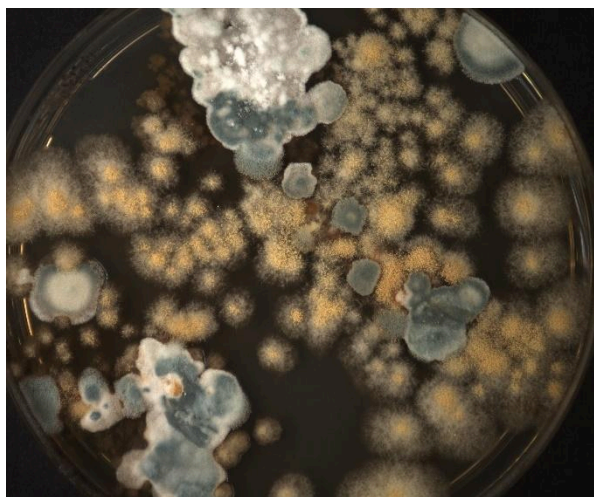
Obrázek 7 - Okrové kolonie rodu *Epicoccum* na živné půdě SDA

Aspergillus

Tento rod s českým názvem kropidlák je u nás také poměrně běžný. Je to plíseň z oddělení Ascomycetes a umí tvořit jak telemorfy (pohlavní stádium), tak anamorfy (nepohlavní stádium). V teplejších oblastech se běžně vyskytuje v půdě v rozkládajících se biomasách. Jeho druhy pak způsobují škody třeba ve skladech obilí. Z potravin se často objevuje v cereáliích, ořechách, kořeních a olejninách. V napadených potravinách pak může produkovat nebezpečný mykotoxin – aflatoxin. Ten patří mezi jednomy z nejsilnějších karcinogenů (příspěvá ke vzniku nádorů) a způsobuje poškození jater. Neobjevuje se navíc jen v napadených potravinách, ale například i v mléce zvířat, která zkonsumovala napadené krmivo. Proto je jeho hladina v potravinách přísně hlídána a limit pro potraviny je nyní 20 µg/kg. Dalším významným mykotoxinem produkovaným plísněmi rodu *Aspergillus* je ochratoxin A (jeho účinky viz výše v kapitole o *Penicilliu*). Spory některých zástupců tohoto rodu mohou také způsobovat alergické reakce.

Některé plísně rodu *Aspergillus* jsou důležitou součástí asijské kuchyně, kde se využívají k fermentaci potravin. Nejznámější jsou asi tzv. potraviny koji fermentované plísní *Aspergillus oryzae*, které se dále používají na výrobu sojové omáčky, miso pasty, alkoholického nápoje sake a dalších produktů. *Aspergillus* se používá i v průmyslu k výrobě organických kyselin.

Já jsem *Aspergillus* izolovala z chleba, na kterém se vyskytovalo hned několik jeho druhů. Tvořil buď modrozelený a hnědý povlak spor, nebo žluté (viz obr 9), tmavě olivové a černé porosty. Černá plíseň by mohla být *Aspergillus niger* a olivově zelená zase např. *Aspergillus fumigatus*.



Obrázek 9 - Kolonie rodu *Aspergillus* (žluté), (modrá kontaminace rodem *Penicillium*) Plíseň byla přenesena z chleba na agar PDA, plíseň rostla pomalu, ale rychle vysporulovala (hodně malých kolonií)

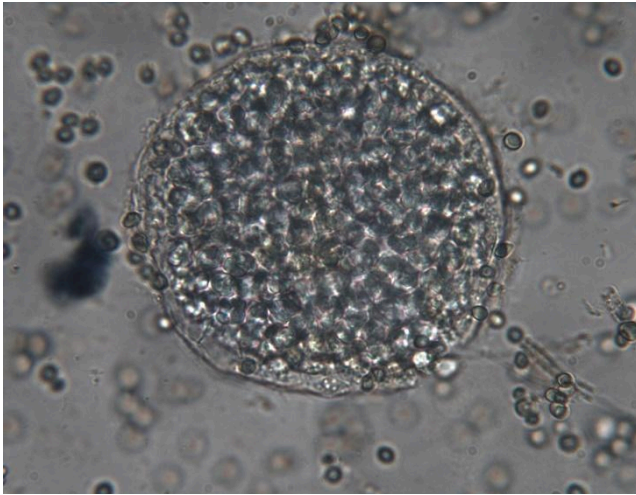


Obrázek 10 - Konidie rodu *Aspergillus*, (kolonie z obr. 9), Foceno pod mikroskopem, zvětšení 10x40

Telemorfa rodu *Aspergillus*

Tuto formu plísně jsem objevila na chlebu. Tvořila žlutý porost, který úplně rozežral část napadeného chleba (viz obr. 12). S pomocí paní doktorky Kubátové jsem ji určila jako plíseň z oddělení Ascomycetes; telemorfu rodu *Aspergillus*. Na rozdíl od již zmiňovaných zástupců tohoto oddělení, které se řadí do hub nedokonalých (*Fungi imperfecti*), se tento druh rozmnožuje pohlavně. Pod mikroskopem bylo možné pozorovat velké, kulovité, výtrusnice s množstvím spor (viz obr.11).

Na agaru se bohužel plíseň neuchytila a místo toho mi vyrostla plíseň rodu *Penicillium*, která pokrývala většinu chleba.



Obrázek 11 - Kulovitá výtrusnice rodu Eurotiales (anamorfa rodu Aspergillus), foceno pod mikroskopem, zvětšení 10x40



Obrázek 12 - Chléb nechaný bez vody, telemorfa rodu Eurotiales (Aspergillus) - žlutá kolonie vlevo dole. Zbytek chleba pokrývají kolonie rodu Penicillium a anamorfy Aspergillu

Vzorek 3 - Mrkev

Alternarium

Další plíseň, kterou jsem zdokumentovala, je z rodu Alternaria. Vzorek jsem izolovala z mrkve, kde se většina z nás s touto plísní setkala v podobě černých skvrn. Plíseň se začala rozrůstat už v lednici, po vyndání se k ní pak později přidaly další druhy. Ty po delší době v teple nakonec rod Alternarium utlačily do ústraní. Plíseň jsem izolovala pomocí RA, na kterém se jí velmi dobře dařilo a vytvořila hustý černý porost. Na PDA a SDA pak tvořila bílé mycelium s černým zrnitým povrchem.

Tato plíseň je možné určit podle spor. Ty se tvoří přímo na myceliu a připomínají balíčky zavázané provázkem – jsou rozdělené na více částí (viz obr.14).

Zástupci tohoto rodu se vyskytují také převážně v půdě, mohou napadat rostliny a jen vzácně živočichy. Na potravinách je často objevíme na různých druzích zeleniny, ale i na obilninách a ovoci. Většina druhů tohoto rodu rychle roste a tvoří tmavé, až černé skvrny. Její konidie (spory vzniklé nepohlavně) se běžně nalézají v ovzduší kolem nás.

U někoho mohou ve větších koncentracích způsobovat alergické reakce. Zároveň mohou produkovat poměrně velké množství mykotoxinů a jak vdechování spor, tak konzumace napadených potravin může negativně ovlivnit zdraví člověka i zvířat. U

zvířat se například objevuje nádor jícnu způsobený konzumací krmiva kontaminovaného mykotoxiny. U člověka může vdechování spor zase zhoršovat pohyb řasinkového epitelu na sliznicích dýchacích cest a vyvolat např. sinusitidu (zánět vedlejších dutin nosních).

Další plísně na mrkvi

Jako další se na mrkvi později objevil modrozelený a bílý povlak tvořený plísní *Penicillium* (viz *Penicillium kapitola Vzorek 2*) (viz obr. 13).

Dále se objevil černý povlak tvořený sporami, jehož původ se mi bohužel nepodařilo určit.



Obrázek 13 - Mrkev napadená několika druhy plísní (*Penicillium* modrozelený a bílý, neurčený povlak spor černý *Alternarium* též černé)

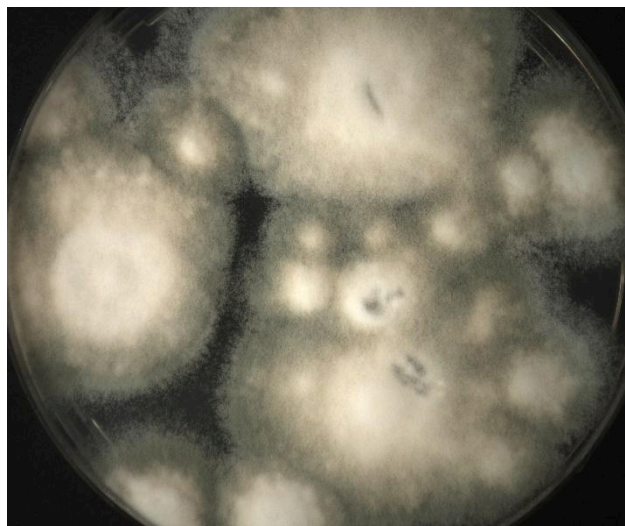
Vzorek 4 - Pomeranč

Penicillium

Na pomeranči jsem objevila jednu z nejznámějších plísní rodu *Penicillium* (o rodu viz. [kapitola u vzorku 2](#)), způsobující tzv. modrou hnilobu citrusů (viz obr.15, 16). Tuto konkrétní plíseň jsem našla na pomeranči skladovaném v lednici. V chladu vytvořila jen malou kolonii, ale po vynětí z chladu se velmi rychle rozrostla. Vytvořila na citrusu modrozelený povlak a později produkovala velké množství modrozelených spor. Stejnou plíseň jsem našla i na dalším pomeranči a citrónu. Pravděpodobně se jedná o druh *Penicillium digitatum*, případně o *Penicillium italicum*, jehož kolonie mají olivovější barvu. Oba druhy velmi často kontaminují citrusy. Mimo ně se mohou objevovat například na rýži, masu či ořeších.



Obrázek 15 - Pomeranč, pokrytý plísní *Penicillium*. Na obrázku je patrná hranice, kde jsou zralé spory (modrozelená část) a kde je jen mycelium.



Obrázek 16 - Plíseň *Penicillium* z pomeranče, přenesená na živnou půdu PDA

Vzorek 5 – Pomazánkové máslo

Na pomazánkovém másle se vytvořily tmavé kolonie rodu *Cladosporium*. Na PDA a SDA plíseň vytvořila tmavé kolonie a vedle ní zároveň vyrostly kolonie kvasinek.

Rod Cladosporium

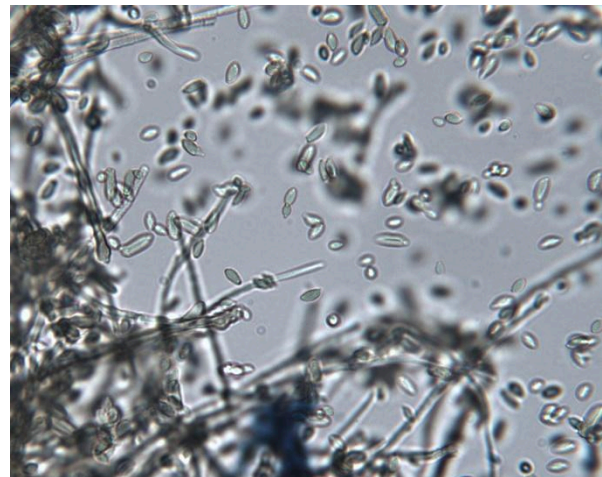
Rod Cladosporium se řadí do oddělení Ascomycota. Jeho spory jsou nejhojnějšími sporama létajícími v ovzduší. Tento rod obsahuje asi 770 druhů. Napadá ovoce, zeleninu, obilniny i masné výrobky.

Spory rodu Cladosporium mohou vyvolávat alergické záchvaty, obzvláště u lidí s astmatem a dýchacími poruchami. Neprodukují žádné významné mykotoxiny, ale mohou produkovat zapáchající těkavé látky.

Plísňe rodu Cladosporium obecně tvoří tmavé kolonie, což se potvrdilo i u této plísně, kdy byla kolonie tmavě šedá (viz obr. 17). Pod mikroskopem můžeme pozorovat konidiofory na nichž vyrůstají řetízky zrajících konidií, které se větví. Jsou ale velmi křehké, a proto se při přípravě preparátu většinou rozpadají. Konidie jsou oválné, mívají hrubý povrch a mohou být vidět i místa, kde byly připojeny k řetízku (viz obr 18).



Obrázek 17 - Kolonie rodu Cladosporium na agaru SDA (tmavě šedé kolonie), plíseň vysporulovala, jak značí i malé kolonie dole



Obrázek 18 - Spory a část mycelia rodu Cladosporium, na konidiích si lze vidět zploštělé místo kde byly přichycené ke konidioforu. Foceno pod mikroskopem, zvětšení 10x40

Vzorek 6 – Křen

Ze křenu se mi na RMA podařilo izolovat druh rodu Fusarium (viz [kapitola Vzorek 1](#)).

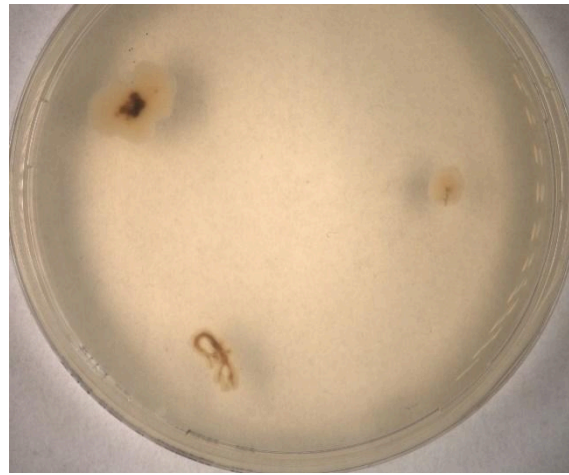
Na rýžovo-mrkvovém agaru vytvořila plíseň jen tenký povlak podlouhlých srpkovitých spor (viz obr. 19). Na půdě se zároveň vytvořily velké bubliny a výdutě.

Na živné půdy jsem pak přenášela plíseň již izolovanou na RMA. Na obou vytvořila bílé vláknité mycelium.

Později při přenášení plísní na profesionální agary už byl vzorek příliš starý, a proto se mi nepodařilo přenést žádnou plíseň, vyrostly mi na nich ale kolonie kvasinek. (viz obr. 20).



Obrázek 19 - Spory rodu *Fusarium*, izolovaného z křenu. Foceno pod mikroskopem, zvětšení 10x40



Obrázek 20 - Kolonie kvasinek přenesených z křenu, kolonie na PDA

Porovnání růstu plísní za různých podmínek

Různé živné půdy

V rámci práce jsem přenášela plísně na 3 různé živné půdy a porovnávala jejich růst. Porovnávala jsem také podobu kolonií na různých půdách.

Rýžová živná půda

Na této půdě se velmi dařilo vzorkům z mrkve rod *Alternarium* a kontaminant *Mucor*. Druhá jmenovaná vytvořila již po 5 dnech porost, který zaplnil celý prostor mezi živnou půdou a víčkem nádoby. Plísně z pomeranče se také rozrostly, i když po mnohem delší době a do mnohem menších objemů. Jejich agar byl navíc kontaminován další plísní rodu *Alternarium* a *Cladosporium*. Rod izolovaný z křenu (*Fusarium*) vytvořil asi po 12 dnech tenký povlak po celé ploše a tvořilo ho velké množství spor. Zároveň vytvořil na agaru zvláštní bubliny. Oproti tomu druh z pomazánky se skoro nerozrostl a jen se udržoval při životě v místě přenosu. Zvláštní bylo, že půda s druhem z pomazánky zůstala tekutá.

Na druhou stranu, na nepoužité půdě, kterou jsem uchovávala v lednici, mi asi po 10 dnech vyrostla neznámá plíseň, ač byla nádoba pevně uzavřena. Půda není univerzální, daří se na ní jen některým plísním. Spíš než na izolaci plísní, se půda hodí na získávání vzorků ze vzduchu.

PDA a SDA

Jak jsem již zmínila, agar PDA je uzpůsobený pro růst saprotrofních plísní (rostou na organických i neorganických materiálech), tudíž byl pro můj účel lepší. Oproti tomu SDA je vyrobený na pěstování patogenních plísní (ty, které napadají živočichy).

Tyto rozdíly se ve většině případů významně promítly na podobě kolonií.

Většina kolonií na PDA měla objemnější porosty a často rostly i rychleji. Na SDA se oproti tomu někdy tvořily jen povlaky spor. Zároveň na PDA plísně častěji sporulovaly (vytvářely spory).

Různé množství vody

Další pokus, který jsem vyzkoušela při zkoumání různých prostředí, byl prováděn s chleby. Čtyři krajíce stejného chlebu jsem vložila do igelitových pytlíčků, ke každému jsem dala různé množství vody a pytlíčky jsem zavázala. Chleby byly skladovány u okna v pokojové teplotě.

Nejdříve se plísně rozrostly na chlebu s největším množstvím přidané vody. Zároveň vytvořily nejvíce mycelia na povrchu chleba a vznikla větší diverzita druhů než u sušších krajíců (viz obr. 24). Porost tvořily převážně zástupci rodu *Penicillium*. Dále se objevovaly kolonie rodu *Aspergillus*.

Na dalších dvou se plíseň vytvořila o pár dní později. Diverzita byla také velká, i když ne tak jako u prvního vzorku chlebu. Vzorek se však výrazně lišil vzhledem porostu. Na povrchu chleba se zdaleka nevytvořilo tolik mycelia, ale na první pohled bylo vidět velké množství uvolňujících se spor.

Vlhčí chleba byl také pokryt převážně plísněmi rodu *Penicillium*, rod *Aspergillus* se však objevoval čteněji a našla jsem i zástupce rodu *Mucor* (viz obr 23).

Na chlebu ponechaném pouze s malým obsahem vody vyrostlo výrazně více zástupců rodu *Aspergillus* a *Mucor* či *Rhizopus*. Zároveň je povrch více prašný (viz obr. 22).

Na posledním krajíci, který byl ponechán bez vody, se viditelná kolonie plísně utvořila zase o něco později. Celkem vyrostly asi jen dva druhy plísně a viditelnou část houby tvořil jen modrozelený nebo žlutý povlak. Porost tvořily modrozelené kolonie rodu *Penicillium* a *Aspergillus*, které uvolňovaly velké množství spor. V jednom místě vyrostla také telemorfa z oddělení *Ascomycetes*. Ta vytvořila žlutozelený porost, který, na rozdíl od dalších porostů, vyhloubil do krajíce poměrně velkou díru.

Ač se na suchém chlebu plíseň vytvořila nejpozději, přesto se objevila až překvapivě rychle, a to asi po 7 dnech.

Tento experiment bylo možné z vybraných potravin jednoduše provádět pouze s chlebem, protože ostatní potraviny již v sobě obsahují vodu a přidání vody by tudíž růst příliš neovlivnilo.



Obrázek 21 - Chléb skladovaný bez přidané vody



Obrázek 22- Chléb s malým množstvím vody

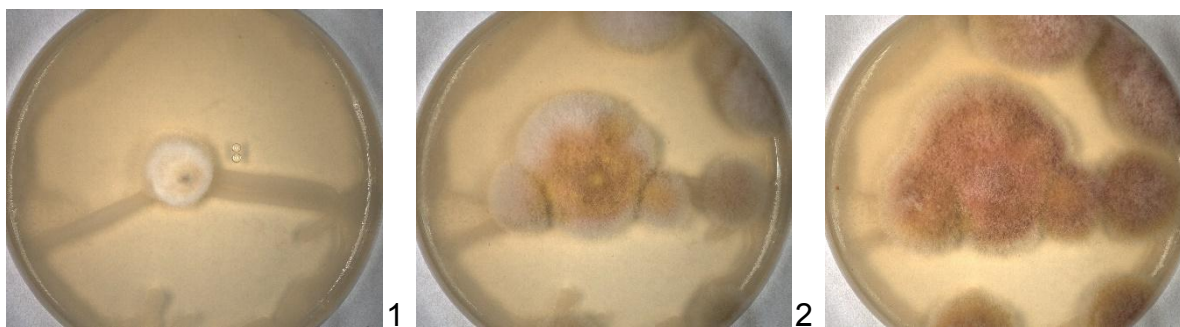


Obrázek 23 - Vzorek nechaný s středním obsahem vody

Sekvence fotografií

Na sekvenčním videu je zachycen růst plísně izolované z jablka. Sekvence se skládá z 42 fotografií focených během 21 dnů – vždy ráno a večer. Miska byla po celou dobu focení ve tmavém prostředí a v pokojové teplotě.

Plíseň rostla na živné půdě PDA a během focení vytvořila červenobílé mycelium. Spory se však bohužel nevytvořily. Největší problém při focení sekvence nastal kvůli tomu, že se se vzorkem nesmělo během procesu focení hýbat, tudíž se nádoba nemohla uzavírat folií. To společně se skutečností, že se miska musela dvakrát denně otevírat kvůli focení, vedlo k tomu, že byla miska na několika místech kontaminována (výběr fotografií ze sekvence viz obr.25).



3



6

Obrázek 25 - Šest vybraných obrázků ze sekvence, 1 - uprostřed agarů, v místě naočkování se začíná tvořit kolonie, 2 - kolonie se začíná rozrůstat, dostává barvu a okolo se tvoří další kolonie, 3 - kolonie se zvětšují a postupně červenají, 4 - kolonie získávají vínovou barvu a na levé straně agarů se tvoří kontaminace (červené jsou kvasinky, černé plíseň, možná Cladosporium), 5 - na krajích kolonií se tvoří bílé mycelium a začínají být patrné hranice kolonií, 6 – poslední snímek sekvence

Přehled pozorovaných plísní

Jedním z mých výstupů je přehled běžných plísní nalezených na potravinách. Přehled má 2 stran a je doplněn mými autorskými mikroskopickými i makroskopickými fotografiemi.

Popisuji v něm základní informace k 7 nejčastějším rodům plísní, kontaminujících potraviny se na potravinách.

Přehled byl pro účely výuky připraven k tisku a je k dispozici v příloze.

Závěr

Během své profilové práce jsem izolovala plísně ze šesti různých potravin a co nejpřesněji jsem je určila. Z potravin jsem izolovala celkem 10 druhů plísní a každou jsem přenesla na dva druhy živných půd. Pozorovala jsem poté, jak se liší vzhled kolonií na obou půdách.

Růst jedné z plísní jsem zdokumentovala pomocí sekvenčního videa, které je součástí profilové práce.

Dále jsem porovnávala, jak ovlivňuje množství vody růst plísní na chlebu. Lze shrnout, že s přibývajícím vlhkostí skladování se urychlovalo uchycení plísní a stoupala rozmanitost zachycených druhů.

Všechny pokusy jsem podrobně fotograficky zdokumentovala makrofotografiemi a plísně jsem nafotila pod mikroskopem. Součástí profilové práce je mnou vypracovaný přehled nalezených plísní. Nakonec jsem vytvořila tisknutelný přehled běžných plísní na potravinách.

Na moji práci by bylo možné v budoucnu navázat zkoumáním dalších druhů potravin nebo podrobnějším zkoumáním toho, jak okolní prostředí ovlivňuje rychlost objevení se plísní a jejich diverzitu.

Zdroje

- 1) SEDLÁŘOVÁ, M., VAŠUTOVÁ, M., PETRŽELOVÁ, I. a kol. Atlas houbových organizmů. Oddělení fytopatologie Katedry botaniky PřF UP v Olomouci
Stránka – askomycety – dostupné z:
<http://old.botany.upol.cz/atlas/system/Ascomycetes.php>
- 2) KUBÁTOVÁ, Alena: Atlas mikroskopických saprotrofních hub (Ascomycota) (2006), dostupné z
<https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a-vyzkum/atlas-mikroskopickych-saprotrofnich-hub-ascomycota>
- 3) Mykotoxiny – heslo dostupné z
<https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76672.aspx>
- 4) TVRZOVÁ, Ludmila, CHUMCHALOVÁ Jana, NĚMEC Miroslav, PÁČOVÁ Zdenka, SAVICKÁ Dana, KUBÁTOVÁ Alena a PATÁKOVÁ Petra. Miniatlas mikroorganismů [online]. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2006 [cit. 2022-11-09]. Elportál. Dostupné z: <http://is.muni.cz/elportal/?id=702650>. ISSN 1802-128X.
- 5) *Kurs 7 - plísňe v potravinách: Plísňe, potraviny a pokrmy v provozovnách stravovacích služeb* [online]. Hradec Králové: KHSHK, 2016 [cit. 2022-11-09]. Dostupné z: http://www.khshk.cz/e-learning/kurs7/obsah_kurzu.html
- 6) KUBÁTOVÁ, Alena. Houby v našich domácnostech aneb o čem doma víte i nevíte. *Živa*. 2012, **2012**(5), 224 - 228.
- 7) OSTRÝ, Vladimír. Mikroskopické vláknité houby: Účinky mykotoxinů na lidské zdraví. *Vesmír*. 2000, **2000**(79), 187 - 189.
- 8) Aspergillus. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco: Wikimedia Foundation, 2022 [cit. 2022-11-09]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Aspergillus>
- 9) JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie pro gymnázia: (teoretická a praktická část)*. 12. vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2021. ISBN 978-80-7182-345-2.
- 10) MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité Mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.

Přílohy

Příloha 1 – záměr profilové práce

Příloha 2 – tisknutelný přehled běžných plísní pro výukové účely

Příloha 3 – sekvenční video růstu plísně rodu *Fusarium*

Příloha 4 – album fotografií