

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2021

Beáta Szabóová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Beáta Szabóová

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

**ÚČINKY HOUBY PYTHIUM OLIGANDRUM NA
NĚKTERÉ DALŠÍ DRUHY MIKROMYCET**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

PLZEŇ 2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Beáta SZABÓOVÁ
Osobní číslo:	Z18B0143P
Studijní program:	B5345 Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor:	Zdravotní laborant
Téma práce:	Účinky houby <i>Pythium oligandrum</i> na některé další druhy mikro- mycet
Zadávací katedra:	Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravot- nictví

Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- DEACON, J. W. Studies on Pythium oligandrum, an aggressive parasite of other fungi. Transaction of the British Mycological Society, 1976, 66.3: 383-391.
- JEDLIČKOVÁ, A. Systémové mykózy: průvodceošetrujícího lékaře. Praha: Maxdorf, 2006, 130 s. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 80-734-5101-8.
- KLABAN, Vladimír. Ekologie mikroorganismů: Ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, 549 s., ISBN 978-807-2627-707.
- MENCL, K. – Bureš, I. – Poláková, H. – Stuchlík, D. Ovlivnění hnisajících a nehojících se ran pomocí mikromycety Pythium oligandrum. Hojení ran, XII. Celostátní kongres s mezinárodní účastí. Mezioborová spolupráce při léčbě ran a kožních defektů, leden 2014.
- SKOŘEPOVÁ, Magdaléna. Dermatolykologie v obrazech. 1. vyd. Praha: Galén, 2008, 98s. ISBN 978-807-2624-625

Vedoucí bakalářské práce:

RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Katedra záchranářství, diagnostických oborů
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **1. června 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2021**

PhDr. Lukáš Štich, MBA
děkan



Mgr. Stanislava Reichertová
vedoucí katedry

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 26. 03. 2021.

.....

vlastnoruční podpis

Abstrakt

Příjmení a jméno: Beáta Szabóová

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Účinky houby *Pythium oligandrum* na některé další druhy mikromycet

Vedoucí práce: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Počet stran – číslované: 37

Počet stran – nečíslované: 20

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 76

Klíčová slova: *Pythium oligandrum*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor species*, mikromycety, alternativní antimykotika

Souhrn:

Tato práce zkoumá vliv houby *Pythium oligandrum* na patogenní rychle rostoucí plísňe a kvasinky, konkrétněji *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Mucor species*. Mezi cíle této práce patří vykultivovat *Pythium oligandrum* z volně prodejných přípravků, zjistit, při jaké teplotě roste *Pythium oligandrum* nejlépe a jaký komerčně dostupný přípravek má vyšší účinnost na patogenní plísňe a kvasinky. Cíle práce se nezdařily kvůli absenci spor *Pythium oligandrum* ve volně prodejných přípravcích.

Abstract

Surname and name: Beáta Szabóová

Department: Department of Rescue, Diagnostics and Public Health

Title of thesis: Effects of *Pythium oligandrum* on some other species of micromycetes

Consultant: RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

Number of pages – numbered: 37

Number of pages – unnumbered: 20

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 76

Keywords: *Pythium oligandrum*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor species*, mikromycetes, alternative antimycotics

Summary:

This thesis examines effect of the fungus *Pythium oligandrum* on pathogenic fast-growing fungi and yeast, more specifically *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* and *Mucor species*. One of the aims of this thesis is to cultivate *Pythium oligandrum* from over-the-counter preparations, than to find out at which temperature *Pythium oligandrum* grows best and which commercially available preparation has a higher efficiency against pathogenic fungi and yeasts. The aims of the thesis failed, due to the absence of *Pythium oligandrum* spores in over-the-counter products.

Předmluva

Tato práce byla napsána, kvůli přibývajícimu počtu patogenů, kteří si vytváří rezistenci na léky. Myslím si, že by bylo dobré hledat nové způsoby, jak s těmito patogeny bojovat, jednak více ekologickou cestou a také bez nejrůznějších vedlejších efektů, které tradiční léky způsobují. Cílem práce je prokázat, že houba *Pythium oligandrum* je schopna rozpoznat a zabít patogenní rychle rostoucí plíseň nebo kvasinku. To by mohlo vést k dalším výzkumům a postupně k vytváření nových léků, které budou napodobovat mechanismy této houby. Nově vyrobené léky by mohly mít potenciál být stejně účinné jako farmaceuticky vyráběné přípravky, ale bez nežádoucích vedlejších efektů.

Poděkování

Děkuji svému vedoucímu práce RNDr. Karlovi Fajfrlíkovi, Ph.D., za jeho trpělivost, ochotu a odborné vedení. Dále MUDr. Heleně Janouškovcové za její rady a poskytnutí zázemí k mé praktické části a laborantkám z Ústavu mikrobiologie ve FN Plzeň, které mi pomohly můj výzkum realizovat. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, hlavně Ing. Ondřeji Szabóovi, za poskytnutí mnoha materiálů, které jsem v této práci využila.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	11
SEZNAM ZKRATEK	13
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	17
1 MIKROMYCETY	17
1.1 Vláknité mikroorganismy – pomalu rostoucí (dermatofyty)	17
1.1.1 <i>Microsporum canis</i>	17
1.1.2 <i>Trichophyton rubrum</i>	18
1.1.3 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	19
1.1.4 <i>Epidermophyton floccosum</i>	20
1.2 Vláknité mikroorganismy – rychle rostoucí (<i>Ascomycota</i> , <i>Zygomycota</i>).....	20
1.3 <i>Ascomycota</i>	20
1.3.1 <i>Aspergillus</i>	21
1.4 <i>Zygomycota</i>	22
1.4.1 <i>Mucor mucedo</i>	23
1.4.2 <i>Rhizopus nigricans</i>	23
1.5 Kvasinkovité mikroorganismy.....	23
1.5.1 <i>Candida albicans</i>	24
1.5.2 <i>Candida glabrata</i>	24
1.5.3 <i>Candida parapsilosis</i>	25
2 VYŠETŘENÍ A IDENTIFIKACE	26
2.1 Mykologické vyšetření klinického materiálu	26
2.1.1 Přístroje a pomůcky	26
2.1.2 Reagencie.....	26
2.1.3 Postup	26
2.2 Identifikace kvasinek a vláknitých mikromycet	27
2.2.1 Přístroje a pomůcky	27
2.2.2 Reagencie.....	27
2.2.3 Identifikace kvasinek.....	27
2.2.4 Identifikace vláknitých mikromycet.....	28
3 DALŠÍ ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ HOUBAMI	29
4 LÉČBA	30
4.1 Léčba dermatofytóz	30
4.1.1 Amfotericin B	30
4.1.2 Ketokonazol.....	30

4.1.3	Flucytosin	30
4.2	Léčba kandidóz	31
4.2.1	Fluconazol	31
4.3	Alternativní léčba.....	31
4.3.1	Taniny.....	31
4.3.2	Esenciální oleje.....	32
4.3.3	Biocontrol agents (BCAs)	32
5	PYTHIUM OLIGANDRUM.....	33
5.1	Taxonomie	33
5.2	Historie.....	33
5.3	Charakteristika	34
	PRAKTICKÁ ČÁST	38
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	38
6.1	Hlavní cíl.....	38
6.2	Dílčí cíle.....	38
7	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	39
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	40
9	METODIKA PRÁCE	41
9.1	Příprava pokusu	41
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	42
10.1	Růst mikromycet při 27 °C	42
10.1.1	<i>C. albicans</i>	42
10.1.2	<i>C. glabrata</i>	42
10.1.3	<i>Mucor species</i>	43
10.1.4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	43
10.1.5	<i>Pythium oligandrum</i>	43
10.2	Růst mikromycet při 37 °C	44
10.2.1	<i>C. albicans</i>	44
10.2.2	<i>C. glabrata</i>	44
10.2.3	<i>Mucor species</i>	45
10.2.4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	45
10.2.5	<i>Pythium oligandrum</i>	45
10.3	Příčiny nepovedeného experimentu	45
	DISKUZE.....	48
	ZÁVĚR.....	51
	SEZNAM LITERATURY.....	52

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 <i>Microsporium canis</i> – kultura	18
Obrázek 2 <i>Microsporium canis</i> – mikroskopický vzhled.....	18
Obrázek 3 <i>Trychophyton rubrum</i> – kultura	19
Obrázek 4 <i>Trychophyton rubrum</i> – mikroskopický vzhled.....	19
Obrázek 5 <i>Trychophyton mentagrophytes</i> – kultura.....	19
Obrázek 6 <i>Trychophyton mentagrophytes</i> – mikroskopický vzhled	19
Obrázek 7 <i>Epidermophyton floccosum</i> - kultura	20
Obrázek 8 <i>Epidermophyton floccosum</i> – mikroskopický vzhled	20
Obrázek 9 <i>Aspergillus fumigatus</i> – mikroskopický vzhled.....	21
Obrázek 10 <i>Aspergillus fumigatus</i> – kultura	21
Obrázek 11 <i>Zygomycota</i> – kultura na ovoci	23
Obrázek 12 <i>Zygomycota</i> – mikroskopický vzhled	23
Obrázek 13 <i>Candida albicans</i> - kultura.....	24
Obrázek 14 <i>Candida albicans</i> - mikroskopický vzhled	24
Obrázek 15 <i>Candida parapsilosis</i> - kultura.....	25
Obrázek 16 <i>Candida parapsilosis</i> – mikroskopický vzhled.....	25
Obrázek 17 Mykoparasitismus patogenních hub (<i>Fusarium graminearum</i>) pomocí <i>P. oligandrum</i>	36
Obrázek 18 Mykoparasitismus patogenních hub (<i>Fusarium graminearum</i>) pomocí <i>P. oligandrum</i> zblízka.....	36
Obrázek 19 Mykoparasitismus patogenních hub pomocí <i>P. oligandrum</i> + spory	37
Obrázek 20 <i>C. albicans</i> vykultivovaná při 27 °C + disky s <i>P. oligandrum</i>	42
Obrázek 21 <i>C. glabrata</i> vykultivovaná při 27 °C + suspenze <i>P. oligandrum</i>	42
Obrázek 22 <i>Mucor species</i> vykultivovaný při 27 °C + disky s <i>P. oligandrum</i>	43
Obrázek 23 <i>Pythium oligandrum</i> na SAB	43
Obrázek 24 <i>C. albicans</i> vykultivovaná při 37 °C + disky s <i>P. oligandrum</i>	44
Obrázek 25 <i>C. glabrata</i> vykultivovaná při 37 °C + suspenze s <i>P. oligandrum</i>	44
Obrázek 26 <i>Mucor species</i> vykultivovaná při 37 °C + disky s <i>P. oligandrum</i>	45
Obrázek 27 <i>P. oligandrum</i> na SAB	45
Obrázek 28 Spory <i>P. oligandrum</i>	46
Obrázek 30 BioGarden přípravek zvětšení 100x.....	46
Obrázek 29 BioGarden přípravek zvětšení 200x.....	46

Obrázek 31 Biodeur přípravek zvětšení 100x	47
Obrázek 32 Biodeur přípravek zvětšení 200x	47

SEZNAM ZKRATEK

°C – stupeň celsia

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome

Aj. – a jiné

API 20 AUX

BCAs – Biocontrol agents

CWP – Cell-wall protein, protein buněčné stěny

Et al. – Et alii, a jiní

FN Plzeň – Fakultní nemocnice Plzeň

G - gram

GT test – Germ tubes test

HIV - Human Immunodeficiency Virus

IgE – Imunoglobulin E

IgM – Imunoglobulin M

Ing. - Inženýr

MALDI-TOF - Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem

Mm - milimetr

MUDr. - Medicinae universae doctor, magisterský titul ze všeobecného lékařství

PEG 150 – Hydrogenovaná jojoba

Ph.D. – Akademický titul doktor

RNDr. - Rerum naturalium doctor, Doktor přírodních věd

SAB - Sabouraudův agar

SARS-CoV-2 - Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus

Sp. – Species, druh

Spol. s r.o. – Společnost s ručením omezeným

ÚVOD

Cílem práce je zjistit, jaké účinky má takzvaná „chytrá houba“ *Pythium oligandrum* na další druhy patogenních mikromycet. Dosud se *P. oligandrum* ve většině případů používalo v zemědělství na rostliny, jako jsou například rajčata, obilí nebo píce. Nicméně v posledních letech, kdy vzrůstá zájem o alternativní léčbu, se tato houba začala používat i ve farmaceutickém průmyslu.

Doposud proběhly studie, které se zaměřovaly především na zemědělskou činnost, nicméně jsou i takové, které proběhly na lidských patogenech. Jedna z nejznámějších je od Aleny Gabrielové et al., kdy se zkoumal vliv *P. oligandrum* na dermatofyty. Tento výzkum měl značný úspěch a prokázal, že *P. oligandrum* začalo po aplikaci na dermatofyty rozpoznávat a zabíjet tyto patogeny. Mezi další příklady patří výzkum vedený MUDr. Karlem Menclem, kdy se zkoumal vliv této takzvané „chytré houby“ na zlepšení léčby bércových vředů.

Prozatím neexistují studie vlivu *P. oligandrum* na rychle rostoucí plísňe a na kvasinky jako na lidské patogeny a proto bych se tímto tématem chtěla zabývat v mé bakalářské práci. Přestože existuje řada tradičních léků, které proti těmto patogenním organismům účinně fungují, je potřeba vymýšlet alternativní řešení, a to zejména kvůli rostoucí rezistenci a řadě méně či více závažných vedlejších efektů, které tyto léky způsobují. Jedno z alternativních řešení by mohla poskytnout právě léčba pomocí *P. oligandrum*. Myslíme si, že je to ideální řešení, protože zatím nejsou známy žádné negativní vedlejší účinky související s jejím růstem.

V tomto výzkumu se proto zaměříme v teoretické části na klasifikaci mikromycet, popis jednotlivých zkoumaných druhů patogenů, popis tradiční léčby a hlavně na samotné *Pythium oligandrum*, jeho mechanismy účinku a historii.

V praktické části se zaměříme na komerčně prodávané přípravky, ať už se jedná o preparáty určené pro rostlinolékařství nebo o přípravky určené v humánní medicíně. Účelem je zjistit, jak reaguje *P. oligandrum* na kvasinky a rychle rostoucí plísňe. Zda a po jaké době začne tato houba zabíjet lidské patogeny, jako jsou *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Mucor species*. Dále také při jaké teplotě roste *P. oligandrum* nejlépe a také se pokusíme zjistit, jaký volně prodejný přípravek je k těmto účelům nejlepší a zda obsahuje dostatečné množství účinné látky (spor *P. oligandrum*) potřebné k eliminaci kvasinek a rychle rostoucích plísňí. K porovnání jsme vybrali dva nejprodává-

nější produkty dostupné na volném trhu, které dle informací získaných z příbalových letáků obsahují lyofilizované spory *P. oligandrum*.

Předpokládáme, že by *P. oligandrum* mělo začít růst v řádu několika dnů na petriho miskách společně se zkoumanými patogeny. Dále by mělo dojít k rozpoznání patogenu a následně by se *P. oligandrum* mělo začít živit jeho myceliem (v případě kvasinek jeho koloniemi). Mělo by dojít k tomu, že patogen začne slábnout a ubývat až do té míry, kdy vymizí úplně celý. Poté, co celý patogen poslouží jako živina pro *P. oligandrum*, by mělo dojít i ke slábnutí a odumírání této houby, protože by již nadále neměla žádné živiny pro své přežití.

To by do budoucna mohlo znamenat, že když se účinky houby *P. oligandrum* potvrdí, mohly by se začít vytvářet nová antimykotika, která by byla bez negativních vedlejších účinků a úspěšně by bojovala s plísňovými a kvasinkovými onemocněními.

TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROMYCETY

Mikromycety (mikroskopické vláknité houby, plísně) jsou vícebuněčné, eukaryotní mikroorganismy. Jsou heterotrofní, saprofytické nebo parazitické. Některé druhy mikromycet jsou rozšířeny po celém světě. Spolu s kvasinkami a kvasinkovitými mikroorganismy tvoří skupinu mikroskopických hub. Jejich stáří se odhaduje na 300 miliónů let (Weitzman, 1996).

Mikromycety jsou velice morfologicky rozmanité a jsou schopny adaptovat se na nejrůznější ekologické podmínky, což znamená, že jsou přítomny všude tam, kde existuje organická hmota. V životním prostředí jsou přítomny v ovzduší, půdě, vodě, na povrchu živých a odumřelých organismů, na potravinách (Charmette, 2008).

Některé druhy hub jsou toxinogenní (vytváří toxiny) nebo patogenní a způsobují onemocnění kůže nebo podkoží (dermatomykózy) nebo dokonce systémová onemocnění. V současné době je známo přes 290 mykotoxinů (Charmette, 2008).

Mikromycety

- Vlákňité mikroorganismy
 - Pomalu rostoucí (dermatofyty)
 - Rychle rostoucí (*Ascomycota*, *Zygomycota*)
- Kvasinkovité mikroorganismy

(Ostrý, 1998)

1.1 Vlákňité mikroorganismy – pomalu rostoucí (dermatofyty)

Patří sem řada příbuzných hub, které způsobují dermatofytózy. Dermatofytózy se projevují nejčastěji infekcí mezi prsty nohou nebo na nehtech, ale mohou se objevit i na jiných částech těla. Mezi dermatofyty patří například *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* a další (Schindler, 2010).

1.1.1 *Microsporum canis*

Microsporum canis patří do skupiny dermatofyty, což jsou blízké příbuzné organismy, které mají schopnost napadat *stratum corneum* (vrchní část epidermis) a z něho

odvozené keratinizované tkáně, jako jsou nehty, vlasy lidí a chlupy zvířat. Tyto houby způsobují infekci zvanou dermatofytóza. *Microsporum canis* je nejčastějším dermatofytem u koček a psů, ale tento organismus byl pozorován i u jiných domácích a divokých zvířat. *M. canis* se rozmnožuje hlavně nepohlavně mitotickým procesem. Během invaze do vlasů (šupin, chlupů,...) jsou hyfy fragmentovány a vytvářejí masy malých arthroconidií, které představují infekční části houby (Pasquetti, 2017).

Morfologie

Průměr kolonie se pohybuje od 3 do 9 cm (po sedmidenní inkubaci při teplotě 25°C na dextrózovém agaru). Textura houby je vlněná až bavlněná, barva bílá nebo světle žlutá z vrchu a žlutá až oranžová zespodu (Pasquetti, 2017).

Obrázek 1 *Microsporum canis* – kultura

Obrázek 2 *Microsporum canis* – mikroskopický vzhled



Zdroj: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/microsporum/>

1.1.2 *Trichophyton rubrum*

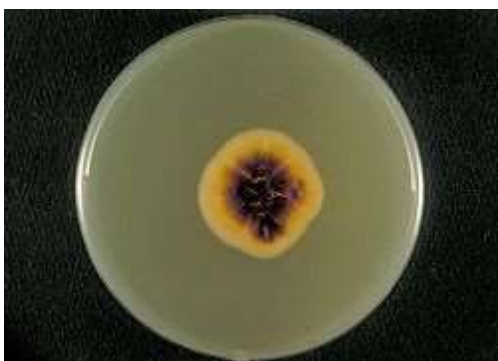
Trichophyton rubrum je keratinyfyní vláknitá houba, která infikuje kůži, nehty a vlasové folikuly. Je celosvětově nejběžnějším původcem dermatofytózy. Způsobuje většinou onemocnění tinea pedis (plíseň nohou) a onychomykózu (plíseň napadající kůži, vlasy a nehty). Přenos z člověka na člověka byl podpořen především půjčováním bot. Bylo dokázáno, že *T. rubrum* se vyvinulo teprve nedávno a rozšířilo se z dálného východu pomocí vojáků během první světové války (Arenas, 1995; Gräser, 1999)

Morfologie

Kolonie bývají bílé, chmýřité s občasným výskytem narůžovělého prstýnku po okrajích. Na spodní straně kolonií můžeme pozorovat červenohnědý až vínově červený pigment. V preparátu pod mikroskopem můžeme vidět méně se vyskytující mikrokonidie, které jsou hruškovitého tvaru a nasedají na strany hyf. Dále také makrokonidie, které mají doutníkovitý tvar (Skořepová, 2008).

Obrázek 4 *Trychpython rubrum* – kultura

Obrázek 3 *Trychophyton rubrum* – mikroskopický vzhled



Zdroj: https://phil.cdc.gov/phil_images/20030723/8/PHIL_4248_lores.jpg

Zdroj: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton/>

1.1.3 *Trychophyton mentagrophytes*

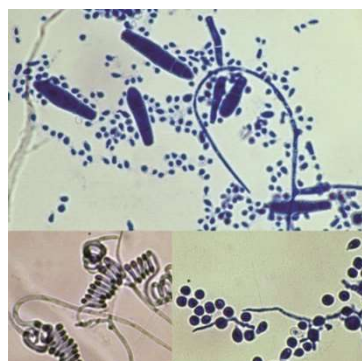
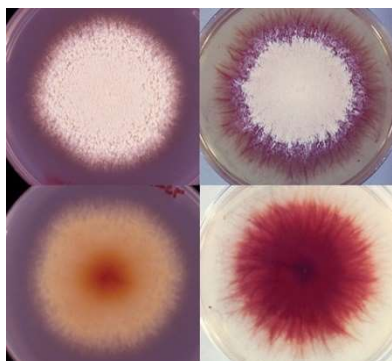
Trychophyton mentagrophytes patří rovněž mezi dermatofyty. Je schopná infikovat keratinové tkáně u lidí a zvířat. Objevuje se celosvětově. U lidí způsobuje například onemocnění tinea corporis (plíseň na těle) a tinea barbae (plíseň ve vlasech) (Knudtson, 1980; Jedličková, 2008).

Morfologie

Na první pohled můžeme pozorovat nízké bílé až krémové kolonie. Spodina se nejprve zbarví do špinavě žluté barvy, která se později postupně mění až do barvy červenoohnědé. Primokultury bývají zrnité, v subkulturách dochází ke změně na chmýřovitou. V mikroskopu můžeme vidět mikrokonidie, které bývají zprvu hruškovité a poté přecházejí do kulovitého tvaru. Mikrokonidie jsou často rozestavené do tvaru hroznů. Pozorujeme také doutníkovité makrokonidie. Charakteristickým znakem bývají vlákna, která mohou připomínat úponky révy (Skořepová, 2008).

Obrázek 5 *Trychophyton mentagrophytes* – kultura

Obrázek 6 *Trychophyton mentagrophytes* – mikroskopický vzhled



Zdroj: <https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/dermatophytes/trichophyton>

1.1.4 Epidermophyton floccosum

Epidermophyton floccosum bylo považováno na počátku 20. století za nejvíce vyskytujícího se antropofilního dermatofyty na území České republiky, nyní je to *Trichophyton rubrum*. Je původcem onemocnění tinea cruris (plíseň v tříslech), tinea pedum (plíseň nohou) a onychomykózy (plíseň nehtů). V současnosti se vyskytuje jen zřídka, ale dokáže způsobit menší epidemii v uzavřené skupině lidí, kteří používají stejná hygienická zařízení (Jedličková, 2008).

Morfologie

Makroskopicky můžeme vidět ploché, jemně zrnité kolonie s okrovým okrajem, který se paprscitě rozbíhá do stran. Spodina je zbarvena do žlutozelena nebo může být narezlé barvy. V mikroskopickém preparátu mikrokonidie nenalezneme. Můžeme však vidět kyjovité makrokonidie, které rostou obdobně jako banány v trsech. Dále také chlamydo-spory, které pozorujeme v různém množství. Tyto útvary převládají nad makrokonidiiemi ve starých preparátech (Skořepová, 2008).

Obrázek 7 *Epidermophyton floccosum* - kultura

Obrázek 8 *Epidermophyton floccosum* – mikroskopický vzhled



Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2015/09/epidermophyton-floccosum.html>

1.2 Vlákňité mikroorganismy – rychle rostoucí (Ascomycota, Zygomycota)

1.3 Ascomycota

Jsou skupina hub vřeckovýtrusných, které jsou makroskopické i mikroskopické a často vytvářejí plodnice. Jsou schopné rozmnožovat se pohlavně i nepohlavně. *Ascomycota* jsou jedna z nejrozšířenějších a nejpočetnějších skupin hub. Patří sem přibližně 40 řádů, jako jsou *Eurotiales* (do tohoto řádu patří např. *Penicillium* a *Aspergillus*), *Erysiphales*

(jeho zástupci jsou *Erysiphe* – různé rody padlí) a *Pleosporales* (rody *Alternaria* - čerň) (Sedlářová, 2007).

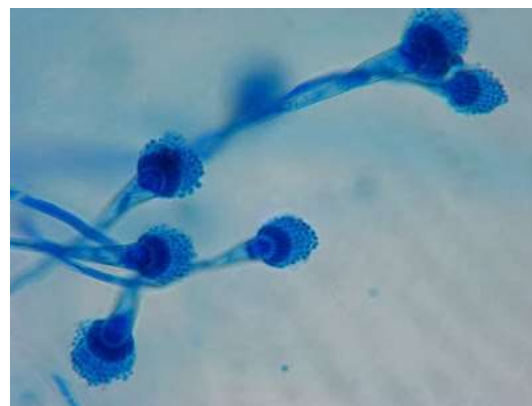
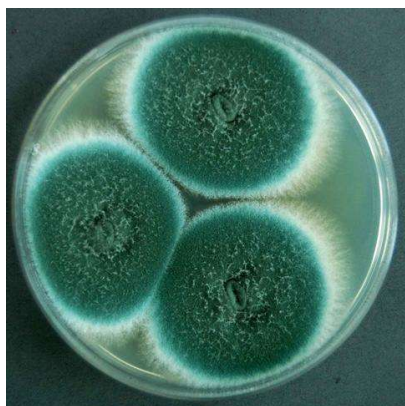
1.3.1 *Aspergillus*

Do rodu *Aspergillus* patří saprofytické vláknité houby, které se vyskytují běžně po celém světě. Tento rod zahrnuje více než 250 druhů (Goldman, 2007).

Mezi nejznámější zástupce patří *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ochraceus* a *Aspergillus versicolor*. Tyto druhy způsobují infekce u člověka (Afzal, 2013).

Obrázek 10 *Aspergillus fumigatus* – kultura

Obrázek 9 *Aspergillus fumigatus* – mikroskopický vzhled



Zdroj: <http://fungi.myspecies.info/file/941>

Zdroj: <http://thunderhouse4-yuri.blogspot.com/2012/01/aspergillus-fumigatus.html>

Aspergily nejlépe rostou při teplotě 37 °C, ale dokážou zvládat teplotu od 12-48 °C. S rostoucí teplotou patogenita u člověka roste. Zástupci tohoto rodu se nejčastěji vyskytují v tropických oblastech a v mírném pásu, ale některé druhy jsou schopné obývat až polární oblasti (Hedayati, 2007; Galimberti, 2012).

Plísň *Aspergillus* můžeme nejsnadněji najít ve zkaženém ovoci a v půdě (ve které se rozkládá organická hmota). Tyto plísně nejčastěji napadají pšenici, ječmen, kukuřici, slunečnici, řepku olejnou, koření a ořechy. Pokud člověk pozře kontaminovanou plodinu, může dojít k závažnému onemocnění a v krajním případě i smrti (Reddy, 2011).

Tyto plísně mohou také dále způsobovat velmi nebezpečné infekce u lidí, kteří mají oslabený imunitní systém (pacienti s AIDS, leukémií, po transplantaci). Infekce se také

vyskytují u pacientů, kteří se dlouho léčí kortikosteroidy ve vysokých dávkách (Dagenais, 2009).

Jedním z nejvážnějších onemocnění způsobené houbami rodu *Aspergillus* je aspergilóza. Ta postihuje plíce, pohrudnici, srdce a může se rozšířit až do centrální nervové soustavy. Člověk se nakazí, pokud vdechuje spory, které se mu poté uloží v průduškách a plicních sklípcích (Wattier, 2016; Dagenais, 2009)

Klinické příznaky jsou horečka, respirační problémy (kašel, dušnost, bolesti na hrudi), nechutenství a únava. Aspergilóza se také může projevit kožními příznaky, jako jsou puchýře, vřídky a krevní výrony. Toto onemocnění často končí smrtí, v případě respiračních problémů z 25-50 %, při zasažení centrální nervové soustavy až z 90 % (Patterson, 2014; Wattier, 2016; Dagenais, 2009).

1.3.1.1 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus se vyskytuje po celém světě a ve vzduchu můžeme za běžných podmínek nalézt až 100 spor na m³. Proto jsou zcela běžně inhalovány lidmi, většinou bez jakýchkoliv nepříznivých účinků. Tyto účinky jsou běžně eliminovány vrozenými obrannými mechanismy, nicméně mohou způsobovat aspergilózu u imunosuprimovaných pacientů. Vzhledem k rostoucímu počtu těchto pacientů v posledních letech představuje *A. fumigatus* jednoho z nejrozšířenějších plísňových patogenů (Latgé, 1999).

Morfologie

Kolonie jsou rychle rostoucí při teplotě 25°C – 37 °C. Vypěstovaná kultura má zeleno modrou až zeleno šedou barvu a po okraji bílý proužek. Na mikroskopickém preparátu můžeme pozorovat konidiofory s nazelenalou stopkou a kyjovitým měchýřkem. Konidie jsou kulovité a jsou uspořádány do sloupců (Kubátová 2021b).

1.4 Zygomycota

Skupina *Zygomycota* (houby spájivé) jsou ve většině případů saprofyté a dají se nalézt v půdách, organických materiálech, na tlejícím ovoci, na trusu nebo na špatně uskladněných potravinách. Mezi nejznámější zástupce oddělení *Zygomycota* patří třídy *Rhizopus* a *Mucor* (Rosypal, 2003; Jablonský, 2006).

Obrázek 12 *Zygomycota* – kultura na ovoci

Obrázek 11 *Zygomycota* – mikroskopický vzhled



Zdroj: <https://www.dreamstime.com/photos-images/zygomycota.html>

Zdroj: Content Providers: CDC/Dr. Lucille K. Georg

Tyto houby způsobují onemocnění zvané zygomykóza. Jsou způsobeny řády *Mucorales* a *Entomophthorales*. Onemocnění je způsobeno inhalací spor, proniknutím spor skrz kůži, nebo požitím spor. Lidská zygomykóza se objevuje především u imunokompromitovaných jedinců. K rizikovým faktorům patří diabetes mellitus, dlouhá imunosupresivní léčba, užívání širokospektrálních antibiotik nebo narušení kožní bariéry (popáleniny, chirurgické rány). U zdravých imunokompetentních pacientů se vyskytuje jen zřídka. Nejčastější projevy nemoci jsou plicní onemocnění a kožní léze. Zygomykóza také může vést k trombóze, infarktu a destrukci tkáně. Pokud má být léčba účinná, musí se zahájit včas. K léčbě se používají antifungální léky v kombinaci s chirurgickým zákrokem (Ribes, 2000).

1.4.1 *Mucor mucedo*

Neboli plíseň hlavičková je jedna z nejrozšířenějších plísní. Roste ve vlhku na organických látkách, na hnoji a hnilých potravinách. Šíří se vzduchem (Čihák, 2021).

1.4.2 *Rhizopus nigricans*

Houba vyskytující se celosvětově, hlavně v tropických oblastech. Roste na potravinách a krmivech a způsobuje hnilobu ovoce. Kolonie rostou rychle, během 3-4 dnů při teplotě 25 °C (Kubátová, 2021a).

1.5 Kvasinkovité mikroorganismy

Infekce způsobená kandidami se nazývá kandidóza. Kandida je houba, která je nepostradatelnou součástí lidského organismu. U zdravého člověka je v rovnováze a symbióze s ostatními mikroorganismy na kůži, v ústní dutině, horních dýchacích cestách, ve vagině, močové trubici i v gastrointestinálním traktu (Pánková, 2013).

Kandidóza je nejčastější mykózou s řadou rozmanitých klinických obrazů různé klinické závažnosti. Početně nejvýznamnější jsou povrchové infekce sliznic a kůže. Klinicky závažnější a život ohrožující jsou kandidové infekce vnitřních orgánů při sepsi, endokarditidě a meningitidě (Pánková, 2013).

Klinický průběh je většinou chronický, ale mohou být i předzvěsti kandidóz se závažným život ohrožujícím průběhem. Většina kandidových infekcí (více než 90 %) je způsobena pěti nejčastěji se vyskytujícími druhy – *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* a *Candida krusei* (Pánková, 2013).

1.5.1 *Candida albicans*

Některé druhy kandid jsou neškodné, vyskytují se běžně v gastrointestinálním a urogenitálním traktu. Jiné mohou být ale patogeny, které způsobují řadu onemocnění, například bolestivé povrchové infekce, jako je vaginitida a povrchové infekce úst a jícnu. U některých imunokompromitovaných pacientů (pacientů s HIV, po chemoterapii aj.) může způsobovat život ohrožující infekce krevního řečiště (Sudbery, 2004; Sudbery, 2011).

Obrázek 13 *Candida albicans* - kultura

Obrázek 14 *Candida albicans* - mikroskopický vzhled



Zdroj: <https://www.shifffrequency.com/michael-edwards-candida-albicans-the-foundation-of-illness/>

Zdroj: <https://www.sciencesource.com/archive/Image/Candida-albicans-culture-SS2441056.html>

1.5.2 *Candida glabrata*

Dříve byla *C. glabrata* považována za nepatogenního saprofyta, který se běžně vyskytuje v přirozené mikroflóře zdravých jedinců a nezpůsobuje žádná závažnější onemocnění. Nicméně po rozšíření imunosupresivní léčby a používání širokospektrálních antimykotik začaly infekční onemocnění způsobené *C. glabrata* značně narůstat. V současnosti je (po *C. albicans*) druhým nejčastějším původcem kandidózy jak systémové, tak slizniční (Haley, 1961; Hitchcock, 1993; Geiger, 1995).

Morfologie

C. glabrata tvoří na agaru hladké, krémově zbarvené kolonie, které jsou k nerozeznání od jiných druhů kandid (Whelan, 1984).

1.5.3 *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis je jeden z hlavních lidských patogenů a jeho prevalence v posledních letech vzrostla tak, že *C. parapsilosis* je nyní jednou z hlavních příčin invazivních kandidálních onemocnění. Mezi jedince s rizikem závažné infekce patří novorozenci a pacienti na jednotkách intenzivní péče (Trofa, 2008).

Obrázek 15 *Candida parapsilosis* - kultura

Obrázek 16 *Candida parapsilosis* – mikroskopický vzhled



Zdroj: <https://microbenotes.com/candida-parapsilosis/>

2 VYŠETŘENÍ A IDENTIFIKACE

2.1 Mykologické vyšetření klinického materiálu

K prokázání přítomnosti mikromycet v klinickém materiálu je stěžejní kultivace. Ke kultivaci dochází především na pevných půdách, kam patří Sabouraudův glukózový agar (SAB) nebo chromogenní selektivní půda (Janouškovcová, 2019).

Pro včasné zahájení léčby je nutné získat výsledky co nejdříve, proto se nejčastěji používá chromogenní selektivní půda, díky níž můžeme u kvasinkové infekce snadno rozlišit jednotlivé druhy patogenu (Janouškovcová, 2019).

2.1.1 Přístroje a pomůcky

Laboratorní informační systém, laminární box, chladnička, biologický termostat, plynový kahan, očkovací kličky, sterilní pinzeta, sterilní skalpel (Janouškovcová, 2019).

2.1.2 Reagencie

Kultivační půdy SAB, SAB + chloramfenikol + gentamicin a chromogenní selektivní medium

Reagencie k barvení dle Grama (Janouškovcová, 2019).

2.1.3 Postup

Odebraný materiál se zašle do mikrobiologické laboratoře s požadavkem na mykologické vyšetření. Pověřený laboratorní pracovník ho zaeviduje do Laboratorního informačního systému. Pokud přijde i požadavek na bakteriologické vyšetření, tak se vzorek odešle do bakteriologické laboratoře, kde proběhne jak mykologické tak bakteriologické vyšetření (Janouškovcová, 2019).

Princip kultivace spočívá v naočkování materiálu na mykologické kultivační půdy. Materiál může být jak tekutý (například moč, likvor, sputum, hnis), tak může jít o různé stěry či tkáně. Materiál se aplikuje na kultivační půdu (Sabouraudův glukózový roztok nebo chromogenní selektivní půdy) a umístí se do termostatu při teplotě 35±2 °C. Zde se nechá 48 hodin, když se jedná o výtěry krku, nosu, larynxu, jazyka; anebo 72 hodin v případě hnisu, punktátu, žluči (Janouškovcová, 2019).

V případě pozitivní kultivace můžeme poté stanovit, o jaký patogen se přesně jedná, jeho kvantitu a jeho citlivost na určitá antimykotika (Janouškovcová, 2019).

Výsledky kultivace hodnotí lékař nebo vysokoškolsky vzdělaný odborný pracovník a zaznamenávají se do Laboratorního informačního systému (Janouškovcová, 2019).

2.2 Identifikace kvasinek a vláknitých mikromycet

Kvasinkovité i vláknité mikroorganismy jsou nedílnou součástí našeho životního prostředí a podílejí se na řadě závažných onemocnění. Proto po kultivaci nastává proces, kdy se musí tyto organismy identifikovat a tím diagnostikujeme onemocnění (Janouškovcová, 2016).

Identifikace kvasinek probíhá pomocí komerčně vyráběných identifikačních setů na základě jejich vlastností jako je asimilace a fermentace. Dále probíhá identifikace pomocí MALDI-TOF, která slouží k identifikaci kvasinek i mikromycet (na základě hmotnostní spektrometrie) a v neposlední řadě pomocí mikroskopie a identifikačních klíčů (na SAB nebo na Czapek Dox agaru) (Janouškovcová, 2016).

2.2.1 Přístroje a pomůcky

Laminární box, laboratorní informační systém, chladnička, termostat, očkovací klička, sterilní pinzeta, korkovrt (Janouškovcová, 2016).

2.2.2 Reagencie

SAB, rýžový nebo bramborový agar, komerčně vyráběné sety: Candidaset 21, API 20 AUX (Janouškovcová, 2016).

2.2.3 Identifikace kvasinek

Identifikace kvasinek je založena na jejich biochemických vlastnostech, jako je schopnost asimilace zdrojů uhlíku a dusíku, fermentace sacharidů a také tvorba charakteristické mikromorfologie (Janouškovcová, 2016)..

Například diagnostika *Candida albicans* se dá spolehlivě určit pomocí selektivní chromogenní půdy, kde tvoří fialové kolonie (Janouškovcová, 2016).

Dále jí můžeme identifikovat pomocí GT testu (germ tubes), kde se *C. albicans* kultivuje 2 hodiny v termostatu při 33-37°C a zde začne vytvářet klíčící hyfy, které jsou jedním z faktorů patogenity (Janouškovcová, 2016).

Provádí se také kultivace na rýžovém agaru, kdy *C. albicans* začne vytvářet pseudomycelium s chlamydosporami (což je další známka patogenity). Kultivace probíhá při pokojové teplotě 48 hodin (Janouškovcová, 2016).

Pokud chceme identifikovat kvasinky z non-albicans kmenů, použijeme komerčně vyráběné sety Candidatest 21 (Erba Lechma) nebo API 20 AUX (bioMérieux). Tyto sety jsou vybaveny návodem a identifikačním klíčem, podle kterého můžeme určit, o který patogen se jedná. Toto vyšetření se někdy doplňuje kultivací na rýžovém či bramborovém agaru a následným mikroskopickým vyšetřením, které odhalí tvorbu typického pseudomycelia (Janoušková, 2016).

Nejčastěji se ovšem využívá identifikace pomocí MALDI-TOF, což je automatický systém založený na hmotnostní spektrometrii, který přesně určí, o jaký kmen kvasinky se jedná. Pokud jsou výsledky z MALDI-TOF nepřesvědčivé (kmen není v databázi, vyjdou příliš nízké hodnoty), využije se jeden z komerčních setů (Janoušková, 2016).

2.2.4 Identifikace vláknitých mikromycet

Vláknité mikromycety jsou schopné vyrůst jak na SAB tak na selektivním chromogenním médiu. Petriho misky s narostlými koloniemi vláknitých mikromycet se předávají do mykologické laboratoře, kde proběhne mikroskopie kultury (Janoušková, 2016).

Je-li kmen dostatečně narostlý, uděláme laktofenolový preparát. Na podložní sklíčko kápneme laktofenol a do něho pomocí kličky umístíme kousek kultury a překryjeme krycím sklíčkem. Poté je možno mikroskopovat (Janoušková, 2016).

Z mikroskopického preparátu je možno zjistit, jestli se jedná o rod *Zygomycetes*, *Aspergillus* nebo jiné (Janoušková, 2016).

Pokud nejde stanovit rod (druh) mikromycety, vytvoříme mikrokulturu. Do Petriho misky umístíme 3 bločky SAB vytvořené korkovrtem, do nich se laboratorní kličkou naočkuje kmen a bločky se překryjí krycími sklíčky. Petriho miska s izolovaným kmenem se vloží do plastového sáčku a inkubuje se při 33-37°C. Identifikuje se pomocí identifikačních klíčů. Identifikace probíhá v laminárním boxu, protože je zde vysoká pravděpodobnost kontaminace (Janoušková, 2016).

K identifikaci se rovněž používá MALDI-TOF. Hmotnostní spektrometrie MALDI je metoda, která stanovuje hmotnosti molekul a atomů tím, že je převede na ionty v prostředí vakua. Každý mikroorganismus při analýze hmotnostním spektrometrem uvolní ze své buněčné stěny určité spektrum vysokomolekulárních látek (proteiny, glykoproteiny, polysacharidy). Toto spektrum je následně porovnáno se spektry v databázi a podle toho se určí, o jaký druh mikroorganismu se jedná (Janoušková, 2016).

3 DALŠÍ ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ HOUBAMI

Některé druhy hub způsobující alergická onemocnění např. alergická rýma, faryngitida, laryngitida a asthma (Zukiewicz-Sobczak, 2013).

Tyto nemoci mohou být způsobeny nebo zhoršeny pomocí bioaerosolu. Hlavní složkou bioaerosolu jsou houby nebo jejich metabolity, které jsou v životním prostředí běžné. Vyskytují se také ve vnitřních prostorech (Zukiewicz-Sobczak, 2013).

Odhaduje se, že alergií na houby trpí ve vyspělých zemích přibližně 2-6 % populace. Většinou je citlivost detekována na rody *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Alergie na houby se objevuje jako okamžitá hypersensitivita způsobená IgM protilátkami. V případě atopické senzibilizace se může projevit jako astma, rýma, zánět spojivek, kopřivka nebo dermatitida. Astma je alergická reakce časného typu, ve které jsou zapojeny IgE protilátky. Charakteristické symptomy pro astma zahrnuje broncho-konstrikce a astmatický záchvat, který se objevuje u pacienta v klidu. Pacientů s astmatem přibývá, a proto se čím dál více studií zaměřuje na příčiny jeho vzniku (genetický i environmentální) (Van Dyken, 2011).

Přítomnost bioaerosolu může u alergiků způsobovat například bronchospasmus (zúžení průdušek) a afonii (ztrátu hlasu). Tyto příznaky byly pozorovány po inhalování spor hub rodu *Penicillium*. U lidí s imunodeficiencí (pacienti s rakovinou nebo AIDS) se mohou objevit po inhalaci aerosolů těžké plicní choroby. U lidí se zdravou imunitou se objevují příznaky jako bolest hlavy a nevolnost (Zukiewicz-Sobczak, 2012).

4 LÉČBA

4.1 Léčba dermatofytóz

Při diagnostice dermatofytóz by měly být klinické příznaky v ideálním případě potvrzeny pomocí kultivace, která potvrdí nebo vyvrátí přítomnost houby (Gupta, 2006).

Infekce se dají léčit buď lokálně, nebo systémově. Zvolená léčba závisí na typu infekce, závažnosti infekce a na preferenci pacienta. Například u tinea capitis a u některých případů onychomykóz se vyžaduje systémová antimykotická léčba, protože jde o středně těžká až těžká onemocnění a lokální léčba by neměla adekvátní odpověď (Gupta, 2006).

Základní léčba většiny povrchových infekcí tinea je pomocí antimykotik. Nejčastěji se používají sloučeniny jako amfotericin B a ketokonazol (Shizmu, 2007).

4.1.1 Amfotericin B

Jedná se o fungistatický a příležitostně fungicidní přípravek, v závislosti na koncentraci v séru a zranitelnosti patogenů. Podává se obvykle intravenózně (Friedrich, 1996).

Polyenový antimykotický amfotericin B se již několik desetiletí používá jako standardní léčba systémových mykóz. Nicméně míra odezvy na některé oportunní infekce není dostatečná. Použití amfotericinu B bylo navíc omezeno kvůli jeho nepříznivým vedlejším účinkům jako nefrotoxicita (Barriere, 1990).

4.1.2 Ketokonazol

Ketokonazol je perorálně absorbovatelný antimykotický lék. Je účinný proti tinea infekcím. Vedlejší účinky podávání ketokonazolu mohou být hepatotoxicita a různé lékové interakce (Como, 1994).

4.1.3 Flucytosin

Je systémové antimykotické léčivo, které se snadno vstřebává z gastrointestinálního traktu. Nejlepší účinek má na kandidózy a chromomykózy. U tohoto přípravku vzniká během léčby rezistence, a proto se podává spolu s amfotericinem B (Bennet, 1977).

4.2 Léčba kandidóz

Stanovení diagnózy by mělo být založeno na zhodnocení anamnézy, klinickém nálezu, nativní mikroskopii a kultivačním výsledku (Pánková, 2013).

Lokální léčba povrchových kandidóz zahrnuje imidazoly, triazoly, allylaminy a nystatin. Granulomatózní a invazivní formy kandidóz léčíme lokálně i celkově triazoly, allylaminy (Terbinafin), echinocandiny (Caspofungin) a amfotericinem B. Součástí léčby je eliminace přidružených faktorů, které podporují rozvoj infekce. Pro případy rezistence by měla být zajištěna možnost stanovení citlivosti kvasinek na antimykotika (Pánková, 2013).

Léčba kandidóz v současnosti někdy selhává, i když jsou vyráběna účinná nová antimykotika. Příčinou je narůstající rezistence kvasinek. Příčinné souvislosti bývají v nesprávném dávkování antimykotik, nedodržení důsledných léčebných postupů a absenci edukace pacientů. Citlivost kvasinek na antimykotika by měla být stanovena před léčbou kandidózy (Pánková, 2013).

4.2.1 Fluconazol

U pacientů s orofaryngeální nebo jícnovou kandidózou způsobuje flukonazol rychlou úlevu a likviduje kvasinky u 50-90 % pacientů. Působí i u žen s akutní vaginální kandidózou. Klinické zkušenosti s tímto lékem nejsou moc velké, a proto není známa optimální dávka (Grant, 1990).

4.3 Alternativní léčba

Infekce způsobené houbami jsou rozšířené po celém světě a představují značný problém. Proti nim se většinou používají syntetické antifungální léky, nicméně z důvodů značných vedlejších účinků je používání syntetických léků omezené. Proto v posledních letech stoupl zájem o užívání rostlinných léčivých přípravků, které jsou bezpečnější, levnější a ekologičtější. Látky pocházející z rostlin jsou vhodnou volbou pro hledání nových antifungálních sloučenin. Mezi těmito látkami jsou například esenciální oleje, taniny a bio-control agents (Pandey, 2003).

4.3.1 Taniny

Taniny jsou ve vodě rozpustné polyfenolové sloučeniny, které jsou syntetizovány v mnoha rostlinách jako sekundární metabolity. Vyskytují se u mnoha druhů rostlin a mohou být přítomny v kůře, listí, dřevě a kořenech (Haslam, 1996).

Taniny jsou známé pro své antimikrobiální a antimykotické účinky. Působí jako růstové inhibitory proti mnoha mikroorganismům jako jsou bakterie, kvasinky a plísně (Aguilera-Carbo, 2008).

Pozorování v transmisním elektronovém mikroskopu ukázalo, že po aplikaci taninů došlo k modifikacím hyf, jako je zvlnění, kroucení, kolaps a také k dramatickým změnám cytoplasmy a organel. Tyto změny mohou být důsledkem narušení propustnosti buněčné stěny, což má za následek nerovnováhu vnitřního osmotického tlaku a zánik buňky (Plodpai, 2013).

4.3.2 Esenciální oleje

Jako zástupce esenciálních olejů lze použít například olej získaný z *M. arvensis* a *C. flexuosus* (máta rolní a citronová tráva). Oleje byly testovány na některé houby, jako jsou *T. mentagrophytes* a *F. oxysporum* a na některé kvasinky (*Candida albicans*). Bylo prokázáno, že již v malém množství byly tyto oleje účinnější než porovnávaný lék (keto-konazol) (Pandey, 2003).

Esenciálních olejů s antimykotickým účinkem je mnoho. Mezi další patří například tea tree olej, olej z voňatky matrinovi, blahovičnicku kulatoplodého a skořicovníku cejlonského (Oliva, 2003; Bansod, 2008).

4.3.3 Biocontrol agents (BCAs)

BCAs využívají různých mechanismů k inhibici nebo k překonání růstu patogeních mikroorganismů jako je antibióza (vylučování sloučenin jako antibiotika, toxiny); přímý parazitismus (přímé napadení parazitického organismu) a také soutěží o živiny a prostor (Sharma, 2009; Sui, 2015).

Mezi potenciální biokontrolní mikroorganismy u lidí patří například *Exophiala dermatitidis*, *Aureobasidium melanogenu* nebo *Pythium oligandrum* (Zajc, 2019).

5 PYTHIUM OLIGANDRUM

5.1 Taxonomie

Říše: *Straminipila (Chromista)*

Kmen: *Heterokonta*

Podkmen: *Peronosporomycotina*

Třída: *Peronosporomycetes (Oomycetes)*

Podtřída: *Peronosporomycetidae*

Řád: *Pythiales*

Čeleď: *Pythiaceae*

Rod: *Pythium*

Druh: *Pythium oligandrum*

(Dick, 2000)

5.2 Historie

Jako první popsal *Pythium oligandrum* americký mykolog Charles Drechsler (1892-1986) ve třicátých letech minulého století. Izoloval ho z kořene hrachu setého (*Pisum sativum*) společně s dalšími fytopatogeny rodu *Pythium*. Nejdříve ho považoval rovněž za fytopatogen, a až v roce 1943 zjistil, že je ve skutečnosti vyhraněný predátor, který napadá jiné plísně, takže se vlastně jedná o mykoparazita (Drechsler, 1930; Drechsler, 1946).

V roce 1965 izoloval houbu český vědec doc. Dáša Veselý, DrSc. a zjistil, že *P. oligandrum* je mykoparazit, který parazituje na buňkách některých dalších hub. Po tomto zjištění si doc. Veselý uvědomil, že by se tato houba dala využít k biologické obraně rostlin. Po několika letech výzkumu se mu podařilo získat spory *P. oligandrum*, urychlit množení v laboratorních podmínkách a zavést postupy, díky nimž je možné získat velký objem spor v relativně krátkém čase. A to umožnilo vznik přípravku Polyversum, který se využívá jako biologický fungicid na ochranu rostlin. Polyversum je univerzální přípravek, který je možno použít na široké spektrum plodin jako je řepka olejná, pšenice, ječmen a jiné. Prodává se ve formě ve vodě rozpustného prášku, ze kterého se dá připravit postřik nebo

zálivka. Přípravek vyrábí společnost Biopreparáty, spol. s r. o., která vznikla v roce 1997 (BIOPREPARÁTY: POLYVERSUM, 2006).

V roce 1992 byla poprvé tato houba použita na léčbu kožních mykóz u člověka. Podle toxikologických studií z dalších let bylo prokázáno, že *Pythium oligandrum* nemá žádné negativní vedlejší účinky na lidský organismus. Také se jím nelze předávkovat, nevzniká na něj rezistence, je vhodné pro všechny věkové kategorie a i pro lidi se sníženou imunitou (Mencl, 2001; BARD, 2006).

V roce 2006 byla založena firma BARD s. r. o. - Bio Agens Research and Development za účelem výzkumu, vývoje a výrobě mikrobiálních přípravků s fungicidním účinkem. Firma tak navázala na výzkumný program firmy Biopreparáty s. r. o. Firma BARD s. r. o. patří k předním výrobcům přípravků, které jsou založené na léčbě pomocí mikroorganismů. Přípravky mají využití jak v oblasti humánní, tak i veterinární medicíny. Potlačují obtíže, které jsou způsobeny bakteriální, kvasinkovou a plísňovou infekcí (BARD, 2006).

5.3 Charakteristika

Většina výzkumů s *Pythium oligandrum* se provádí na rostlinách, proto uvádím charakteristiku související s rostlinami. Z dostupné literatury vyplývá, že se výzkumem houbového organismu *P. oligandrum* zabývají vědci zejména s ohledem ve vztahu k půdě a k rostlinám, a že poznatků o účincích na lidský organismus a jejich patogeny je zatím nedostatek. Právě proto je následující charakteristika tohoto organismu zaměřena spíše ke vztahu k rostlinám a jejich patogenům (Pisarčík, 2020; Gabrielová, 2018).

Pythium oligandrum je houbový, eukaryotní, mikroskopický organismus. Jedná se o nepatogenní půdní organismus, který dokáže fungovat v mykorizním stavu s rostlinami a zároveň parazitovat ostatní houby ze stejného i jiných rodů. V 1 g půdy můžeme nalézt 4 – 20 životaschopných zárodků. Dnes je ve světě zkoumáno několik kmenů tohoto organismu (Klaban, 2011; Drechsler, 1946; Mencl, 2001; Vallance, 2009).

Mykoparazitárních schopností se využívá jak v biologické ochraně rostlin, v průmyslu, tak v posledních letech i v lékařství k léčbě mykóz. Na českém trhu *P. oligandrum* nejčastěji nalezneme pod názvem „chytrá houba“ (Krýzlová, 2014).

Krátce po kontaktu *P. oligandrum* s myceliem parazitované houby dochází ke ztrátě a kolapsu turgoru. Snímky z elektronového mikroskopu naznačují, že dochází k totální dezintegraci buněčné cytoplasmy a ztrátě cytoplasmatické membrány. Během této doby zůstává buněčná stěna z chitinu zcela zachovalá a hyfy pronikají do patogenního organismu. V této době už mycelium patogenu dále neroste, avšak bílé mycelium *Pythium oligandrum* ano (Benhamou, 1977; Brožová, 2002)

Rozlišují se 3 typy reakcí *P. oligandrum* na rostlinné patogeny:

1. **Rychlá lýza:** je charakteristická tím, že hyfa patogenu přestává ihned růst a *P. oligandrum* penetruje buněčnou stěnu. Nakonec dochází k lýze buňky patogenu. Tento příklad se týká většiny druhů houbových patogenů až na *Pythium* sp. a *Rhizoctonia solani* (Lewis, 1989).

2. **Rychlá granulace:** je typická dezintegrací a granulací obsahu buňky patogenu, výjimečně lýzou buňky. To následně vede k zastavení růstu a zprůhlednění hyf. Jediným dosud známým patogenem s touto interakcí je *R. solani* (Lewis, 1989).

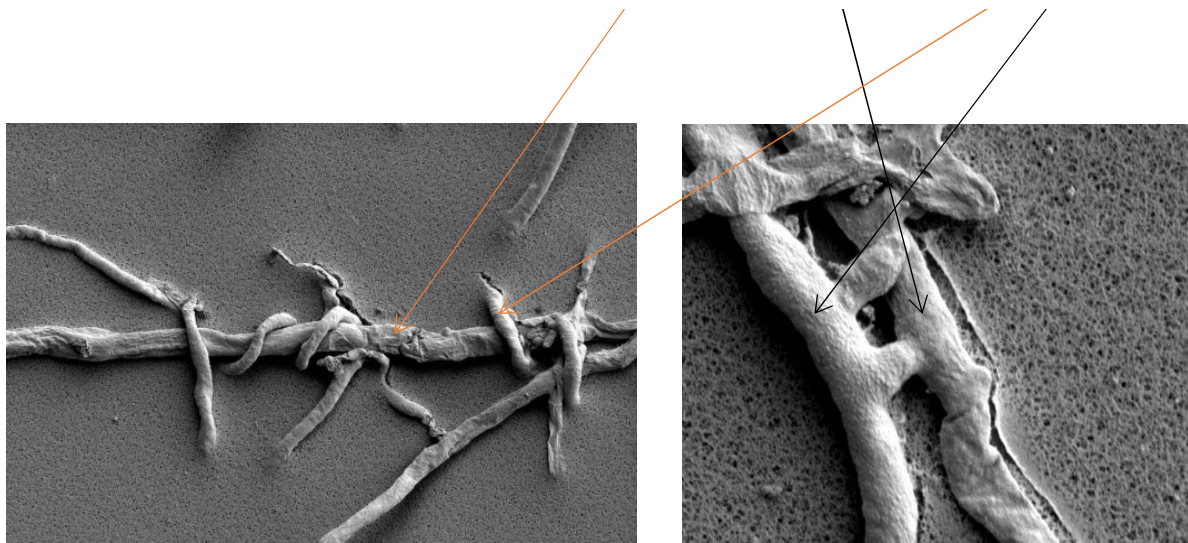
3. **Pomalá granulace, bez lýzy:** Tato interakce je typická pro všechny druhy *Pythium* sp. Je založena pouze na granulování a zesvětlení obsahu buněk patogenu v časovém horizontu 1–8 minut po kontaktu s hyfou *P. oligandrum* (Lewis, 1989).

Rovněž bylo zjištěno, že *Pythium oligandrum* pomáhá rostlině vytvořit indukovanou rezistenci proti patogenům. Indukovaná rezistence spočívá ve vytváření určitých proteinů v membráně buněčných stěn (cell-wall protein-CWP) organismem *Pythium oligandrum*, které nemají přímý fungicidní účinek proti patogenům. Pomáhají ale rostlinám dále vyrábět různé látky, jako například fenolické sloučeniny, chitinázu (rozkládá buněčnou stěnu hub z chitinu), anebo fenylalanin amonium lyázu, které již přímý fungicidní účinek mají. Tyto látky se nazývají elicitory. Uvádějí se dvě látky, které byly extrahovány z buněčné stěny *P. oligandrum* a které dokáží fungovat jako elicitory. První sloučeninou je oligandrin, jehož přítomnost v rostlinách napadených patogeny je v úzké korelaci s přítomností velké řady antifungálních látek. Druhou sloučeninou je chitosan, pro jehož přítomnost je charakteristické utváření strukturálních bariér v místě, kde se patogeny pokoušejí penetrovat (Benhamou, 1977; Takenaka, 2003).

Ohledně přežívání *P. oligandrum* v pletivech rostlin stále panují dohady. Oproti jiným BCAs dokáže pronikat hlouběji do rostlinného pletiva, což by mohlo vést k vyšší účinnosti oproti např. *Trichoderma sp.* Dále se uvádí, že *P. oligandrum* nenarušuje kořenovou mikroflóru rostlin. Samostatný organismus *P. oligandrum* produkuje látky oligandrin (glykoproteinový elicitor) a tryptamin (látku ze skupiny auxinů), což jsou molekuly, zajišťující vyšší vzrůst rostlin. Zároveň se podařilo prokázat, že kolonizace kořenů (v tomto případě rajčat) organismem *Pythium oligandrum* probíhá bez zjevného porušení buněk. Hyfy *P. oligandrum* na svých koncích v rostlinném pletivu vytvářejí prázdné buňky. V těchto buňkách vznikají nové oospory, které pak v prostředí přetrvávají a při správných podmínkách opět klíčí a kolonizují stanoviště. Jednotlivé kmeny *P. oligandrum* mají různou schopnost vytvářet oospory (Gerbore, 2014; Le Floch, 2007; Vallance, 2009).

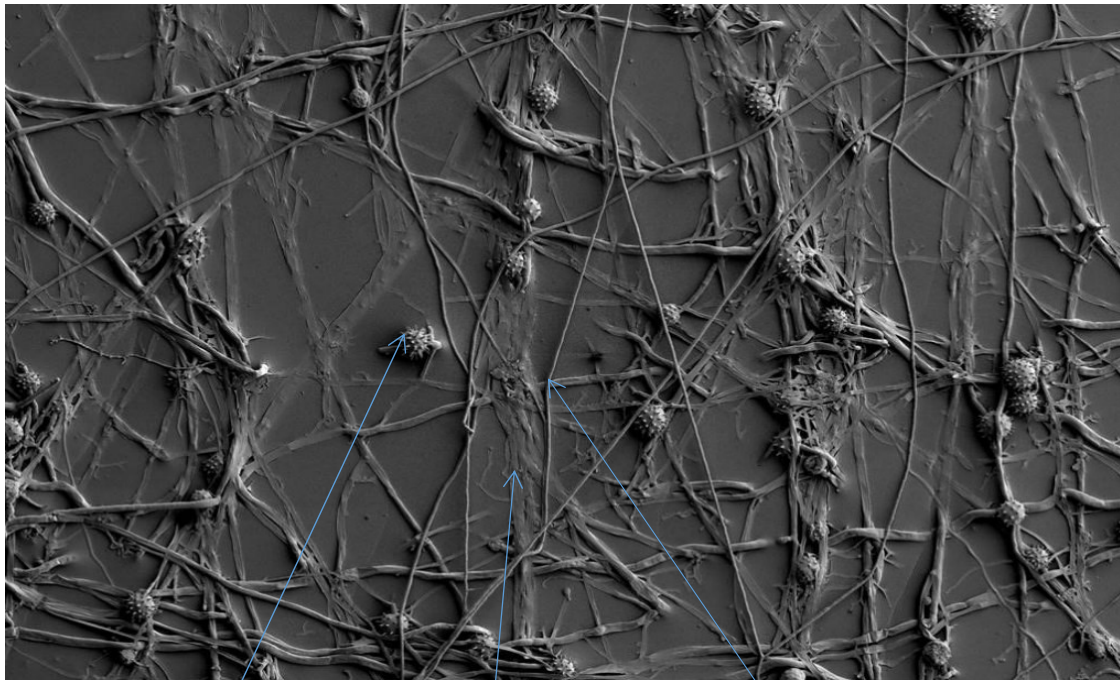
Obrázek 17 Mykoparasitismus patogenních hub (*Fusarium graminearum*) pomocí *P. oligandrum*

Obrázek 18 Mykoparasitismus patogenních hub (*Fusarium graminearum*) pomocí *P. oligandrum* zblízka



Zdroj: <https://biopreparaty.eu/>

Obrázek 19 Mykoparasitismus patogenních hub pomocí *P. oligandrum* + spory



Oospora

Fusarium graminearum

Pythium oligandrum

Zdroj: <https://biopreparaty.eu/>

Pythium oligandrum je známo pro svou schopnost mykoparasitismu proti více než 50 houbám. Jeho schopnost potlačovat a zabít původce dermatofytóz a kandidóz je však potřeba ještě prostudovat. Některé výzkumy (např. výzkum Aleny Gabrielové – *Pythium oligandrum* může potlačit a zabít původce dermatofytóz) uvádí biocidní účinek *P. oligandrum* například na *Microsporum canis*. Výzkum ukázal, že dermatofyty jsou účinně potlačeny nebo usmrceny v laboratorních podmínkách mezi 48 a 72 hodinami od prvního kontaktu (Brožová, 2002; Gabrielová, 2018).

Výzkum dále prokázal, že z 69 pacientů zahrnutých do studie byly klinické příznaky zcela potlačeny u 83 % pacientů. Výzkum poskytuje důkaz, že *P. oligandrum* je schopné rozpoznat a zabít dermatofyty pomocí podobného mechanismu rozpoznávání jako u rostlin (Gabrielová, 2018).

PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

6.1 Hlavní cíl

Prokázat účinnost volně prodejných substrátů (Polyversum BioGarden a Biodeur od společnosti BARD), které obsahují spory *Pythium oligandrum* proti některým druhům mikromycet získaných z FN Plzeň, jako jsou *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Mucor species*.

6.2 Dílčí cíle

1. Zvládnout laboratorní diagnostiku a taxonomii mikromycet
2. Vykultivovat *Pythium oligandrum* z volně dostupných preparátů
3. Určit při jakých teplotách roste *P. oligandrum* lépe
4. Porovnat účinnost přípravku Polyversum BioGarden (Biopreparáty spol. s r.o.) a Biodeur (BARD) na některé mikromycety

7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

- Lze vypěstovat komerční preparát na rutinně používaných kultivačních půdách?
- Roste *Pythium oligandrum* lépe při teplotě 27°C nebo 37°C?
- Bude preparát účinný i na mikromycety (patogenní i nepatogenní) diagnostikované v laboratoři FN v Plzni?
- Bude vyšší účinnost na kvasinky nebo na plísně?
- Závisí účinnost na teplotě?

8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

Byly testovány dva různé volně prodejné preparáty. Jeden z nich je Polyversum BioGarden od společnosti Biopreparáty, spol. s r.o. Jedná se o prášek, který má obsahovat lyofilizované spory „chytré houby“ *Pythium oligandrum*, které se aktivují rozmícháním ve vodě. Tento přípravek slouží na ochranu rostlin proti plísním. Druhý přípravek je Biodeur od společnosti BARD, který kromě mikroorganismu *P. oligandrum* obsahuje také kyselinu citronovou, hydrogenuhličitan sodný, sorbitol, oxid křemičitý, extrakt z prosa setého, PEG 150 a uhličitan sodný. Tento přípravek se používá v humánní medicíně proti plísním na nohou a nehtech.

Byly testovány účinky těchto dvou preparátů na různé druhy kvasinek a plísní získaných od pacientů z různých oddělení a klinik FN Plzeň. Konkrétně se jednalo o mikroorganismy *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Mucor species*.

9 METODIKA PRÁCE

9.1 Příprava pokusu

Dle návodu byl připraven roztok spor houby *Pythium oligandrum* a destilované vody. Na přípravu roztoků byly použity dva různé, volně prodejné přípravky, které podle příbalových letáků mají obsahovat spory chytré houby. První z nich byl BioGarden Polyversum a druhý Biodeur prevent od společnosti BARD. Pokaždé se přípravek smíchal s potřebným množstvím destilované vody dle návodů a výsledný roztok se nechal zaktivovat v pokojové teplotě 30 minut. K aktivaci by mělo docházet po 20 minutách a zároveň roztok nesmí být starší než 10 hodin.

Část roztoků se nanosla na Petriho misky se sabouraudovým agarem. Misky se umístily do termostatu, jednou při 27°C a jednou při 37°C, od každého přípravku jedna. Tato část pokusu slouží k tomu, aby se zjistilo, který přípravek a při jaké teplotě poroste rychleji.

Druhou částí roztoků se nechaly napustit sterilní disky z filtračního papíru o průměru 7mm.

Z kvasinek *Candida albicans* a *Candida glabrata* a plísní *Aspergillus fumigatus* a *Mucor species* byla pomocí fyziologického roztoku vytvořena suspenze o zákalu 0,5 McFarlanda. Tato suspenze byla inokulována pomocí očkovací kličky na Petriho misky se sabouraudovým agarem. Poté se na tyto misky položily sterilní disky nasáknuté houbou *Pythium oligandrum*.

Všechny plotny byly poté inkubovány v termostatu několik dní. Jedna sada při teplotě 27°C a druhá sada při teplotě 37°C. Byl sledován průběžný růst inokulovaných kvasinek, plísní a hlavně růst zkoumané houby *P. oligandrum*, která by měla vyrůst z napuštěných disků a ovlivnit růst patogenních kvasinek a plísní.

10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

10.1 Růst mikromycet při 27 °C

10.1.1 *C. albicans*

Obrázek 20 *C. albicans* vykultivovaná při 27 °C + disky s *P. oligandrum*



Zdroj: vlastní

Na obrázku je patrné, že *C. albicans* po sedmi dnech porostla celou plotnu, kdežto z napuštěných disků *P. oligandrum* růst nezačalo.

10.1.2 *C. glabrata*

Obrázek 21 *C. glabrata* vykultivovaná při 27 °C + suspenze *P. oligandrum*



Zdroj: vlastní

První pokus s *C. glabrata* dopadl stejně jako s *C. albicans* a *P. oligandrum* vůbec nenarostlo. Tak se přešlo k tomu, že na vypěstovanou kvasinku byl roztok s *P. oligandrem* nanesen přímo. Nicméně nedošlo k žádnému růstu chytré houby a tudíž ani k potlačení růstu kvasinek.

10.1.3 *Mucor species*

Obrázek 22 *Mucor species* vykultivovaný při 27 °C + disky s *P. oligandrum*



Zdroj: vlastní

Na této plotně opět vyrostla pouze houba *Mucor species* a z napuštěných disků *P. oligandrum* růst nezačalo.

10.1.4 *Aspergillus fumigatus*

Nelze vyfotit. Nicméně k nárůstu *P. oligandrum* nedošlo.

10.1.5 *Pythium oligandrum*

Obrázek 23 *Pythium oligandrum* na SAB



Zdroj: vlastní

Na petriho misku se nakapala suspenze spor a destilované vody z obou přípravků. K nárůstu samostatného *P. oligandrum* při 27°C nedošlo ani u jednoho z přípravků.

10.2 Růst mikromycet při 37 °C

10.2.1 *C. albicans*

Obrázek 24 *C. albicans* vykultivovaná při 37 °C + disky s *P. oligandrum*



Zdroj: vlastní

Při 37°C opět došlo pouze k nárůstu *C. albicans*, ale z napuštěných disků *P. oligandrum* nenarostlo.

10.2.2 *C. glabrata*

Obrázek 25 *C. glabrata* vykultivovaná při 37 °C + suspenze s *P. oligandrum*



Zdroj: vlastní

C. glabrata při 37°C narostla, ale *P. oligandrum* nenarostlo ani z napuštěných disků, ani při druhém testu, když se na kvasinku nanasla suspenze spor.

10.2.3 *Mucor species*

Obrázek 26 *Mucor species* vykultivovaná při 37 °C + disky s *P. oligandrum*



Zdroj: vlastní

Při 37°C narostla pouze houba *Mucor species*, ale *P. oligandrum* z disků opět ne.

10.2.4 *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus nešlo vyfotit. Patogenní houba vyrostla, ale *P. oligandrum* opět ne.

10.2.5 *Pythium oligandrum*

Obrázek 27 *P. oligandrum* na SAB



Zdroj: vlastní

Na petriho misku se nakapala suspenze spor a destilované vody z obou přípravků. Ani z jednoho přípravku houba nevyrostla.

10.3 Příčiny nepovedeného experimentu

V žádném vzorku požadovaná chytrá houba nenarostla. Vzhledem k tomu, že by *P. oligandrum* mělo být nenáročné a mělo by být možné ho vypěstovat do několika dní na jakékoliv půdě, byly podrobněji prověřeny testované preparáty. Na příbalových letáčích u obou preparátů je uvedeno, že přípravky obsahují jako hlavní účinnou složku spory *P. oligandrum*, které se aktivují ve vodě a začnou růst. Spory *P. oligandrum* jsou snadno roze-

znatelné, díky jejich kulovitému tvaru s ostny kolem dokola (viz. obrázek 28). Proto se obsah zakoupených přípravků umístil pod mikroskop, aby se ověřila přítomnost spor *P. oligandrum* v přípravcích.

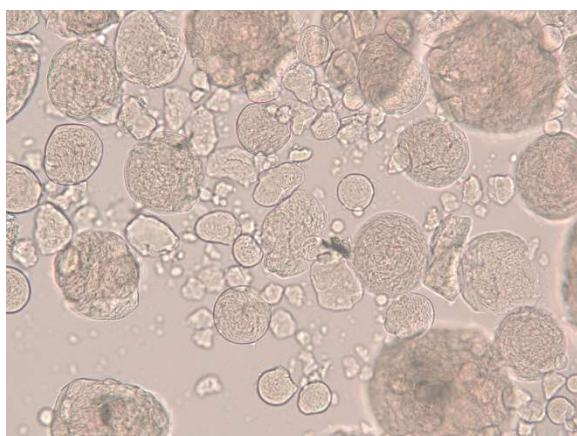
Obrázek 28 Spory *P. oligandrum*



Zdroj: https://cs.wikipedia.org/wiki/Pythium_oligandrum#/media/Soubor:Pythium_oligandrum.jpg

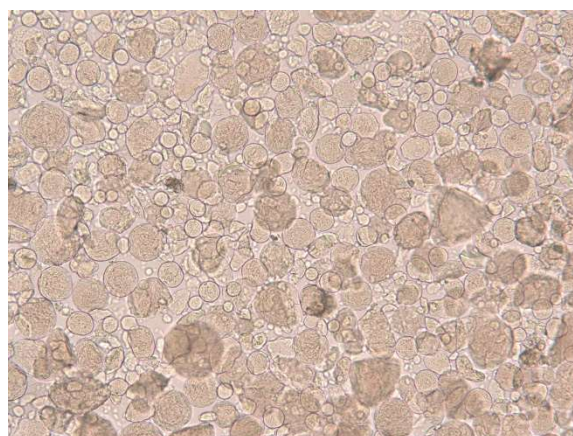
Mikroskopický preparát přípravku BioGarden Polyversum:

Obrázek 30 BioGarden přípravek zvětšení 200x



Zdroj: vlastní

Obrázek 29 BioGarden přípravek zvětšení 100x



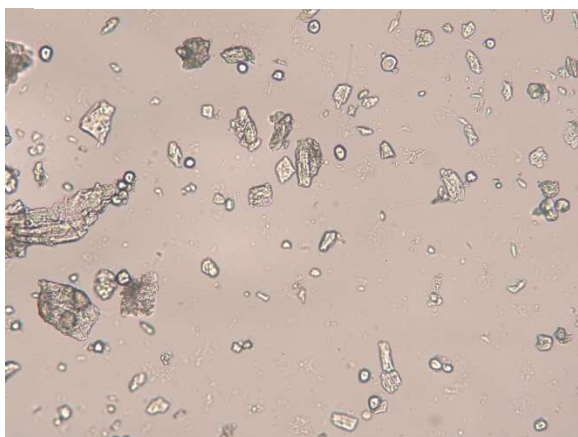
Zdroj: vlastní

Pravý obrázek (Obrázek 30) ukazuje přípravek BioGarden od společnosti Biopreparáty spol. s r.o. pod mikroskopem se zvětšením 100x, levý obrázek (Obrázek 29) totéž jen s větším zvětšením a to 200x. Když oba obrázky prozkoumáme blíže, můžeme si všim-

nout, že přípravek neobsahuje žádné částice, které mají kulovitý tvar s ostny, tudíž žádná známka spor *P. oligandrum*.

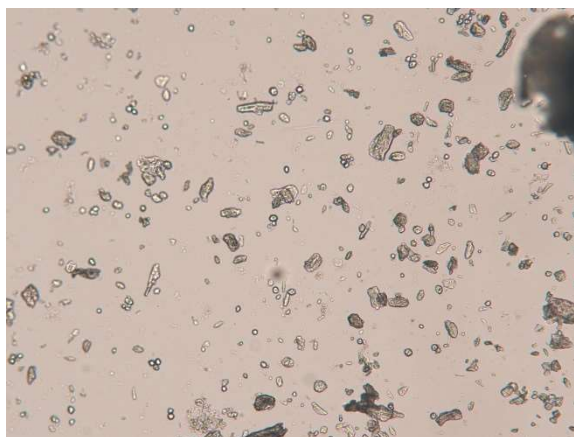
Mikroskopický preparát přípravku Biodeur BARD:

Obrázek 32 Biodeur přípravek zvětšení 200x



Zdroj: vlastní

Obrázek 31 Biodeur přípravek zvětšení 100x



Zdroj: vlastní

Obrázky ukazují přípravek Biodeur od společnosti BARD pod mikroskopem, obrázek vpravo (Obrázek 31) se zvětšením pod mikroskopem 100x, obrázek vlevo (Obrázek 32) se zvětšením 200x. Jsou zde patrné pouze neurčité fragmenty, ale žádné spory *P. oligandrum* nejsou přítomné.

DISKUZE

Svým výzkumem jsem původně chtěla navázat na výzkum Aleny Gabrielové et al. The oomycetese *Pythium oligandrum* can suppress and kill the causative agents of dermatophytes, která zkoumala účinky *P. oligandrum* na některé druhy dermatofyt a prokázala, že *P. oligandrum* je schopné rozpoznávat a zabíjet dermatofyty na základě speciálních rozpoznávacích mechanismů podobně jako u rostlin. Proto jsem se rozhodla částečně napodobit její výzkum jen s výjimkou toho, že bych nezkoumala účinky na dermatofyty, ale na kvasinky a rychle rostoucí plísně. Spory pro jejich výzkum získali Alena Gabrielová et al. od společnosti Biopreparáty spol. s r. o., a proto jsem i já jako jeden ze zkoumaných vzorků zakoupila stejný přípravek, aby výsledky byly snáze porovnatelné. Další ze zkoumaných přípravků byl od společnosti BARD, který je přímo určen pro použití na lidech.

Cílem mého výzkumu bylo prokázat účinnost volně prodejných přípravků na lidské patogeny, jako jsou *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Mucor species*. I dnes totiž představují tyto patogeny značný problém, kdy sice existuje řada fungicidních a antimykotických léků a mastí, ale tyto léky mají při dlouhodobém používání časté vedlejší účinky a nezdědky na ně vzniká rezistence. Proto by bylo vhodné najít přípravek, který by účinně pomohl v boji proti těmto patogenům bez vedlejších efektů a zároveň by fungoval jako preventivní opatření proti onemocněním, které jsou způsobovány těmito patogeny.

Chtěla jsem prokázat nejen účinky *P. oligandrum* na lidské patogeny, ale také zjistit, zda se tento mikroorganismus vyskytuje ve volně prodejných přípravcích dostupných široké veřejnosti v dostatečném množství. Proto jsem se rozhodla vykultivovat *P. oligandrum* na Sabouraudově agaru z komerčně prodávaných přípravků a chtěla jsem určit, v jaké teplotě roste nejlépe. Nicméně ani po několika týdnech v termostatu, i když kulturační čas u *P. oligandrum* je běžně v řádu dnů, nedošlo na petriho miskách k žádnému růstu mycelia ani při teplotě 27°C ani při teplotě 37°C.

V další fázi pokusu se na petriho miskách vypěstoval vždy jeden patogen, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus* a *Mucor species* a posléze se k němu vsadil disk z filtračního papíru napuštěný přípravkem, který měl obsahovat *P. oligandrum*. V každém termostatu byla jedna sada petriho misek. V ideálním případě mělo dojít k růstu mycelia *P. oligandrum* zároveň s nárůstem patogenní houby a mělo se sledovat, za jak dlouho začne *P. oligandrum* napadat patogenní plíseň, a kdy začne docházet k jejímu

úbytku a zmenšování až do doby jejího úplného vymizení. V tomto momentě by mělo dojít i k umírání *P. oligandrum*, protože by už nadále neměla žádné potřebné živiny, díky kterým by mohla zůstat naživu. Nicméně při mém pokusu došlo pouze k nárůstu patogenní houby a nikoliv k růstu obou mikromycet současně.

Proto se přistoupilo k opakování části pokusu, kdy se rozmíchaly nové roztoky přípravků a ty se nakapaly na již vyrostlé plotny s *C. glabrata*, aby se zjistilo, jestli nebudou lépe působit přímo ve formě roztoku, než ve formě napuštěných filtračních disků. Bohužel ani v tomto případě *P. oligandrum* růst nezačalo.

Následovala kontrola obou použitých přípravků pod mikroskopem, aby se zjistilo, jestli spory nejsou nějakým způsobem poškozené nebo jsou v přípravcích obsažené pouze v nedostatečném množství. Při této kontrole se ukázalo, že ani Polyversum od BioGarden ani přípravek Biodeur neobsahují žádné lyofilizované spory *P. oligandrum*, ale že se jedná jen o neurčitý bílý prášek.

Na základě výše uvedeného jsem nemohla provést další z mých dílčích cílů a zjistit, při jakých teplotách roste *P. oligandrum* lépe a porovnat účinnost přípravku Polyversum BioGarden (Biopreparáty spol. s r. o.) a Biodeur (BARD) na některé mikromycety.

Můj pokus o vypěstování houby *Pythium oligandrum* se nezdařil, protože šlo pravděpodobně o chybnou šarži výrobků. Četné výzkumy prokázaly, že přípravek od společnosti Biopreparáty má antimykotický účinek na pěstování rostlin. Mezi nejznámější patří například Pisarčík et al., který svým výzkumem z roku v roce 2020 spolehlivě prokázal účinky této houby na jetelu. V oblasti zdravotnictví stejný přípravek použil MUDr. Karel Mencl z Pardubické krajské nemocnice, kdy ve svém výzkumu zkoumal účinky *P. oligandrum* na bércové vředy. Pacienti s bércovými vředy trpí tímto onemocněním relativně dlouhou dobu a léčba bývá často komplikovaná a zdlouhavá. MUDr. Mencl dokázal, že *P. oligandrum* sice nevyléčí bércové vředy, ale pomocí něj se v ráně udržuje čisté prostředí a to značně zlepšuje léčbu.

Výzkum sice nevyšel podle plánu, ale myslím si, že do budoucna má tato houba veliký potenciál. Žijeme v době, kdy se více a více lidí snaží žít v souladu s přírodou a místo uměle vyráběných léků užívat alternativní přírodní preparáty. Tato metoda by mohla být pro tyto lidi přínosem, ať už by se jednalo o léčbu jejich zdravotních potíží, nebo o pěstování plodin bez nutnosti chemického postřiku. Mnoho výzkumů také dokazuje snižující se účinnost antifungálních a antimykotických léků (jeden z mnoha například Alexander,

1997), nehledě na široké spektrum jejich vedlejších účinků. Proto je důležité hledat alternativy založené na přírodní bázi. Příkladem pro tento postup je právě *Pythium oligandrum*, které by mělo být schopné zlikvidovat patogenní původce chorob bez nepříznivých nežádoucích efektů. Existuje řada výzkumů, které dokázaly vysokou účinnost této houby, ale většina z nich probíhala v interakci s rostlinami nebo rostlinnými patogeny. Proto je potřeba výzkumy v humánní a veterinární medicíně ještě rozšířit.

ZÁVĚR

V teoretické části se mi podařilo klasifikovat mikromycety a popsat nejčastější patogenní rychle rostoucí houby, kvasinky a dermatofyty. Také jsem zde uvedla jednotlivé léky užívané k léčbě onemocnění způsobené těmito patogeny. Popsala jsem mykologické vyšetření klinického materiálu a způsob, jakým se identifikují kvasinky a vláknité mikromycety. Dále jsem popsala samotné *Pythium oligandrum*, jeho klasifikaci, historii objevu a jeho charakteristiku.

Praktická část se mi nevydařila, kvůli chybějícím lyofilizovaným sporám ve volně zakoupených přípravcích, tudíž můj výzkum nedokázal prokázat, v jakých teplotách roste *P. oligandrum* nejlépe, ani po jakém čase je schopno vyhledat a zničit patogenní rychle rostoucí plísňe a kvasinky.

Myslím si ovšem, že koncepce mého výzkumu špatná nebyla, a že kdybych měla funkční přípravky, výsledky by potvrdily mé hypotézy a *P. oligandrum* by bylo schopné zabít patogenní mikromycety.

Můj výzkum se odehrával na Ústavu mikrobiologie ve FN Plzeň, který je momentálně zahlcený prací způsobenou epidemií virem SARS-CoV-2. Proto nebyl čas výzkum opakovat s novými funkčními přípravky obsahující spory *P. oligandrum*.

SEZNAM LITERATURY

AFZAL, Hina, et al. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of Larkana District (Sindh, Pakistan). *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 2013, 1.3: 105-117.

AGUILERA-CARBO, Antonio, et al. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*, 2008, 78.2: 189-199.

ALEXANDER, Barbara D.; PERFECT, John R. Antifungal resistance trends towards the year 2000. *Drugs*, 1997, 54.5: 657-678.

ARENAS, Roberto; Judith DOMÍNGUEZCHERIT; Luisa FERNANDEZ. Open randomized comparison of itraconazole versus terbinafine in onychomycosis. *International journal of dermatology*, 1995, 34.2: 138-143.

BANSOD, Sunita; Mahendra RAI. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger*. *World Journal of Medical Sciences*, 2008, 3.2: 81-88.

BARD: Pythium oligandrum [online]. Praha, 2006 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://pythium.eu/o-nas>

BARRIERE, Steven L., et al. Pharmacology and pharmacokinetics of traditional systemic antifungal agents. *Pharmacotherapy*, 1990, 10.6 part 3.

BENHAMOU, N; P. REY; M. CHÉRIF; J. HOCKENHULL; Y. TRILLY. Treatment with the mycoparasite *Pythium oligandrum* triggers induction of defense-related reactions in tomato roots when challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 1997, 87(1): 108-122.

BENNETT, John E. Flucytosine. *Annals of Internal Medicine*, 1977, 86.3: 319-322.

Biopreparáty: Polyversum [online]. Uherce [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://biopreparaty.eu/cz-polyversum>

BROŽOVÁ, J. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*, 2002, 38(1): 29-35.

COMO, Jackson A.; William E. DISMUKES. Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *New England Journal of Medicine*, 1994, 330.4: 263-272.

ČIHÁK, Libor. *Deratizace: Plísně* [online]. [cit. 2021-02-15]. Dostupné z: <https://www.deratizator.cz/galerie-skudcu/plisne-a-houby/plisne.html>

DAGENAIS, Taylor R. T.; Nancy KELLER. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 2009, 22.3: 447-465.

DE HOOG, G. S. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. *Mycoses*, 1996, 39.11-12: 407-417.

DICK, M. W. Classification of the *Peronosporomycetes*. In *Encyklopedia of Food mikrobiology* (Richard K. Robinson eds). San Diego: Academic Press, 2000, str. 871-883. ISBN: 0-12-227070-3.

DRECHSLER, Charles. Several species of *Pythium peculiar* in their sexual development. *Phytopathology*, 1946, 36: 781-864.

DRECHSLER, Charles. Some new species of *Pythium*. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 1930, 20.16: 398-418.

FRIEDRICH, Andrea B.; Garabed ANTRANIKIAN. Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermotogales. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62.8: 2875-2882.

GABRIELOVÁ, Alena, et al. The oomycete *Pythium oligandrum* can suppress and kill the causative agents of dermatophytoses. *Mycopathologia*, 2018, 183.5: 751-764.

GALIMBERTI, Ricardo, et al. Emerging systemic fungal infections. *Clinics in dermatology*, 2012, 30.6: 633-650.

GEIGER, A. M.; B. FOXMAN; J. D. SOBEL. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *C. glabrata* and no candida. *Sexually Transmitted Infections*, 1995, 71.5: 304-307.

GERBORE, J., et al. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21.7: 4847-4860.

GHAHFAROKHI, Masoomesh Shams, et al. Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, 2004, 75.7-8: 645-655.

GOLDMAN, Gustavo H.; Stephen A. OSMANI. *The Aspergilli: genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*. CRC press, 2007.

GRANT, Susan M.; Stephen P. CLISSOL. Fluconazole. *Drugs*, 1990, 39.6: 877-916.

GRÄSER, Y.; J. KÜHNISCH; W. PRESBER Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37.11: 3713-3717.

GUPTA, Aditya K.; TU, Linh Q. Dermatophytes: diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2006, 54.6: 1050-1055.

HALEY, Leanor D., et al. Yeasts of medical importance. *American Journal of Clinical Pathology*, 1961, 36.3.

HASLAM, Edwin. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 1996, 59.2: 205-215.

HEDAYATI, M. T., et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 2007, 153.6: 1677-1692.

HITCHCOCK, C. A., et al. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1993, 37.9: 1962-1965.

CHERMETTE, René; Laerte FERREIRO; Jacques GUILLOT. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia*, 2008, 166.5-6: 385-405.

JABLONSKÝ, Ivan; Václav ŠAŠEK. *Jedlé a léčivé houby: pěstování a využití*. Brázda, 2006.

JANOUSHKOVCOVÁ, Helena. Identifikace kvasinek a vláknitých mikromycet: SOPV/MIKRO_BAK/036/00/04. FN Plzeň, 2016.

JANOUSHKOVCOVÁ, Helena. Mykologické vyšetření klinického materiálu: SOPV/MIKRO_BAK/034/00/05. FN Plzeň, 2019.

JEDLIČKOVÁ, Anna; Jaromír MAŠATA a Magdalena SKOŘEPOVÁ. 2008. *Lokální mykózy: průvodce ošetřujícího lékaře*. Jessenius. Praha : Maxdorf, 2008. ISBN 9788073451509.

KLABAN, Vladimír. Ekologie mikroorganismů: Ilustrovaný lexikon biologie, ekologie a patogenity mikroorganismů. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, 549 s., ISBN 978-807-2627-707.

KNUDTSON, William U., et al. Trichophyton mentagrophytes dermatophytosis in wild fox. *Journal of Wildlife Diseases*, 1980, 16.4: 465-468.

KRÝZOVÁ, Adéla. Pythium oligandrum v klinické praxi. 2014.

KUBÁTOVÁ, Alena. *Aspergillus význam* [online]. [cit. 2021-02-18]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a-vyzkum/atlas-mikroskopickyh-saprotroufnych-hub-ascomycota/3-03-eurotiales-aspergillus.pdf>

KUBÁTOVÁ, Alena. *Miniatlas mikroorganismů: Rhizopus nigricans* [online]. [cit. 2021-02-15]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/rhi.htm>

LATGÉ, Jean-Paul. Aspergillus fumigatus and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, 1999, 12.2: 310-350.

LE FLOCH, Gaetan, et al. Rhizosphere persistence of three Pythium oligandrum strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. *FEMS microbiology ecology*, 2007, 61.2: 317-326.

LEWIS K.; J. M. WHIPPS; R. C. COOKE. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. *Biotechnology of fungi for improving plant growth*, 1989, 16: 191.

MENCL, K. Přírodou proti dermatomykózám. *Derma*, 2001, 1 : 8 - 12.

OLIVA, B., et al. Antimycotic activity of Melaleuca alternifolia essential oil and its major components. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 37.2: 185-187.

OSTRÝ, Vladimír. *Vláknité mikroskopické houby (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka*. Praha: Státní zdravotní ústav, 1998. ISBN 80-707-1102-7.

PANDEY, A. K.; M. K. RAI; D. ACHARYA. Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. *Pharmaceutical Biology*, 2003, 41.6: 421-425.

PÁNKOVÁ, Růžena. Povrchové kandidózy a možnosti léčby. *Dermatologie pro praxi.*, 2013

PASQUETTI, Mario, et al. Infection by *Microsporium canis* in paediatric patients: a veterinary perspective. *Veterinary Sciences*, 2017, 4.3: 46.

PATTERSON, Karen C.; Mary E. STREK. Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest*, 2014, 146.5: 1358-1368.

PISARČIK, Martin; Josef HAKL; Zuzana HREVUŠOVÁ. Effect of *Pythium oligandrum* and poly-beta-hydroxy butyric acid application on root growth, forage yield and root diseases of red clover under field conditions. *Crop Protection*, 2020, 127: 104968.

PLODPAI, Patimaporn, et al. Anti-Rhizoctonia solani activity by Desmos chinensis extracts and its mechanism of action. *Crop Protection*, 2013, 43: 65-71.

REDDY, Kasa RN; Nazira FARHANA; Baharuddin SALLEH. Occurrence of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in Malaysian foods used for human consumption. *Journal of food science*, 2011, 76.4: T99-T104.

RIBES, Julie A.; Carolyn L. VANOVER-SAMS; Doris J. BAKER. Zygomycetes in human disease. *Clinical microbiology reviews*, 2000, 13.2: 236-301.

RIPPON, John Willard, et al. *Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Eastbourne, UK; WB Saunders Company, 1982.

ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Scientia, Praha, 2003, s. 797 ISBN 978-80-86960-23-4.

SEDLÁŘOVÁ, Michaela a Martina VAŠUTOVÁ. *Atlas houbových organismů* [online]. 2007 [cit. 2021-02-14]. Dostupné z: <http://old.botany.upol.cz/atlas/system/index.php>

SHARMA, R. R.; Dinesh SINGH; Rajbir SINGH. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 2009, 50.3: 205-221.

SHIZMU, Hiroshi. *Shimizu's textbook of dermatology*. Hokkaido: Hokkaido University Press/Nakayama Shoten, 2007. ISBN 978-4521679211.

SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3170-4.

SKOŘEPOVÁ, Magdalena. 2008. *Dermatomykologie v obrazech: Dermatomykologie in pictures*. Praha: Galén, 2008. ISBN 9788072624652

SUDBERY, Peter E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9.10: 737-748.

- SUDBERY, Peter; Neil GOW; Judith BERMAN. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 2004, 12.7: 317-324.
- SUI, Yuan, et al. Responses of yeast biocontrol agents to environmental stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81.9: 2968-2975.
- TAKENAKA, Shigehito; Zenta NISHIO; Yumi NAKAMURA. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*, 2003, 93.10: 1228-1232.
- TROFA, David; Attila GÁCSER; Joshua D. NOSANCHUK. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*, 2008, 21.4: 606-625.
- VALLANCE, Jessica, et al. Influence of *Pythium oligandrum* biocontrol on fungal and oomycete population dynamics in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75.14: 4790-4800.
- VAN DYKEN, Steven J., et al. Fungal chitin from asthma-associated home environments induces eosinophilic lung infiltration. *The Journal of Immunology*, 2011, 187.5: 2261-2267.
- WATTIER, Rachel L.; Lynn RAMIREZ-AVILA. Pediatric invasive aspergillosis. *Journal of Fungi*, 2016, 2.2: 19.
- WEITZMAN, Irene; Arvind A. PADHYE, Dermatophytes: gross and microscopic. *Dermatologic clinics*, 1996, 14.1: 9-22.
- WHELAN, W. L., et al. Auxotrophic variants of *Torulopsis glabrata*. *FEMS microbiology letters*, 1984, 24.1: 1-4.
- ZAJC, Janja, et al. Stress-tolerant yeasts: opportunistic pathogenicity versus biocontrol potential. *Genes*, 2019, 10.1: 42.
- ŻUKIEWICZ-SOBCZAK, W., et al. Fungal hazards in buildings and flats—impact on the human organism. *Med Ogolna Nauki Zdr*, 2012, 18.2: 141-6.
- ŻUKIEWICZ-SOBCZAK, Wioletta A. The role of fungi in allergic diseases. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii I Alergologii*, 2013, 30.1: 42.