

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Botaniky

studijní program: Biologie
studijní obor: Botanika



Bc. Karolína Homutová

Ekofyziologie mikroskopické houby
Pseudogymnoascus destructans

Ecophysiology of microscopic fungus *Pseudogymnoascus destructans*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Alena Kubátová, CSc.
Konzultant: Mgr. Miroslav Kolařík, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2014

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mé školitelce RNDr. Aleně Kubátové, CSc. za vedení diplomové práce, pomoc při zpracování a především za velkou trpělivost. Můj velký dík patří též konzultantovi Mgr. Miroslavu Kolaříkovi, PhD. za všestrannou pomoc a podnětné rady. Dále bych chtěla poděkovat za cenné rady Mgr. Žanetě Růžičkové, RNDr. Janu Svobodovi, Ph.D. a Mgr. Tereze Veselské.

Zvláštní poděkování patří mým blízkým, kteří mě při studiu vždy podporovali.

Práce byla finančně podpořena grantem P506/12/1064 (Adaptace netopýrů na plísňové onemocnění geomykózu).

Obsah

Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
1. Úvod.....	9
1.1. Charakteristika houby <i>Pseudogymnoascus destructans</i>	9
1.1.1. Taxonomické zařazení, fyziologie a genetika.....	9
1.1.2. Výskyt a rozšíření <i>Pseudogymnoascus destructans</i>	11
1.1.3. Patogeneze syndromu bílého nosu.....	13
1.2. Selektivní média pro izolaci hub a jejich význam.....	15
1.2.1. Zdroje uhlíku a dusíku a jejich poměr v médiu.....	15
1.2.2. Antimykotika (antibiotika).....	16
1.2.3. Další možnosti zvýšení selektivity média.....	17
1.2.4. Metody hodnocení růstu hub na médiích.....	17
1.3. Studium životaschopnosti spor hub.....	18
1.3.1. Představení vybraných fluorescenčních barviv.....	18
1.4. Využití metody Biolog pro hodnocení biochemické schopnosti hub.....	21
2. Cíle práce.....	22
3. Metodika.....	23
3.1. Studium fyziologických a biochemických vlastností <i>Pseudogymnoascus destructans</i> s cílem vytvoření selektivního média.....	24
3.1.1. Testování růstových schopností <i>P. destructans</i> na 8 různých médiích.....	24
3.1.2. Testování optimální teploty pro růst <i>P. destructans</i>	26
3.1.3. Testování citlivosti <i>P. destructans</i> k antimykotikům.....	26
3.1.4. Médium pro další kultivační pokusy.....	27
3.1.5. Testování citlivosti <i>P. destructans</i> k antimykotikům/antibiotikům v médiu.....	27
3.1.6. Testování růstu <i>P. destructans</i> na médiu s různými hodnotami pH.....	28
3.1.7. Testování růstu <i>P. destructans</i> na různých zdrojích C a N.....	28
3.1.8. Testování selektivního média.....	30
3.1.9. Testování tolerance <i>P. destructans</i> k obsahu NaCl v selekt. médiu.....	31
3.1.10. Testování tolerance k 2,6-dichloro-4-nitroanilinu.....	32
3.1.11. Testování selektivního média - klíčení <i>P. destructans</i>	32
3.1.12. Zkouška různých variant médií.....	32

3.1.13. Testování schopnosti klíčení <i>P. destructans</i> spolu se spory hub ze sedimentu.....	34
3.1.14. Kontrolní testování životaschopnosti spor <i>P. destructans</i> po zmrazení na -70 C.....	34
3.2. Testování životaschopnosti spor při různých formách nepříznivých podmínek..	35
3.2.1. Testování FUN-1 s pufrem 1x PBS.....	35
3.2.2. Testování FUN-1 s pufrem Na-HEPES.....	36
3.2.3. Testování FUN-1 a délky inkubace spor.....	37
3.2.4. Testování FUN-1 spolu s Hoechst 33258.....	37
3.2.5. Testování propidia jodidu (PI) a Hoechst 33258.....	39
3.2.6. Testování spolehlivosti PI.....	40
3.2.7. Studium životaschopnosti spor hub po působení různých forem nepříznivých podmínek.....	41
3.2.8. Údaje k měření na průtokovém cytometru.....	42
3.2.9. Údaje ke konfokální mikroskopii.....	43
3.2.10. Metodika vyhodnocování výsledků.....	43
3.3. Biolog.....	44
3.3.1. Destičky FF MicroPlate™.....	44
3.3.2. Destičky Phenotype MicroArrays™ - PM.....	45
3.3.3. Vyhodnocování metody Biolog.....	47
4. Výsledky.....	49
4.1. Fyziologické a biochemické vlastnosti <i>P. destructans</i> a jejich využití pro vytvoření selektivního média.....	49
4.1.1. Testování růstových schopností <i>P. destructans</i> na 8 různých médiích...49	
4.1.2. Testování optimální teploty pro růst <i>P. destructans</i>	50
4.1.3. Testování citlivosti <i>P. destructans</i> k antimykotikům.....	50
4.1.4. Testování citlivosti <i>P. destructans</i> k antimykotikům/antibiotikům v médiu.....	51
4.1.5. Testování růstu <i>P. destructans</i> na médiu s různými hodnotami pH.....	55
4.1.6. Testování růstu <i>P. destructans</i> na různých zdrojích C a N.....	55
4.1.7. Testování selektivního média.....	56
4.1.8. Testování tolerance <i>P. destructans</i> k obsahu NaCl v selektivním médiu.....	57
4.1.9. Testování tolerance k 2,6-dichloro-4-nitroanilinu.....	58

4.1.10. Testování selektivního média - klíčení <i>P. destructans</i>	59
4.1.11. Zkouška různých variant médií.....	60
4.1.12. Pokus sledující <i>P. destructans</i> spolu se sporami hub ze sedimentu.....	61
4.1.13. Kontrolní testování životaschopnosti spor <i>P. destructans</i> po zmrazení na -70 °C.....	65
4.2. Testování životaschopnosti po působení různých formách nepříznivých podmínek.....	70
4.2.1. Testování FUN-1 s pufrem 1x PBS.....	70
4.2.2. Testování FUN-1 s pufrem Na-HEPES.....	71
4.2.3. Testování FUN-1 a délky inkubace spor.....	72
4.2.4. Testování FUN-1 spolu s Hoechst 33258.....	72
4.2.5. Testování propidia jodidu (PI) a Hoechst 33258.....	73
4.2.6. Testování spolehlivosti PI.....	74
4.2.7. Testování životaschopnosti spor hub po působení různých forem nepříznivých podmínek.....	76
4.3. Výsledky testování utilizace různých živin metodou Biolog.....	81
5. Diskuze.....	96
5.1. Vytváření selektivního média.....	96
5.2. Testování životaschopnosti spor - metodika.....	98
5.2. Testování životaschopnosti spor - výsledky.....	99
5.3. Biolog - utilizace různých zdrojů živin.....	100
6. Závěr.....	103
7. Literatura.....	104
8. Přílohy.....	112
8.1. Substráty obsažené na FF a PM Biolog destičkách.....	112

Abstrakt

Mikroskopická houba *Pseudogymnoascus destructans* (Ascomycota: *Pseudeurotiaceae*) způsobuje nemoc zvanou syndrom bílého nosu (WNS) působící úhyn netopýrů během hibernace. Nemoc se vyskytuje v Severní Americe a v Evropě. Houba je charakteristická asymetricky zakřivenými konidii, pomalým růstem a růstem v nízkých teplotách (pod 20 °C).

Cílem této studie je vytipovat vlastnosti zodpovědné za unikátní ekologii *Pseudogymnoascus destructans* pomocí srovnání s ekologicky příbuznými či nepříbuznými patogenními i nepatogenními druhy hub. Tato část zahrnuje studium tolerance k nepříznivým podmínkám a poznání spektra utilizovaných živin (sloučeniny uhlíku, dusíku, fosforu, síry a nutriční elementy). Testování k nepříznivým podmínkám také má pomoci odhadnout potenciál houby se šířit mimo jeskyně. Posledním cílem je vyvinutí selektivního izolačního média pro *P. destructans*.

Vliv nepříznivých podmínek (např. UVA, UVA s UVB, 25 °C, 30 °C, 37 °C a nedostatek vzdušné vlhkosti) byl testován fluorescenčním značením propidium jodid (PI) prostřednictvím průtokové cytometrie. Spory *P. destructans* a tři izolátů hub z podzemních nebyly životaschopné po 3 týdnech uchování v 37 °C. Další nepříznivé podmínky nezpůsobovaly výrazný pokles životaschopnosti nebo způsobily výraznější pokles životaschopnosti jen u některého izolátu.

Vývoj selektivního média pro *P. destructans* měl několik kroků (např. nalezení srovnávacího média, vhodné kultivační teploty, testování antimykotik atd.). Selektivní médium také pomohlo vyvinout systém Biolog pro testování utilizace uhlíku, dusíku, fosforu, síry a nutričních doplňků. Systém Biolog ukázal, že izoláty *Pseudogymnoascus destructans* se liší v utilizaci uhlíku, dusíku, fosforu, síry a nutričních doplňků od dalších testovaných kmenů hub.

klíčová slova: houby, *Pseudogymnoascus*, fyziologie, utilizace, životaschopnost

Abstract

A microscopic fungus *Pseudogymnoascus destructans* (Ascomycota: *Pseudeurotiaceae*) causes illness known as white-nose syndrome (WNS) causing death of bats during hibernation. The illness occurs in the North America and in Europe. The fungus is characteristic by asymmetrically curved conidia, by slow growth and growth at low temperatures (below 20 °C).

The aim of this study is to clarify properties responsible for unique ecology of *Pseudogymnoascus destructans* by comparison with ecological related or unrelated pathogenic or nonpathogenic fungi. This part includes study of tolerance to physiological stresses and recognition of spectrum of utilizing nutrients (compounds of carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur and nutrient supplements). Testing to physiological stresses should help to estimate a potentiality of fungus to spread out of caves. The last aim is to develop a selective isolation medium for *P. destructans*.

Influence of several types of physiological stress (e.g. UVA, UVA with UVB, 25 °C, 30 °C, 37 °C and dryness) was investigated with fluorescent stain propidium iodide (PI) by flow cytometry. The spores of *Pseudogymnoascus destructans* and three fungi from underground spaces were not viable after 3 weeks at 37 °C. Other stresses did not cause a decreasing of viability or some stresses caused a decreasing of viability only in some strains of fungi.

The development of the selective isolation medium for *P. destructans* had several steps (e.g. finding a control medium, finding suitable cultivation temperature, testing antimycotics etc.). The selective medium was also developed through Biolog MicroPlate for testing of utilization carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur and nutrient supplements. System Biolog showed, that isolates of *Pseudogymnoascus destructans* differ in utilization of sources of carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur and nutrient supplements from other testing fungi.

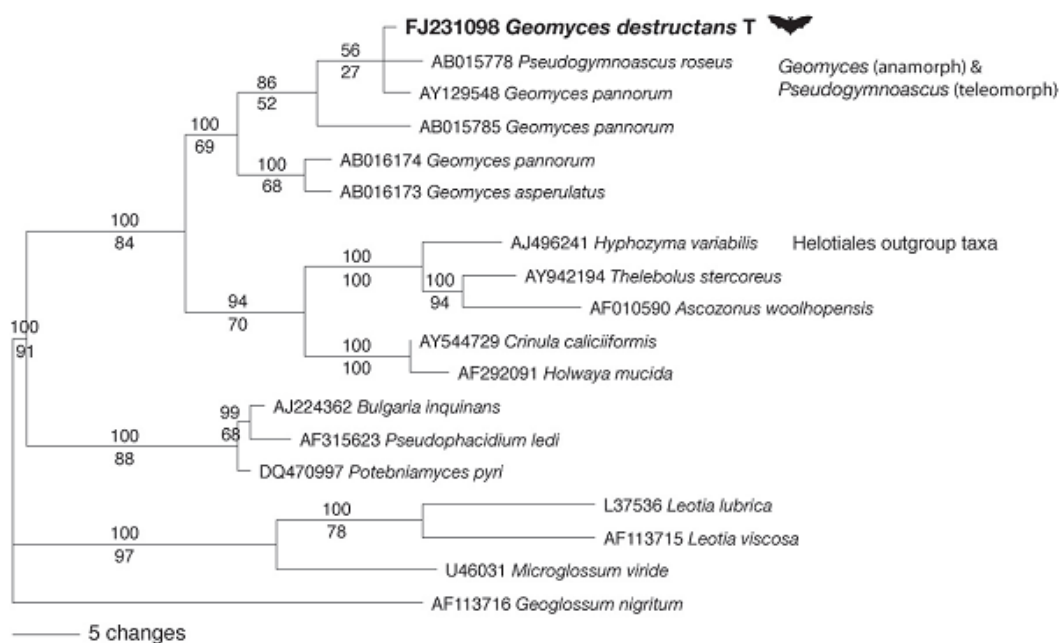
Key words: Fungi, *Pseudogymnoascus*, physiology, utilization, viability

1. Úvod

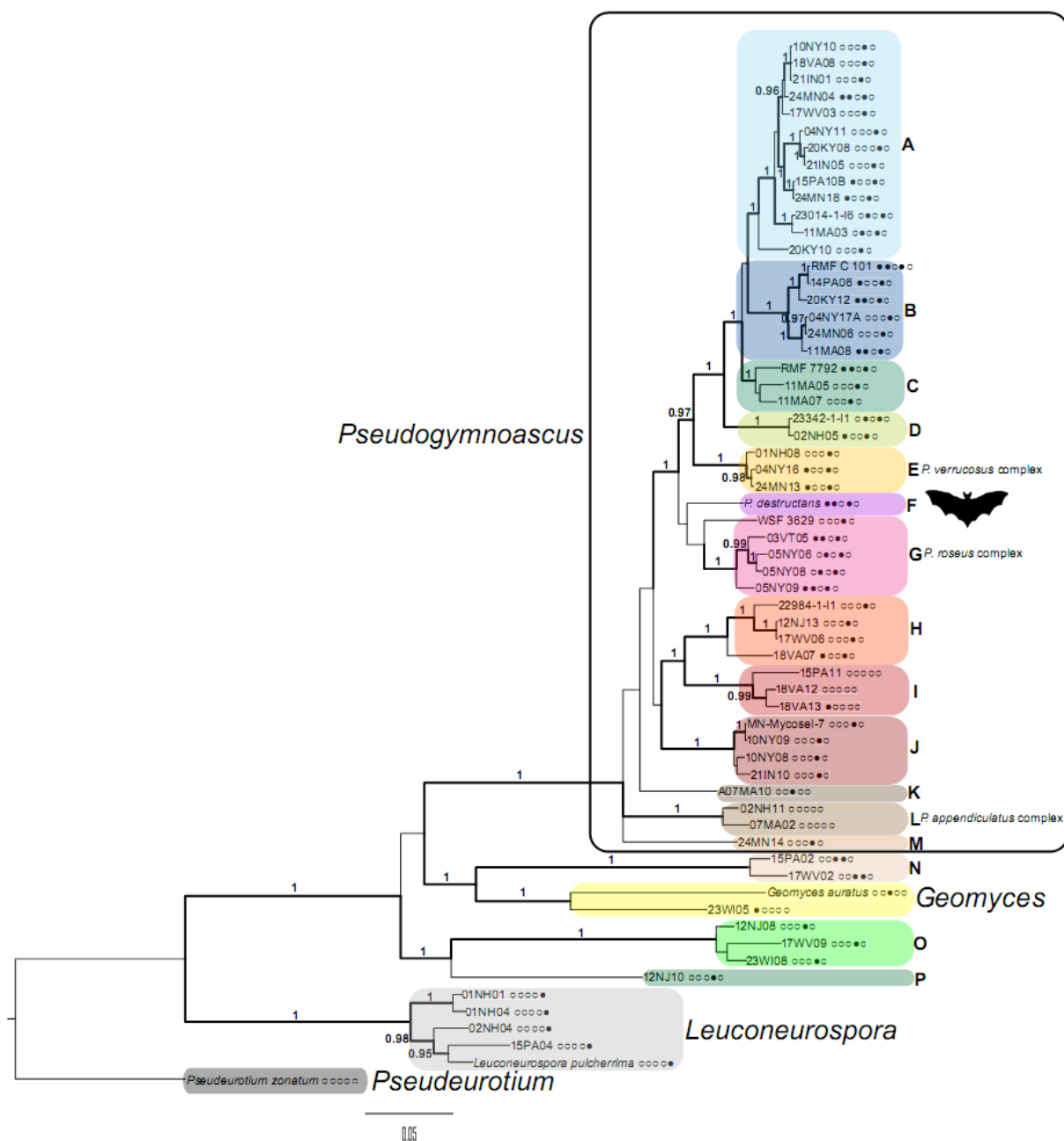
1.1. Charakteristika houby *Pseudogymnoascus destructans*

1.1.1. Taxonomické zařazení, fyziologie a genetika

Houba byla poprvé zaznamenána v jeskyni ve státě New York v roce 2006 (Blehert et al., 2009) a následně popsána roku 2009 jako *Geomyces destructans*, Obr. 1 (Gargas et al., 2009). Nemoc, kterou způsobuje, byla nazvána syndrom bílého nosu (white-nose syndrome, Blehert et al. 2009) a později geomykóza (Chaturvedi a Chaturvedi, 2011). V roce 2013 provedli Minnis et Lindner (2013) na základě nové fylogenetické analýzy novou nomenklatorickou kombinaci a houbu zařadili do druhu *Pseudogymnoascus destructans* v rámci čeledi Pseudeurotiaceae (Ascomycota), Obr. 2. Porovnáním mnoha variabilních genomických úseků bylo zjištěno, že onemocnění WNS v USA způsobil pouze jeden klonální genotyp (Rajkumar et al., 2011; Ren et al., 2012). *P. destructans* patří mezi heterotalické houby. Severoamerický klon patří pouze jednomu párovacímu typu MAT1-1, zatímco v Evropě se nachází oba párovací typy (MAT1-1, MAT1-2) (Palmer et al. 2014). Komplexní fytogeografická studie založená na materiálu z celého areálu není zatím k dispozici. V Evropě se nachází ITS rDNA haplotypy identické s USklonem a navíc haplotyp unikátní (1 bp odlišnost od US klonu) (Puechmaile et al., 2011, Martínková et al. 2010).



Obr.1: Fylogenetický strom znázorňující příbuzenské vztahy *P. destructans* s dalšími druhy. Ke konstrukci stromu byla použita ITS rRNA (převzato z Gargas et al., 2009).



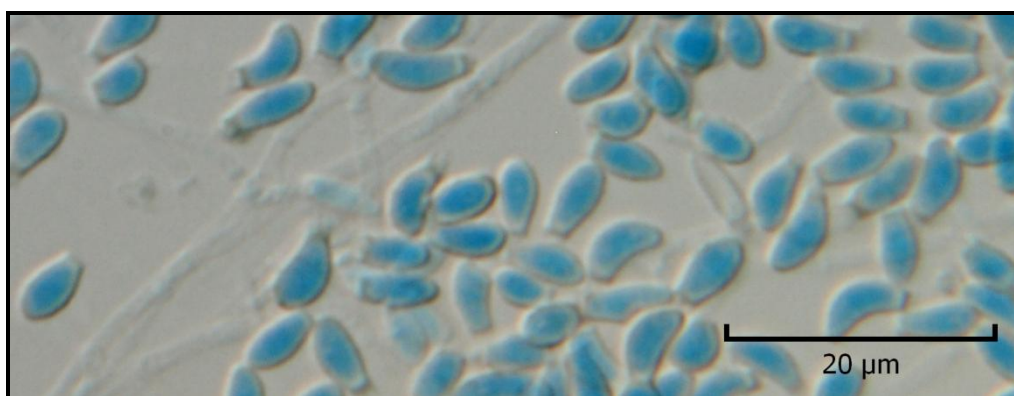
Obr. 2: Fylogenetická analýza znázorňující postavení *P. destructans* (linie F) v rámci rodu *Pseudogymnoascus*. Ke stromu byly použity geny ITS , LSU MCM7, RBP2 a TEF1 (převzato z Minnis et Lindner, 2013).

P. destructans je psychrofilní houba. Roste v teplotním rozmezí cca 3-19 °C. Nejrychlejší růst byl zaznamenán při teplotách od 10-12 °C do 14 °C. Při -10 °C a naopak při 20 °C a vyšší teplotě již neroste (Gargas et al., 2009; Chaturvedi et al., 2010; Verant et al., 2012).

Houba je charakteristická svými rohlíčkovitě zakřivenými konidii (Obr. 3), kterými se liší od ostatních druhů rodu *Pseudogymnoascus*. Konidie jsou 2 až 3,5 μm široké a 5 až 12 μm dlouhé (Gargas et al., 2009). Vyrůstají jednotlivě nebo v krátkých řetězcích na rozvětvených konidioforech. Kolonie jsou na svrchní straně bělavé až šedozeleňé, na spodní straně bělavé až šedavé či hnědé (Kubátová et al., 2011) v závislosti na typu kultivačního média.

P. destructans má schopnost produkovat proteolytické a hydrolyzující enzymy, což by mohlo hrát určitou roli v jeho patogenezi. Produkuje acid-fosfatázu, N-acetyl- β -glukosaminidázu, β -glukosidázu, esterázu, esterázu lipázu, leucin arylamidázu a naphthol-AS-B1-fosfohydrolázu. Dále sekretuje proteinázy na médiích podporující tuto schopnost (Chaturvedi et al., 2010). U *P. destructans* nebyla prokázána keratinolytická aktivita, ačkoli byl schopen dobře růst na azurovém médiu s α -keratinem, na médiu s β -keratinem nikoli (Raudabaugh et Miller, 2013).

Chaturvedi et al. (2011) studovali také vlastnosti spojené se schopností odolávat různým antimykotikům. *P. destructans* je citlivý na amfotericin B, flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, posakonazol a vorikonazol. Má schopnost tolerance k vysokým množstvím echinokandinů a 5-fluorocytosinu.



Obr. 3: Spory *Pseudogymnoascus destructans* CCF 3944, vlastní fotografie.

1.1.2. Výskyt a rozšíření *Pseudogymnoascus destructans*

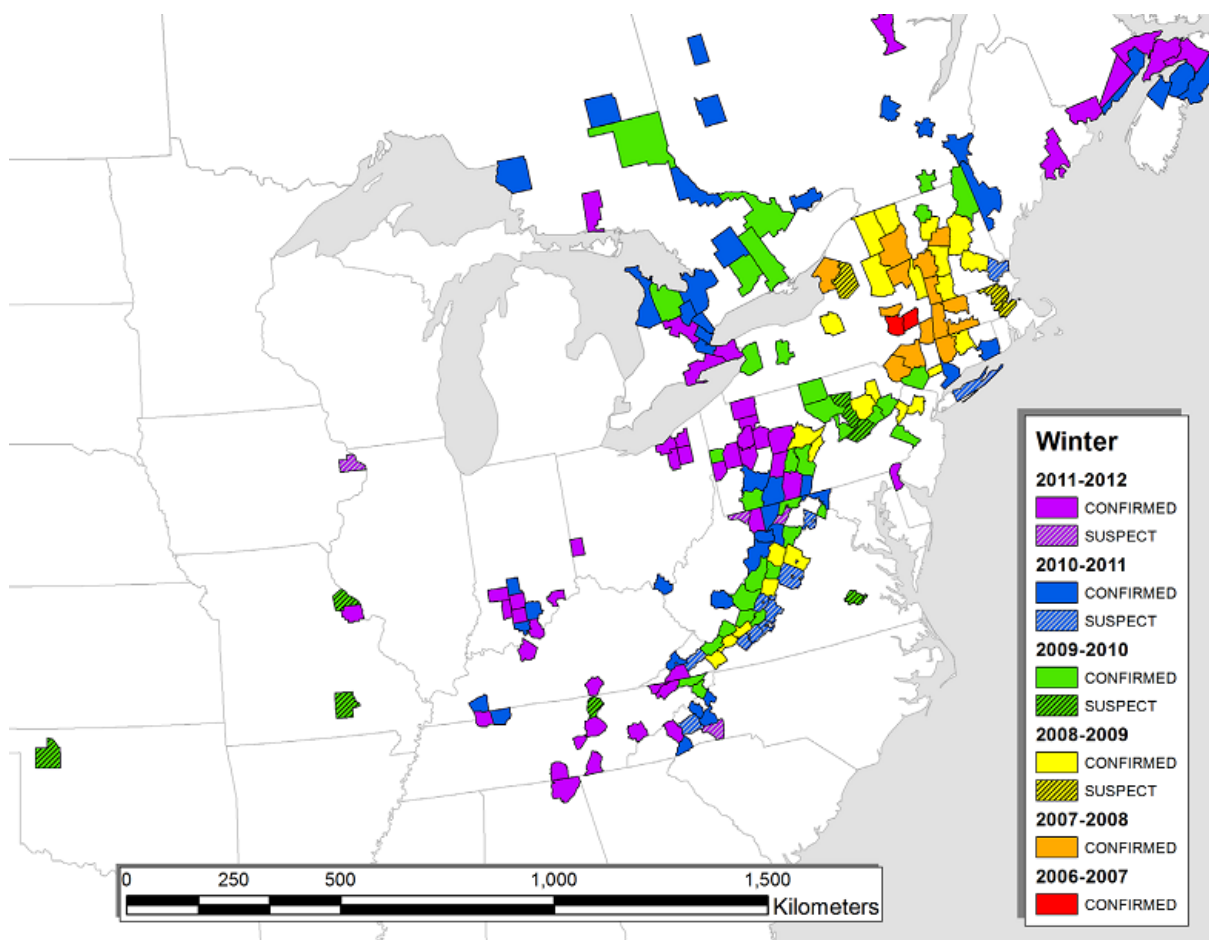
P. destructans je svým výskytem vázán téměř výlučně na těla hibernujících netopýrů. Pouze ojediněle byl *P. destructans* prokázán i v prostředí podzemních prostor obývaném netopýry (viz dále). Poprvé byl *P. destructans* zaznamenán v únoru 2006 v USA na hibernujících netopýrech v jeskyni Howes, blízko Albany ve státě New York, a to v souvislosti s hromadným hynutím netopýrů, na nichž bylo pozorováno onemocnění

zvané syndrom bílého nosu ("white-nose syndrome", WNS) (Blehert et al., 2009). Z prvotního místa výskytu se syndrom bílého nosu rozšířil na východě Severní Ameriky do mnoha států USA (North Carolina, Tennessee, Virginia, Pennsylvania, Connecticut, Vermont atd.) a do provincií Kanady Ontario a Quebec (Obr. 4). Bylo zjištěno, že houba roste dobře při relativní vlhkosti vzduchu pohybující se kolem 60-90 %, což je vlhkost obvyklá v zimovištích netopýrů a rovněž na povrchu těla netopýrů v období hibernace (Cryan et al., 2010).

V USA bylo nejvíce postiženo 6 druhů netopýrů: *Eptesicus fuscus* (netopýr hnědý), *Myotis leybii*, *Myotis lucifugus* (netopýr hnědavý), *Myotis septentrionalis*, *Myotis sodalis* (netopýr společenský) a *Perimyotis subflavus* (Castle et Cryan, 2010).

V Evropě byl výskyt *P. destructans* publikován již v roce 2010. Tato houba se vyskytuje ve většině států (Rakousku, Belgii, Dánsku, Estonsku, Francii, Německu, Nizozemsku, Polsku, Rumunsku, Švýcarsku, Slovensku, Turecku a Ukrajině) včetně České republiky (Puechmaille et al., 2010, Wibbelt et al., 2010, Martínková et al., 2010, Šimonovičová et al. 2011). V Evropě houba nepůsobí úmrtí hostitele, a proto se zde nemluví přímo o výskytu WNS. Výjimkou je práce Pikula et al. (2012), která podává histopatologický důkaz WNS z naší republiky, ale nemoc zde nepůsobí úhyn. V České republice byly nejvyšší koncentrace zjištěny ve vlhkých až středně vlhkých podhorských oblastech. Naopak nižší výskyt byl zaznamenán v horských a vápencových oblastech. V Evropě byl nemocí nejvíce poznamenán druh *Myotis myotis* (netopýr velký) (Martínková et al., 2010; Puechmaille et al., 2011), dále např. druhy *Myotis blythii*, *Myotis oxygnathus* (netopýr ostrouchý), *Myotis mystacinus* (netopýr vousatý), *Myotis daubentonii* (netopýr vodní) či *Myotis dasycneme* (netopýr pobřežní) (Puechmaille et al., 2011). V Čechách jsou nejvíce postiženy druhy *Myotis myotis*, *Myotis daubentonii*, *Myotis bechsteinii*, *Myotis nattereri*, *Myotis brandtii*, *Myotis emarginatus* a *Rhinolophus hipposideros* (Zukal et al., 2014).

Významnou, dosud zcela nevyjasněnou otázkou zůstává, zda a kde existuje přírodní rezervoár houby mimo tělo netopýrů, případně i jak je velký. Mohlo by to být na stěnách jeskyní (či jiných podzemních prostor) či v jeskynním nebo půdním sedimentu. Lorch et al. (2012a) izolovali *P. destructans* ze sedimentu na 3 lokalitách (celkem studovali 19 lokalit). V další práci Lorch et al. (2012b) uvádějí, že izolovali *P. destructans* ze sedimentu na 7 lokalitách ze 14 zkoumaných. To je důkaz, že houba se v sedimentu vyskytuje a přežívá tam.



Obr. 4: Rozšíření syndromu bílého nosu v USA a v Kanadě do roku 2012. Plná pole znázorňují výskyt potvrzený histopatologickou analýzou a pruhovaná pole výskyt potvrzený PCR analýzou (Cryan et al., 2013).

1.1.3. Patogeneze syndromu bílého nosu:

Bílý houbový porost *P. destructans* na hibernujících netopýrech je pozorovatelný především na čenichu, uších a létacích blanách (Obr. 5) (Blehert et al., 2009). Houbové hyfy v zasažené pokožce pronikají do vlasových váčků, do tukových a apokrinních žláz a pronikají až do pojivové tkáně. Takto je hluboce zasažena pokožka a pojivová tkáň kůže, na které se mohou vytvořit i viditelné vředy (Meteyer et al., 2009).

Létací blány mohou být postiženy různou měrou. Pro netopýra jsou velmi důležité, protože kromě pohybu zajišťují termoregulaci (Thomas et Suthers, 1972), výměnu plynů (Herreid et al., 1968) a rovnovážné hospodaření s vodou (Kluger et Heath, 1970). Zranění létacích blan způsobuje, že létací blány neplní zcela svou funkci. Plísňový porost *P. destructans* na létacích blanách se může také podílet na poškození jejich funkce. Nejdříve

způsobuje vznik skvrn, později depigmentaci, nekrotizaci tkáně, vznik děr či úplnou ztrátu části blány (Reichard et Kunz, 2009).



Obr. 5: Zasažený netopýr velký (*Myotis myotis*) (Wibbelt et al., 2011).

Je překvapující, že u mnoha netopýrů zasažených plísní se neobjeví zánětlivá odpověď. Pokud se v kůži projevy zánětu objeví, projevuje se to otoky a přítomností neutrofilů v oblasti pojivové tkáně, případně mohou být pozorovatelné abscesy uvnitř tkáně kůže (Meteyer et al., 2009).

V lokalitách, kde je syndrom bílého nosu rozšířen, bylo pozorováno nestandardní chování netopýrů v době hibernace. Velké množství z nich přelétávalo uvnitř hibernakula do částí hibernakula nacházejících se blíže vchodu nebo do neobvykle chladných prostor. Bylo také pozorováno, že netopýři vylétávali v průběhu zimy během dne ven z hibernakula. V důsledku vyčerpání se pak mnoho mrtvých netopýrů nacházelo uvnitř hibernakula či blízko vchodu (Castle et Cryan, 2010).

V Severní Americe je výskyt syndromu bílého nosu spojen s hromadným úhynem netopýrů (Blehert et al., 2009). Jednou z příčin může být, že netopýři v Severní Americe přezimují ve velkých shlukách. Velikost těchto shluků se pohybuje od 1000 po 50000 jedinců. Naproti tomu v Evropě netopýři hibernují jednotlivě nebo v malých skupinách (Wibbelt et al., 2010). Strategie přezimování netopýrů v Severní Americe může hrát velkou roli v šíření nákazy, jelikož Lorch et al. (2011) zjistili, že *P. destructans* se mezi netopýry šíří přímým kontaktem.

Velké úhyny netopýrů jsou významný ekologický problém pro člověka, neboť mají důležitou roli v mnoha ekosystémech, zejména v regulaci hmyzu, v regeneraci lesa a v opylování rostlin (Williams-Guillen et al., 2008).

Fakt, že *P. destructans* je široce rozšířen v Evropě, kde však není jeho výskyt spojen s vysokou mortalitou netopýrů, malá genetická diverzita v US a přítomnost jen jednoho párovacího typu, podporuje hypotézu, že v Evropě se houba vyskytovala již mnohem dříve než v Severní Americe (Puechmaille et al., 2011), čímž mohli netopýři po dlouhou dobu koevulovat s houbou, a tudíž být k nemoci WNS imunologicky a behaviorálně více rezistentní (Wibbelt et al., 2010).

1.2. Selektivní média pro izolaci hub a jejich význam

Média pro kultivaci hub mohou být širokospektrá, tak aby na nich bylo schopno růst co nejvíce druhů hub. Avšak v řadě případů jsou potřebná média určená pouze pro určitou ekologickou skupinu hub, rod či dokonce druh houby. Tato média se označují jako selektivní. Ideální selektivní médium by mělo svým specifickým složením omezovat růst nežádoucích hub a co nejvíce podporovat růst preferovaného druhu houby. Může toho být docíleno tím, že např. obsahuje vybrané zdroje živin případně i o určitém poměru, má pH odpovídající optimu růstu houby, obsahuje antimykotika či antibiotika, která nejméně omezují růst preferovaného druhu houby (Elad et al., 1981; Chase et al., 1986; Andrews et Pitt, 1986).

1.2.1. Zdroje uhlíku a dusíku a jejich poměr v médiu

Jako zdroj uhlíku a dusíku v agarových médiích pro kultivaci hub se mohou použít různé chemické sloučeniny. Zdrojem uhlíku bývají většinou cukry jako např. glukóza či sacharóza. Zdrojem dusíku bývají organické látky, např. močovina nebo anorganické látky, např. dusičnan sodný. Optimální zdroje živin jsou druhově specifické a stejně jako poměr obsahu uhlíku (C) a dusíku (N) může značně ovlivnit fenotyp a jde tedy o základní charakteristiky sloužící při vývoji selektivního média.

Engelkes et al. (1997) studovali vliv poměru uhlíku (zdroj maltóza) a dusíku (zdroj vápník a dusičnan amonný) na sporulaci houby *Talaromyces flavus*. Zjistili, že poměr C a N má vliv na tvorbu askospor, při vyšším poměru (od 5:1 do 15:1) bylo produkováno více askospor. Podobnou studii se zabývali Gao et Liu (2009), kteří zkoumali vliv poměru C:N na sporulaci *Paecilomyces lilacinus*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*

a *Trichoderma viride*. Také zjistili, že poměr C:N (zdroj C: sacharóza, zdroj N: sójový pepton) má vliv na produkci spor, u každého druhu houby se však hodnoty lišily.

Různý poměr C:N může ovlivňovat i schopnost růstu houby. Egli et Quayle (1986) studovali vliv C:N na buněčné a enzymatické složení kvasinky *Hansenula polymorpha*. Zjistili, že poměr C:N ovlivňuje v médiu postupné potlačení syntézy metanolu. López et al. (2003) studovali, jak poměr C:N v médiu ovlivňuje produkci léčiva lovastatinu (látka snižující cholesterol v krvi) produkovaného houbou *Aspergillus terreus*. Prokázali, že studovaný aspekt má na produkci léčiva vliv, protože nejvíce je ho produkováno při poměru C:N 40:1.

1.2.2. Antimykotika (antibiotika)

Antimykotika jsou chemické látky usmrcující houby (fungicidní účinek) nebo potlačující růst hub (fungistatické působení). Jejich účinek je druhově či kmenově specifický

V této části budu pojednávat o antimykotikách použitých v této práci.

Mechanismus působení antimykotik může být různý. **Polyenová antimykotika** (amfotericin B, ketokonazol, mikonazol, flukonazol, itraconazol, vorikonazol, nystatin, pimaricin) interagují s ergosterolem v buněčných membránách hub, rozrušují je (vznik porinů - integrální protein v cytoplazmatické membráně mitochondrií), čímž dojde ke zvýšení permeability pro monovalentní kationty, a to způsobí následnou destrukci buňky (Jedličková, 2006; Jedličková, 2008; Aparicio, 2000). Antimykotikum **5-fluorocytosin** inhibuje syntézu RNA a DNA přeměnou na metabolit 5-fluorouracil (Vermes et al., 2000). **Amfotericin B** se váže na ergosterol v membráně mikroskopických hub, čímž dochází k rozrušení kontinuity membrány, ke vzniku pórů, úniku iontů a vylití buněčného obsahu. Imidazoly **klotrimazol, bifonazol a ekonazol** podobně jako polyeny inhibují syntézu ergosterolu, která vede ke strukturálnímu a funkčnímu poškození cytoplazmatické membrány. **Ciklopiroxolamin** inhibuje syntézu proteinů buněčné membrány mikroorganismů (Jedličková, 2006). **Dodine** interaguje s intra-cytoplazmatickými organelami, mění propustnost membrán a poškozuje intracelulární membránové struktury v buňce (Somers et Pring, 1966). **CTAB** (cetyltrimethylammonium bromide) ovlivňuje elektroforetickou mobilitu a způsobuje únik malých fosforylovaných složek, proteinů a DNA, což způsobí lýzi buňky (Vieira et Carmona-Ribeiro, 2006).

Antibiotika jsou obecně látky, které potlačují růst mikroorganismů nebo je usmrcují, ať jde o bakterie, houby či prvoky. Patří mezi ně např. bengálská červeň a chloramfenikol (použité v mé práci při vývoji selektivního média, kapitola 3.1.5.). **Bengálská červeň** má bakteriostatické účinky na bakterie (Ottow, 1972), což znamená, že omezuje růst bakterií.

Působí tak, že narušuje proteosyntézu, replikaci DNA a celkový metabolismus. Navíc omezuje i růst mikroskopických hub. **Chloramfenikol** má podobné účinky na bakterie jako bengálská červeň, je bakteriostatický, jelikož inhibuje proteosyntézu (Lincová D. et al., 2007).

1.2.3. Další možnosti zvýšení selektivity média

Selektivitu média můžeme dále ovlivnit zvolením vhodného pH a kultivační teploty, které vyhovují nejvíce studovanému druhu houby.

Podle nároků na vhodnou teplotu růstu (Mueller et al., 2004) se rozlišuje několik skupin hub: **mezofilní, termofilní, termotolerantní, psychrofilní a psychrotolerantní**. Mezofilní houby rostou v rozmezí teplot 5 °C až 35 °C, optimum růstu mají ve 20 °C až 30 °C. Termofilní houby rostou v rozmezí teplot 20 °C až 50 °C. Termotolerantní houby nerostou pod mezní teplotu 20 °C, mají však schopnost růst dokonce i ve 40 °C až v 50 °C. Psychrofilní houby nedokážou růst při teplotě nad 20 °C, optimum mají kolem 15 °C a níže. Psychrotolerantní houby vykazují růst i okolo 0 °C, optimum růstu mají přibližně ve 20 °C.

Houby se dále liší v nárocích na pH prostředí. V přírodních substrátech se pH pohybuje obvykle v rozmezí 4 až 9, optimum růstu pro mnoho organismů je v tomto rozpětí. Je obecně známo, že houby rostou a produkují spory v mírně kyselém až v neutrálním pH. Mikroorganismy, které mají optimum růstu v pH 8 až 9 (10), jsou alkalofilní. Jde většinou o prokaryota. Jsou však známy i alkalofilní houby, např. *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus oryzae*.

Houby se také mohou lišit dle tolerance k obsahu NaCl v substrátu. Houby, které nejsou halofilní, tolerují maximálně množství 0,2 M NaCl (0 - 12 g/l) v substrátu, nepatrně halofilní 0,2 - 0,5 M (12 - 29 g/l), mírně halofilní 0,5 - 2,5 M (29 až 146 g/l) a extrémně halofilní 2,5 - 5 M (146 - 303 g/l) (Mueller et al., 2004).

1.2.4. Metody hodnocení růstu na médiích hub

Používají se tři základní způsoby hodnocení růstu hub: zjišťování počtu vyklíčených spor, měření rychlosti radiálního růstu nebo zjišťování biomasy.

Metoda zjišťování počtu vyklíčených spor předpokládá, že se před inokulací spor v suspenzi zjistí koncentrace spor v objemové jednotce nebo se připraví ředící řada a po inokulaci daného objemu suspenze spor se hodnotí počet narostlých kolonií (Chase et al., 1986). Při měření rychlosti radiálního růstu se měří poloměr nebo průměr kolonií (Andrews et Pitt, 1986; Kubátová et al., 2011) či se měří celková plocha kolonie (Verant et al., 2012). Další možností je zjišťování množství biomasy (Engelkes et al., 1997).

1.3. Studium životaschopnosti spor hub

Životaschopnost spor hub lze studovat kultivačně (stanovujeme % klíčivosti) či prostřednictvím fluorescenčního značení sledujícího životnost na základě určitých ukazatelů v buňce charakteristických pro dané značení (stanovujeme % životnosti). Koncentraci analyzovaných spor v roztoku lze měřit hemocytometrem nebo v počítací komůrce různých typů.

Braga et al. (2002) použili kultivační postup u entomopatogéních hub *Verticillium lecanii* a *Aphanocladium album* vystavených působení UV-B záření. Na médium vysévali určitý objem suspenze se stanoveným počtem spor a zjišťovali procento vyklíčených spor. Podobně zjišťovali procento vyklíčených spor Abrashev et al. (2005), kteří zkoumali reakci houby *Aspergillus niger* na vystavení teplotám 30 °C, 50 °C, 60 °C a 80 °C. Po ukončení působení vyšších teplot byly suspenze o určitém objemu se stanoveným počtem spor vysety na Petriho misky s médiem a odečítány klíčící spory.

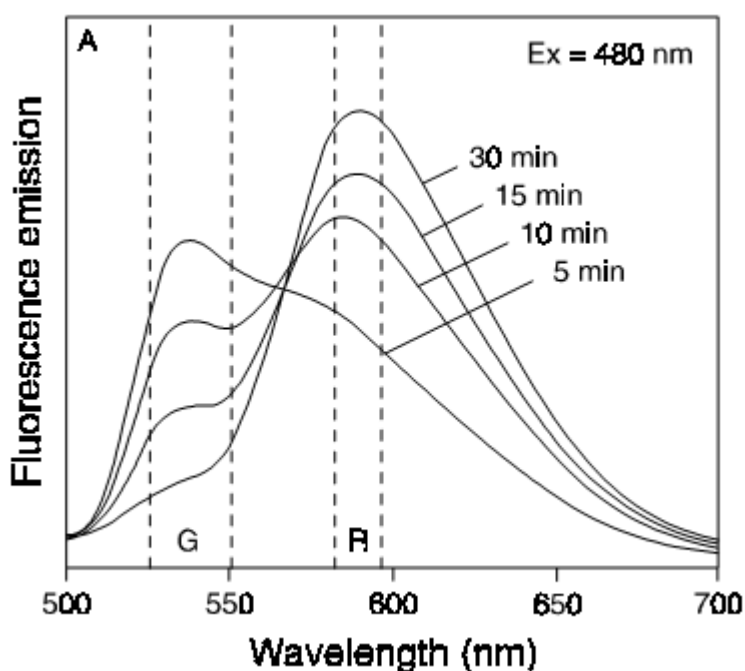
Další možností pro studium životnosti spor je použití fluorescenčního značení rozlišujícího životaschopné a neživotaschopné spory. Fluorescenčního značení spor je více typů; liší se od sebe principem značení spor.

1.3.1. Představení vybraných fluorescenčních barviv

V následujícím textu jsou zmíněna fluorescenční značení použitá v této diplomové práci.

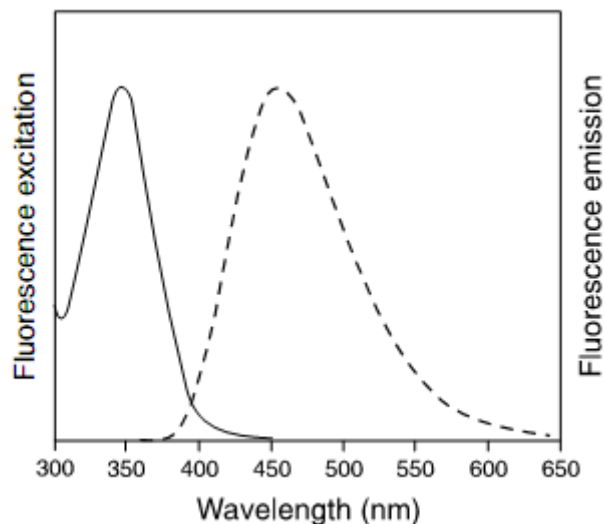
FUN-1 je fluorescenční barvivo, které značí mrtvé i metabolicky aktivní buňky. Mrtvé buňky s porušenou membránou nebo s nedostatečnou metabolickou aktivitou vykazují v cytoplazmě difuzně rozptýlenou zeleno-žlutou fluorescenci, zatímco metabolicky aktivní buňky jsou značeny oranžovo-červenou fluorescencí přítomnou uvnitř intravakuolárních struktur (CIVS) (barvivo se do nich metabolicky z cytoplazmy přečerpá). Jako standardní pufr pro fluorescenční značení FUN-1 se používá 10mM Na-HEPES s obsahem 2% D-(+)-glukózy, s pH 7,2. Excitační vlnová délka je 480 nm, emise v zeleno-žlutém rozmezí odpovídá vlnové délce 525 nm až 550 nm a v červeném spektru 570 nm až 598 nm (Obr. 6) (Anonymus, 2001). Pro efektivní značení, zejména pro zvýraznění intravakuolárních struktur v červeném spektru fluorescence, je potřeba přítomnost glukózy. Glukóza je zdrojem energie pro metabolickou aktivitu, která je potřeba pro přečerpání barviva z cytoplazmy do intravakuolárních struktur (CIVS), kde vykazuje fluorescenci odpovídající vlnovým délkám v červeném rozmezí (Millard et al., 1997).

V mnoha pracích se používá FUN-1 jako vitální barvivo pro testování životnosti spor při testování účinnosti antimykotik. Např. Mukherjee et al. (2003) testovali citlivost buněk kvasinky *Candida albicans* z biofilmů na antimykotikum flukonazol spektrofotometrem. V jiné obdobné práci testovali citlivost kvasinky *C. albicans* na antimykotika flukonazol a amfotericin B prostřednictvím průtokové cytometrie (Parisi-Duchene et al., 2006). Fluorescenční značení FUN-1 se nepoužívá jen pro kvasinky, ale i pro jiné rody hub, např. Balajee et al. (2002) studovali průtokovou cytometrií životnost spor *Aspergillus fumigatus* a *Aspergillus terreus* po působení antimykotika amfotericinu B.



Obr. 6: Fluorescenční excitační a emisní spektrum FUN-1, G - "zelená" fluorescence, R - "červená" fluorescence, EX - excitace (Anonymus, 2001).

Další značení, které však bylo testováno v této diplomové práci jen okrajově, je **Hoechst 33258**. Je to fluorescenční značení, které se váže na nukleové kyseliny. Značení bývá také používáno jako vitální barvivo, protože proniká pouze do porušené buňky a váže se na DNA (váže se do AT bohatých oblastí). Hoechst 33258 má excitační maximum ve vlnové délce 350 nm a emisní maximum ve vlnové délce 450 nm (modrá) viz Obr. 7 (Anonymus, 2005). Z toho vyplývá, že se dá použít společně s fluorescenčním značením FUN-1, neboť se nekryje s jeho excitačním a emisním spektrem.

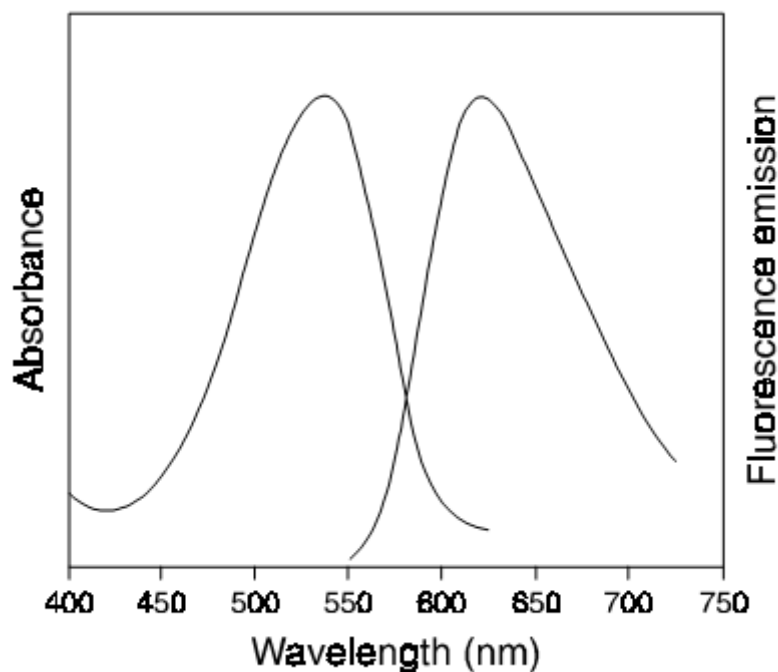


Obr. 7: Fluorescenční excitační a emisní spektrum Hoechst 33258 (Anonymus, 2005).

Fluorescenční značení pomocí **propidium jodidu (PI)** je další způsob, který byl využit v této práci a je pro ni stěžejní. Propidium jodid se váže do DNA a RNA. Barvivo je aktivně vypumpováno z živých buněk, je proto používáno pro značení mrtvých buněk. Emisní maximum odpovídá vlnové délce 540 nm a excitační maximum odpovídá vlnové délce 610 nm (Obr. 8) (Anonymus, 2006).

Propidium jodid není ve velké míře využíván jako fluorescenční značení pro studium životnosti buněk, jsou však práce, které ho k tomuto účelu využívaly. Green et al. (1999) zkoumali účinky antimykotika LY303366 (semisyntetický analog echinokandinu B) na kvasinku *Candida albicans* v koncentraci PI.

Propidium jodid je poměrně spolehlivý indikátor k určení množství životaschopných spor, což potvrzuje práce Ramani et Chaturvedi (2000). Tito vědci zkoumali citlivost kvasinky *Candida albicans* na antimykotika. V rámci studie testovali účinnost antimykotik amfotericinu B a flukonazolu prostřednictvím průtokové cytometrie inkubované buňky v několika variantách: všechny živé, všechny mrtvé a smíchané 1:1 živé s mrtvými buňkami. Výsledky korelovaly s poměry živých/mrtvých buněk v testovaných variantách. V jiné práci Vittal et al. (2012) srovnávali spolehlivost propidium jodidu použitého současně s fluorescenčním značením CFDA (combined carboxy fluorescein diacetate) při testování životnosti urediospor *Phakopsora pachyrhizi*. Testovali životnost v přítomnosti PI i CFDA současně a zvlášť. Nebyl nalezen výrazný rozdíl mezi výsledky při použití obou značení zároveň a zvlášť.



Obr. 8: Fluorescenční excitační a emisní spektrum propidium jodidu (Anonymus, 2006).

1.4. Využití metody Biolog pro biochemické schopnosti hub

Metodu Biolog představím jen ve stručnosti, neboť se jí podrobně věnovala ve své diplomové práci Tereza Veselská (2013), z jejíž práce v metodách postupu a vyhodnocování vycházím.

Metoda Biolog umožňuje zjistit schopnost asimilace různých substrátů u mikroorganismů. V mikrotitračních destičkách jsou již jednotlivé substráty připraveny od výrobce. Destičky mají zpravidla 96 jamek. V práci jsem použila destičky s označením FF, PM3B, PM4A a PM5. Destičky označené FF zkoumají utilizaci zdrojů uhlíku, PM3B zdrojů dusíku, PM4A zdrojů fosforu a síry a PM5 zdrojů nutričních doplňků.

2. Cíle práce

1) Vytipovat vlastnosti zodpovědné za unikátní ekologii houby *Pseudogymnoascus destructans* pomocí porovnání její fyziologie s ekologicky příbuznými i nepříbuznými patogenními a nepatogenními druhy. Tato část zahrnuje studium tolerance ke stresu (teplota, světlo) a poznání spektra utilizovaných živin.

2) Odhadnout potenciál *P. destructans* pro šíření mimo jeskyně. Tato část zahrnuje detailnější testy odolnosti *P. destructans* vůči stresu.

3) Vyvinout selektivní izolační médium pro *P. destructans*.

3. Metodika

Seznam izolátů hub použitých v diplomové práci (tab. 1). Všechny izoláty jsou uloženy ve Sbírce kultur hub (CCF) na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty UK.

Tabulka 1: Seznam izolátů hub použitých v diplomové práci.

izolát houby	rok odběru	místo izolace, typ substrátu
<i>P. destructans</i> CCF 3937	2010	štola Malá Amerika ČR, čenich <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 3938	2010	Solenice ČR, čenich <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 3939	2010	Solenice ČR, čenich <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 3941	2010	štola Malá Amerika ČR, čenich <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 3942	2010	štola Malá Amerika ČR, křídlo <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 3943	2010	štola ve Stříbře ČR, <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 3944	2010	Nový Knín ČR, čenich <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 4103	2011	štoly Herlíkovice, Krkonoše ČR, čenich <i>Pleurotus auritus</i>
<i>P. destructans</i> CCF 4124	2011	Horní Albeřice, Krkonoše ČR, <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 4126	2011	Sněžné v Orlických horách ČR, <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 4128	2011	Herlíkovice, Krkonoše ČR, <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 4129	2011	Pístov - sklep ČR, čenich a předloktí <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 4131	2011	Vyškov, štola Věra ČR, čenich a předloktí <i>Myotis myotis</i>
<i>P. destructans</i> CCF 4132	2011	Pernink, Červená štola ČR, <i>Myotis myotis</i>
<i>Arthroderma</i> sp. AK 27/09	2012	štola Malá Amerika ČR, trus netopýra
<i>Trichophyton terrestre</i> AK 44/09	2012	štola Alkazar ČR, exkrement s částmi brouků
<i>Pochonia suchlasporia</i> K59/11	2012	štola Velká Amerika ČR, sediment
neurčený <i>Leotiales</i> AK 88/11	2012	štola Velká Amerika ČR, sediment
neurčený <i>Leotiales</i> AK 91/11	2012	studna Karlštejn ČR, sediment
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. AK 87/11	2012	Koněpruské jeskyně ČR, sediment
<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> AK 51/11	2012	Herlíkovice, Krkonoše ČR, <i>Eptesicus nilssonii</i>
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. AK 71/11	2012	štola Velká Amerika ČR, sediment
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. Ak 77/11	2012	štola Velká Amerika ČR, sediment
<i>Oidiodendron cerealis</i> CCF 3941	2005	Bedřichov ČR, stěna tunelu s vodním potrubím
<i>Aspergillus spelunceus</i> CCF 4085	2010	štola Malá Amerika ČR, ucho <i>Myotis myotis</i>
<i>Aspergillus flavus</i> CCF 3154	1999	Brno ČR, černý pepř
<i>Aspergillus acidus</i> CCF 3984	2010	Praha ČR, čajový sáček (Yerba maté)
<i>Microsporium canis</i> CCF 3443	2003	Ostrava ČR, klinický substrát
<i>Microsporium gypseum</i> CCF 3100	1998	Šumperk ČR, pokožka na prstu ženy
<i>Trichophyton ajelloi</i> CCF 2907	1994	Horní Počaply ČR, půda s průmyslovým popelem
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CCF 3954	2009	Pardubice ČR, nehet na prstu u nohy

3.1. Studium fyziologických a biochemických vlastností *Pseudogymnoascus destructans* s cílem vytvoření selektivního média

3.1.1. Testování růstových schopností *Pseudogymnoascus destructans* na 8 různých médiích

Cílem pokusu bylo porovnat růstové schopnosti *P. destructans* na agarových médiích odlišného složení a následně vybrat optimální médium pro další pokusy.

Pokus byl prováděn se sedmi izoláty *P. destructans*: CCF 3937, CCF 3938, CCF 3939, CCF 3941, CCF 3942, CCF 3943, CCF 3944.

Pro kultivaci bylo použito osm médií: SEA, SEGA, SDAC, SDA, GKCH, GK, PCA a CZ (složení viz v tab. 2), která jsou běžně používána v mykologii a která se liší obsahem živin. Média byla sterilizována při 121 °C po dobu 15 min (stejně tak ostatní média použitá v práci). Po sterilizaci byla média nalita na Petriho misky o průměru 90 mm.

Každý izolát byl třibodově naočkován na 3 Petriho misky o průměru 90 mm s příslušným médiem. K dispozici tak bylo vždy devět hodnot pro každou variantu měření. Měření probíhalo čtyři týdny, průměry kolonií byly měřeny 1x týdně. Kultivace probíhala při 10 °C.

Tabulka 2: Složení médií.

název média	složení
SEA - agar s půdním extraktem (Gams, 1970)	půdní extrakt 1000 ml
	agar 20 g
SEGA - agar s půdním extraktem a s bengálskou červení (Fassatiová, 1986)	glukóza 10 g
	NaNO ₃ 1 g
	K ₂ HPO ₄ 1 g
	agar 20 g
	bengálská červen 0,07 g
SDA - Sabouraudův agar (Samson et al., 2004)	půdní extrakt 1000 ml
	glukóza 40 g
	pepton 10 g
	agar 15 g
SDAC - Sabouraudův agar s cykloheximidem (Harrington, 1981; Samson et al., 2004)	destilovaná voda 1000 ml
	stejně přísady jako v SDA cycloheximid 0,1 g

GK - glukózový agar s kvasničným extraktem	kvasničný extrakt 5 g
	glukóza 20 g
	agar 15 g
	destilovaná voda 1000 ml
GKCH - glukózový agar s kvasničným extraktem a chloramfenikolem (Malíř et al., 2003)	stejně přísady jako v GK
	chloramfenikol 0,1 g
PCA - bramborovo-mrkvový agar (Fassatiová et al., 1986)	brambory 20 g
	mrkev 20 g
	agar 20 g
	destilovaná voda 1000 ml
CZ - Czapkův agar (Samson et al., 2004)	K ₂ HPO ₄ 1 g
	CZ koncentrát 10 ml (tab. 3)
	Cu-Zn koncentrát 1 ml (tab. 3)
	kvasničný extrakt 5 g
	sacharóza 30 g
	agar 15 g
destilovaná voda 1000 ml	

Tabulka 3: Složení CZ koncentrátu a Cu-Zn koncentrátu použitého do Czapkova média.

Přísada do CZ média	Složení
CZ koncentrát	NaNO ₃ 30 g
	KCl 5 g
	MgSO ₄ 5 g
	FeSO ₄ 0,1 g
	destilovaná voda 1000 ml
Cu-Zn koncentrát	ZnSO ₄ 1 g
	CuSO ₄ 0,5 g
	destilovaná voda 1000 ml

Tabulka 4: pH agarových médií před nalitím na Petriho misky.

agarové médium	pH
SEA	6,4
SEGA	6,4
SDAC	5,8
SDA	5,8
GKCH	6,1
GK	6,1
PCA	6,4
CZ	5,8

3.1.2. Testování optimální teploty pro růst *Pseudogymnoascus destructans*

Cílem dílčího pokusu bylo zjistit, v jaké teplotě roste *P. destructans* nejrychleji, tj. jaká teplota bude zvolena pro další pokusy vedoucí k vývoji selektivního média.

Pokus probíhal celkem s 10 kmeny *P. destructans*: CCF 3938, CCF 3941, CCF 3943, CCF 4103, CCF 4124, CCF 4126, CCF 4128, CCF 4129, CCF 4131 a CCF 4132.

Pro kultivaci byla zvolena tato média: CZ (Czapek médium), SDA (Sabouraudovo médium) a GK (glukózové médium s kvasničným extraktem). Složení médií je uvedeno v kapitole 3.1.1. Kultivační médium bylo po sterilizaci nalito do Petriho misek o průměru 90 mm, kam se houba naočkovala tříbodově (celkem 9 opakování na 3 Petriho miskách).

Kultivace trvala čtyři týdny, průměr kolonií byl odečítán 1x týdně. Pro pokus bylo zvoleno pět teplot, a to 4 °C, 7 °C, 10 °C, 13 °C, 16 °C.

3.1.3. Testování citlivosti *Pseudogymnoascus destructans* k antimykotikům

Pro stanovení citlivosti *P. destructans* na antimykotika byla použita antimykotika od firmy ITEST plus s.r.o. Testováno bylo 13 druhů antimykotik o definované koncentraci účinné látky (tab. 5). Antimykotikem jsou napuštěny papírové kulaté disky o průměru 5 mm, které se aplikují na povrch agarového média pokrytého suspenzí testované houby.

Tabulka 5: Antimykotika v sadě ITEST.

antimykotikum	typ	koncentrace účinné látky (obsah látky v disku)	minimální velikost inhibiční zóny značící citlivost
Nystatin	polyenové	50 µg	> 15 mm
Amfotericin B	polyenové	50 µg	> 10 mm
Pimaricin	polyenové	50 µg	> 10 mm
klotrimazol	azolové	30 µg	> 20 mm
Mikonazol	azolové	30 µg	> 20 mm
Ekonazol	azolové	30 µg	> 20 mm
Bifonazol	azolové	30 µg	> 10 mm
ketokonazol	azolové	30 µg	> 20 mm
Itrakonazol	azolové	30 µg	> 10 mm
Flukonazol	azolové	25 µg	> 10 mm
vorikonazol	azolové	1 µg	> 17 mm
5-fluorocytosin	-	5 µg	> 20 mm
ciklopiroxolamin	-	30 µg	> 10 mm

Příprava suspenze spor: spory *P. destructans* byly z kolonií narostlých na glukózo-kvasničném médiu (složení kapitola 3.1.1.) odebrány sterilními vatovými tamponky do

zkumavky se sterilní vodou. Hustota vzorku byla měřena na spektrofotometru. Na SDA médium (složení kapitola 3.1.1.) bylo vyseto 60 μ l suspenze spor o hustotě transmitance 75 %, poté byla suspenze rozetřena sterilní hokejkou.

Do jedné Petriho misky byly nakladeny 4 - 3 disky s různými antimykotiky (vždy 1 disk od 1 typu antimykotika). Byly připraveny 2 varianty. Do 1. varianty byly kladeny disky hned po inokulaci suspenze se spory (varianta A), do 2. varianty (varianta B) druhý den po inokulaci.

Inhibiční zóny byly odečítány 4 dny po inokulaci pod binolokulární lupou a 5 dnů po inokulaci pro kontrolu (protože *Pseudogymnosascus destructans* klíčí velmi pomalu a pouhým okem by nebyly inhibiční zóny zřetelné). Výsledky jsou vyjádřeny průměry inhibičních zón v milimetrech.

3.1.4. Médium pro další kultivační pokusy

V kapitole 3.1.1. jsem uvedla, že pro další kultivační pokusy bylo vybráno médium GK (glukózo-*kv*asničné). Médium bylo využíváno jako kontrola ke srovnávání s médii vyvíjejícími jako selektivní. Dále bylo použito jako základ pro dílčí pokusy s testováním různého pH a k toleranci antimykotik v médiu. Složení média je uvedeno v kapitole 3.1.1.

3.1.5. Testování citlivosti *Pseudogymnoascus destructans* k antibiotikům v médiu

Pro testování citlivosti *P. destructans* byly použity tři kmeny: CCF 3838, CCF 3941 a CCF 4132. Výchozí médium pro testování bylo GK (glukózo-*kv*asničný agar).

Testovanými antibiotiky (včetně antifungálních) byly dodine, CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), bengálská červeň a 5-fluorocytosin (testované koncentrace viz v tab. 6).

Bengálská červeň byla do média přidávána před sterilizací média. Ostatní antibiotika (do jednotlivých Erlenmeyerových baněk s médiem) byla přidána až po sterilizaci média. Antibiotika o příslušných koncentracích byla nejprve zředěna v 5 ml sterilní vody, vzniklý roztok byl přefiltrován (kvůli sterilitě) a přidán do média.

Média byla rozlita do Petriho misek o průměru 60 mm, do každé misky byla houba inokulována 1 vpichem. Každá varianta měla šest opakování (šest Petriho misek). Kultury byly kultivovány v 10 °C.

Průměr kolonií byl měřen po dobu jednoho měsíce 1 x týdně, proběhla tedy čtyři měření.

Tabulka 6: Použité koncentrace jednotlivých antimykotik v médiu.

antimykotikum/antibiotikum	koncentrace (g/l média)						
Dodine	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	-	-
CTAB	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	-	-
bengálská červeň	0,03	0,05	0,07	0,1	0,13	0,16	-
5-fluorocytosin	0,06	0,1	0,2	0,33	0,5	0,66	1

3.1.6. Testování růstu *Pseudogymnoascus destructans* na médiu s různými hodnotami pH

Růstové schopnosti houby *P. destructans* při různých hodnotách pH byly testovány na třech izolátech: CCF 3938, CCF 3941 a CCF 4132, a to na základním glukózo- kvasničném médiu.

Testované stupně pH v médiu byly 2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5; 8,5; 9,5; 10,5 a 11,5. Hodnoty pH byly dosaženy použitím 20% roztoku NaOH nebo 10% roztoku HCl (po sterilizaci média). Dané hodnoty pH byly upravovány pomocí pH papírků s odpovídajícím rozmezím pH 0,5-5,5; 4-7; 5,5-9 a 9-13.

Pro testování byly použity Petriho misky o průměru 60 mm. Na jednu misku byla houba inokulována jedním vpichem. Každá varianta měla 6 opakování. Kultivace probíhala v 10 °C.

3.1.7. Testování růstu *Pseudogymnoascus destructans* na médiích s různým poměrem C a N

Na základě analýzy výsledků růstu *P. destructans* na různých zdrojích uhlíku a dusíku prostřednictvím destiček Biolog byla jako zdroj uhlíku vybrána glukóza (nejlepší růst a cenová dostupnost) a jako zdroj dusíku močovina. Glukóza (zdroj C) a močovina a případně kvasničný extrakt (zdroj N) byly do média přidány v definovaném poměru C:N. Testování probíhalo se třemi kmeny *P. destructans*: CCF 3938, CCF 3941 a CCF 4132. Na každou variantu bylo šest opakování, průměr kolonií se měřil po dobu jednoho měsíce 1x týdně.

Pro srovnání jsem si nejprve vypočítala poměr C:N v Czapkově médiu a v glukózo- kvasničném médiu dle práce Gao et Liu (2009).

Czapek médium (CZ):sacharóza (C₁₂H₂₂O₁₁).....30 gNaNO₃.....3 gM (NaNO₃) = Ar (Na) + Ar (N) + 3 * Ar (O)M (NaNO₃) = 22,959770 + 14,0067 + 3 * 15,9994 g/molM (NaNO₃) = 84,96471 g/molvýpočet obsahu dusíku v NaNO₃:

3 g.....84,96471 g/mol

x.....14,00674 g/mol

$$x = 3 * 14,00674 / 84,96471 \text{ g} = \mathbf{0,5 \text{ g}}$$

M (C₁₂H₂₂O₁₁) = 342,296 g/mol

M (C v sacharóze) = 12 * C = 12 * 12,0107 = 144,1284 g/mol

výpočet obsahu uhlíku v sacharóze:

30 g.....342,296 g/mol

x.....144,1284 g/mol

$$x = 30 * 144,1284 / 342,296 \text{ g} = \mathbf{12,63 \text{ g}}$$

poměr C:N:

$$12,63 : 0,5 = \mathbf{25:1}$$

Glukózo-kvasničné médium (GK):glukóza (C₆H₁₂O₆).....20 g

kvasničný extrakt.....5 g

celkový obsah dusíku v kvasničném extraktu (Difco; Zimrio et al., 2009)
přibližně 10,9 %

5 g.....100 %

x.....11,25 %

$$x = 5 * 11,25 / 100 \text{ g} = 0,5625 \text{ g (celkový obsah dusíku v 5 g kvas. extraktu)}$$

M (C₆H₁₂O₆) = 180,155 g/mol

M (C v glukóze) = 6 * C = 6 * 12,0107 g/mol = 72,0642 g/mol

výpočet obsahu uhlíku v glukóze:

20 g.....180,155 g/mol

x.....72,0642 g/mol

$$20 * 72,0642 / 180,155 \text{ g} = 8 \text{ g}$$

poměr C:N:

$$8 : 0,5 = \mathbf{16:1}$$

Stejným způsobem jsem vypočítala poměr uhlíku a dusíku v dalších použitých testovacích médiích. Do média byly dále přidány následující přísady: 10 ml Czapek koncentrátu (složení: KCl 5 g, MgSO₄ 5 g, FeSO₄ 0,1 g, 100 ml destilované sterilní vody), 1 ml Cu-Zn koncentrátu (složení: ZnSO₄ 1 g, CuSO₄ 0,5 g, 100 ml sterilní destilované vody), 15 g agaru a 1000 ml destilované vody. Testované poměry uhlíku ku dusíku jsou v tab. 7. Dle manuálu Difco (Zimbrao et al., 2009) jsem získala informaci, že kvasničný extrakt obsahuje přibližně 10,9 % dusíku.

Pro testování byly použity izoláty *P. destructans*: CCF 3938, CCF 3941 a CCF 4132. Kultury byly kultivovány při 10 °C. Velikost kolonií byla odečítána 1x týdně po dobu jednoho měsíce.

Tabulka 7: Přehled poměru C:N množství močoviny a glukózy použitých v jednotlivých variantách médií.

Médium	poměr C:N	zdroj C	C (g/l)	množství glukózy (g/l)	zdroj N	množství zdroje N(g/l)	podíl N z kv.e.
1	20:1	glukóza	10	25	močovina	1,07	-
2	20:1	glukóza	10	25	močovina, kvasničný extrakt	0,7; 1,56	1/3 N z kvas.extraktu
3	20:1	glukóza	10	25	močovina, kvasničný extrakt	1,1; 0,5	1/5 N z kvas.extraktu
4	20:1	glukóza	4	10	močovina	0,43	-
5	20:1	glukóza	6	15	močovina	0,64	-
6	10:1	glukóza	4	10	močovina, kvasničný extrakt	0,57; 1,22	1/3 N z kvas.extraktu
7	10:1	glukóza	6	15	močovina, kvasničný extrakt	0,86; 1,8	1/3 N z kvas.extraktu
8	5:1	glukóza	4	10	močovina, kvasničný extrakt	1,14; 2,45	1/3 N z kvas.extraktu
9	5:1	glukóza	6	15	močovina, kvasničný extrakt	1,72; 3,67	1/3 N z kvas.extraktu

3.1.8. Testování selektivního média

Výsledné selektivní médium bylo vyvinuto na základě předchozích zjištěných růstových vlastností v dílčích pokusech (složení média v tab. 8). Pro testování bylo použito pět izolátů *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132, CCF 4103 a CCF 4131) a šest opakování na každou variantu. Kultivace probíhala čtyři týdny v 10 °C. Velikost kolonií byla zjišťována 1x týdně po dobu jednoho měsíce.

Tabulka 8: Složení selektivního média.

Složení	množství
Glukóza	15 g
Močovina	0,64 g
Czapek koncentrát *	10 ml
roztok stopových prvků (Cu-Zn) *	1 ml
Agar	15 g
destilovaná voda	1000 ml
Chloramfenikol	0,1 g
bengálská červeň	0,05 g
5-fluorocytosin (5-FC)	0,1 g
pH	8,5

* Czapek roztok: KCl 5 g, MgSO₄ 5 g, FeSO₄ 0,1 g, destilovaná voda 100 ml

* Cu-Zn roztok: ZnSO₄ 1 g, CuSO₄ 0,5 g, destilovaná voda 100 ml

3.1.9. Testování tolerance *Pseudogymnoascus destructans* k obsahu NaCl v selektivním médiu

Tolerance *P. destructans* k obsahu NaCl v médiu byla testována v selektivním médiu o složení uvedeném v kapitole 3.1.8. V rámci tohoto pokusu byly přidány do jednotlivých variant selektivního média určité koncentrace NaCl uvedené v tab. 9. Cílem pokusu bylo zjistit, zda je *P. destructans* tolerantní k vyšším koncentracím NaCl v médiu. Bylo testováno pět kmenů *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132, CCF 4103, CCF 4131).

Každá varianta měla šest opakování, inokulace 1-bodová, měření 1x týdně po dobu jednoho měsíce. Kultivace v 10 °C.

Tabulka 9: Použité koncentrace NaCl v selektivním médiu.

médium číslo	obsah NaCl v g/l
1	6
2	12
3	20
4	28
5	35
6	0

3.1.10. Testování tolerance k 2,6-dichloro-4-nitroanilinu

V selektivním médiu byla také testována tolerance *Pseudogymnoascus destructans* k 2,6-dichloro-4-nitroanilinu o dvou koncentracích 0,001 g/l a 0,002 g/l (používaný také k omezení růstu nežádoucích kmenů hub (Henson, 1981; Andrews et Pitt, 1986)). Pokus byl prováděn s třemi kmeny, CCF 3938, CCF 3941 a CCF 4132.

Na každou variantu bylo šest opakování, kultivace probíhala při 10 °C. Inokulace houby byla 1-bodová. Průměry kolonií se měřily 1x týdně po dobu jednoho měsíce.

3.1.11. Testování selektivního média - klíčení *Pseudogymnoascus destructans*

Selektivní médium bylo vyvíjeno na základě měření velikosti kolonií *P. destructans*. Vzhledem k tomu, že bylo potřeba otestovat médium klíčením spor z jeskynního sedimentu, musel být napřed proveden pokus na schopnost klíčení spor *P. destructans*. Médium bylo testováno s 1 kmenem CCF 3938.

Jako srovnávací kontrolní médium k selektivnímu bylo použito glukózo-kvasničné médium (GK, složení kapitola 3.1.1.). Pro inokulaci byla použita suspenze spor. Jejich množství bylo předem zjištěno v Bürkerově počítací komůrce. Na agarovou plotnu s médiem bylo vyséváno 20 µl suspenze se spory. Na každou variantu byla tři opakování kultivovaná v 10 °C. Odečet počtu vyklíčených spor probíhal po 15 dnech.

3.1.12. Zkouška různých variant médií

Předchozí pokus ukázal neschopnost klíčení *Pseudogymnoascus destructans* na selektivním médiu, což vedlo k pokusu vyzkoušet různé varianty média lišící se vybranými složkami (viz níže).

K pokusu byly využity tři kmeny, jejichž počet spor byl spočítán v Bürkerově počítací komůrce. Na agarové plotny bylo napipetováno 20 µl suspenze se spory, poté byla suspenze rozetřena sterilní hokejkou. Kultivace probíhala v 10 °C. Vyklíčené spory byly odečítány po 16 dnech.

Kromě 1. modifikace média (tři opakování) byla pro každou variantu použita dvě opakování.

Základní složení médií

Selektivní médium (SM):

- glukóza	15 g	Cz koncentrát - KCl 5 g, MgSO ₄ 5 g, FeSO ₄ 0,1 g, voda 100 ml
- močovina	0,64 g	roztok stop.prvků - ZnSO ₄ 1 g, CuSO ₄ 0,5 g, voda 100 ml
- CZ konc.	10 ml	
- roztok stop.prvků (Cu-Zn)	1 ml	
- agar	15 g	
- chloramfenikol	0,1 g/l	
- destilovaná voda	1000 ml	

- bengálská červeň, 5 - FC - **po klávkování přidáno**

Glukózo-kvasničné médium (GK):

- kvasničný extrakt	5 g
- glukóza	20 g
- agar	15 g
- destilovaná voda	1000 ml

Modifikace médií:

- 1 - SM, médium s močovinou (po kláv. přidána), pH 5,8
- 2 - SM, médium s močovinou (po kláv. přidána), pH 8,5
- 3 - GK (bez chloramfenikolu), pH 5,8
- 4 - GK (s chloramfenikolem), pH 5,8
- 5 - GK (s chloramfenikolem), pH 8,5
- 6 - SM, médium s močovinou (po kláv. přidána), pH 8,5, RB - 0,05 g/l, 5-FC - 0,1 g/l
- 7 - SM, médium s močovinou (po kláv. přidána), pH 8,5, 5-FC - 0,1 g/l
- 8 - GK (s chloramfenikolem), pH 8,5, RB - 0,05 g/l
- 9- GK (s chloramfenikolem), pH 8,5, RB - 0,05 g/l, 5-FC - 0,1 g/l
- 10 - GK (s chloramfenikolem), pH 8,5, 5-FC - 0,1 g/l
- 11 - SM, močovina (klávkována), pH 8,5, RB - 0,05 g/l, 5-FC - 0,1 g/l

3.1.13. Pokus sledující klíčení *Pseudogymnoascus destructans* spolu se sporami hub ze sedimentu

Účinnost dvou izolačních médií (SM a GK15) sestavených v předešlých experimentech, byla testována současnou inokulací spor *P. destructans* a tří vzorků sedimentů ze štol. Cílem bylo zjistit, zda spory *P. destructans* vyklíčí v prostředí konkurence spor jiných hub.

Byly použity tři vzorky sedimentů ze štol: sediment 1: N54/2013 - Malá Amerika, sediment 2: N8/2013 - Velká Amerika a sediment 3: N132/2013 - Starý Jeroným. Sediment byl před použitím zmrazen v $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 24 h. Všechny sedimenty byly poté rozmrazeny v pokojové teplotě. Dále byly 4 g sedimentu rozptýleny v 10 ml sterilní destilované vody. Připravená suspenze byla dále zředěna 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} a 10^{-4} .

Souběžně se sedimentem byly připravovány suspenze se sporami *P. destructans*. Počet spor byl odečten v Bürkerově počítací komůrce. Na agarovou plotnu bylo napipetováno 20 μl suspenze, která byla rozetřena sterilní hokejkou. Na klíčení byly testovány tři izoláty *P. destructans*, ve 20 μl bylo u kmenu CCF 3938 přibližně 105 spor, u kmenu CCF 3941 přibližně 125 spor a u kmenu CCF 4132 přibližně 114 spor.

Na agarové plotny (se 3 médii - selektivní, GK15 a kontrolní GKCH) byly vysety jen jednotlivé suspenze sedimentů (každý zvlášť), jen vzorky *P. destructans* a vzorky sedimentu spolu s kmenem *P. destructans* CCF 3938. Od každého ředění sedimentu bylo na agarovou plotnu vyséváno 150 μl . Od varianty zředění sedimentu 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} byly připraveny tři opakování, od varianty 10^{-4} dvě opakování. Kultivace probíhala v $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Počty kolonií pocházející ze vzorků sedimentu a *P. destructans* byly odečítány po 14 dnech.

3.1.14. Kontrolní testování životaschopnosti spor *Pseudogymnoascus destructans* po zmrazení na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Vzhledem k tomu, že v předchozím pokusu byl sediment před použitím zmrazen v $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, bylo nutné totéž vyzkoušet se sporami *P. destructans* a ověřit, zda jsou schopné tuto teplotu přežít.

Byla použita tři média: selektivní, GK15 a kontrolní GKCH (složení v kapitolách 3.1.1.) a tři izoláty *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941 a CCF 4132). Hodnoceno bylo procento vyklíčených spor (po 14 dnech) i velikost kolonií (po jednom měsíci). Petriho misky s narostlými koloniemi *P. destructans* byly zmrazeny při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h. a poté

rozmrazeny v pokojové teplotě. Byla připravena také 2. varianta s narostlými koloniemi, které byly uchovávány stále v 10 °C.

Pro každou variantu byla připravena tři opakování. Kultivace v 10 °C.

3.2. Testování životaschopnosti po působení různých forem nepříznivých podmínek

3.2.1. Testování FUN-1 s pufrům 1x PBS

Cílem pokusu bylo sledovat, jak budou reagovat spory *P. destructans* na obarvení fluorescenčním barvivem FUN-1 (Molecular Probes), které značí mrtvé spory zelenou fluorescencí v cytoplazmě a živé spory červenou fluorescencí v intravakuolárních strukturách (CIVS).

K testování byl použit jeden kmen *P. destructans* CCF 3944. Do flakonku s pufrům 1x PBS (8 g of NaCl, 0,2 g of KCl, 1,44 g of Na₂HPO₄, 0,24 g of KH₂PO₄ v 1000 ml H₂O, pH 7,4 doplněné o 2% glukózu; Barker, 1998) byly setřeny spory z kultury sterilní bakteriologickou kličkou. V Bürkerově komůrce byla odměřena hustota spor, která odpovídala 4,5 x 10⁶ spor na 1 ml.

Ke sporám setřeným přímo z kultury byla ještě připravena varianta s mrtvými sporami, které byly inkubovány v 70% ethanolu po dobu 30 min v -70 °C. Spory byly poté promyty 0,1% detergentem Triton. Po odstranění detergentu byl ke sporám přidán 1 ml pufru 1x PBS a odpovídající množství FUN-1. Inkubace spor v přítomnosti fluorescenční barvy FUN-1 trvala 1 h.

Testované vzorky:

- 1 - mrtvé spory, 5 μM FUN-1
- 2 - živé spory, 5μM FUN-1
- 3 - mrtvé spory, 10 μM FUN-1
- 4 - živé spory, 10 μM FUN-1
- 5 - mrtvé spory, 15 μM FUN-1
- 6 - živé spory, 15 μM FUN-1

3.2.2. Testování FUN-1 s pufrům Na-HEPES

Cílem pokusu bylo sledovat, jak budou reagovat spory *P. destructans* na obarvení fluorescenčním barvivem FUN-1 v pufru Na-HEPES s 2 % glukózy.

K testování byl použit 1 kmen *P. destructans* CCF 3943. Vzhledem k tomu, že *P. destructans* je pomalu rostoucí houba, předpokládá se, že bude mít pravděpodobně pomalejší metabolismus. Pro zrychlení metabolismu byly spory nejprve třepány v tekutém médiu. Třepání probíhalo v erlenkách s 25 ml glukózo-*kv*asničného média (GK, složení kapitola 3.1.1., bez agaru) po dobu pěti dnů v 10 °C při 250 rpm. Po skončení třepání byly odebrány 2 ml vzorků do jednotlivých ependorfek, které byly centrifugovány při 14000 g 5 min, poté bylo odpipetováno kultivační médium a buňky promyty v pufru Prosser nebo Na-HEPES.

Připravena byla rovněž varianta s mrtvými sporami, které se připravily inkubací v 70% ethanolu po dobu 30 min. v -70 °C. Spory byly promyty od ethanolu stejně jako "živá" varianta.

Do každé varianty vzorku byl přidán 1 ml pufru Pfosser nebo Na-HEPES a FUN-1 (koncentrace ve vzorku 15 μM). Vzorky byly inkubovány v temnu 1 h. v 10 °C nebo ve 25 °C.

Výsledky barvení FUN-1 byly hodnoceny prostřednictvím konfokálního mikroskopu a zaznamenány na fotografiích.

Testované vzorky (Ž - "živé", M - "mrtvé"):

- 1 - Na-HEPES 25 °C Ž
- 2 - Na - HEPES 25 °C M
- 3 - Pfosser 25 °C M
- 4 - Pfosser 25 °C Ž
- 5 - NA-HEPES 10 °C Ž
- 6 - NA-HEPES 10 °C M
- 7 - Pfosser 10 °C Ž
- 8 - Pfosser 10 °C M

3.2.3. Testování FUN-1 a délky inkubace spor

V předchozím pokusu se osvědčil pufr Na-HEPES s 2 % glukózy, avšak výsledek nebyl stále uspokojivý. Přikročilo se tedy k testování délky inkubace spor s fluorescenční barvou FUN-1.

Spory byly třepány 3 dny (byly již naklíčené) za stejných podmínek jako v kapitole 3.2.2. Po skončení třepání byly odebrány 2 ml vzorků do jednotlivých ependorfeček, které byly centrifugovány při 14000 g 5 min, poté bylo odpipetováno kultivační médium a buňky promyty v pufru Na-HEPES.

Připravila se opět varianta s mrtvými sporami připravené stejným způsobem jako v kapitole 3.2.1.

Ke vzorkům byl přidán 1 ml pufru Na-HEPES a FUN-1 (koncentrace ve vzorku 15 μ M). Jednotlivé vzorky se lišily délkou inkubace s FUN-1 v 25 °C. Vzorky byly poté zkoumány na konfokálním mikroskopu.

Testované vzorky (M - "mrtvé", Ž - "živé"):

1M - inkubace s FUN-1 24 h

1Ž - inkubace s FUN-1 24 h

2M - inkubace s FUN-1 5 h

2Ž - inkubace s FUN-1 5 h

3M - inkubace s FUN-1 3 h

3Ž - inkubace s FUN-1 3 h

4M - inkubace s FUN-1 1,5 h

4Ž - inkubace s FUN-1 1,5 h

3.2.4. Testování FUN-1 spolu s Hoechst 33258

Do erlenmeyerovy baňky s tekutým glukózo-*kv*asničným médiem (na 1000 ml destilované vody 20 g glukózy, 5 g *kv*asničného extraktu a 0,1 g streptomycinu) bylo dáno definované množství spor. Spory se třepaly dva dny v 10 °C při 250 rpm. Byly připraveny také "mrtvé" vzorky stejně jako v kap. 3.2.1. Pro srovnání byly testovány buňky kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, na kterých se běžně životaschopnost buněk prostřednictvím FUN-1 testuje.

Z tekutého glukózo-*kv*asničného média bylo po dvou dnech třepání odebráno 0,5 ml s naklíčenými sporami *P. destructans* a *Saccharomyces cerevisiae*. Poté se vzorky centrifugovaly 5 min při 14000g (rpm) ve 20 °C, z centrifugovaných vzorků bylo odebráno médium, spory byly pak promyty v 0,5 ml pufru Na-HEPES. Pak byly vzorky opět

zcentrifugovány, z nich odebrán roztok na promytí. K buňkám pak byl dán pufr Na-HEPES, k němu byla napipetována fluorescenční barva FUN-1. Buňky se barvily 3 h.

Bylo celkem 24 variant vzorků lišících se koncentrací fluorescenční barvy FUN-1 (5 μ M, 10 μ M a 15 μ M) a teplotou, během níž probíhalo barvení buněk (5 °C, 25 °C a 30 °C).

Do každého vzorku byl také přidán Hoechst 33258 (LifeTech) s výslednou koncentrací 1 μ g/ml na vzorek, barvení 15 min. na každý vzorek ve stejné teplotě jako barvení s FUN-1.

Průtokovým cytometrem se testovala životnost prostřednictvím Hoechst 33258 pro potvrzení, zda jsou "živé". Všechny vzorky byly také zmikroskopovány a zdokumentovány (pět snímků na vzorek) na zkoušku fluorescence FUN-1 a Hoechst 33258.

Vzorky (Ž - "živé", M - "mrtvé" spory; 1.číslo - koncentrace FUN-1 v μ M, 2.číslo - teplota při barvení °C):

- 1 - M 5/30 kvasinky
- 2 - M 10/30 kvasinky
- 3 - M 15/30 kvasinky
- 4 - M 5/5 *P. destructans*
- 5 - M 10/5 *P. destructans*
- 6 - M 15/25 *P. destructans*
- 7 - M 5/25 *P. destructans*
- 8 - M 10/25 *P. destructans*
- 9 - M 15/25 *P. destructans*
- 10 - M 5/30 *P. destructans*
- 11 - M 10/30 *P. destructans*
- 12 - M 15/30 *P. destructans*
- 13 - Ž 5/30 kvasinky
- 14 - Ž 10/30 kvasinky
- 15 - Ž 15/30 kvasinky
- 16 - Ž 5/5 *P. destructans*
- 17 - Ž 10/5 *P. destructans*
- 18 - Ž 15/5 *P. destructans*
- 19 - Ž 5/25 *P. destructans*
- 20 - Ž 10/25 *P. destructans*
- 21 - Ž 15/25 *P. destructans*
- 22 - Ž 5/30 *P. destructans*

23 - Ž 10/30 *P. destructans*

24 - Ž 15/30 *P. destructans*

3.2.5. Testování propidia jodidu (PI) a Hoechst 33258

Po rozhodnutí nevyužití FUN-1 v práci se přikročilo k testování jiných fluorescenčních značení. Cílem pokusu bylo srovnat výsledky testování životaschopnosti získaných prostřednictvím Hoechst 33258 a propidia jodidu (Fluka) a na základě toho se rozhodnout, které značení bude lepší pro testování životaschopnosti spor *P. destructans*.

Spory o definovaném množství byly třepány v tekutém glukózo-kvasničném médiu v Erlenmeyerově baňce v 10 °C při 230 rpm po dobu 2 dnů.

Byly také připraveny mrtvé spory pro srovnání s živými buňkami stejným způsobem jako v předešlých experimentech.

Z Erlenmeyerovy baňky bylo odebráno 0,5 ml roztoku se sporami. Každý vzorek byl centrifugován za účelem odpipetování média, vzorky dále byly promyty pufrem 10x PBS, opět zcentrifugovány a nakonec byl přidán pufr 10x PBS (složení: 2 g KCl, 2,4 g KH₂PO₄, 80 g NaCl, 11,45 g Na₂HPO₄, 1000 ml vody, pH 7,4) a barvivo PI nebo Hoechst do vzorku, aby výsledná koncentrace byla 2 µg/ml fluorescenčního barviva na vzorek. Barvení vzorků fluorescenčními barvivy probíhalo 30 min. v pokojové teplotě.

Obdobná příprava vzorků probíhala s mrtvými sporami.

Všechny vzorky byly analyzovány v průtokovém cytometru a mikroskopovány konfokálním mikroskopem, to bylo i fotograficky zdokumentováno (pět snímků na vzorek).

Testované vzorky:

1 - živé spory, bez třepání, Hoechst 33258

2 - mrtvé spory, Hoechst 33258

3 - spory uchovány v 37 °C po dobu 24 h, Hoechst 33258

4 - spory uchovány v 37 °C po dobu 24 h, pak třepané spory při 10 °C 2 dny, Hoechst 33258

5 - spory uchovány v 37 °C po dobu 24 h, pak třepané spory při 10 °C 2 dny v přítomnosti streptomycinu, Hoechst 33258

6 - živé spory, třepané spory při 10 °C 2 dny v přítomnosti streptomycinu, Hoechst 33258

7 - živé spory, třepané spory při 10 °C 2 dny, Hoechst 33258

8 - živé spory, bez třepání, PI

9 - mrtvé spory, PI

- 10 - spory uchovány v 37 °C po dobu 24 h, PI
- 11 - spory uchovány v 37 °C po dobu 24 h, pak třepané spory při 10 °C 2 dny, PI
- 12 - spory uchovány v 37 °C po dobu 24 h, pak třepané spory při 10 °C 2 dny v přítomnosti streptomycinu, PI
- 13 - živé spory, třepané spory při 10 °C 2 dny v přítomnosti streptomycinu, PI
- 14 - živé spory, třepané spory při 10 °C 2 dny, PI

3.2.6. Testování spolehlivosti PI

Cílem pokusu bylo vyzkoušet spolehlivost PI, který byl v předchozím experimentu vybrán pro další pokusy sledující životaschopnost spor *P. destructans*.

Ověření spolehlivosti PI bylo testováno směsnými vzorky "živých" a "mrtvých" spor. "Živé" spory byly setřeny sterilním vatovým tamponem z 1 měsíc staré kultury přímo do pufru 10x PBS, jejich výsledná koncentrace $9 \cdot 10^6$ buněk/ml byla napočítána v Burkerově počítací komůrce. "Mrtvé" spory byly připraveny uchováním v 70% ethanolu v -70 °C po dobu 30 min (po inkubaci zcentrifugovány a promyty v pufru 10x PBS). Výsledná koncentrace "mrtvých" spor byla také spočítána v Bürkerově komůrce, aby se co nejvíce přibližovala koncentraci "živého" vzorku.

V jednotlivých vzorcích byla výsledná koncentrace propidia jodidu 2 µg/ml.

Vzorky byly analyzovány průtokovou cytometrií.

Vzorky:

- 1 - "živé" spory
- 2 - "mrtvé" spory
- 3 - "mrtvé" ku "živé" spory v poměru 1:1
- 4 - "mrtvé" ku "živé" spory v poměru 3:1
- 5 - "mrtvé" ku "živé" spory v poměru 1:3

Souběžně byla životaschopnost spor *P. destructans* ověřována hodnocením jejich klíčivosti na glukózo-kvasničném médiu. Pro toto ověření byly připraveny stejné typy vzorků jako jsou uvedeny výše. Testovala se tři ředění původních vzorků. Na každou variantu byla tři opakování. Počet vyklíčených spor byl odečítán po 14 dnech inokulace na médium.

3.2.7. Studium životaschopnosti spor hub po působení různých forem nepříznivých podmínek

Pokusy na přežívání nepříznivých podmínek byly testovány na několika izolátech *P. destructans* a několika srovnávacích izolátech hub: *Aspergillus flavus* CCF 3154, *Aspergillus acidus* CCF 3984, 2 kmeny *Pseudogymnoascus* sp. (AK 71/11 a AK 77/11) a *Pseudogymnoascus pannorum* AK 51/11. První dva druhy představují houby, které se efektivně šíří vzduchem a najsou vázány na jeskyně. Další kmeny patří nepatogenním houbám, které žijí v půdě jeskyní.

Kultivace jednotlivých hub probíhala při optimálních podmínkách pro jejich růst. Izoláty *P. destructans* byly kultivovány na médiu glukózo-kvasničném a ostatní kmeny hub na sladinovém médiu (4°). Kmeny *P. destructans* byly umístěny do 10 °C po dobu 4 až 5 týdnů, kmeny *Pseudogymnoascus* sp. a *Pseudogymnoascus pannorum* do 10 °C po dobu 2 týdnů a kmeny *Aspergillus flavus* a *A. acidus* do 20 °C po dobu 2 týdnů.

Nakultivované kmeny hub byly vystaveny různým fyzikálním podmínkám. Od každého kmene houby se umístil do testovaných podmínek takový počet misek odpovídající počtu měření (plus jedna až dvě navíc kvůli případné kontaminaci).

Na každé měření byly odebrány sterilním vatovým tamponem spory z jedné misky do ependorfky s 1,5 ml pufru 10x PBS. Požadované množství spor bylo odměřeno v Bürkerově počítací komůrce, aby se průměrná hustota spor pohybovala od 50 do $75 \cdot 10^5$ buněk/ml. Z ependorfky byly odebrány tři vzorky, které byly testovány zvlášť jako jednotlivé vzorky na průtokovém cytometru (tedy 3 pseudo-opakování), tím by mohla být odhalena chyba měření na přístroji, např. ucpání při nasávání vzorku.

1. pokus - testování životaschopnosti spor po působení různých teplot a světla o různé vlnové délce

Měření životaschopnosti spor proběhlo ihned po založení pokusu, za dva dny působení stresu a poté každý týden do doby trvání šesti týdnů nepříznivých podmínek. Byla také založena kontrola, tj. kmeny hub uchované ve standardních (tj. optimálních) podmínkách.

Testované nepříznivé podmínky:

- uchovávání při 25 °C ve tmě
- uchovávání při 30 °C ve tmě
- uchovávání při 37 °C ve tmě
- uchovávání při 25 °C za působení UVA záření
- uchovávání při 25 °C a působení UVA a UVB záření
- uchovávání při 25 °C a působení bílého světla
- uchovávání při 25 °C v prostředí s nedostatkem vlhkosti

Pro působení UVA záření byla použita zářivka UV 11W/G23-DZ, pro UVA a UVB záření zářivka Repti Glo 10.0 (20 W, T8, s podílem 10 % UVB a 33 % UVA) a pro bílé světlo žárovka značky Philips (LUX BL, 11 W, 230 V až 240 V ~ 50/60 Hz, 2700 K).

Prostředí s nedostatkem vlhkosti bylo vytvořeno ve velkých skleněných Petriho miskách uzavřených parafilmem obsahujících silikagel k pohlcení vlhkosti. Kontrola vlhkosti byla prováděna vlhkoměrem, který nízkou vlhkost (pod 20 %) potvrdil. Spory hub byly setřeny sterilními vatovými tampony, na nichž byly spory uchovávány v Petriho miskách.

2. pokus - vliv teploty 34 °C na přežívání spor a otestování dalších izolátů na některé již zmíněné nepříznivé teplotní podmínky z 1. pokusu.

3. pokus - vliv cyklického střídání teplot 20 °C a 34 °C s délkou cyklu 12 h. po dobu 85 dní. Životaschopnost spor *P. destructans* byla testována na průtokovém cytometru 1x za 5 dní. Pokus měl napodobit teplotní podmínky, které se vyskytují na povrchu těla temperátních netopýřů v průběhu reprodukční sezóny, kdy netopýři často tráví neaktivní část dne v tzv. torporu (denní strnulosti), při kterém snižují tělesnou teplotu často až na teplotu prostředí (Dietz et Kalko, 2006).

3.2.8. Údaje k měření na cytometru

Životaschopnost spor byla hodnocena pomocí průtokového cytometru typu LSRII (Becton Dickonson, USA) s programem FACSDiva 6 Software v MBÚ, AV ČR, Krč, Praha. Při analýze vzorků propidie jodidem byl k excitaci použit PI band-pass filtr 610/20 (561nm laser) a Hoechst 33258 Hoechst Band-pass filtr 450/50 (405nm laser). Výstupní data (formát fcs - flow cytometry standard verze 3.0) z průtokového cytometru byla vyhodnocována v programu FlowJo od fy TreeStar Inc.

3.2.9. Údaje ke konfokální mikroskopii

Spory značené fluorescenčním značením byly také kontrolovány v konfokálním mikroskopu, zejména ze začátku studie životaschopnosti spor a hlavně u FUN-1 byla tímto způsobem hodnocena účinnost značení.

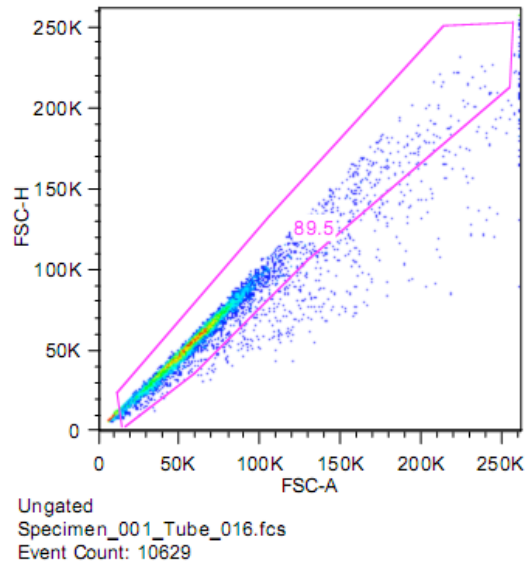
Mikroskopie probíhala na konfokálním mikroskopu Olympus FV1000 (Olympus Corporation, USA) v MBÚ, AV ČR, Krč, Praha. Ze vzorku bylo na podložní sklíčko odebráno 30 μ l vzorku, pak se překrylo krycím sklem. Buňky byly pozorovány za použití imerzního oleje (Olympus) při zvětšení 100x a dále ještě 3x. Při pozorování byly také pořízeny snímky (na každý vzorek pět, max. sedm snímků). K následné úpravě snímků z konfokální mikroskopie byl použit program FV10-ASW 2.0 Viewer, v kterém se snímky kolorizovaly a spojily fotografie z fluorescence.

Excitační vlnová délka laseru pro FUN-1 byla 473 nm o výkonu 0,7 mW, emise na detektoru pro kanál 1 od 520 nm do 550 nm a pro kanál 2 580 nm až 600 nm. Excitační vlnová délka laseru pro PI byla 559 nm o výkonu 2,2 mW, emise se snímala na detektoru od 570 nm do 670 nm. Excitační vlnová délka laseru pro Hoechst 33258 byla 473 nm o výkonu 0,7 mW, emise se snímala na detektoru od 425 nm do 475 nm.

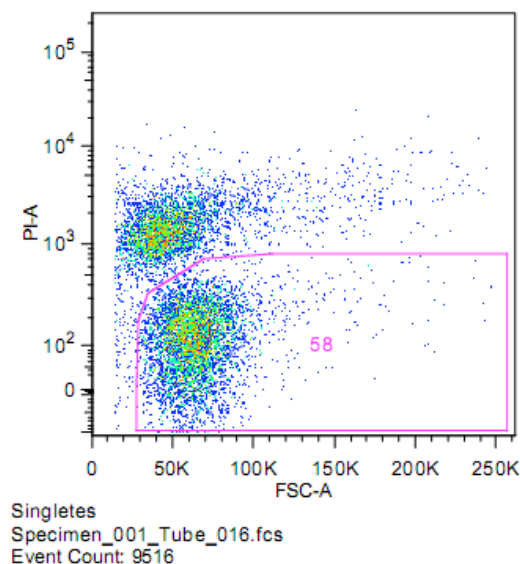
3.2.10. Metodika vyhodnocování výsledků

Prvním výstupovým grafem z průtokového cytometru je graf, který znázorňuje na ose x FSC-A (plochu signálu) a na ose y FSC-H (výšku signálu). Na základě toho je proveden *gating*, který vybere signály od zkoumaných objektů (spor) a ohraničuje skupinu spor *singlets*, které jsou dále testovány na životnost (Obr. 9). Dalším grafem, který vychází z prvního na základě *gating*, je ten, který nám znázorňuje životnost. Na ose x je FSC-A a na ose y je PI-A, což je signál generující intenzitu fluorescence od jednotlivých spor. Nad určitou hodnotu (10^3) signálu z PI-A jsou spory považovány za neživotaschopné. Tato oblast je znázorněna v grafu červenou spojnicí vytvářející ohraničené pole, uvnitř kterého je určité procento životaschopných spor. Toto pole bylo vytvořeno na základě testování kontrolního vzorku živých spor (Obr. 10).

V postupu zakládání vzorků na testování průtokovým cytometrem jsem uváděla, že jsem z 1 Petriho misky odebrala spory a rozdělila je na 3 nezávislá měření. Z těchto 3 měření na vzorek jsem udělala průměr, který jsem vynesla do grafu.



Obr. 9: Vyobrazení znázorňuje gating a singlety spor v něm.



Obr. 10: Vyobrazení znázorňuje spory z gatingu, které jsou analyzovány na životnost.

3.3. Biolog

3.3.1. Destičky FF MicroPlate™

Cílem pokusu bylo otestovat u vybraných izolátů hub schopnost utilizace zdrojů uhlíku (přehled substrátů viz příloha 8.1.).

Houby se před prací s destičkami Biolog napěstovaly na médiu při teplotě odpovídající fyziologickým požadavkům houby. Na destičkách Biolog bylo analyzováno celkem 27 kmenů

hub (tab. 13), včetně 10 izolátů *P. destructans*. Pro srovnání byly testovány izoláty z podzemních prostor a dermatofyta, aby se zjistilo, zda se *P. destructans* více blíží ekologii hub z podzemních prostor nebo dermatofyt, která jsou také schopná parazitovat na kůži obratlovců (Simpanya, 2000).

Postup:

Postup byl převzat z instrukcí výrobce (Biolog, Inc., USA). Před inokulací destiček Biolog FF byl nejprve připraven inokulační roztok Phytigel (Sigma) (složení tab. 10). Do menších lahvíček bylo napipetováno přibližně 11 ml roztoku Phytigelu. Do roztoku se přenesly spory setřené z povrchu kolonie sterilním vatovým tamponem, pak se suspenze se sporami mírně promíchala. Požadovaná hustota suspenze spor by měla dosahovat transmitance 75 % (tolerance ± 2 %). Transmitance se měřila ve spektrofotometru (Lambda 11 UV/VIS, Perkin Elmer, USA) pomocí kyvety při vlnové délce 490 nm, jako kontrola (blank) slouží roztok Phytigelu bez spor. Roztok Phytigelu se sporami hub o hustotě T přibližně 75 % se přelil do Petriho misky, dále se rozpipetoval na celou destičku, do každé jamky destičky 100 μ l roztoku. Destičky se změřily na spektrofotometru (Magellan) v čase 0, pak přibližně každý den. Přístroj odečítal hodnoty při 490 nm a 750 nm (data se zobrazí v MS Excel). Destičky se inkubovaly v určité optimální teplotě pro zkoumaný organismus (tab. 14).

Tabulka 10: Složení inokulačního roztoku Phytigel do destiček Biolog FF.

přísady	množství
destilovaná deionizovaná voda	100 ml
Tween 40	30 μ l
Phytigel	0,25 g

3.3.2. Destičky Phenotype MicroArraysTM - PM

Cílem pokusu bylo otestovat u vybraných izolátů hub schopnost utilizace zdrojů dusíku (PM3B), fosforu a síry (PM4A) a nutričních elementů (PM5) (přehled substrátů viz. příloha 8.1.).

Postup byl proveden podle instrukcí výrobce (Biolog, Inc., USA). Příprava destiček Biolog PM je v některých krocích podobná přípravě destiček Biolog FF. Nejprve se připravily inokulační roztoky Phytigel (složení tab. 10), PM a roztok glukózy (složení tab. 11, 12 a 13). Do roztoku Phytigelu se setřely spory sterilním vatovým tamponem. Požadovaná

hustota se měřila na spektrofotometru s nastavením $A = 490 \text{ nm}$, požadovaná hustota odpovídala transmitanci 62 % (tolerance $\pm 2 \%$), jako blank sloužil roztok Phytagelu. Požadované množství Phytagelu se sporami (25 μl) o transmitanci 62 % se napipetovalo do inokulačního roztoku PM (PM3, PM4, PM5). Roztok PM se sporami se přelil na Petriho misku a rozpítoval po 100 μl na jamku. Kultivace a měření nainokulovaných destiček probíhalo stejně jako u destiček Biolog FF (tab. 14).

Tabulka 11: Příprava PM inokulačních roztoků.

PM roztok	PM3 (ml)	PM4 (ml)	PM5 (ml)
roztok FF	10	10	10
D-glucose (tab. 12)	0,375	0,375	0,375
PM additive (tab.13)	1	-	1
buňky (v roztoku FF, o požadované T = 62 %)	0,025 *	0,025*	0,025*
sterilní voda	0,6	1,6	0,6
celkem	12	12	12

* Buňky (spory) se do PM roztoku přidávají až po naměření požadované hustoty.

Tabulka 12: Složení roztoku D-glukózy:

roztokD-glukózy	koncentrace (mM)	g/100 ml
D - glukóza	3200	57,664

Rozpouští se v destilované vodě. Sterilizuje se filtrací (filtry 0,45 μm). Uchovat v chladu (4 $^{\circ}\text{C}$).

Tabulka 13: Složení roztoku PM additive.

PM additive	koncentrace (mM)	g/100 ml
KH_2PO_4	60	0,8166
Na_2SO_4	24	0,341

Rozpouští se v destilované vodě. Sterilizuje se filtrací (filtry asi 0,22 μm). Uschovat v chladu (4 $^{\circ}\text{C}$).

Tabulka 14: Seznam izolátů hub analyzovaných metodou Biolog (x - analyzováno, - neanalyzováno, médium - kultivační médium před inokulací na destičky Biolog, inkubační teplota na destičkách - kultivační teplota houby inokulované na destičce).

skupina	značka	název houby	FF	PM3	PM4	PM5	médium	inkubační teplota na destičkách
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 3938	x	x	x	x	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 3941	x	x	x	x	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 3943	x	x	x	x	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 4103	x	x	x	x	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 4124	x	x	x	x	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 4126	x	x	-	-	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 4128	x	-	-	-	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 4129	x	x	-	-	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 4131	x	x	x	x	GK	10 °C
<i>P. destructans</i>	+	<i>P. destructans</i> CCF 4132	x	x	x	x	GK	10 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i> AK 51/11	x	x	x	x	SL	10 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. AK 71/11	x	x	x	x	SL 4°	10 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Trichophyton terrestre</i> AK 44/09	x	x	x	x	SL 4°	10 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Arthroderma</i> sp. AK 27/09	x	x	x	x	SL 4°	25 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Pochonia suchlasporia</i> AK 59/11	x	x	x	x	SL 4°	10 °C
h. z podzem.prostor	□	neurčený <i>Leotiales</i> AK 88/11	x	x	x	x	SL 4°	10 °C
h. z podzem.prostor	□	neurčený <i>Leotiales</i> AK 91/11	x	x	x	x	SL 4°	10 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. AK 87/11	x	x	x	x	SL 4°	10 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Pseudogymnoascus</i> sp. AK 77/11	x	x	x	x	SL 4°	25 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Oidiodendron cerealis</i> CCF 3491	x	x	x	x	SL 4°	25 °C
h. z podzem.prostor	□	<i>Aspergillus spelunceus</i> CCF 4085	x	x	x	x	SL 4°	25 °C
aspergily	Δ	<i>Aspergillus acidus</i> CCF 3984	x	-	-	-	SL 4°	25 °C
aspergily	Δ	<i>Aspergillus flavus</i> CCF 3154	x	-	-	-	SL 4°	25 °C
dermatofyta	◇	<i>Microsporum canis</i> CCF 3443	x	x	x	x	SL 4°	25 °C
dermatofyta	◇	<i>Microsporum gypseum</i> CCF 3100	x	x	x	x	SL 4°	25 °C
dermatofyta	◇	<i>Trichophyton ajelloi</i> CCF 2907	x	x	x	x	SL 4°	25 °C
dermatofyta	◇	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> CCF 3954	x	x	x	x	SL 4°	25 °C

3.3.3. Vyhodnocování metody Biolog

Destičky Biolog v přístroji Magellan se měřily při dvou vlnových délkách 490 nm a 750 nm. Růst jednotlivých izolátů na destičkách byl měřen každý den. Pouze u *P. destructans* každý druhý den vzhledem k jeho pomalému růstu. K vyhodnocování jsem použila data získaná měřením při vlnové délce 750 nm. Destičky FF měly dvě opakování na izolát, tudíž jsem použila jejich průměr, destičky PM3B, PM4A a PM5 měly jen 1 opakování na izolát. Vzhledem k tomu, že se velmi lišila rychlost růstu jednotlivých

izolátů hub, vybrala jsem do vyhodnocovacích analýz měření z různých dnů. Vybírala jsem poslední měření, u kterého bylo zjevné, že u daného izolátu houby již nepřibývá diverzita substrátů. Od hodnot na destičkách byla odečtena jejich negativní kontrola. Po odečtu negativní kontroly byly hodnoty menší než negativní kontrola upraveny na 0. V některých jamkách byly naměřeny vysoké hodnoty při nulovém měření v důsledku špatného rozpouštění substrátu, v důsledku toho byly tyto jamky vyřazeny z hodnocení (FF - B1, B3, G2 a H10; PM3B - C1 a G1; PM4A - A3 a B9).

Data byla vyhodnocována v programu PAST prostřednictvím PCA analýzy a One-way ANOSIM, které testovaly variabilitu mezi jednotlivými izoláty rozdělených do těchto skupin: *P. destructans*, další houby obývající podzemní prostory a dermatofyta (u destiček FF ještě aspergily). Dále byla testována rozdílnost skupin v Shannonově indexu prostřednictvím Kruskal-Wallis testu doplněným o Mann-Whitney pairwise comparison. Provedla jsem regresní analýzu pomocí RMA (reduced major axis) modelu mezi Shannonovým indexem (SH) a substrátovou bohatostí (SR) na jednotlivé destičky Biolog.

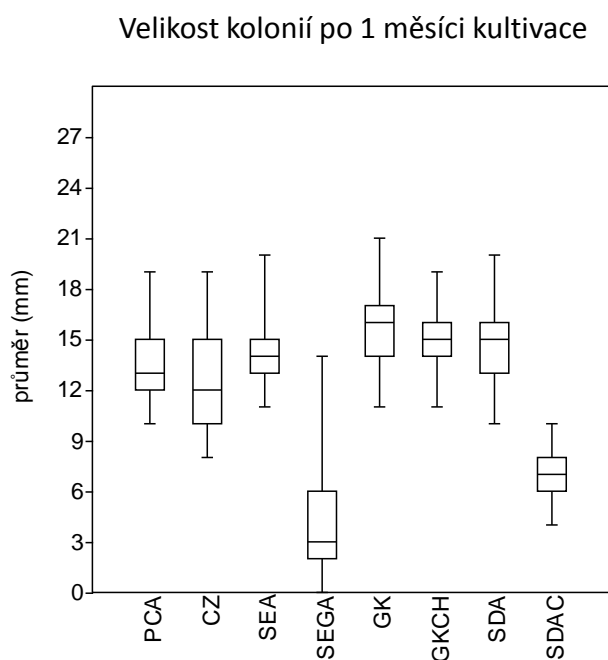
4. Výsledky

4.1. Fyziologické a biochemické vlastnosti *Pseudogymnoascus destructans* a jejich využití pro vytvoření selektivního média

4.1.1. Testování růstových schopností *Pseudogymnoascus destructans* na 8 různých médiích

Byl testován růst sedmi izolátů *P. destructans* (CCF 3937, CCF 3938, CCF 3939, CCF 3941, CCF 3942, CCF 3943, CCF 3944) na osmi různých médiích (SEA, SEGA, SDAC, SDA, GKCH, GK, PCA a CZ).

Nejlepší růst *P. destructans* byl pozorován na médiích GK, GKCH a SDA, potvrdila to i analýza One-way ANOVA v programu PAST, podle níž není mezi těmito médii signifikantní rozdíl. Pro srovnávací pokusy vedoucí k vývoji selektivního média bylo vybráno médium GK, které se snáze připravuje a je levnější než ostatní výše uvedená média (graf 1).

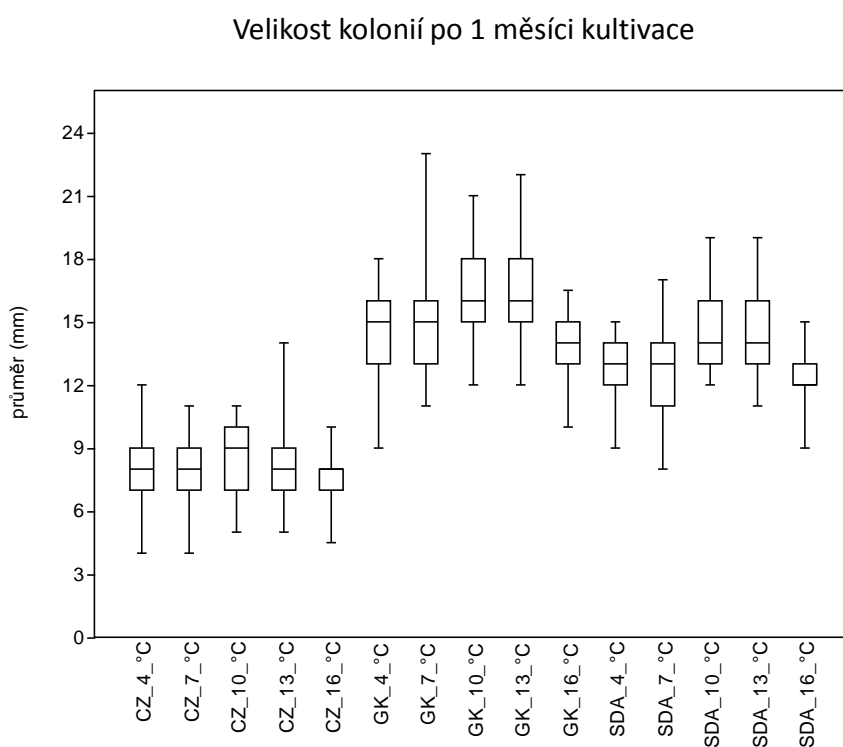


Graf 1: Krabicový diagram znázorňující velikost kolonií *P. destructans* (izoláty CCF 3937, CCF 3938, CCF 3939, CCF 3941, CCF 3942, CCF 3943, CCF 3944) po jednom měsíci kultivace na osmi médiích při 10 °C. V grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech sedmi testovaných kmenů.

4.1.2. Testování optimální teploty pro růst *Pseudogymnoascus destructans*

K experimentu bylo použito 10 kmenů *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 3943, CCF 4103, CCF 4124, CCF 4126, CCF 4128, CCF 4129, CCF 4131, CCF 4132). Testování probíhalo na třech agarových médiích (CZ, GK, SDA) a při pěti teplotách (4 °C, 7 °C, 10 °C, 13 °C, 16 °C).

Ve většině případů byly největší průměry kolonií dosaženy v teplotách 10 °C a 13 °C. U média GK nebyl dle One-way ANOVA nalezen signifikantní rozdíl v růstu ve výše uvedených teplotách. Rozhodla jsem se proto další kultivační pokusy za vývojem selektivního média provádět při teplotě 10 °C, která by mohla být oproti 13 °C pro kmeny jiných hub selektivnější.



Graf 2: Krabicový diagram znázorňující rozdíly v růstu kolonií na 3 médiích v 5 teplotách. Do grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech kmenů.

4.1.3. Testování citlivosti *Pseudogymnoascus destructans* k antimykotikům

P. destructans je citlivý téměř na všechna antimykotika s výjimkou 5-fluorocytosinu (tab. 15). Pro vývoj selektivního média byl tedy dále používán 5-fluorocytosin.

Tabulka 15: Výsledky testů citlivosti 5 izolátů *P. destructans* (CCF 3937, CCF 3938, CCF 4129, CCF 4130, CCF 4132) na antimykotika. Značka „-“, znamená, že hodnota nemohla být odečtena.

antimykotikum	konc.[μg]	Průměr inhibiční zóny [mm]									
		CCF 3937		CCF 3938		CCF 4129		CCF 4130		CCF 4132	
		4 dny	5 dnů	4 dny	5 dnů	4 dny	5 dnů	4 dny	5 dnů	4 dny	5 dnů
nystatin	50	40	40 (35)	40	40	-	40	-	-	40	32
pimaricin	50	40	37	38	40	-	40	-	-	42	40
klotrimazol	30	44	44	44	40	44	40	-	-	40	36
flukonazol	25	14	17	14	26	11	14	-	13	11	8
bifonazol	30	36	34	36	36	46	34	-	-	34	32
vorikonazol	50	30	26	45	40	30	36	-	-	36	26
amfotericin B	50	14	14	10	16	20	18	16	14	18 (16)	16
5-fluorocytosin	5	0	0	0	0	0	10	9	8	8	0
mikonazol	30	46	40	50	40	50	40	50	40	40	40
ekonazol	30	50	50	50	50	50	50	-	-	50	50
ciklopiroxolamin	30	34	30	36	36	40	34	40	34	34	26
ketokonazol	30	46	40	46	48	-	30	-	44	46	44
itraconazol	30	34	40	38	30	-	-	-	28	30	28

4.1.4. Testování citlivosti *Pseudogymnoascus destructans* k antimykotikům/antibiotikům v médiu

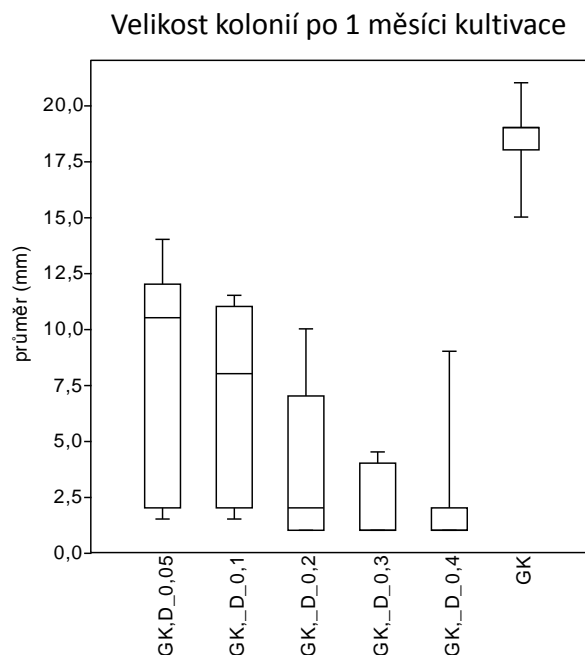
Citlivost k antimykotikům či k antibiotikům v médiích byla testována na třech izolátech *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po dobu jednoho měsíce v 10 °C. Výsledky znázorňují grafy 3 až 7.

Antimykotika dodine a CTAB byla shledána jako nevhodná pro další použití, protože značně negativně ovlivnila velikost kolonií *P. destructans*. Zvláště kmen CCF 4132 byl velmi málo tolerantní k téměř všem koncentracím v médiu (graf 3 a 4).

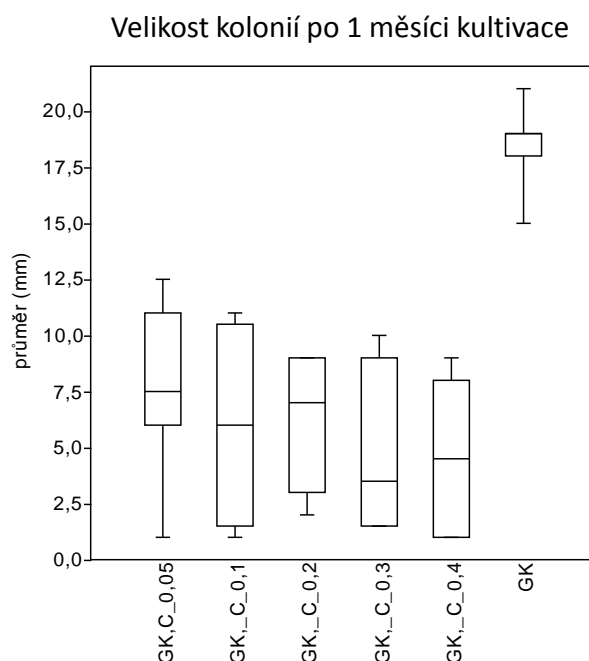
Antibiotikum bengálská červeň o nižších koncentracích nemělo na velikost kolonií velké inhibiční účinky, proto bylo včleněno do složení budoucího selektivního média (graf 5).

K antimykotiku 5-fluorocytosin byla houba nejvíce tolerantní, i k vyšším koncentracím. Antimykotikum bylo proto začleněno do složení selektivního média (graf 6).

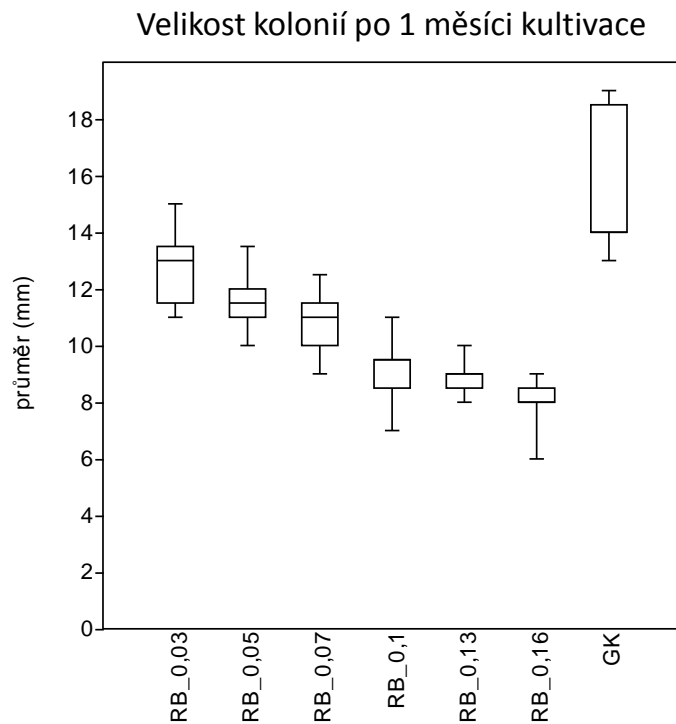
Na základě výsledku testování antimykotik v médiu jsem se rozhodla testovat bengálskou červeň a 5-fluorocytosin v jednom médiu současně, a to ve dvou variantách. 1. varianta - bengálská červeň 0,05 g/l, 5-fluorocytosin 0,33 g/l; 2. varianta - bengálská červeň 0,07 g/l, 5-fluorocytosin 0,33 g/l (graf 7).



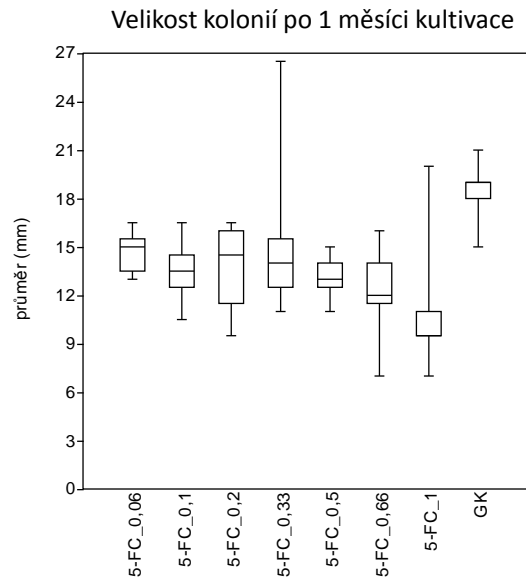
Graf 3: Velikost kolonií *P. destructans* (izoláty CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po 1 měsíci kultivace v 10 °C. Byly použity různé koncentrace dodinu, GK,D_0,05 = dodine 0,05 g/l; GK,D_0,1 = dodine 0,1 g/l; GK,D_0,2 = dodine 0,2 g/l; GK,D_0,3 = dodine 0,3 g/l, GK,D_0,4 = dodine 0,4 g/l a GK - kontrola. Do grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech kmenů.



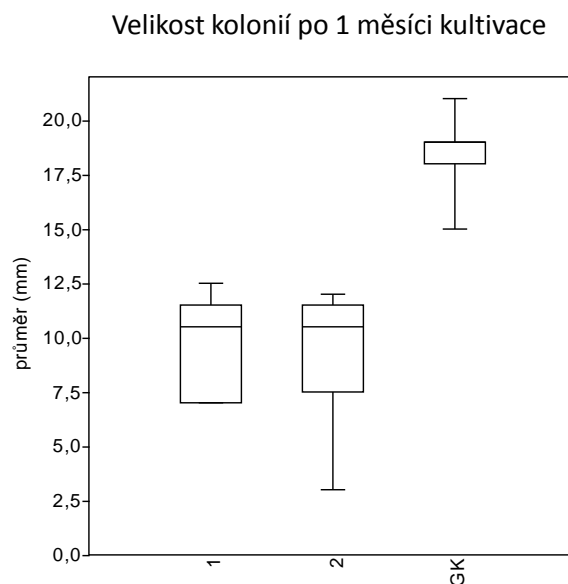
Graf 4: Velikost kolonií *P. destructans* (izoláty CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po 1 měsíci kultivace v 10 °C. Byly použity různé koncentrace CTAB, GK,C_0,05 = CTAB 0,05 g/l; GK,C_0,1 = CTAB 0,1 g/l; GK,C_0,2 = CTAB 0,2 g/l; GK,C_0,3 = CTAB 0,3 g/l, GK,C_0,4 = CTAB 0,4 g/l a GK - kontrola. Do grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech kmenů.



Graf 5: Velikost kolonií *P. destructans* (izoláty CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po 1 měsíci kultivace v 10 °C. Byly použity různé koncentrace bengálské červeně, RB_0,03 = bengálská červeně 0,03 g/l; RB_0,05 = bengálská červeně 0,05 g/l; RB_0,07 = bengálská červeně 0,07 g/l; RB_0,1 = bengálská červeně 0,1 g/l; RB_0,13 = bengálská červeně 0,13 g/l, RB_0,16 = bengálská červeně 0,16 g/l a GK - kontrola. Do grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech kmenů.



Graf 6: Velikost kolonií *P. destructans* (izoláty CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po 1 měsíci kultivace v 10 °C. Byly použity různé koncentrace 5-fluorocytosinu, 5-FC_0,06 = 5-fluorocytosin 0,06 g/l; 5-FC_0,1 = 5-fluorocytosin 0,1 g/l; 5-FC_0,2 = 5-fluorocytosin 0,2 g/l; 5-FC_0,33 = 5-fluorocytosin 0,33 g/l; 5-FC_0,5 = 5-fluorocytosin 0,5 g/l; 5-FC_0,66 = 5-fluorocytosin 0,66 g/l, 5-FC_1 = 5-fluorocytosin 1 g/l a GK - kontrola. Do grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech kmenů.

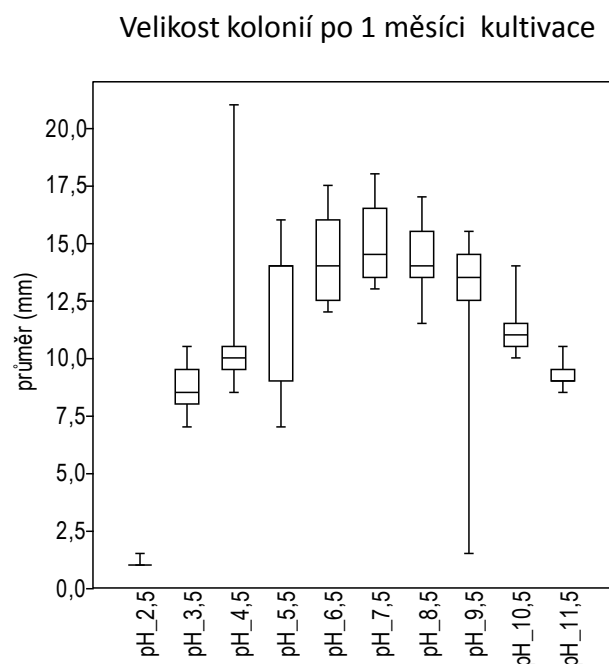


Graf 7: Velikost kolonií *P. destructans* (izoláty CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po 1 měsíci kultivace v 10 °C. Byly použity dvě kombinace koncentrací antibiotik, 1 (bengálská červeň 0,05 g/l, 5-fluorocytosin 0,33 g/l), 2 (bengálská červeň 0,07 g/l, 5-fluorocytosin 0,33 g/l) a GK - kontrola. Do grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech kmenů.

4.1.5. Testování růstu *Pseudogymnoascus destructans* na médiu s různými hodnotami pH

Pro testování byly použity tři izoláty *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132), glukózo- kvasničné médium a 10 různých hodnot pH.

Z testovaných hodnot odpovídá pH 7,5 růstovému optimu. Mezi optimální hodnotou pH a sousedními hodnotami 6,5 a 8,5 nebyl nalezen signifikantní rozdíl (One-Way Anova). Pro selektivní médium bylo zvoleno pH 8,5. Je to hodnota pH, při které *P. destructans* roste dobře, ale naopak růst jiných hub z prostředí může být omezen.

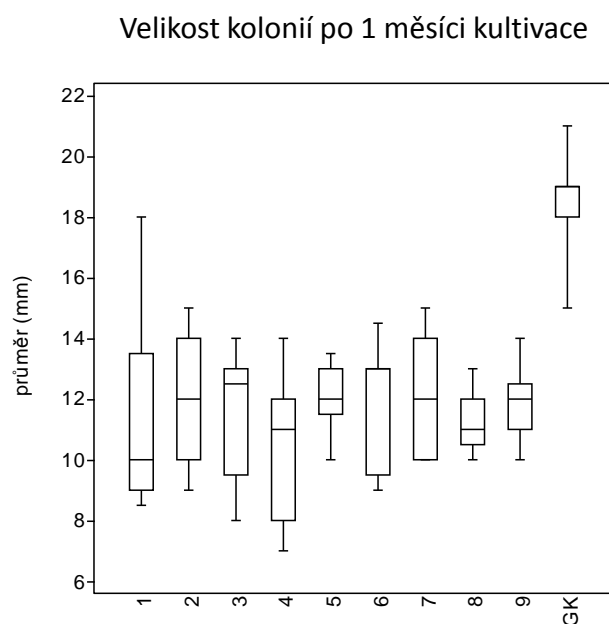


Graf 8: Velikost kolonií *P. destructans* (izoláty CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po 1 měsíci kultivace na médiu GK s 10 hodnotami pH. V grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech 3 testovaných kmenů.

4.1.6. Testování růstu *Pseudogymnoascus destructans* na médiích s různým poměrem C a N

Z grafu 9 lze vyčíst, že různé množství zdroje uhlíku a dusíku v několika variantách poměrů a případně s přidavkem kvasničného extraktu nemá na velikost kolonií velký vliv. Potvrdila to i analýza One-way ANOVA v programu PAST, dle té se od sebe média 1 až 9 od sebe signifikantně neliší. Liší se samozřejmě všechny od standardu GK. Rozhodla jsem se tedy do selektivního média použít variantu 5 (poměr C:N 20:1, s 15 g glukózy a s 0,64 g močoviny). Zvolené médium pro další experimenty obsahuje nižší množství

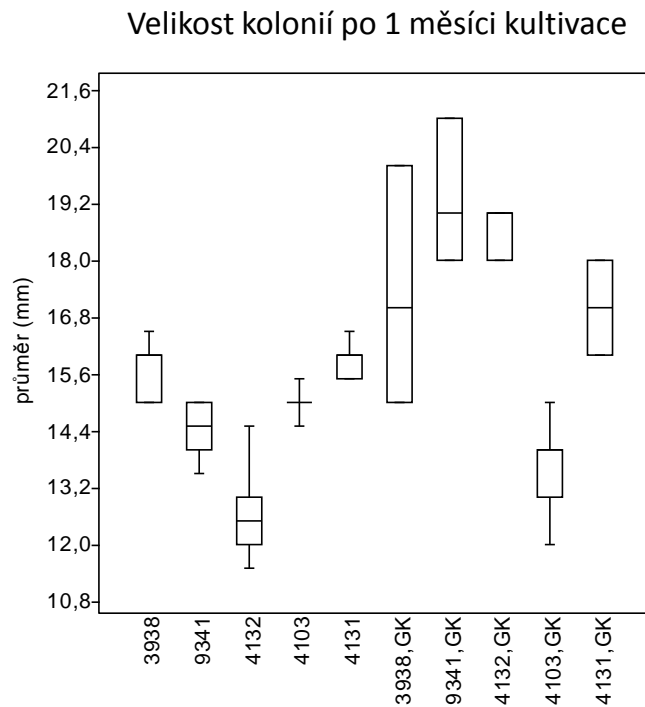
glukózy a neobsahuje kvasničný extrakt (komplexní zdroj živin). Vybrala jsem si ho tedy proto, že by mělo méně podporovat růst nežádoucích kmenů hub.



Graf 9: Velikost kolonií *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132) po 1 měsíci kultivace. Čísla 1 až 9 představují média s různým obsahem zdroje uhlíku a dusíku. Složení médií tab. 7, kapitola 3.1.7. V grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech 3 testovaných kmenů.

4.1.7. Testování selektivního média

Výsledky testování růstu pěti izolátů *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132, CCF 4103 a CCF 4131) na selektivním médiu jsou znázorněny v grafu 10. Všechny izoláty dosáhly po jednom měsíci kultivace velikosti kolonií nad 11 mm v průměru.

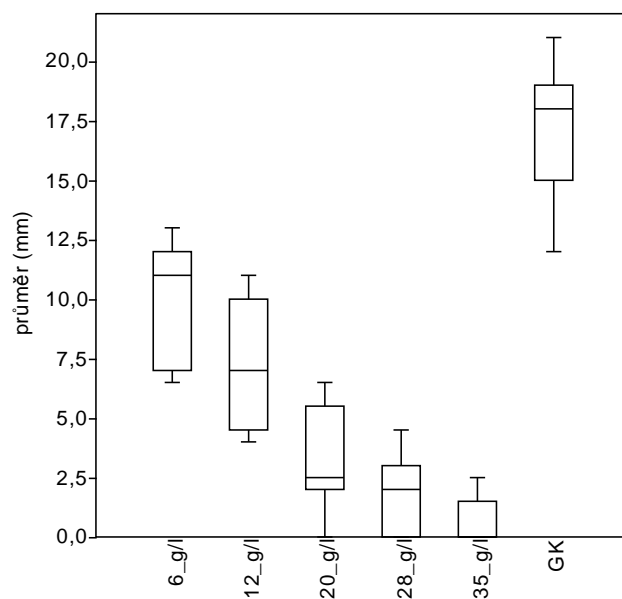


Graf 10: Velikost kolonií *P. destructans* po 1 měsíci kultivace na selektivním médiu při 10 °C. Bylo testováno 5 kmenů: CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132, CCF 4103 a CCF 4131. V grafu jsou hodnoty velikosti kolonií na selektivním médiu a kontrolním médiu GK (glukózo-kvasničném; v grafu s označením GK).

4.1.8. Testování tolerance *Pseudogymnoascus destructans* k obsahu NaCl v selektivním médiu

Bylo zjištěno, že pět testovaných izolátů *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132, CCF 4103, CCF 4131) nejsou k žádné koncentraci NaCl v médiu tolerantní natolik, aby se některá z variant dala dále používat (graf. 11).

Velikost kolonií po 1 měsíci kultivace

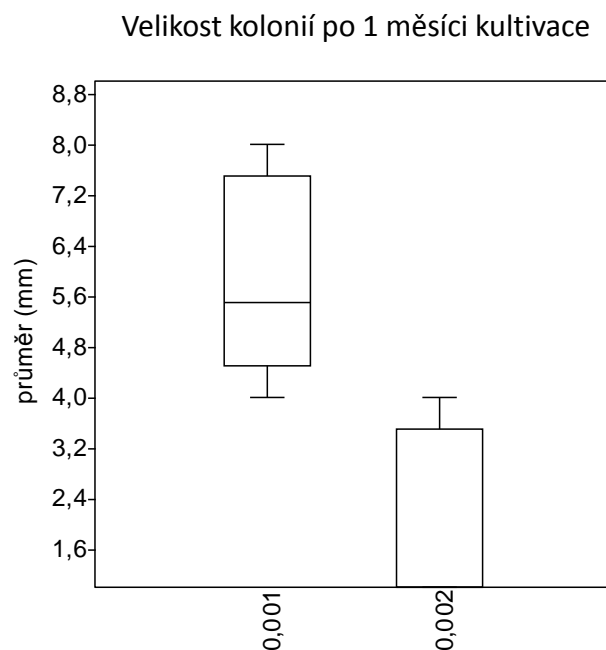


Graf 11: Velikost kolonií *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132, CCF 4103, CCF 4131) po 1 měsíci kultivace v 10 °C s 5 variantami koncentrací NaCl v médiu.

4.1.9. Testování tolerance k 2,6-dichloro-4-nitroanilinu

Na toleranci k 2,6-dichloro-nitroanilinu (0,001 g/l a 0,002 g/l) v médiu bylo testováno pět izolátů *P. destructans* (CCF 3938, CCF 3941, CCF 4132, CCF 4103, CCF 4131).

Z grafu 12 je zřetelné, že schopnost růstu *P. destructans* byla dichloranem omezena. Z toho vyplývá, že dichloran do konečného složení selektivního média nebyl zahrnut.



Graf 12: Velikost kolonií *P. destructans* po 1 měsíci kultivace na selektivním médiu se 2 různými koncentracemi s 2,6-dichloro-4-nitroanilinu (0,001 - 2,6-dichloro-4-nitroanilin 0,001 g/l a 0,002 - 2,6-dichloro-4-nitroanilinu 0,002 g/l). V grafu jsou zahrnuty hodnoty od všech testovaných izolátů.

4.1.10. Testování selektivního média - klíčení *Pseudogymnoascus destructans*

Orientační test na klíčení spor *P. destructans* na selektivním médiu byl proveden pouze s jedním izolátem (CCF 3938).

Počet vyklíčených spor byl odečítán po 15 dnech. Z tab. 16 je zjevné, že spory na selektivním médiu neklíčí. Lze to vysvětlit tím, že při inokulaci vpichem se nabere větší počet spor, z nichž některé vyklíčí, proto při měření velikosti průměru kolonie se jeví selektivní médium jako použitelné.

Tabulka 16: Procento vyklíčených spor *P. destructans* CCF 3938 po 15 dnech (GK - glukózo- kvasničné médium, SM - selektivní médium).

	GK (%)	SM (%)
miska A	82	0
miska B	72	0
miska C	72	0

4.1.11. Zkouška různých variant médií

Výsledky jsou uvedeny v tab. 17. Na médiu 6 nevyklíčily žádné konidie, na médiu 1 je velmi omezený počet.

Bylo zjištěno, že selektivní médium o složení (uvedeno v kapitole 3.1.8.) je nevyhovující, protože inhibuje klíčení. Houba dobře klíčila na všech variantách médií GK, což je zřejmé z tab. 17. Na základě toho jsem došla k závěru, že *P. destructans* potřebuje mít v médiu komplexní zdroj živin, kterým je např. kvasničný extrakt. V důsledku toho bylo poněkud pozměněno stávající složení selektivního média. Navíc bylo vyvinuto ještě další médium (GK15), podobné v základu složením GK obohacené o antimykotika a s pH 8,5, což již bylo použito v selektivním médiu.

Tabulka 17: Procento vyklíčených spor *P. destructans* po 16 dnech na různých modifikacích média.

médium	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	7 (%)	8 (%)	9 (%)	10 (%)	11 (%)
CCF 3938	0	15	15	17	9	0	19	12	24	24	17
	0	15	19	17	22	0	27	11	12	16	16
	1										
CCF 3941	0	15	26	21	31	0	11	39	32	37	11
	0	12	32	27	28	0	15	27	29	28	12
	0										
CCF 4132	4	14	23	30	20	0	0	20	16	23	6
	1	27	18	23	11	0	3	28	22	10	1
	4										

Nové složení médií:

Selektivní médium (SELEK):

- glukóza 15 g
- močovina 0,48 g (3/4 dusíku, po kláv. přidána, filtrace, rozpuštěno v 10 ml)
- kvasničný extrakt 0,67 g (1/4 dusíku)
- CZ konc. 10 ml
- roztok stop.prvků (Cu-Zn) 1 ml
- agar 15 g
- chloramfenikol 0,1 g/l
- bengálská červeň (RB) 0,05 g/l (po kláv. přidána)

- 5-fluorocytosin (5-FC) 0,1 g/l (po kláv. přidána)
- destilovaná voda 1000 ml
- pH 8,5 (upraveno po klávování)

Cz koncentrát - KCl 5 g, MgSO₄ 5 g, FeSO₄ 0,1 g, voda 100 ml
 roztok stop.prvků - ZnSO₄ 1 g, CuSO₄ 0,5 g, voda 100 ml

GK15:

- glukóza 15 g
- kvasničný extrakt 5 g
- chloramfenikol 0,1 g
- bengálská červeň (RB) 0,05 g/l (po kláv. přidána)
- 5-fluorocytosin (5-FC) 0,1 g/l (po kláv. přidána)
- agar 15 g
- destilovaná voda 1000 ml
- pH 8,5

4.1.12. Pokus sledující klíčení *Pseudogymnoascus destructans* spolu se sporami hub ze sedimentu

Na jednotlivých médiích se velmi lišil počet narostlých kolonií (pocházejících z 1 vyklíčené spory) ze sedimentu, markantní rozdíl byl mezi selektivním médiem a oběma dalšími (GKCH a GK15). Z tabulky 19, kde jsou průměrné hodnoty výsledků ze tří opakování, je zřejmé, že počet kolonií na selektivním médiu a GK15 byl snížen o 2/3 ve srovnání s médiem GKCH.

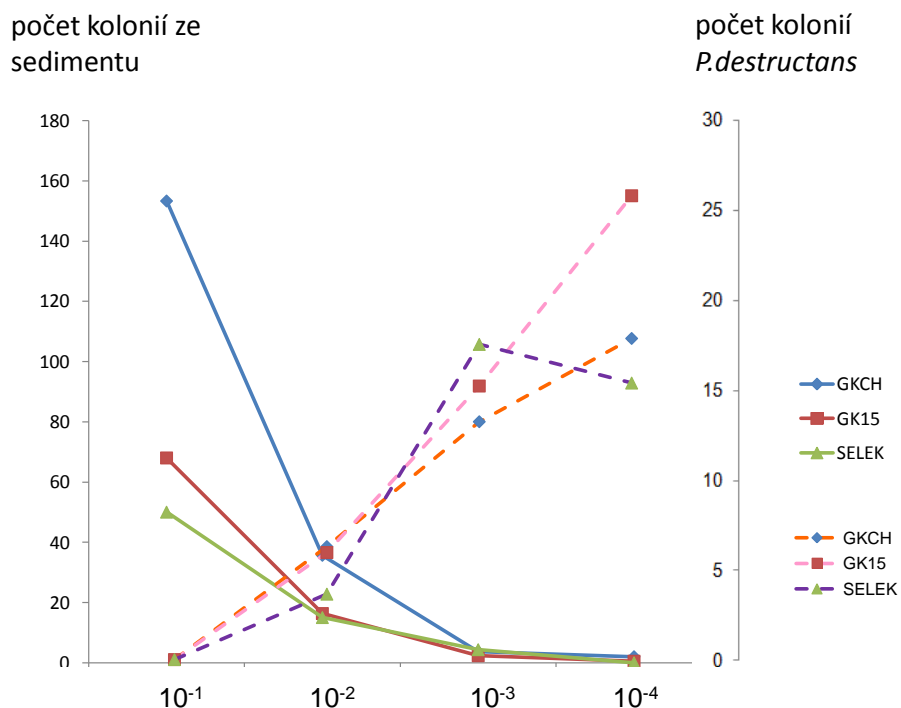
Údaje uvedené v tabulce 19 jsou přehledně znázorněny v grafech (13 až 15). Potvrdil se předpoklad, že s vyšším zředěním se snižuje počet vyklíčených spor hub ze sedimentu. Zatímco záchytnost *P. destructans* je na všech médiích podobná, tak počet kolonií ostatních hub je na selektivním médiu výrazně redukován.

Tabulka 18: Procento vyklíčených spor *P. destructans* na 3 médiích.

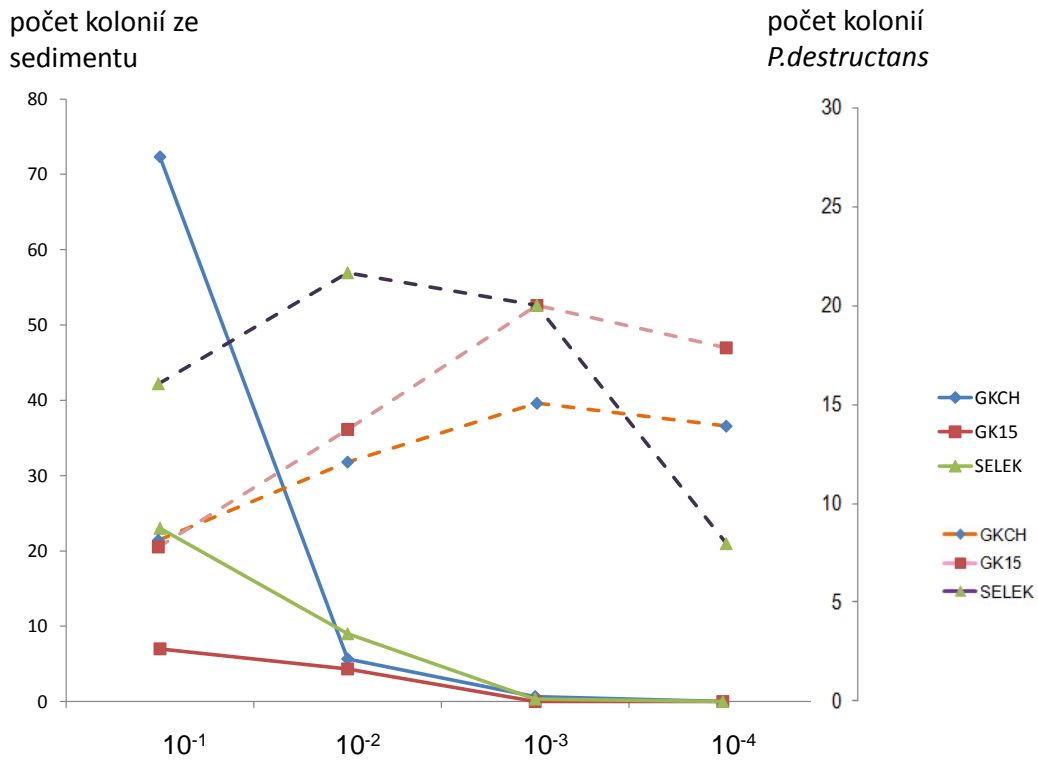
médiium	GKCH (%)			GK15 (%)			selektivní médium (%)		
	CCF 3938	CCF 3941	CCF 4132	CCF 3938	CCF 3941	CCF 4132	CCF 3938	CCF 3941	CCF 4132
kmen									
miska 1	13	6	50	20	2	15	15	10	38
miska 2	23	6	30	25	2	20	33	6	32

Tabulka 19: Počet vyklíčených spor hub na 3 médiích (S - sediment, PD - *P. destructans* CCF 3938). V grafu jsou průměrné hodnoty ze 3 opakování každé varianty.

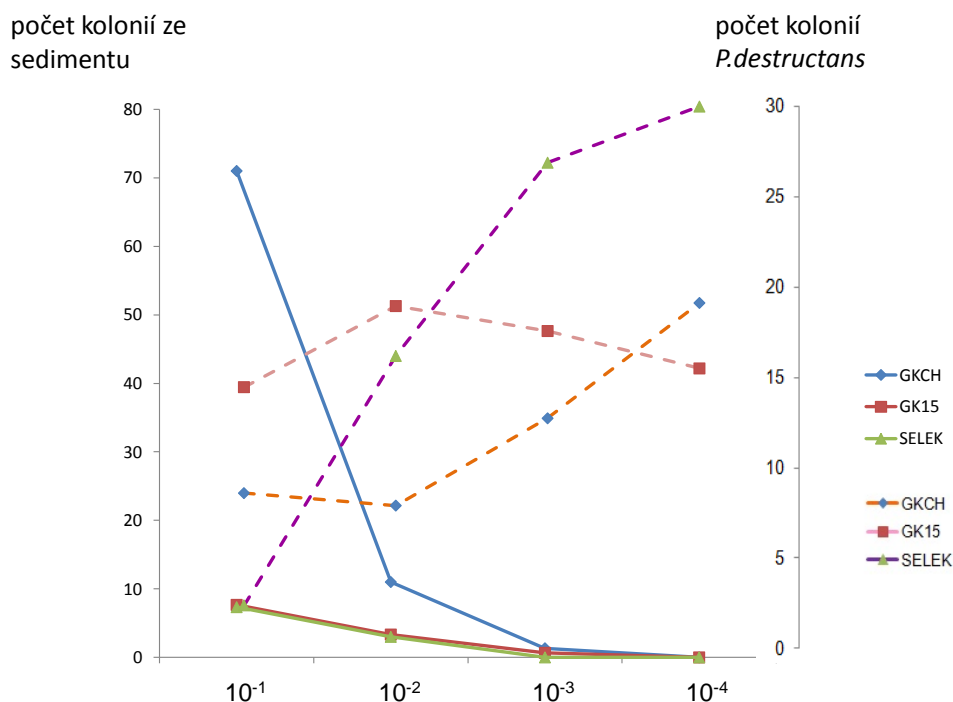
		GKCH							
zř.sedimentu	10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		
sediment 1	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	0	153	6	36	13	4	18	2	
sediment 1	S		S		S		S		
kolonie	118		32		12		2		
sediment 2	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	9	72	13	6	15	1	14	0	
sediment 2	S		S		S		S		
kolonie	97		6		4		0		
sediment 3	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	9	71	8	11	13	1	19	0	
sediment 3	S		S		S		S		
kolonie	103		18		2		0		
		GK15							
zř.sedimentu	10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		
sediment 1	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	0	68	6	16	15	2	26	1	
sediment 1	S		S		S		S		
kolonie	15		11		3		1		
sediment 2	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	8	7	14	4	20	0	18	0	
sediment 2	S		S		S		S		
kolonie	8		2		0		0		
sediment 3	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	15	8	19	3	18	1	16	0	
sediment 3	S		S		S		S		
kolonie	18		3		0		0		
		SELEK							
zř.sedimentu	10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}		
sediment 1	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	0	50	4	15	18	4	16	0	
sediment 1	S		S		S		S		
kolonie	47		16		3		1		
sediment 2	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	17	23	22	9	20	0	8	0	
sediment 2	S		S		S		S		
kolonie	22		4		0		0		
sediment 3	PD	S	PD	S	PD	S	PD	S	
kolonie	3	7	17	3	27	0	30	0	
sediment 3	S		S		S		S		
kolonie	31		4		1		0		



Graf 13: Počet kolonií hub narostlých ze **sedimentu 1** (mění se koncentrace na ose x) a *P. destructans* CCF 3938 (stejná koncentrace - inokulace 105 spor) na agarových plotnách. **Plné křivky sediment:** modrá GKCH - počet kolonií sedimentu, červená GK15 - počet kolonií sedimentu, zelená SELEK - počet kolonií sedimentu. **Přerušované křivky *P. destructans*:** oranžová GKCH - počet kolonií *P. destructans*, růžová GK15 - počet kolonií *P. destructans*, fialová SELEK - počet kolonií *P. destructans*.



Graf 14: Počet kolonií hub narostlých ze **sedimentu 2** (mění se koncentrace na ose x) a *P. destructans* CCF 3938 (stejná koncentrace - inokulace 105 spor) na agarových plotnách. **Plné křivky sediment:** modrá GKCH - počet kolonií sedimentu, červená GK15 - počet kolonií sedimentu, zelená SELEK - počet kolonií sedimentu. **Přerušované křivky *P. destructans*:** oranžová GKCH - počet kolonií *P. destructans*, růžová GK15 - počet kolonií *P. destructans*, fialová SELEK - počet kolonií *P. destructans*.



Graf 15: Počet kolonií hub narostlých ze **sedimentu 3** (mění se koncentrace na ose x) a *P. destructans* CCF 3938 (stejná koncentrace - inokulace 105 spor) na agarových plotnách. **Plné křivky sediment:** modrá GKCH - počet kolonií sedimentu, červená GK15 - počet kolonií sedimentu, zelená SELEK - počet kolonií sedimentu. **Přerušované křivky *P. destructans*:** oranžová GKCH - počet kolonií *P. destructans*, růžová GK15 - počet kolonií *P. destructans*, fialová SELEK - počet kolonií *P. destructans*.

4.1.13. Kontrolní testování životaschopnosti spor *Pseudogymnoascus destructans* po zmrazení na -70 °C

Médium GK15 a kontrolní GKCH jsou pro *P. destructans* téměř rovnocenná, pokud jde o schopnost klíčení a velikost kolonií (tab. 20 a 21, graf 16 až 21). Na selektivním médiu houba klíčí, ale velikost kolonií je menší než u GK15 a GKCH. Je to zvláště zřetelné na koloniích získaných v klíčícím pokusu (1 kolonie z 1 spory), viz Obr. 11 až 13.

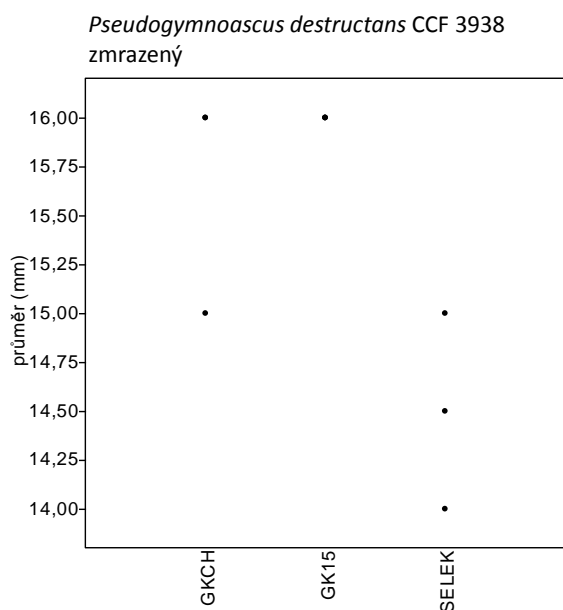
Z pokusu v kapitole 4.1.12. vyplývá, že pro izolaci *P. destructans* ze zmrazeného sedimentu je vhodnější médium GK15, protože omezuje klíčení spor nežádoucích rychleji rostoucích hub ze sedimentu téměř stejně jako Selektivní médium.

Tabulka 20: Procento vyklíčených spor u 3 testovaných kmenů *P. destructans* na 3 různých médiích po předchozím zmrazení na -70 °C. V tabulce jsou uvedeny průměry ze 3 opakování pro každou variantu.

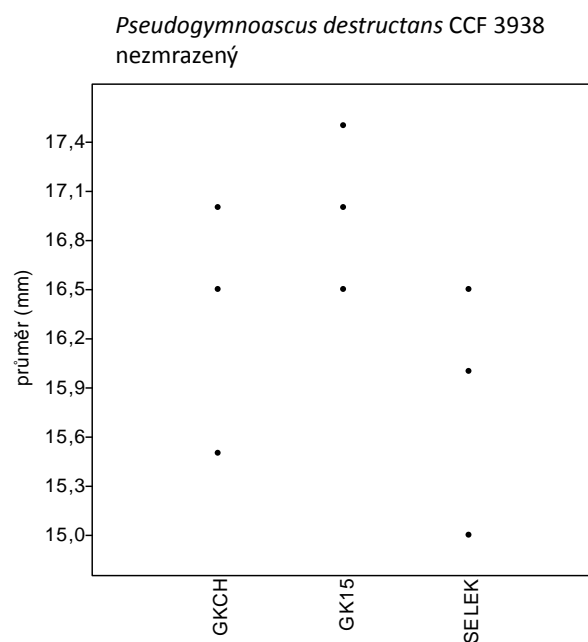
kmen	spory <i>P. destructans</i> zmrazeny (24h v -70°C)			spory <i>P. destructans</i> nezmrazeny		
	GKCH (%)	GK15 (%)	SELEK (%)	GKCH (%)	GK15 (%)	SELEK (%)
CCF 3938	83	78	63	95	125	90
CCF 3941	120	124	91	113	98	79
CCF 4132	94	77	0	70	52	0

Tabulka 21: Souhrnná tabulka zobrazující velikosti průměru kolonií po 1 měsíci při 10 °C.

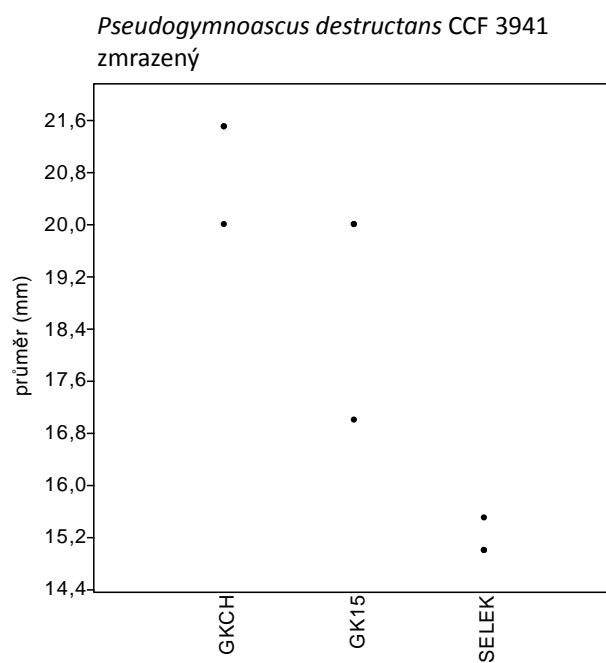
kmen	<i>Pseudogymnoascus destructans</i> zmrazeny (24h v -70 °C)			<i>Pseudogymnoascus destructans</i> nezmrazený (kontrola)		
	GKCH (mm)	GK15 (mm)	SELEK (mm)	GKCH (mm)	GK15 (mm)	SELEK (mm)
CCF 3938	16	16	15	17	17,5	16,5
	16	16	14,5	16,5	17	15
	15	16	14	15,5	16,5	16
CCF 3941	20	17	15	20	20	13,5
	21,5	20	15,5	19,5	19,5	15
	21,5	20	15	21	20,5	15
CCF 4132	14	16	9,5	17	15,5	11
	15	15,5	8,5	18	16	9,5
	14	15,5	8	17	15	10



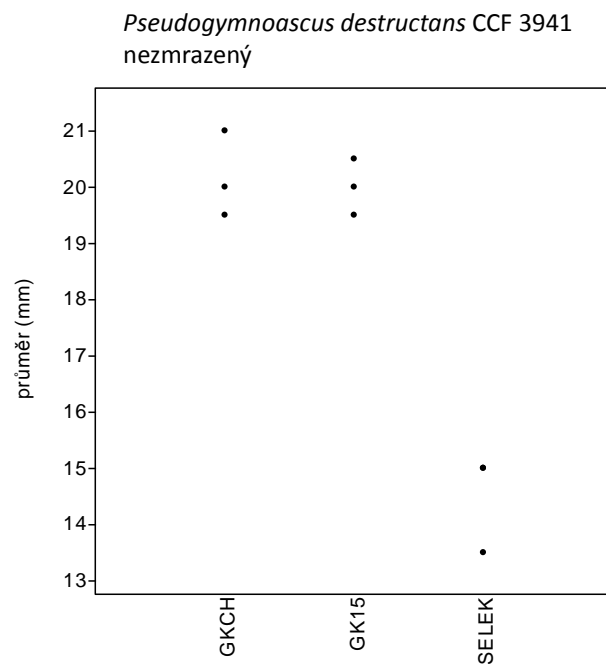
Graf 16: Průměry kolonií *P. destructans* CCF 3938 v mm vyrostlých ze zmrazených spor po 1 měsíci kultivace při 10 °C.



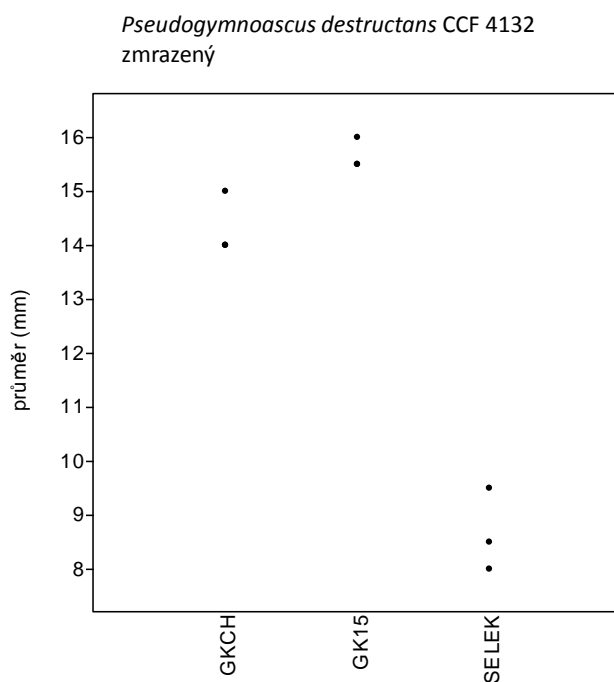
Graf 17: Průměry kolonií *P. destructans* CCF 3938 (nezmrazená kontrola) po 1 měsíci kultivace při 10 °C



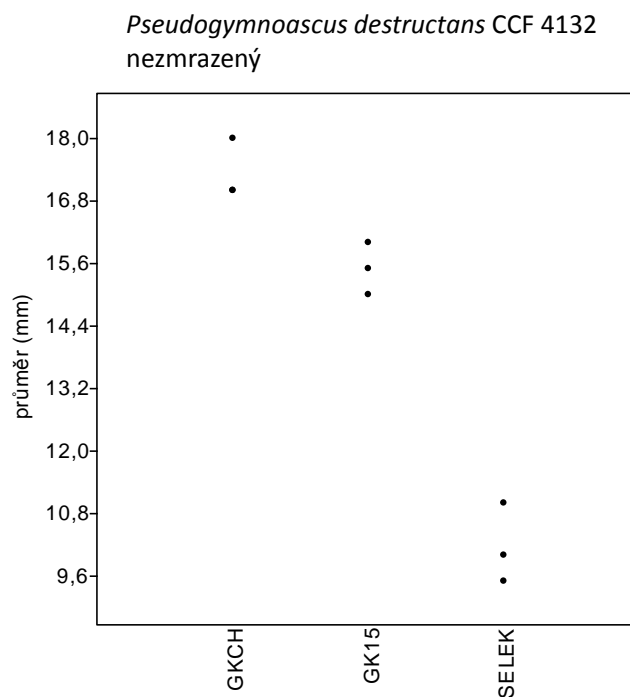
Graf 18: Průměry kolonií *P. destructans* CCF 3941 v mm vyrostlých ze zmrazených spor po 1 měsíci kultivace při 10 °C.



Graf 19: Průměry kolonií *P. destructans* CCF 3941 (nezmrazená kontrola) po 1 měsíci kultivace při 10 °C



Graf 20: Průměry kolonií *P. destructans* CCF 4132 v mm vyrostlých ze zmrazených spor po 1 měsíci kultivace při 10 °C.



Graf 21: Průměry kolonií *P. destructans* CCF 4132 (nezmrazená kontrola) po 1 měsíci kultivace při 10 °C.

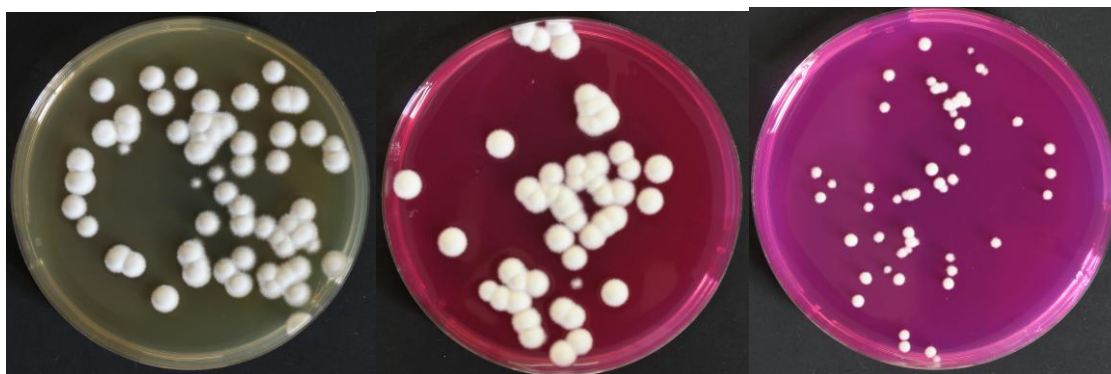


A

B

C

Obr. 11: *P. destructans* CCF 3938, kolonie vyrostlé ze suspenze spor (nezmrazená varianta) po 3 týdnech kultivace při 10 °C, A - GKCH, B - GK15, C - selektivní médium.

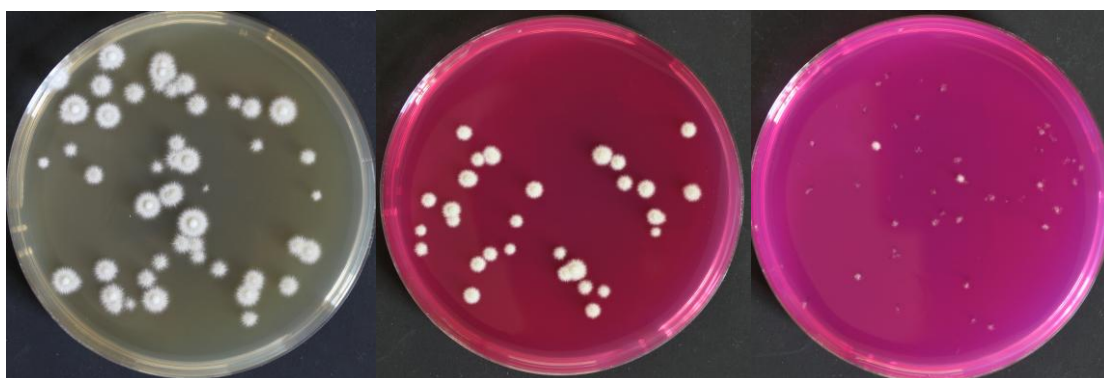


A

B

C

Obr. 12: *P. destructans* CCF 3941, kolonie vyrostlé ze suspenze spor (nezmrazená varianta) po 3 týdnech kultivace, A - GKCH, B - GK15, C - selektivní.



A

B

C

Obr. 13: *P. destructans* CCF 4132, kolonie vyrostlé ze suspenze spor (nezmrazená varianta) po 3 týdnech kultivace, A - GKCH, B - GK15, C - selektivní.

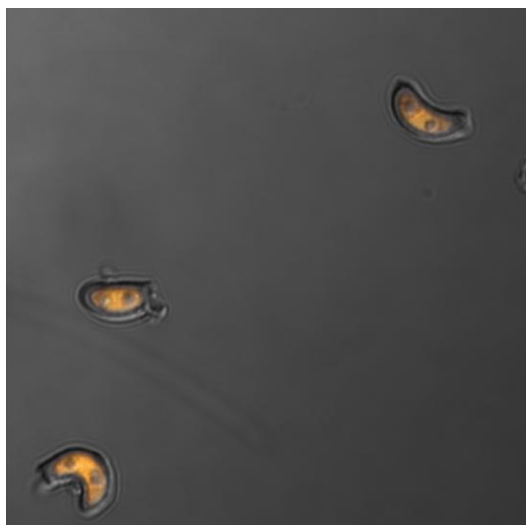
4.2. Testování životaschopnosti spor po působení různých forem nepříznivých podmínek

4.2.1. Testování FUN-1 s pufrům 1x PBS

Výsledek barvení spor značením FUN-1 byl pozorován konfokálním mikroskopem. Výsledky byly dokumentovány fotografiemi.

Vzorky "živých" a "mrtvých" spor (Obr. 14 a 15) vypadaly po obarvení úplně stejně. V "živých" sporách se vůbec neobjevila zřetelná červená fluorescence, která značí intravakuolární struktury, nepomohla tomu ani vyšší koncentrace fluorescenčního značení.

Spory nereagovaly na obarvení podle původního předpokladu, proto se přikročilo k testování FUN-1 v jiném pufru.



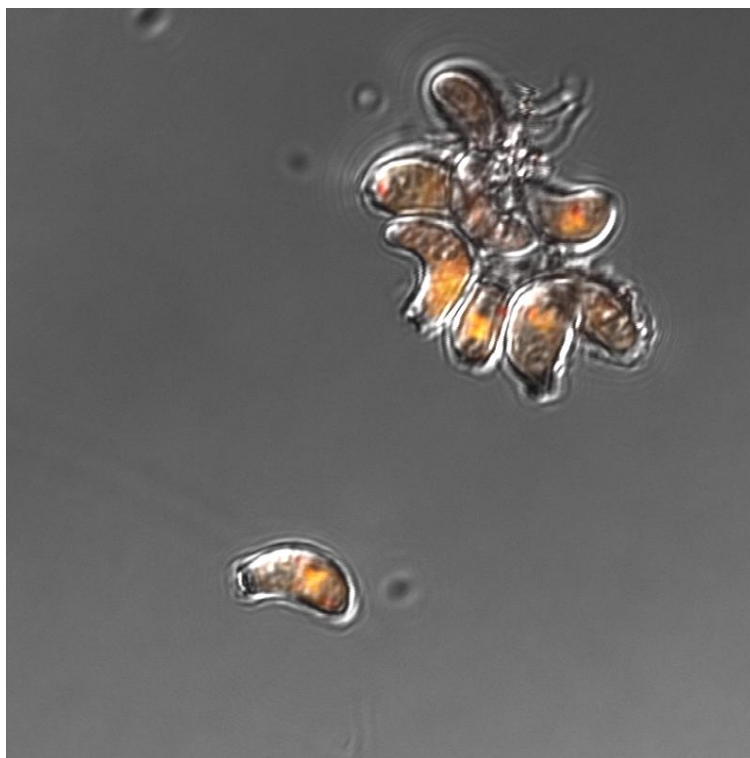
Obr. 14: "Mrtvé" spory, 15 μ l FUN-1 ve vzorku.



Obr. 15: "Živé" spory, 15 μ l FUN-1 ve vzorku.

4.2.2. Testování FUN-1 s puftrem Na-HEPES

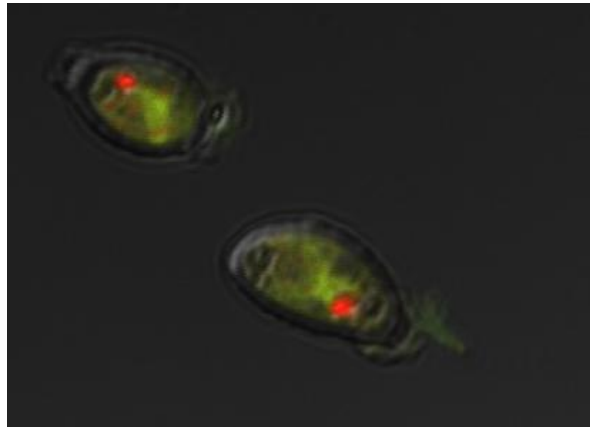
Ve variantě 1 (Na-HEPES 25 °C Ž, Obr. 16) byl již vidět náznak červených bodů (CIVS-intravakuloárních struktur), ale výsledek nebyl stále uspokojivý, proto se přikročilo k dalšímu testování fluorescenčního značení FUN-1.



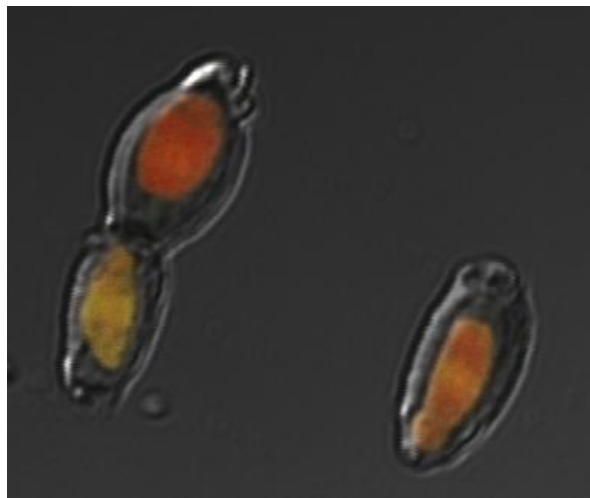
Obr. 16: Fotografie z konfokálního mikroskopu, vzorek 1.

3.2.3. Testování FUN-1 a délky inkubace spor

Všechny vzorky vypadaly v konfokálním mikroskopu podobně. Po delší inkubaci spor s FUN-1 intravakuolární struktury (CIVS) měly zřetelnější "červenou" fluorescenci. Problémem však bylo, že v cytoplazmě "živých" i "mrtvých" buněk byl rozptýlen signál pro "červenou" i "zelenou" fluorescenci (Obr. 17 a 18).



Obr. 17: Vzorek 3Ž s "živými" sporami *P. destructans*, inkubace s FUN-1 3 h.



Obr. 18: Vzorek 3M s "mrtvými" sporami *P. destructans*, inkubace s FUN-1 3 h.

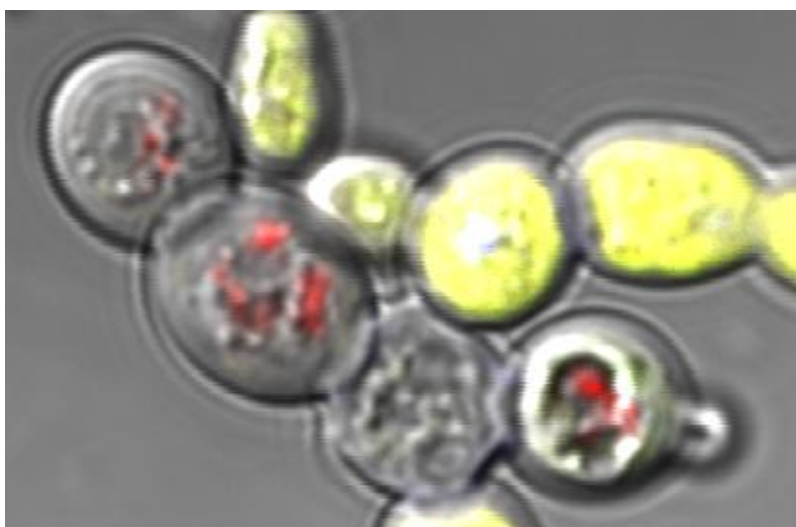
4.2.4. Testování FUN-1 spolu s Hoechst 33258

Ač byly "živé" vzorky spor po podpoření metabolismu (vlivem třepání po 2 dny v médiu), zjistilo se, že vysoké procento spor v "živých" vzorcích představovaly mrtvé spory, což se zjistilo díky pozitivní fluorescenci Hoechst 33258. Přesto byly zaznamenány i metabolicky aktivní spory *P. destructans*. Na fotografiích zaznamenaných při konfokální

mikroskopii nebyly bohužel zjištěny žádné rozdíly mezi jednotlivými dosud testovanými variantami spor *P.destructans* s FUN-1.

Rozhodla jsem se tedy, že od úmyslu testovat životaschopnost prostřednictvím FUN-1 opustím a vyzkouším jiné fluorescenční značení používané k tomuto účelu, a to Hoechst 33258 nebo propidium jodid (PI).

Prostřednictvím testování kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se ukázalo, že metoda vyšetřování životaschopnosti FUN-1 funguje, protože byly zaznamenány na fotografii buňky kvasinek se zcela zřetelnými CIVS (obr. 19).

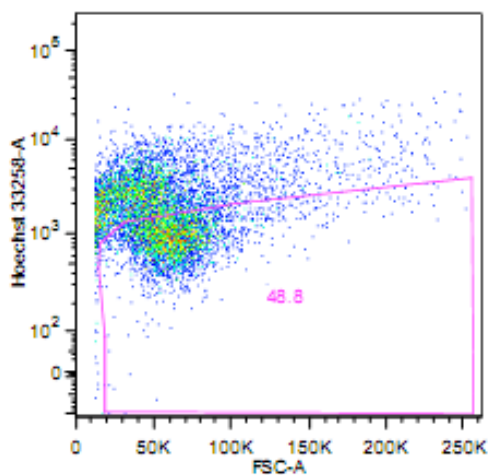


Obr. 19: *Saccharomyces cerevisiae*, živé buňky kvasinek (10 μ l FUN-1, inkubace v 30 °C) zaznamenané konfokální mikroskopií.

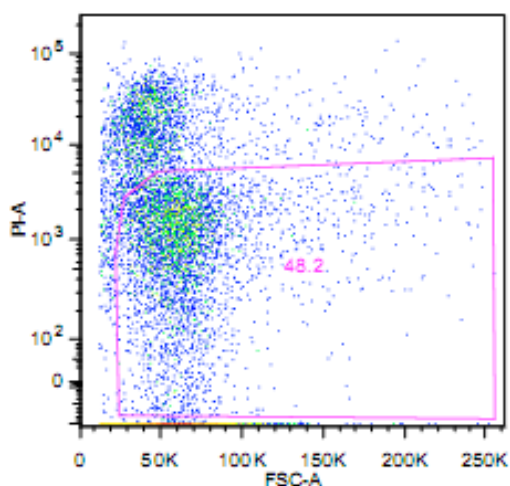
4.2.5. Testování PI a Hoechst 33258

Bylo zjištěno, že třepání spor před vyšetřováním životaschopnosti s použitím fluorescenčních barviv propidium jodid a Hoechst 33258 nemá vliv.

Dle testování stejných vzorků dvěma fluorescenčními barvivami bylo rozhodnuto, že dále pro testování životaschopnosti bude používán propidium jodid, protože lépe oddělil skupiny "živých" a "mrtvých" spor *P.destructans* (Obr. 20 a 21).



Obr. 20: Vzorek 4 testovaný Hoechst 33258.



Obr. 21: Vzorek 4 testovaný propidiem jodidem.

4.2.6. Testování spolehlivosti PI

Výsledky z průtokového cytometru (procento životaschopných spor):

- 1 - "živé" spory - 90 %
- 2 - "mrtvé" spory - 3,81 %
- 3 - "mrtvé" ku "živé" spory v poměru 1:1 - 58 %
- 4 - "mrtvé" ku "živé" spory v poměru 3:1 - 35,3 %
- 5 - "mrtvé" ku "živé" spory v poměru 1:3 - 78,3 %

Bylo ověřeno, že PI je vhodný pro testování životaschopnosti spor *P.destructans* průtokovou cytometrií.

Prováděné testy na klíčivost dopadly logicky v rámci srovnání vyšetých spor v jednotlivých poměrech "živé" ku "mrtvé" (tab. 22), lišily se však od výsledků průtokové cytometrie.

Průtokový cytometr prostřednictvím PI totiž testuje okamžitou životaschopnost spor, nikoliv schopnost vyklíčení, která se může iniciovat v různou dobu výskytu spory na substrátu. Je možné, že některé vyklíčené spory by byly spočítatelné po delší době inkubace než 14 dní. Přestože se výsledná čísla životaschopných spor z průtokového cytometru a počet vyklíčených spor na médiích liší, výsledky ukazují, že jednotlivé poměry v porovnání spolu souhlasí.

Tabulka 22: Počet vyklíčených spor *P. destructans* na glukózo-kvasničném médiu po 14 dnech kultivace v 10 °C (ž - živé, m - mrtvé spory).

živé					
ředění	počet kolonií			průměrný počet kolonií	počet živých buněk (%)
	1	2	3		
1.zř (20x)	484	532	639	551,6666667	31,55
2.zř. (10x)	63	62	59	61,33333333	35,08
3.zř (10x)	5	6	11	7,333333333	41,95
				průměr →	36,20
mrtvé					
ředění	počet kolonií			průměrný počet kolonií	počet živých buněk (%)
	1	2	3		
1.zř (20x)	8	17	17	14	0,82%
2.zř. (10x)	3	1	1	1,666666667	1%
3.zř (10x)	0	-14	0	0	0,00%
				průměr →	0,60%
(ž:m; 1:1)					
ředění	počet kolonií			průměrný počet kolonií	počet živých buněk (%)
	1	2	3		
1.zř (20x)	181	154	161	165,3333333	9%
2.zř. (10x)	31	34	26	30,33333333	17,35%
3.zř (10x)	3	4	2	3	17,16%
				průměr →	15%
(ž:m, 3:1)					
ředění	počet kolonií			průměrný počet kolonií	počet živých buněk (%)
	1	2	3		
1.zř (20x)	363	343	409	371,6666667	21,26%
2.zř. (10x)	69	58	43	56,66666667	32,42%
3.zř (10x)	7	5	5	5,666666667	32%
				průměr →	28,70%
(ž:m, 1:3)					
ředění	počet kolonií			průměrný počet kolonií	počet živých buněk (%)
	1	2	3		
1.zř (20x)	72	83		77,5	4,43%
2.zř. (10x)		9	12	10,5	6,00%
3.zř (10x)	4	4		4	22,88%
				průměr →	11,10%

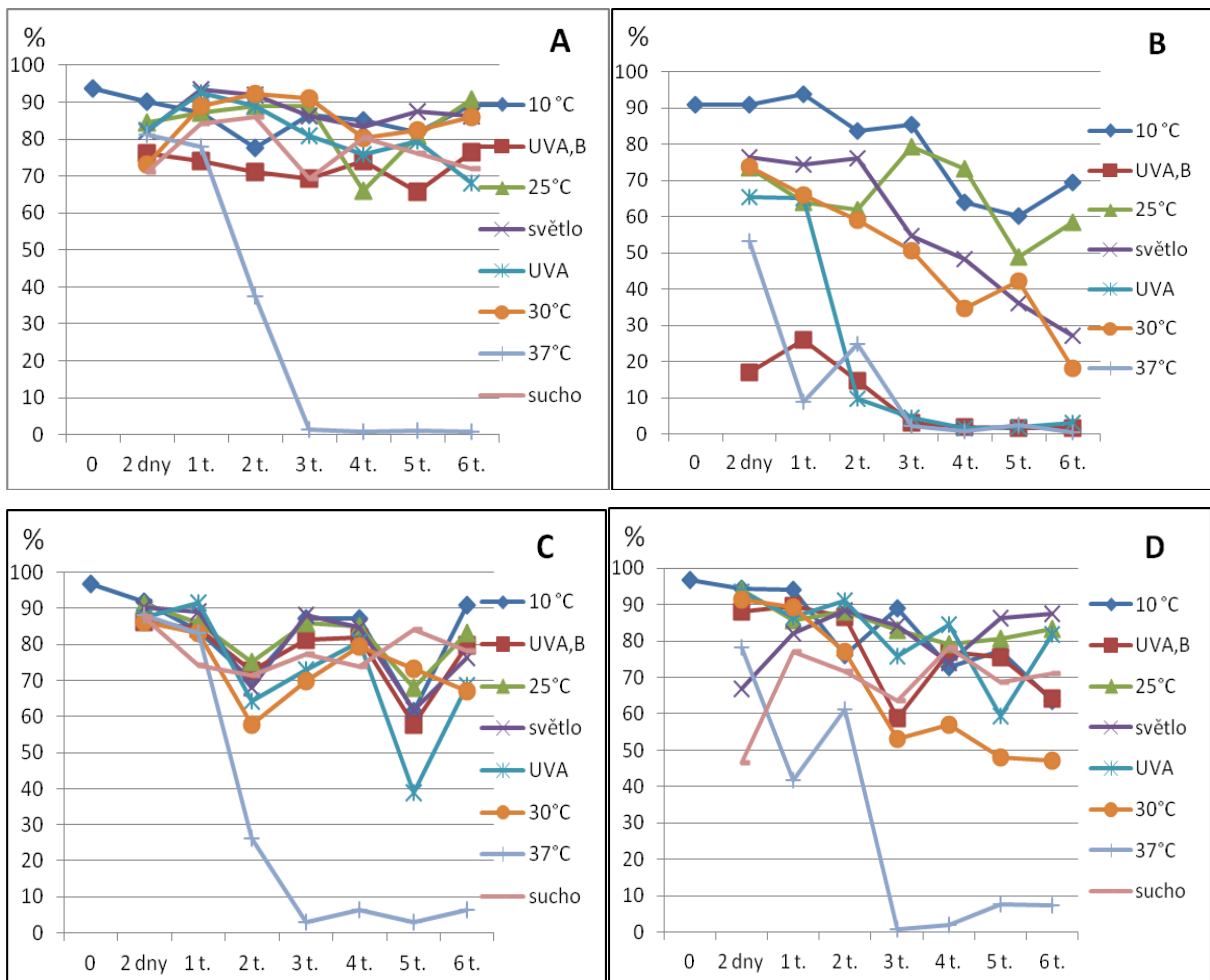
4.2.7. Testování životaschopnosti spor po působení různých forem nepříznivých podmínek

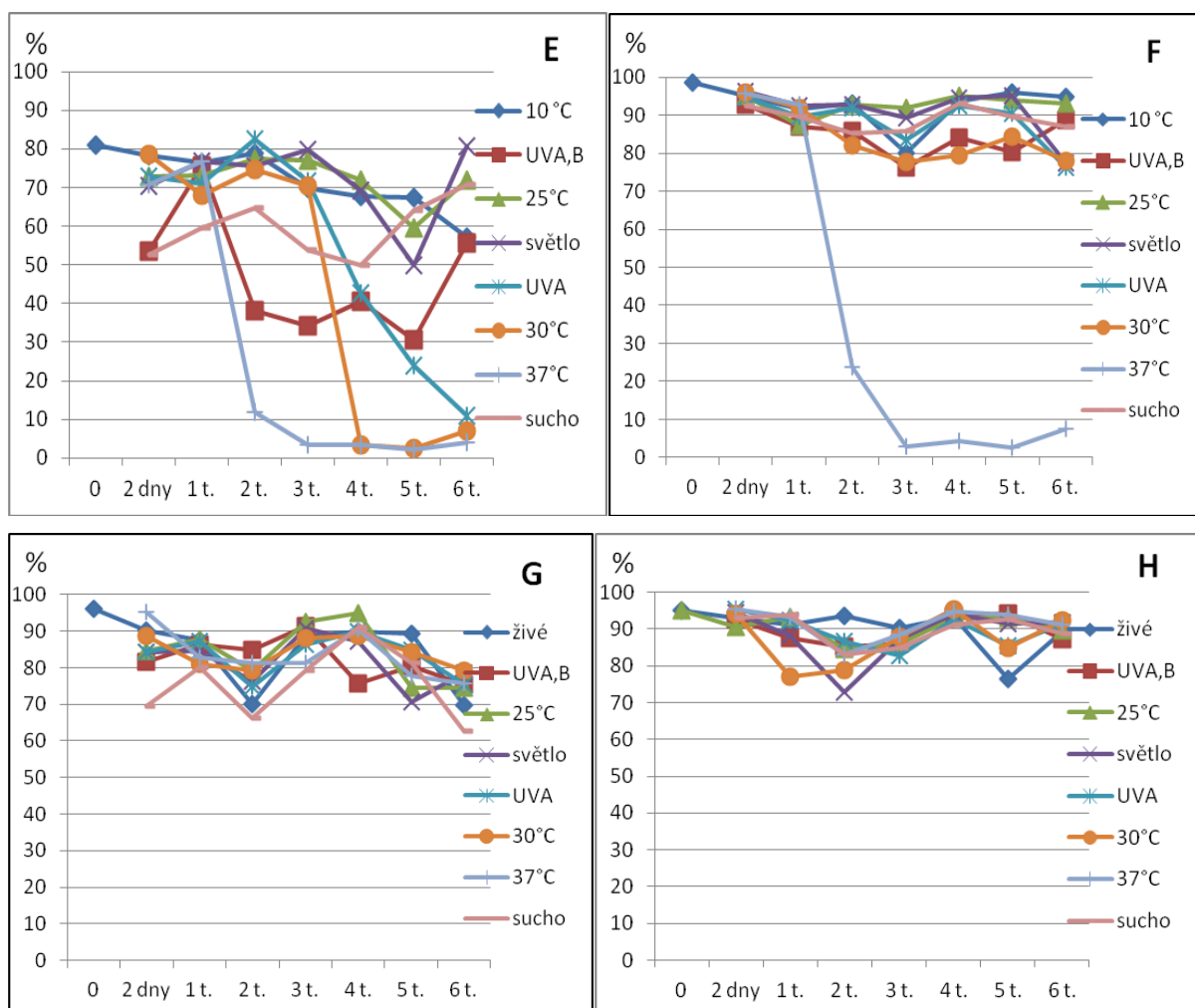
1. pokus - výsledky vlivu různých teplot a světla na životaschopnost spor

Výsledky jsou znázorněny v grafech (grafy 22 A-H), kde procento vyjadřuje počet životaschopných spor.

Všechny kmeny *P. destructans* a *Pseudogymnoascus* spp. byly citlivé na 37 °C, jejich téměř nulová životaschopnost se projevila po 3 týdnech inkubace spor v 37 °C. Dále bylo zjištěno, že izolát *P. destructans* CCF 3941 a *Pseudogymnoascus pannorum* AK 51/11 jsou citlivější. Izolát *P. destructans* (CCF 3941) se netestoval na nepříznivou podmínku nedostatek vzdušné vlhkosti, protože produkoval málo spor (ve stěru na vatovém tamponu nebyl dostatečný počet spor).

Izoláty *Aspergillus flavus* a *A. acidus* nebyly na žádnou z těchto podmínek citlivé.

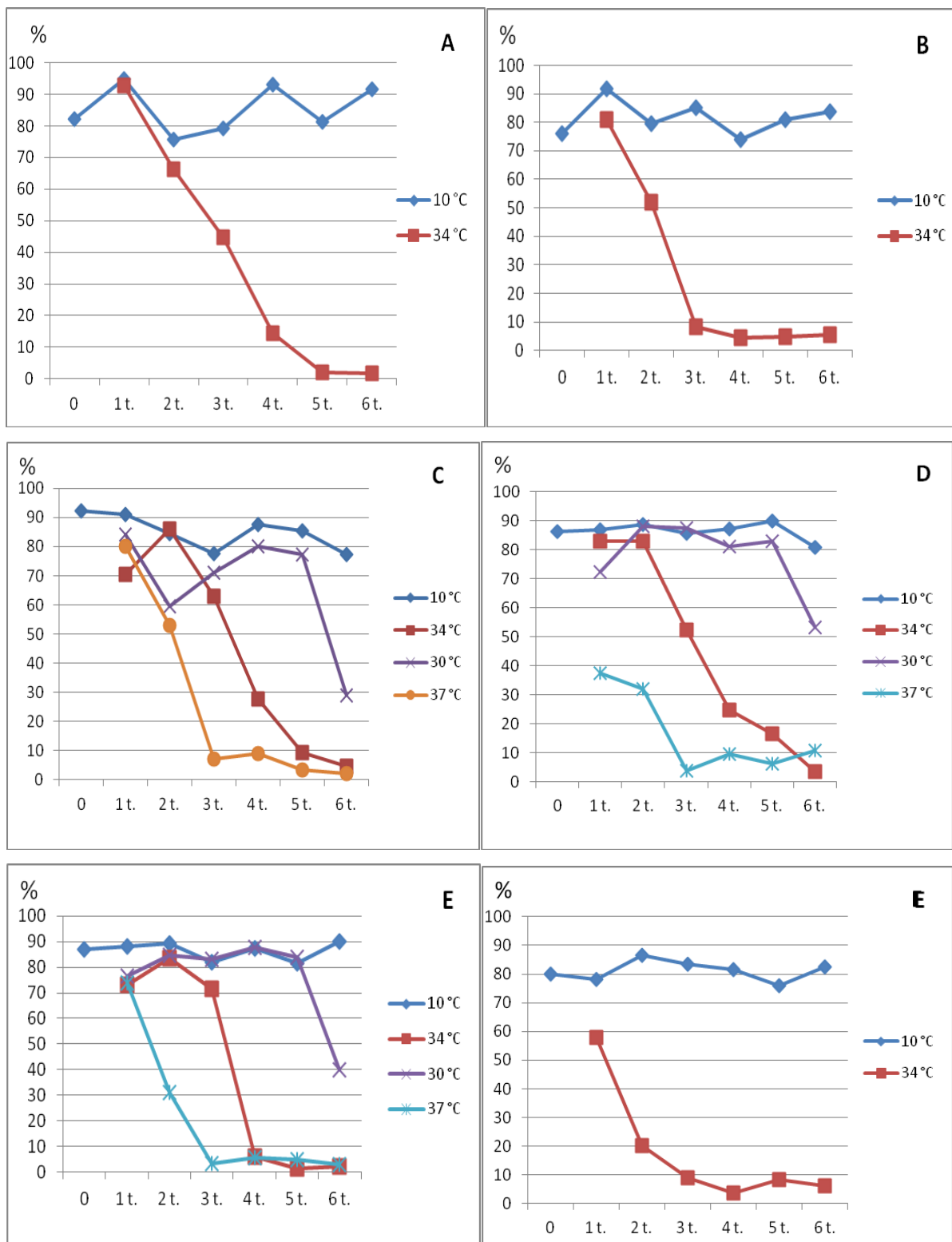




Graf 22: Zobrazení míry životaschopnosti spor jednotlivých izolátů hub (je znázorněno procento životaschopných spor) po působení nepříznivých podmínek. A - C - *P. destructans* (A - CCF 3938, B - CCF 3941, C - CCF 4132), D - *Pseudogymnoascus* sp. AK 77/11, E - *Pseudogymnoascus pannorum* AK 51/11, F - *Pseudogymnoascus* sp. AK 71/11, G - *Aspergillus flavus* CCF 3154 a H - *Aspergillus acidus* CCF 3984. Na ose x zkratka t. znamená týden.

2. pokus

Jednalo se o doplnění dat k 1. pokusu. Testovány byly ještě další izoláty *P. destructans*. Výsledky byly obdobné pro *P. destructans* jako v 1. pokusu. Jako zajímavý výsledek považují, že životaschopnost spor klesla k nule při uchovávání v teplotě 34 °C za týdnů, což je 2x delší doba než u teploty 37 °C. Výsledky jsou znázorněny v grafech 23 A - F.

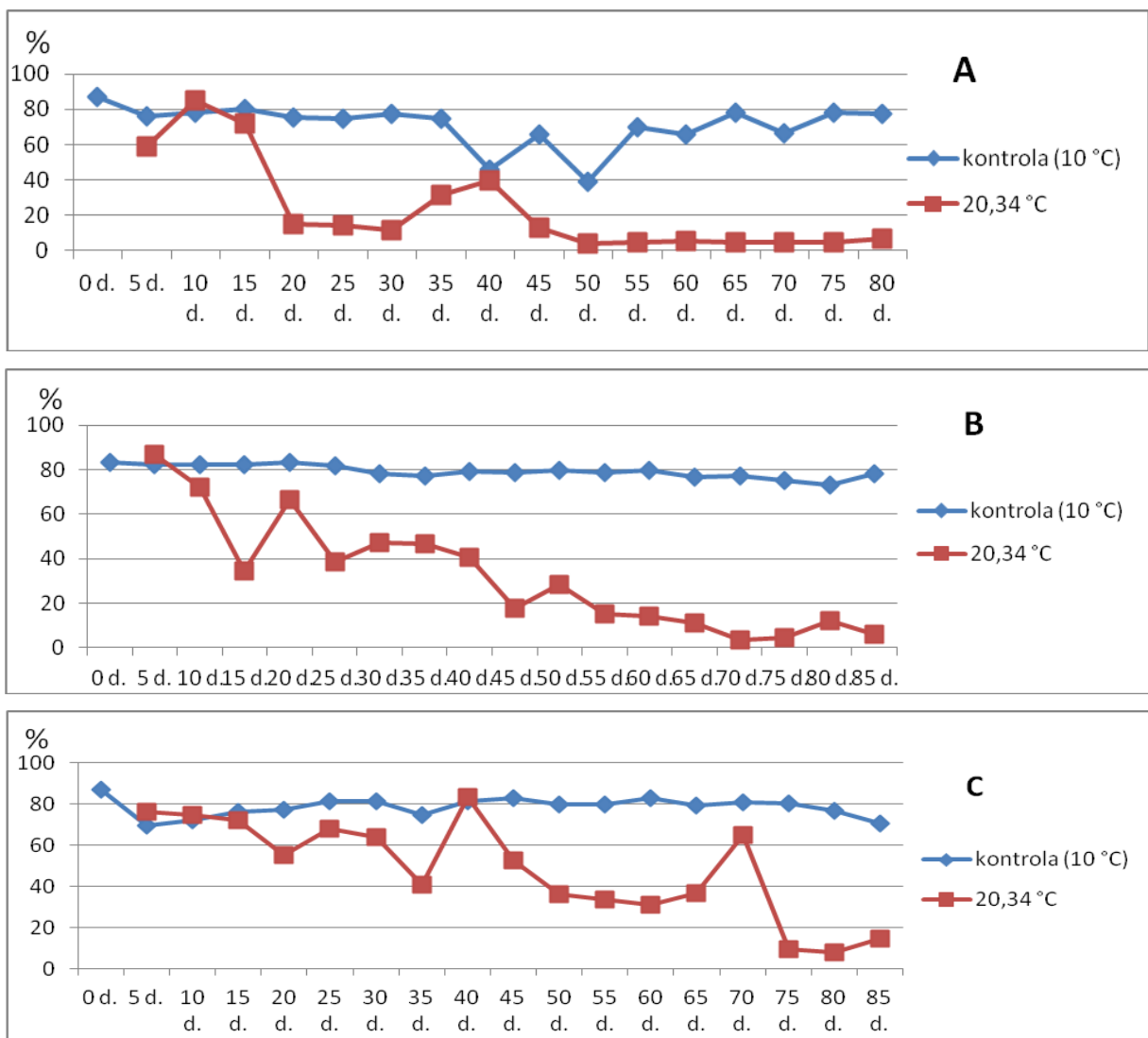


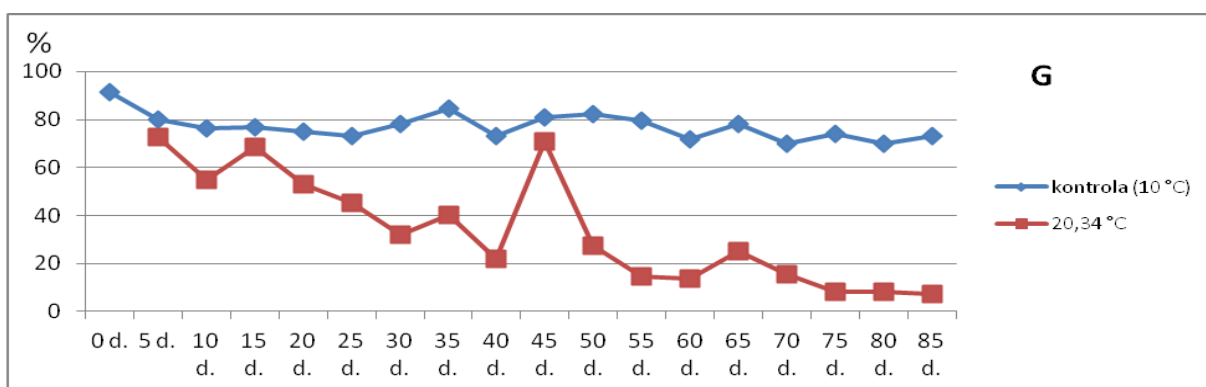
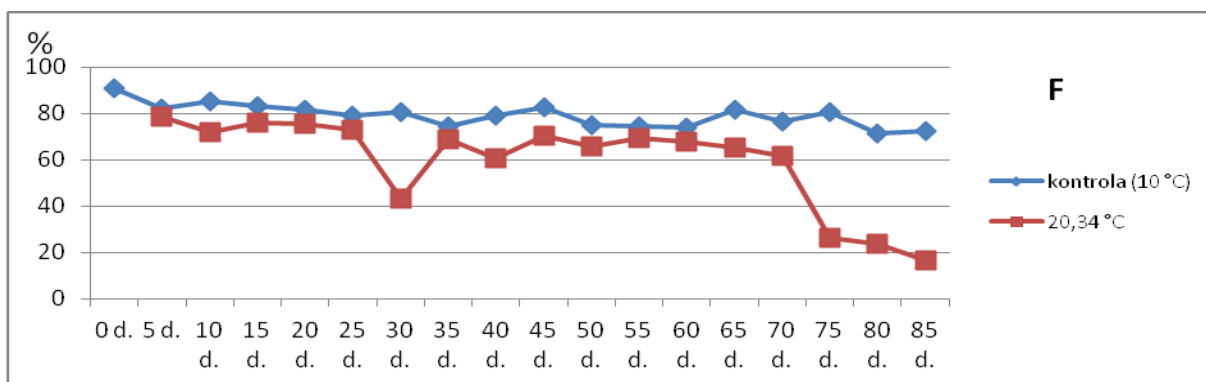
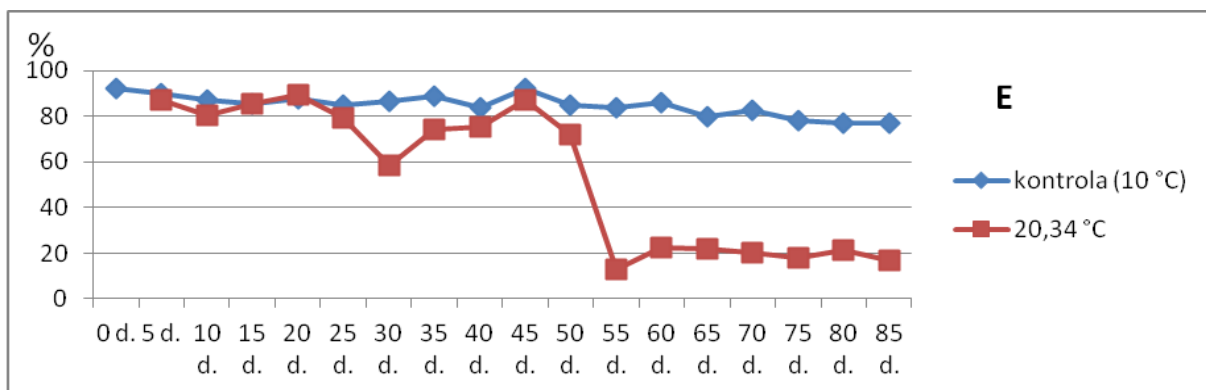
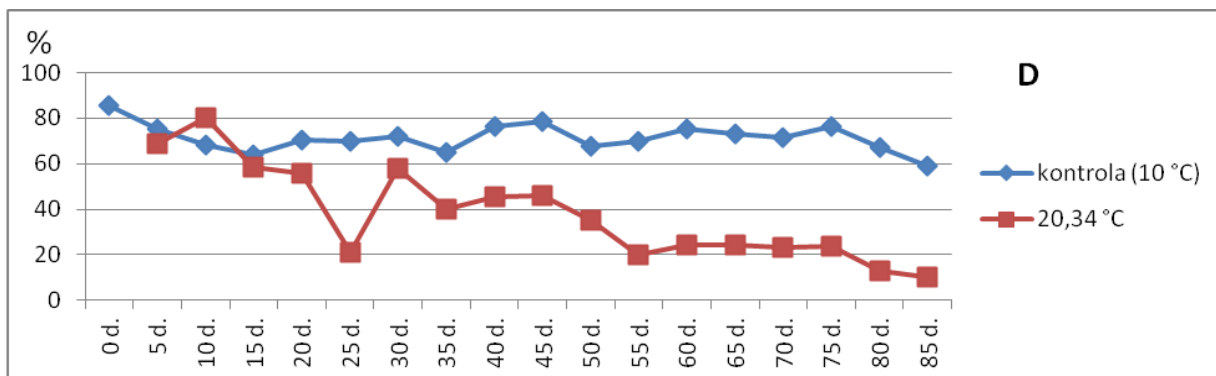
Graf 23: Zobrazení míry životaschopnosti spor jednotlivých izolátů *P. destructans* (je znázorněno procento životaschopných spor) po působení teplot 10 °C, 30 °C, 34 °C a 37 °C. A - CCF 3938, B - CCF 4132, C - CCF 3943, D - CCF 4124, E - CCF 4129 a F - CCF 3941. Na ose x zkratka t. znamená týden.

3. pokus

U většiny izolátů *P. destructans*, u nichž byl sledován vliv střídání teplot 20 °C a 34 °C po 12 h., kleslo procento životaschopnosti spor k 20 % (případně i níže) většinou po 55. dni. Pouze u CCF 3943 a CCF 4131 klesla životaschopnost spor ke zmiňované hodnotě až 75. den. Výsledky od všech testovaných izolátů *P. destructans* jsou znázorněny v grafech 24 A-G.

Tento výsledek by mohl potvrzovat domněnku, že netopýr by v určité době po hibernaci neměl již mít na sobě životaschopné spory.





Graf 24: Zobrazení míry životaschopnosti spor jednotlivých izolátů *P. destructans* (je znázorněno procento životaschopných spor). A - CCF 3938, B - CCF 3941, C - CCF 3943, D - CCF 4103, E - CCF 4124, F - CCF 4131 a G - CCF 4132.

4.3. Výsledky testování utilizace různých živin metodou Biolog

Metoda Biolog potvrdila různorodost utilizace substrátů jednotlivými skupinami hub.

Největší rozdíly mezi izoláty byly pozorovány při analýze PCA všech typů destiček Biolog (FF, PM3B, PM4A a PM5) (Obr. 22). Dále se výrazně liší v utilizaci substrátů na destičce FF a PM3B (PCA Obr. 23 a 26). Totéž potvrzuje One-way ANOSIM (tab. 24 a 25).

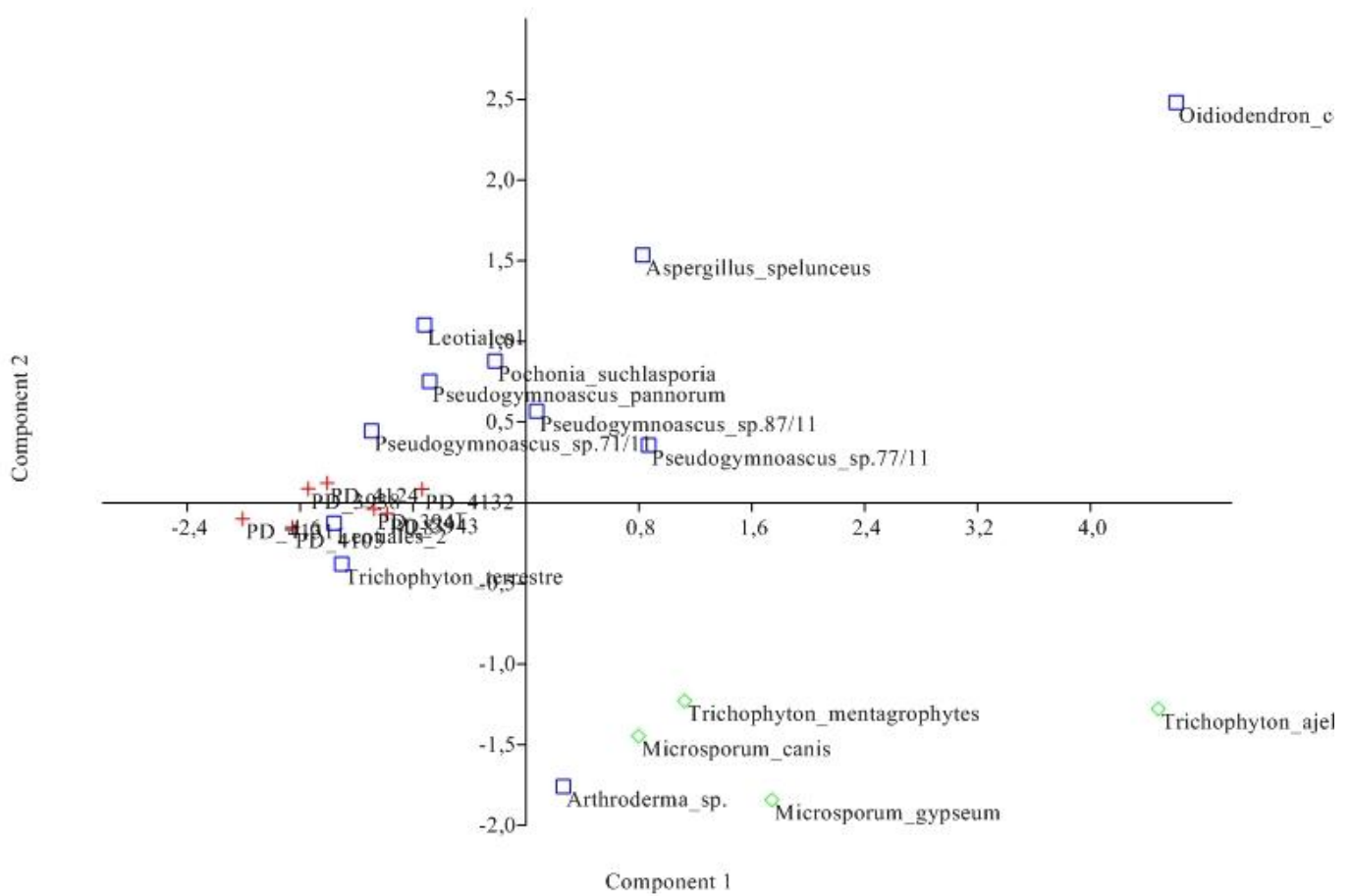
Metoda Biolog FF také ukázala variabilitu v rozdílu utilizace substrátů mezi testovanými kmeny hub, 1 PCA oddělila většinu kmenů *P. destructans* od ostatních kmenů hub, 2 PCA částečně oddělila dermatofyta od hub z podzemních prostor (PCA Obr. 23, One-way ANOSIM tab. 24). Totéž ukázala metoda Biolog PM3B, kde jsou všechny izoláty *P. destructans* soustředěny v 1 oblasti (PCA Obr. 26 a One-way ANOSIM tab. 25).

Metoda Biolog PM4A neukázala variabilitu mezi testovanými kmeny (PCA Obr. 29), dle One-way ANOSIM (tab. 26) byly od *P. destructans* signifikantně odlišeny dermatofyta. To ukazuje, že *P. destructans* umí využívat mnoho zdrojů fosforu a síry, nejsou tedy pro něj limitující vzhledem k výběru substrátu, zřejmé z regresní analýzy Shannonova indexu (SH) a substrátové bohatosti (SR) (Obr. 31). Naopak zdroje uhlíku a dusíku jsou pro něj limitující, protože má velmi omezený výběr substrátů, které dokáže využít, opět zřejmé z regresní analýzy Shannonova indexu a substrátové bohatosti (Obr. 29 a 30).

Metoda Biolog PM5 také ukázala variabilitu v rozdílu utilizace substrátů mezi testovanými skupinami izolátů (PCA Obr. 32 a One-way ANOSIM tab. 27), neboť PCA 2 zcela odděluje *P. destructans* od ostatních izolátů.

Testování Shannonova indexu diverzity pro destičky FF a PM3B ukázalo signifikantní rozdíl mezi *P. destructans* a izoláty z podzemních prostor (Obr. 25 a 26, tab. 29 a 30). U destiček PM4 se Shannonův index diverzity signifikantně lišil mezi *P. destructans* a skupinou dermatofyta (Obr. 27, graf 31), u destiček PM5 byl prokázán signifikantní rozdíl mezi všemi skupinami (Obr. 28, graf 32).

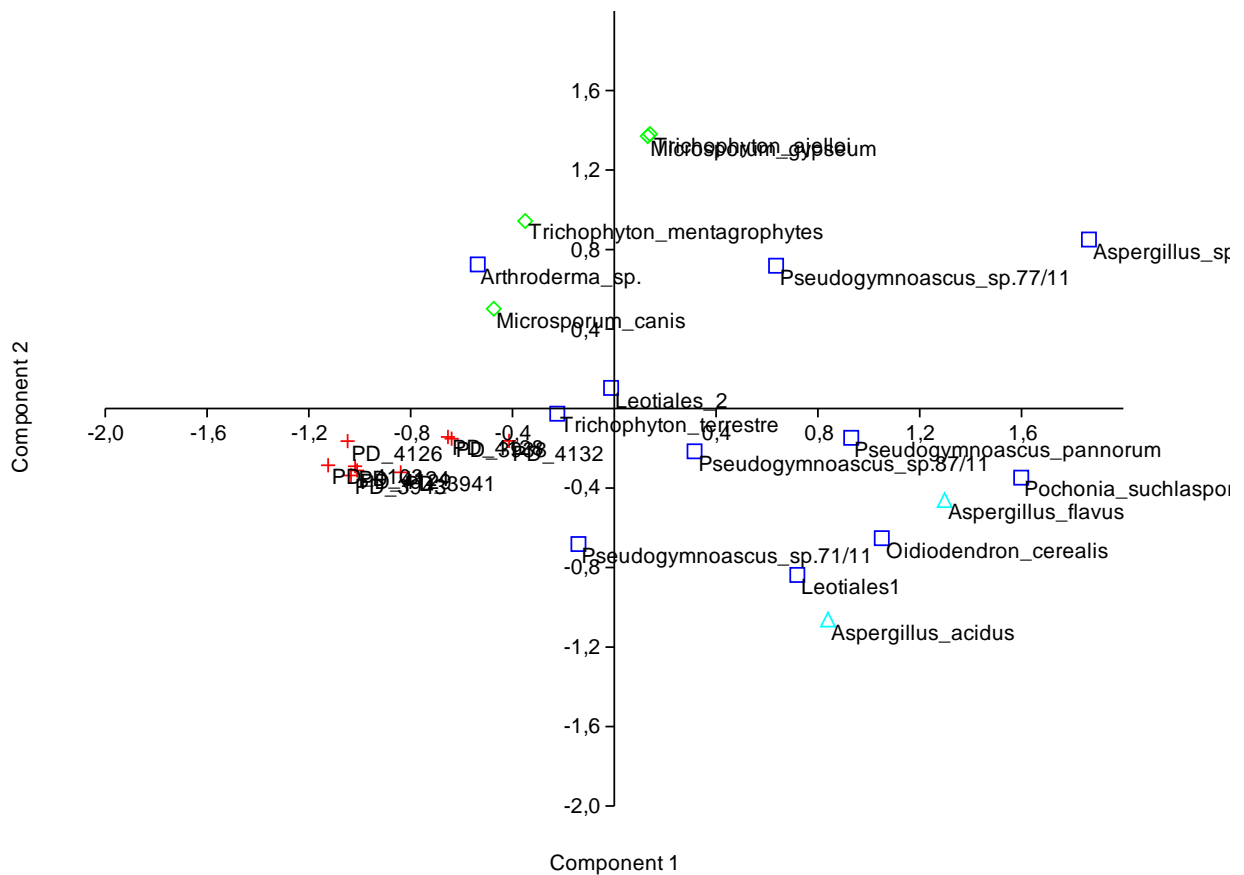
V tab. 28 jsou vypsány substráty na jednotlivých destičkách Biolog, které *P. destructans* dokázal nejlépe využít.



Obr. 22: Hromadná PCA analýza hodnot ze všech typů destiček Biolog. Hodnota variability osa x 36,98 %, osa y 12,99 %.

Tabulka 23: One-way ANOSIM, hromadná analýza všech typů destiček Biolog.

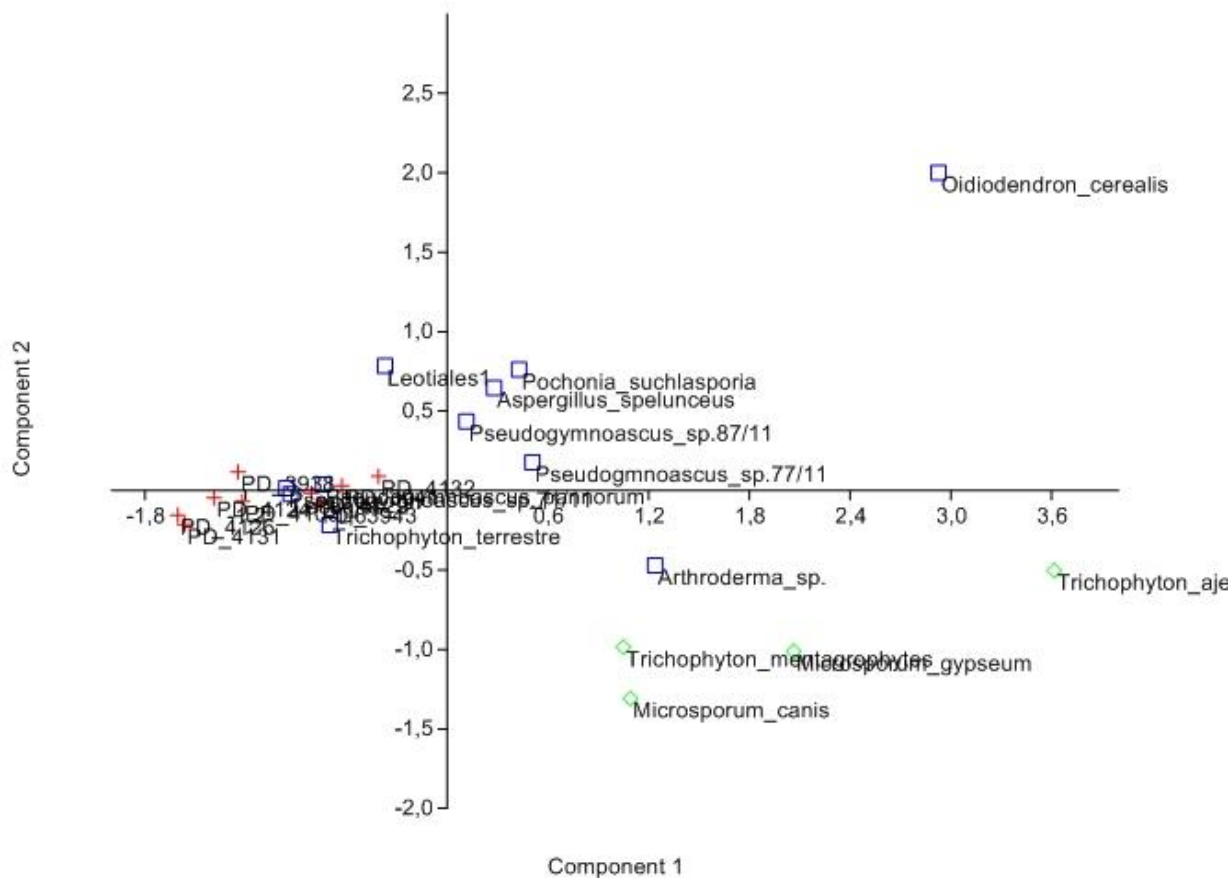
	<i>P. destructans</i>	jeskynní izoláty	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,0005	0,0023
jeskynní izoláty	0,0005	-	0,4867
dermatofyta	0,0023	0,4867	-



Obr. 23: PCA analýza destiček Biolog FF. Hodnota variability osa x 32,79 %, osa y 17,61 %.

Tabulka 24: One-way ANOSIM, analýza destiček Biolog FF.

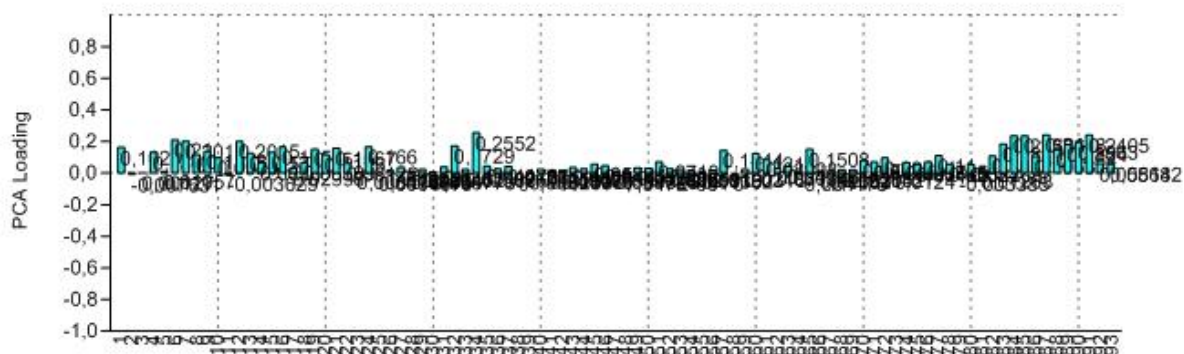
	<i>P. destructans</i>	h. z podzem.prostor	aspergily	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,0001	0,019	0,003
h. z podzem.prostor	0,0001	-	0,3101	0,0065
aspergily	0,019	0,3101	-	0,0627
dermatofyta	0,003	0,0065	0,0627	-



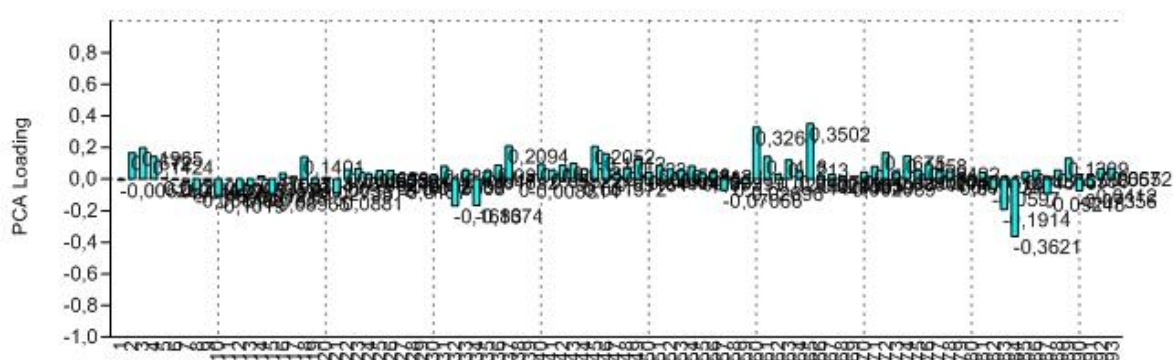
Obr. 26: PCA analýza destiček Biolog PM3B. Hodnota variability osa x 52,36 %, osa y 11,82 %.

Tabulka 25: One-way ANOSIM, analýza destiček Biolog PM3B.

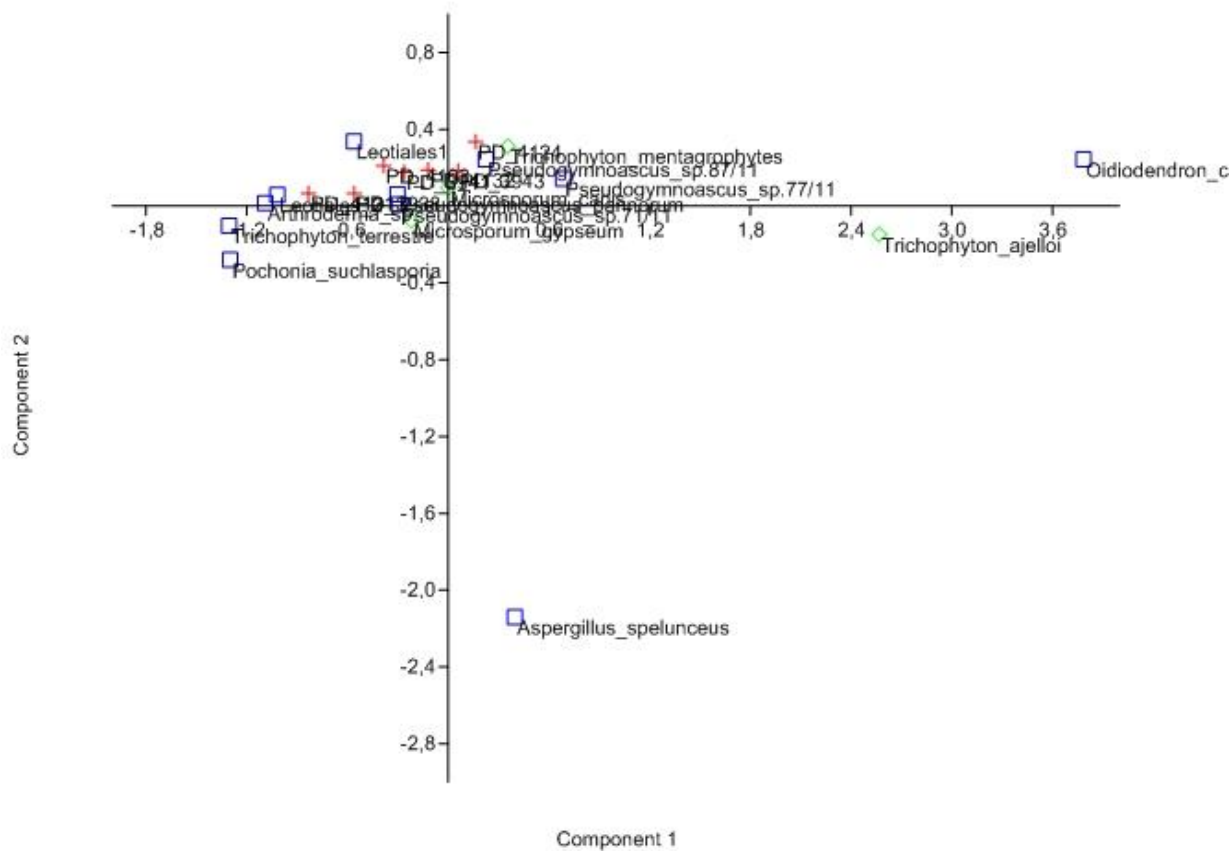
	<i>P. destructans</i>	h. z podzem.prostor	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,0005	0,0011
h. z podzem.prostor	0,0005	-	0,059
dermatofyta	0,0011	0,059	-



Obr. 27: Loading z PCA analýzy PM3B destiček Biolog, zobrazuje korelaci substrátů k dané ose - komponentě C1.



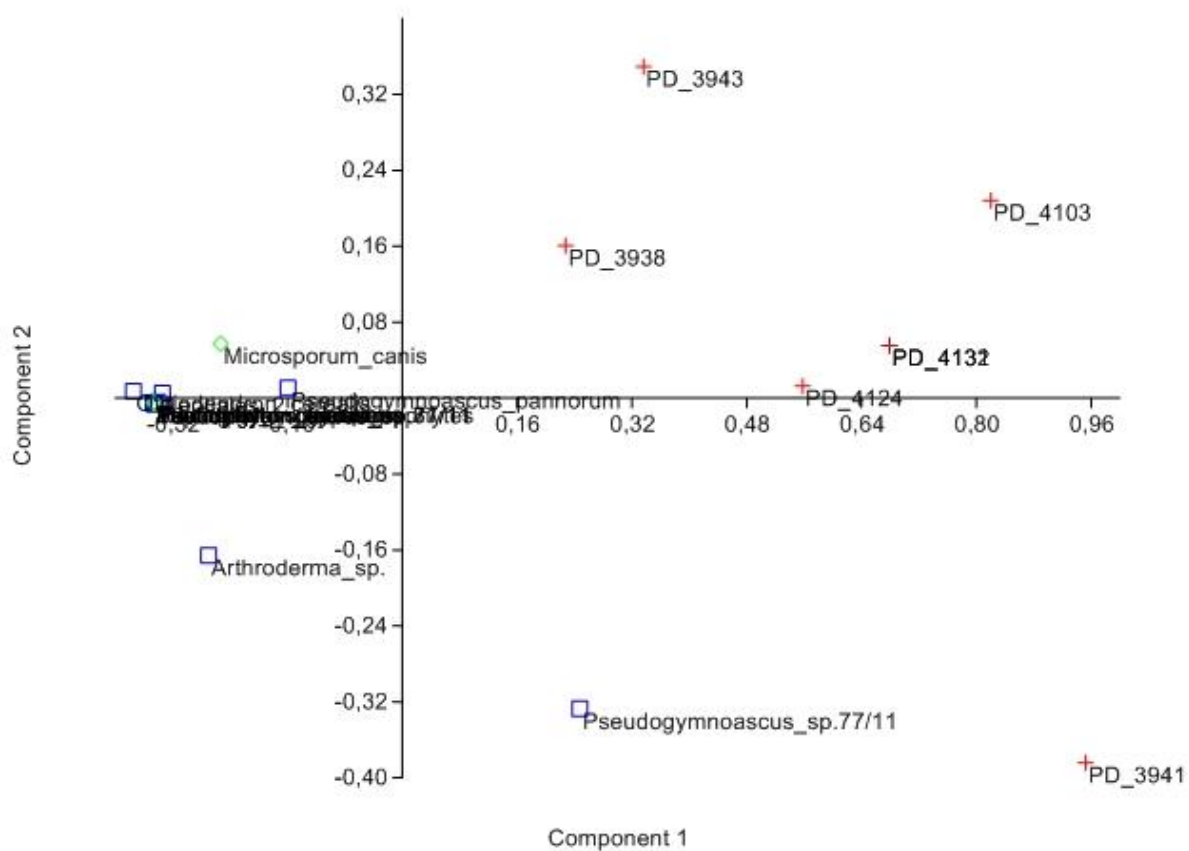
Obr. 28: Loading z PCA analýzy PM3B destiček Biolog, zobrazuje korelaci substrátů k dané ose - komponentě C2.



Obr. 29: PCA analýza destiček Biolog PM4A. Hodnota variability osa x 59,53 %, osa y 10,88 %.

Tabulka 26: One-way ANOSIM, analýza destiček Biolog PM4A.

	<i>P. destructans</i>	h. z podzem.prostor	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,7199	0,0215
h. z podzem.prostor	0,7199	-	0,9781
dermatofyta	0,0215	0,9781	-



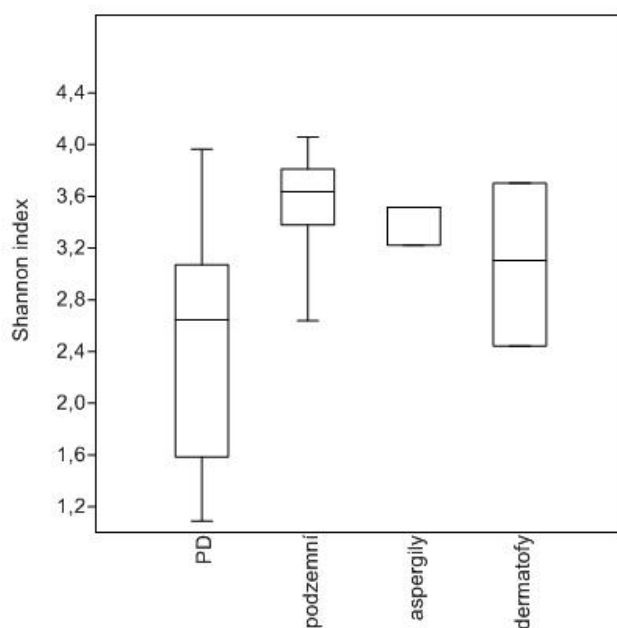
Obr. 32: PCA analýza destiček Biolog PM5. Hodnota variability osa x 62,75 %, osa y 6,7 %.

Tabulka 27: One-way ANOSIM, analýza destiček Biolog PM5.

	<i>P. destructans</i>	h. z podzem.prostor	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,0193	0,0023
h. z podzem.prostor	0,0193	-	0,9572
dermatofyta	0,0023	0,9572	-

Tabulka 28: Nejvíce utilizované substráty kmeny *P. destructans* na jednotlivých destičkách Biolog.

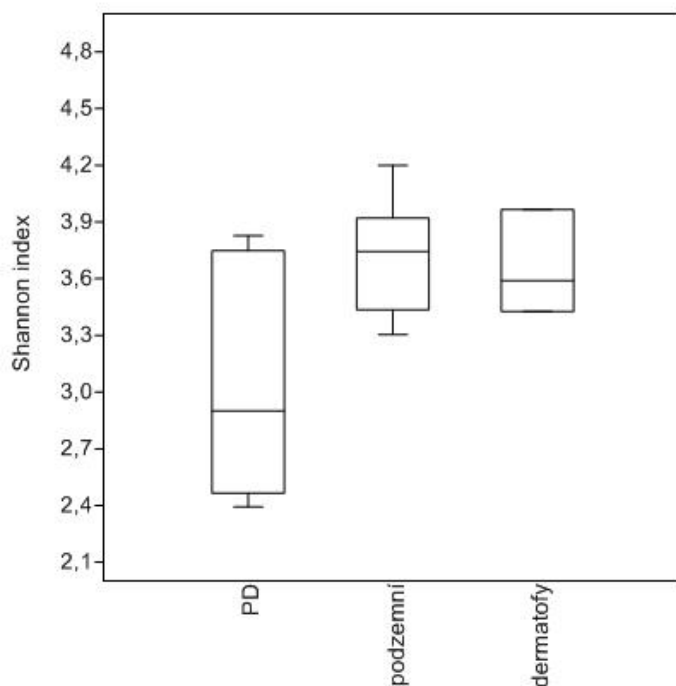
FF	PM3	PM4	PM5
D-fruktoza	močovina	2-deoxy-D-glukóza 6-fosfát	L-lysin
gentibiosa	gly-gln	D-3-fosfo-glycerová kyselina	L-tyrosin
α -D-glukoza	allantoin	O-fosforyl-ethanolamin	L-leucine
D-manosa	gly-glu	cytidine-2'-monofosfát	deferoxamin mesylát
D-trehalosa	ala-asn	guanosine-2'-monofosfát	L-homoserin lakton
L-alanin	ala-gly	adenosine-2'-monofosfát	D-(+)-glukóza
	amoniak	6-fosfo-glukonová kyselina	D-alanin
	dusičnan	O-fosfo-L-serin	D,L- α,ϵ -Dlamino-pimelová kys.
	glycine	guanosine-5'-monofosfát	orotic acid
	kyselina močová	cytidine-3'-monofosfát	β -alanin
	ala-thr		
	N-acetyl-D-glukosamin		



Graf 25: Krabicový diagram Shannonova indexu Biolog destičky FF.

Tabulka 29: Mann-Whitney analýza Shannonova indexu pro destičky FF Biolog.

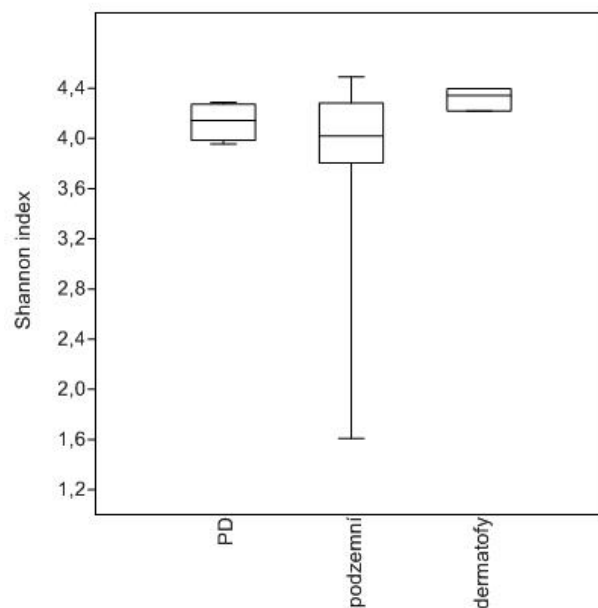
	<i>P. destructans</i>	h z.podzem. prostor	aspergily	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,006706	0,1071	0,1376
h z.podzem. prostor	0,04024	-	0,3744	0,1332
aspergily	0,6427	1	-	0,4875
dermatofyta	0,8254	0,7995	1	-



Graf 26: Krabicový diagram Shannonova indexu Biolog destičky PM3B.

Tabulka 30: Mann-Whitney analýza Shannonova indexu pro destičky PM3B Biolog.

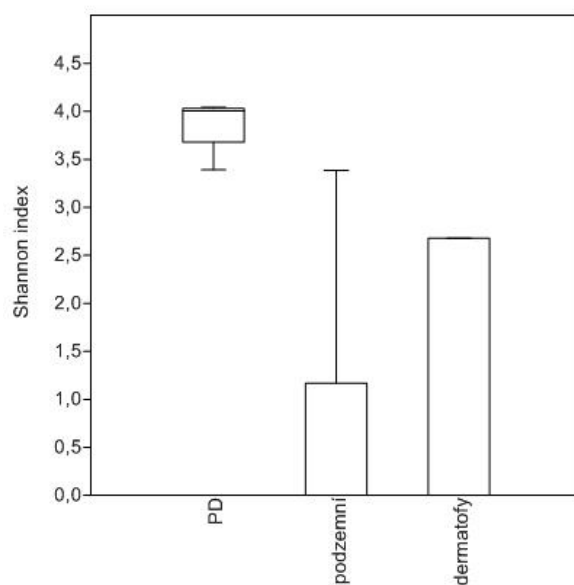
	<i>P. destructans</i>	h. z podzem. prostor	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,01851	0,1897
h. z podzem. prostor	0,05554	-	0,8447
dermatofyta	0,569	1	-



Graf 27: Krabicový diagram Shannonova indexu Biolog destičky PM4A.

Tabulka 31: Mann-Whitney analýza Shannonova indexu pro destičky PM4A Biolog.

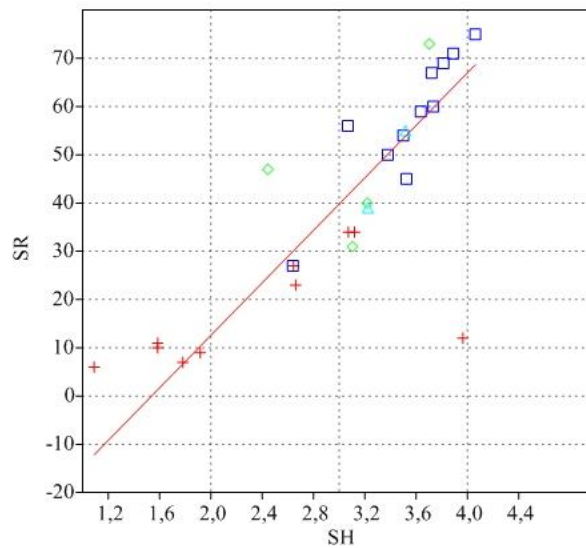
	<i>P. destructans</i>	h. z podzem. prostor	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,415	0,04722
h. z podzem. prostor	1	-	0,1027
dermatofyta	0,1417	0,3081	-



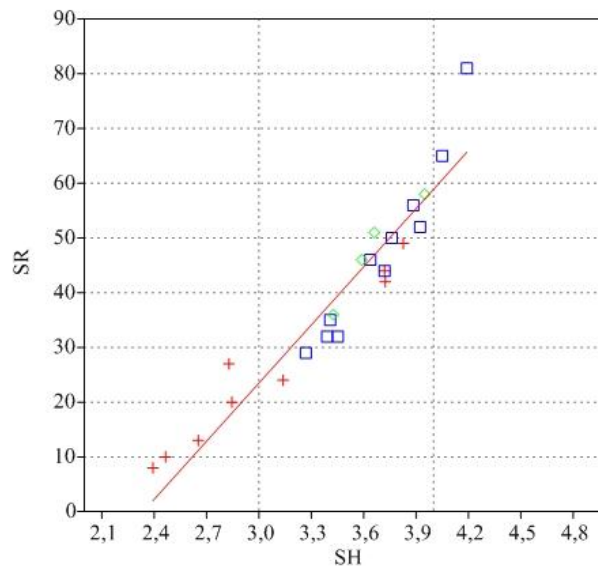
Graf 28: Krabicový diagram Shannonova indexu Biolog destičky PM5.

Tabulka 32: Mann-Whitney analýza Shannonova indexu pro destičky PM5 Biolog.

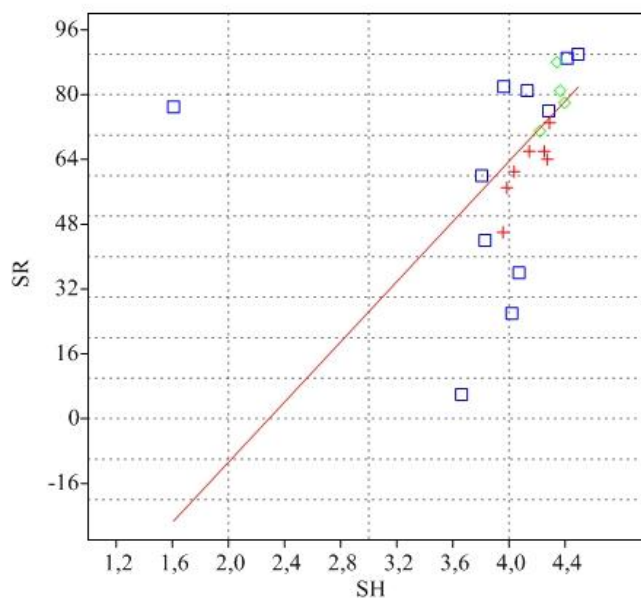
	<i>P. destructans</i>	houby z podzem. prostor	dermatofyta
<i>P. destructans</i>	-	0,0004527	0,00986
houby z podzem.prostor	0,001358	-	0,6062
dermatofyta	0,02958	1	-



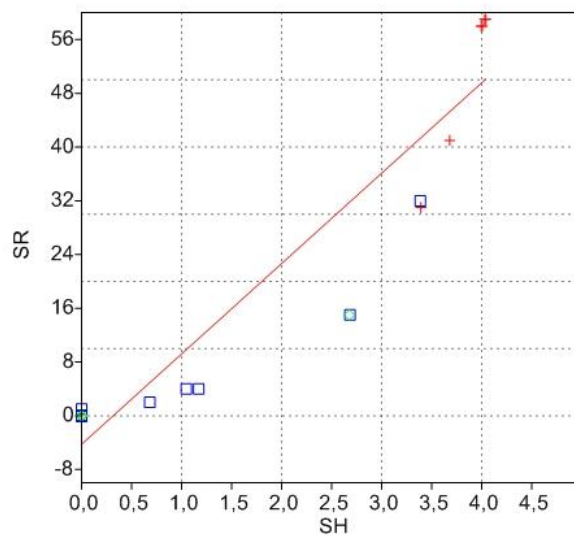
Graf 29: Regresní analýza (program PAST) substrátové bohatosti (SR) se Shanonnovým indexem (SH) pro destičky Biolog FF. $R^2 = 0,69$, $p < 0,0001$.



Graf 30: Regresní analýza substrátové bohatosti (SR) se Shanonnovým indexem (SH) pro destičky Biolog PM3B. $R^2 = 0,83$, $p < 0,0001$.



Graf 31. Regresní analýza substrátové bohatosti (SR) se Shanonnovým indexem (SH) pro destičky Biolog PM4A. $R^2 = 0,56$, $p < 0,0001$.



Graf 32. Regresní analýza substrátové bohatosti (SR) se Shanonnovým indexem (SH) pro destičky Biolog PM5. $R^2 = 0,881$, $p < 0,0001$.

5. Diskuze

5.1. Vytváření selektivního média

Jedním z cílů bylo vytvořit selektivní médium, což byl časově velmi náročný úkol, protože bylo třeba zkoumat více ekologických nároků *P. destructans* postupně. Zvolenou metodou bylo měření velikost kolonií v průměru, což je běžně používaná metoda pro tento účel (Andrews et Pitt, 1986; Kubátová et al., 2011). V počátku byly zkoumány růstové schopnosti *P. destructans* na více izolátech (kapitola 3.1.1. na 7 dostupných izolátech, kapitola 3.1.2. na 10 izolátech). Ukázalo se, že hodnoty od jednotlivých izolátů se výrazně neliší, proto se vybraly 3 izoláty *P. destructans*, s kterými probíhaly další kultivační experimenty. Výsledky se u těchto 3 kmenů (CCF 3938, CCF 3941 a CCF 4132) většinou příliš neodlišovaly. Největší rozdíly byly zaznamenány u testování citlivosti na antimykotika dodin a CTAB, kdy dva izoláty *P. destructans* (CCF 3938 a CCF 3941) projevovaly mírnou toleranci, na rozdíl od izolátu CCF 4132.

Některé růstové schopnosti *P. destructans* byly již zkoumány v dřívějších studiích na amerických či evropských izolátech.

Jednou z těchto studovaných vlastností je rychlost růstu izolátů *P. destructans* z USA a z Evropy (Německo, Švýcarsko, Maďarsko) v rozmezí teplot od 0 do 20 °C na médiu SDA (Verant et al., 2012). Růstové optimum se pohybovalo v rozmezí 12,5 °C až 13,8 °C, vymykalo se tomu švýcarský izolát (optimum 15,8 °C). České izoláty optimálně narůstaly na médiích SDA a GK v 10 °C i ve 13 °C, hodnoty byly téměř rovnocenné. Odchylna může být způsobena jinou schopností růstu českých izolátů nebo použitím jiné metodiky měření. Verant et al. (2012) měřily celkovou plochu kolonie, zatímco v této práci byl měřen průměr.

Kubátová et al. (2011) se zabývali charakteristikou růstu na různých kultivačních médiích. Použili stejná média jako v této práci (v 10 °C), akorát jejich pokus probíhal ve 12 °C a v 15 °C. Výsledky se nedají zcela srovnat pro odlišné kultivační teploty. Je však zřetelné, že rychlosti růstu ve srovnání mezi jednotlivými médii byly podobné s výsledky v této práci kromě média SEGA, kde Kubátová et al. (2011) udává větší kolonie.

V jiné studii (Raudabaugh et Miller, 2013) také testovali citlivost *P. destructans* na pH 5 - 11. Nejistili signifikantní rozdíly ve velikosti kolonií. V mé práci byly testovány varianty médií s pH o větším rozmezí (2,5 až 11,5), kdy bylo zjištěno, že průměry kolonií se směrem k extrémním hodnotám pH zmenšovaly. Mírný rozdíl výsledků by mohl být způsoben použitím odlišného média, nemělo by to však způsobit tak výrazné rozdíly. Více

pravděpodobné však je, že americké izoláty, které byly testovány, mohou reagovat jinak, tak jako se ukázalo v práci Verant et al. (2012) studující teplotní charakteristiky.

Testováním antimykotik se zabývali Chaturvedi et al. (2011) prostřednictvím metod ETESTU a destiček YeastOne. Ačkoli v mé práci byla použita jiná metoda - ITEST, byly zjištěny u českých izolátů *P. destructans* podobné výsledky u daného výběru testovaných antimykotik.

Po zjištění všech růstových schopností *P. destructans* zjištěnými dílčími pokusy bylo sestaveno složení 1. typu selektivního média (kapitola 3.1.8.) a následně bylo testováno obvyklým způsobem (měření průměru kolonií). Metoda prokázala použitelnost média. Ve fázi testování klíčivosti jednotlivých spor *P. destructans* na selektivním médiu byl objeven problém, jelikož po 14 dnech kultivace nebyly počítatelné žádné viditelné kolonie. Důvodem může být, že při metodě měření průměru kolonií, kdy bylo na médium inokulováno větší množství spor včetně hyf (vždy podobná velikost inokula 1x1x1 mm), byla vždy nějaká spora schopna vyklíčit, tudíž se netolerance k novému navrhnutému médiu neprojevila. V případě testování klíčivosti spor na médiu se však může nedostatek tolerance houby k médiu projevit výrazněji, protože na médium je vyséváno jen malé množství spor (desítky), a to jednotlivých. Dalším vysvětlením jsou odlišné nutriční nároky spor a hyf, kdy spory potřebují ke klíčení některou z esenciálních látek z kvasničného extraktu. V tomto případě se nabízí testování klasických esenciálních růstových látek (některé aminokyseliny, vitaminy, mastné kyseliny) za účelem poznání regulace klíčení spor *P. destructans*. Tímto regulátorem by mohly být například mastné kyseliny na kůži netopýrů. Naopak absence těchto látek v okolním prostředí by vysvětlila specifickou ekologii této houby.

Na základě tohoto problému v práci soudím, že by se nová navrhovaná média měla testovat spíše metodou stanovování klíčivosti spor. Nevýhodou této metody však je, že je náročnější na přípravu a vyhodnocení.

Vytvoření selektivního média bylo vytvořeno za účelem úspěšnější izolace *P. destructans* z environmentálních vzorků (zejména z jeskynního sedimentu). Lorch et al. (2012a, 2012b) se ve svých studiích pokoušeli izolovat ze sedimentu *P. destructans* prostřednictvím média SDA. *P. destructans* se jim podařilo zachytit, ale v malém procentu vzorků. Selektivní médium by mohlo záchytnost *P. destructans* zvýšit. V této studii se prokázalo (kapitola 4.1.12.), že selektivní médium (GK15) při kultivační teplotě 10 °C

výrazně omezuje růst rychleji rostoucích hub vyskytujících se v sedimentu z podzemních prostor.

5.2. Testování životaschopnosti spor - metodika

Při volbě a vytváření metodického postupu pro zjišťování životaschopnosti spor přicházely v úvahu různé typy metodických přístupů (fluorescence, klíčivost spor). V mé práci byla zvolena metoda průtokové cytometrie za použití fluorescenčního značení.

Bylo vyzkoušeno fluorescenční značení FUN-1, v jehož parametrech je, že je schopen značit mrtvé a živé (popřípadě polomrtvé) spory zároveň, což by bylo pro řešení úkolu velmi praktické. Při testování FUN-1 se ukázalo, že značení není vhodné. Jako vhodný pufr se ukázal doporučený - Na-HEPES s 2% glukózy (Anonymus, 2001; Millard et al., 1997), za jehož použití ve sporách *P. destructans* intravakuolární struktury (CIVS) byly pozorovatelné, ale ne zcela dobře. Další testování bylo zaměřeno na dva faktory - na délku inkubace a inkubační teplotu spor (vzhledem k psychrofilnosti *P. destructans*) s FUN-1. V dostupných studiích inkubovali spory hub např. 30 min ve 30 °C v temnu (Eggleston et Marshall, 2007), 45 min ve 30 °C (Balajee et al., 2002) či 30 min ve 35 °C (Wenisch et al., 1997). Vhodná kombinace inkubačních podmínek nebyla nalezena. Možnou příčinou by mohla být psychrofilie a pomalý metabolismus *P. destructans*. Životaschopnost spor proto nemohla být testována prostřednictvím FUN-1.

Jako vhodný prostředek pro zjišťování životaschopnosti prostřednictvím fluorescence na průtokovém cytometru se ukázalo fluorescenční značení propidium jodidem (PI), běžně používané pro dané účely (Green et al., 1994 a 1999; Ramani et Chaturvedi, 2000; Chaturvedi et al., 2004).

Použití průtokové cytometrie je velmi rychlá metoda, která zanalyzuje velké množství buněk (v této práci 10 tisíc). Takovéto velké množství vyšetřených spor snižuje chybu oproti testování malého množství spor, např. 50. Za nedostatek by mohlo být považováno, že při každém měření byl každý izolát měřen jen z 1 misky ve 3 oddělených vzorcích (tzv. tři pseudo-opakování). Výsledky však byly poměrně logické a zároveň bylo testováno v rámci druhu *P. destructans* více izolátů, které reagovaly na většinu nepříznivých podmínek podobně. Vzhledem k tomu, že byl testován větší počet izolátů hub, bylo by velmi časově a prostorově náročné testovat životaschopnost během jednoho měření u jednoho kmenu houby ze dvou či tří misek.

Dalším přístupem testování životaschopnosti spor je klíčení jednotlivých spor na médiu (např. Braga et al., 2002). Metoda má dvě nevýhody. První je, že je časově mnohem náročnější, tudíž by se nezvládlo otestovat tolik izolátů hub a variant nepříznivých podmínek. Druhým z nich je, že by nebylo testováno tak velké množství spor, ale jen např. množství 50 až 100 spočítatelných na Petriho misce s kultivačním médiem, takže by výsledky nebyly tak názorné jako u použití průtokové cytometrie s možností testovat mnohonásobně větší počet spor.

Pokud by v této práci byla životaschopnost spor testována prostřednictvím klíčivosti spor, byly by pravděpodobně jiné výsledky, které by vypovídaly o schopnosti spor vyklíčit. To se ukázalo v kapitole 4.2.6. při srovnání metody průtokové cytometrie a klíčivosti spor. Propidium jodid proniká do mrtvých spor, výsledek nám tedy ukáže absolutní číslo mrtvých a živých spor. Při metodě zjišťující procento vyklíčených spor však všechny nemusí vyklíčit najednou ve stejnou dobu, u některých může být iniciace klíčení delší a některé, i když jsou "živé", nemusí vyklíčit vůbec.

5.3. Testování životaschopnosti spor - výsledky

V práci se podařilo zanalyzovat na schopnost spor přežít v nepříznivých podmínkách více izolátů houby *P. destructans* a jí příbuzných izolátů. Testované abiotické proměnné (světlo, teplota nad 30 °C) měla sledovat podmínky, s kterými by se *P. destructans* mohlo setkat, když se dostane mimo prostředí jeskyně (podzemní prostory). Testované podmínky byly nastaveny kontinuálně a neměně po dobu trvání pokusu. V reálném prostředí jedna podmínka nepůsobí neměně po stanovenou dobu a daných faktorů může působit více najednou. Tudíž nám výsledky ze studia životaschopnosti spor hub poskytují orientační představu, jak by mohly spory reagovat v přírodě. Snižování životaschopnosti spory houby tedy nebude v přírodě pravděpodobně tak rychlé jako v laboratorních podmínkách.

Všechny izoláty *P. destructans* nebyly životaschopné po 3 týdnech uchovávání v 37 °C a po 6 týdnech uchovávání v 34 C. Příbuzné kmeny hub nebyly životaschopné po stejné době uchovávání v 37 °C. To ukazuje, že tyto houby nejsou fyziologicky přizpůsobeny, aby přežily dlouhodobé působení takto vysokých teplot. Na působení světelných nepříznivých podmínek (UVA, UVB, světlo) nebyly tak citlivé, s výjimkou izolátu *P. destructans* CCF 3941 a *Pseudogymnoascus pannorum*. Izoláty hub (*Aspergillus flavus*, *A. acidus*) vyskytujících se běžně v ovzduší nebyly citlivé na žádnou testovanou podmínku. Výsledky ukazují, že *P. destructans* se v tomto neodlišuje od příbuzných izolátů *Pseudogymnoascus*

spp., které se také běžně vyskytují v podzemních prostorách (Bosák et al., 2000; Nováková, 2009; Bastian et al., 2010), pro ně v optimálním prostředí.

Na základě zjištění, že *P. destructans* není schopen přežít dlouhodobé působení teploty 37 °C, byl proveden experiment, který měl napodobit teplotní podmínky vyskytující se na povrchu těl netopýrů v průběhu reprodukční sezóny (Dietz et Kalko, 2006). Byla sledována míra životaschopnosti v průběhu 85 dní v reakci na cyklické střídání teplot 20 °C a 34 °C s délkou cyklu 12 h. Životaschopnost spor se prodloužila ve srovnání se stálým působením teploty 34 °C (životaschopnost pod 10 % za 6 týdnů), přesto po 75 až 85 dnech klesla životaschopnost spor *P. destructans* pod 10 %. Je to zajímavé zjištění, které nabízí hypotézu, že se netopýr po určité době po ukončení hibernace zbaví porostu spor na svém těle. Je to však pouze hypotéza testována za pravidelně se střídajících podmínek na Petriho miskách s médiem. Otázkou je, jak spory a mycelium reagují po ukončení hibernace na hostiteli - netopýrovi, na jehož povrchu těla teplota více kolísá (Dietz et Kalko, 2006). Po zjištění se nabízí dvě možnosti. První možností je, že se netopýr po určité době po ukončení hibernace zcela zbaví porostu spor na svém těle, ovšem pokud nezůstane v pokožce netopýra nízké procento spor životaschopných, které by při návratu do chladu opět mohly způsobit masivní nárůst houby na těle netopýra. Druhou možností je, že nemusí v těle netopýra zůstat žádné životaschopné spory a netopýr se nakazí až při návratu do místa hibernace.

5.4. Biolog - utilizace různých zdrojů živin

Mikroskopická houba *P. destructans* je ojedinelá svým výhradním způsobem života na hibernujících netopýrech. Nebyla nalezena na jiném substrátu v takto masivním množství. Další význačnou charakteristikou je, že roste velmi pomalu. Otázkou k řešení tedy bylo, jak se liší strategií výživy od jiných hub.

Při celkové analýze dat ze všech destiček Biolog zároveň (FF, PM3B, PM4A a PM5) se ukázalo, že se *P. destructans* liší od hub izolovaných z podzemních prostor (štol či jeskyní) a od dermatofyt, která jsou schopná také parazitovat na živočiších (Simpanyia, 2000).

Nejvíce byly odlišeny jednotlivé skupiny hub (*P. destructans*, jeskynní izoláty a dermatofyta) prostřednictvím destiček Biolog FF a PM3B. Pro *P. destructans* je charakteristické, že dokáže využít málo dusíkatých a velmi málo uhlíkatých zdrojů. V utilizaci C a N se tak zcela lišil od izolátů z podzemních prostor a dermatofyt.

P. destructans využíval z uhlíkatých zdrojů zejména monosacharidy glukózu, manózu a fruktózu a disacharidy gentibiózu a trehalózu sestávající ze dvou jednotek D-glukózy, složitější sloučeniny sacharidů nebyl schopen využít. Trehalóza stabilizuje membrány

během dehydratace, v buňce se vyskytuje v cytosolu. Je to látka, která se vyskytuje u psychrofilních hub (Jorge et al., 1997, Weinstein et al., 2000), proto je pro *P. destructans* důležitá.

Zajímavý je fakt, že *P. destructans* roste na zdrojích dusíku, které se vyskytují v moči (ve větším či menším množství) jako odpadní produkt, což jsou močovina, kyselina močová a allantoin či amoniak, který vzniká rozkladem exkrementů a moči. Pro močovinu je všeobecně známé, že se u savců také vyskytuje v kůži zejména jako součást odpadního produktu - potu. Schopnost růstu *P. destructans* na močovině také potvrdili ve svých studiích Chaturvedi et al. (2010) a Raudabaugh et Miller (2013).

Dalším zajímavým zdrojem dusíku je N-acetyl-D-glukosamin, který *P. destructans* utilizoval, i když o něco pomaleji než např. močovinu. N-acetyl-D-glukosamin je derivát glukózy, z něhož je složen polymer chitin, který se vyskytuje v exoskeletu hmyzu a v buněčných stěnách hub (Zikakis, 1984). Otázkou schopnosti *P. destructans* využívat jako zdroj živin chitin se zabývali Raudabaugh et Miller (2013), kteří došli ke zjištění, že *P. destructans* zřejmě není schopen degradovat chitin, ale je pravděpodobně schopen využít některé komponenty z chitinových substrátů.

Tato zjištění nasvědčují faktu, že *P. destructans* je zřejmě schopen bez problémů přežít na jiných substrátech (např. v sedimentu) než je kůže netopýrů, v době, kdy nejsou netopýři přítomni v hibernakulech. Je tedy možné vykultivovat *P. destructans* ze životaschopných spor vyskytujících se v odebraném sedimentu (Lorch et al., 2012a; Lorch et al., 2012b). Pro toto hovoří také skutečnost, že ze sedimentu z jeskynních či podzemních prostor se dá také izolovat příbuzný druh *Pseudogymnoascus pannorum* (Bosák et al., 2000; Nováková, 2009; Bastian et al., 2010). Mulec et al. (2013) detekovali dvakrát *Pseudogymnoascus* sp. z guana ze slovinských jeskyní.

Na základě analýzy dat z destiček Biolog zkoumající využití fosforu a síry se zjistilo, že tyto zdroje nejsou pro *P. destructans* limitující. *P. destructans* se ve schopnostech neodlišoval od příbuzných a nepříbuzných izolátů z podzemních prostor, odlišoval se od dermatofyt. *P. destructans* byl schopen využít mnoho zdrojů fosforu a síry.

Z výsledků dat zkoumající využití nutričních elementů vyplynulo, že *P. destructans* je schopen využívat mnoho těchto zdrojů. Je možné, že tyto schopnosti kompenzují specializaci na malý okruh využitelných zdrojů uhlíku a dusíku. V této schopnosti se lišil od dermatofyt a od skupiny izolátů z podzemních prostor.

P. destructans se zcela odlišuje v utilizaci C, N, P, S a nutričních elementů od dermatofyt parazitujících také na kůži živočichů. Z toho vyplývá, že tyto dvě ekologicky podobné skupiny hub mají zcela odlišnou strategii výživy, protože obě využívají jiné zdroje.

Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na studium ekofyziologie mikroskopické houby *Pseudogymnoascus destructans*, a to na dostupných českých izolátech. Hlavními tématy zkoumání bylo zjišťování růstových schopností za různých podmínek za účelem vytvoření selektivního média, zjišťování životaschopnosti spor po působení různých nepříznivých podmínek a testování schopnosti utilizace různých zdrojů C, N, P, S a nutričních doplňků. Součástí práce bylo i porovnání těchto vlastností s jinými izoláty hub (např. nepatogenními houbami z podzemních prostor či s dermatofyty).

V rámci práce bylo vytvořeno selektivní médium k izolaci *P. destructans* z environmentálních vzorků (např. ze sedimentu, trusu, ovzduší). Složení selektivního média bylo vyvinuto na základě dílčích kultivačních pokusů s *P. destructans*. Šance záchytu *P. destructans*, např. ze sedimentu, byla zvýšena tím, že byl cíleně omezován růst ostatních hub. Nicméně pomalý růst houby *P. destructans* je i nadále největší překážkou stoprocentního využití selektivního média.

Důležitým zjištěním bylo, že tato psychrofilní houba není schopna dlouhodobě přežít v teplotách nad 30 °C (stejně tak příbuzné izoláty z podzemních prostor, čímž jsou si s *P. destructans* podobné). Tím se nabízí hypotéza, že netopýr na konci nehibernačního období nemá v sobě téměř žádné (nebo malé procento) životaschopných spor *P. destructans*.

Strategie utilizace substrátů obsahujících uhlík a dusík u *P. destructans* byla ve srovnání s izoláty jiných hub z podzemních prostor i s izoláty příbuzných hub rozdílná. Tato strategie byla dokonce odlišná i ve srovnání s dermatofyty. To potvrzuje fakt, že *P. destructans* má jedinečnou životní strategii vyúsťující ve specializaci k jedinému výhradnímu typu hostitelů – hibernujícím netopýrům, kde mu není na překážku nižší konkurenceschopnost, která je jinak patrná na běžných kultivačních médiích.

Celkově soudím, že má diplomová práce alespoň částečně odhalila určité charakteristiky *P. destructans*, z nichž některé nebyly doposud známy.

V mé práci jsem se nezabývala dalšími možnými testy, které umožní ještě hlouběji poznat ekologii *P. destructans*. V plánu je udělat testy na profil enzymů a biologicky aktivních látek u *P. destructans* a srovnat profily optima pH u příbuzných izolátů hub z podzemních prostor s *P. destructans*.

7. Literatura

- Abrashev R., Dolashka P., Christova R., Stefanova L. et al.** (2005): Role of antioxidant enzymes in survival of conidiospores of *Aspergillus niger* 26 under conditions of temperature stress. - Journal of Applied Microbiology 99: 902-909.
- Andrews S., Pitt J.I.** (1986): Selective medium for isolation of *Fusarium* species and dematiaceous hyphomycetes from cereals. - Applied and Environmental Biology 51(6): 1235-1238.
- Anonymus** (2001): Probes for stain viability (L-7009 LIVE/DEAD® Yeast Viability Kit, F-7030 FUN® 1 cell stain, F-13150 FUN® 2 cell stain), 6 p..
- Anonymus** (2005): Manuál - Hoechst stains, Molecular Probes Invitrogen detection technologies, 4 p..
- Anonymus** (2006): Manuál - Molecular Probes, Propidium Iodide Nucleic Acid Stain, 5 p.
- Aparicio J.F., Fouces R., Mendes M.V., Oluvera N. et al.** (2000): A complex multienzyme systém encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. - Chemistry & Biology 7(11): 895-905.
- Balajee S.A., Marr A. Kieren** (2002): Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of *Aspergillus* species. - Journal of Clinical Microbiology 40(8): 2741–2745.
- Barker K.** (1998): At the Bench: A Laboratory Navigator, nakladatelství Cold Spring Harbor Laboratory Press. 460 p..
- Bastian F., Jurodo V., Nováková A., Alabouvette C., Saiz-Jimenez C.** (2010): The microbiology of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. - Microbiology 156: 644–652.
- Blehert D.S., Hicks A.C., Behr M., Meteyer C.U. et al.** (2009): Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? Science 323(5911): 227.
- Bosák P. et al.** (2001): Czech Republic. - In: Juberthie Ch., Decu V. (eds): Encyclopaedia Biospeleologica, Tom III, 1406-1426, Société de Biospeleologie, Moulis - Bucarest.
- Braga G.U.L., Rangel D.E.N., Flint S.D., Miller C.D. et al.** (2002): Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. - Mycologia 94(6): 912-920.
- Castle K.T., Cryan P.M.** (2010): White-nose syndrome in bats: A primer for resource managers. - Park Science 27(1): 20-25.

- Cryan P., Meteyer C.U., Boyles J.G., Blehert D.S.** (2013): White-nose syndrome in bats: illuminating the darkness. - *BMC Biology* 11(47): 1-4.
- Cryan P.M., Meteyer C.U., Boyles J.G., Blehert D.S.** (2010): Wing pathology of white-nose syndrome in bats suggests life-threatening disruption of physiology. - *BMC Biology* 8(135): 1-8.
- Dietz M., Kalko E.K.V.** (2006): Seasonal changes in daily torpor patterns of free-ranging female and male Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). - *Journal of Comparative Physiology B* 176(3): 223-231.
- Eggleston M.D. et Marshall P.A.** (2007): *Saccharomyces cerevisiae* samples stained with FUN-1 dye can be stored at -20°C for later observation. - *Journal of Microscopy* 225: 100-103.
- Egli T. et Quayle J.R.** (1986): Influence of the carbon:nitrogen ratio of the growth medium on the cellular composition and the ability of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* to utilize mixed carbon sources. - *Journal of General Microbiology* 132: 1779-1788.
- Elad Y., Chet I., Henis Y.** (1981): A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. - *Phytoparasitica* 9(1): 59-67.
- Engelkes C.A., Nucló R.L., Fravel D.R.** (1997): Effect of carbon, and C:N ratio on growth, sporulation, and biocontrol efficacy of *Talaromyces flavus*. - *Phytopathology* 87(5): 500-505.
- Fassatiová O.** (1986): Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. - 233 p. Amsterdam etc.
- Gams W.** (1970): Gliederungsprinzipien in der Gattung *Mortierella*. - *Nova Hedwigia* 18: 30-43.
- Gao L. et Liu X.Z.** (2009): A novel two-stage cultivation method to optimize carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio for sporulation of biocontrol fungi. - *Folia Microbiologica* 54(2): 142-146.
- Gargas A., Trest M.T., Christensen M., Volk T.J., Blehert D.S.** (2009): *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. - *Mycotaxon* 108: 147-154.
- Green L., Petersen B., Steimel L., Haerber P., Current W.** (1994): Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. - *Journal of Clinical Microbiology* 32(4): 1088-1091.

- Green L.J., Marder P., Mann L.L., Chio L.-C., Current L.** (1999): LY303366 Exhibits rapid and potent fungicidal activity in flow cytometric assays of yeast viability. - *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(4): 830-835.
- Harrington T.C.** (1981): Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. - *Mycologia* 73: 1123-1129.
- Henson O.E.** (1981): Dichloran as a inhibitor of mold spreading in fungal plating media: effects on colony diameter and enumeration. - *Applied and Environmental Microbiology* 42(4): 656-660.
- Herreid C. F., Bretz W. L., Schmidt-Nielsen K.** (1968): Cutaneous gas exchange in bats. - *American Journal of Physiology* 215: 506–508.
- Chaturvedi V., Ramani R., Pfaller M.A.** (2004): Collaborative study of the NCCLS and flow cytometry methods for antifungal testing susceptibility of *Candida albicans*. - *Journal of Clinical Microbiology* 42(5): 2249-2251.
- Chaturvedi S., Rajkumar S.S., Li X., Hurteau G.J. et al.** (2011): Antifungal testing and high-throughput screening of compound library against *Geomyces destructans*, the etiologic agent of geomycosis (WNS) in bats. - *Plos One* 6(3): 1-6.
- Chaturvedi V., Chaturvedi S.** (2011): Editorial: What is in a name? A proposal to use Geomycosis instead of White Nose Syndrome (WNS) to describe bat infection caused by *Geomyces destructans*. - *Mycopathologia* 171(4): 231-233.
- Chaturvedi V., Springer D.J., Behr M.J., Ramani R. et al.** (2010): Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with White nose syndrome (WNS). - *Plos One* 5: 1-12.
- Chase A.E., Osborne L.S., Ferguson V.M.** (1986): Selective isolation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from an artificial potting medium. - *The Florida Entomologist* 69(2): 285-292.
- Jedličková A.** (2006): Systémové mykózy. - Maxdorf, Praha, 130 p..
- Jedličková A., Mašata J., Skořepová M.** (2008): Lokální mykózy. - Maxdorf, Praha, 176 p..
- Jorge A.J., Polizeli T.M., Thevelein J.M., Terenzi H.F.** (1997): Trehaloses and trehalose hydrolysis in fungi. – *FEMS Microbiology letters* 154: 165-171.
- Kluger M. J., Heath J. E.** (1970): Vasomotion in the batwing: a thermoregulatory response to internal heating. - *Comparative Biochemistry and Physiology* 32: 219–220.
- Kubátová A., Koukol O., Nováková A.** (2011): *Geomyces destructans*, phenotypic features of some Czech isolates. *Czech Mycology* 63 (1): 65 - 75.

- Lincová D., Farghali H. et al.** (2007): Základní a aplikovaná farmakologie 2. - Galén, Praha, 481 p.
- López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J.M., Acién Fernández F.G.** (2003): Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. - *Enzyme and Microbial Technology* 33: 270-277.
- Lorch J.M., Meteyer C.U., Behr M.J., Boyles J.G. et al.** (2011): Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. - *Nature* 480: 376-379.
- Lorch J.M., Lindner D.L., Gargas A., Muller L.K. et al.** (2012a): A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. - *Mycologia* 105(2): 237–252.
- Lorch J.M., Muller L.K., Russell R.E., O'Connor M. et al.** (2012b): Distribution and environmental persistence of the causative agent of white-nose syndrome, *Geomyces destructans*, in bat hibernacula of the eastern United States. - *Applied and Environmental Microbiology* 79(4): 1293–1301.
- Malíř F., Ostrý V., Bárta I., Buchta V. et al.** (2003): Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka [Filamentous micromycetes (moulds), mycotoxins and human health]. 349 p., Brno [In Czech]
- Martínková N., Bačkor P., Horáček I. et al.** (2010): Increasing incidence of *Geomyces destructans* fungus in bats from the Czech Republic and Slovakia. - *Plos One* 5(11): 1-7.
- Meteyer C.U., Buckles E.L., Blehert D.S., Hicks A.C. et al.** (2009): Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. - *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21: 411-414.
- Millard P.J., Roth B.L., Thi H.-P.T., Yue S.T., Haugland R.P.** (1997): Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. - *Applied and Environmental Microbiology* 63(7): 2897-2905.
- Minnis A.M. et Lindner D.L.** (2013): Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biology* 117: 638-649.
- Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S.** (2004): Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. - Elsevier Inc., Amsterdam etc., 777 p..

- Mukherjee P.K., Chandra J., Kuhn D.C., Ghannoum M.A.** (2003): Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and immunity* 71(8): 4333-4340.
- Mulec J., Covington E., Walochnik J.** (2013): Is bat guano a reservoir of *Geomyces destructans*? - *Open Journal of Veterinary Medicine* 3: 161-167.
- Nováková A.** (2009): Microscopic fungi isolated from the Domica Cave systém (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. - *International Journal of Speleology* 38(1): 71-82.
- Ottow J.C.G.** (1972): Rose bengal as a selective aid in the isolation of fungi and actinomycetes from natural sources. - *Mycologia* 64(2): 304-315.
- Palmer J.M., Kubátová A., Nováková A., Minnis A.M., Kolařík M., Lindner D.L.** (2014): Molecular characterization of a heterothallic mating system in *Pseudogymnoascus destructans*, the fungus causing white-nose syndrome of bats. - *Genes (Genomes) Genetics Early Online* (doi: 10.1534/g3.114.012641): 1-11.
- Parisi-Duchene E., Reibel C., Grawey I., Heller R.** (2006): Rapid antifungal susceptibility testing of fluconazole and amphotericin B by flow cytometry using FUN-1: a preliminary study. - *Journal de Mycologie Médicale* 16: 126-133.
- Pikula J., Band'ouchová H., Novotný L., Meteyer C.U.** (2012): Histopathology confirms white-nose syndrome in bats in Europe. - *Journal of Wildlife Diseases* 48(1): 207-211.
- Puechmaille S.J., Verdeyroux P., Fuller H., Gouilh et al.** (2010): White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bat, France. - *Emerging Infectious Diseases* 16(2): 290-293.
- Puechmaille S.J., Wibbelt G., Korn V., Fuller H.** (2011): Pan-European distribution of white-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) not associated with mass mortality. - *Plos One* 6(4): e19167- e19167.
- Rajkumar S.S., Li X., Rudd R.J., Okoniewsko J.C. et al.** (2011): Clonal genotype of *Geomyces destructans* among bats with white-nose syndrome, New York, USA. - *Emerging Infectious Diseases* 17(7): 1273-1276.
- Ramani R., Chaturvedi V.** (2000): NCCLS broth microdilution test and comparison with the *Candida albicans* testing of pathogenic yeasts other than flow cytometry antifungal susceptibility. - *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(10): 2752-2758.
- Raudabaugh D.B. et Miller A.N.** (2013): Nutritional capability of and substrate suitability for *Pseudogymnoascus destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. - *Plos One* 8 (10): 1-9.

- Reichard J.D., Kunz T.H.** (2009): White-nose syndrome inflicts lasting injuries to the wings of little brown myotis (*Myotis lucifugus*). - *Acta Chiropterologica* 11(2): 457–464.
- Ren P., Haman K.H., Last L.A., Rajkumar S.S. et al.** (2012): Clonal spread of *Geomyces destructans* among bats, midwestern and southern United States. - *Emerging Infectious Diseases* 18(5): 883-885.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C.** (2004): Introduction to food- and airborne fungi. 7th Ed. - 389 p., Utrecht.
- Simpanya M.F.** (2000): Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and pathogenicity. In: *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, Kuswaha R.K.S. et Guarro (eds.): *Biology dermatophytes and other keratinophilic fungi* p. 1-12, Spain.
- Somers E. et Pring R.J.** (1966): Uptake and binding of dodine acetate by fungal spores. - *Annals of Applied Biology* 58: 457-466.
- Šimonovičová A., Pangallo D., Chovanová K., Lehotská B.** (2011): *Geomyces destructans* associated with bat disease WNS detected in Slovakia. - *Biologia* 66(3): 562-564.
- Thomas S. P., Suthers R. A.** (1972): The physiology and energetics of bat flight. - *Journal of Experimental Biology* 57: 317–335.
- Verant M.L., Boyles J.G., Waldrep W., Wibbelt G., Belhert D.S.** (2012): Temperature-dependent growth of *Geomyces destructans*, the fungus that causes bat white-nose syndrome. - *Plos One* 7(9): e46280- e46280.
- Vermes A., Guchelaar H.-J., Dankert J.** (2000): Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. - *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 171-179.
- Veselská T.** (2013): Evoluční ekologie rodu *Geosmithia*. - Ms., 102 p. (Diplomová práce depon. in: Katedra botaniky PřF UK Praha).
- Vieira D.B., Carmona-Ribeiro A.M.** Cationic lipid and surfactants as antifungal agents: mode of action. - *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 760 - 767.
- Vittal R., Haudenschild J.S., Hartman G.L.** (2012): A multiplexed immunofluorescence method identifies *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores and determines their viability. - *Phytopathology* 102(12): 1143-1152.
- Wibbelt G., Kurth A., Hellmann D., Weishar M. et al.** (2010): White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe. - *Emerging Infectious Diseases* 16(8): 1237-1242.

- Winstein R.N., Montiel P.O., Johnstone K.** (2000): Influence of growth temperature on lipid and soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime Antarctic. - *Mycologia* 92(2): 222-229.
- Wenisch C., Linnau K.F., Parschalk B., Zedtwitz-Liebenstein K., Georgopoulos A.** (1997): Rapid susceptibility testing of fungi by flow cytometry using vital staining. - *Journal of Clinical Microbiology* 35(1): 5-10.
- Williams-Guillen K., Perfecto I., Vandermeer J.** (2008): Bats limits insects in a neotropical agroforestry system. - *Science* 320: 70.
- Zikakis J.P.** (1984): Chitin, chitosan and related enzymes. Ed., Pergamon Press, New York, 83 p.
- Zimbrio M.J., Power D.A., Miller S.M., Wilson G.E., Johnson J.A.** (2009): Manual Difco & BBL Manual, Manual of Microbiological Culture Media, Second Edition. 700 p.
- Zukal J., Band'ouchová H., Bartinička T., Berková H. et al.** (2014): White-nose syndrome fungus: a generalist pathogen of hibernating bats. - *Plos One* 9(5): 1-10.

8. Přílohy

8.1. Substráty obsažené na FF a PM Biolog destičkách

FF MicroPlate™

A1 Water	A2 Tween 80	A3 N-Acetyl-D- Galactosamine	A4 N-Acetyl-D- Glucosamine	A5 N-Acetyl-D- Mannosamine	A6 Adonitol	A7 Amygdalin	A8 D-Arabinose	A9 L-Arabinose	A10 D-Arabitol	A11 Arbutin	A12 D-Cellobiose
B1 α-Cyclodextrin	B2 β-Cyclodextrin	B3 Dextrin	B4 γ-Erythritol	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Genfibiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 D-Glucosamine	B12 α-D-Glucose
C1 Glucose-1- Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Gluconic Acid	C4 Glycerol	C5 Glycogen	C6 m-Hostal	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 α-D-Lactose	C9 Lactulose	C10 Maltitol	C11 Maltose	C12 Maltotriose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Melezitose	D4 D-Melibiose	D5 α-Methyl-D- Galactoside	D6 β-Methyl-D- Galactoside	D7 α-Methyl-D- Glucoside	D8 β-Methyl-D- Glucoside	D9 Rafinose	D10 D-Ribose	D11 D-Raffinose	D12 L-Rhamnose
E1 D-Ribose	E2 Salicin	E3 Sedoheptulosan	E4 D-Sorbitol	E5 L-Sorbitose	E6 Stachyose	E7 Sucrose	E8 D-Tagatose	E9 D-Trehalose	E10 Turanose	E11 Xylitol	E12 D-Xylose
F1 γ-Amino-butyrlic Acid	F2 Bromosuccinic Acid	F3 Fumaric Acid	F4 β-Hydroxy-butyrlic Acid	F5 γ-Hydroxy-butyrlic Acid	F6 β-Hydroxyphenyl- acetic Acid	F7 α-Keto-glutaric Acid	F8 D-Lactic Acid Methyl Ester	F9 L-Lactic Acid	F10 D-Malic Acid	F11 L-Malic Acid	F12 Quinic Acid
G1 D-Saccharic Acid	G2 Sebacic Acid	G3 Succinamic Acid	G4 Succinic Acid	G5 Succinic Acid Mono-Methyl Ester	G6 N-Acetyl-L- Glutamic Acid	G7 Alaninamide	G8 L-Alanine	G9 L-Alanyl-Glycine	G10 L-Asparagine	G11 L-Aspartic Acid	G12 L-Glutamic Acid
H1 Glycyl-L-Glutamic Acid	H2 L-Omithine	H3 L-Phenylalanine	H4 L-Proline	H5 L-Pyroglytamic Acid	H6 L-Serine	H7 L-Treonine	H8 2-Amino Ethanol	H9 Rutrescine	H10 Adenosine	H11 Uridine	H12 Adenosine-5- Monophosphate

PM3B MicroPlate™ Ni trogen Sources

A1 Negative Control	A2 Ammonia	A3 Nitrite	A4 Nitrate	A5 Urea	A6 Biuret	A7 L-Alanine	A8 L-Arginine	A9 L-Asparagine	A10 L-Aspartic Acid	A11 L-Cysteine	A12 L-Glutamic Acid
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L- Phenylalanine	B9 L-Proline	B10 L-Serine	B11 L-Threonine	B12 L-Tryptophan
C1 L-Tyrosine	C2 L-Valine	C3 D-Alanine	C4 D-Asparagine	C5 D-Aspartic Acid	C6 D-Glutamic Acid	C7 D-Lysine	C8 D-Serine	C9 D-Valine	C10 L-Citrulline	C11 L-Homoserine	C12 L-Omithine
D-1 N-Acetyl-D,L- Glutamic Acid	D2 N-Phthaloyl-L- Glutamic Acid	D3 L-Pyroglytamic Acid	D4 Hydroxylamine	D5 Methylamine	D6 N-Amylamine	D7 N-Butylamine	D8 Ethylamine	D9 Ethanolamine	D10 Ethylenediamin e	D11 Putrescine	D12 Agmatine
E1 Histamine	E2 β-Phenylethyl- amine	E3 Tyramine	E4 Acetamide	E5 Formamide	E6 Glucuronamide	E7 D,L-Lactamide	E8 D-Glucosamine	E9 D- Galactosamine	E10 D- Mannosamine	E11 N-Acetyl-D- Glucosamine	E12 N-Acetyl-D- Galactosamine
F1 N-Acetyl-D- Mannosamine	F2 Adenine	F3 Adenosine	F4 Cytidine	F5 Cytosine	F6 Guanine	F7 Guanosine	F8 Thymine	F9 Thymidine	F10 Uracil	F11 Uridine	F12 Inosine
G1 Xanthine	G2 Xanthosine	G3 Uric Acid	G4 Alloxan	G5 Allantoin	G6 Parabanic Acid	G7 D,L-α-Amino-N- Butyric Acid	G8 γ-Amino-N- Butyric Acid	G9 ε-Amino-N- Caproic Acid	G10 D,L-α-Amino- Caprylic Acid	G11 δ-Amino-N- Valeric Acid	G12 α-Amino-N- Valeric Acid
H1 Ala-Asp	H2 Ala-Gln	H3 Ala-Glu	H4 Ala-Gly	H5 Ala-His	H6 Ala-Leu	H7 Ala-Thr	H8 Gly-Asn	H9 Gly-Gln	H10 Gly-Glu	H11 Gly-Met	H12 Met-Ala

PM4A MicroPlate™ Phosphorus and Sul fur Sources

A1 Negative Control	A2 Phosphate	A3 Pyrophosphate	A4 Trimeta- phosphate	A5 Tripoly- phosphate	A6 Triethyl Phosphate	A7 Hypophosphite	A8 Adenosine- 2'- monophosphate	A9 Adenosine- 3'- monophosphate	A10 Adenosine- 5'- monophosphate	A11 Adenosine- 2',3'-cyclic monophosphate	A12 Adenosine- 3',5'-cyclic monophosphate
B1 Thiophosphate	B2 Dithiophosphat e	B3 D,L- α -Glycerol Phosphate	B4 β -Glycerol Phosphate	B5 Carbamy l Phosphate	B6 D-2-Phospho- Glyceric Acid	B7 D-3-Phospho- Glyceric Acid	B8 Guanosine- 2'- monophosphate	B9 Guanosine- 3'- monophosphate	B10 Guanosine- 5'- monophosphate	B11 Guanosine- 2',3'-cyclic monophosphate	B12 Guanosine- 3',5'-cyclic monophosphate
C1 Phosphoenol Pyruvate	C2 Phospho- Glycolic Acid	C3 D-Glucose-1- Phosphate	C4 D-Glucose-6- Phosphate	C5 2-Deoxy-D- Glucose 6- Phosphate	C6 D- Glucosamine-6- Phosphate	C7 6-Phospho- Gluconic Acid	C8 Cytidine- 2'- monophosphate	C9 Cytidine- 3'- monophosphate	C10 Cytidine- 5'- monophosphate	C11 Cytidine- 2',3'- cyclic monophosphate	C12 Cytidine- 3',5'- cyclic monophosphate
D1 D-Mannose-1- Phosphate	D2 D-Mannose-6- Phosphate	D3 Cysteamine-S- Phosphate	D4 Phospho-L- Arginine	D5 O-Phospho-D- Serine	D6 O-Phospho-L- Serine	D7 O-Phospho-L- Threonine	D8 Uridine- 2'- monophosphate	D9 Uridine- 3'- monophosphate	D10 Uridine- 5'- monophosphate	D11 Uridine- 2',3'- cyclic monophosphate	D12 Uridine- 3',5'- cyclic monophosphate
E1 O-Phospho-D- Tyrosine	E2 O-Phospho-L- Tyrosine	E3 Phosphocreatin e	E4 Phosphoryl Choline	E5 O-Phosphoryl- Ethanolamine	E6 Phosphono Acetic Acid	E7 2-Aminoethyl Phosphonic Acid	E8 Methylene Diphosphonic Acid	E9 Thymidine- 3'- monophosphate	E10 Thymidine- 5'- monophosphate	E11 Inositol Hexaphosphate	E12 Thymidine 3',5'-cyclic monophosphate
F1 Negative Control	F2 Sulfate	F3 Thiosulfate	F4 Tetrathionate	F5 Thiophosphate	F6 Dithiophosphat e	F7 L-Cysteine	F8 D-Cysteine	F9 L-Cysteinyl- Glycine	F10 L-Cystelo Acid	F11 Cysteamine	F12 L-Cysteine Sulfonic Acid
G1 N-Acetyl-L- Cysteine	G2 S-Methyl-L- Cysteine	G3 Cystathionine	G4 Lanthionine	G5 Glutathione	G6 D,L-Ethionine	G7 L-Methionine	G8 D-Methionine	G9 Glycyl-L- Methionine	G10 N-Acetyl-D,L- Methionine	G11 L-Methionine Sulfoxide	G12 L-Methionine Sulfone
H1 L-Djenkolic Acid	H2 Thiourea	H3 1-Thio- β -D- Glucose	H4 D,L-Lipoamide	H5 Tauricolic Acid	H6 Taurine	H7 Hypotaaurine	H8 <i>p</i> -Amino Benzene Sulfonic Acid	H9 Butane Sulfonic Acid	H10 Hydroxyethane Sulfonic Acid	H11 Methane Sulfonic Acid	H12 Tetramethylene Sulfone

PM5 MicroPlate™ Nutrient Supplements

A1 Negative Control	A2 Positive Control	A3 L-Alanine	A4 L-Arginine	A5 L-Asparagine	A6 L-Aspartic Acid	A7 L-Cysteine	A8 L-Glutamic Acid	A9 Adenosine- 3',5'-cyclic monophosphate	A10 Adenine	A11 Adenosine	A12 2-Deoxy Adenosine
B1 L-Glutamine	B2 Glycine	B3 L-Histidine	B4 L-Isoleucine	B5 L-Leucine	B6 L-Lysine	B7 L-Methionine	B8 L- Phenylalanine	B9 Guanosine- 3',5'-cyclic monophosphate	B10 Guanine	B11 Guanosine	B12 2-Deoxy Guanosine
C1 L-Proline	C2 L-Serine	C3 L-Threonine	C4 L-Tryptophan	C5 L-Tyrosine	C6 L-Valine	C7 L-Isoleucine + L-Valine	C8 trans-4-Hydroxy L-Proline	C9 (5) 4-Amino- imidazole-4(5)- Carboxamide	C10 Hypoxanthine	C11 Inosine	C12 2-Deoxy Inosine
D1 L-Ornithine	D2 L-Citrulline	D3 Choramic Acid	D4 (-)-Shikimic Acid	D5 L-Homoserine Lactone	D6 D-Alanine	D7 D-Aspartic Acid	D8 D-Glutamic Acid	D9 D,L- α , ϵ - Diamino-pimelic Acid	D10 Cytosine	D11 Cytidine	D12 2-Deoxy Cytidine
E1 Putrescine	E2 Spermidine	E3 Spermine	E4 Pyridoxine	E5 Pyridoxal	E6 Pyridoxamine	E7 β -Alanine	E8 D-Pantothenic Acid	E9 Orotic Acid	E10 Uracil	E11 Uridine	E12 2-Deoxy Uridine
F1 Quinolinic Acid	F2 Nicotinic Acid	F3 Nicotinamide	F4 β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide	F5 β -Amino- Levulinic Acid	F6 Hematin	F7 Deferoxamine Mesylate	F8 D-(+)-Glucose	F9 N-Acetyl D-Glucosamine	F10 Thymine	F11 Glutathione (reduced form)	F12 Thymidine
G1 Oxaloacetic Acid	G2 D-Biotin	G3 Cyano- Cobalamin	G4 <i>p</i> -Amino- Benzoic Acid	G5 Folic Acid	G6 Inosine + Thiamine	G7 Thiamine	G8 Thiamine Pyrophosphate	G9 Riboflavin	G10 Pyrrolo- Quinoline Quinone	G11 Menadione	G12 Myo-Inositol
H1 Butyric Acid	H2 D,L- α -Hydroxy- Butyric Acid	H3 α -Ketobutyric Acid	H4 Caprylic Acid	H5 D,L- α -Lipoic Acid (oxidized form)	H6 D,L-Mevalonic Acid	H7 D,L-Carnitine	H8 Choline	H9 Tween 20	H10 Tween 40	H11 Tween 60	H12 Tween 80