

1. ÚVOD

Aeromykologie je vědní obor, který se zabývá kvalitativní i kvantitativní identifikací spór houbových organismů v ovzduší. Vznikl postupně v druhé polovině minulého století, jako reakce na znečištění ovzduší a na nárůst výskytu dýchacích a alergických onemocnění v lidské populaci.

Lidé přichází do kontaktu s houbami v ovzduší po celý život, jsou 100-1000x častější než pylová zrna. Ukázalo se, že mnoho hub ovzduší je silným alergenem a jejich inhalace způsobuje rýmu či astma (Henríquez et al. 2001; Prospero et al. 2005). Od doby, co jsou známe některé z alergenů, je snadnější diagnostika a léčba patologií, které způsobují. Proto je výzkum a hledání těchto hub v ovzduší tolik důležitý ve všech částech světa (Henríquez et al. 2001). Jejich výskyt má také důležitý ekonomický dopad. (Kiffer et Morelet 1999).

Spóry mikro- i makroskopických druhů hub jsou všudypřítomné, lze je zachytit jak ve venkovním prostředí tak uvnitř obytných i technických budov (Sen et Asan 2009). Intenzita jejich výskytu závisí na ročním období, meteorologických podmínkách (Tomassetti et al. 2009) a místě odchyty (Kasprzyk et Worek 2006), stejně tak i jejich druhové spektrum. I když k odchyty spór (spore trapping) se používají různé metody, konečná fáze - identifikace spór a vykultivovaných kultur - je založena na tradičních mikroskopovacích metodách nebo na DNA analýzách směsných vzorků nebo jednotlivých kultur.

Tato práce by měla shrnout dosavadní poznatky a metody používané v aeromykologii, shrnout metodiku odchyty, osvojit si mikroskopovací a identifikační metody a popsat nejhojnější druhy hub v ovzduší v rozdílných oblastech v celosvětovém měřítku a v rozdílných ročních obdobích v České republice.

Součástí této práce je také kvalitativně a kvantitativně zhodnotit výskyt spór v ovzduší v jednotlivých měsících roku 2009 pomocí vybrané odchyty metody.

2. REŠERŠNÍ ČÁST

2.1. Význam hub obecně

Houbové organismy reprezentují polyfyletickou říši Mycota. Vzhledem k jejich druhové četnosti, ekologické diverzitě a evolučním kontextům s ostatními organismy hrají nezastupitelnou roli v bioenergetických cyklech a procesech.

Mezi hlavní role hub na Zemi patří jejich schopnost rozkládat organický materiál na jednodušší komponenty a tím obohacovat půdu o živiny. Také jsou schopné tvořit mykorhizní symbiózu, tvořit stélky lišejníků v symbióze se sinicemi a řasami nebo mají patogenní a antibiotické účinky, tzn., mohou produkovat sekundární metabolity.

Houby vždy hrály svou roli v rozvoji dávných i současných civilizací, přizpůsobovaly se rozvoji zemědělských kultur (fytopatogenní druhy), byly a jsou součástí tradiční medicíny pro různá etnika a v současnosti se intenzivně využívají v biotechnologiích, k výrobě organických kyselin, potravinářských produktů, ve farmaceutickém průmyslu a v neposlední řadě v zemědělství a lesnictví. Genotypická a fenotypická plasticita a adaptabilita těchto organismů umožnila mnohým druhům dokonale se přizpůsobit znečištění v průmyslovém prostředí.

Houby jako organismy vytváří stélku – hyfu, na které se formují pohlavní či nepohlavní spóry, coby rozmnožovací propagule různého tvaru, barvy a velikosti (0,5-1000 μm). Spóry hub jsou u mnoha druhů prašné, nebo aktivně odmršťované do prostředí a představují jeho běžnou součást. V ovzduší jsou aktivně šířeny vzdušnými proudy a deštěm.

Houbové organismy, makro- i mikroskopické houby jsou všudypřítomné, najdeme je ve všech substrátech a jejich partikule, spóry a hyfy, jsou běžnou celosvětovou součástí atmosféry - lze je detekovat opravdu všude (Mižáková et al. 2002; Burch et Levetin 2002). Hyfy hub jsou v atmosféře 300-500krát častější než samotné spóry (Oliveira et al. 2009).

Z přibližně miliónu rodů hub se jich asi 50 řadí mezi lidské patogeny, z nichž většina dokáže vytvářet velice účinné mykotoxiny, některé z nich mohou zapříčinit hypersenzitivní a alergické reakce (Khan et al. 1999; Henríquez et al. 2001; Burch et Levetin 2002; Gioulekas et al. 2004; Prospero et al. 2005). Lidé přichází do kontaktu s houbami v ovzduší po celý život. Jejich rozličenost a koncentrace závisí hlavně na topografických a klimatických podmínkách. Od doby, co jsou známé některé z alergenů, je v některých případech diagnostika a léčba patologických stavů snazší. Proto je výzkum,

detekce a identifikace těchto hub v ovzduší tolik důležitá ve všech částech světa (Henríquez et al. 2001). Přesto nejsou spóry mnoha kontaminujících druhů dobře zdokumentovány a popsány. Totéž platí o jejich patologických účincích (Gioulekas et al. 2004; Galante et al. 2006).

2.2. Bioaerosoly

Aerosoly jsou heterogenní směsi malých, pevných či kapalných částic nebo jejich skupin šířící se vzduchem (Pretel et Vácha 2003). Bioaerosoly obsahují kromě anorganických částic, či velkých složitých molekul, také jednobuněčné organismy. Velikost organismů (i anorganických částic) se pohybuje od deseti nanometrů u virů po sto mikrometrů u pylových zrn, pro houbové spóry jsou charakteristické velikosti mezi 1-10 μ m (Elbert et al. 2006). Tyto bioaerosoly tvoří celou atmosféru Země, ve které se vyskytují vysoké koncentrace alergenů, toxigenů, karcinogenů atd. Mezi organické škodliviny ve vzduchu patří spóry hub nebo hyfy mikromycet, pylová zrna, bakterie nebo viry, a organickou složku tvoří prach a průmyslové polutanty (Yao et al. 2009).

V poslední době se vědci často zaměřují na různé lokality, u nichž analyzují a porovnávají složky aerosolů, a to hlavně v místech, které přímo nebo nepřímo mohou ovlivňovat zdraví člověka. Fracchia et al. (2006) například měřila koncentrace bakterií v aerosolech ve dvou čističkách odpadních vod vyroben potravin. Odpadní vody totiž obsahují velké množství patogenů, jako jsou viry, bakterie a lidské či zvířecí parazité, což může ohrozit zaměstnance těchto zařízení.

Vysoké koncentrace bakterií a spór hub se nacházejí v aerosolech vznikajících při kompostování. Proto jsou koncentrace alergenů v ovzduší často měřeny v blízkosti těchto míst (Bru-Adan et al. 2009).

2.3. Antropogenní vliv na koncentraci spór v ovzduší

Jak bylo již uvedeno, lidská činnost má výrazný vliv na kvalitativní i kvantitativní zastoupení spór v ovzduší.

Některé druhy hub, jejichž spóry a mycelia můžeme detekovat v ovzduší, mají pro člověka významný přínos. Používají se k výrobě sýrů s ušlechtilou plísní, na což byly vyšlechtěny například druhy *Penicillium camembertii* nebo *Penicillium roquefortii*. *Bortyitis cinnerea* se používá k produkci sladkých vín. *Aureobasidium pollutans* se nechává růst u speciálních druhů vín v dubových sudech, kde spolu zrají a víno tak dostává charakteristickou chuť a vlastnosti. *Penicillium chrysogenum* má široké využití. Používá se

jako hnojivo, krmivo pro dobytek, prostředek k vyloučení uranu a radia z odpadní vody atomového průmyslu, či jako antibiotikum. Antibiotický účinek má též *Penicillium griseofulvum*. Další využití hub člověkem je například v zemědělství, kdy mají různé druhy (např. *Beauveria bassiana*) funkci bioinsekticidu. Rody hub *Dactylella* či *Dactylaria* se cíleně používají k hubení jiných druhů hub - mají mykoparazitické vlastnosti. Například mykoparazitické druhy rodu *Scytalidium* se v USA používají, aby zabránily *Phellinus weirii* rozkládat sloupy telefonního vedení. *Fusarium oxysporum* spp. *cannabis*, *Colletotrichum gloeosporioides* a *Colletotrichum truncatum* slouží jako bioherbicide (Kiffer et Morelet 1999). Některé z hub mohou být využity jako biokontrola u cílových organismů. Houba *Beauveria bassiana*, parazitující na hmyzím škůdci datlové palmy (*Phoenix dactylifera*) - *Phoenicococcus marlatti* z řádu Hemiptera, silně inhibuje účinek parazitující mikromycety *Penicillium vermoeseni* (Asenio et al. 2007).

Člověk sice umí některé mikromycety používat, nicméně se sám významně podílí na obsahu spór v ovzduší intenzivní zemědělskou činností, ať se jedná o práci s půdou nebo s nadzemní biomasou (Kiffer et Morelet 1999).

Mnoho druhů spór hub vyskytujících se ve vzduchu patří k účinným fytopatogenům, jež se na rostlinách patologicky projevují různými symptomy, od diskolorací pletiv až po tvorbu sněživých nádorů v závislosti na druhu houbového patogena. Mohou způsobovat tkáňové nekrózy, jež se tvoří na listech, květech, plodech, kmenech či kořenech. Známa je například *Spilocaea pomi*, která parazituje na jablkách a způsobuje jejich skvrnitost. *Marssonina rosae* má za následek nekrotické skvrny na listech růže. Jiné druhy způsobují usychání rostlin a jejich opad. Příkladem hub s tímto následkem je *Verticillium* sp. napadající cévní soustavu listů stromů (Kiffer et Morelet 1999). Na broskvoni zase parazituje *Taphrina deformans* způsobující kadeřavost listů a následně jejich opad (Roselli et al. 1997).

Významným alergenním kontaminantem jsou v období vegetace také rzi a sněti. Během roku se mění jejich životní stádia a spóry jsou v ovzduší hojné od jara do podzimu. Jsou to fytopatogenní houby, které snižují fitness rostlin a tím jejich ekonomickou výnosnost. Ne náhodou se hospodářské rostliny geneticky upravují, aby byly vůči těmto patogenům rezistentní (Okubara et al. 2009). Mají neblahý vliv i na zdraví člověka, u kterého způsobují rýmy, zužování dýchacích cest a podobně. Jsou to typičtí zástupci těch skupin hub, jejichž koncentrace v ovzduší stoupá s blízkostí k vegetaci.

Ve studii Levetin et Dorsey (2006) byl porovnán výskyt spór hub na fyloplánu (=povrchu listu) stromů s výskytem spór v ovzduší. Zjistilo se, že na fyloplánu bylo

nalezeno 50 taxonů hub, z nichž 10 se objevilo i ve vzorcích ze vzduchu, přičemž nejhojnější byly *Cladosporium*, aeciospóry, basidiospóry a *Alternaria* a tvořily 90% všeho, co ve vzduchu bylo nalezeno. Celkový součet spór hub na fyloplánu každého stromu ukázal, že četnosti jsou vyšší než $1 \cdot 10^8$ CFU/cm². Tato studie ukazuje, že povrch listů rostlin je stěžejní pro koncentrace a druhy spór hub ovzduší. Ve studii popisující koncentrace spór hub ve vzduchu proudícího ze Sahary na Barbados jasně vychází, že právě rostliny jsou hlavním zdrojem hub ve vzduchu, období vysokých koncentrací hub jsou spojeny s obdobím dešťů (Prospero et al. 2005). Výskyt spór hub ve vzduchu tedy ovlivňuje přítomnost rostlin nejen v mírném pásu, to samé platí i pro tropy a subtropy.

2.4. Škodlivý vliv spór v ovzduší na člověka

Znečištěné ovzduší je hlavním původcem alergických reakcí. Je proto velice důležité poznávat a určovat chemické polutanty a alergeny, které se v něm nachází. (Levetin et Water 2001).

Látky zodpovědné za alergické reakce z částic ze vzduchu jsou označovány jako endotoxiny – nacházející se v bakteriích a (1,3)-β-D-glukan, jež je přítomen v celulóze u rostlin, v buněčných stěnách kvasinek, hub či bakterií. Oba alergeny mohou způsobovat zdravotní problémy, jako je astma nebo zápal plic, a ukazuje se, že konkrétně endotoxin je u dětí do dvou let původcem onemocnění dýchacích cest (Yao et al. 2009).

Mnoho skupin spór hub detekovatelných v ovzduší obsahuje širokou škálu zdraví škodlivých druhů. Mohou způsobovat vnější i vnitřní mykózy či alergické reakce (jak dýchací, tak i kožní). 20-30% lidí, majících problém s chronickými rýmami, astmatem či se zápaly plic, jsou přecitlivělí na houby ve vzduchu (Gioulekas et al. 2004). Mnoho autorů dokazuje pozitivní korelaci mezi symptomy alergických reakcí a koncentracemi hub v ovzduší (Gioulekas et al. 2004; Levetin et Water 2001). Při inhalaci (vdechnutí) jsou alergeny schopné se dostat do krevního řečiště, kde interagují s žírnými buňkami – mastocyty. Mastocyty začnou vylučovat histamin, který způsobuje stahy hladké svaloviny a zužování dýchacích cest, hlavně průdušek, a dochází tak k dušení (Yao et al. 2009).

Houby ve vzduchu mohou také obsahovat různé mykotoxiny, jež mají různé a různě silné projevy. Nejznámější z mykotoxinů jsou aflatoxiny, jež jsou obsaženy v rodech *Aspergillus* a *Penicillium*, z nichž některé typy jsou silně karcinogenní (Bock et Cotty 2006; Douwes et al. 2003; Kiffer et Morelet 1999).

Aflatoxiny způsobují potlačování imunitního systému, rakovinu a smrt. Lidé by se neměli této látce vystavovat. Studie zabývající se tematikou výskytu aflatoxinů ukazují, jak

je tento problém složitý a neřešený. Aflatoxiny jsou přítomny ve vysokém procentu potravin, způsobují výrazné ekonomické ztráty výrobcům, obchodníkům či pěstitelům v různých odvětvích zemědělství (Cotty et Garcia 2007). *Aspergillus flavus* produkuje mimo aflatoxinů ještě cyklopiazonovou kyselinu, jež způsobuje například poškození jater, ledvin, pankreatu, slinných žláz a myokardu. *Aspergillus niger* produkuje ochratoxin A, který je neuro- a nefrotoxický (Kłosowski et al. 2010).

K dispozici je mnoho studií, ve kterých byly testovány potraviny na přítomnost mikromycet. Výsledky nebyly zcela uspokojivé. Mižáková et al. (2002), testovala na přítomnost mikromycet a mykotoxinů masové produkty, jako jsou salámy, párky a klobásy a zjistila, že nejčastější rody mikromycet byly *Penicillium*, *Acremonium*, *Mucor*, *Cladosporium* a *Aspergillus*, jimiž byly přísady přidávané do výrobků (koření) silně kontaminovány.

Penicillium produkuje nejširší škálu sekundárních metabolitů, které nejen využíváme jako antibiotika, ve farmacii či potravinářství, ale některé druhy produkují také nežádoucí mykotoxiny, jako jsou ochratoxin A, patulin, jež se vytváří například v hnijících jablkách. Způsobuje širokou škálu zdravotních problémů – od křečí, otoků, po průjemy a zvracení, navíc byla na zvířatech prokázána jeho karcinogenita (Barreira et al. 2010). Citrinin má sice protibakteriální účinky (Jia et al. 2010), ale u člověka může způsobit nemoci ledvin (Flajs et Peraica 2009). U rubratoxinu byl prokázán inhibiční účinek na určitý druh rakovinných buněk, nicméně je toxigenní (Wang et al. 2007). Cyklopiazonik je účinný neurotoxin a po orálním užití se u krys začaly objevovat nádory jater, ledvin, sleziny a dalších orgánů (Sawane et Saoji 2005). Mezi další sekundární metabolity rodu *Penicillium* patří například peniciliová kyselina, secalonin nebo mykofenolové kyseliny (Sawane et Saoji 2005).

Některé zdroje uvádějí, že rody *Cladosporium*, *Mucor*, *Acremonium* a *Absidia* nejsou nejspíše schopné vytvořit mykotoxin (Mižáková et al. 2002), jiné je považují za velmi toxigenní (Kiffer et Morelet 1999). Rody *Alternaria sp.* a *Cladosporium sp.* byly dokonce uvedeny coby jedni z původců kožních mykóz (Gioulekas et al. 2004). Rod *Alternaria* v mnohých studiích vychází jako velice efektivní původce astmatu (Levetin et Water 2001; Gioulekas et al. 2004).

Ve studii Gioulekase et al. (2004) se ukázalo, že (pro Řecko) platí, že mladí jedinci jsou citlivější na houby ve vzduchu a že muži jsou náchylnější k problémům s dýcháním, způsobených tímto původcem, než ženy a to v poměru 3:2, hlavně v případě alergie způsobené spórami rodu *Alternaria sp.*

2.5. Transport a rozšiřování spór hub

Obecně se všechny druhy hub, včetně těch, které kontaminují prostředí, rozšiřují ovzduším pomocí spór nebo fragmentů hyf. Není však zcela jasné, jaká je frekvence přenosu vzduchem, kapkami deště nebo například hmyzem (Magyar 2005). Některé studie ukazují transport spór hub na částicích prachu.

Studie o dálkovém přenosu spór pasátovými větry z Afriky na Barbados v letech 1996-1997 potvrdily, že životaschopné propagule hub a bakterií se takto šíří pouze jsou-li přítomné částice saharského prachu, který chrání částice před UV zářením a před vysycháním, což bylo potvrzeno pozitivní korelací mezi množstvím mikroorganismů (CFU m⁻³) a prachu (μg m⁻³). Tato studie také dokládá, že v období El Niño byly koncentrace hub a bakterií ve vzduchu daleko vyšší, než během zbytku roku 1997 (Prospero et al. 2005). V mírném pásu Evropy se spóry hub rozšiřují vzduchem nebo na částicích prachu, bohužel se ale neví, jak přítomnost částic prachu ovlivňuje či neovlivňuje klíčivost spór.

V mírném pásu Evropy také funguje dálkový přenos hub - vertikálními turbulencemi větru se spóry hub dostávají výš a proudění vzduchu je roznáší. Je zajímavé, že do výšky 1000 metrů je koncentrace spór hub v ovzduší 10⁴ spór/m³, ve 3000 metrech jsou koncentrace o dva řády nižší (Hirst et al. 1967). Z toho vyplývá, že stěžejní procento transportu spór hub probíhá v podstatě regionálně. Průběh sezónní cirkulace je závislá na směru a rychlosti větru, tlaku, přítomnosti a průběhu deště a relativní vlhkosti (Gioulekas et al. 2004).

V ovzduší celého světa je mnoho faktorů, které mohou životnost a klíčivost spór i bakterií negativně či naopak pozitivně ovlivnit. Tyto mikroorganismy musí být resistantní k mnoha stresům, například proti UV záření. Prachové částice, řasy, rostlinné zbytky a pyly v ovzduší představují pro fragmenty a spóry hub nejen transportní mechanismy, ale také poskytují zásobu vlhkosti, ochranu před vysycháním a UV zářením.

2.6. Časoprostorový výskyt hub v ovzduší a abiotické faktory toto ovlivňující

Výskyt spór hub v ovzduší se mění v čase a prostoru a je závislý na mnoha faktorech.

Je dobře zdokumentováno, že vzorky pocházející z různých lokalit se mohou lišit z pohledu kvalitativního a kvantitativního zastoupení hub (Gioulekas et al. 2004) a bakterií (Fierer et al. 2008). Kvalitativně a kvantitativně se mohou lišit i vzorky nasbírané na jedné lokalitě v závislosti na čase odběru (jak během dne, tak během roku). Důvodem těchto změn jsou lokální či regionální meteorologické podmínky (Fierer et al. 2008). Dle

některých studií (Levetin et Dorsey 2006) je při teplých letních deštích koncentrace spór hub ve vzduchu nejvyšší. Ve studii O'Gorman et Fuller (2008) vyšla jasná pozitivní korelace mezi vzrůstající teplotou a koncentrací spór ve vzduchu u rodu *Cladosporium sp.* Vlhkost vzduchu pozitivně korelovala s koncentracemi spór rodů *Penicillium sp.* a *Aspergillus sp.*

Jedním z faktorů může být například přítomnost lesních porostů, blízké sousedství s hospodářskou půdou (Kiffer et Morelet 1999) nebo vegetací jako takovou (Gioulekas et al. 2004). Je zcela logické, že v případě, je-li většina běžných mikromycet fytopatogenní nebo fytoapofytickými druhy, koncentrace CFU/m³ jejich spór se bude zvyšovat s blízkostí od těchto ploch. Dle diverzity rostlin se liší diverzita hub (Gioulekas et al. 2004; Levetin et Dorsey 2006). Je důležité řešit problematiku alergenních spór hub v ovzduší v zemědělských oblastech, kde je jejich koncentrace vždycky vyšší.

Již vyšlo mnoho studií, zabývajících se výskytem spór hub v ovzduší během roku. Ve většině prací je zdokumentováno, že vysoké koncentrace spór hub v ovzduší jsou od jara do podzimu (Levetin et Dorsey 2006), ve studii vytvořené Oliveirou (2009) se hovoří o nejvyšších hodnotách rodu *Penicillium sp.* v zimě.

Spóry hub potřebují dost tepla i vlhkosti. Mnozí z nich jsou patogeny rostlin, proto je výhodné, aby jejich potenciální cíloví hostitelé byli na vrcholu vegetačního cyklu. S ohledem na ekologii jednotlivých rodů spór hub nebo jejich stádií je jasné, že v každém ročním období převládají jiné druhy. Vrcholy koncentrací jednotlivých druhů hub se od sebe liší, každá houba má jiný životní cyklus a vyhovují jí i jiné podmínky.

Koncentrace spór hub jsou každý rok jinak vysoké, protože se mění například meteorologické podmínky. Je tedy obtížné shrnout, kdy jsou koncentrace spór hub v ovzduší nejvyšší. Ve studii vypracované Konopiňskou (2004) vychází nejvyšší koncentrace spór hub v ovzduší v létě. V polské srovnávací studii (Gniadek et al. 2005) se ukázaly nejvyšší koncentrace spór hub v ovzduší na podzim, kdy je zpravidla také nejvyšší počet plodnic sporulujících makromycet.

Abiotickými faktory, jež ovlivňují výskyt spór hub v ovzduší, mohou být teplota, déšť, rychlost větru, rosný bod, tlak vzduchu či směr větru. Rody jako *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum* nebo *Drechslera* mají nejvyšší koncentrace během teplých suchých dní, zatímco askospóry a basidiospóry jsou nejhojnější naopak ve vlhkých podmínkách v noci nebo k ránu (Burch et Levetin 2002).

2.7. Outdoor vs. Indoor Fungi

Výskyt spór hub v ovzduší v budovách a mimo ně se liší. Trend výskytu je takový, že, až na výjimky, se v budovách nachází nižší koncentrace spór než venku, nicméně druhově se příliš neliší. Nejhojnějšími rody jsou *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* a nesporulující druhy (Shelton et al. 2002; Gniadek et al. 2005; Lee et Jo 2005; Oliviera 2009). Shelton uvádí, že pouze u jediného druhu - *Stachybotrys chartarum* – byla naměřená koncentrace uvnitř testovaných budov vyšší (6%) než mimo ně (1%). Průměrná koncentrace spór, jež způsobují zdravotní problémy, byla 101 CFU/m³. Je jisté, že rod *Stachybotrys* je nejčastější a nejhojnější rod nacházející se uvnitř budov. Rád tvoří obrovské kolonie, zvláště po vodních haváriích (Kleinheinz et al. 2006). Dalším velice významným rodem je rod *Acremonium*, jehož dominantní výskyt byl zdokumentován v práci z petrohradského metra (Bogomolova et Kirtsideli 2009).

Dassonville (2008), jež testoval na výskyt spór hub v ovzduší pařížské kojenecké ústavy, naměřil vysoké koncentrace rodu *Alternaria sp.* (rod *Alternaria*, coby hojný druh, vyšel i ve studii Fierer 2008; Lee et Jo 2005; Levetin et Water 2001; O’Gorman et Fuller 2008; Oliveira 2009). Koncentrace spór byla pozitivně korelovaná s provzdušňováním pokojů a vlhkostí v nich (Dassonville 2008). Spóry hub i jiné alergeny se do interiérů dostávají otvory, jako jsou okna, dveře či klimatizace (Levetin et Water 2001).

2.8. Normy a limity hub v ovzduší

Ačkoliv jsou houby v ovzduší původci různých alergií, astmat, zápalů plic atd. (Burch et Levetin 2002; Gioulekas et al. 2004; Henríquez et al. 2001; Khan et al. 1999; Prospero et al. 2005), v České republice neexistují limity ani žádná omezení, která by jasně ustanovila, jak vysoké koncentrace spór ve vzduchu se mohou vyskytovat. V ustanovení EU z roku 2000 byly určité druhy bakterií i hub ohodnoceny jakýmsi známkami na základě škodlivosti. Osoba zodpovědná za zdraví zaměstnanců musí být obeznámena s tím, do jaké míry se zaměstnaný vystavuje kontaminantům a musí znát zdravotní stav všech zaměstnanců (EU Council Directive 2000).

Fracchia et al. (2006) se zmiňuje o tom, že ani v Itálii neexistují normy na koncentrace spór hub v ovzduší. Na pracovištích je zpoplatněna míra riziku způsobená aerosoly pod nařízením EU.

V mnoha státech jsou asanační společnosti, které se zabývají likvidací plísní v obytných a provozních objektech. Hygienické stanice většiny evropských států mají jedno společné: na výskyt spór hub v ovzduší neexistují limity, i přes to, že patologické a

alergenní účinky plísní jsou známé. Nicméně například v Americe padlo několik návrhů, které by měly určovat vrchní strop koncentrace výskytu spór v ovzduší, ale žádný z nich nebyl nikdy realizován.

2.9. Nomenklatura

Jako ostatní organismy, i houby mají svou taxonomii, systém a nomenklaturu. Druhy spadají do rodů, ty do čeledí, čeledi do řádů, řády do tříd a třídy do kmenů. Každý z těchto stupňů má vlastní koncovky kvůli orientaci, co je v systému nadřazené čemu. Například rod *Mucor* s druhovým názvem *mucedo* patří do čeledi **Mucoraceae**, řádu **Mucorales**, třídy **Zygomycetes**, jež náleží do kmenu **Zygomycota**, to celé spadá do říše **Fungi/houby**. (Carlile et al. 2001). Toto je ukázka formální nomenklatury, bohužel je velice rozšířené používání neformálního zakončování u jednotlivých stupňů, jako například, že **Zygomycota** jsou často nahrazované názvem **Zygomycetes**, ačkoliv autor mluví v rádech kmenů nebo se **Zygomycota** v literatuře často pojí s termínem oddělení (Gomez-Lopez 2001). Dokonce se uměle vytváří celé skupiny. Příkladem může být třída **Deuteromycetes**, ve které jsou zahrnuty pouze nepohlavní stádia hub tříd **Ascomycetes** a **Basidiomycetes**. Neformální zakončování a vytváření těchto skupin je dokonce rozšířenější a stabilnější než formální nomenklatura. Názory na nomenklaturu se u jednotlivých autorů se poněkud liší.

Stejně jako nomenklatura se liší i názory autorů na vztahy mezi jednotlivými skupinami hub. Molekulární metody do systému vnášejí trochu více světla. Systémy hub jsou značně modifikované na základě praktického užití např. ve fytopatologii, medicíně apod., kde si ostatní vědní obory systém hub upravují z hlediska praktického užití. Existuje tedy řada systémů hub (Hibbet et al. 2007), já v této práci používám aktuálnější taxonomii on-line projektu Tree of life Web project <http://tolweb.org/tree/>, uvedený v publikaci z r. 2007 (Maddison et al.). Hibbet s kolektivem v roce 2007 vytvořili rozsáhlou studii, v níž shrnuli dosavadní poznatky fylogeneze hub. Řadí tento projekt k jedněm z nejlepších a zastává názor, že taxonomie on-line bude mnohem populárnější.

2.10. Metody používané v aeromykologii

2.10.1. Odchyt

Vzorky pro analýzu diverzity a koncentrací spór hub v ovzduší se dají odebírat různými způsoby. Výsledky každého ze způsobů mají jinou vypovídací hodnotu.

Vzorky se dají odebírat po nějaký čas kontinuálně. Na to se používají lapače, které jsou zpravidla umístěny na střeších vysokých budov. Existují dva typy lapačů: - například Hirstův volumetrický lapač (Stach 2003), v němž se posouvá páska, přes kterou se přehání vzduch s bioaerosoly. Tyto pásky se mohou ihned mikroskopovat; jiný sampler je filtrový, v němž je vložen filtr, přes který se nahání vzduch. Filtr se po odchytu vymývá na různá média kvůli různým typům hub. Ty se nechávají nakultivovat v odlišných teplotách – termofilní a mezofilní houby potřebují jiné teploty pro svoji kultivaci (Durand et al. 2002).

Dalším způsobem je odchyt na misku se živným médiem. Tato metoda se používá v případě zájmu o rody hub, jež mohou vyklíčit a vyrůst. Tyto narostlé mikromycety se dají dále mikroskopovat, studovat morfologii propagulí, jež mohou pomoci determinovat jak rod, tak i druh mikromycety. Jen díky této metodě se dají určovat *Mycellia sterilla*. Dále je možné čistou mikromycetní kulturu analyzovat molekulárně. Koncentrace hub ve vzduchu vychází v n CFU/cm².

Posledním způsobem je odebírat vzorky na sklíčko potřené adhesivem. Jako adhezivum může sloužit vrstvička vazelíny, směsi vazelíny a parafínu nebo vrstvy 1% agaru. Cílem tohoto odchytu je determinace rodů.

2.10.2. Kultivace

Základem studia mikromycet *in vitro* je kultivace na médiích. Izolace a kultivace čistých mikromycetních kultur vyžaduje přípravu sterilního média. Většina médií obsahuje hlavně vodu, dále uhlík a dusík. Proto se, coby zdroje těchto prvků, přidávají do médií cukry, peptidy, aminokyseliny, dusičnany a další. Média mohou být dále obohacena o vitamíny nebo v nich mohou být přimíchaná antibiotika, která inhibují růst bakterií. Kultivace na médiích mohou být determinačními znaky nejen druhu, ale i poddruhu mikromycet. Mikromycety různým způsobem reagují na látky přidané do média. Toto se používá zvláště v případě identifikace hub, jako je *Aspergillus* ze sekce *Nigri* nebo *Fumigati*.

2.10.3. Fixace a barvení vzorků pro mikroskopii

Základem pro mikroskopování je vytvoření preparátu. Ty mohou být buď trvalé, polotrvalé nebo dočasné. Trvalé a polotrvalé preparáty zamezují díky konzervantům degradaci usmrcených buněčných struktur při dlouhodobém uchovávání vzorku. Na výrobu trvalých preparátů se používá gelvatol, malviol, polyvinilalkohol nebo glycerínový gel. Základem přípravků na tvorbu těchto preparátů je fenol.

Pro mikroskopii se může, ale nemusí použít barvivo. Neobarvené preparáty lze pozorovat ve světlém poli, fázovém kontrastu či fázovém rozhraní. K barvení vzorků se užívá několik druhů přípravků. Barviva se váží na chitin, jenž je stavební látkou všech hub, čímž se zvýrazní stěžejní struktury, podle kterých se může úspěšně identifikovat druh. Na barvení preparátů se používá Trypan Blue a Cotton Blue, nebo Basic Fuchsin (De Silva 1965; Lacey et West 2006). Tato barviva v sobě obsahují fenol, proto i ty preparáty konzervují. Samotné struktury hub se dají barvit různými činidly, která ve vzorku reagují s látkou, na kterou vzorek testujeme.

V literatuře lze najít mnoho návodů na vytvoření směsí pro vytvoření preparátů či pro barvení vzorků, například příloze knihy Biodiversity of Fungi (2004, str. 613-618), nebo též v příloze knihy Air Spora (2006, str. 117-118).

2.10.4. Mikroskopie

Základním nástrojem pro určování mikromycet je mikroskop. I makroskopické znaky, jako je barva a povrch kolonie, barva hyf, tvorba hala nebo vnoření do média, jsou důležité, ale stěžejní je mikroskopování. Mikromycety se určují na základě charakteristických znaků, viditelných až při zvětšení 400-1000x.

Prvním krokem k určení rodu mikromycety je analyzovat septaci hyfy. Septované mycelium mají pouze houby z oddělení Basidiomycota a Ascomycota, neseptované jsou z oddělení Zygomycota, Chitridiomycota a Oomycota. Dalším identifikačním znakem je barva hyf, jejich povrch či větvení. Na základě přítomnosti a pohlavích a nepohlavních rozmnožovacích struktur lze určit mnoho rodů. U Deuteromycet existuje mnoho způsobů, jak tvořit spóry a to je právě jeden z determinačních znaků. U spór se sleduje melanizace, povrch, septace, tvar, „jizev“ (místa po odlomení od konidiogenní buňky, v případě vývinu v řetězcích, mají pupky dva) a velikost.

2.10.5. Molekulární metody

Molekulární metody nám v současné době umožňují maximální přesnou identifikaci hub, ale je stále nezbytné, aby byly podloženy kvalitními morfologickými popisy, protože bez toho může být výsledek podložený NCBI a BLAST databázemi poněkud zavádějící. Zatím je neproveditelné analyzovat jednotlivě odchycené spóry hub. Pomocí molekulárních metod se tedy identifikují pouze kultury nakultivované *in vitro*, což je v našem případě pouze část hub v ovzduší. Po izolaci DNA (CTAB metoda nebo kity) se pomocí PCR metody amplifikuje ITS oblast (ITS1 nebo ITS1-F a ITS4) a výsledný produkt PCR může být přímo sekvenován nebo nejprve je klonován a pak sekvenován. Pro účel identifikace jednotlivých kultur je tato metoda dostačující.

K analýze směsných vzorků hub (spór či mycelií) získaných ze vzduchu je vhodnější separační metoda jako je například Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), kde pomocí „sady“ selektivních reverzních primerů (ITS4) lze oddělit jednotlivé taxonomické skupiny (Nikolcheva et Bärlocher 2004; Nikolcheva et Bärlocher 2005). DGGE je metoda kombinující přednosti klonování a sekvenování. Požadovaný gen přítomný v genomu všech fungálních zástupců v odebraném vzorku je zaměřen vhodnými primery a amplifikován prostřednictvím PCR. Pokud se geny u různých druhů podstatně liší velikostí, lze je oddělit obyčejnou elektroforézou (Yang et al. 2001). Výsledné odseparované produkty (bandy) se přečistí (kit), zaklonují a následně osekvenují.

2.10.6. Diverzita

Ve vzduchu se nacházejí dva typy spór. Spóry, jež jsou schopné vyrůst na umělém médiu, jsou saprotrofní houby nebo nespecifiční parazité rostlin. K takovým druhům patří například *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Botrytis* atd. Druhou skupinu představují spóry hub, jež jsou nekultivovatelné *in vitro*, jsou ty, jež nevyklíčí na umělém médiu. Jde většinou o obligátní patogeny rostlin nebo o spóry, které rostou pouze za přítomnosti svého symbionta (například ektomykorhizní druhy). V tomto případě se na sklíčkách objevují dle ročního období různé spóry životních stádií rzí (Uredinales) či snětí (Ustilaginales), a dále (dle ročního období) spóry různých makromycet, například basidiomycetní spóry z řádu Russulales nebo různých chorošů. Je možné pozorovat také spóry Ascomycet. Rovněž nutriční a ekologická diverzita druhů rozhoduje o možnosti „nakultivovat“ kultury kvantitativně i kvalitativně adekvátní odebranému vzorku. Některé druhy jsou rychle rostoucí s vysokou konkurenční schopností, ty kolonizují substrát rychle a limitují kultivaci druhů pomalurostoucích s nižší konkurenční schopností.

Následující členění se zaměřuje na systém a morfologický popis těch rodů, jejichž spóry byly přítomné alespoň v jediném vzorku.

2.10.6.1 Oomycota

Je to samostatná vývojová skupina, jež má společný původ a vývoj s heterokontními řasami s chlorofylem *a* a *c*, ale s říší Houby nemají společný fylogenetický původ. Důvod, proč jsou sem zařazeny, je jejich společná morfologická podobnost. Také mají stejný způsob výživy.

Oomycotní houby mají mnohojadernou, neseptovanou, diploidní stélku, na níž se tvoří gametangia – oogonia a antheridia, jež dávají vznik pohlavní oospoře. Nepohlavně se Oomycota rozmnožují pomocí biflagelátní zoospóry ze sporangií. Suchozemská sporangia mají sférický nebo citrónkovitý tvar a bazální septum odděluje sporangia od samotné hyfy. Zoospora se pohybuje ke vhodnému místu na hostiteli (například *Phytophthora infestans* k hlíze lilku bramboru), přilne k jeho povrchu a vklíčí do něj.

Tato skupina má velice širokou ekologickou valenci. Rhipidiales jsou vodními saprofyty, Leptomitales také, ale jsou i parazité zvířat. Saprolegniales jsou saprotrofové a nektrotrofní patogeni na zvířatech, rostlinách. Phytiales parazitují na zvířatech, rostlinách i jiných houbách. Peronosporales jsou tak zvané pravé plísně, které parazitují na rostlinách. Sclerosporaceae mají ve svých řadách biotrofní patogeny na tropických a subtropických travách (Carlile et al. 2001; Webster et Weber 2007).

2.10.6.2 Zygomycota (houby spájivé)

V tomto oddělení nejsou vztahy ještě zdaleka jasné. Do oddělení Zygomycota patří rychle rostoucí druhy hub. Většinou to jsou saprofyty na organických substrátech. Ve svých řadách mají i četné zástupce parazitů – jak lidských (například druh *Basidiobolus ranarum* z řádu Entomophthorales a čeledi Basidiobolaceae), tak i zvířecích (*Conidiobolus sp.* či *Basidiobolus sp.* z řádu Entomophthorales a čeledi Basidiobolaceae). Několik druhů hub z řádu Entomophthorales jsou parazité hmyzu. Patří sem například druh *Empusa muscae*.

Formují nepohlavní kolumenátní struktury - sporangia (zygosrangia), v nichž se tvoří nepohlavní sporangiospóry, které se na základě jejich morfologických odlišností dělí na konidie, chlamydospóry a arthrospóry. Sporangia vyrůstají na sporangioforu, což je specializovaná hyfa, která může být nerozvětvená nebo dichotomicky větvená. Od sporangioforu odděluje rozmnožovací strukturu jediná septa. Mycelium je jinak bez sept a tvoří struktury jako rhizoidy či stolony (Carlile et al. 2001; Webster et Weber 2007).

Sporangiospóry této skupiny mohou být hojným kontaminantem ovzduší, zejména pokud jsou vzorku odebírány blízko u země.

2.10.6.2.1 Mucorales: *Mucor sp.*

Druhy řádu Mucorales jsou především saprotrofní organismy, běžně se vyskytující v půdě. Některé druhy způsobují hnití a tlení různých materiálů, například plodů. Tyto druhy jsou většinou schopné napadat, kolonizovat a úspěšně rozkládat materiály jako je celulóza nebo chitin. Mají silné, rychle rostoucí hyfy, na kterých se v krátkém čase tvoří rozmnožovací struktury.

Některé z druhů jsou mykoparazité napadající jiné houby. U těch jsou hyfy naopak malé a útlé. Další zástupci jsou obligátní parazité, které je nemožné kultivovat.

Nejvýznamnějšími druhy spojovanými s kontaminací ovzduší jsou rody *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.* a *Absidia sp.* (Richardson 2009). V porovnání s kultivovatelnými rody mitosporických hub *Penicillium sp.* a *Aspergillus sp.* je jejich výskyt mnohem nižší. To zejména proto, že to jsou sice rychle rostoucí rody, ale jsou vázané na organické substráty bohaté na sacharidy a mají nízkou konkurenční schopnost vůči ostatním houbovým polutantům. Nejsou známy jako alergenní rody, ale u imunodeficientních pacientů mohou vyvolávat rinocerebrální mykózy (Bouza et al. 2009).

Mucor sp. je rod tvořící silné hyfy, z nichž některé jsou zakončeny masivní rozmnožovací strukturou - sporogenní kolumelou. Protože tyto houby patří mezi Zygomycota, jejich mycelium není septované, jediná přepážka se tvoří mezi kolumelou a hyfou. Kolumelu volně obepíná sporangiální stěna, v níž se hromadí masy spór. Spóry jsou velice malé (1-4 μ m), tmavé, hladké nebo bradavičnaté. Jsou jen velice obtížně rozpoznatelné od konidií rodů *Aspergillus* či *Penicillium*. *Mucor sp.* tvoří chlupaté charakteristické kolonie, jejichž barva může pokrývat škálu od šedé po zelenou (Carlile et al. 2001; Webster et Weber 2007).

2.10.6.3. Ascomycota (houby vřeckaté)

Toto oddělení zahrnuje širokou škálu druhů - přes 64 000, mezi nimiž jsou zastoupeni saprotrofové žijící na odumřelém dřevě jako například *Sarcoscypha coccinea* (Pezizales) nebo *Xylaria hypoxylon* (Xylariales) nebo specialisté na rozkládání rohoviny a peří hlavně z třídy Onygenales – *Onygena sp.* Dále sem patří fytopatogenní druhy například *Taphrina deformans* (Taphrinales) způsobující kadeřavost broskvoní či *Claviceps purpurea*, (Hypocreales) – paličkovice nachová, při jejímž působení vyrůstají v klasech

obilnin a trav sklerócia, v nichž se tvoří alkaloidy, které po požití člověkem či zvířetem způsobují ergotismus. Na rostlinách také přežijí tzv. obligátní biotrófové. Mezi ně patří hlavně rody řádu Erysiphales (padlí). I patogeni zvířat a člověka mají své zástupce (*Candida albicans*, Saccharomycetales). Mohou to být také mykorhizní houby (například *Tuber sp.*, Pezizales). Asi třetina z oddělení Ascomycot se řadí mezi houby, jež žijí v symbióze s řasami a sinicemi (*Peltigerales*, *Teleoschistales* či *Pezizales*) a tvoří spolu lišejníky. Patří sem také houby, jež se cíleně používají ke štěpení cukru za vzniku alkoholu – z třídy Schyzosaccharomycetes například *Schizosaccharomyces pombe* k výrobě piva. *Saccharomyces cerevisiae* z třídy Saccharomycetales se používá jako potravinářské kvasinky.

Houby vřeckaté formují ve výtrusorodé vrstvě aska neboli vřecky, v nichž pohlavně meiózou vznikají spóry nazývané askospóry. Většina Ascomycet také tvoří nepohlavní spóry – konidie (= konidiospóry), které jsou nesený zvláštními hyfami – konidiofory. V případě, že se askospóra nachází v substrátu s vhodnými podmínkami, může vyklíčit v septované haploidní mycelium, jež má v každé buňce pouze jedno jádro. V rámci životního cyklu se dělí na stádium nepohlavní - mitotickou holomorfu neboli anamorfu, která produkuje nepohlavní spóry – konidie (oidie, chlamydospóry) a pohlavní stadium - meiotickou holomorfu neboli teleomorfu, která dává vznik askospórám. Oba typy spór jsou u většiny druhů schopné se šířit vzduchem. Vzhledem k tomu, že u mnoha nepohlavních stádií není známá ekvivalentní pohlavní fáze, nebo donedávna nebyla známá, je většina nepohlavních stádií řazena do umělé třídy Deuteromycetes (Carlile et al. 2001; Webster et Weber 2007).

2.10.6.3.1. Pezizomycotina: Leotiomycetes: Erysiphales (padlí)

Druhy v řádu Erysiphales, neboli padlí, jsou obligátními biotrófové bylin a dřevin. Anamorfoou od mnohých telemorfních rodů padlí (*Erysiphe sp.*, *Microsphaera sp.*, *Podosphaera sp.*, *Sphaerotheca sp.* a *Uncinula sp.*) je uváděn rod *Oidium sp.*, tomuto stádiu se proto říká oidiální a není divu, že zahrnuje kolem 120 druhů. *Oidium sp.* tvoří arthrospóry, jež tvoří společně s myceliem na listech charakteristické bílé povlaky. Konidie jsou ovoidní až elipsoidní, poměrně velké (některé druhy např. *Erysiphe trifolii* mají rozměry až 30-40x 16-20 μ m), mohou být hladké, bradavičnaté, s bodlinatým povrchem nebo s podélnými lištami, konce mohou být zduřené nebo zúžené a vystouplé. U Erysiphales je mycelium složené z jednobuněčných haploidních segmentů. Tvoří se hyfopódia, apresória a haustoria, pomocí nichž se (u většiny druhů) dostávají do buněčných

prostor epidermis listů. Jsou to takzvaní ektotrofové. Mezi endotrofní rody (ty, které prorůstají inter- i/nebo extracelulárně celým listem) patří například *Phyllactinia sp.*, *Leveilulla sp.* či *Pleochaeta sp.*

Mezi druhy padlí patří například *Microsphaera alphitoides* – padlí dubové nebo *Uncinula adunca* – padlí vrbové. Některá z padlí jsou ekonomicky důležitá, způsobují škody na hospodářských rostlinách. Takovým příkladem může být *Podosphaera leucotricha* parazitující na jabloni nebo *Uncinula necator* kolonizující listy vinné révy.

Pohlavní stádia se tvoří na listech kleistothecia s hygrofobními apendixy. Ty plní za vlhka funkci přichycovací. Za suchého počasí apendixy vyschnou, tím se zvednou od povrchu listu a kleistothecium s askospórami jsou větrem přenášeny dál. Po prasknutí kleistothecia se uvolní aska s askospórami. Hlavním určovacím znakem padlí je jeho cílový hostitel. Určení do druhu je též možné na základě apendixů, ale i podle charakteristik konidií, jež jsou velice rozdílné. Během vegetace jsou ve vzduchu zastoupené zejména konidie (oidie), které tvoří hojnou nepohlavní fázi na hostitelských rostlinách během vegetace, jsou arthrické, hyalinní a snadno se šíří větrem (Carlile et al. 2001; Webster et Weber 2007).

2.10.6.4. Basidiomycota (houby stopkovýtrusé)

Toto oddělení je sesterskou skupinou oddělení Ascomycota.

Basidiomycot bylo popsáno asi 37 000. Je to skupina hub tvořící převážně makroskopické plodnice. Mycelia hub tvoří s kořeny bylin a stromů symbiotické vazby (třídy Boletales, Russulales atd.) nebo jsou saprofyty odumřelých organismů (třídy Polyporales, Phallales atd.). Dále ve svých řadách mají parazity rostlin a to parazitující na dřevě například *Heterobasidion annosum* (Russulales), který vyrůstá na bázi jehličnanů a pomocí enzymů je zabíjí. Ve výtrusorodé vrstvě makromycet se na basidiích (stopečkách) tvoří četné basidiospóry, rozličných tvarů i velikostí, které jsou zejména na podzim velice hojně zastoupené mezi ostatními spórami hub v ovzduší.

V rámci oddělení Basidiomycota existují dvě třídy Ustilaginomycetes (sněti) a Urediniomycetes syn. Pucciniomycetes (rzi), jejichž zástupci jsou především fytopatogenní a produkují celou řadu pohlavních i nepohlavních spór v závislosti na hostiteli a životním cyklu. Právě tyto dvě skupiny představují v jarních a letních měsících významné alergenní polutanty v prostředí.

Kromě pohlavních fází, kdy tvoří basidiospóry, mají též nepohlavní životní fáze, při nichž se formují konidiální stádia, jež produkují konidiospóry. Mnohá nepohlavní stádia a

kvasinkovité fáze jsou řazeny opět do umělé třídy Deuteromycetes (Carlile et al. 2001; Webster et Weber 2007).

2.10.6.4.1. Agaricomycotina: Agaricomycetes: Russulales

Třída Russulales zahrnuje rody, které jsou buď ektomykorhizní nebo saprotrofní. Jejich plodnice nemají homogenní strukturu. Obsahují totiž kulovité proteinové buňky – sférocysty, což způsobuje jejich křehkost a lámavost. Některé rody (*Lactarius sp.*) mají ve tkáni specializované buňky – laktifery, jimiž produkují mléko (latex). Pohlavní spóry se tvoří ve výtrusorodé vrstvě plodnic a charakteristické pro tuto skupinu je, že jsou poměrně malé – 6-10 μ m, kulovité nebo ovoidní, amyloidní a výrazně ornamentované. Druhy rodu Russulales rostou od léta do podzimu, kdy jsou hojně zastoupeny ve vzduchu (Carlile et al. 2001; Webster et Weber 2007).

2.10.6.4.2. Ustilaginomycotina: Ustilaginomycetes: Ustilaginales (sněti): *Ustilago sp.*

Tyto fytopatogenní druhy mají významný hospodářský a ekonomický dopad. *Ustilago maydis* například vytváří snětivé masy na klasech kukuřice. Sněti se přenáší jako spóry na semenech. Sterilní rostlina má normální vývoj a napadení se pozná až v okamžiku, kdy se vyvine klas s masami snětí.

Spóry snětí jsou dvojího typu. Ty nepohlavní – jednojaderné, diploidní - jsou známe pod názvy teliospóra (nejběžněji), ale i teleutospóra, chlamydospóra, ustilospóra, ustospóra nebo probasidium. Ty jsou produkovány na podzim sory snětivé masy. Sory se u různých hostitelů formují na různých orgánech a spóry mají po sporulaci rozšiřovací a přezimovací funkci. Na jaře začnou klíčit, meioticky se dělit a vytvoří promycelium se čtyřmi haploidními buňkami. Každá buňka vytvoří pučením sporidium a je schopna opakovaně pučit. Toto mycelium je parazitické. Haploidní basidiospóry neboli sporidie klíčí velice ochotně i na málo výživných médiích a tvoří stádia podobná kvasinkám (Carlile et al. 2001; Vánky 2000; Webster et Weber 2007).

2.10.6.4.3. Pucciniomycotina: Pucciniomycetes: Puccinales (syn. Uredinales, rzi): *Uromyces sp.*

Puccinales vytvářejí rezavá ložiska (sory) spór na infikovaných rostlinách. Jsou obligátními parazity právě rostlin, nakultivovat na umělém médiu se prozatím podařilo jen několik málo druhů. Je to velice ekonomicky důležitá skupina, protože parazitují i na

hospodářských rostlinách, což je v některých státech hlavním omezením v úspěšném pěstování například obilí, cukrové třtiny, tabáku či kávovníku.

Existují dva typy rzí: pro makrocyklické rzi je typické střídání hostitelských rostlin a tvorba pěti typů spór. Obvykle mají dvě hostitelské rostliny, které si jsou absolutně nepříbuzné (například *Puccinia graminis* střídá dřevitý a graminoid) a v rámci uceleného životního cyklu tvoří pět typů spór – basidiospóry, spermacie, aeciospóry, uredospóry a teliospóry. Ve vzduchu jsou nejčastější aeciospóry, uredospóry a teliospóry. Na povrchu listu se tvoří spermatogonium, v němž zrají spermacie, mycelium prorůstá listem a na spodní straně se formuje aecium, z něhož vypadávají aeciospóry.

Mikrocyklické rzi mají pouze jednoho hostitele a vynechávají urediniální a aecidiální fázi. Oba typy rzí formují k penetraci rostliny nejdříve apresorium na povrchu listu rostliny, z apresoria prorůstá do mezibuněčných prostor penetrační hrot, který do intracelulárních prostor vniká ve formě haustoria. Determinace rzí se určuje na základě druhu hostitele, typu aecia a morfologie teliospóry.

Spory se od sebe poznávají na základě morfologických rozdílů. Na dva typy nejvíce detekovatelných spór v ovzduší existují morfologické definice: Aeciospóry jsou produkovány v řetězcích a obvykle jsou bradavičnatě ornamentované. Uredospóry (urediniospóry) jsou definovány jako ty, které jsou vždy jednobuněčné, tvoří se každá zvlášť na stopce a ornamentaci mají ježatou. Dále se spóry dají definovat ontogeneticky – dle stádií v životním cyklu. Teliospóry jsou podle této klasifikace spóry, z nichž roste basidium, basidiospóry jsou jednojaderné spóry produkované na basidiu, spermacie jsou samčí gamety, aeciospóry jsou spóry vzniklé po dikaryotizaci a dávají vznik dvoujadernému vegetativnímu myceliu. Uredospóry jsou opakující se vegetativní spóry produkované vegetativním myceliem. Tato klasifikace je společná mnoha druhům rzí. (Carlile et al. 2001; Cummins et Hiratsuka 1983; Webster et Weber 2007)

2.10.6.5. Deuteromycetes (syn. *Fungi imperfecti*, mitospórické houby)

Deuteromycetes nazývané také mitospórické houby nebo *Fungi imperfecti* je uměle vytvořená skupina, jež zahrnuje nepohlavní stádia (neboli anamorfy) Ascomycet a Basidiomycet. Pohlavní stádia k těmto houbám často nejsou známy nebo byly objeveny teprve nedávno.

Mitospórické houby jsou hojně zastoupené ve vzduchu, půdě a mnoha dalších substrátech. Mají širokou ekologickou valenci. Někteří zástupci této skupiny účinně rozkládají organický materiál – umí štěpit jak celulózu, tak lignin, jiní zástupci jsou

patogeny rostlin, zvířat ale i člověka. Způsobují kazivost potravin, degradaci papíru, textilu a jiných materiálů. Naopak člověk umí několik z nich účinně použít - například v lékařství nebo potravinářství. Někteří zástupci produkují účinné mykotoxiny a spóry všech by se daly označit za alergenní biopolutanty.

Deuteromycetes tvoří nepohlavní spóry neboli konidie ze specializované hyfy - konidioforu. Konidiogeneze probíhá různými způsoby a proto existují i různé typy konidií, jež je právě jeden z rozpoznávacích znaků hub. Dalšími znaky jsou například pigmentace spór a hyf, velikost, tvar spór či septace spóry. Mycelia v této skupině jsou septovaná. Deuteromycetes, jež netvoří žádné spóry, se označují jako *Mycelia sterilla*. U těch se dá zjistit, zda náleží k Basidiomycetes nebo Ascomycetes dle charakteristiky septace hyf. U Ascomycetes mají primitivní septa centrální pór s Woroninovými tělísky. U Basidiomycet je pór s vypouklým okrajem, jež se nazývá dolipor (Carlile et al. 2001; Kiffer et Morelet 1999; Webster et Weber 2007).

2.10.6.5.1. Hyphomycetes

Tato skupina v podstatě zahrnuje terestrické rody, jejichž spóry kolonizují rozličné substráty. Každý druh Deuteromycet se řadí do různých skupin podle morfologie a vzniku spór. Další dělení je na základě morfologických skupin:

a) Phialosporae:

Je to morfologická skupina tvořící fialospóry - konidie, které vznikají z fialid, což jsou lahvicovité konidiogenní buňky. Ty postupně pučí ze stálého konidiogenního místa a produkují basipetální konidie, jimž narůstá buněčná stěna *de novo*. Konidie mohou být uspořádány dvěma způsoby: buď ve shlucích, nebo v řetízcích. V místě, kde byly spóry spojené s fialidou, mají jizvu, v případě růstu v řetízcích mají jizvy dvě.

Aspergillus sp.

Jde o kosmopolitní půdní druh, jenž je saprofytem nebo parazitem různých substrátů, proto nebylo nijak obtížné ho nakultivovat.

Kolonie rodu *Aspergillus* jsou jemné, suché a mohou mít v různé barvy – nejčastěji zelenou nebo nažloutlou, méně často hnědou nebo černou. Fialidy s fialospórami jsou posazeny buď přímo na vezikulárním konidioforu, nebo častěji se mezi fialidy a konidioforem jeden řád větví a z něj teprve fialidy vyrůstají. Souběžné fialidy (s větvemi)

se nejdříve tvoří na vrcholu konidioforu, později i na stranách. Konidie jsou asi 3 - 5 μ m velké, suché, sférické, hladké, svraštělé, bradavičnaté či bodlinaté.

Determinace druhů rodu *Aspergillus* je složitá a jednotlivé druhy od sebe jde rozeznat jen těžce, zvláště u *Aspergillus* ze sekce *Nigri* či *Flavus*, kdy se používají nejrůznější metody a to jak morfologické, tak hlavně molekulární.

Aphanocladium sp.

Aphanocladium je mykoparazit, který se vyskytuje celosvětově.

Tento rod je charakteristický zobánky více či méně vytvořenými na konidioforech, z nichž vyrůstají kapkovité bílé spóry. Spóry jsou malé a suché – pro rozšiřování pomocí větru. Tvoří bílé vláskovité kolonie, na povrchu jiných kolonií hub.

Fusarium sp.

Je to kosmopolitní rod, jehož druhy jdou saprofyté nebo sapro-parasité na rostlinách. Je toxigenní.

Fusarium sp. vytváří různobarevné kolonie – od šedé přes oranžovou k sytě růžové. Fialidy navazují přímo na hyfu, všechny jsou od hyfy odděleny septami a vyrůstají v nižších počtech. Fialidy mají spíše útlý tvar. Dávají vznik tzv. fragmospórám (-konidiím), což jsou několikabuněčné konidie. Tyto spóry jsou poměrně dlouhé, velice úzké, zahnuté nebo rovné a, jak na bázi, tak na apikálním konci, ostré. Konidie z fialid vyrůstají v hustých trsech.

Penicillium sp.

Jde o kosmopolitní terestrický rod. Je to saprofytní a parazitický zástupce hub v ovzduší.

Penicillium vytváří obrovské masy spór, jež pokrývají škálu barev od zelené k modré, při identifikaci se hodnotí také formace kolonie. Zespodu vytváří velice charakteristické vrásčité mycelium. Tvoří většinou lahvicovité fialidy, jež nasedají v trsech rovnou na neztlustělý konidiofor. V rodu *Penicillium sp.* je také mnoho druhů a mikroskopicky se identifikují podle postavení fialidů či podle konidií – zda vyrůstají v řetízkách nebo ve shlucích. Konidie jsou malé, 3 - 5 μ m velké, suché, sférické, či oválné, hladké, svraštělé, bradavičnaté či bodlinaté.

b) Acroblastosporae:

Ve skupině Acroblastosporae jsou konidiofory více či méně odvozené hyfy. Na vrcholku hyfy se objeví nepatrný „pupen“, který roste a zvětšuje se, až je z něj dospělá buňka, která dává vznik další buňce, jež bude jednou zakladatelem nové kolonie. Toto se může opakovat mnohokrát. Pro tuto skupinu je charakteristické řetězení jedno- či vícebuněčných spór. Konidie mají (až na tu nejmladší) vždy dvě jizvy.

Cladosporium sp.

Cladosporium je zástupcem morfologické skupiny Acroblastosporae. Je to velice častý rod, je kosmopolitní, saprofytující mnohé substráty, dále patří mezi fytopatogeny, kdy způsobuje kladospóriózy nebo strupovitost nebo může to být hyperparazit rzi. Je toxigenní. Patří mezi tzv. saproparasitické černě, protože způsobuje černé skvrny na listech rostlin, to je běžné například u jabloní nebo slivoní. Známa je také skvrnitost okurek (Konopiňská 2004).

Kolonie mají olivovou nebo šedou, hnědou až černou barvu a jsou velice kompaktní. Povrch může být sametový nebo vláskovitý. Mycelium je buď vnořené do substrátu, nebo je povrchové. Občas se tvoří stromata. Konidiofory jsou buď rovné, nebo rozvětvené, občas tvoří řapík a hlavičku, která může být jemná nebo bradavičnatá. Spóry jsou vřetenovité, oválné, sférické a bodlinaté či bradavičnaté. Jsou značně melanizované (ochrana před UV zářením) a tlustostěnné (ochrana před zimou či teplem). Mohou mít až tři septy. Jsou v podstatě nezničitelné.

Torula sp.

Torula sp. patří mezi půdní druhy, často parazituje na rostlinách a protože na ní vytváří černé skvrny, patří mezi černě.

Tvoří malé, sametové zelené, hnědé až černé kolonie. Konidiofory jsou nerozvětvené nebo nepravidelně rozvětvené, silně hyalinní, hladké či bradavičnaté. Kononidiogenní buňky jsou terminální, hladké, bradavičnaté či bodlinaté. Jsou obvykle sférické, někdy ale také číškovité. Má silnostěnné bodlinaté spóry, jež jsou složeny z jedné až mnoha kulovitých buněk v řadě za sebou, mezi nimiž jsou vytvořena septa. Spóry jsou suché, pigmentované a tvoří se buď v lineárních, nebo rozvětvených v řetězcích. Jsou elipsoidní nebo sférické, hladké, bradavičnaté či bodlinaté. Buď nemají žádné, jedno nebo mnoho příčných sept. Terminální buňka konidie s mnoha septy bývá konidiogenní buňkou. Jednotlivé buňky spór jsou 3-6 μ m velké.

c) **Anellophorae a anneloblastosporae:**

V této morfologické skupině jsou konce fertálních hyfálních fragmentů zluštělé a konidiogenní buňka vytváří vždy jen jednu terminální konidii. Pod konidiogenní buňkou se nachází bazální septum oddělující ji od hyfy. Po konidiích na hyfě zůstávají krčky. V tomto místě na konidiogenní buňce se tvoří další a další konidie, které tu zanechávají krčky. Vytváří efekt prstence, který je pro tuto morfologickou skupinu charakteristický, dokonce se podle něj jmenuje. Délka jednotlivých krčků je jedním z determinačních znaků rodů v této skupině.

Belemnospra:

Je to kosmopolitní rod, zahrnující druhy saprofytické i fakultativně fytopatogenní..

Konidie je malá cylindrická, oválná, hyalinní a hladká. Může být septovaná až několika septy anebo vůbec. Krčky tvořící prstenec jsou poměrně široké.

d) **Porosporae:**

Všechny houby této skupiny jsou melanizované. Spóry vznikají z pórů na konidioforech (není zcela jasné, kdy pór vzniká – zda před, po nebo během konidiogeneze, často není jisté, zda je vůbec vytvořen, proto je velice složité do této skupiny zástupce zařadit). Konidiofory mohou stát po jedné nebo v přeslenech a mohou se objevovat také v akropetálních řetězcích. Póry lemují melanizovaný prsten, který je pro tuto skupinu charakteristický. Konidie jsou buď jedno-, dvou- nebo vícebuněčné.

Alternaria sp.

Alternaria sp. je velice často a hojně zastoupena v ovzduší celého světa. Řadí se mezi černě a jako saproparasit napadá jak mrtvé, tak živé rostliny, dle Konopiňské (2004) některé druhy způsobují zasychání rostlin či červenou skvrnitost. Je to terestrický druh.

Alternaria tvoří velice rozteklé šedé až černé kolonie a jen vzácně se tvoří stromata. Kolonie kolem sebe mívají světlé halo. Konidiofory jsou jednoduché nebo nepravidelně rozvětvené. Konidiogenní buňky jsou terminální. Konidie se řetězí nebo rostou po jedné. Jsou suché, složené, silnostěnné a hnědé od melaninu. Mohou mít oválný či lahvicovitý tvar, někdy mají na terminálním konci zobákový výrůstek. Jsou buď hladké, nebo bradavičnaté. Konidie mají mnoho nepravidelných sept, jak transverzálních, tak longitudinálních.

Curvularia sp.

Curvularia sp. je kosmopolitní rod parazitující na graminoidech.

Tvoří hnědé, šedé nebo černé kolonie, jejichž povrch je sametový nebo vláskový. Tvoří na svých koloniích velká, černá, často větvená stromata. Konidiofory jsou většinou hladké, rovné nebo zatočené. Konidiogenní buňky jsou terminální, sympodiální, zduřelé nebo cylindrické. Konidie jsou po jedné a jednoduché, zatočené, elipsoidní nebo oválné se třemi a více příčnými septy. Mohou být buď hladké, nebo bradavičnaté.

Stemphylium sp. + *Ulocladium sp.*

Tento rod je kosmopolitním terestrickým saprofytem a fytoparazitem. Rod *Stemphylium* je v některých zdrojích uváděn jako synonymum k rodu *Ulocladium*, v některých jsou rozčleněné na dva rody. V praktické části této práce je k nim přistupováno jako ke dvěma odlišným rodům. Zde stojí dohromady, jelikož mají velice podobné struktury.

Kolonie jsou hnědé, šedé, olivově hnědé nebo černé, většinou sametové. Tvoří stromata. Konidiofory jsou nerozvětvené nebo řídce rozvětvené. Konidie jsou solitérní, suché, protáhlé, zakulacené na koncích, elipsoidní nebo téměř kulaté. Mohou mít hnědou, černou, olivově hnědou či olivově zelenou barvu. Povrch spór může být hladký, bradavičnatý nebo bodlinkatý. Konidie jsou přepaženy mnoha příčnými i podélnými septy.

e) Botryoblastosporae:

U morfologické skupiny Botryoblastosporae se tvoří spóry souběžně v nahuštěných trsech na apikálním vesikulárním konci konidioforu.

Aureobasidium sp.

Rod *Aureobasidium* má širokou valenci. Může to být kosmopolitně rozšířen saprofyt, fytoparazit, endofyt či patogen na člověku.

Kolonie rodu *Aureobasidium sp.* je nejprve bílá, potom krémová, žlutá, oranžová a v konečné fázi zčerná a kolonie se ztenčí. Hyfy jsou bílé, v pozdějších fázích tvoří ztlustělé a melanizované kulovité až hranaté buňky uprostřed hyfy, v nichž jsou uloženy živiny a jsou určeny k rozšiřování. Těmto útvarům se říká chlamydospóry. Konidiofory jsou rozvětvené, zahnuté, zprvu hyalinní, později tmavnou. Konidie jsou shluknuté v malé kupky, mají elipsoidní až oválný tvar a jsou bezbarvé, hladké a bez sept.

f) Aleuriosporae:

Je to skupina, ve které se nachází mnoho druhů, jež mají konidiofory jen málo diferencované. Jsou to vlastně jen krátké, laterální větvičky vegetativní hyfy. Nachází se zde nejvíce morfologických typů spór. Aleurospóry jsou obdobou chlamydospór (zásobních spór), ty fungují často jako samostatný organismus, umí se totiž samy množit.

Epicoccum sp.

Epicoccum sp. je zcela běžný zástupce hub v ovzduší v celosvětovém měřítku. Stejně jako nemá problém s geografickou valencí, je schopné vyrůst na mnohých druzích substrátu. Je toxigenní.

Kolonie tohoto rodu je oranžovohnědá se světlejším halo. Kolonie mají tendenci tmavnout v čase (postupující melanizace) a tvoří se u něho vystouplá stromata. Konidiofory jsou často shluknuté k sobě. U tohoto rodu spóra vzniká tak, že několik buněk na konci hyfy začne měnit tvar na sférický, postupně septovat, zužovat se místo, kde je budoucí aleurospóra přichycena ke konidioforu, až se zcela oddělí. Tyto konidie jsou malé, kulovité, ale mnohobuněčné, silně melanizované, tlustostěnné a hladké nebo bradavičnaté.

g) Arthrospora:

Arthrospora je spóra, která vzniká fragmentací hyfy. Tyto konidie nejsou vlastně pravé konidie, které vznikají *de novo* ze specializované konidiogenní buňky.

Monoascus sp.

Tento rod má kosmopolitní rozšíření. Je terestriální.

Tvoří tmavé – hnědé až černé kolonie. Konidie jsou tmavé, bradavičnaté a mohou být přepaženy septy. Jsou sférické nebo oválné.

Scytalidium sp.

Scytalidium sp. je kosmopolitně se vyskytující druh se širokou ekologickou valencí. Patří mezi terestrické druhy, kteří parazitují na jiných houbách, např. rzi. U mnohých rostlin způsobuje různé nádory. Je také patogenem lidí – způsobuje dermato- a onychomykózy. Dále je schopen štěpit celulózu a lignin a je též zástupcem mykorhizních druhů.

Tvoří tmavé černohnědé až černé kolonie. Hyfy jsou tmavé a 2-8 μ m úzké. Konidie jsou tmavé, jemné, s žádným nebo až několika velice tmavými transverzálními septy.

Mohou být buď cylindrické, potom jsou 4-17 x 3-8 µm velké nebo mohou být kulovité a to 5-11 µm velké.

h) Sympodulosporae:

U morfologické skupiny Sympodulosporae jsou konidie zapuštěné do konidioforu pomocí úzkých istmat. Po dozrání se konidie odlomí a s ní se přeruší i istmus. Na konidii zůstane hilum (pupek) a to buď špičatý, plochý nebo kulatý.

Dactylaria sp.

Tento rod se vyskytuje kosmopolitně. Je to saprotrofní nebo parazitická houba rostlin. Může ovšem parazitovat i na člověku.

Kolonie jsou šedé nebo hnědé. Buňky mycelia nejsou nijak vezikulární v epidermis či rhizodermis hostitele. Konidiofory jsou buď samostané nebo ve svazečcích, vzpřímené, rovné či zahnuté, septované. Konidie jsou suché, jednoduché, rostou po jedné (s jedním pupkem), ale různě tvarované s jedním nebo více transverzálními septy. Jsou hyalinní a jemné.

2.10.6.5.2. Agonomycetes

Agonomycetes je skupina sterilních mycelií (= *Mycelia sterilla*), jež z definice slova sterilní, nikdy netvoří spóry. Některé druhy tvoří sklerócia, jiné druhy poznáme podle kolonizovaného substrátu. Některé mají zvláštní hyfální struktury, ale ve většině případů je jejich identifikace nesmírně obtížná a je rozhodně dobré sáhnout k jejich identifikaci po molekulárních metodách. Rozšiřují úlomky hyf. (Carlile et al. 2001; Ellis 1971; Ellis 1976; Kiffer et Morelet 1999; Webster et Weber 2007).

3. PRAKTICKÁ ČÁST

3.1. Odběr vzorků

3.1.1. Vzorky pro kvalitativní a kvantitativní identifikaci spór pod světelným mikroskopem

Vzorky pro kvalitativní a kvantitativní determinaci spór byly odebírány každý měsíc na jedné lokalitě – v Českých Budějovicích (Jihočeský kraj) ve výšce pěti metrů nad zemí. Mikroskopovací sklíčka (76x24 mm) byla vysterilována v autoklávu a ve sterilním prostředí ve flowboxu pokryta tenkou vrstvou 1% vodního agaru. Takto připravená sklíčka byla uzavřena ve sterilních Petriho miskách. Na místě odchyty byla miska odkryta a sklíčko vystaveno 24 hodinové depozici spór. Po té byla miska uzavřena. Obsah na sklíčku byl fixován kotonovou modří v laktofenolu a překryt krycím sklíčkem o rozměrech 60x24 mm.

Vzorky byly uloženy v chladu a kvantifikace a identifikace spór proběhla ihned po transportu do laboratoře. Na sklíčkách byla kvantifikována a identifikována myceliární vlákna a spóry.

Kvantifikace a identifikace byla prováděna po celé vrstvě agaru na sklíčku tj. cca plocha sklíčka pod světelným mikroskopem Olympus BX41.

3.1.2. Vzorky pro určení životaschopných spór hub a bakterií ve vzduchu – formace kolonií *in vitro*

Ne všechny zachycené spóry jsou životaschopné nebo schopné kultivace *in vitro*. Množství takových jednotek se hodnotí jako CFU index kolonií hub a bakterií po 24 expozici na definovanou plochu (případně při kvantifikované vzorku vzduchu na 1m³ vzduchu) (Lee et al. 2009; Kleinheinz et al. 2006; Fracchia et al. 2006).

K odpočtu kolonií *in vitro* kultivovatelných hub a bakterií byly použity Petriho misky o průměru 90 mm. Odchyt spór probíhal na stejné lokalitě jako v případě odchyty na sklíčka, ale na maltózový a Czapkův - Dox agar, což jsou neselektivní živné půdy používané v mykologii pro růst houbových kultur *in vitro*. Složení a přípravy obou agarů jsou v příloze (Příloha 1.). Po 24 hodinové expozici na vzduchu byly misky uzavřeny. Množství kolonií na plochu misky bylo vyhodnoceno po dalších 24 hodinách. Pro identifikaci houbových kolonií byly kolonie očíslovány a sterilně přeočkovány na čistou Petriho misku s živným médiem. Misky byly uloženy do termostatu s teplotou 25°C a po 5-

7 dnech byla identifikována na základě morfologických znaků vysporulovaná kultura jako preparát pod světelným mikroskopem Olympus BX41.

3.1.3. Kvalitativní identifikace spór

Spóry byly identifikovány podle morfologie, tvaru a velikosti. U mnohých spór je nemožné určit přesně, ke kterému rodu a druhu houbového organismu patří. Tyto spóry byly proto rozděleny do taxonomicky nejbližších skupin. K identifikaci byly použity klíče a internetové zdroje, které se zabývají aeromykologií a determinací spór. Spóry pro jednotlivé měsíční odběry byly pozorovány rovněž pod mikroskopem Olympus BX41 a zdokumentovány pomocí digitální kamery a Camedia Software. Některé byly nafoceny fotoaparátem Olympus Camedia Model NO.C-5060 Wide Zoom.

Přehled internetových zdrojů:

- http://conabioweb.conabio.gob.mx/bancoimagenes/doctos/001_thumbs2-1.htm (29. 4. 2010)
- <http://pollen.utulsa.edu/Spores/AIRSPORA.html> (29. 4. 2010)

Přehled klíčů:

- Illustrated Genera of Rust Fungi (Cummis et Hiratsuka, 1983)
- Illustrated Genera of Smut Fungi (Kálmán et Vánky, 2000)
- The Deuteromycetes (Kiffer et Morelet, 1999)
- Dematiaceous hyphomycetes (Elis, 2001)

3.1.4. Identifikace vyizolovaných kultur

Kultury nakultivované in vitro byly identifikovány na základě morfologických struktur – konidiofórů a konidií podle klíčů na základě mikroskopického preparátu v kotonové modři (Příloha 2).

Preparáty z jednotlivých kultur byly pozorovány pod mikroskopem Olympus BX41 za použití zvětšení 100x-1000x.

3.1.5. Biodiverzita

Spóry na sklíčkách byly spočítány a určeny. Byly vytvořeny grafy na základě různých členění – druhové zastoupení, dle typů spór, a to buď v měsíčních periodách, nebo po ročních obdobích.

Biodiverzita v měsíci a v ročním období byla vyjádřena Shannonovým indexem H, Simpsonsovým indexem D a Simpsonsovým recipročním indexem 1/D

$$H' = - \sum_{i=1}^S \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

$$D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)},$$

kde je n_i celkový počet jedinců jednoho druhu, N je celkový počet všech jedinců a S počet druhů. Tyto indexy vypovídají o dominanci druhů ve společenstvu. Dále byla počítána ekvitabilita E

$$E = H / \ln S$$

, která udává míru vyrovnanosti společenstva.

3.1.6 Statistické zpracování dat:

Pro analýzu sezonality druhů zachycených na sklíčka a sezonní výskyt jednotlivých typů spór byl použit program CANOCO a v něm lineární metoda přímé ordinace RDA. Data byla logaritmičsky transformována s přičtením jedničky jako $\ln(x+1)$. Jako vysvětlující proměné byly použity čtyři roční období. Jaro bylo definováno měsíci březen až květen, léto měsíci červen až srpen, podzim měsíci září až listopad a zima měsíci prosinec až únor. Test signifikance vlivu ročního období na složení společenstva zachyceného na sklíčko probíhal při 499 permutacích plného modelu.

Testem dobré shody bylo pomocí programu Statistica porovnáno, zda se v rámci ročních období lišil počet rodů vykultivovaných na CFU.

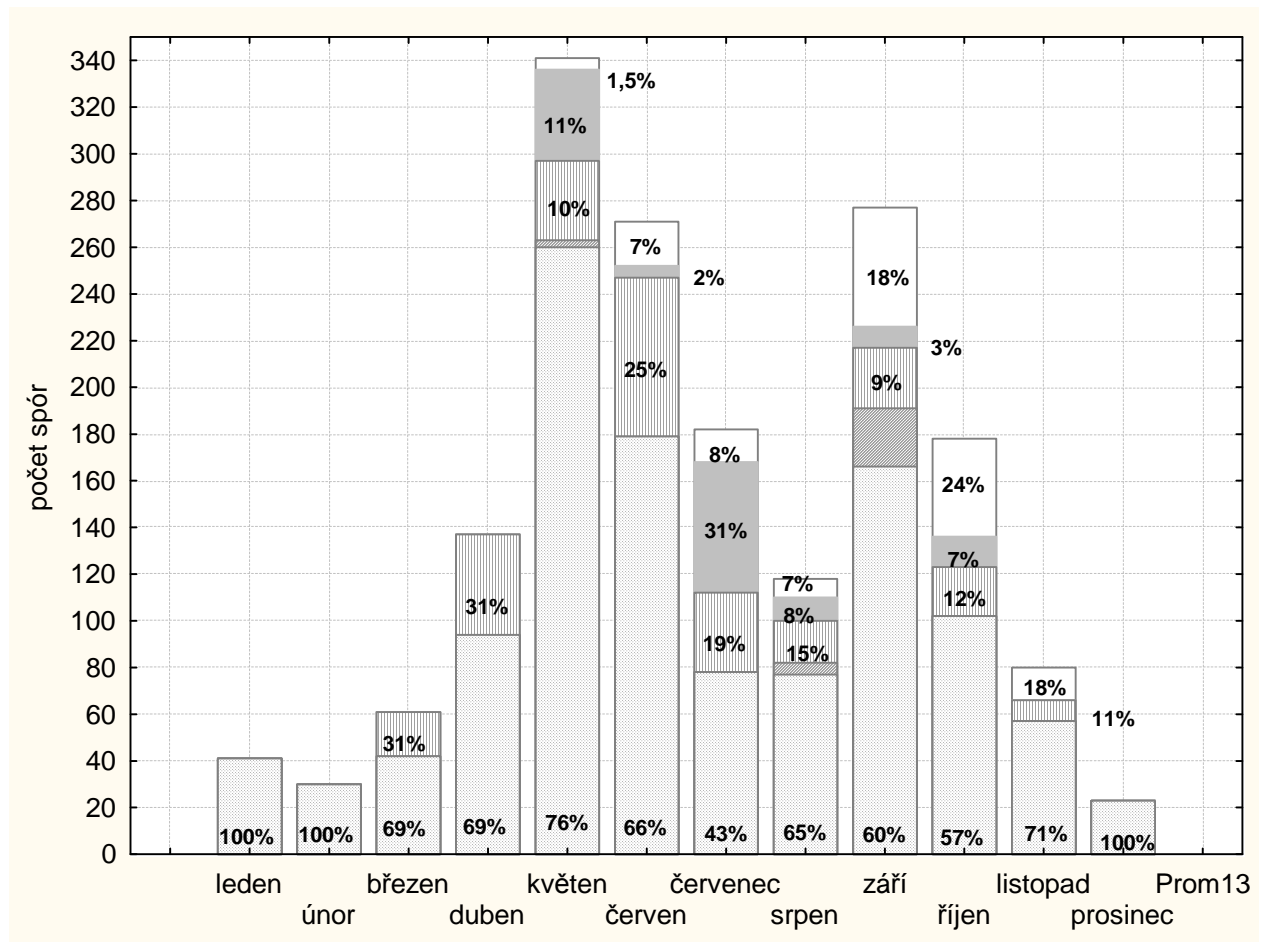
4. Výsledky

4.1. Vyhodnocení výsledků

4.1.1. Vzorky pro kvalitativní a kvantitativní identifikaci spór pod světelným mikroskopem

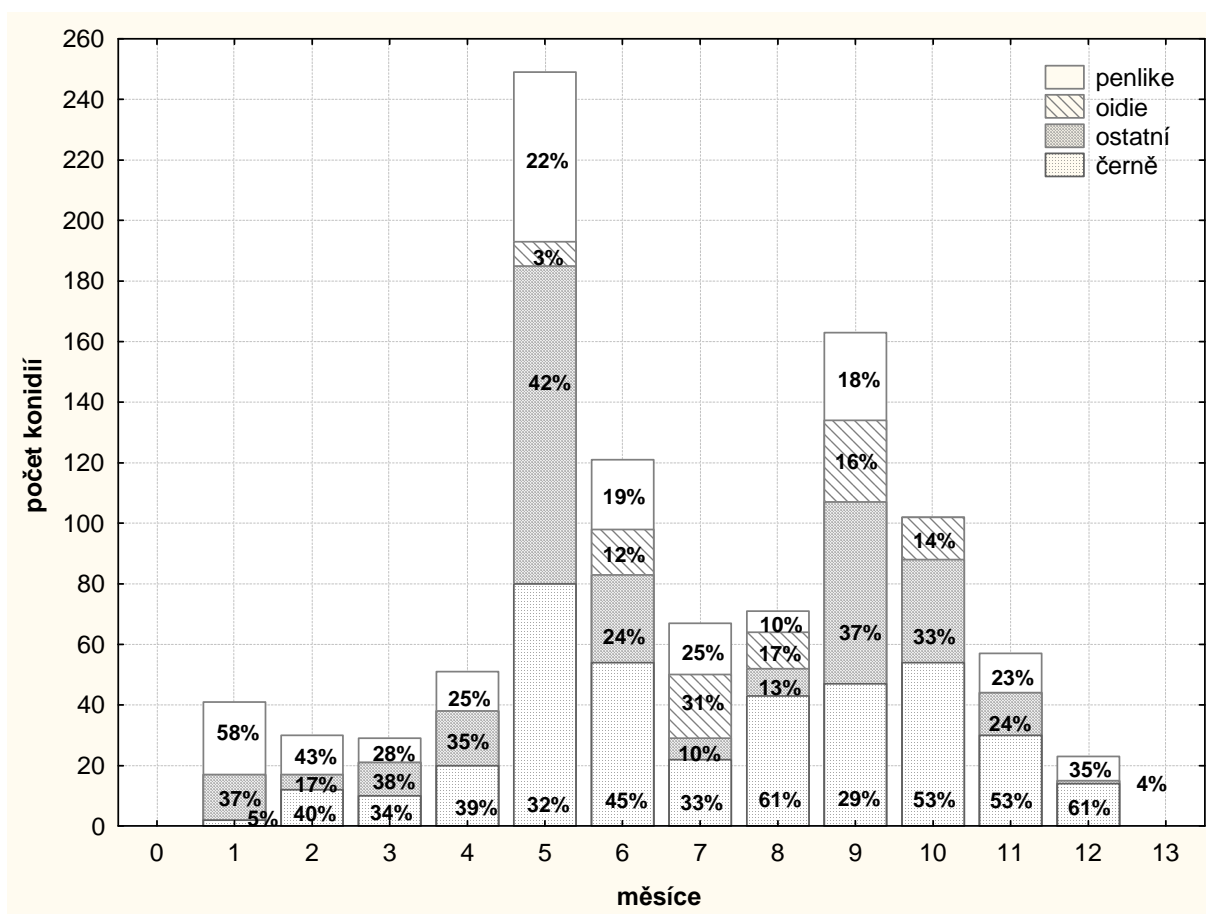
Ve vzorcích na sklíčkách bylo nalezeno a určeno 26 typů spór. Ty byly určeny do co nejnižších taxonomických skupin, protože v aeromykologii není vždy možné určit houby do rodu na základě jejich spór. Z 26 identifikovaných typů spór byly 2 typy zařazeny do čeledí, 12 bylo určeno do rodu a 3 do druhu. Jeden typ spóry se bohužel nepodařil zařadit dále, než na úroveň konidie. 17 z 26 typů spór patřilo k *Fungi imperfecti*, 4 náležely k telemorfním stádiím oddělení Basidiomycota, 3 typy byla různá stádia spór rzí a snětí a 1 typ náležel k telemorfním stádiím oddělení Ascomycota. Jeden typ se řadil do kmenu Oomycota. V celoročním průměru dominovaly Deuteromycetes se zastoupením 62%. Rzi a snětí tvořily 17% ročního průměru. 10% bylo vyhodnoceno jako telemorfní stádia oddělení Basidiomycota, 8% jako telemorfní stádia oddělení Ascomycota, a 2% patřila ke kmenu Oomycota (Obr. 1).

Nejhojněji se vyskytoval rod *Cladosporium sp.*, a to v měsíci květnu, kdy tvořil dvacetiprocentní měsíční podíl. Tento měsíc byl také absolutně nejvyšší počet spór v ovzduší. Hojně byly v měsíci květnu i ostatní černě, včetně rodu *Cladosporium*, které dosáhly 31%. Tento měsíc byl také naměřený vysoký počet konidií penicilliového typu (15%). V porovnání s ostatními skupinami dominují po celý rok zástupci Deuteromycetes. V měsících květen, červen a červenec se vyskytovalo mnoho různých stádií rzí a snětí (10%, 33% a 20%).



Obr. 1: Procentuální zastoupení spór během roku. Sloupce reprezentují taxonomické skupiny a jejich procentuální podíl na celkovém množství spór na sklíčku pro každý měsíc v roce 2009. Legenda: □ Basidiomycota - basidiospory, ▒ Ascomycota - askospory, ▤ Uredinales a Ustilaginales, ▨ Oomycota, ▧ Deuteromycetes.

Na sklíčkách byly nalezeny ve vysokém procentu zástupci třídy Deuteromycetes (Obr. 1), v zimě tvořily jedinou zachycenou skupinu. V Obr. 2 lze vidět, že z třídy Deuteromycetes ve většině měsíců dominují konidie černí. V měsíci květnu a září jsou dominantou konidie ze skupiny „ostatních konidií“, které nebylo možné blíže určit.



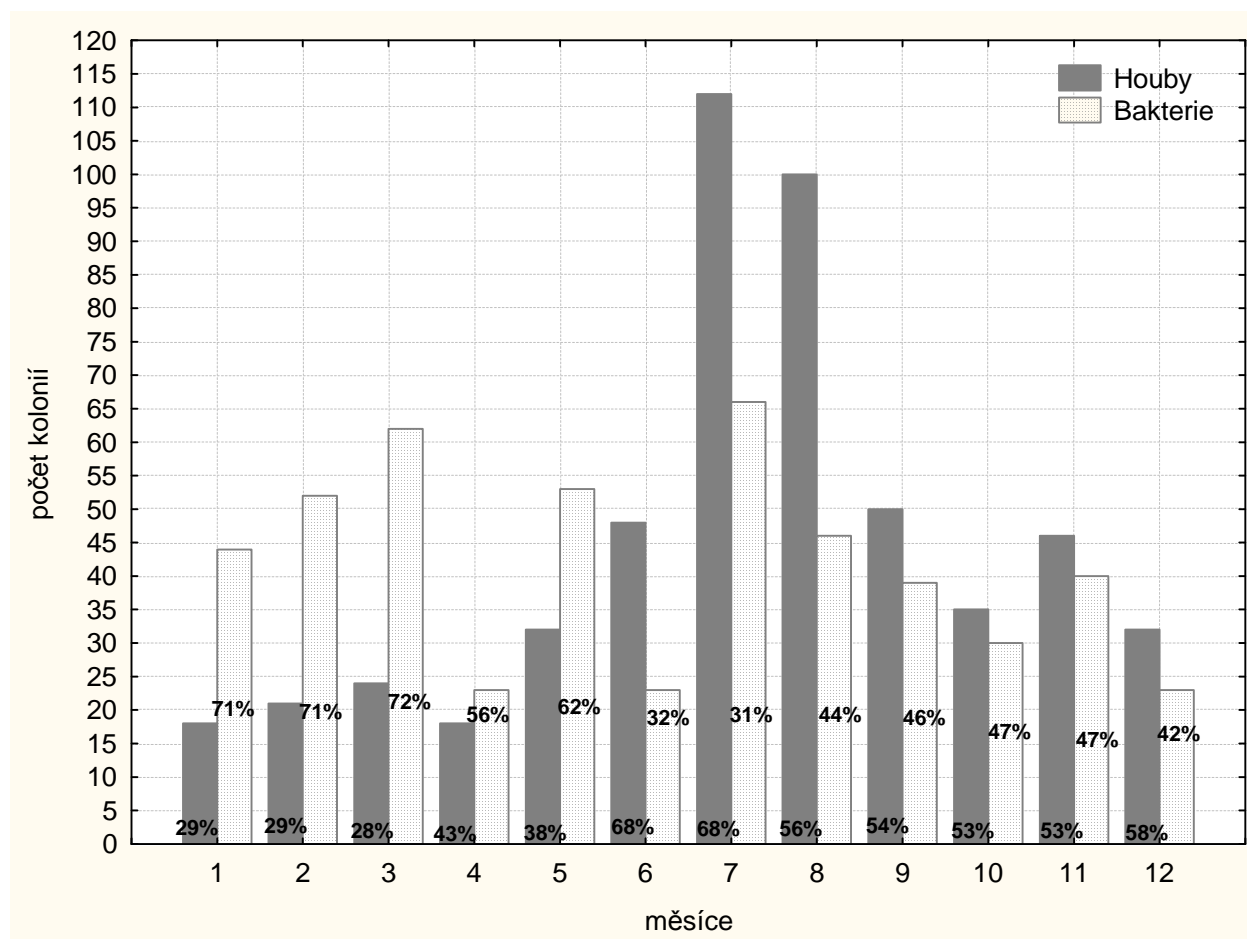
Obr. 2: Výskyt spór anamorfních stádií (tř. Deuteromycetes) během celého roku. Sloupce reprezentují uměle členěné podskupiny a jejich procentický podíl na celkovém množství spór na sklíčku. Skupina „penlike“ zastupuje konidie penicilliového typu.

4.1.2. Vzorky pro určení životaschopných spór hub a bakterií ve vzduchu – formace kolonií *in vitro*

Na Petriho miskách se podařilo nakultivovat 16 mikromycet, které se, až na *Mycellia sterilla*, povedlo určit alespoň do rodu. Mikromycety na médiích spadaly do dvou oddělení: do Deuteromycetes (14 rodů) a Zygomycetes (dva rody).

Celoroční výskyt byl zaznamenán pouze u dvou mikromycet – u rodu *Cladosporium sp.* a *Penicillium sp.* Téměř celý rok byla také zaznamenána přítomnost rodů *Alternaria* a *Aspergillus*. Obecně ale u kultivovaných hub nebyl dle mých dat průkazný rozdíl mezi počtem kultivovaných rodů v rámci jednotlivých ročních období ($\chi^2 = 4.1395$, $df = 3$, $p = 0,9657$).

Na médiích byly rozpoznány kolonie jak hub, tak bakterií. Jejich množství byly velice variabilní. Od ledna do května dominovaly bakterie, jejichž nejvyšší naměřené množství bylo 66 CFU na misku v červenci a 62 CFU na misku v měsíci březnu. Od června do prosince se vyskytovaly ve vyšších množstvích CFU hub. V měsících červenci a srpnu stouplо množství hub na 112 a 100 CFU na misku s médiem (Obr. 3).



Obr. 3: Prercentuální podíl kolonií hub a bakterií na Petriho miskách po 24 hodinové kultivaci při 25°C pro každý měsíc.

4.1.3. Kvalitativní identifikace spór

Na základě klíčů se povedlo identifikovat 26 typů spór (Tab. 1). V příloze je přiřazen obrázek s návodem, jak poznat jednotlivé spóry hub (Příloha 5). Spóry byly nafoceny a jsou též přiložené (Příloha 6, 7, 8).

Tab. 1: Měsíční výskyt spór hub nachytané na sklíčko.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.
<i>Aeciospora</i>			13	43	11	58	11	6	3			
<i>Aescheliella crocea</i>									17	11	1	
<i>Alternaria</i>			4	4		3	6	5	6	12	7	2
Askospora					39	5	56	1	9	13		
<i>Aureobasidium pollutans</i>	15	5	11	12	2	13	2		6			
Basidiospora					5	19	14	8	48	42	14	
<i>Belemnospora</i>									4	13		
<i>Cladosporium</i>	2	12	6	16	72	32	16	26	26	23	16	9
<i>Curvularia</i>								5				
Deutero XY					83	12		5				
<i>Drechslera</i>									2	3		
<i>Epicoccum</i>					8	16		2	3	12	3	3
Erysiphales					8	15	21	12	27	14		
<i>Fusarium</i>					5	4	5	4	29	6		
<i>Chrysosporium</i>					12							
Oospory					3			5	25			
<i>Penicillium-like</i>	24	13	8	13	56	23	17	7	29		13	8
Russulales									3			
<i>Scytalidium</i>				6	3				4	4	4	1
<i>Stemphylium</i>						3		3				
Teliospora			6						6	13	6	
<i>Torula</i>								2	6		4	
<i>Ulocladium</i>									4	4		
<i>Uredospora</i>					23	1	23	12	17	8	3	
<i>Urocystis</i>			8									
<i>Ustilago</i>						2						
Celkem typů spór v měsíci	3	3	6	7	14	14	10	15	20	14	10	5
Celkem spór v měsíci	41	30	48	102	330	215	171	112	274	178	80	23

4.1.4. Identifikace vyizolovaných kultur

Na základě klíčů se podařilo identifikovat 16 rodů mikromycet (Tab. 2). Některé z nich jsou i nafocené (Příloha 8).

Tab. 2: Měsíční nárůst rodů mikromycet nakultivovaných na médiu.

	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	X.	XI.	XII.
<i>Alternaria</i>	*	*	*			*	*		*	*	*	*
<i>Aphanocladium</i>	*			*	*							
<i>Aspergillus</i>	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Aurobasidium pollutans</i>	*	*	*	*		*		*	*			
<i>Botrytis cinerea</i>	*											
<i>Cladosporium</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Chrysosporium</i>					*	*	*	*	*		*	
<i>Penicillium</i>	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>Mucor</i>							*	*			*	*
<i>Epicoccum nigrum</i>						*	*	*		*	*	
<i>Mycellia sterilla</i>	*		*				*	*	*	*	*	*
<i>Monoascus</i>							*					
<i>Aphanomyces</i>				*								
<i>Fusarium</i>					*			*	*		*	
<i>Micromucor</i>						*						
<i>Stemphylium</i>						*						
Celkem rodů v měsíci	8	5	5	6	6	9	9	9	8	6	9	6

4.1.5. Biodiverzita

V září bylo na sklíčku nalezeno 20 typů spór, což byl nejvyšší počet za celý rok 2009. Na médiích se podařilo nakultivovat maximálně 9 rodů mikromycet. Tato hodnota byla dosažená ve všech třech letních měsících. Nejnížší hodnoty byly na sklíčkách zaznamenány v lednu a únoru, kdy byly nalezeny pouze 3 typy spór. Média měla své minimum mikromycet v únoru a březnu, kdy jich bylo 5.

Nejvyšší diverzita hub v ovzduší vychází dle všech indexů na měsíc září (Tab. 3). Nejméně diverzní je leden, který měl svou populaci hub i poměrně nevyrovnanou. Podobné tendence k dominantním druhům se projevily v květnu. Roční období s nejširším spektrem nachytných morfologických typů spór byl podzim. V tomto období byl také nejnížší index ekvitability (Tab. 4).

Tab. 3: Indexy popisující složení a biodiverzitu spór hub v ovzduší v ročním období. Spóry jsou rozděleny do taxonomických skupin.

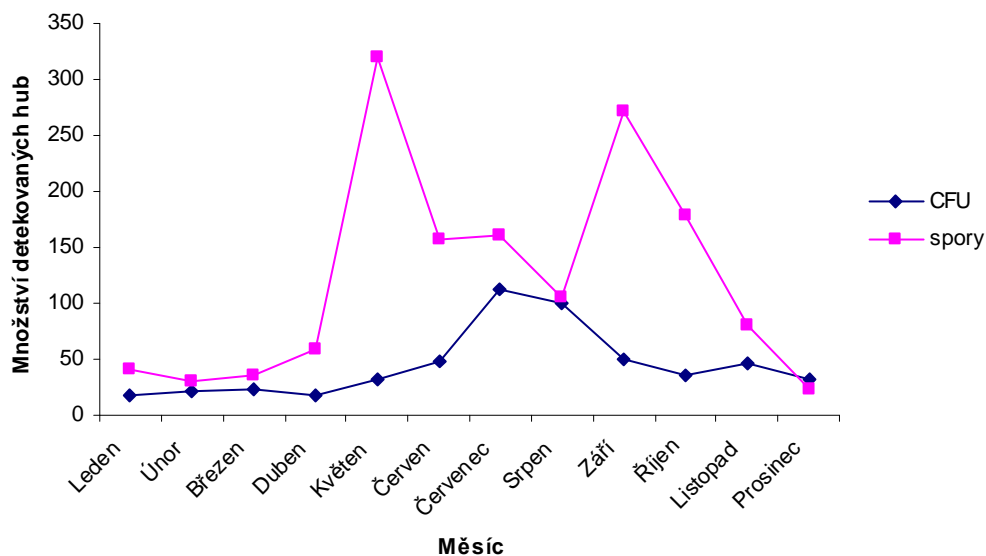
	S	H	D	1/D	E
Leden	3	0,83	0,48	2,09	0,75
Únor	3	1,03	0,38	2,66	0,94
Březen	6	1,72	0,19	5,21	0,96
Duben	7	1,66	0,24	4,11	0,854
Květen	14	2,076	0,16	6,14	0,79
Červen	14	2,267	0,13	7,41	0,86
Červenec	10	2,00	0,17	5,81	0,87
Srpen	15	2,47	0,11	9,32	0,91
Září	20	2,61	0,09	10,88	0,87
Říjen	14	2,40	0,11	8,94	0,91
Listopad	10	2,14	0,13	7,48	0,93
Prosinec	5	1,35	0,30	3,33	0,84

Tab. 4: Indexy popisující složení a biodiverzitu spór hub v ovzduší v ročním období. Spóry jsou rozděleny do skupin na základě jejich morfologických charakteristik.

	S	H	D	1/D	E
Jaro	10	1,86426	0,185773	5,382926	0,809638
Léto	9	2,045278	0,142191	7,032781	0,930846
Podzim	10	1,992627	0,1634	6,119967	0,865387
Zima	3	1,048226	0,367813	2,718769	0,954136

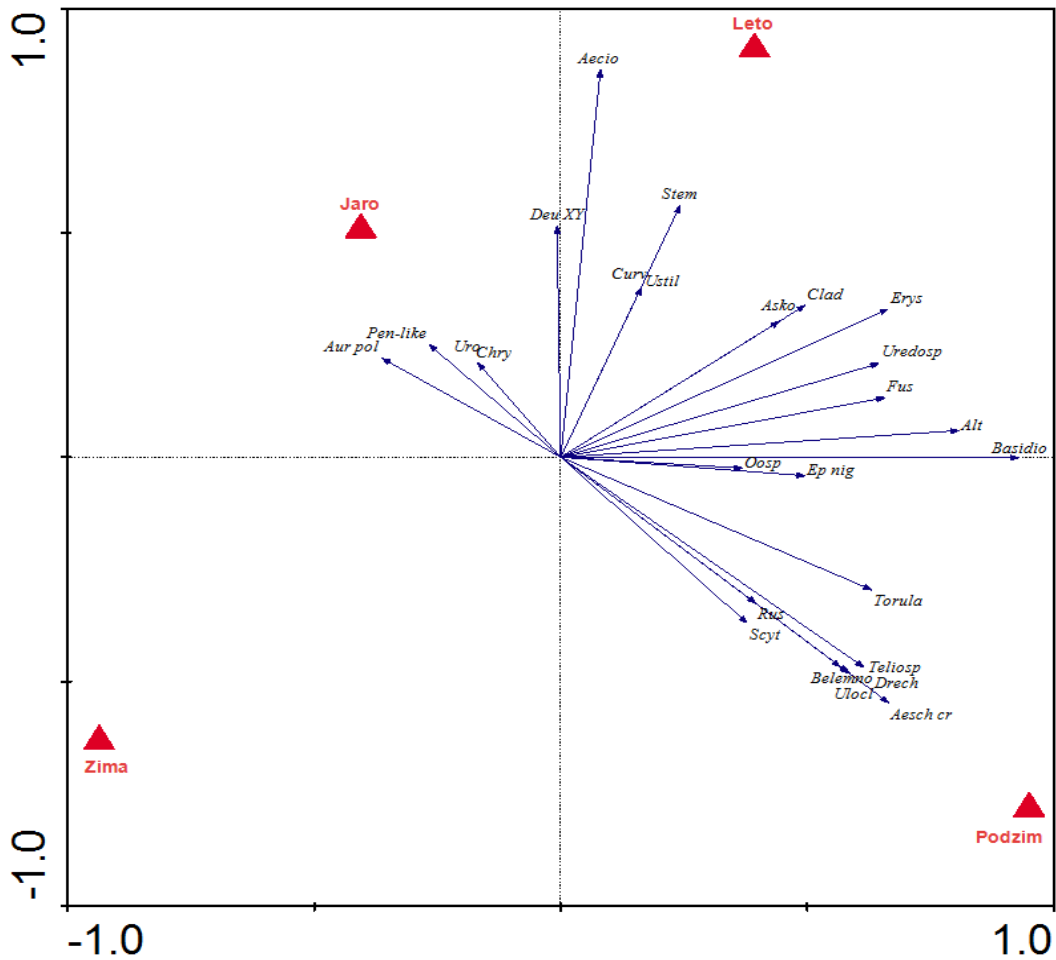
4.1.6. Sezonalita zachycených druhů a typů spór

Porovnání počtů spór nachytných na sklíčku a nakultivovaných mikromycet na mediích se lišily. Kolísání množství detekovaných hub v čase lze vidět v grafu (Obr. 4).



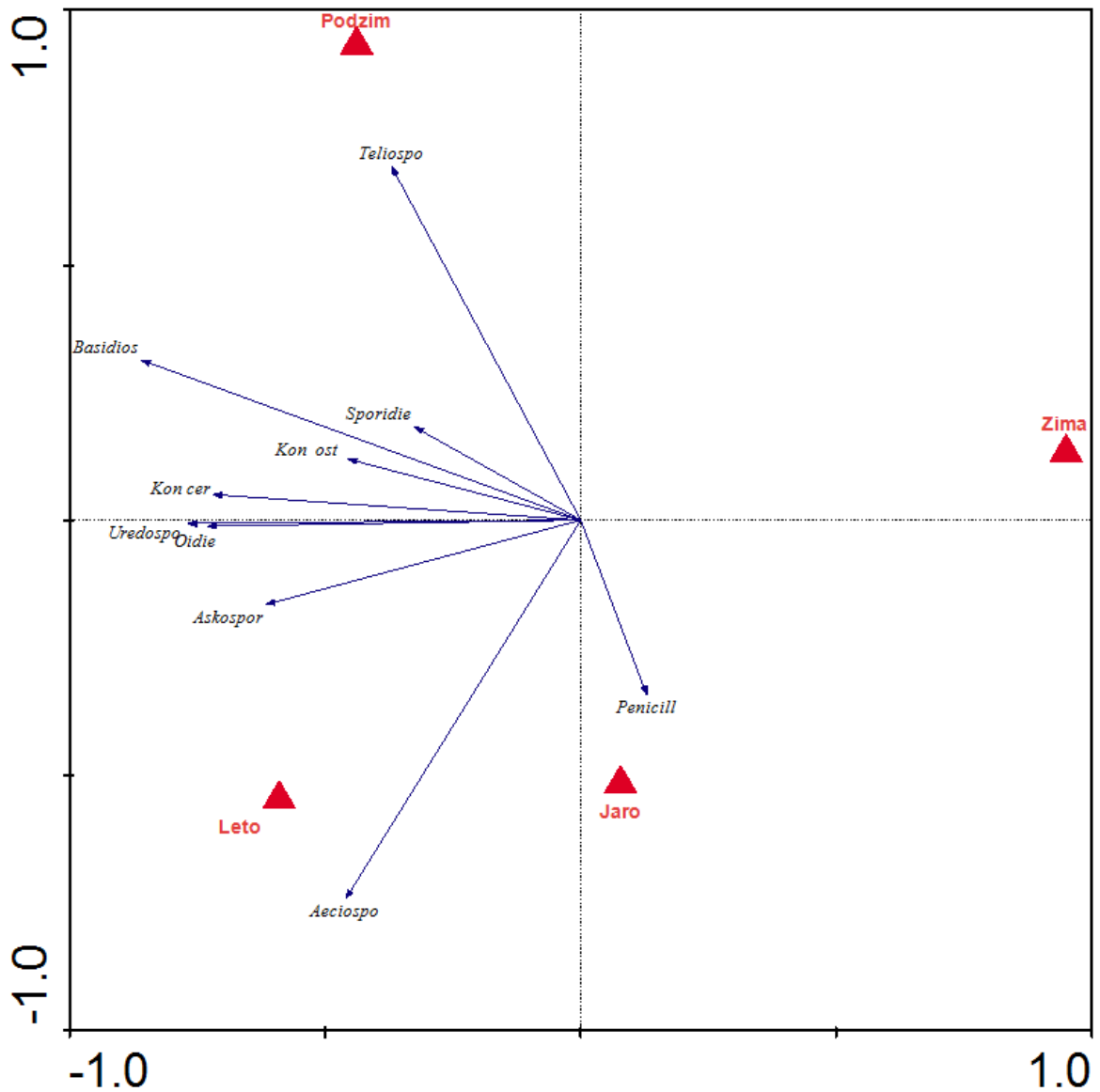
Obr. 4: Měsíční výskyt hub v ovzduší v roce 2009.

Analyzovaná data ukazují rozdíly v sezónním výskytu jednotlivých druhů aeromycet (Monte Carlo : $F = 2.657$, $p=0.0020$) (Obr. 5). Žádnou ze skupin nelze označit za převážně zimní. *Aureobasidium pollutans* či *Chrysosporium sp.* se dají označit za jarní druhy. Rody *Stemphylium*, *Curvularia* a *Ustilago* jsou zástupci hub, které se vyskytují hlavně v letních měsících. Vysoká variabilita spór hub v ovzduší je na podzim, ačkoliv tyto rody nemají zcela hojné zastoupení. Typicky podzimními rody jsou *Ulocladium*, *Scytalidium* nebo dále například holubinky (Russulales). Nejhojnější druhy – *Cladosporium sp.*, *Alternaria sp.* či *Fusarium sp.* se vyskytují od léta do podzimu. Hojné *Penicillium*-like konidie se však vyskytují nejvíce v jarních měsících.



Obr. 5: Ordinační diagram RDA sezonality druhů, jejichž spóry byly zachyceny na sklíčce. První a druhá osa dohromady vysvětlují 45.4% procent variability. Zkratky jmen druhů lze najít v příloze (Příloha 3).

Sezonalita byla prokázána i u morfologických typů spór (Monte Carlo: $F=3,674$, $p=0.0020$) (Obr. 6). Nejvyšší variabilita byla během léta a podzimu. Jediným typem spóry inklinujícího k jedinému ročnímu období, jsou teliospóry rží a sněží. Aeciospóry rží mají svá maxima v létě.



Obr. 6: Ordinační diagram RDA sezonality morfologických typů spór zachycených na sklíčce. První a druhá kanonická osa vysvětlují 52,9 % variability. Zkratky jmen typů spór lze najít v příloze (Příloha 4).

5. DISKUZE

Tato práce poskytuje data, jež vyjadřují z části kvantitativní, z části kvalitativní výskyt spór hub v ovzduší v Českých Budějovicích během roku 2009. Nutno zmínit, že všechna data jsou ochuzena o součty CFU vzorků z médií, to znamená, že kvantitativní data se týkají pouze vzorků nachytných na sklíčka. Počítání CFU jednotlivých rodů vyrostlých na médiích neproběhlo z časových a materiálních důvodů, na které je daná metoda náročná. Na médiích byl sečten pouze celkový počet narostlých kolonií. Jde tedy o takzvanou non – viable method. Metoda, v níž se kalkuluje s CFU hub, se nazývá viable (nebo cultural) method (Pyrri et Kapsanaki-Gotsi 2007; Magyar et al. 2009).

Na sklíčku bylo nalezeno 26 typů spór a na miskách pouze 16. Dalo by se usuzovat, že odchyt na sklíčko je lepší metodou, protože lze odchytit i spóry druhů nekultivovatelných *in vitro* a druhů s nižšími konkurenčními vlastnostmi při *in vitro* kultivacích, které přerostou rychle rostoucí druhy. Odchyt na sklíčko poskytuje vyšší variabilitu spór, jež jsme schopni pozorovat. Na sklíčku se nachází mnoho druhů, které ani nejsou schopné na umělých médiích vyrůst – například obligátní parazité rostlin (Pyrri et Kapsanaki-Gotsi 2007, Magyar et al., 2009), jež na germinaci potřebují odpověď hostitele. Na druhou stranu mají některé rody mikromycet tak podobné spóry, že není možné je od sebe rozeznat – například konidie rodu *Aspergillus sp.* a *Penicillium sp.* (Magyar et al., 2009), proto oba rody v případě sklíček spadají do skupiny „*Penicillium – like*“.

Odchyt na Petriho misky umožňuje určit mikromycety a to poměrně snadno, už jenom kvůli tomu, že mikroskopie především myceliárních somatických i rozmnožovacích struktur, je dobrým vodítkem k úspěšnému určení rodu a druhu. Spóry mají velikosti většinou 1-20 μ m a myceliární struktury mohou být několikrát větší. Makroskopické znaky jsou též důležité na identifikaci. Některé druhy na svých (různobarevných) koloniích vytváří například stromata, podle nichž se dají druhy také určit. Při porovnání počtů identifikovaných hub na sklíčku a na médiu je sice množství mikromycet nakultivovaných na médiu nižší než množství spór na sklíčku, ale každá z metod má nejvyšší naměřené hodnoty v jiném měsíci. Také porovnání dat v tabulkách (Tab. 1 a 2) s výčty taxonomických skupin obou metod se liší.

V této práci byla také zjišťována přítomnost mikromycet. Neurčitelné spóry *Penicillium – like* ze sklíček byly tedy podpořeny přítomností nakultivovaných rodů *Aspergillus* i *Penicillium*, z čehož se dá předpokládat, že některé z *Penicillium - like* spór

patří rodu *Aspergillus* a jiné rodu *Penicillium*, popřípadě Zygomycetám. V případě, že by bylo počítáno CFU hub nakultivovaných na misce, dalo by se samozřejmě usuzovat více – například jaké je kvantitativní zastoupení v ovzduší jednotlivých rodů, které by se daly mnoha metodami určit i blíže než jen do rodu (Frisvad et Samson 2004; Kramer et al., 1960; Oliviera et al., 2009; Samson et al. 2007). Bylo by zajímavé výsledky porovnat se studií ze stejného regionu, v níž se s CFU kalkulovalo, ale bohužel je toto první aeromykologická studie z venkovního prostředí v České republice vůbec. Ve studii vytvořenu Magyar et al. (2009) byly srovnávány výsledky non - viable a viable method a zjistilo se, že vyšla podobná čísla identifikovaných hub (189 pro non – viable a 165 pro viable). V této studii vyšel konečný počet typů spór, rozdělených na základě taxonomicky nejbližší možné určitelnosti - 27, pro nakultivované mikromycety to bylo 13. Rozdíly počtů určených typů spór ve studii vytvořenu Magyar et al. (2009) a v této práci se tolikanásobně liší, protože jejich studie probíhala na vinici (v bezprostřední blízkosti s rostlinami), 3 roky po sobě a byl použit lapač, který do sebe nasává 10 l vzduchu za hodinu. Všechny tři faktory zvyšují výsledné hodnoty typů spór. Navíc metoda odchytu na médium na Petriho misky nebyla zcela vhodně zvolena. Médium bylo citlivé na vysoké teploty, kdy vysychalo, v mrazech v zimě naopak zamrzalo a měnilo své morfologické vlastnosti. Za deště se médium ředilo a při vylití přebytečné vody se jistě odstranila i většina nachytaných spór. Docházelo tak ke zbytečným ztrátám dat. Tato metoda se spíše používá k měření koncentrací hub uvnitř budov (Klánová 2002), ale v dnešních dnech se živná média používají pouze ke kultivacím. Jsou totiž dostupné samplery, které umožňují buď viable nebo non – viable method. Tyto samplery jsou mnohem pohodlnější na odchyt a také přesnější. Jejich hlavní výhoda tkví v umožnění dlouhotrvajícího kontinuálního odchytu.

Mnoho studií vůbec nepracuje s metodou CFU, pouze určují spóry mikroskopicky. Ne náhodou potom vychází vysoké hodnoty *Penicillium*-like konidií (Magyar 2009), které vyšly vysoké i v této práci (Obr. 2). *Aspergillus* i *Penicillium* jsou hojné druhy a sloučení počtů jejich spór do společné hodnoty tvoří dojem, že jednotlivé rody jsou ještě hojnějšími. Ačkoliv je již dlouho známá problematika spór hub ve vzduchu, ještě nebyla objevena metoda, která by dokázala shrnout kvantitativní i kvalitativní data. Také neexistuje žádná metoda, která by kombinovala kontinuální odchyt s možností úspěšného určení všech (alespoň) rodů hub (D'Amato et Spieksma 1995; Kasprzyk 2006; Nikkels et al. 1996). Ve vzorcích na sklíčkách bylo mnoho druhů, které nebylo možné určit blíže, než jako konidie

Deuteromycet. Každá studie, která používá k identifikaci hub v ovzduší pouze mikroskopické metody, vykazuje podobné výsledky (Magyar et al. 2009).

Nejvyšší počty spór hub v ovzduší byly naměřeny v průměru v podzimních měsících, ale nejvyšší hodnoty za měsíc byly naměřeny v květnu, kdy absolutně dominovalo v ovzduší *Cladosporium sp.*, které bylo nejhojnějším rodem téměř celý rok. Dominance této houby vysvětluje nižší ekvitabilitu E pro měsíc květen (Tab. 1). Vysoké hodnoty spór hub byly naměřeny i v létě a na jaře. Rody *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* a *Alternaria* byly přítomny ve všech vzorcích (buď jejich spóry nebo ve formě nakultivovaných vzorků). Tyto rody hub jsou řazeny k těm nejhojnějším a to v ovzduší celého světa (Apetrei et al. 2009; Awad 2007; Kasprzyk et Worek 2006; Kramer et al. 1960).

Zajímavé jsou sezónně zvýšené hodnoty fytopatogenních hub. Vysoká hodnota aeciospór rzí v jarních až letních měsících (Obr. 5, Obr. 6) souvisí s jejich životním cyklem. V tomto období se rozšiřují na svého mezipřijímatel. Teliospóry snětí a rzí byly přítomné v „jarních“ vzorcích, protože tento typ spór má přezimovací funkci. Dal by se předpokládat i jejich výskyt v zimních měsících, což se ale nepotvrdilo. Erysiphales (padlí) měly zvýšený výskyt v létě a na podzim, kdy se na listech jejich hostitelů objevují bílé povlaky oidíí. Hodnoty černí byly po celý rok vysoké a víceméně vyrovnané.

Výskyt vysokých hodnot „basidiospór“, kde jsme spolehlivě mohli identifikovat basidiospóry řádu „Russulales“ hlavně na podzim, méně v létě, dokazuje přítomnost sporulujících makromycet v tomto období. Právě tyto méně zastoupené, ale rozličné morfologické typy udělaly z podzimu nejdiverzitivnější roční období (Tab. 1).

Sezónní výskyt spór hub v ovzduší se dle jednotlivých autorů liší (Gniadek et al., 2005; Konopiňská 2004; Oliviera et al 2009). Je ovlivněn mnoha faktory, jako například místem odběru, časem, počasím, větrem, tlakem, délkou odběru a samozřejmě také použitou metodou. Výsledky výskytu hub – jak jejich množství, tak jejich druhů – jsou neúplné a navíc nelehko získatelné. V poslední době se začíná mluvit o tak zvané CBR – „Case-based recognition“ metodě. Je to jakýsi teoretický nápad vytvořit zařízení, které by dokázalo odhalit konkrétní druhy spór hub ve vzduchu a také jejich množství. Součástí lapacího přístroje by měl být i software, který by uměl detekovat spóry hub na základě některých jejich vlastností jako je barva, tvar, struktura, velikost a obrys. Toto automatické zařízení by bylo první svého druhu, které by získávalo z ovzduší vzorky opravdu dlouhodobě a identifikace by byla velice rychlá (Perner et al. 2003, Perner et al. 2004).

Opět by šlo ale o metodu, která by nedokázala rozeznat konidie některých rodů vyskytujících se v ovzduší.

V bakalářském studijním programu jsem se naučila rozeznávat některé druhy hub vyskytujících se v ovzduší. V magisterském programu bych chtěla změnit metodiku a odchyťovat spóry hub z ovzduší pomocí sampleru, který by umožnil získat mnohem více dat mnohem větší kvality.

6. ZÁVĚR

- Nejhojnější výskyt spór hub v ovzduší byl za rok 2009 v květnu.
- Nejvariabilnějším měsícem, co se týče typů spór bylo září.
- Nejhojnějším rodem bylo *Cladosporium sp.*
- Byla prokázána sezonalita v rámci jak taxonomických skupin spór, tak morfologických skupin spór. Typickými jarními spórami jsou kondie *Aureobasidium pollutans*, *Chrysosporium*, či konidií typu *Penicillium*. Přes jaro a léto je zvýšené množství aeciospór rzí. Letními druhy bychom mohli označit *Ustilago* či *Stemphylium*. Nejvíce typů spór hub se ale nachází přes léto a podzim. Do této hojné skupiny spór patří například basidiospory náležející k Hymenomycetes, uredospóry rzí nebo oidiální stádia třídy Erysiphales. Také sem patří hojné mikromycetní druhy – *Cladosporium*, *Fusarium* či *Alternaria*. Typickými podzimními typy spór byly teliospóry rzí či snětí nebo basidiomycetní spóry řádu Russulales.

7. POUŽITÁ LITERATURA

Apetrei, I. C., Draganescu, G. E., Popescu, I. T., Carp-Carare, C., Guguianu, E., Mihaescu, T., Stefanache, A., Cret, C., Patras, X. (2009). Possible cause of allergy for the librarians: books manipulation and ventilation as sources of fungus spores spreading. *Aerobiologia*, 25(3), 159–166.

Asenio, L., López-Jimenéz, J. Á., López-Llorca, L. V. (2007). Mycobiota of the date palm phylloplane: description and interactions. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(4), 299-304.

Awad, A. H. A. (2007). Airborne dust, bacteria, actinomycetes and fungi at a flourmill. *Aerobiologia*, 23(1), 59–69.

Barreira, M. J., Alvito, J. C., Almeida, C. M. M. (2010) Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal Source. *Food Chemistry*, 121(3), 653-658.

Bock ,C. H. & Cotty, P. J. (2006). Methods to sample air borne propagules of *Aspergillus flavus*. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 357–362.

Bogomolova, E. & Kirtsideli, I. (2009). Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg underground railway system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(2), 156-160.

Bouza, E., Muñoz, P., Guinea, J. (2009) Mucormycosis: an emerging disease?. *Clinical Microbiology And Infection*, 12(7), 7-23.

Bru-Adan, V., Wéry, N., Moletta-Denat, M., Bioron, P., Delgènes, J. P., Godon, J. J. (2009). Diversity of bacteria and fungi in aerosols during screening in a green waste composting plant. *Current Microbiology*, 59(3), 326-335.

Burch, M. & Levetin, E. (2002). Effects of meteorological conditions on spore plumes. *International Journal of Biometeorology*, 46(3), 107-117.

Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. (2001). *The Fungi*. London: Elsevier Academic Press.

Cotty, P. J. & Jaime-Garcia, R. (2007). Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2), 109-115.

Cummins G. B. & Hiratsuka Y. (1983). *Illustrated Genera of Rust Fungi*, St. Paul: APS Press.

D'Amato, G. & Spieksma, F. T. M. (1995). Aerobiologic and clinical aspects of mould allergy in Europe. *Allergy*, 50 (11), 870–877.

Dassonville, C., Demattei, C., Detaint, B., Barral, S., Bex-Capelle, V., Momas, I. (2008). Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentrations in Paris newborn babies' homes. *Environmental Research*, 108 (1), 80– 85.

De Silva, E. M. (1965). Basic Fuchsin-tannic acid; a one-solution stain for spore walls in fungi. *Biotechnic & Histochemistry*, 40(5), 253-257.

Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003). Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, 47(3), 187–200.

Durand, K. T. H., Muilenberg, M. L., Burge, H. A., Seixas, N. S. (2002). Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Annals of Occupational Hygiene*, 46(1), 113-118.

Elbert, W., Taylor, P. E., Andreae, M. O., Pöschl, U. (2006). Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions by Asco- and Basidiomycota. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 7(17), 4569-4588.

Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Wallingford: *Cab International*.

Ellis, M. B. (1976). More dematiaceous Hyphomycetes. Wallingford: *Cab International*.

EU Council Directive, 2000. EU Council Directive 2000/54/EC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. *Official Journal of the European Community*, L262/21, 21-45.

Fierer, N., Liu, Z., Rodríguez-Hernández, M., Knight, R., Henn, M., Hernandez, M. T. (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 200-207.

Flajs, D. & Peraica, M., (2009). Toxicological properties of citrinin. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 60 (4), 457-464.

Fracchia, L., Pietronave, S., Rinaldi, M., Martinotti, M. G. (2006) Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research*, 40(10), 1985-1994.

Frisvad, J. C. & Samson R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* - A guide of identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 1-173.

Galante, D., De Capriles, C. H., Mata-Essayag, S., Conesa, A., Cordova, Y., Trejo, E., Tassinari, P. (2006). Respiratory allergies in Venezuela: are fungi responsible?. *Mycoses*, 49(6), 493-498.

Gioulekas, D., Damialis, A., Papakosta, D., Spieksma, F., Gioulekas, P., Patakas, D. (2004). Allergenic fungi spore records (15 years) and sensitization in patients with respiratory allergy in Thessaloniki-Greece. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 14(3), 225-231.

Gniadek, A., Macura, A. B., Oksiejczuk, E., Krajewska-Kulak, Lukaszuk C (2005) Fungi in the air of selected social welfare homes in the Molopolskie and Podlaskie provinces-a comparative study. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 55(2), 85-91.

Gomez-Lopez, A., Cuenca-Estrella, M., Monzon, A., Rodriguez-Tudela, J. L. (2001). In vitro susceptibility of clinical isolates of Zygomycota to amphotericin B, flucytosine, itraconazole and voriconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(6), 919-921.

Hanlin, R. T., (1997). Illustrated Genra of Ascomycetes, volume I. St. Paul, Minnesota, USA

Hanlin, R. T., (2000) Illustrated Genra of Ascomycetes, volume II. St. Paul, Minnesota, USA

Henríquez, V. I, Villegas, G. R., Nolla, J. M. R. (2001), Airborne fungi monitoring in Santiago, Chile. *Aerobiologia*, 17(2), 137-142.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Lumbsch, H. T., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y. C., Gams, W., Geiser, D. M., Griffith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K. H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J. M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y. J., Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.

- Hirst, J. M., Stedman, O. J., Hogg, W. H. (1967). Long-distance Spore Transport: Methods of Measurement, Vertical Spore Profiles and the Detection of Immigrant Spores. *Journal of General Microbiology*, 48(3), 329-355.
- Jia, X. Q., Xu, Z. N., Zhou, L. P., Sung, C. K. (2010). Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. *Metabolic engineering*, 12(1), 1-7.
- Kasprzyk, I. & Worek, M. (2006). Airborne fungal spores in urban and rural environments in Poland. *Aerobiologia*, 22(3), 169–176.
- Kiffer, E. & Morelet, M. (1999). The Deuteromycetes. New Hampshire: *Science Publishers*.
- Khan, Z. U., Khan, M. A. Y., Chandy, R., Sharma, P. N. (1999). Aspergillus and other moulds in the air of Kuwait. *Mycopathologia*, 146(1), 25–32.
- Kleinheinz, G. T., Langolf, B. M., Englebert E. (2006). Characterization of airborne fungal levels after mold remediation. *Microbiological Research*, 161 (č) 367—376.
- Klanova, K., (2002) Effect of zeolites on bacteria, moulds and dust mite allergens in household dust and indoor air. *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 20(5), 56-59.
- Kłosowski, G., Mikulski, D., Grajewski, J., Błajet-Kosicka, A. (2010). The influence of raw material contamination with mycotoxins on alcoholic fermentation indicators. *Bioresource Technology*. 101(9), 3147–3152.
- Konopińska, A. (2004). Monitoring of *Alternaria* and *Cladosporium* link airborne spores in Lublin (Poland) in 2002. *Annals of agricultural and environmental medicine*. 11(2), 347-349.
- Kramer, C. L., Pady, S. M., Rogerson, C. T. (1960). Kansas aeromycology V: *Penicillium* and *Aspergillus*, *Mycologia*. 52, 545-551.
- Lacey, M. E. & West, J. S. (2006) Air Spora. Dordrecht: *Springer*.
- Lee, J. H. & Jo, W. K. (2005). Exposure to airborne fungi and bacteria while commuting in passenger cars and public buses. *Atmospheric Environment*, 39(38), 7342-7350.
- Lee, D. S., Fahey, D. W., Forster, P. M., Newton, P. J., Wit, R. C. N., Lima L. L., Owen, B., Sausen, R. (2009). Aviation and global climate change in the 21st century. *Atmospheric Environment*, 43(22-23), 3520-3537
- Levetin, E. & Dorsey, K. (2006). Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia*, 22(1), 3-12.
- Levetin, E. & Van de Water, P. (2001). Environmental contributions to allergic disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, 1(6), 506-514.
- Maddison, D. R., Schulz K. S., Maddison W. P. (2007). The tree of life web project. *Zootaxa*, 1668, 19-40. <http://tolweb.org/tree/>
- Magyar, D., (2005). Aerobiological studies on mycobiota: PhD Thesis, Szentisván University. phd.okm.gov.hu/dissertaciok/tezisek/2005/tz_en2542.pdf
- Magyar, D., Frenguelli, G., Bricchi, E., Tedeschini, E., Csontos, P., Li, D. W., Bobvos, J. (2009). The biodiversity of air spora in an Italian vineyard. *Aerobiologia*, 25(2), 99–109.
- Mižáková, A., Pipová, M., Turek, P. (2002) The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech journal of food sciences*, 20(3), 89-94.
- Mueller, G. M., Bills, G. F., Foster M. S. (2004). Biodiversity of Fungi. London: *Elsevier Academic Press*.

- Nikkels, A. H., Terstegge, P., Spieksma, F. T. M. (1996). Ten types of microscopically identifiable air-borne fungal spores at Leiden. *Aerobiologia*, 12(2), 107–112.
- Nikolcheva L. G., Bärlocher F. (2004). Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycological Progress*, 3(1), 41-49.
- Nikolcheva L. G., Bärlocher F. (2005). Molecular approaches to estimate fungal diversity. II. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Methods to study litter decomposition: A practical guide*, 177 – 184. Graça, M. A. S., Bärlocher, F., Gessner, M. O. *Springer*
- O’Gorman, C. M. & Fuller, H. T. (2008). Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *Atmospheric Environment*, 42(18), 4355-4368.
- Okubara, P. A., Steber, C. M., DeMacon, V. L., Walter, N. L., Paulitz, T. C., Kidwell, K. K. (2009). Scarlet-Rz1, an EMS-generated hexaploid wheat with tolerance to the soilborne necrotrophic pathogens *Rhizoctonia solani* AG-8 and *R. oryzae*. *Theoretical And Applied Genetics*, 112(2), 293–303.
- Oliveira, M., Ribeiro, H., Delgado, J.L., Abreu, I. (2009) Seasonal and intradiurnal variation of allergenic fungal spores in urban and rural areas of the North of Portugal. *Aerobiologia*, 25 (2), 85–98.
- Perner, P., Günther T., Perner, H. (2003). Airborne fungi identification by Case-based reasonig. *Institute of Computer Vision and Applied Computer Sciences*.
<http://oucsace.cs.ohiou.edu/~marling/iccbr03/perner.pdf>
- Perner, P., Perner, H., Jänichen, S., Bührin, A. (2004). Recognition of airborne fungi spores in digital microscopic images. *International Conference on Pattern Recognition*, 3, 566 – 569.
- Pretel, V., & Vácha, D. (2003). Studie pro Ministerstvo životního prostředí, samostatné oddělení změny klimatu (Příprava internetové stránky zaměřené na vědecké poznatky o změně klimatu).
www.chmi.cz/cc/inf/klima.doc
- Prospero, J. M., Blades, E., Mathison, G., Naidu, R. (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 21(1),1-19.
- Pyrrri, I., & Kapsanaki-Gotsi, E. (2007). A comparative study on the airborne fungi in Athens, Greece, by viable and non-viable sampling methods. *Aerobiologia*, 23(1), 3–15.
- Richardson, M. (2009). The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology And Infection*, 15(5), 2-9.
- Roselli, G., Cantini, C., Mariotti, P. (1997). Susceptibility to peach leaf curl (*Taphrina deformans* Berk.) Tul. in a peach germplasm collection. *Journal of Horticultural Science*, 72, 863-872.
- Samson, R. A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59(1), 129-145.
- Sawane A. M., Saoji A. A. (2005). Airborne Penicillium in the grain shops of Nagpur (India). *Grana*. 44(2), 123–128.
- Sen, B., & Asan, A. (2009). Fungal flora in indoor and outdoor air of different residential houses in Tekirdag City (Turkey): Seasonal distribution and relationship with climatic factors. *Environmental Monitoring And Assesment*, 151(1-4), 209-219.
- Shelton, B. G., Kirkland, K. H., Flanders, W. D., Morris, G. K. (2002). Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1743-1753.
- Stach, A. (2003) The use of Hirst volumetric trap, preparation of drums and slides. *Advances in Dermatology and Allergology*, 4, 246–249.

Tomassetti, B., Bruno, A. A., Pace, L., Verdecchia, M., Visconti, G. (2009). Prediction of *Alternaria* and *Pleospora* concentrations from the meteorological forecast and artificial neural network in L'Aquila, Abruzzo (Central Italy). *Aeromycologia*, 25(3), 127-136.

Yang, C. H., Crowley, D. E., Borneman, J., Keen, N. T. (2001). Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. *PNAS*, 98(7), 3889-3894

Yao, M., Wu, Y., Zhen, S., Mainelis, G. (2009). A comparison of airborne and dust-borne allergens and toxins collected from home, office and outdoor environments both in New Haven, United States and Nanjing, China. *Aerobiologia*, 25(3), 183-192.

Vánky, K. (2000). Illustrated Genera of Smut Fungi. St. Paul: *APS Press*.

Wang, T., Zhang, Y., Wang, Y., Pei, Y. H., (2007). Anti-tumor effects of Rubratoxin B on cell toxicity, inhibition of cell proliferation, cytotoxic activity and matrix metalloproteinase-2,9. *Toxicology in vitro*. 21(4), 646-650.

Webster, J. & Weber, R. W. S. (2007). Introduction to fungi. Edinburg: *Cambridge University Press*.

http://conabioweb.conabio.gob.mx/bancoimagenes/doctos/001_thumbs2-1.htm (29. 4. 2010)

<http://pollen.utulsa.edu/Spores/AIRSPORA.html> (29. 4. 2010)

8. PŘÍLOHY

Příloha 1: Složení agarů:

Czapek - Dox Agar

Sacharóza	30,0g
NaNO ₃	2,0g
K ₂ HPO ₄	1,0g
MgSO ₄ + 7H ₂ O	0,5g
KCl	0,5g
FeSO ₄ + 7H ₂ O	0,01g
Agar	15,0g
Destilovaná voda	1 l

Směs se připravuje v autoklávu při 121°C po dobu 15-20 minut. V případě izolace z přírodního substrátu mohou být přidána antibiotika. Toto médium se používá pro kultivaci a izolaci mikromycetních hub, zvířecích patogenů a hub z extrémních prostředí.

Maltózový agar

Maltózový extrakt	30g
Mykologický pepton	5g
Agar	15g
Destilovaná voda	1 l

Směs se připravuje při 115°C po dobu 10 minut. Mohou být přidány 2ml 10% sterilní přefiltrované kyseliny mléčné, která zabrání kontaminaci bakteriemi.

Příloha 2: Složení Laktofenol Cotton Blue:

Fenol	20,0g
Cotton Blue	0,05g
Glycerol	40,0ml
Kyselina mléčná	20,0ml
Destilovaná voda	20,0ml

Příprava trvá dva dny. První den se Cotton (Anilin) Blue rozpouští v destilované vodě. Druhý den se kyseliny mléčné přidají krystaly fenolu. Směs se míchá tak dlouho, než dojde k rozpuštění krystalů. Přidá se glycerol. Posledním krokem je přefiltrování roztoku Cotton Blue do roztoku fenolu, mléčné kyseliny a glycerolu.

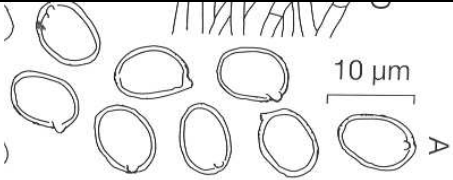
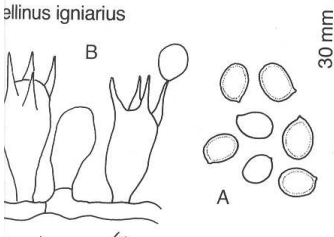
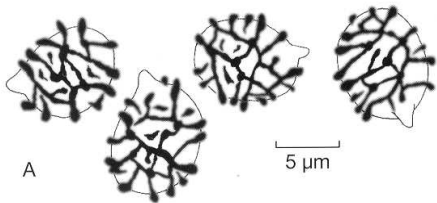
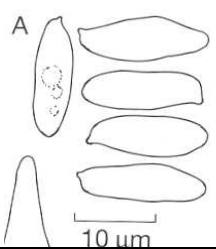
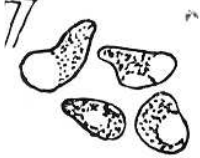
Příloha 3: Vysvětlivky zkratk váží se k Obr. 5

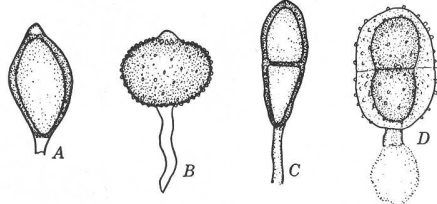
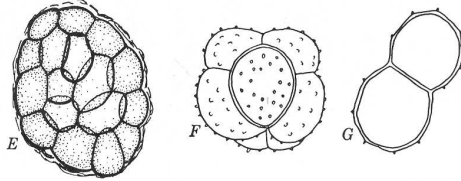
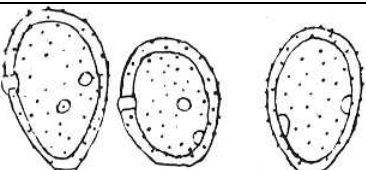
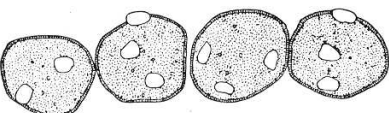
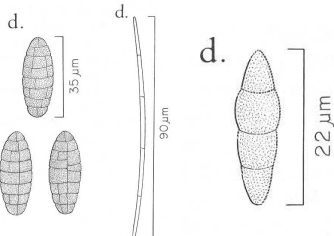
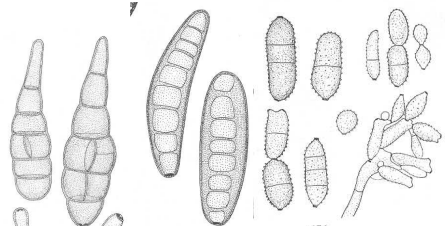
<i>Aeciospora</i>	Aecio
<i>Aescheliela crocea</i>	<i>Aesch cro</i>
<i>Alternaria</i>	<i>Alt</i>
Askopora	Asko
<i>Aureobasidium poluitans</i>	<i>Aur pol</i>
Basidiospora	Basidio
<i>Belemnospora</i>	<i>Belemno</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Clad</i>
<i>Curvularia</i>	<i>Curv</i>
Deutero XY	Deu XY
<i>Drechslera</i>	<i>Drech</i>
<i>Epicoccum</i>	<i>Ep nig</i>
Erysiphales	Erys
<i>Fusarium</i>	<i>Fus</i>
<i>Chrysosporium</i>	<i>Chry</i>
Oospory	Oosp
<i>Penicillium-like</i>	<i>Pen-like</i>
Russulales	Rus
<i>Scytalidium</i>	<i>Scyt</i>
<i>Stemphylium</i>	<i>Stem</i>
Teliospora	Teliosp
<i>Torula</i>	<i>Torula</i>
<i>Ulocladium</i>	<i>Ulocl</i>
Uredospora	Uredosp
<i>Urocystis</i>	<i>Uro</i>
<i>Ustilago</i>	<i>Ustil</i>

Příloha 4: Vysvětlivky k tabulce vážící se k Obr. 6.

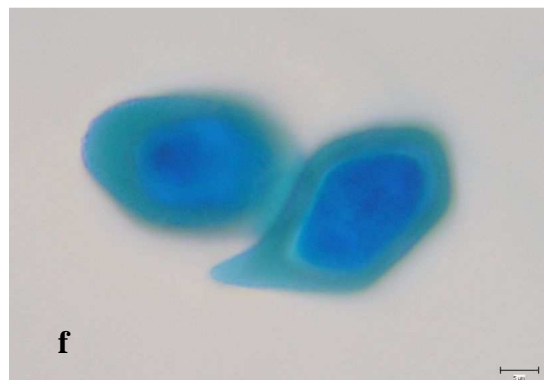
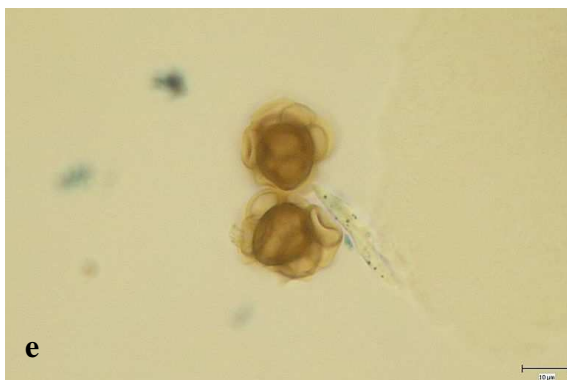
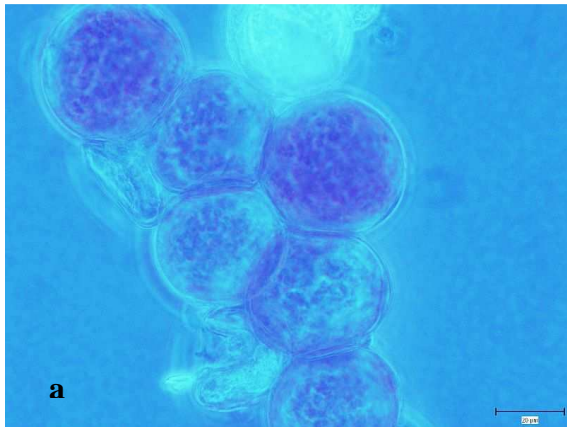
Aeciospory	Aeciospo
Askospory	Askospor
Basidiospory	Basidios
Konidie-čerň	Kon cer
Konidie-ostatní	Kon ost
Oidie	Oidie
Penicillium-like konidie	Penicill
Sporidie	Sporidie
Teliospory	Teliospo
Uredospory	Uredospo

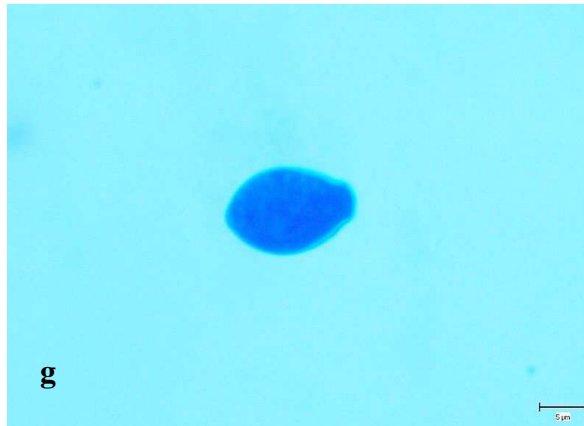
Příloha 5: Rozdělení spor do taxonomických skupin – obecné charakteristiky

Taxonomická skupina	Typ spory	Taxonomická skupina Cca velikost spory (š x d)	Ostatní charakteristiky	Příklad:
Odd: Basidiomycota Tř: Hymenomyces	Basidiospora	Agaricales 1-8μm x 1-10μm	Oválné, kulovité, jednobuněčné stopka	
Podtř: Homobasidiomycetidae		Polyporales 3- 13μm x 3-13μm	Různé tvary, barvy a velikosti jednobuněčné	<i>ellinus igniarius</i> 
		Rusullales 6-9 μm x 5-10μm	Ostíny bílé, žluté Ornamentace a ostnitě Stopka jednobuněčné	
		Boletales 3-6 x 7- 15μm	Hladké, ostnitě, podlouhle vejčité Stopka jednobuněčné	
Podtř: Heterobasidiomycetidae		Urediniomycetes (Rzi) <8μm	Hyalinní, nepravidelně oválný tvar	

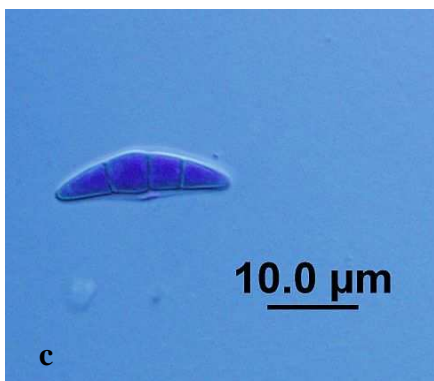
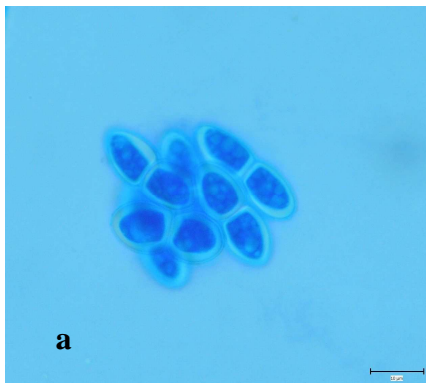
	Teliospora	Urediniomycetes (Rzi)	Jedno či vícebuněčné Stopkaté Rodově typický tvar i ornamentace	
		Ustilaginomycetes (sněti)	Jednobuněčné i vícebuněčné s rodově charakteristickou ornamentací a klíčovými pory Jalové přídatné buňky	
	Uredospora	Urediniomycetes (Rzi) 20-40 x 12-30µm	Jednobuněčná, osténkatá, rezavá	
	Aeciospora	12-20 x 12-20	Jednobuněčná, jemně osténkatá, hyalinní - žlutá	
Odd: Ascomycota	Askospora	Vysoká variabilita	Vysoká variabilita – jedno i vícebuněčné, kulovité, niťovité etc. Hyalinní, melanizované	
Tř: Deuteromycetes	Konidie	Vysoká variabilita	Vysoká variabilita – jedno i vícebuněčné, kulovité, niťovité etc. Hyalinní, melanizované	

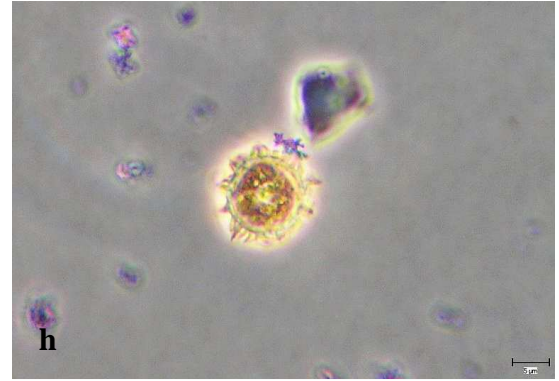
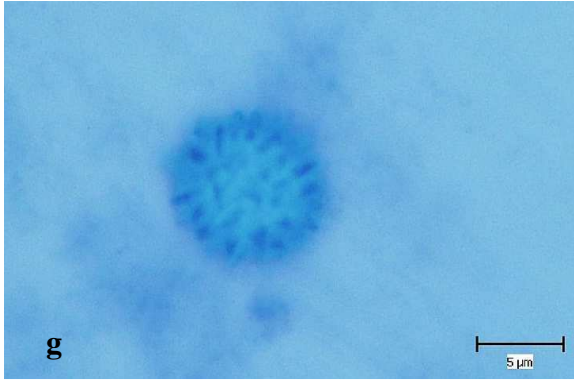
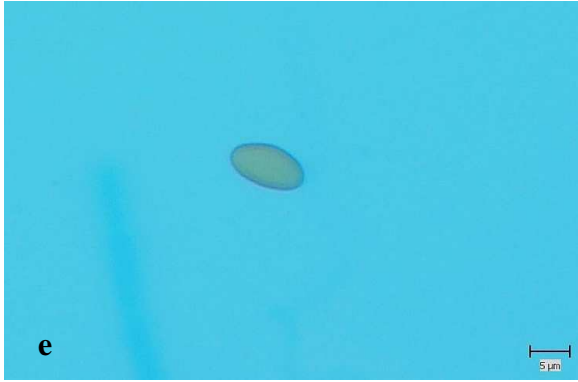
Příloha 6: Spóry náležící ke třídě Urediniomycetes a Ustilaginomycetes: a. aeciospóry, bar= 20 μ m; b. aeciospóra, bar= 10 μ m; c. uredospóra, bar =5 μ m, d. uredospóry, bar=50 μ m; e. teliospóry rodu *Urocystis* bar=10 μ m; f. teliospóry rodu *Puccinia* bar= 5 μ m; g. Sporangium náležející do oddělení Oomycota (ř. Pythiales) bar= 5 μ m.





Příloha 7: Spóry náležící k třídám Ascomycetes a Basidiomycetes: a., b., c., d. askospory, bar=10µm; e., f. basidiospory, bar=5µm; g., h. basidiospory náležící do čeledi Russulales, bar=5µm; i. basidiospory náležící do čeledi Russulales, bar=10µm.





Příloha 8: Spóry náležící ke třídě Deuteromycetes: a. *Allescheliella crocea*, bar=5 µm; b. *Allescheliella crocea*, bar=10µm; c.,d. *Alternaria* sp., bar= 10µm; e. *Cladosporium* sp., bar= 50µm; f. *Cladosporium* sp., bar =10µm, g.,h., konidie, bar=5µm, i. konidie, bar=10µm; j. *Stemphylium* sp., bar=10µm; k., l. *Belemnospora* sp., bar=5µm; m. *Dactylaria* sp., bar=5µm; n. *Dreschlera* sp., bar=5µm; o., p. *Torula* sp., bar=10µm; q. *Ulocladium* sp., bar=20µm; r. *Stemphylium* sp., bar=10µm; s. *Aureobasidium pollutans*, bar=20µm; t. *Scytalidium* sp., bar=20µm; u., v. *Epicoccum nigrum*, bar=5µm; w. Erysiphales – oidie, bar=20µm; x. konidie, bar=5µm, y. *Fusarium* sp., bar=10µm; z. *Chrysosporium* sp., bar=20µm, A., B. *Curvularia*, bar=5µm; C. *Penicillium* sp., bar=20µm; D. *Aspergillus* sp.; E. *Botrytis* sp.; F. *Mucor* sp., bar=20µm.

