

## SZCZEPY *CANDIDA ALBICANS*, *CANDIDA AQUATICA*, *CANDIDA KRUSEI* I *CANDIDA TROPICALIS* IZOLOWANE ZE ŹRÓDEŁ WOJEWÓDZTWA PODLASKIEGO

BOŻENA KIZIEWICZ

Zakład Biologii Ogólnej, Akademia Medyczna, ul. Kilińskiego 1, 15-089 Białystok;  
E-mail: bkizbiol@amb.edu.pl

**ABSTRACT:** *Candida albicans*, *Candida aquatica*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* strains isolated from springs of Podlasie province. Species composition of yeast-like fungi was investigated in 2001-2003 years. Four species from genus *Candida* were found: *Candida albicans*, *Candida aquatica*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*. The occurrence of yeast was investigated, using bait and the Sabouraud methods in the fresh waters of the six springs: Antoniuk, Cypisek, Sobolewo, Smolniki, Pólko and Rybnik of Podlasie Province. The fungi were found to be the most common at eutrophized sites of the spring Sobolewo. The spring Sobolewo, as compared to remaining springs, had a considerably higher concentrations of ammonium nitrogen, phosphates, and suspended substances.

**Key words:** *Candida albicans*, *C. aquatica*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, Podlasie province, springs.

### WSTĘP

Grzyby tworzą grupę organizmów wykrywanych w zróżnicowanych pod względem właściwości wodach zarówno słodkich jak i morskich, albo w otoczeniu wilgotnym. Pobierane przez nie związki węgla muszą być uprzednio zsyntetyzowane przez rośliny. Związki te są następnie rozkładane z uwolnieniem włożonej w nie energii. Azot, siarka, fosfor, jony magnezu i innych metali mogą być pobierane i wykorzystywane głównie w formie związków nieorganicznych. Intensywność wzrostu grzybów zależy między innymi od koncentracji związków odżywczych znajdujących się w podłożu. Obecności grzybów w środowisku nie wyklucza ani wysoka temperatura ani niska. W naturalnych warunkach w środowisku o wysokiej koncentracji jonów wodorowych grzyby rozwijają się lepiej niż bakterie. Mineralizując substancję organiczną znajdującą się w wodzie znacząco przyczyniają się do jej samooczyszczania. Grzyby są bardzo wrażliwe na działanie substancji toksycznych i dlatego niektóre z nich stanowią bioindykatory czystości wód (Müller i Loeffler 1987, Mikulski 1982).

Grzyby drożdżopodobne są bioindykatorami skażenia wód użytkowych ścieka-

mi komunalno-przemysłowymi (Dynowska 1995); mogą one zagrażać zdrowiu człowieka w przypadku obniżonej odporności immunologicznej (Cooke i wsp. 1960, Gentles i La Touche 1969, Sowiński 1986, Maleszka i wsp. 1990, Dąbkowska i Dzierżanowska 1993, Kurnatowska 1997).

Podstawowym problemem niniejszej pracy było ustalenie, czy w wodach źródeł o różnym stopniu czystości województwa podlaskiego występują grzyby z rodzaju *Candida* oraz czy na ich pojawianie się mogą mieć wpływ czynniki środowiskowe.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania dotyczące występowania grzybów anamorficznych prowadzono w latach 2001-2003 w źródłach Antoniuk, Cypisek, Smolniki, Sobolewo, Pólko, Rybnik w pobliżu miejscowości Rybniki, zlokalizowanych w Białymstoku i okolicach na terenie Puszczy Knyszyńskiej i na terenie Suwalskiego Parku Krajobrazowego. Sezonowo wiosną, latem, jesienią i zimą z każdego stanowiska pobierano każdorazowo po 8 próbek wody. Do izolowania grzybów stosowana była metoda przynęty polegająca na wprowadzaniu do próbek wody małych fragmentów różnego rodzaju substratów zwierzęcych: ikry karasia, skóry węża i skrzydeł owadów. Pojemniki przykrywano płytkami szklanymi, po to aby przynajmniej częściowo zabezpieczyć znajdującą się w nich wodę przed wnikaniem bakterii z otoczenia. Próbkę przechowywano przez okres czterech tygodni w pracowni w temperaturze zbliżonej do temperatury wody w źródłach, rzekach, stawach i w jeziorze w danym miesiącu. W tym czasie regulowano oświetlenie i ogrzewanie. Stwierdzone mikroskopowo na przynętach grzybnie przenoszono do wysterylizowanych szalek Petriego z wodą destylowaną. Przynęty przeglądano pod mikroskopem optycznym codziennie, zaczynając od trzeciego dnia od założenia hodowli. Z każdej próby wykonywano kilkanaście preparatów mikroskopowych.

W celu wyizolowania szczepów z rodzaju *Candida* z uzyskanych próbek wody posługiwano się także metodą hodowli grzybów na podłożach stałych. W tym celu posiewano 1 cm<sup>3</sup> wody ze zbiorników na podłoże Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu oraz na podłoże Sabourauda bez antybiotyku wobec prób kontrolnych. Posiewy inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C a następnie pozostawiano w temperaturze 20°C-25°C. Po upływie 3-5 dni z wyrosłych na podłożu stałym kolonii grzybów sporządzono preparaty bezpośrednie w 0,9% roztworze chlorku sodowego a część preparatów barwiono metodą Gramma. Po stwierdzeniu w preparatach bezpośrednich elementów morfologicznych grzybów, posiewano kolonie na świeże podłoże, co pozwoliło na wyizolowanie po kilku pasażach czystych bezbakteryjnych szczepów grzybów. Diagnostykę mikologiczną grzybów przeprowadzono w sposób rutynowy. Przy oznaczaniu grzybów do gatunku posługiwano się pracami Batki 1975, Kowszyk-Gindifer i Sobiczewskiego (1986), Kurnatowskiej (1995), Zaremby i Borowskiego (2001).

Próbki przeznaczone do badań fizykochemicznych z ustalonych zbiorników wodnych pobierano około 0,20 m pod powierzchnią wody za pomocą aparatu Ruttnera o pojemności 2,0 dm<sup>3</sup>. W laboratorium wykonywano analizę hydrochemiczną wody, w której oznaczano między innymi temperaturę, odczyn-pH, utlenialność, dwutlenek węgla, zasadowość ogólną, siarczany, azot amonowy, azot azotynowy, azot azotanowy, fosforany, żelazo całkowite, chlorki, wapń, magnez, suchą pozostałość, substancje rozpuszczone i zawiesiny. Badania fizykochemiczne wody wykonano metodami zalecanymi przez Standard Methods według Greenberga i wsp. (1992) oraz Dojlidy (1995).

Wyniki badań poddano analizie statystycznej stosując metodę analizy skupień (Podani 2000).

### WYNIKI

Podczas wieloletnich badań dotyczących składu gatunkowego grzybów w sześciu źródłach: Antoniuk, Cypisek, Smolniki, Sobolewo, Pólko i Rybnik województwa podlaskiego stwierdzono występowanie następujących gatunków grzybów z rodzaju *Candida*: *C. aquatica*, *C. albicans*, *C. krusei* i *C. tropicalis*. Grzyby te z różną częstością pojawiały się w próbkach wody pochodzącej ze źródeł. W wodzie źródła Sobolewo oznaczono wszystkie wymienione gatunki grzybów. *Candida albicans* występowała we wszystkich źródłach, *C. tropicalis* w źródłach Cypisek, Smolniki, Sobolewo i Pólko, *C. crusei* w źródłach Antoniuk, Cypisek i Sobolewo, a *C. aquatica* również w źródłach Smolniki, Sobolewo i Rybnik.

Grzyby z rodzaju *Candida* występowały w źródłach w każdym sezonie badawczym, niezależnie od temperatury. Wyniki badań fizykochemicznych wody oraz skład gatunkowy grzybów przedstawiono w Tabeli 1. Źródło Sobolewo miało, w porównaniu z pozostałymi badanymi zbiornikami wodnymi, podwyższoną zawartość biogenów: azotu amonowego, fosforanów rozpuszczonych oraz zawiesiny. Na rysunkach 1-6 przedstawiono wyniki analizy podobieństw wskazujące, że czynnikiem środowiskowym określającym liczbę gatunków grzybów w wodzie źródeł Antoniuk i Rybnik była alkaliczność, Cypisek i Sobolewo – azotany, Pólko – fosforany, a Smolniki – żelazo.

### DYSKUSJA

Z czterech gatunków grzybów z rodzaju *Candida* zarejestrowanych w źródłach województwa podlaskiego, trzy były wcześniej notowane w innych zbiornikach wodnych.

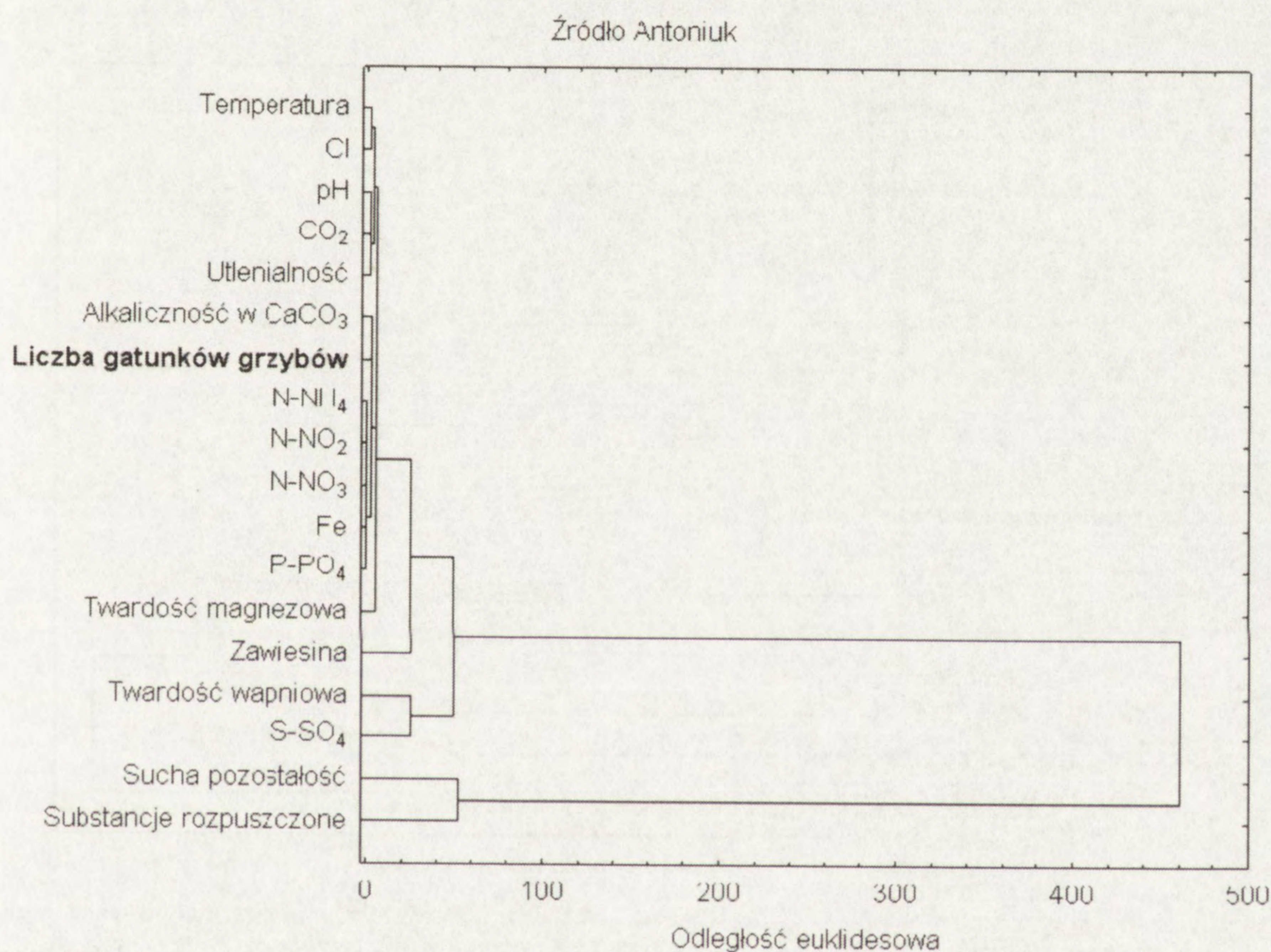
*Candida aquatica* wykryto w pianie kilku jezior (Batko 1975) i w wodzie jeziora Mamry na materiale roślinnym i zwierzęcym (Czeczuga i Woronowicz 1991-1992). W naszych badaniach stwierdzono jego obecność w wodzie trzech źródeł.

Tabela 1. Skład fizykochemiczny wody w mg l<sup>-1</sup> i skład gatunkowy grzybów wyizolowanych z badanych źródeł

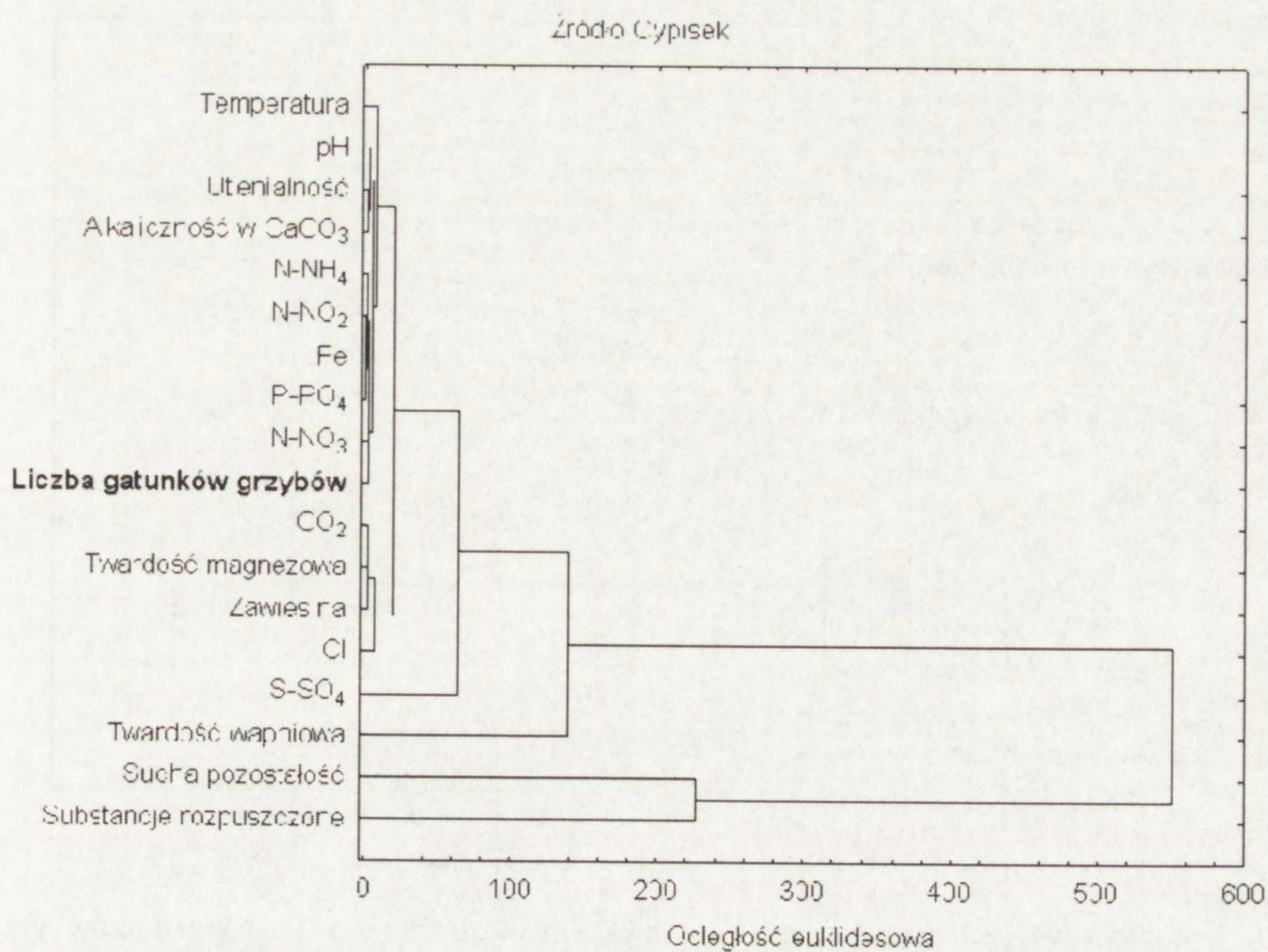
Stanowisko Specyfikacja	Antoniuk	Cypisek	Smolniki	Sobolewo	Pólko	Rybnik
Temperatura (°C)	10,5	11,0	7,3	10,5	8,8	8,3
PH	7,6	7,2	7,5	7,1	7,0	7,5
Utlenialność	6,7	5,4	1,4	10,4	5,4	22,5
CO <sub>2</sub>	8,4	22,4	11,7	14,3	10,6	9,2
Alkaliczność (mval l <sup>-1</sup> )	3,6	5,9	4,7	5,9	3,9	3,5
N-NH <sub>4</sub>	0,030	0,610	0,050	0,170	0,040	0,080
N-NO <sub>2</sub>	0,029	0,047	0,010	0,521	0,002	0,060
N-NO <sub>3</sub>	0,100	1,768	0,170	2,765	0,130	0,160
P-PO <sub>4</sub>	0,259	0,235	0,270	1,251	0,750	0,490
Cl	11,40	27,20	22,65	43,10	16,50	17,24
Twardość wapniowa Ca	68,00	135,10	49,38	117,10	102,60	49,40
Twardość magnezowa Mg	14,51	23,70	37,32	24,30	58,16	10,50
S-SO <sub>4</sub>	54,80	61,20	34,61	78,90	29,73	32,00
Fe	0,10	0,100,	56	0,49	0,19	0,12
Sucha pozostałość	342	550	406	403	182	240
Substancje rozpuszczone	314	429	389	331	131	210
Zawiesina	28	21	17	72	51	30
Nazwy gatunków grzybów	<i>Candida albicans</i> <i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida aquatica</i> <i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida aquatica</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Candida aquatica</i>
Ogólna liczba gatunków grzybów	2	3	3	4	2	2

*Candida albicans*, który w naszych badaniach został stwierdzony we wszystkich źródłach, był wcześniej znajdowany również w leśnych strumieniach (Czeczuga i wsp. 1986) oraz w wodzie pochodzącej ze stawów (Czeczuga i Muszyńska 1999).

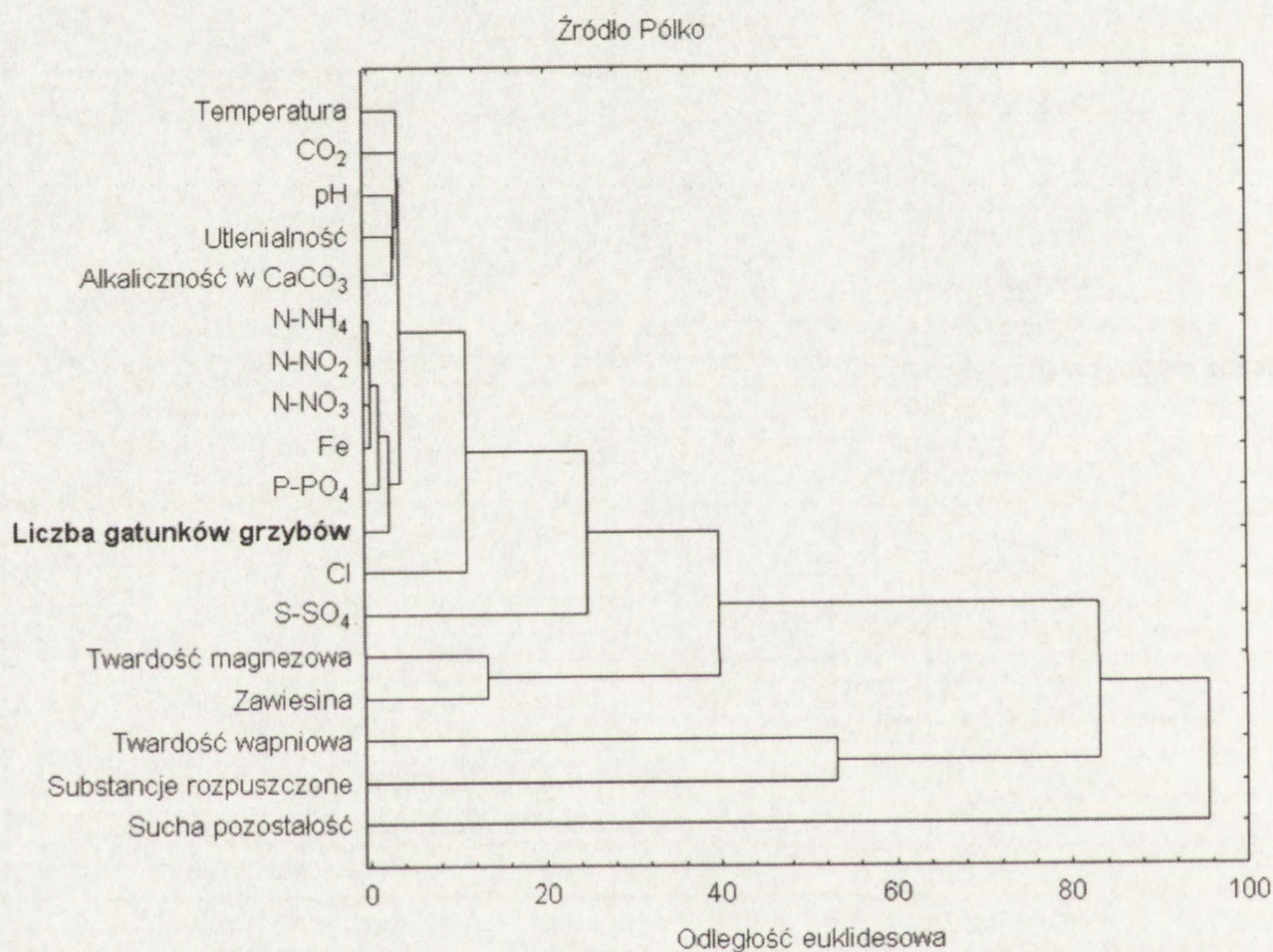
*Candida tropicalis* wykrywany był na krewetkach (Batko 1975) oraz na liściach i nasionach roślin i na materiale zwierzęcym: skórze węża, włosach ludzkich, ścin-kach rogów w wodzie rzeki Biebrzy (Czeczuga i wsp. 1990), jeziora Łuknajno (Czeczuga 1990), jeziora Śniardwy (Czeczuga 1991) oraz jeziora Mamry (Czeczuga i Woronowicz 1991-1992). W naszych badaniach wystąpił w wodzie z czterech źródeł.



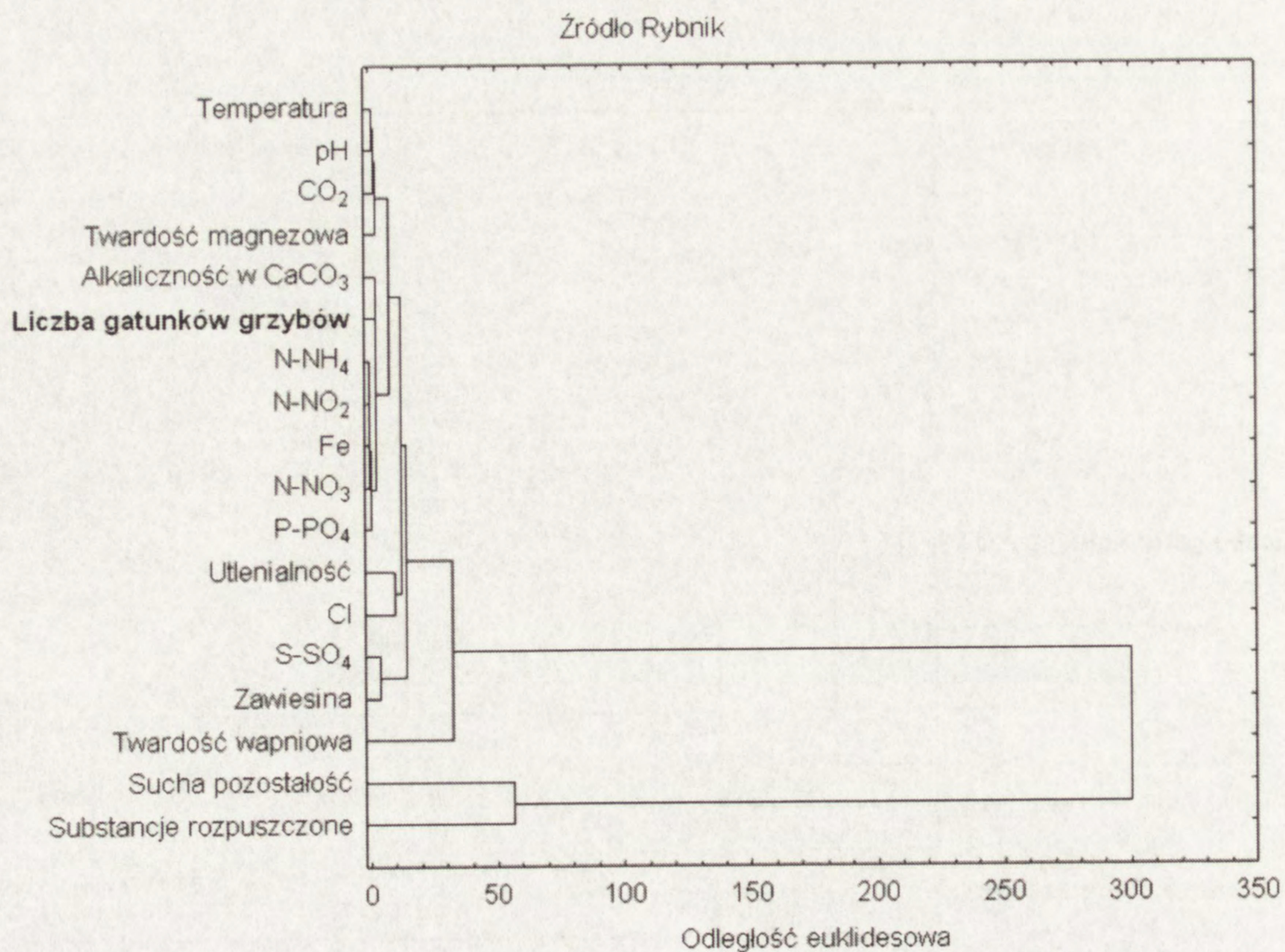
Rys. 1. Podobieństwo badanych parametrów fizykochemicznych oraz liczba gatunków grzybów w wodzie źródła Antoniuk (miara podobieństwa – odległość euklidesowa)



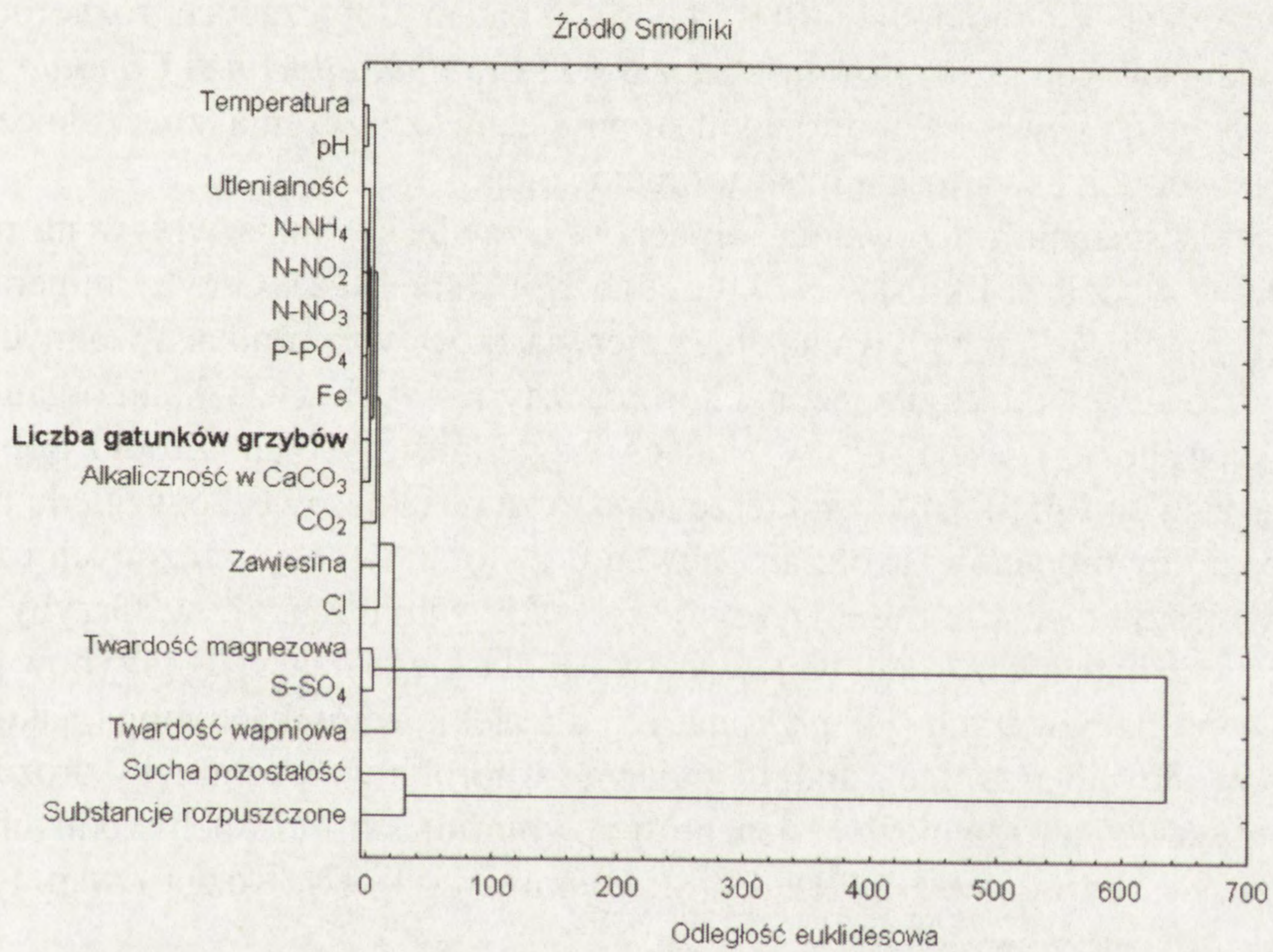
Rys. 2. Podobieństwo badanych parametrów fizykochemicznych oraz liczba gatunków grzybów w wodzie źródła Cypisek (miara podobieństwa – odległość euklidesowa)



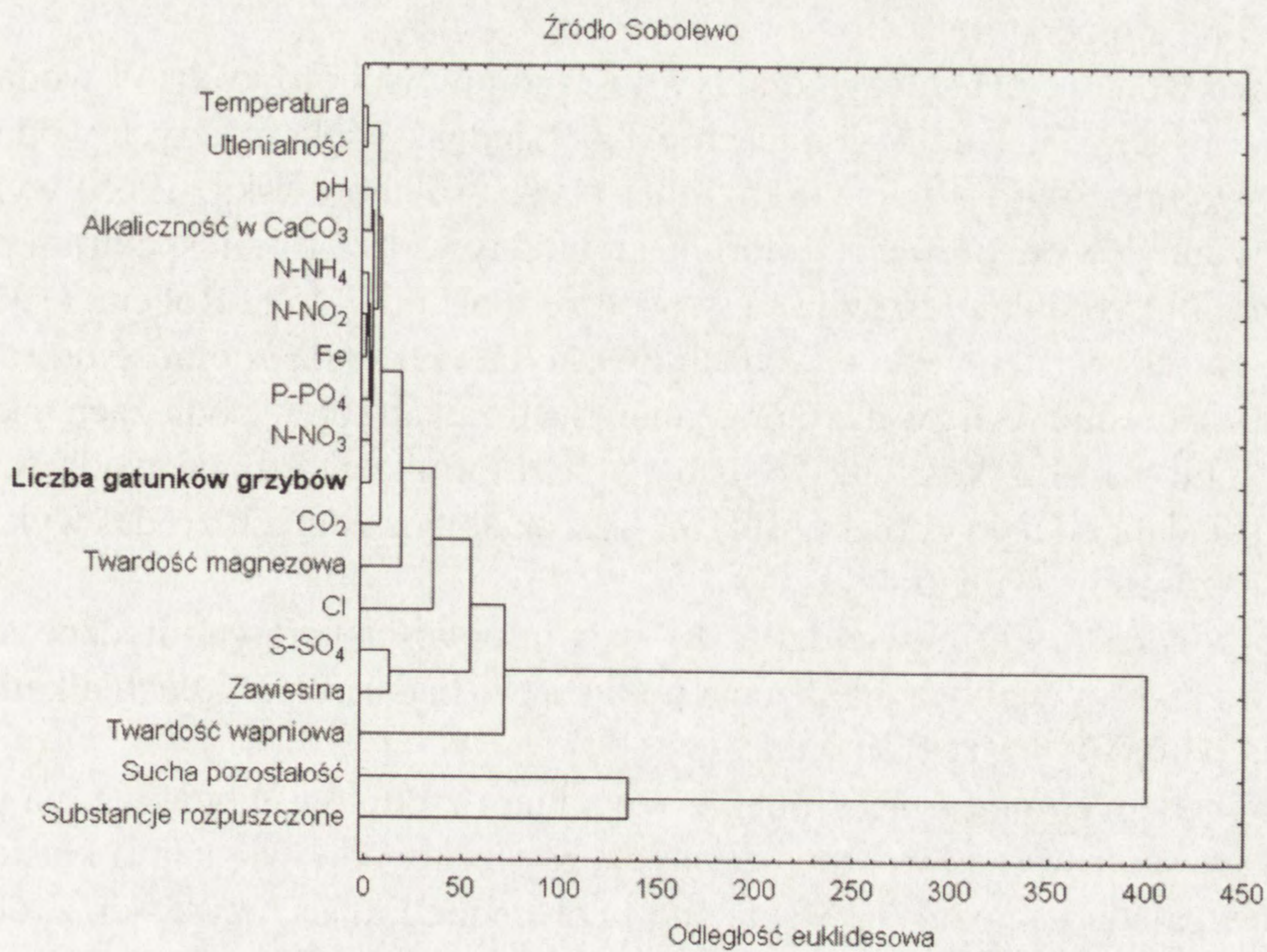
Rys. 3. Podobieństwo badanych parametrów fizykochemicznych oraz liczba gatunków grzybów w wodzie źródła Pólko (miara podobieństwa – odległość euklidesowa)



Rys. 4. Podobieństwo badanych parametrów fizykochemicznych oraz liczba gatunków grzybów w wodzie źródła Rybnik (miara podobieństwa – odległość euklidesowa)



Rys. 5. Podobieństwo badanych parametrów fizykochemicznych oraz liczba gatunków grzybów w wodzie źródła Smolniki (miara podobieństwa – odległość euklidesowa)



Rys. 6. Podobieństwo badanych parametrów fizykochemicznych oraz liczba gatunków grzybów w wodzie źródła Sobolewo (miara podobieństwa – odległość euklidesowa)

Solntzeva i Vinogradova (1989) podczas badań dotyczących różnorodności grzybów niektórych jezior Estonii wykazały, że *Candida albicans* i *Candida tropicalis* występują w jeziorach o różnym stopniu zanieczyszczenia, znacznie częściej w wodach z dużą zawartością materii organicznej.

Wysokie stężenia utleniania, biogenów i zawiesiny mają wpływ na rozwój grzybów w wodzie (Mikulski 1974, Greenberg i wsp. 1992). Grzyby mineralizują związki organiczne, co wpływa na obieg pierwiastków w zbiornikach wodnych oraz na ich wzrost. W wodach obciążonych w znacznym stopniu związkami organicznymi wykrywano je częściej niż w wodach względnie czystych. Źródło Sobolewo o najbardziej eutroficznym charakterze uznano za pozaklasowe, ze względu na wysokie poziomy biogenów: azotu amonowego, fosforanów rozpuszczonych i zawiesiny. W wodzie tego zbiornika wykryto wszystkie gatunki grzybów. Grzyby izolowane z wody badanych źródeł województwa podlaskiego należą do grzybów potencjalnie chorobotwórczych. W sprzyjających dla siebie warunkach mogą, jako patogeny, powodować grzybice u ludzi i zwierząt. Chorobotwórcze grzyby drożdżopodobne obserwowali również w różnego typu zbiornikach i ciekach wodnych Czeczuga (1994), Ulfig (1995, 1996, 1998), Dynowska (1997), Rózga i wsp. (1999), Kiziewicz i Czeczuga (2001).

Temperatura wody może mieć istotny wpływ na biocenozy wód i na przebieg w nich procesów chemicznych. Grzyby z rodzaju *Candida* występowały w źródłach we wszystkich sezonach badawczych. Oznacza to, że wykazują one szeroki zakres tolerancji na temperaturę.

Odczyn wody tj. pH zależy od aktywności jonów wodorowych. W wodach powierzchniowych waha się w granicach pH 4-9, jednak większość tych wód ma pH 6,5-8,5 (Dojlido 1996). Stpiczyńska-Tober (1965) i Zaborowska (1965) wykazały, że grzyby mogą występować w zbiornikach wodnych o szerokim spektrum pH, zaś *Candida albicans* dobrze rozwija się w wodzie o pH od 7 do 8. Roberts (1963) podaje, że grzyby występujące w wodach kwaśnych wykazują zdolność do rozkładu trudno rozszczepialnych związków organicznych zawartych w podłożach takich jak błonnik, chityna oraz keratyna. W badanych zbiornikach jedynie woda w źródle Pólko posiadała odczyn obojętny (pH 7), zaś woda pozostałych źródeł wykazywała odczyn zasadowy (pH powyżej 7).

Korniłłowicz (1994) stwierdziła, że na właściwości keratynolityczne saprofitycznych grzybów wpływa alkalizacja podłoża. W badanych źródłach alkaliczność wynosiła od 0,030 do 0,610 mval l<sup>-1</sup>.

Woda badanych przez nas źródeł, z wyjątkiem źródła w Sobolewie, na podstawie zawartości fosforanów rozpuszczonych, zawiesiny odpowiadała II klasie, natomiast ze względu na pozostałe wskaźniki przeważnie I klasie czystości. Źródło Sobolewo wykazywało najbardziej eutroficzne właściwości. Oznaczono w nim wysokie poziomy biogenów: azotu amonowego i fosforanów rozpuszczonych oraz zawiesiny i na tej podstawie uznano je za pozaklasowe (Dziennik Ustaw 1991).



Przeprowadzona przez nas analiza podobieństw wykazała, że w poszczególnych źródłach inne czynniki środowiskowe (alkaliczność, azotany, fosforany, żelazo) określają liczbę występujących tam gatunków grzybów.

## LITERATURA

- Batko A. 1975. Zarys hydromikologii. PWN, Warszawa.
- Cooke W.B., Phaff H.J., Miller M.W., Shifrine M., Knapp E.P. 1960. Yeasts in polluted water and sewage. *Mycologia* 52: 210-230.
- Czczuga B. 1990. Studies of aquatic fungi. XV. The hydromycoflora of Biosfere Sanctuary, Lake Łuknajno. *Acta Mycologica* 26: 37-44.
- Czczuga B. 1991. Studies of aquatic fungi. XVIII. Aquatic fungi in lake Śniardwy and eighteen neighbouring lakes. *Internationale Revue Gesamted Hydrobiologie* 76: 121-135.
- Czczuga B. 1994. Aquatic fungi growing on eel fry montée *Anguilla anguilla* L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 24: 35-31.
- Czczuga B., Muszyńska E. 1999. Aquatic fungi growing on the eggs of fishes representing 33 cyprinid taxa (Cyprinidae) in laboratory conditions. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 39: 53-72.
- Czczuga B., Woronowicz L. 1991-1992. Studies of aquatic fungi. XXI. The Lake Mamry complex. *Acta Mycologica* 27: 93-103.
- Czczuga B., Woronowicz L., Brzozowska K. 1986. Aquatic fungi of two forest brooks. *Nova Hedwigia* 43: 459-465.
- Czczuga B., Woronowicz L., Brzozowska K., 1990. Studies of aquatic fungi. XII. Aquatic fungi of the lowland River Biebrza. *Acta Mycologica* 26: 77-83.
- Dąbkowska M., Dzierżanowska D. 1993. Zakażenia grzybicze. *Pediatrics Polska* 68: 7-10.
- Dojlido J.R. 1995. Chemia wód powierzchniowych. Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok.
- Dynowska M. 1995. Drożdże i grzyby drożdżopodobne jako czynniki patogenne oraz bioindykatory ekosystemów wodnych. Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Olsztyn.
- Dynowska M. 1997. Grzyby drożdżopodobne o właściwościach bioindykacyjnych izolowane z rzeki Łyny. *Acta Mycologica* 32: 279-286.
- Dziennik Ustaw, Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dnia 5 listopada 1991 w sprawie zasad ustanawiania stref ochronnych źródeł i ujęć wody. Dz. U. z dnia 16 grudnia 1991r., poz. 504.
- Gentles J.C., La Touche C.J. 1969. Yeasts as human and animal pathogens. In: *The yeasts* (Eds. A. H. Rose, J.S Harrison), Academic Press, Inc., New York. 1: 107-182.
- Greenberg A.E., Clesceri L.S., Eaton A.D. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, Washington, DC.
- Kiziewicz B., Czczuga B. 2001. Aspects of ecological occurrences *Trichosporon cutaneum* (de Beurman Gougerot et Vaucher, 1909) Ota, 1915 in waters north-east Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 783-788.
- Korniłowicz T. 1994. Methods for determining keratinolytic activity of saprophytic fungi. *Acta Mycologica* 29: 169-178.
- Kowszyk-Gindifer Z., Sobiczewski W. 1986. Grzybice i sposoby ich zwalczania. PZWL, Warszawa.
- Kurnatowska A. 1995. Wybrane zagadnienia mikologii medycznej. Promed, Łódź.
- Kurnatowska A. 1997. Ekologia, jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy. PWN, Warszawa-Łódź.
- Maleszka R., Rzepecka B., Mazurek M. 1990. Kandydozy skóry i błon śluzowych – przegląd własnych przypadków w okresie 10-lecia. *Postępy Dermatologii* 7: 263-267.
- Mikulski J.S. 1982. Biologia wód śródlądowych. PWN, Warszawa.
- Müller E., Loeffler W. 1987. Zarys mikologii dla przyrodników i lekarzy. PWRiL, Warszawa.

- Podani J. 2000. Introduction to the exploration of multivariate biological data. Backhuys, Publishers Leiden.
- Roberts R.E. 1963. A study of the distribution of certain members of the Saprolegniales. *Transmission Britany Mycology Societates* 46: 213-224.
- Różga A., Różga B., Babski P. 1999. Poszukiwanie grzybów drożdżopodobnych w wybranych jeziorach Tucholskiego Parku Krajobrazowego. *Acta Mycologica* 34: 89-96.
- Solntzeva I.O., Vinogradova G.G. 1989. Abundance and specific composition of yeasts in various lake types of Estonia. *Mikologia i Fitopatologia* 23: 362-366.
- Sowiński W. 1986. Studium epidemiologiczne grzybic skóry i błon śluzowych. *Postępy Dermatologii* 3: 185-19.
- Stpiczyńska-Tober E. 1965. Flora grzybów wodnych rzek: Jeziorka i Świder. *Acta Mycologica* 1: 53-57.
- Ulfig K. 1995. Statystyczna ocena występowania grzybów keratynolitycznych w osadach dennych dwóch zbiorników zaporowych. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 1: 81-89.
- Ulfig K. 1996. Wzajemne oddziaływania pomiędzy wybranymi grzybami geofilnymi i pasożytniczymi dermatofitami. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 47: 137-142.
- Ulfig K. 1998. Badanie grzybów keratynolitycznych w osadach dennych górskich strumieni. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 49: 469-479.
- Zaborowska D. 1965. Grzyby wodne z torfowiska Bocian. *Acta Mycologica* 1: 31-52.
- Zaremba L., Borowski J. 2001. Mikrobiologia lekarska. PZWL, Warszawa.

Zaakceptowano do druku 30 maja 2004