

The background of the cover is a microscopic image of yeast cells. The cells are shown in various stages of growth and division, appearing as bright, glowing structures against a dark background. The color palette is primarily blue and purple, with some yellowish-white highlights from the yeast cells themselves. The overall effect is a dense, textured field of microorganisms.

**Elżbieta Bogusławska-Wąs**

**Różnorodność  
społeczności drożdży  
w estuarium Odry  
i ich wpływ na rozwój  
ichtiofauny**

**Szczecin 2010**







CP 24.03  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny  
w Szczecinie

Elżbieta Bogusławska-Wąs

**Różnorodność społeczności drożdży w estuarium  
Odry i ich wpływ na rozwój ichtiofauny**

Biblioteka Główna  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny  
Księgozbiór Przyrodniczy

CP. 1020



530-000001405

0301-030  
Szczecin 2010



Recenzenci  
MARIA DYNOWSKA  
BOGUMIŁA SKOTARCZAK

Opracowanie redakcyjne  
ALICJA BERNER

WYDANO ZA ZGODĄ  
REKTORA ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIWERSYTETU TECHNOLOGICZNEGO  
W SZCZECINIE

ISBN 978-83-7663-071-7

CP. 1020



530-1020

WYDAWNICTWO UCZELNIANE ZACHODNIOPOMORSKIEGO UNIWERSYTETU TECHNOLOGICZNEGO W SZCZECINIE  
70-311 Szczecin, al. Piastów 50, tel. 91 449 47 60, e-mail: wydawnictwo@zut.edu.pl  
Druk PPH „Zapol” Dmochowski, Sobczyk Sp.j., 71-062 Szczecin, al. Piastów 42, tel. 91 434 10 21  
e-mail: zarzad@zapol.com

2011/05/15



## Spis treści

1. Wstęp .....	5
1.1. Wprowadzenie do studiów taksonomicznych drożdży .....	5
1.2. Występowanie grzybów w środowisku wodnym .....	8
1.3. Strategie przeżycia drożdży .....	10
1.3.1. Biofilm mikrobiologiczny .....	11
1.3.2. Występowanie drożdży w środowisku jako formy VBNC .....	14
1.4. Estuarium Odry jako miejsce bytowania drożdży .....	16
2. Cel pracy .....	19
3. Materiał i metody .....	21
3.1. Charakterystyka obszaru badań .....	21
3.2. Analizy mikrobiologiczne .....	23
3.3. Analizy genetyczne .....	25
3.4. Analizy spektrofotometryczne .....	29
3.5. Ikra jako środowisko rozwoju drożdży .....	32
3.6. Analizy hydrochemiczne .....	34
3.7. Analizy statystyczne .....	34
4. Omówienie i dyskusja wyników .....	37
4.1. Estuarium Odry jako siedlisko grzybów jednokomórkowych .....	37
4.2. Struktura społeczności drożdży w estuarium Odry .....	42
4.3. Ryby jako środowisko mykocenoz wodnych .....	46
4.3.1. Struktura gatunkowa drożdży izolowanych ze śluzu ryb .....	46
4.3.2. Struktura gatunkowa drożdży izolowanych z przewodu pokarmowego ryb .....	51
4.4. Ekologia rodzaju <i>Cryptococcus</i> .....	56
4.4.1. Wprowadzenie .....	56
4.4.2. Zróżnicowanie biochemiczne <i>Cr. laurenti</i> na tle rodzaju <i>Cryptococcus</i> .....	57
4.4.3. Zróżnicowanie genetyczne <i>Cr. laurenti</i> .....	58
4.5. Ekologia rodzaju <i>Rhodotorula</i> .....	60
4.5.1. Wprowadzenie .....	60
4.5.2. Zróżnicowanie biochemiczne <i>Rh. mucilaginosa</i> i <i>Rh. glutinis</i> .....	61
4.5.3. Zróżnicowanie genetyczne <i>Rh. mucilaginosa</i> i <i>Rh. glutinis</i> .....	61
4.6. Strategie przeżycia drożdży w środowisku estuarium Odry .....	66
4.6.1. Wprowadzenie .....	66
4.6.2. Przeżywalność drożdży w wodach estuarium Odry .....	67
4.7. Ikra jako miejsce rozwoju mikroorganizmów .....	74
4.8. Drożdże jako wskaźniki zanieczyszczenia wód .....	89
5. Podsumowanie .....	95
6. Wnioski .....	99
Piśmiennictwo .....	101
Summary .....	121
Zusammenfassung .....	123







# 1. Wstęp

## 1.1. Wprowadzenie do studiów taksonomicznych drożdży

W różnych ekosystemach grzyby stanowią jedną z ważniejszych grup organizmów. Różnorodność wyjątkowo dużej liczby jednostek taksonomicznych i ich zdolności dostosowawcze do środowiska sprawiły, że grzyby uznano za organizmy euryekologiczne. Kosmopolityczne gatunki są zazwyczaj istotnie zróżnicowane pod względem wymagań pokarmowych i możliwości wykorzystywania przez nie związków organicznych. Adaptacja poszczególnych jednostek społeczności mikrobiologicznych do warunków środowiskowych, w których dostępność nutrientów jest zazwyczaj okresowa (Fry 1990), jest metabolicznym odzwierciedleniem specyfiki zasiedlanego przez drożdże ekosystemu (Phaff i Starmer 1987). Pomimo przyjęcia ściśle określonych kryteriów identyfikacji drożdży, opartych na cechach morfologicznych i fizjologicznych (Lodder 1971, Kockova-Kratochvilova 1990, Kurtzman i Robnett 1998, Barnett i in. 2000), zmienność fenotypowa spowodowała tworzenie nowych jednostek taksonomicznych już istniejących gatunków. Hawksworth (2001) oszacował bogactwo gatunkowe grzybów na 1,5 miliona (Hawksworth 1991). Zdaniem Rossmana (1994) jest to liczba znacznie zawyżona, a jej hipotetycznie wyznaczona wartość nie powinna przekraczać miliona gatunków. Ewentualna liczba taksonów waha się od 500 do 9,9 miliona (Hawksworth 2001) i stale jest weryfikowana. Pomimo wielu kontrowersji i dyskusji, jakie wywołała ocena dotycząca przypuszczalnej liczebności gatunków, liczbę tę zaakceptowano wraz z ukazaniem się publikacji „Global biodiversity assessment” (Hammond 1995). Przyjmuje się, że dotychczas poprawnie opisano jedynie 5,0–6,0% taksonów grzybów (Rossman 1994, Hawksworth 2001) z powszechnie podawanej ich ogólnej liczby (SA 2000 1994). Tak niewielka wiedza na temat różnorodności grzybów wynika z ich biologicznej ewolucji (Hawksworth i Mueller 2005). Za najważniejsze ww. autorzy uznali filogenetyczne hipotezy i ich rolę w kształtowaniu się różnorodności gatunkowej jako skutku elastyczności fenotypowej oraz wzajemnych relacji w procesie koewolucji. W odpowiedzi na zmienność profilu ekologicznego środowiska te same genotypy drobnoustrojów mogą ulegać zróżnicowaniu fenotypowemu. W związku z tym zjawisko plastyczności fenotypowej powinno być rozważane w kontekście błędów w ocenie stopnia zróżnicowania gatunkowego, jeżeli nie zostanie poparte cechami genetycznymi.

Drożdże stanowią filogenetycznie zróżnicowaną grupę jednokomórkowych grzybów (de Baros Lopes 1998), które we współczesnej systematyce stanowią odrębne, w stosunku do roślin i zwierząt, królestwo – grzybów (Fungi). Organizmy te współtworzą jedną z sześciu linii rozwojowych w obrębie supergrupy Opisthokonta (Simpsona i Rogera 2004). Zaznaczyć należy, że wyniki analiz opartych na rzeczywistym pokrewieństwie organizmów (klasyfikacja molekularna) pozwoliły na wskazanie znacznie bliższego pokrewieństwa grzybów z królestwem zwierząt (Animalia) niż ze światem roślin (Plantae). Związek pomiędzy



wskazanymi królestwami, poza zbieżnymi cechami morfologicznymi i metabolicznymi komórek, potwierdza również wyjątek w regule uniwersalności kodu genetycznego. Sekwencja aminokwasów jest kodowana przez system trójkowy nukleotydów – tzw. kodonów. Spośród 64 tripletów nukleotydowych 61 koduje pojedyncze aminokwasy. Trzy pozostałe – UAG, UAA i UGA w kodzie standardowym nie wyznaczają żadnego aminokwasu. Kodony te, zwane nonsensownymi albo kodonami STOP, sygnalizują zakończenie sekwencji kodującej białko. Wspomnianym wyjątkiem jest kodon UGA (normalnie kodon stop), który zamiast przerwania translacji w mitochondriach drożdży i zwierząt powoduje kodowanie tryptofanu. Według Golika (2009) ma to istotne znaczenie w ograniczeniu transferu genów mitochondrialnych do jądra i utrzymaniu mitochondrialnego systemu genetycznego.

Możliwość wykorzystania technik biologii molekularnej w klasyfikacji organizmów spowodowała w systematyce królestwa grzybów całkowitą rewolucję. Reklasyfikacja nastąpiła przede wszystkim w gromadach obejmujących drożdże. Uważane przez niektórych za prymitywną grupę stanowią jedną z najbardziej zróżnicowanych jednostek taksonomicznych. Zapewne wynika to z polifiletycznej natury drożdży, w związku z czym ich usystematyzowanie stało się znacznie bardziej skomplikowane niż np. grzybów pleśniowych. Z powodu euryekologicznego charakteru drożdży, zmienności fizjologicznej i zdolności przystosowywania się do zróżnicowanych nisz ekologicznych może nastąpić zmiana cech niektórych szczepów, co stwarza niebezpieczeństwo ich niewłaściwej identyfikacji metodami tradycyjnymi. Wiele gatunków drożdży charakteryzuje również umiejętność tworzenia pseudostrzępek i strzępek oraz jednokomórkowej formy planktonowej. Ich wegetatywna postać zdolna jest do bezpłciowego rozmnażania poprzez pączkowanie lub rozszczepianie oraz do rozmnażania płciowego (Kurtzman 1994). Typy rozmnażania drożdży stały się pierwotnie jednym z podstawowych powodów, dla których poza Ascomycota i Basidiomycota została wyróżniona niezależna grupa systematyczna – Fungi Imperfecti (Deuteromycetes) obejmująca wszystkie grzyby, które nie mają stadiów płciowych. Dopiero charakterystyka molekularna wykazała pokrewieństwo niektórych form anamorficznych (bezpłciowych) z przedstawicielami gromady Ascomycota oraz Basidiomycota, potwierdzając to, że gromada Fungi Imperfecti jest sztuczną jednostką taksonomiczną.

W tak niehomogenicznej grupie, jaką są drożdże, zastosowanie systemu klasyfikacji, opartego wyłącznie na kryteriach fizjologicznych oraz morfologicznych form wegetatywnych i płciowych, w wielu przypadkach było naukowo nieuzasadnione i doprowadziło do zamieszania w systematyce jednokomórkowych grzybów. W pierwszej edycji „The yeast, a taxonomic study” (Lodder 1971) zostało scharakteryzowanych 349 gatunków drożdży w 39 rodzajach. W 1990 roku Burnett i in. (1990) opisali 590 gatunków należących do 83 rodzajów. Osiem lat później Kurtzman i Fell (1998) wydłużyli listę gatunków do 700. W 2003 roku opisanych już było ponad 800 gatunków drożdży (Vaughan-Martini 2003). Wzrost liczby taksonów wynika bez wątpienia ze zwiększającego się zainteresowania mykologią oraz z przyjętej koncepcji gatunku i ze złożoności cech uwzględnianych w metodach identyfikacyjnych. W ostatniej dostępnej edycji „The yeasts, a taxonomic study” (Kurtzman i Fell 1998) w ocenie taksonomicznej uwzględniono sekwencję DNA, co umożliwiło rekonstrukcję linii ewolucyjnej drożdży. Odnalezienie zależności genealogicznych pomiędzy organizmami stało się podstawą podziału drożdży na klady, czyli grupy organizmów mających wspólnego przodka



o unikatowych cechach plezjomorficznych – charakterystycznych dla określonej linii ewolucyjnej (Rokas i in. 2003, Brinkmann i Leipe 2005). Dopiero zastosowanie analizy filogenetycznej w systematyce biologicznej drożdży pozwoliło na uporządkowanie taksonów w hierarchicznej strukturze kategorii systematycznych. Kurtzman (2006) zwraca jednak uwagę, że przy wykorzystaniu odpowiednich technik identyfikacji genetycznej może nastąpić nawet podwojenie liczby opisanych gatunków w stosunku do liczby z czwartej edycji publikacji dotyczącej taksonomii drożdży (Kurtzman i Fell 1998).

Pokrewieństwo morfologiczne oraz ich umiejscowienie w filogenetycznej strukturze z grzybami strzępkowymi definiuje drożdże jako uproszczone formy bardziej rozwiniętych struktur mykologicznych (Lachance 2003, 2006). Zgodnie z obowiązującym kryterium identyfikacji należą one do Ascomycota, klas: Neoelectomycetes, Pneumocystidomycetes, Schizosaccharomycetes, Taphrinomycetes i Saccharomycetes (Kurtzman i Fell 2006) oraz do Basidiomycota, klas: Ustilaginomycetes, Uridiniomycetes i Hymenomycetes (McLaughlin i in. 1995, Swann i Taylor 1995, 1995 a, Fell i in. 2000, Scortzetti i in. 2002). W identyfikacji drożdży pierwszym krokiem w uzupełnieniu metod fenotypowych o metody biologii molekularnej było rozróżnienie grzybów należących do Ascomycota od należących do Basidiomycota. Zostało ono wyrażone w mol% G+C w nDNA, czyli w zawartości guaniny i cytozyny w DNA jądrowym (Kurtzman i Phaff 1987, Kurtzman i Robnett 1991). Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że w przypadku workowców zawartość G+C w nDNA mieści się w zakresie 28–50 mol% G+C, natomiast w nDNA podstawczaków jest znacznie wyższe – 50–70 mol% G+C. Należy podkreślić, że różnicowanie na poziomie 1–2 mol% może prowadzić do uznania szczepów za oddzielne gatunki (Kurtzman i Phaff 1987, Kurtzman 2006). Opracowana metoda była oparta na zależności pomiędzy zawartością guaniny i cytozyny a punktem topnienia DNA genomowego. Zasada komplementarności DNA w oznaczaniu gatunkowym wskazuje na związek całkowitego podobieństwa genomów między dwoma organizmami. Zgodność DNA-DNA wyrażona w procentach (Kurtzman 2006), poza wskazaniem reprezentantów populacji, określa ich miejsce w filogenetycznym systemie taksonomicznym i poziom ich różnicowania genetycznego. Niektórzy ustalają granice gatunku na poziomie podobieństwa wynoszącym aż 80,0% zgodności hybrydyzacji DNA-DNA (Price i in. 1978, Stackebrandt 2006). Oznacza to różnicę w temperaturze topnienia DNA pomiędzy porównywanymi genomami o  $\leq 5^{\circ}\text{C}$  (Jay i in. 2005). Interpretacja uzyskanych wyników była jednak bardziej satysfakcjonująca w przypadku szeregowania możliwych związków lub podobieństw niż w określaniu identity gatunkowej (Spencer i Spencer 1997). Dlatego według Stackebrandt (2006) nie powinno się rekomendować tej metody do klasyfikacji gatunków, których uprzednio nie rozróżniono na podstawie kryteriów fenotypowych (Zhou i Thompson 2002).

Poprawność identyfikowania gatunku w zakresie ekologii drożdży jest podstawowym czynnikiem determinującym prowadzone badania. Jest bowiem fundamentem szacowania ich różnorodności w ekosystemie. W definiowaniu gatunku mikrobiolodzy stosują zasadę 70-procentowej identity sekwencji DNA-DNA (Wheeler i Meier 2000, Salyers i Witt 2003, Rossello-Mora 2006). Stosowane coraz częściej techniki oparte na sekwencjach DNA, według Lachance (2006) jeszcze niewystarczająco powszechnie, mają na celu sprecyzowanie pojęcia różnicowania pomiędzy pojedynczymi jednostkami, które łączy wspólna pula



genowa pochodząca z tego samego biologicznego gatunku jako wspólnego przodka. Sformułowanie nowej filogenetycznej koncepcji gatunku PSC – ang. Phylogenetic Species Concept (Freeland 2008) dało podstawy do uznania biologicznej koncepcji gatunku BSC – ang. Biological Species Concept (Mayr 1942) za przestarzałą i niewystarczającą (Nguyen i in. 2000, Lopez i in. 2003, Kurtzman 2006). W przypadku drożdży koncepcja ta nie uwzględniała zmienności form anamorficznej i telemorficznej w obrębie gatunku, które w wielu przypadkach opisywane były jako odmienne taksony (Barnett i in. 1990). Na uwagę zasługuje fakt, że w przeciwieństwie do BSC, w PSC identyfikuje się znacznie większą liczbę taksonów – nawet o 48,7% (Agapow i in. 2004).

Zastosowanie różnych technik w metodzie PCR z ich specyficznym (Lopez i in. 2003) i niespecyficznym system detekcji (Baleiras Couto i in. 1996, Spencer i Spencer 1997) umożliwiło różnicowanie szczepów drożdży w obrębie gatunku i pomiędzy gatunkami (Fell 1993, Casey i Dobson 2004, Middelhoven i in. 2004). Aktualnie w identyfikacji drożdży obowiązuje technika oparta na „kluczu molekularnego regionu drożdży” (Fell i in. 2000, Vaughan-Martini 2003). Stanowi go fragment DNA, w przybliżeniu 600–650-nukleotydowy, opisany jako D1/D2 z LSU (ang. *large subunit*) 26S rDNA (Fell i in. 2000, Fell i in. 2001, Gadanho i in. 2003, Libkind i in. 2003). Według Kurtzmana i Robnetta (1998) szczepy należące do tego samego gatunku mają zazwyczaj identyczną sekwencję D1/D2. Alternatywną metodą identyfikacji gatunkowej, stosowanej przez Inacio i in. (2005), jest analiza sekwencji ITS (ang. Internal Transcribed Spacer), w przypadku, której baza danych nie jest jednak uzupełniana (Fell i in. 2000). Mimo to badania oparte na analizie uporządkowania ITS prowadzone są nadal. Zazwyczaj są wykorzystywane w celach porównawczych z wynikami analiz sekwencji D1/D2 (Casey i Dobson 2004, Middelhoven i in. 2004, Kurtzman i in. 2005) lub wykorzystywane do ich kombinacji (Scorzetti i in. 2002). Uzyskane przez Scorzetti i in. (2002) wyniki analiz łącznego zastosowania regionów ITS oraz D1/D2 wskazały, że opracowana metoda może być rekomendowana na potrzeby klasyfikacji biologicznej szczepów drożdży należących do Basidiomycota. Powszechna akceptacja metody opartej na sekwencjonowaniu regionu D1/D2 i ITS1/ITS2 zdominowała metodologicznie filogenetyczne analizy drożdży. Zastosowanie jednak analiz filogenetycznych w badaniach gatunków odmiennych biologicznie (*Trichosporon montevidense* i *Tr. domesticum*) wykazało, że sekwencjonowanie regionu ITS może okazać się niewystarczające do rozróżnienia gatunków (Sugita i in. 2000). Według Lopandic i in. (2005) filogeneza rDNA powinna być poparta przez *fingerprinting* całego genomu. Sukcesem zakończyło się zastosowanie metody znanej jako RAPD (ang. *random amplified polymorphic DNA* – losowo amplifikowane polimorficzne DNA) oraz AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism* – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów) w genomowym typowaniu form prokariotycznych i eukariotycznych (Couto i in. 1994, Andrighetto i in. 2000, Lopandic i in. 2005).

## 1.2. Występowanie grzybów w środowisku wodnym

Zdolność zasiedlania przez grzyby zróżnicowanych siedlisk spowodowała wyróżnienie wielu grup ekologicznych, w których swoje miejsce znalazły również grzyby wodne. Są to jedynie te gatunki, których cykl życiowy związany jest ściśle ze środowiskiem wodnym, poza którym nie stwierdza się ich obecności – rezydenci (Hawkswortha i Lagreca 2007). Dix



i Webster (1995) uwzględnili możliwość występowania w grupie tej, oprócz form autochtonicznych, imigrantów, dla których środowisko wodne może być miejscem alternatywnego bytowania (tab. 1). W zależności od możliwości adaptacyjnych komórki grzybów ulegają powsolnemu wymieraniu lub stają się nierozłączną częścią biocenozy danego akwenu, odgrywając w nim określoną rolę w pętli mikrobiologicznej. Ich aktywność metaboliczna przy znormalizowanych warunkach ekologicznych jest stała jedynie w przypadku form autochtonicznych, sporadyczna – w przypadku form zaadaptowanych, natomiast jej brak oznaczany jest u form przemijających (Dix i Webster 1995).

Tabela 1. Klasyfikacja heterotroficznych mikroorganizmów w środowisku wodnym

Kategoria mikroorganizmów			Obecność w wodzie	
rezydenci	formy autochtoniczne		stała	
	imigranci	migracja	okresowa	przemijająca
		adaptacja	nieregularna	

Źródło: Dix i Webster (1995).

W zasadzie każdy z ekosystemów wodnych zasiedlany jest przez grzyby z różnych jednostek taksonomicznych i grup ekologicznych. Według Shearer i in. (2007) reprezentują one wszystkie klasy, a najczęściej oznaczane należą do: Chytridiomycetes, Oomycetes i Ascomycetes, rzadko – do Basidiomycetes. Izoluje się je z jezior, ze stawów, z bagien, rozlewisk, ze strumieni, z rzek, estuariów, mórz i oceanów, w których obecność dostępnej materii pozwala na utrzymanie podstawowych funkcji życiowych. Barghoon i Linder (1944) po raz pierwszy opisali biologię grzybów strzępkowych izolowanych wyłącznie ze środowiska morskiego lub oceanicznego. Stało się to podstawą do podzielenia grupy ekologicznej grzybów wodnych na grzyby śródlądowe i morskie. W 1979 roku Kohlmeyer i Kohlmeyer na liście gatunków grzybów morskich umieścili 209 taksonów. Wzrost zainteresowania grzybami wodnymi, jak również rozwój technik badawczych wpłynęły na zwiększenie się liczby identyfikowanych gatunków (Kohlmeyer i Volkmann-Köhlmeier 1991). Do 2003 roku opisanych już było 465 przedstawicieli grzybów morskich (Shearer i in. 2007). Na podstawie ich zasięgu występowania i cech behawioralnych wyróżnione zostały obligatoryjne i fakultatywne gatunki morskie (Kohlmeyer i Kohlmeyer 1979). W przypadku tych ostatnich nieistotny dla procesów metabolicznych i reprodukcyjnych jest wpływ środowiska śródlądowego. Natomiast do podtrzymania podstawowych procesów komórkowych bezwzględnych form morskich niezbędne jest środowisko słonowodne. W biogeograficznym zróżnicowaniu grzybów wodnych, poza czynnikiem determinującym, jakim jest zawartość chlorków w wodzie, bardzo ważna jest temperatura wody. Hughes (1974) próbował wprowadzić pięć biogeograficznych regionów opisujących zależność temperaturową grzybów: arktyczny, umiarkowany, subtropikalny, tropikalny, antarktyczny. Powyższy system dywersyfikacji został jednak dosyć szybko podważony przez mykologów ze względu na zbyt szeroki zakres temperaturowego nakładania się wyodrębnionych stref (Kohlmeyer 1983).

W każdym z wymienionych rejonów geograficznych i ekosystemów wodnych swoje miejsce znalazły również drożdże. Ich obecność w środowisku odzwierciedla umiejętność dostosowania do profilu czynników abiotycznych i relacji z innymi organizmami, z którymi



współtworzą biotyczną część zasiedlanej niszy. Obecność drożdży w ekosystemach naturalnych rozpatruje się więc w związku z ich udziałem w biologicznej i chemicznej dynamice zmian, w których odgrywają one istotną rolę jako: reducenty, konsumenci, konkurenci lub symbionty (Dix i Webster 1995, Shearer i in. 2007).

Występowanie drożdży w środowisku wodnym jest powszechne. Ich euryekologiczny charakter wynika z możliwości adaptacyjnych pojedynczej komórki i całej plechy do zmieniającego się w czasie i przestrzeni profilu hydrochemicznego środowiska. Szczególnie warunki kształtują obszary estuariowe, które charakteryzują się wysoką dynamiką zmian, a relacje pomiędzy biotycznymi i abiotycznymi elementami ekosystemu ulegają ciągłej fluktuacji (Marques i in. 1997). Prowadzić to może do powstawania barier ekologicznych wyznaczających granice migracji słodkowodnych i morskich organizmów. Zazwyczaj takim krytycznym czynnikiem jest zasolenie. Wydaje się jednak, że zmiany w zasoleniu nie wpływają istotnie na występowanie drożdży (Larsson i in. 1990). Ich obecność oznaczana była w środowiskach o zróżnicowanym profilu fizykochemicznym. Izolowane były z wód arktycznych (Vishniac 1995, Guffogg i in. 2004), wód tropikalnych Pacyfiku czy Atlantyku (Valdes-Collazo i in. 1987, Schoenlein-Crusius i in. 2006), salinatów (Butinar i in. 2005) oraz wodnych organizmów roślinnych i zwierzęcych (Nagahama i in. 2001).

W zasadzie żadne z przeprowadzonych do tej pory badań nie wyjaśnia mechanizmu przystosowania się drożdży do życia w środowisku wodnym. Wyodrębniono jedynie kilka cech, które mogą predysponować grzyby jednokomórkowe do życia w takich ekosystemach. Mikroorganizmy te na ogół należą do tlenowych niesporulujących form, słabo fermentujących, które wymagają przynajmniej jednego czynnika wzrostowego w postaci witamin (Kutty i Philips 2008). Ich obecność w środowisku wodnym nie jest również determinowana stężeniem chlorków. Zasolenie jest jedynie jednym z wielu czynników wpływających na mechanizmy ekologiczne drożdży. Według Kohlmeyer i Kohlmeyer (1979) zasadny jest podział tych form na obligatoryjne (np. *Metschnikowia zobellii*, *M.krissii*) i fakultatywne grzyby morskie (*Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp., *Trichosporon* sp.). Do pierwszej grupy zalicza się tylko te grzyby, których procesy reprodukcyjne i metaboliczne wymagają obecności chlorków. Dla pozostałych, zazwyczaj drożdży słodkowodnych i lądowych, ich obecność nie jest konieczna, a czasami jest wręcz szkodliwa. Kutty i Philip (2008) podkreślają, że dla drożdży izolowanych z gleby, ontosfery zwierząt lub człowieka estuarium i morza nie stanowią środowiska natywnego. Obecne w nich grzyby jednokomórkowe najprawdopodobniej zostały zawleczone wraz z nurtem rzeki, ściekami lub wiatrem. W większości przypadków występowanie drożdży pochodzących z obszarów śródlądowych w wodach o wysokim zasoleniu jest jednak okresowe (Rheinheimer 1979) lub zostały przeoczone w wyniku zastosowania standardowych metod izolacji (Ekendahl i in. 2003).

### 1.3. Strategie przeżycia drożdży

W każdym ekosystemie zależności istniejące pomiędzy organizmami warunkowane są zmiennością czynników biotycznych i abiotycznych. Wiele biocenoz charakteryzuje określona równowaga biologiczna. W tym przypadku fizjologiczna tolerancja poszczególnych gatunków wyznacza kierunek zmian w ich strukturze (Marques i in. 1997). Interakcje drożdży



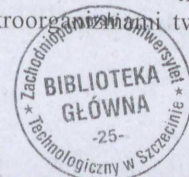
z innymi mikrogrzybami, bakteriami i pierwotniakami, jak również z wyższymi hydrobiontami oparte są na określonych zależnościach, których podstawowym celem jest utrzymanie się w środowisku. W naturalnych ekosystemach wodnych mikroorganizmy, chcąc przetrwać, muszą przyjąć określoną strategię przeżycia. Staje się ona odzwierciedleniem reakcji populacji na fluktuacje dostępności nutrientów. Dotyczy to przede wszystkim form allochtonicznych, których przemiana materii jest często niedostosowana do nowych warunków siedliskowych. W przypadku relacji opartych na zasadach konkurencji koegzystujących organizmów grupy biologiczne charakteryzujące się szybkim tempem reprodukcji cechuje skokowy wzrost zagęszczenia w stosunku do utrzymywanej stałej liczby populacji silnych konkurentów (Lampert i Sommer 1996).

Pojęcie „społeczność mikrobiologiczna” rozważane jest zazwyczaj w kontekście zachowań tworzących je organizmów oraz niszy ekologicznej, w której funkcjonują. Zakres występowania drożdży w warunkach naturalnych, definiowany jako nisza rzeczywista, warunkowany jest rozproszeniem i interakcjami z innymi organizmami (Lachance 1990). Wyznaczają je podstawowe relacje ekologiczne, spośród których najczęściej rozważane są mutualizm i komensalizm (Møller i in. 1998, Richard i in. 2002). Egzystencja populacji jest uzależniona nie tylko od czynników biologicznych, ale również od wyznaczonego przez niszę podstawową zakresu warunków fizycznych, poniżej których organizmy mogą jeszcze funkcjonować (Lachance 1990).

Interakcje pomiędzy drożdżami a innymi grupami mikroorganizmów żyjących w tej samej niszy ekologicznej nie muszą być oparte na zasadach konkurencji, natomiast powinny być oparte na współtworzeniu zorganizowanej społeczności (Adams i in. 2008). Odkrycie zdolności formowania heterogenicznego konsorcjum przez drobnoustroje zrewolucjonizowało poglądy w ekologii mikroorganizmów i dotyczące możliwości ich funkcjonowania w środowisku wodnym. Stało się to niejako konsekwencją sugestii, iż w środowisku naturalnym potencjalne występowanie pojedynczych komórek jest sporadyczne (Costerton i Lewandowski 1997, Vachova i in. 2009). W większości przypadków tworzone są kompleksy naturalnych społeczności, w których szanse przeżycia są znacznie większe. W strukturze powstającego kompleksu stratyfikację organizacji wielogatunkowej społeczności wyznaczają funkcjonalność i poziom wyspecjalizowania metabolicznego (Carlsson 1997, Gilbert i in. 1997, Richard i in. 2003).

### 1.3.1. Biofilm mikrobiologiczny

Biofilm populacji mikrobiologicznej jest strukturą przestrzenną, której funkcjonalność i forma zależą od fizykochemicznych parametrów środowiska (Jenkinson i in. 2001). Regulacja tworzenia biofilmu odbywa się w czterech podstawowych etapach: adherencji do powierzchni, tworzenia mikrokolonii, dojrzewania biofilmu i tworzenia finalnej formy przestrzennej oraz jego opuszczania (Stanley i Lazazzera 2004, Blankenship i Mitchell 2006). Dwa pierwsze etapy, obejmujące formowanie biofilmu, wyznaczane są poprzez transdukcję czynników środowiska, których sensorem stają się zewnętrzne struktury ściany komórkowej (Otto i Silhavy 2002). Kolejne etapy wynikają przede wszystkim z kontroli dostępności pokarmowej oraz z *quorum sensing*, czyli relacji pomiędzy mikroorganizmami tworzącymi





społeczność a ich profilem fizjologicznym (Stanley i Lazazzera 2004). Architektura tworzonej społeczności zależna jest przede wszystkim od profilu genetycznego mikroorganizmów tworzących społeczność (Davey i O'Toole 2000, Sutherland 2001). Rozwojowi biofilmu towarzyszy różnicowanie morfologii komórek, zwolniony metabolizm i zmiany fenotypowe, które warunkują ich oporność i zjadliwość (Bartoszewicz i Rygiel 2006).

W składzie chemicznym biofilmu istotną rolę odgrywa woda, której udział określa się na poziomie przekraczającym 97,0%. Jest ona związkiem, od obecności którego zależy struktura biofilmu (Schmidt i Fleming 1999). Może być związana w otoczkach komórek lub jako rozpuszczalnik determinować właściwości zawartych w niej związków. Oprócz wody i drobnoustrojów (2,0–5,0%) biofilm współtworzy *matrix*. Stanowi go kompleks powstały z egzopolisacharydowych polimerów, zaabsorbowanych nutrientów i metabolitów, produktów pochodzących z lizy komórek – przede wszystkim DNA i RNA (1,0–2,0%) oraz z cząstek pochodzących z najbliższego otoczenia (Sutherland 2001). Skład i struktura przestrzena biofilmu nie są stałe, odzwierciedlają bowiem specyfikę profilu fizjologicznego i genetycznego tworzących go komórek.

Formowanie biofilmu mikrobiologicznego jest złożonym procesem wymagającym koordynacji kilku zależnych i uzupełniających się reakcji. Kompleks zjawisk, którego efektem jest uformowanie mikrowarstewki, inicjowany jest poprzez przyleganie do powierzchni lub innej komórki – koagregację (Richard i in. 2003). Jest to pierwszy i krytyczny etap tworzenia biofilmu i/lub społeczności planktonowych (Mercie-Bonin i in. 2004). Ta jedna z wielu wyjątkowych cech drożdży generowana jest plastycznością fenotypową, której zmienność regulują mechanizmy genetyczne i epigenetyczne (Verstrepen i in. 2006). Istotną rolę w przyleganiu grzybów odgrywa struktura ściany komórkowej. Jej budowa nie jest jednorodna u wszystkich przedstawicieli drożdży. Wspólnym elementem jest glikozylofosfatydyloloinozytol (ang. GPI – *glycosylphosphatidylinositol*), który poprzez kowalencyjne wiązania z  $\beta$ -1,6-glukanem tworzy jej integralną część (Klis i in. 2006, Norice 2007). Powstająca proteinowo-polisacharydowa struktura (GPI- $\beta$ -1,6-glukan- $\beta$ -1,3-glukan) nie jest typowa jedynie dla dimorficznych drożdży z klasy Ascomycetes (Klis i in. 2002). Zbliżona „organizacja” ściany komórkowej została opisana w przypadku rozszerpkowych drożdży *Schizosaccharomyces pombe*, grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus* i *Fusarium*, jak również wielu gatunków należących do Basidiomycetes (Yin i in. 2007). W drożdżach GPI odgrywa zasadniczą rolę w przeżywalności komórek i ekspresji białek powierzchniowych (Lipke i in. 1989, Lipke i Kurjan 1992, Watari i in. 1994, van der Vaart i in. 1995, Yin i in. 2007). Jako element ściany komórkowej GPI może współtworzyć, opisane przez Kondo i Ueda (2004), struktury wyspecjalizowanych białek takich jak aglutyniny (np. Aga1 i Aga1) i flokuliny (np. Flo1, Sed1, Cwp1 Tip1 i Tir1/Srp1).

Wszystkie adhezyny grzybów, opisywane również jako flokuliny (Verstrepen i Klis 2006), mają budowę złożoną z trzech domen (C-terminalnej, środkowej i N-terminalnej). Poprzez wiązanie kowalencyjne GPI z C-terminalnym fragmentem adhezyny następuje umiejscowienie białka w membranie ściany komórkowej i stabilizacja domeny środkowej (Groes i in. 2002, Rigden i Hello 2004). Tej zasadniczej – środkowej części adhezyny przypisuje się plastyczność fenotypową drożdży i zdolność do szybkiego dostosowywania właściwości przylegania powierzchni komórki do nowego środowiska. Wynika ona z obecności



wielokrotnych powtórzeń serynowych i treoninowych. Częste występowanie rekombinacji jest uwarunkowane posiadaniem powtórzeń tandemowych w genach kodujących, co doprowadza do stworzenia nowej formacji adhezyny z nowym fenotypem (Guo i in. 2000, Sheppard i in. 2004). Dzięki dużemu zróżnicowaniu liczby takich powtórzeń jego polimorfizm jest ogromny. Mechanizm ten zapewnia grzybom niekończącą się „kopalnię” adhezyn o nowych właściwościach, co powoduje, że zdolność przylegania grzybów należy do najbardziej elastycznych mechanizmów dostosowywania się do zmieniających się warunków środowiskowych. Trójdomenową strukturę adhezyn uzupełnia jej N – terminalna część, poprzez którą następują specyficzne wiązania z aminokwasami lub resztami cukrowymi występującymi na powierzchni innych komórek (Groes i in. 2002, Rigden i Hello 2004). W komórkach drożdży występuje kilka rodzajów tych związków; każda z nich wykazuje specyficzność łączenia się z konkretnym substratem lub powierzchnią abiotyczną.

Genetycznie uwarunkowana zdolność adherowania lub flokulacji drożdży nie odzwierciedla ich konstytutywnej cechy. Zainicjowanie aktywności może być odpowiedzią na brak dostępności węgla i/lub azotu, zmiany pH środowiska lub stężenia etanolu (Verstrepen i in. 2003, Sampermans i in. 2005), jak również na produkowane przez gospodarza molekuly, takie jak auksyny czy NAD u ssaków (Verstrepen i in. 2006). Tworzenie społeczności jest odpowiedzią komórki na zmiany w środowisku jej bytowania, a regulacja mechanizmu wynika z określonego szlaku ekspresji genów adhezyn (Verstrepen i in. 2003, Blankenship i Mitchell 2006). Jego przebieg jest adekwatny do właściwych dla komórki szlaków, które znane są jako regulatory adhezyn, np. FLO w przypadku *S. cerevisiae* (Liu 2001, Kaur i in. 2005, Maidan i in. 2005). Pomimo wielu cech wspólnych w mechanizmie tworzenia i strukturze adhezyn wykazują one subtelne różnice sugerujące ekologiczny charakter komórek. Przede wszystkim stają się wyrazem dostosowania właściwości powierzchni ściany komórkowej do nowego środowiska (Guo i in. 2000, Sheppard i in. 2004). Odzwierciedlają również „styl” życia komórek określonych gatunków drożdży. Zdaniem Verstepena i Klisa (2006) w adhezji grzybów można wyróżnić dwa rodzaje oddziaływań – *lectin-like adhesion* i *sugar-insensitive adhesion*. W przypadku pierwszego typu wiązań wskazane jest powinowactwo do adhezyn z resztami cukrowymi. Adhezyny z tej grupy w terminalnej domenie wiążącej mają węglowodany (pfam no. 06660), które hamują przyleganie niespecyficznych związków, a umożliwiają adhezję swoistych N-końców na powierzchni innych komórek. W drugim typie wiązań w adhezji pośredniczą adhezyny wiążące inne peptydy (Klotz i in. 2004). Efektem ich aktywności jest również zwiększenie powierzchni hydrofobowej komórek wspomagające przyleganie do powierzchni abiotycznych lub oddziaływań hydrofobowych pomiędzy samymi komórkami (Reynolds i Fink 2001, Kang i Choi 2005). Stabilizację takiego układu zapewnia macierz powstała z zewnątrzkomórkowych polimerów. W jej strukturze, poza wciąż nieokreślonymi związkami (Baillie i Douglas 2000), stwierdzono obecność: polisacharydów, białek, fosfolipidów, peptydoglikanu, DNA i RNA oraz heksozamininy (Langille i Geesey 2000, Sutherland 2001). W większości prac autorzy wskazują na podobieństwo struktury biochemicznej biofilmu i społeczności planktonowej (Oloffon i in. 1998, Sutherland 2001) pomimo istotnych różnic w ekspresji genów inicjujących powstawanie odmiennych mikroekosystemów (Chandra i in. 2001, Sauer i Amper 2001).



Kolejne etapy kooperacji są zazwyczaj w wielogatunkowej społeczności konsekwencją zróżnicowania i specjalizacji utworzonego w określonej niszy ekologicznej biofilmu. Każdy kolejny etap jest jednak warunkowany określonym schematem reakcji wynikającym z ekspresji poszczególnych genów (tab. 3).

Tabela 3. Ekspresja genów w poszczególnych etapach tworzenia biofilmu

Etapy tworzenia biofilmu	Adherencja do substratu	Rozwój biofilmu	Dojrzewanie biofilmu	Opuszczanie biofilmu
Adhezja	Ace2			
		Bcr1, Tec1, Als3, Hwp1		
			Als2	
Różnicowanie strzępek	Efg1, Tec1, Suv3, Nup85, Mds3, Kem3			
Lekooporność	Cdr1, Mdr1			
		zmiana w kompozycji steroli		
		Mkc1		
Wytwarzanie zewnątrzkomórkowego <i>matrix</i>	Adh1			
<i>Quorum sensing</i>			Chk1	
				Ywp1

Źródło: Blankenship i Mitchell (2006).

Skutkiem funkcjonowania biofilmu dużej populacji komórek w określonym miejscu jest postępujący proces jego starzenia. Wywołuje go narastające w czasie ograniczenie dostępności składników odżywczych. W efekcie uruchomiony może zostać proces apoptozy lub *quorum sensing*. W pierwszym przypadku obecność martwych komórek, jako skutku „altruistycznego” zachowania biofilmu, odgrywa istotną rolę w utrzymaniu jego rozwoju (Markx i in. 2004). Natomiast regulacja poprzez system chemicznego porozumiewania się uruchamia mechanizm uwalniania jednostek potomnych poszczególnych populacji biofilmu, co jest warunkiem niezbędnym efektywnego przetrwania komórek danego mikroorganizmu i zasiedlania kolejnych środowisk.

Funkcjonowanie bakterii w środowiskach o zróżnicowanym profilu ekologicznym zostało dość dobrze poznane (Mueller 1996, Richard i in. 2003), natomiast wciąż niewiele wiadomo o procesach współtworzenia struktur ekologicznych przez drożdże.

### 1.3.2. Występowanie drożdży w środowisku jako formy VBNC

Ekspozycja biofilmu lub społeczności wolnoptywających na czynniki niesprzyjające rozwojowi komórek powoduje zmiany w ich morfologii i aktywności metabolicznej. Przeżycie w niekorzystnych warunkach najczęściej zapewnia genetycznie zaprogramowana odpowiedź komórki (Kjelleberg i in. 1993). Niezależne zespoły badawcze pod kierunkiem Caustona i in. (2001) zdefiniowały mechanizmy regulacji genów, które zostały opisane jako CER (ang. *common environmental response*) – odpowiedź komórki na czynniki środowiska (Causton i in. 2001) a pod kierunkiem Gasha i in. (2000) ESR (ang. *environmental stress response*) – jako odpowiedź komórki na stres środowiskowy.



Reakcja komórki wynika z obecności genów „wzbudzanych” i „hamowanych”, których aktywność wyraża stopień odstępstwa od warunków ich dotychczasowego bytowania. Generalnie uznać należy, iż rolą grupy genów „wzbudzanych” jest regulacja metabolizmu energetycznego komórki oraz kontrola rozpadu białek komórkowych i syntezy *de novo* białek stresu czy np. odbudowa uszkodzonego DNA (Mattanovich i in. 2004). Mechanizm regulacji poprzez pozostałe geny (wyciszane) związany jest z procesami wzrostu komórki, metabolizmem nukleotydu i RNA oraz białkami rybosomalnymi (Mattanovich i in. 2004). Wyzwolona poprzez czynniki środowiskowe odpowiedź adaptacyjna komórek może doprowadzić do permanentnej lub przejściowej niehodowalności (Dahm i Strzelczyk 2004).

Naturalną odpowiedzią komórek na stres środowiskowy jest ich przejście w postać komórek żywych, ale niehodowalnych – tzw. VBNC (ang. *viable but nonculturable*) – McDougald i in. (1998). Komórki w stanie VBNC są definiowane jako aktywne oddechowo, ale niezdolne do podziału na podłożach laboratoryjnych (Oliver 1993, Colwell 2000). W warunkach *in vitro* zdolne są do syntezy białek (Yamamoto 2000) oraz zachowania niskiej aktywności metabolicznej (Oliver 2005), która jest wyższa u drobnoustrojów zjadliwych (Sardessai 2005). Regulacja właściwości fizjologicznych wynika z obecności substancji sygnałowych – tzw. autoinduktorów oraz z systemu ich przekazywania.

Najczęstszą konsekwencją zmiany, np. zawartości substratu w środowisku, jest zmiana objętości komórki. Jest ona naturalnym skutkiem konieczności zmniejszenia zapotrzebowania energii i zagęszczenia cytoplazmy poprzez zmniejszenie ilości lipidów i białek (Divol i Lonvaud-Funel 2005). McDougald i in. (1998) zauważyli również, że przejściu w stan VBNC towarzyszy zmiana w błonie i modyfikacji ściany komórkowej. Jest to istotne, ponieważ błona komórkowa jest najczęściej obserwowaną strukturą morfologiczną bakterii; utratę jej integralności utożsamiano ze śmiercią komórki. W badaniach przeprowadzonych przez Bogusławską-Wąs i in. (2006) wykazano, że wprowadzenie szczepów *S. cerevisiae* do środowiska charakteryzującego się mniejszymi wartościami nutrientów od tolerancji metabolicznej testowanych drożdży spowodowało utratę integralności błony komórkowej.

Wykorzystana w celu ustalenia jej stanu technika mikroskopii fluorescencyjnej umożliwiła przeprowadzenie jeszcze jednej obserwacji. Zastosowanie barwnika DAPI (diamidino-2-fenylindolu) do bezpośredniej oceny zmienności liczby drożdży pozwoliło na wykazanie, że w poszczególnych strefach estuarium Odry standardowo oznaczana liczebność *S. cerevisiae* była zaniżona średnio o 2 log w stosunku do liczebności wynikającej z obserwacji mikroskopowej. Według Zweifel i Hagström (1995) zdolność barwnika DAPI do wybarwienia komórki o nieuszkodzonych i uszkodzonych błonach biologicznych nie może być uznana za rzeczywiste odzwierciedlenie obecności rosnących i/lub żywych mikroorganizmów. Dlatego w badaniach nad przeżywalnością *S. cerevisiae*, prowadzonych przez Bogusławską-Wąs i in. (2006), wykorzystano selektywne wiązanie DAPI z parami zasad adenina–tynina DNA komórki i wykazano obecność aktywnego jądra komórkowego – tzw. DAPI NuCC. Umożliwiło to zweryfikowanie wyników o obecność *ghost*, opisanych przez Sondergarda (2000). Ostatecznie wykazano, iż zbiorniki wodne nie są dla tego gatunku drożdży naturalnym miejscem bytowania. Profil fizykochemiczny środowiska wodnego nie sprzyja rozwojowi i podtrzymaniu procesów metabolicznych, nie musi jednak prowadzić do śmierci komórki. Przy założeniu, że drożdże do środowiska wodnego przedostają się w stacjonarnej fazie wzrostu zgromadzone rezerwy energetyczne w postaci glikogenu i trehalozy umożliwiają komórkom *S. cerevisiae* przeżycie w warunkach głodzenia przez dłuższy czas (Granot i Snyder 1991, Granot



i Snyder 1993). Nie jest do końca jasne, czy przechodzenie komórek w stan VBNC jest stabilnym fizjologicznym stadium, po którym następuje ich regeneracja (Divol i Lonvaud-Funel 2005), czy jedynie formą przejściową prowadzącą do ich śmierci (Ohtomo i Saito 2001, Oliver 2005).

W ekosystemach naturalnych częstym zjawiskiem jest niedobór substancji odżywczych. Ich stężenie nie przekracza zazwyczaj 10  $\mu\text{g/l}$ . Skutkiem deficytu związków odżywczych jest przede wszystkim maksymalne wydłużenie okresu między podziałami lub jego całkowite zahamowanie oraz „przebudowa” aparatu enzymatycznego. Ograniczeniu procesu wzrostowego komórek towarzyszy wstrzymanie syntezy ściany komórkowej oraz uruchomienie systemu zwiększonej oporności komórki na szkodliwe parametry środowiska (Barcina 1997, Dahm i Strzelczyk 2004). W warunkach absolutnego głodu dochodzi do stopniowego obniżania zawartości RNA, powolnego rozregulowania metabolizmu i rozpadu struktur wewnątrzkomórkowych, czego efektem jest śmierć komórki (Kunicki-Goldfinger 2001).

#### 1.4. Estuarium Odry jako miejsce bytowania drożdży

Zgodnie z obowiązującą definicją za estuarium uznaje się rejon ujściowy rzeki o małej głębokości i nietypowym kształcie, na obszarze którego mieszają się wody morskie i spływające z lądu (Elliot i McLusky 2002). Podstawowym problemem, z jakim borykają się hydrologi, jest określenie kryteriów wyznaczania granic estuarium (Pritchard 1967, Majewski 1972, Fairbrige 1980, Jasińska 1991, Elliot i in. 1999). Na wybrzeżu polskim typowym obszarem estuariowym tworzącym w końcowym odcinku zatokę, obficie zaopatrywaną w wody rzeczne, jest estuarium rzeki Odry (Tórz 2007). Na podstawie struktury zasolenia zostało ono zakwalifikowane do kategorii estuarium homogenicznego. W przeciwieństwie do estuariów uwarstwionych i częściowo wymieszanych nie oznacza się w nim pionowego gradientu zasolenia, a przemieszczanie wód słonych następuje jedynie w kierunku poziomym. Na podstawie zmienności przestrzennej stężenia makrojonów Tórz (2007) dokonała podziału estuarium Odry na trzy strefy:

1. Estuarium dolne – strefa bezpośrednio połączona z morzem, obejmująca obszar Zatoki Pomorskiej, której wody charakteryzują się wysokim poziomem jonów sodu i chlorkowych. Według Majewskiego (1967) warunki hydrochemiczne, hydrologiczne i hydrobiologiczne tej strefy kształtują w znacznym stopniu wody Odry, które stanowią aż 83,0% dopływu wód rzecznych.

2. Estuarium środkowe – obszar słonawowodny Zalewu Szczecińskiego charakteryzujący się wysoką dynamiką wód z dominacją wód z Odry oraz z zaznaczającą się dominacją jonów sodu i chlorkowych.

3. Estuarium górne – środowisko słodkowodne Odry od Widuchowej do Zalewu Szczecińskiego. Profil hydrochemiczny tego obszaru kształtowany jest przez dynamikę wód estuarium środkowego w wyniku okresowych cofek, z dominacją jonów wapnia i wodorowęglanowych.

Cyrkulacja wód w estuariach bezpływowych zależy przede wszystkim od wielkości dopływu śródlądowego, którego wody stają się przyczyną mieszania. Intensywność i przestrzenny zasięg tego procesu zależą od siły i kierunku wiatrów (Kubiak 1980, Skriptunov i Gorelits 2001). W okresie pobierania prób miasto Szczecin nie miało działającej oczysz-



czalni ścieków. W związku z tym do Odry w 2003 roku odprowadzono dziennie około 70 000 m<sup>3</sup> ścieków komunalnych, z czego aż 50 000 m<sup>3</sup> na dobę nie było oczyszczonych (GUS 2005). Spośród prawie 90 wylotów kanalizacyjnych jedynie dwa miały urządzenia do oczyszczania mechaniczno-biologicznego. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego w Szczecinie (2005) ścieki komunalne odprowadzone siecią kanalizacyjną, poddawane oczyszczaniu mechanicznemu, stanowiły jedynie 25,0%, a biologicznemu – 2,7%.

Estuaria jako obszary o wysokiej zawartości materii organicznej i dostępności pokarmowej charakteryzują się znaczną bioróżnorodnością (Marques i in. 1997). Wzajemne powiązania pomiędzy funkcjonującymi w takim ekosystemie organizmami wynikają z różnorodności środowisk cząstkowych tworzących ekosystem estuarium. Jako środowiska nieistniejące samodzielnie charakteryzują się specyficznym profilem fizycznym, chemicznym i biologicznym. Ich położenie oraz zróżnicowanie kształtuje środowisko bytowania ichtiofauny. W estuarium Odry Elliott i Hemingway (2002) wyróżnili 50 gatunków ryb, dla których było ono miejscem rozrodu (46,0%), podchowu wylęgu i stadiów młodocianych (54,0%), miejscem żerowania (88,0%), jak również szlakiem wędrówki ryb dwuśrodowiskowych (20,0%). Elliott i Dewailly (1995) dokonali podziału ekologicznego ichtiofauny, określając udział poszczególnych gatunków typowych dla środowiska słodkowodnego (57,0%), wód estuariowych (21,0%) oraz dwuśrodowiskowych (17,0%). Pozostałą, niewielką, liczbę gatunków reprezentują okazy młodociane (4,0%) oraz formy typowo morskie (1,0%), których obecność jest przypadkowa (Elliott i Hemingway 2002).

W estuariach efekt oscylacji zmian parametrów biotycznych i abiotycznych w istotny sposób wpływa na skład gatunkowy, rozmieszczenie i liczebność drobnoustrojów. W ekologii liczba gatunków i różnorodność gatunkowa są podstawą do charakterystyki biocenoz i ich części. Dlatego tak istotny jest dobór metod izolacji, hodowli i identyfikacji mikroorganizmu. Z uwagi na euryekologiczny charakter drożdży, zmienność fizjologiczną i ich zdolność przystosowania się do życia w zasiedlanych niszach ekologicznych zaistniał problem kwantyfikacji biologicznej grzybów jednokomórkowych. Sprecyzowana przez Convention on Biological Diversity bioróżnorodność jest „[...] zróżnicowaniem żywych organizmów pochodzących z różnorodnych środowisk, wewnątrznie odmiennych (*inter alie*), lądowego, morskiego i innych ekosystemów wodnych i ekologicznych kompleksów, których te organizmy są częścią” (Convention on Biological Diversity 1992, [www.biodiv.org/convention/articles.asp](http://www.biodiv.org/convention/articles.asp)).

Już sama definicja różnorodności biologicznej sugeruje, że prowadzenie badań o charakterze szczegółowym nie pozwala na wskazanie roli poszczególnych populacji w ekosystemie. Jedynie ich umiejętne powiązanie stworzy możliwość określenia zachowań mikroorganizmów i ich funkcji w środowisku.







## 2. Cel pracy

Estuaria jako obszary graniczne stają się miejscem procesów, w wyniku których na drodze ewolucji, adaptacji i selekcji mamy do czynienia ze zmiennością biologicznej różnorodności. Zazwyczaj różnorodność rozważana jest w kontekście dwóch podstawowych aspektów życia – różnorodności i zmienności organizmów. Zapewnienie i podtrzymanie określonego zespołu organizmów i ich biocenozy warunkowane jest dynamiką zmian czynników fizykochemicznych ekosystemu. Istotne znaczenie ma to zwłaszcza w strefach wzajemnego oddziaływania wód śródlądowych i morskich, za jakie uznane zostały estuaria. Specyfika tych środowisk wskazuje na konieczność poszukiwania ewentualnych zależności pomiędzy profilami genetycznym, taksonomicznym i siedliskowym jako podstawowymi do rozważań dotyczących funkcjonowania poszczególnych grup organizmów w ekosystemie.

W związku z powyższym wyznaczono w niniejszej pracy następujące zadania badawcze, jakimi były:

- 1) określenie bogactwa gatunkowego drożdży w wodach i ichtiofaunie estuarium Odry;
- 2) ocena stopnia zróżnicowania wewnątrzgatunkowego oznaczonych grzybów umożliwiającą wskazanie pochodzenia szczepów i ich specyficzności;
- 3) określenie formy przeżycia drożdży i tworzenia społeczności w środowisku estuariowym;
- 4) ustalenie oddziaływania drożdży na ikrę ryb.

Pozwoliło to na zrealizowanie celu niniejszej pracy, którym było określenie różnorodności wybranych społeczności drożdży i ich wpływ na rozwój ichtiofauny.



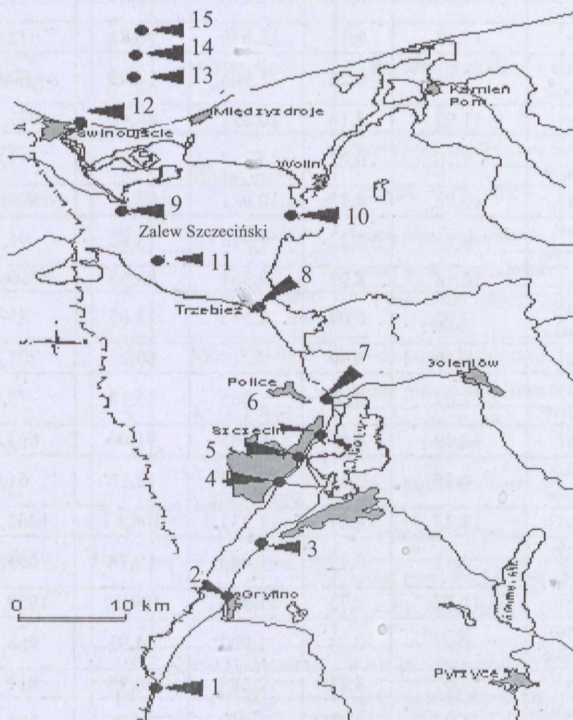




### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Charakterystyka obszaru badań

Obszar badań obejmował estuarium Odry (Odrę szczecińską, Roztokę Odrzańską z Zalewem Szczecińskim i Zatokę Pomorską), na którym wyznaczono 15 stacji badawczych (rys. 1).



Rys. 1. Rozmieszczenie stacji badawczych (1–15) na obszarze estuarium Odry

Stacje wyznaczone na podstawie wskaźników hydrochemicznych wód (tab. 4) oraz charakterystyki zlewni (Jurkowska i in. 2000, Bogusławska-Wąs i in. 2007).

Pierwszy punkt pobierania prób wyznaczono na wysokości wodowskazu Widuchowa, poniżej którego (ok. 2,0 km) rzeka Odra dzieli się na Odrę Wschodnią i Odrę Zachodnią. Ramię wschodnie rzeki niesie 76,0% ogółu wód, natomiast 24,0% przypada na jej część zachodnią. Oba ramiona rzeki tworzą obszar Międzyzdrza. Począwszy od kanału żeglownego Skońnica, poprzez który następuje wyrównanie przepływów pomiędzy głównymi ramionami rzeki, Odra Wschodnia przechodzi w Regalicę. Odra Zachodnia natomiast rozdziela się na Odrę Szczecińską, przepływającą przez Szczecin, i na Parnicę, która wraz z Regalicą uchodzi do przepływowego jeziora Dąbie. To właśnie ten 17,5-kilometrowy odcinek rzeki (od Kanału Kurowskiego do Inńskiego Nurta) jest odbiorcą około 70,0% ścieków z rejonu Szczecina. Po rozdzieleniu na dwa ramiona wody Odry ponownie łączą się i wpływają jednym nurtem (Inński Nurt) do Roztoki Od-



rzańskiej, a dalej – do Zalewu Szczecińskiego. Ostatnim etapem jest Zatoka Pomorska, z którą odrzańskie wody łączą się poprzez cieśniny: Świna, Dziwna i Piana (Buchholz 1991).

Tabela 4. Charakterystyka fizykochemiczna wody w estuarium Odry

Stacja badawcza	Numer stacji badawczej	Oznaczone parametry					
		wartość	temperatura [°C]	pH	tlen rozpuszczony [mg O <sub>2</sub> /l]	nasylenie tlenem [%]	przewodność [μS/cm]
Widuchowa	1	średnia	10,20	8,18	10,947	96,43	668,70
		odchylenie standardowe	7,78	0,27	1,816	11,06	91,01
Gryfino	2	średnia	11,53	8,10	10,686	96,81	672,20
		odchylenie standardowe	7,45	0,26	1,968	12,05	92,07
Odra Wschodnia	3	średnia	11,02	8,16	10,822	86,48	971,70
		odchylenie standardowe	7,10	0,22	1,8212	11,00	91,01
Most Cłowy	4	średnia	10,96	8,17	10,921	98,66	688,70
		odchylenie standardowe	8,25	0,23	1,916	13,62	91,16
Most Długi	5	średnia	10,58	8,03	9,361	83,55	719,20
		odchylenie standardowe	7,92	0,07	2,588	13,65	85,19
Urząd Morski w Szczecinie	6	średnia	10,53	8,00	9,210	80,25	705,20
		odchylenie standardowe	8,09	0,08	3,265	15,18	75,94
Police	7	średnia	10,49	8,09	10,285	91,05	693,60
		odchylenie standardowe	8,25	0,18	2,823	18,38	61,86
Trzebież	8	średnia	12,23	8,51	11,233	104,67	1303,17
		odchylenie standardowe	6,41	0,17	1,446	10,78	693,37
Kanał Piastowski	9	średnia	11,77	8,73	11,783	109,17	1959,17
		odchylenie standardowe	6,27	0,24	1,907	14,93	958,71
Dziwna	10	średnia	12,67	8,11	9,583	90,33	817,50
		odchylenie standardowe	6,47	0,25	1,887	13,98	197,39
WWE	11	średnia	12,55	8,21	11,120	102,22	1521,17
		odchylenie standardowe	6,22	0,20	1,880	14,02	720,33
Świnoujście	12	średnia	14,72	8,34	10,950	105,50	8367,50
		odchylenie standardowe	5,97	0,12	3,339	22,81	1323,11
0,5 mili	13	średnia	14,72	8,34	10,950	105,50	8367,50
		odchylenie standardowe	5,97	0,12	3,339	22,81	1323,11
1,5 mili	14	średnia	14,87	8,59	10,825	103,25	7415,00
		odchylenie standardowe	6,20	0,24	2,786	14,57	1220,78
3,0 mile	15	średnia	15,05	8,61	10,800	106,25	7927,50
		odchylenie standardowe	6,13	0,24	2,165	13,10	2113,11



### 3.2. Analizy mikrobiologiczne

#### Analiza ogólnej liczby drożdży w próbach wody

Monitoring zmian liczebności drożdży prowadzono w latach 2001–2003. Próby pobierano raz w miesiącu. W przypadku Odry Szczecińskiej badania prowadzono od lutego do grudnia, natomiast w przypadku Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej materiał pobierano od kwietnia do października. Łącznie przeanalizowano 336 prób wody. Szczegółowe dane dotyczące liczby pobranych prób wody i ich pochodzenia podano w tab. 5.

Tabela 5. Rodzaj i liczba prób pobranych z wybranych stacji badawczych estuarium Odry

Rejon badawczy	Numer stacji badawczej	Nazwa stacji	Przedmiot analizy	Liczba prób wody / ryb	Okres badań
Cedyński Park Krajobrazowy	1	Widuchowa	woda powierzchniowa	30	II 2001 – XI 2003
			ryby: okoń, płoć	21 7	IV 2001 – X 2001 V 2003 – X 2003
Międzyodrze	2	Gryfino	woda powierzchniowa	30	II 2001 – XI 2003
	3	Odra Wschodnia	woda powierzchniowa ryby: okoń, płoć, leszcz	30 21 6	II 2001 – XI 2003 IV 2001 – X 2001 V 2003 – X 2003
Odra Szczecińska	4	Most Cłowy	woda powierzchniowa	30	II 2001 – XI 2003
	5	Most Długi	woda powierzchniowa	30	II 2001 – XI 2003
			ryby: okoń, płoć, leszcz	13 9	IV 2001 – X 2001 V 2003 – X 2003
	6	Urząd Morski w Szczecinie	woda powierzchniowa	30	II 2001 – XI 2003
	7	Police	ryby: okoń, płoć	21 15	IV 2001 – X 2001 V 2003 – X 2003
			woda powierzchniowa	21	IV 2001 – X 2003
	8	Trzebież	ryby: okoń, płoć, leszcz	17 9	IV 2001 – X 2001 V 2003 – X 2003
			woda powierzchniowa	21	IV 2001 – X 2003
	9	Kanał Piastowski	woda powierzchniowa	21	IV 2001 – X 2003
	10	Dziwna	woda powierzchniowa	21	IV 2001 – X 2003
11	WWE	woda powierzchniowa	21	IV 2001 – X 2003	
Zatoka Pomorska	12	Świnoujście	woda powierzchniowa	18	V 2001 – X 2003
	13	0,5 mili	woda powierzchniowa	18	V 2001 – X 2003
	14	1,5 mili	woda powierzchniowa	18	V 2001 – X 2003
	15	3,0 mile	woda powierzchniowa	18	V 2001 – X 2003
Razem		woda powierzchniowa ryby	336 139		

Próby pobierano zgodnie z zaleceniami akredytowanego laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska w Szczecinie. Analiza ogólnej liczby drożdży w wodzie wykonana została na podstawie Bogusławskiej-Wąs i Dąbrowskiego (2001). Hodowlę grzybów prowadzono przez 3–5 dni na podłożu YM Agar (0,3% – yeast ekstrakt, 0,3% – malt ekstrakt, 0,5% – pepton, 1,0% – glukoza, 2,0% – agar; Difco, USA) z dodatkiem chloramfenikolu (Interforum Pharma, Polska), przy pH 4,5, w temperaturze 20°C.



Ogólną liczbę drożdży, liczoną w jednostkach tworzących kolonię (jtk), ustalano na podstawie wyrosłych na filtrach membranowych kolonii, według wzoru:

$$\text{jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1} = (a \cdot 100) / v$$

gdzie:

$a$  – liczba zliczonych kolonii,

$v$  – objętość przefiltrowanej próbki [ml].

Na podstawie charakterystyki morfologicznej oraz cech biochemicznych wyizolowanych kolonii ustalono wstępną przynależność taksonomiczną drożdży. Wyizolowane szczepy przeznaczone do dalszych badań laboratoryjnych przechowywano w formie zamrożonej.

### **Analiza ogólnej liczby drożdży w próbach pochodzących od ryb i z ikry**

Ryby przeznaczone do badań – leszcz (*Abramis brama* Linnaeus, 1758), płóc (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758) i okoń (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) – pozyskiwano od wędkarzy. Łącznie analizie mikrobiologicznej poddano 139 osobników wyżej wymienionych gatunków. Szczegółowe dane dotyczące pobranych ryb i ich pochodzenie podano w tab. 5. Ikra przeznaczona do badań pochodziła od troci wędrowniej (*Salmo trutta trutta* m. *trutta* Linnaeus, 1758) i okonia. Do mykologicznej analizy ikry wykorzystano jaja pochodzące z naturalnych miejsc tarłowych ryb oraz pobrane od tarlaków w warunkach laboratoryjnych. Łącznie analizie poddano 36 prób ikry.

W celu ustalenia liczby drożdży na ikrze oraz w śluzie i przewodzie pokarmowym ryb wykorzystano technikę namnażania na podłożu SDA – Sabouraud Dextrose Agar (0,5% – yeast ekstrakt, 2,0% – glukoza, 2,0% – agar; Scharlau, Hiszpania) z dodatkiem chloramfenikolu (Interforum Pharma, Polska), przy pH 4,5. Inkubację prowadzono w temperaturze 20°C, przez 3–5 dni. Schemat postępowania metodycznego przyjęto na podstawie wcześniejszego opracowania (Bogusławska-Wąs i in. 2007). Z powierzchni ryb pobierano jałowo śluz, który worteksowano w soli fizjologicznej, zachowując każdorazowo proporcję 1 : 9. W przypadku analiz mikrobiologicznych ikry jaja trzykrotnie przemywano w soli fizjologicznej, a następnie postępowano jak w przypadku prób ze śluzem. W celu ustalenia mykobioty przewodu pokarmowego, po uprzednim sprawdzeniu obecności treści pokarmowej, wyreparowany materiał rozcierano w moździerz w dodatkiem piasku. Dla wszystkich prób wykonywano kolejne rozcieńczenia dziesiętne.

### **Analiza bakteriologiczna prób wody**

W celu ustalenia poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego wody w estuarium Odry oznaczano obecność drobnoustrojów wskaźnikowych, zgodnie z PN-77 C-04615.

### **Identyfikacja biochemiczna drożdży**

Wstępna identyfikacja drożdży wyrosłych na podłożach hodowlanych wykonana została na podstawie ich cech makro- i mikroskopowych (morfologii kolonii, kształtu komórki i typu pączkowania, zdolności do tworzenia strzępek lub pseudostrzępek). W celu ustalenia profilu biochemicznego wyizolowanych grzybów zastosowano testy API ID 32C i 20 AUX (BioMerieux, Francja) oraz test DBB. W celu uzupełnienia charakterystyki fizjologicznej drożdży z rodzaju *Cryptococcus* i *Rhodotorula* wykonano również testy temperaturowe. Hodowle prowadzono metodą namnażania płytkowego na podłożu SDA (Scharlau, Hiszpania) w temperaturze: 6, 20 i 37°C.

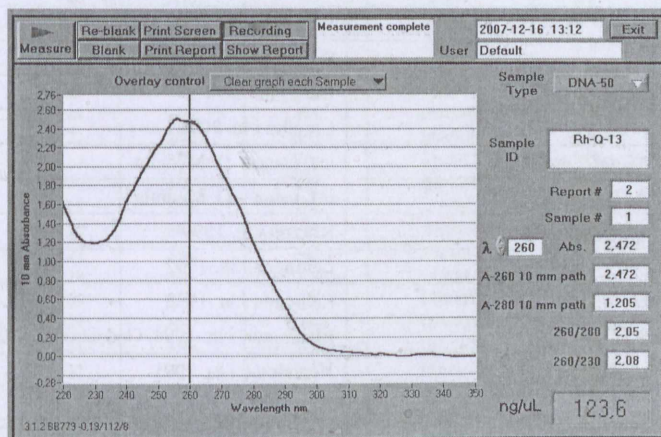


### 3.3. Analizy genetyczne

#### Ekstrakcja DNA

Wyniki identyfikacji biochemicznej drożdży z rodzaju *Cryptococcus* i *Rhodotorula* potwierdzono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (ang. *polymerase chain reaction*).

Szczepki drożdży przeznaczone do analizy genetycznej namnażano na podłożu YPD (1,0% – wyciąg drożdżowy, 2,0% – pepton, 2,0% – glukoza; Scharlau, Hiszpania) przez 24 godziny. DNA genomowy izolowano zgodnie z protokołem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy) z zastosowaniem litykazy (Sigma-Aldrich, USA). Efektywność izolacji oceniano spektrofotometrycznie za pomocą spektrofotometru ND-1000 (ThermoScientific NanoDrop, USA). Uzyskane wyniki interpretowano na podstawie stosunku wartości absorbancji  $A_{260}/A_{280}$  oraz ilości wyizolowanego DNA oznaczanego w  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (Słomski 2008), co było podstawą standaryzacji metody (rys. 2). Uzyskany supernatant przechowywano w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$  do czasu wykonania następných analiz.



Rys. 2. Przykładowe widmo absorpcji DNA w świetle UV. Wykres widma uzyskany dla *Rh. mucilaginosa*

#### Identyfikacja taksonomiczna drożdży metodą PCR

Przedmiotem identyfikacji był DNA genomowy różnych szczepów drożdży wyizolowanych z estuarium Odry oraz szczepów wzorcowych zakupionych z kolekcji DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Niemcy). Szczepki *Rh. mucilaginosa*, *Rh. glutinis* oraz *Cr. laurenti* amplifikowano przy zastosowaniu pary starterów o sekwencjach nukleotydów ITS 3(5'-gCATCgATgAAgAACgCagC) oraz ITS 4(5'-TCCTC-CgCTTATTgATATgC), zgodnie z White i in. (1990). Startery zostały zsyntetyzowane przez TIB MolBiol (Polska). Reakcję PCR prowadzono w 25  $\mu\text{L}$  mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 100mM Tris-HCl (pH 8,3 w  $25^\circ\text{C}$ ), bufor polimerazy Tag (A&A Biotechnology, Polska), 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,25U Tag DNA polimerazy (A&A Biotechnology, Polska) oraz po 25 pmol/ $\mu\text{L}$  każdego startera. Profil temperaturowy ustalono zgodnie z Casey i Dobson (2004): denaturacja –  $95^\circ\text{C}/5$  min przez 35 cykli, przyłączanie starterów –  $59^\circ\text{C}/1$  min (White i in. 1990), wydłużanie –  $72^\circ\text{C}/1$  min, finalne wydłużanie –  $72^\circ\text{C}/10$  min. Reakcję przeprowadzono w aparacie LightCycler 480 II (Roche, USA). Produkty amplifikacji były rozdzielane elektroforetycznie w 1,2-procentowym żelu agarozowym (Prona Agarose Plus, Pol-



ska) barwionym wewnątrznie bromkiem etydyny (0,5µL/mL) (Bio-Rad, USA). Uzyskane wyniki wizualizowano w świetle UV w aparacie GelDoc (Bio-Rad, USA) i archiwizowano przy zastosowaniu programu Quantity One (Bio-Rad, USA).

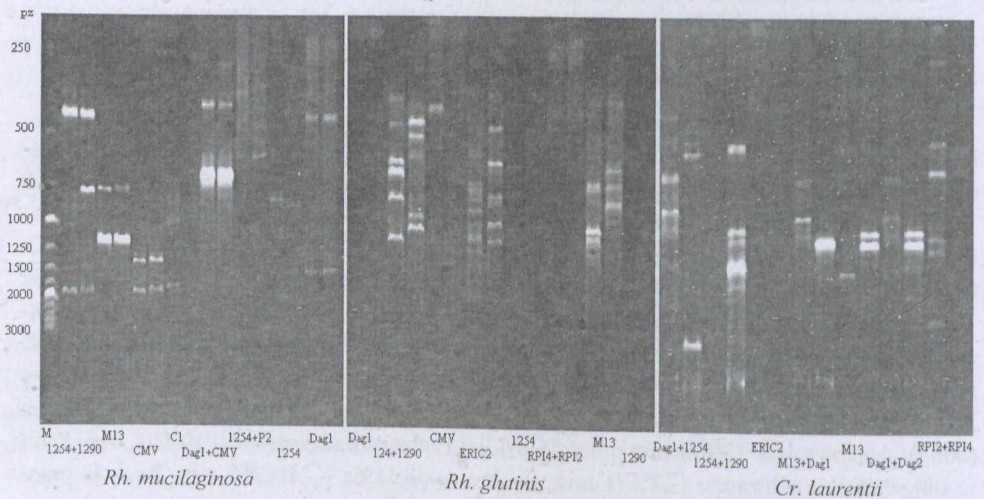
### Genotypowanie szczepów drożdży

Typowanie genetyczne przeprowadzono techniką RAPD-PCR (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*), zgodnie z Casey i Dobson (2004). Jej zastosowanie umożliwiło analizę molekularną szczepów o bardzo niskim stopniu zróżnicowania genetycznego (Welsh i McClelland 1990). Przydatność i możliwości dyskryminacyjne metody określono, wykorzystując kombinację par starterów (TIB MolBiol, Polska) zestawionych w tab. 6.

Tabela 6. Charakterystyka starterów uwzględnionych w typowaniu wewnątrzgatunkowym szczepów drożdży

Starter	Sekwencja 5'-3'	Referencje
P 2	gCTCgTCgTT	Baleiras Couto i in. 1994
P 1	gTggTggTg	Senses-Ergul i in. 2006
1254	CCg CAg CCA A	Berg i in. 1994
1290	gTg gAT gCg A	Carvalho i in. 2001
Dag 1	CgAATCTAACggCTggCACA	inf. ustna – D. Mędrala
Dag 2	gCCCAAATAgTgTCACCgCT	inf. ustna – D. Mędrala
CMV 2	ggTAgCACCGCgggTTTCgAC	Korzon i in. 1999
RPI 4	TAggATCAg A	Lehmann i in. 1992
RPI 2	AAggATCAgA	Lehmann i in. 1992
M13	gAgggTggCggTTCT	Elaichouni i in. 1994, Gadanho i in. 2003
ERIK 2	AAgTAAgTgACTggggTgAgCg	Versalovic i in. 1991

Podstawowym kryterium wyboru starterów wykorzystywanych w dalszych oznaczeniach była czytelność rozdziału elektroforetycznego oraz liczba uzyskanych amplifikonów (rys. 3).



Rys. 3. Przykładowe profile genetyczne szczepów drożdży uzyskane w różnych kombinacjach starterów. Jako wzorec masowy DNA (M) wykorzystano marker XVI (Roche, USA)



Tabela 7. Typy genetyczne drożdży wyizolowane z badanych stref estuarium Odra

Strefa estuarium	Lp.	Oznaczenie szczepu <i>Cr. laurenti</i>	Typ genetyczny	Oznaczenie szczepu <i>Rh. mucilaginosa</i>	Typ genetyczny	Oznaczenie szczepu <i>Rh. glutinis</i>	Typ genetyczny
	1	1/10	I/A	1/14	I/A	1/6	I/A-IU
	2	1/11	I/A	8A/597	I/A	9A/536	I/A-2
	3	12A/13	IB	8A/598	I/A	9A/537	I/A-2
	4	12A/14	IB	4A/18	II/A-3	1/12	I/B-1
	5	12A/18	IB	8A/592	II/A-3	8A/595	I/B-1
	6	1/12	IIA	8A/593	II/A-3	1/3	I/B-1
	7	1/D	II/B	8A/589	II/A-3	3A/57	I/B-1
	8	1/E	II/B	8A/591	II/A-3	3A/59	I/B-1
	9	1/14	II/C	8A/596	II/A-3	14A/620	I/B-3
	10	1/A	II/C	4A/187A	II/B-1	3A/56	I/B-3
	11	1/B	II/C	5A/337A	II/B-1	14A/622	I/B-3
	12	1/6	II/B	6A/315	II/B-1	3A/58	I/B-3
	13	1/7	II/C	11A/545	II/B-1	3A/69	I/B-4
	14	1/8	II/B	12A/567	II/B-1	3A/73	I/B-4
	15	1/9	II/C	7A/500	II/B-1	3A/70	I/B-4
	16	2/15	IV	3A/74	II/B-1	3A/66	I/B-5
	17	2/16	V/A	4A/150A	II/B-1	6A/309	I/B-6
	18	2/17	V/A	6A/308	II/B-2	9A/538	I/B-6
	19	2/19	II/C	6A/311	II/B-2	6A/314	I/B-6
	20	2/21	IV	4A/77	II/B-2	9A/534	I/B-6
	21	2/23	V/A	14A/609	II/B-3	4A/150A	II/A-2
	22	2/27	II/C	14A/610	II/B-3	4A/51	II/A-2
	23	3/36	V/B	14A/611	II/B-3	4A/76	II/A-3
	24	3/37	V/B	5A/337	II/B-3	4A/F	II/A-3
	25	3/39	V/A	3A/68	II/C-1	2A/52	II/B-2
	26	3/41	II/D	3A/305	II/C-1	2A/54	II/B-2
	27	3/42	II/D	9A/540	II/C-1	2A/55	II/B-2
	28	3/44	V/A	4A/51	II/C-1	2A/46	II/B-2
	29	3/46	II/C	10A/522	III/A-1	2A/53	II/B-2
Odra	30	3/47	II/B-2	10A/531	III/A-1		
	31	4/48	V/E	10A/525	III/A-1		
	32	4/50	II/C	10A/527	III/A-1		
	33	4/53	V/E	10A/526	III/A-1		
	34	4/54	V/E	12A/568	III/B-1		
	35	4/56	V/E	7A/501	III/B-1		
	36	4/59	II/B	12A/570	III/C-1		
	37	4/63	II/C	12A/573	III/C-1		
	38	4/64	V/E	7A/506	III/C-1		
	39	7/220	V/A	12A/574	III/C-1		
	40	9/253	II/C	7A/507	III/C-1		
	41	9A/253	II/C	12A/576	III/C-1		
	42	10/270	II/C	7A/503	III/C-1		
	43	5/104	III/C	4A/150	U		
	44	5/115	III/C	4A/G	U		
	45	5/114	III/C	5A/330	U		
	46	3/17	II/C	10A/520	IV/A-1		
	47	1A/502	II/C	10A/528	IV/A-1		
	48	1C/301	II/C	10A/521	IV/A-1		
	49	1C/308	II/C	10A/523	IV/A-2		
	50	1C/302	II/U	10A/524	IV/A-2		
	51	12A/3	III/A	10A/529	IV/A-2		
	52	12A/4	III/A	11A/547	V/A-1		
	53	1C/313	V/A	11A/555	V/A-1		
	54	1C/314	V/A	11A/548	V/A-1		
	55	1A/508	V/A	11A/549	V/A-1		
	56	1C/306	V/A	11A/554	V/A-1		
	57			7A/502	V/A-2		
	58			7A/508	V/A-3		
	59			11A/556	U		



cd. tab. 7

Strefa estuarium	Lp.	Oznaczenie szczepu <i>Cr. laurenti</i>	Typ genetyczny	Oznaczenie szczepu <i>Rh. mucilaginoso</i>	Typ genetyczny	Oznaczenie szczepu <i>Rh. glutinis</i>	Typ genetyczny
Zalew Szczeciński	1	1/C	II/C	1/17	II/A-1	13A/562	I/A-2
	2	1C/311	V/F	8A/599	II/A-1	14A/621	I/A-2
	3	1/13	II/A	13A/566	II/A-1	14A/623	I/A-2
	4	2/28	II/C	8A/587	II/A-1	6A/312	I/A-2
	5	2/33	II/C	4A/B	II/A-3	6A/319	I/A-2
	6	6/200	II/C	4A/A	II/A-3	9A/535	I/A-2
	7	6/208	II/C	4A/C	II/A-3	3A/72	I/B-1
	8	6/209	II/C	1/2	II/B-1	8A/588	I/B-1
	9	6/210	II/C	14A/607	II/B-1	14A/618	I/B-1
	10	6/211	II/C	8A/586	II/B-1	3A/62	I/B-1
	11	6/212	II/C	4A/D	II/B-1	5A/224	I/B-1
	12	6/213	II/C	13A/560	II/B-1	1/4	I/B-2
	13	6/215	II/C	9A/542	II/B-2	1/9	I/B-2
	14	7/216	II/C	6A/208	II/B-2	1/5	I/B-2
	15	7/217	II/C	9A/539	II/B-2	1/7	I/B-2
	16	4A/50	V/E	5A/322A	II/B-2	14A/624	I/B-2
	17	1C/312	V/F	9A/541	II/B-2	1/13	II/A-1
	18	4/57	II/D	14A/613	II/C-1	3A/60	II/A-1
	19	4/61	II/D	8A/606	II/U	8A/594	II/A-3
	20	4/58	V/E	7A/514	III/B-1	9A/540	II/A-3
	21	4/65	V/E	12A/571	III/B-2	2A/40	II/B-1
	22	4/62	V/E	12A/581	III/B-2		
	23	6/206	V/G	7A/504	III/B-2		
	24	5/113	V/E	12A/572	III/B-3		
	25	2/20	V/D	7A/505	III/B-3		
	26	3/38	V/A	12A/580	III/B-3		
	27	5/101	III/B	7A/513	III/B-3		
	28	5/103	III/B	11A/553	V/A-2		
	29	5/107	III/B	12A/583	V/B-1		
	30	5/106	III/B	7A/516	V/B-1		
	31	5/105	III/B	12A/582	V/C-1		
	32	5/102	III/C				
	33	5/110	III/C				
	34	5/108	III/B				
	35	5/112	III/B				
	36	5/118	III/B				
	37	5/116	V/G				
	38	5/117	V/G				
	39	5/100	II/C				
	40	1A/512	II/C				
	41	1C/303	II/C				
	42	1C/307	V/C				
Zatoka Pomorska	1	3/40	V/D	9A/533	II/B-1	6A/190	I/B-5
	2	3/45	V/D	10A/519	II/B-1	9A/544	I/B-6
	3	6/204	V/D	13A/558	II/B-1	13A/559	U
	4	1A/511	V/C	14A/608	II/B-2	8A/604	I/C-1
	5	1A/513	V/C	6A/196	II/B-2	8A/605	I/C-1
	6	1C/307	V/C	14A/612	II/B-2	4A/G	II/A-1U
	7	1C/310	V/C	4A/E	II/C-1		
	8			6A/193	III/A-1U		
	9			9A/543	III/A-1U		
	10			7A/511	III/B-1		
	11			7A/514	III/B-1		
	12			12A/584	V/A-2		
Ryba	1	1/12	II/A	2A/37	II/B-1	1/10	I/A-1
	2	2/22	V/A	4A/87	II/C-1	1/11	I/A-1
	3	2/25	II/B	7A/517	V/A-2	1/8	I/A-1
	4	2/26	II/C	12A/569	V/A-2	8A/590	I/B-1
	5	2/32	V/A	12A/575	V/A-3	14A/614	I/B-3
	6	3/34	V/B	7A/515	V/C-1	2A/41	II/B-1
	7	3/35	V/D			2A/42	II/B-1
	8	4/52	V/E			2A/43M	II/B-1
	9	10/271	II/A			2A/43	II/B-1
	10	10/272	II/A			2A/45	II/B-1
	11	1A/505	V/A			2A/47	II/B-1
	12					2A/48	II/B-1
	13					2A/43Y	II/B-2



W celu przeprowadzenia różnicowania gatunkowego *Rh. mucilaginosa* zastosowano startery 1254 i 1290, w identyfikacji *Rh. glutinis* – ERIK2, natomiast w przypadku *Cr. laurenti* – 1254 i DAG-1. W celu uzyskania złożonych i stabilnych profili amplifikacji zastosowano schemat szyku ortogonalnego zaproponowany przez Taguchi i Wu (1980), zmodyfikowany przez Cobb i Clarkson (1994). Reakcję RAPD-PCR prowadzono w 25  $\mu$ L mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (przy pH 8,3, w 25°C), 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM dNTP, po 20 pmol/ $\mu$ L każdego startera, 1U Taq DNA polimerazy (Eppendorf, Niemcy) i 20 ng matrycy DNA w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf, Niemcy). Profil termiczny ustalano zgodnie z zaleceniami Casey i Dobson (2004).

Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 2-procentowym żelu agarozowym (Prona Agarose Plus, Polska) barwionym wewnątrznie bromkiem etydyny – 0,5  $\mu$ L/mL (Bio-Rad, USA). Wyniki rozdziału elektroforetycznego wizualizowano w promieniach UV w aparacie GelDoc (Bio-Rad, USA) i archiwizowano, korzystając z programu Quantity One (Bio-Rad, USA). Stopień pokrewieństwa szczepów określono na podstawie analizy klastrowej uzyskanych profili amplifikacji (RAPD) – metodą UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) w oprogramowaniu Bio-Gene (Vilber-Lourmat, Francja). Wyniki analizy zostały zobrazowane w postaci dendrogramu przy współczynniku Dice wynoszącym 3,0%. Wartości współczynnika obliczano na podstawie wzoru:

$$D = \frac{2N_{ab}}{(2N_{ab} + N_a + N_b)}$$

gdzie:

$N_{ab}$  – liczba produktów wspólnych dla obu profili,

$N_a$  i  $N_b$  – liczba produktów w poszczególnych profilach.

Stopień pokrewieństwa pomiędzy poszczególnymi szczepami *Rhodotorula* spp. oraz *Cryptococcus* spp. określano na podstawie podobieństwa uzyskanych profili genetycznych RAPD szczepów. W interpretacji wyników wykorzystano przyjęty przez Tenover i in. (1995) podział, uwzględniający procentową zgodność wzorów genetycznych uzyskanych techniką RAPD. Przyjęto, że przy wskaźniku  $S > 75,0\%$  szczepy są blisko spokrewnione, przy  $75,0\% > S > 50,0\%$  – prawdopodobnie spokrewnione, a przy  $S < 50,0\%$  – niespokrewnione. Zawarte w tab. 7 zestawienie obejmuje pochodzenie szczepów oraz ich genotyp wyznaczony na podstawie uzyskanego dendrogramu.

### 3.4. Analizy spektrofotometryczne

#### Hodowle

Jako podłoża hodowlane stosowano wodę z poszczególnych stref estuarium Odry – z Wioduchowej (Wid.), Urzędu Morskiego w Szczecinie (UMS) i Zatoki Pomorskiej (ZP) oraz podłoże YNB (wyciąg drożdżowy – 0,3%, malt ekstrakt – 0,3%, pepton – 0,5%, glukoza – 1,0%; Difco, USA). Wszystkie podłoża sterylizowano metodą fizyczną przy użyciu filtrów membranowych o średnicy 0,22  $\mu$ m (Millipore, USA).

#### Badane gatunki drożdży

Materiałem badawczym były: *Rh. mucilaginosa* i *Rh. glutinis* oraz *Cr. laurenti*. Testowane szczepy w obrębie gatunku różniły się profilem genetycznym oraz miejscem izolacji (zob. tab. 9).

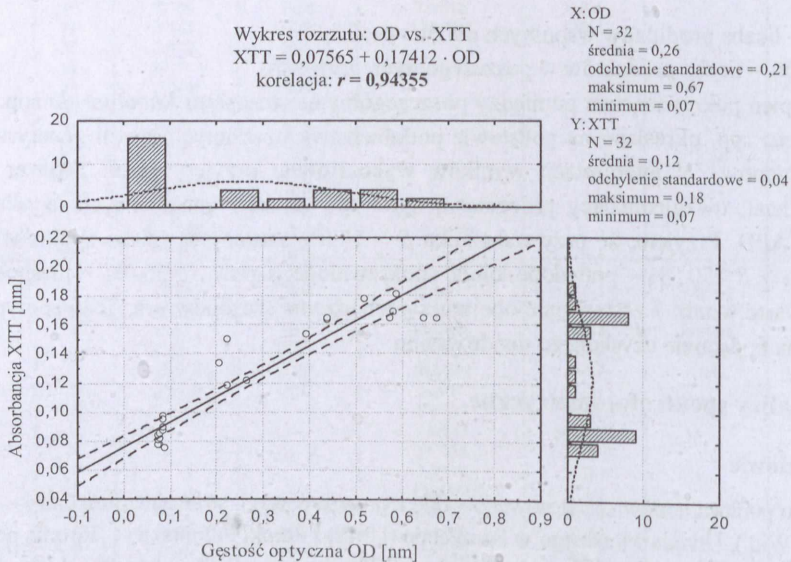


W celu przygotowania wyjściowego inokulum drożdży namnażano na podłożu YPD agar (wyciąg drożdżowy – 1,0%, pepton – 2,0%, glukoza – 2,0%, agar – 2,0%; OXOID, Anglia), przez 48 godzin, w temperaturze 22°C. Po inkubacji wyrosłe kolonie zawieszano w jałowym zbuforowanym roztworze soli fosforanowej PBS (Biomed, Polska). Wystandaryzowaną zawiesinę komórek (3 w skali McFarlanda) przemywano 3-krotnie i wirowano, przy 10 000 obrotów, przez 10 minut (MPW-52, Polska). Powstały osad zawieszano w podłożach hodowlanych – Wid., UMS, ZP oraz YNB. Tak przygotowane szczepy drożdży wykorzystywano do dalszych oznaczeń.

### Ocena przeżywalności i formy wzrostu drożdży w środowisku wodnym

Zdolność przeżycia testowanych szczepów drożdży oceniano kolorymetrycznie z wykorzystaniem wodorotlenku tetrazoliny XTT (sodium 3,3,-[(phenylamino)carbonyl]-3,4-tetrazolium-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate; Sigma-Aldrich, USA).

W celu oznaczenia zależności pomiędzy rzeczywistą liczbą komórek a wskaźnikiem ich aktywności oddechowej przeprowadzono doświadczenie wstępne na podłożu YNB. Monitoring zmian w czasie doświadczenia oparto na kontroli wartości gęstości optycznej komórek (OD) oraz tempa redukcji XTT jako wskaźnika aktywności oddechowej. Zestawienie uzyskanych parametrów pozwoliło na wyznaczenie istotnej korelacji ( $r = 0,9435$ ) pomiędzy przyjętymi wskaźnikami (rys. 4). Poza ustaloną zależnością wzrostu liczby komórek (OD), kontrolowanych spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 550$  nm, której towarzyszył wzrost wartości pomiaru formazanu tetrazoliny, przy  $\lambda = 490$  nm (Nanodrop ThermoScientific, USA), wyznaczono stopień zbieżności istotnych statystycznie zmian w czasie dla wartości OD i XTT względem inokulum.



Rys. 4. Korelacja pomiędzy gęstością komórek (OD) a ich aktywnością oddechową (XTT) w czasie trwania doświadczenia. Czcionką pogrubioną wyróżniono wartości istotne statystycznie

W obu modelach badawczych (XTT i OD) istotność różnic oznaczono w 24. godzinie doświadczenia (tab. 8). Ustalone zależności pozwoliły na wykorzystanie opracowanej metody do oceny zdolności wzrostu w formie biofilmu i/lub planktonu określanego metodą redukcji XTT.



Tabela 8. Poziom istotności zmian w czasie w odniesieniu do wprowadzonego inokulum

Oznaczany wskaźnik	Czas inkubacji [h]						
	2	4	6	24*	48*	72*	96*
XTT	0,387379	0,061140	0,409491	0,000126	0,000138	0,000144	0,000147
OD	0,980563	0,983163	0,996140	0,018005	0,000138	0,000147	0,000144

\* Statystycznie istotne różnice.

Tabela 9. Charakterystyka hodowli drożdży w próbach kontrolowanych

Opis doświadczenia	Gatunek	Pochodzenie wody hodowlanej	Oznaczane środowisko	Genotyp
YNB YNB/p YNB/b	<i>Cr. laurenti</i>	odżywcze podłoże hodowlane	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IA-1/10 IB-12A/13 IIA-1/12
Wid. Wid./p Wid./b	<i>Cr. laurenti</i>	Widuchowa	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IIC-4/50 IIC-6/210 IID-4/57
UMS UMS/p UMS/b	<i>Cr. laurenti</i>	Urząd Morski w Szczecinie	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IIIC-5/104 IV-2/15 VC-1A/511
ZP ZP/p ZP/b	<i>Cr. laurenti</i>	Zatoka Pomorska	OD XTT planktonu XTT biofilmu	VD-3/35 VF-1C/311 VA-2/32
YNB YNB/p YNB/b	<i>Rh. mucilaginosa</i>	odżywcze podłoże hodowlane	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IA-1/114 IIA1-1/17 IIA4-8A/589
Wid. Wid./p Wid./b	<i>Rh. mucilaginosa</i>	Widuchowa	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IIB1-1/2 IIB2-6A/196 IIB4-3A/68
UMS UMS/p UMS/b	<i>Rh. mucilaginosa</i>	Urząd Morski w Szczecinie	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IIA1-10A/531 IIB1-7A/501 IIB2-7A/504 IIB3-7A/505
ZP ZP/p ZP/b	<i>Rh. mucilaginosa</i>	Zatoka Pomorska	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IVA-10A/520 VA1-11A/548 VIA-7A/515
YNB YNB/p YNB/b	<i>Rh. glutinis</i>	odżywcze podłoże hodowlane	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IA-1/11 IA-6A/312 IB-3A/57
Wid. Wid./p Wid./b	<i>Rh. glutinis</i>	Widuchowa	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IB-3A/58 IB-3A/66 IC-8A/604
UMS UMS/p UMS/b	<i>Rh. glutinis</i>	Urząd Morski w Szczecinie	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IIA-1/13 IIA-4A/F IIA-4A/51
ZP ZP/p ZP/b	<i>Rh. glutinis</i>	Zatoka Pomorska	OD XTT planktonu XTT biofilmu	IIB-2A/42 IIB-2A/52

p – plankton, b – biofilm, YNB – podłoże odżywcze, Wid. – Widuchowa, UMS – Urząd Morski w Szczecinie, ZP – Zatoka Pomorska.

W celu zrealizowania założeń doświadczenia zastosowano mieszaninę: wodorotlenku te-trazoliny XTT, menadionu (witamina K<sub>3</sub> – 2-methyl-1,4-naphthoquinone; Sigma-Aldrich, USA) i PBS (Jin i in. 2004). Przyjętą metodę zmodyfikowano, przyjmując ostateczną objętość składo-



wych mieszaniny: 1580  $\mu\text{L}$  PBS, 200  $\mu\text{L}$  XTT i 20  $\mu\text{L}$   $\text{K}_3$ . Doświadczenie prowadzono w systemie mikropłytkowym – 96-dółkowym (Sarstedt, Anglia). Do każdego z dołków wprowadzono po 100  $\mu\text{L}$  poszczególnych hodowli. Opis doświadczenia zawarto w tab. 9.

Kontrolę formowania biofilmu i/lub wzrostu planktonowego prowadzono co 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 i 120 godzin w temperaturze 10°C (średnia temperatura wody w badanym estuarium). W przypadku tworzenia formy planktonowej przez komórki drożdży z poszczególnych wariantów hodowli przenoszono całą objętość wprowadzonego inokulum (100  $\mu\text{L}$ ) do jałowych probówek typu eppendorf (Eppendorf, Niemcy). W odzyskanej hodowli sprawdzano gęstość optyczną komórek (OD). Pomiary OD przeprowadzono za pomocą spektrofotometru Nanodrop ND-1000, przy długości fali  $\lambda = 550$  nm, zgodnie z procedurą podaną przez producenta (Nanodrop ThermoScientific, USA). Uzyskane wyniki interpretowano na podstawie programu UV-Vis firmy Eppendorf (Niemcy). W kolejnym etapie (ocenie aktywności oddechowej komórek) do 100  $\mu\text{L}$  hodowli dodano 100  $\mu\text{L}$  mieszaniny XTT +  $\text{K}_3$ ; całość inkubowano przez 2 godziny w 20°C. Następnie próby odwirowywano, przy 10 000 obrotów, przez 10 min (MPW-52, Polska). Uzyskany supernatant przenoszono do nowych mikropłytek (Sarstedt, Anglia) i wykonywano pomiar w ośmiokanałowym czytniku absorbancji Elx808 (BioTek Instruments), przy długości fali  $\lambda = 490$  nm (Antachopoulos i in. 2006).

W przypadku kontroli zmian zachodzących w biofilmie wykorzystano pozostały w mikropłytkach materiał badawczy, zaadherowany do powierzchni dna. Aktywność oddechową komórek w biofilmie testowano metodą redukcji XTT, opisaną przez Ramage i in. (2001), w modyfikacji własnej. Zmiany zachodzące w hodowli wyznaczano na podstawie pomiarów ekstynkcji, przy zachowaniu parametrów i urządzeń wskazanych w analizie form planktonowych.

### 3.5. Ikra jako środowisko rozwoju drożdży

#### Ikra

Ikra pochodziła od pięciu samic każdego gatunku ryb – okonia (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) oraz troci wędrowej (*Salmo trutta trutta m. trutta* Linnaeus, 1758). Jaja wyciskano w laboratorium i zapładniano mleczem pochodzącym od pięciu samców każdego gatunku. Analizie poddano również ikrę pobraną z naturalnych miejsc tarłowych. Pozyskana ikra była poddawana badaniu mikrobiologicznemu oraz wykorzystywana w następnych doświadczeniach.

#### Zdolność drożdży do kolonizacji powierzchni ikry

Hodowle badawcze ikry okonia oraz troci wędrowej prowadzone były w 24-dółkowych mikropłytkach (Sarstedt, Niemcy), zgodnie z Nakata i in. (2004), lub w krystalizatorach. W każdym dołku umieszczano zapłodnione jaja poszczególnych gatunków ryb i zalewano wodą hodowlaną pobraną z obszaru połowu tarlaków. W doświadczeniu wykorzystano różne genotypy szczepów *Rh. glutinis*, *Rh. mucilaginosa* oraz *Cr. laurenti*. Do szalek hodowlanych wprowadzono przygotowane (jw.) inokulum 48-godzinnej hodowli testowanych przedstawicieli grzybów jednokomórkowych. Warunki hodowli dostosowano do wymagań wylęgu poszczególnych gatunków ryb. W celu przeprowadzenia doświadczenia założono trzy warianty badawcze opisane w tab. 10. Podczas doświadczenia prowadzono stałą kontrolę jakości mikrobiologicznej inkubowanej ikry i środowiska zawieszającego (wody hodowlanej).



Tabela 10. Charakterystyka hodowli ikry w próbach kontrolowanych

Skład hodowli		Opis doświadczenia	Aktywność oddechowa społeczności mikrobiologicznej
gatunek ikry	szczep drożdży		
Okoń	<i>Rhodotorula</i> spp.	IOR <sub>h</sub>	XTT planktonu w wodzie hodowlanej XTT biofilmu ikry
Okoń	<i>Cryptococcus</i> spp.	IOCr	XTT planktonu w wodzie hodowlanej XTT biofilmu ikry
Okoń	brak inokulum drożdży	IOD <sup>-</sup>	XTT planktonu w wodzie hodowlanej XTT biofilmu ikry
Troć wędrowną	<i>Rhodotorula</i> spp.	ITR <sub>h</sub>	XTT planktonu w wodzie hodowlanej XTT biofilmu ikry
Troć wędrowną	<i>Cryptococcus</i> spp.	ITCr	XTT planktonu w wodzie hodowlanej XTT biofilmu ikry
Troć wędrowną	brak inokulum drożdży	ITD <sup>-</sup>	XTT planktonu w wodzie hodowlanej XTT biofilmu ikry

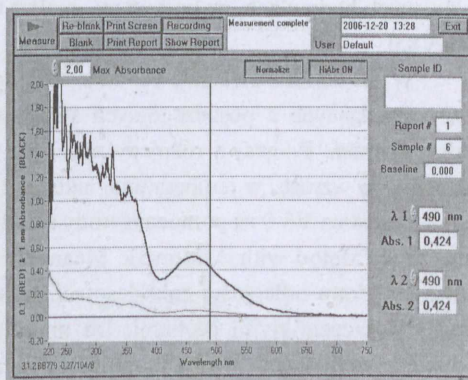
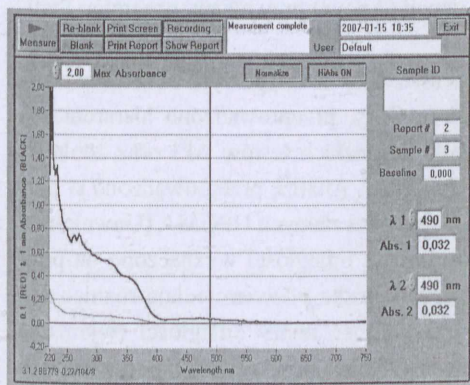
IO – ikra okonia, IT – ikra troci, R<sub>h</sub> – *Rhodotorula*, Cr – *Cryptococcus*, D<sup>-</sup> – próby bez drożdży.

### Metoda kolorymetryczna w analizie mikrobiologicznej ikry

W analizie spektrofotometrycznej wykorzystano mieszaninę XTT + K<sub>3</sub>, wykonaną zgodnie z procedurą podaną powyżej. Przygotowane do analiz jaja umieszczano w probówkach typu eppendorf, do których wprowadzano mieszaninę kolorymetryczną w objętości 200 µL. W przypadku analizy wody otaczającej ikrę (wody hodowlanej) próby preparowano w proporcji 1:1. Inkubację prowadzono bez dostępu światła przez 2 godziny. Aktywność oddechową komórek drożdży oceniano na podstawie pomiaru absorbancji w czytniku spektrofotometru Nanodrop ND-1000, przy długości fali  $\lambda = 490$  (Antachopoulos i in. 2006). Przykładowe rezultaty przedstawiono graficznie na rys. 5. Uzyskane wyniki korygowano o wartości uzyskane z prób nieinokulowanych drożdżami.

A – hodowla nieinokulowana drożdżami (ITD<sup>-</sup>):  
absorbancja = 0,032

B – hodowla inokulowana szczepami  
*Rhodotorula* (ITR<sub>h</sub>): absorbancja = 0,424



Rys. 5. Pomiar wartości absorbancji farmazanu tetrazoliny na powierzchni jaj

### Metody mikroskopii fluorescencyjnej

Kompozycję uformowania biofilmu na powierzchni jaj oraz w wodzie hodowlanej obserwowano w preparatach mikroskopowych wybarwianych barwnikami fluorescencyjnymi.



mi z zestawu LIVE/DEAD Yeast Viability Kit (Molecular Probes, USA). Przygotowanie stężeń wyjściowych (ang. *stock solution*) barwników wykonano zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Wizualizację biofilmu na materiale badawczym przeprowadzono, stosując 10  $\mu\text{L}$  FUN-1 i 25  $\mu\text{L}$  Calcofluor<sup>TM</sup> White M2R (Molecular Probes, USA) w 75  $\mu\text{L}$  HEPES *solution salt* (Sigma-Aldrich, USA). Obserwacje preparatów prowadzono w świetle mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Eclipse E400 z filtrami EX/BA 450–490/505–520 nm (Nikon, Japonia).

### 3.6. Analizy hydrochemiczne

#### Analiza zawartości biogenów w próbach wody

Podstawowe wskaźniki biogeniczne:  $N_{\text{org}}$ ,  $N_{\text{całk}}$ ,  $N\text{-NH}_4$ ,  $N\text{-NO}_2$ ,  $N\text{-NO}_3$  oraz  $P_{\text{całk}}$ ,  $P_{\text{całk org}}$ ,  $P_{\text{rozp całk}}$ ,  $P_{\text{rozp org}}$  zostały wykonane w laboratorium Zakładu Hydrochemii Akademii Rolniczej w Szczecinie (obecnie Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie), na podstawie Standard Methods (1995).

#### Podstawowe wskaźniki chemiczne wody

Pomiary temperatury, pH i przewodnictwo poszczególnych prób wody zostały wykonane za pomocą sondy LW 196 (WTW, Polska) w określonym miejscu i czasie pobierania prób mikrobiologicznych.

### 3.7. Analizy statystyczne

#### Statystyki podstawowe

Do interpretacji statystycznej uzyskanych wyników badań, obejmujących zróżnicowanie liczbowe drożdży w poszczególnych strefach estuarium oraz zmiany zachodzące w kontrolowanych hodowlach, wykorzystano analizę wariancji (Anova) przy użyciu programu Statistica V8.0.

W celu zobrazowania ewentualnych podobieństw cech fenotypowych szczepów drożdży, pochodzących z poszczególnych stref estuarium Odry, przeprowadzono hierarchiczną analizę skupień. Podstawą różnicowania były wyniki wszystkich testów API oraz zdolność szczepów do wzrostu w temperaturze inkubacji 6, 20 i 37°C. Analizę przeprowadzono w programie Statistica V8.0 za pomocą metody średnich połączeń ważonych UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), w której miarę odległości wyznaczono na podstawie kwadratu odległości euklidesowej. Utworzone skupiska odzwierciedlają różnice pomiędzy poszczególnymi cechami. Im mniejsza jest wartość miary odległości (wyrażona w procentach) między dwoma szczepami, tym mniejsza różnica, a większe ich podobieństwo pod względem analizowanych cech.

#### Analiza statystycznej różnorodności gatunkowej

Gatunkowe podobieństwo pomiędzy poszczególnymi strefami estuarium określono na podstawie wskaźnika Jaccarda ( $J_{i,j}$ ) i wzoru opisanego przez van Ooyena (2003):



$$JI_{ij} = \frac{n_{ab}}{(n_a + n_b - n_{ab})}$$

gdzie:

$n_{ab}$  – liczba gatunków występujących w próbach  $a$  i  $b$ ,

$n_a$  – liczba gatunków występujących w próbie  $a$ ,

$n_b$  – liczba gatunków występujących w próbie  $b$ .

W oznaczaniu bogactwa gatunkowego w poszczególnych strefach estuarium Odry wykorzystano wskaźnik Margalefa ( $d$ ) obliczony na podstawie wzoru:

$$d = \frac{S-1}{\ln N}$$

gdzie:

$S$  – liczba gatunków,

$N$  – całkowita liczba badanych organizmów.

Niniejsza praca jest wielowątkowym opracowaniem, którego wyniki mają wskazać na pewne zależności w holistycznym ujęciu ekologii drożdży. W celu uniknięcia odsyłania czytelnika do konkretnego rozdziału dyskusję wyników wraz z ich omówieniem przedstawiono w jednym rozdziale. Tworzą go wyodrębnione podrozdziały tematyczne, co ułatwi wnioskowanie i wykaże zasadność podjęcia kolejnych etapów badań, jak również wpłynie na przejrzystość pracy.



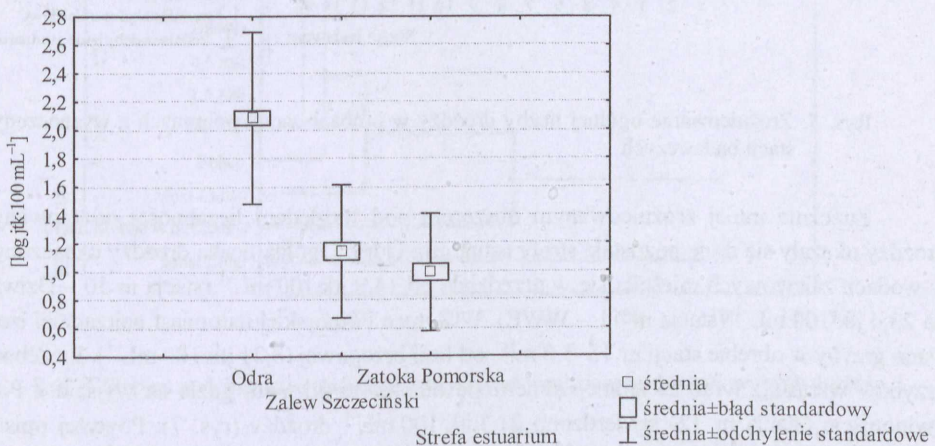




## 4. Omówienie i dyskusja wyników

### 4.1. Estuarium Odry jako siedlisko grzybów jednokomórkowych

Obecność drożdży w środowisku wodnym jest powszechna, a liczebność oznaczanych populacji jest zależna od rodzaju wód oraz ich czystości. W ekosystemach estuariowych kształtowanie liczebnej proporcji mikrobioty determinowane jest dodatkowo kilkoma czynnikami. Do najczęściej wymienianych należą odpływy (Almeida 2005), obecność warstwy halokliny bogatej w związki odżywcze (Hakanson 1991) i obszar spływu wód śródlądowych, w tym ścieków (Lazarus i Koburger 1974). Analiza ogólnej liczby drożdży w estuarium Odry, prowadzona w latach 2001–2003, wykazała jej istotne zróżnicowanie w poszczególnych strefach (rys. 6). W próbach pobranych z wód Odry grzybów jednokomórkowych było znacznie więcej niż w analitach z Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej (różnice wyznaczone na poziomie istotnym statystycznie wynosiły 0,000022, przy  $p < 0,05$ ).

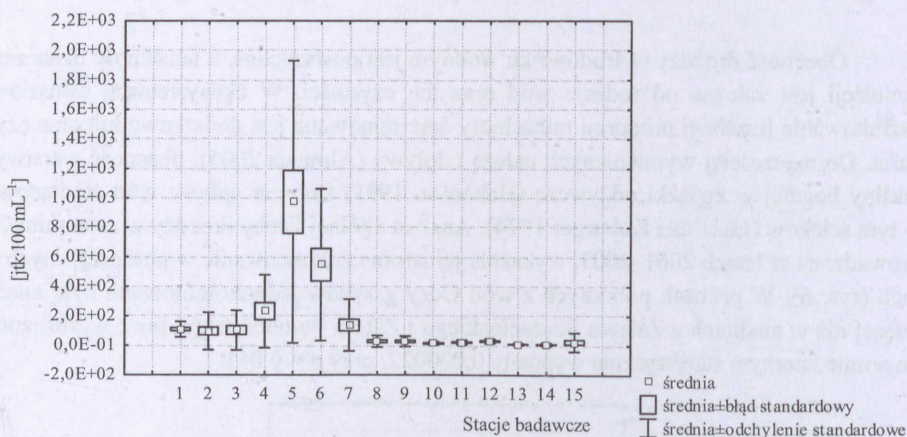


Rys. 6. Ogólna liczba drożdży izolowanych z poszczególnych stref estuarium. Istotność różnic wyznaczano przy istotnej analizie wariancji i współczynnika zgodności wynoszącym 0,45358

Pierwsze stanowisko badawcze (Widuchowa) znajdowało się 30 km powyżej Szczecina. Ewentualne źródła zanieczyszczenia wody na tej wysokości rzeki mogły pochodzić jedynie ze zrzutów oczyszczalni niemieckiego miasta Schwedt oraz ze spływów z łąk i pól. Niekontrolowane wylewy rolniczych ścieków przydomowych na pobliskie tereny uprawne mogą być przyczyną stosunkowo dużego zanieczyszczenia mykologicznego tego obszaru. Oznaczone średnie liczebności jednokomórkowych grzybów, począwszy od stacji Widuchowa (109,0 jtk·100 mL<sup>-1</sup>), przez Gryfino (86,2 jtk·100 mL<sup>-1</sup>), do Odry Wschodniej (103,6 jtk·100 mL<sup>-1</sup>), wskazują na wody już poddane działaniu antropogenicznemu. Jakość mikrobiologiczna wód zmieniała się wraz ze zmniejszaniem się odległości od Szczecina jako głównego źródła zanieczyszczenia tego odcinka rzeki (Bogusławska-Wąs i in. 2007). Mykocenotyczny obraz Odry szczecińskiej, wyznaczony przez sta-



cje: Most Cłowy ( $234,4 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ), Most Długi ( $973,7 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ), Urząd Morski w Szczecinie ( $545,7 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ) i Police ( $138,7 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ), wskazuje na zanieczyszczenie mykrobiologiczne typowe dla wód zeutrofizowanych (rys. 7). Uzyskane wyniki rozmieszczenia przestrzennego drożdży nie są zaskoczeniem. Wielokrotnie opisywany był już wpływ czynników antropogenicznych na intensywność rozwoju mykobioty (Slavikova i Vadkertiova 1997, Bogusławska-Wąs i Dąbrowski 1999, 2001, Libkind i in. 2003).

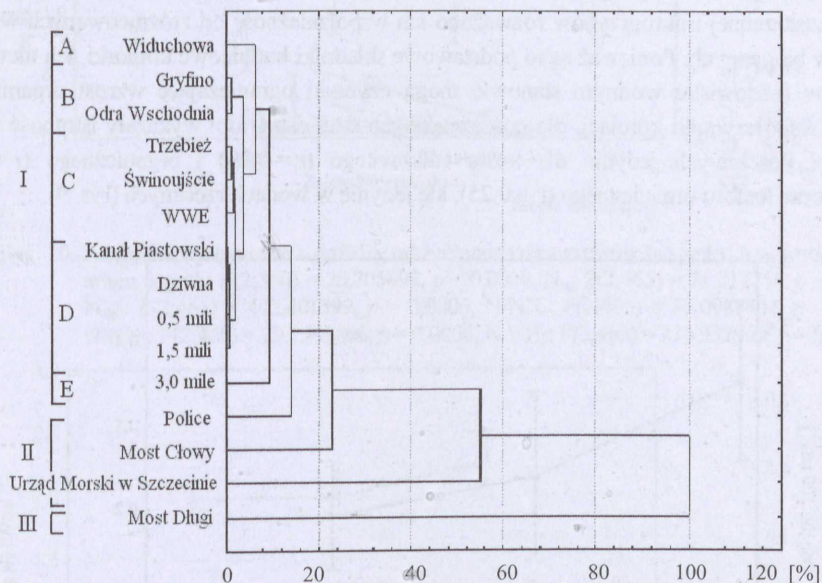


Rys. 7. Zróżnicowanie ogólnej liczby drożdży w próbach wody pobranych z wyznaczonych stacji badawczych

Znacznie mniej zróżnicowanym obszarem pod względem liczebności odnotowanych drożdży okazały się dwie pozostałe strefy estuarium Odry. Ogólna liczba drożdży oznaczonych w wodach zalewowych mieściła się w przedziale od  $14,9 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (stacja nr 10 – Dziwna) do  $23,4 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  (stacja nr 11 – WWE). W Zatoce Pomorskiej natomiast najrzadziej izolowano grzyby w obrębie stacji nr 15–3,0 mile od linii brzegowej ( $8,21 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ). Liczebność grzybów wzrastała wraz ze zmniejszaniem się odległości od lądu, gdzie na wyjściu z Portu Świnoujście (stacja nr 12) stwierdzono  $21,3 \text{ jtk} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$  drożdży (rys. 7). Powyżej opisany obraz rozmieszczenia przestrzennego wybranych mykocenoz jest typowy dla obszarów przybrzeżnych (Nagahama i in. 2001, Gadano i in. 2003). Badania własne oraz dane z piśmiennictwa wskazują, że w wodach morskich liczba drożdży maleje wraz ze zwiększaniem się odległości od lądu. Wynika to zapewne z ograniczenia potencjalnych źródeł materii organicznej wykorzystywanej w metabolizmie tych grzybów. W większości przypadków nie mamy do czynienia z typową ekologiczną grupą grzybów morskich, ale przede wszystkim z formami, które wtórnie dostały się do morza (Hyde i in. 1998, Kurtzman i Fell 2006, Nagahama 2006). Najczęściej podawanym czynnikiem, limitującym występowanie grzybów, jest stężenie chlorków. Zasolenie Zatoki Pomorskiej nie przekracza jednak  $7,0 \text{ PSU}$  (ang. Practical Salinity Unit – praktyczna jednostka zasolenia), a przedstawione w niniejszej pracy wartości przewodnictwa (w  $\mu\text{mS/cm}$ ) nie miały statystycznie istotnego wpływu na zróżnicowanie liczebności badanych drożdży. Mało prawdopodobne jest to, aby był to czynnik ograniczający wzrost i rozwój drożdży w tej części estuarium.



Statystyczna analiza skupień, oparta na zróżnicowanej liczbie wyizolowanych drożdży, wykazała rzeczywiste podobieństwo pomiędzy poszczególnymi stacjami badawczymi wyznaczającymi strefy badanego estuarium (rys. 8). Na podstawie funkcji podobieństwa wyodrębnione zostały trzy podstawowe grupy (I, II, III) o zróżnicowanym poziomie podobieństwa wewnętrznego. Przyjmując, że miara odległości pomiędzy wyznaczonymi stacjami (wyrażona w procentach) wskazuje na różnice pomiędzy nimi, możemy stwierdzić, że całkowicie odmienny jest „odcinek” rzeki na wysokości mostu Długiego. Każda z kolejnych stacji badawczych wyznaczonych na obszarze Odry szczecińskiej charakteryzowała się innym poziomem zanieczyszczenia grzybami, dla których maksymalne współczynniki odległości mieściły się w zakresie 25–55,0% (rys. 8).



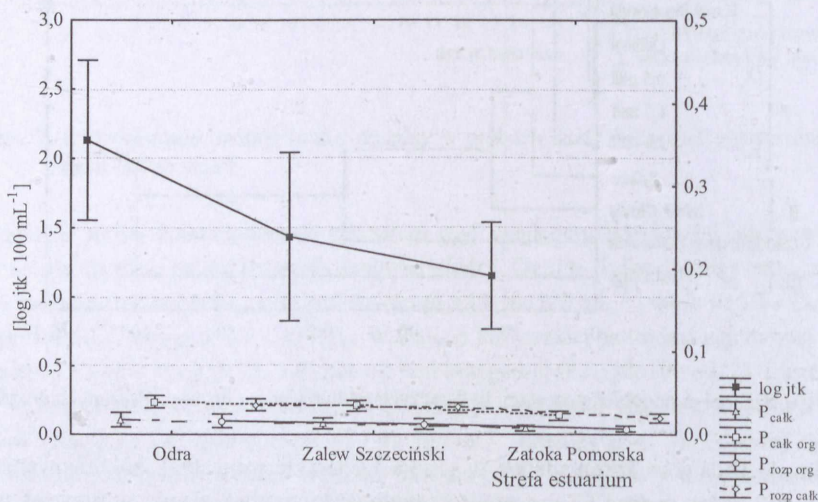
Rys. 8. Stopień podobieństwa stacji badawczych pod względem liczby izolowanych drożdży

Stacje badawcze zgromadzone w grupie I charakteryzuje brak zróżnicowania statystycznego. Wyraźne (ponad 97-procentowe) podobieństwo stwierdzono w przypadku grupy IC, obejmującej stacje Świnoujście (obszar Zatoki Pomorskiej), WWE i Trzebież (obszar Zalewu Szczecińskiego). Zapewne jest to konsekwencją podobnego mechanizmu oddziaływania mieszających się wód morskich i śródlądowych, w tym pochodzących ze zlewni, na obecne w tej części estuarium gatunki drożdży. Zwłaszcza że dominującą część zlewiska Zatoki Pomorskiej stanowi Zalew Szczeciński, z wodami którego wnoszone są wysłodzone wody śródlądowe. W przypadku grupy ID, dla której wyznaczono 95-procentowe podobieństwo z grupą IC (rys. 8), rozważyć należy hydrologiczne zależności estuarium Odry. Wyznaczone na obszarze Zalewu Szczecińskiego stacje badawcze – Kanał Piastowski i Dziwna – pozostają pod wpływem wód z Zatoki Pomorskiej. Według Majewskiego (1972) w ciągu roku wody morskie wpływające przez cieśniny kształtują warunki hydrochemiczne w Zalewie, a wyznaczony przez Tórz (2007) układ dominacji jonów w tych wodach świadczy o ich oligohalinowym



charakterze. Może się wydawać, że to właśnie parametry hydrochemiczne w istotny sposób wpływały na grzyby. Nie wykazano jednak korelacji pomiędzy układem hydrochemicznych wskaźników a ilościowym zróżnicowaniem izolowanych drożdży. Kształtujące się społeczności mikrogrzybów były więc jedynie wynikiem cyklu wpływów wód słonych, które nie mogą być jednak rozpatrywane jako ich źródło. W wodach Zatoki Pomorskiej liczebność oznaczanych grzybów w zasadzie nie przekraczała  $100 \text{ kom} \cdot \text{L}^{-1}$  (rys. 7), co jest typowe dla wód otwartych i czystych (Hagler i Ahear 1987). Zawleczone z tej strefy estuarium drożdże nie mogły istotnie wpływać na liczebność grzybów izolowanych z wód zalewowych.

Obecność materii organicznej i niezbędność źródeł węgla dla wszelkich form życia nie podlega dyskusji. W celu przeprowadzenia wnioskowania wskazującego na przyczyny dywersyfikacji przestrzennej mikrogrzybów rozważono ich współzależność od zróżnicowanych wartości związków biogennych. Ponieważ są to podstawowe składniki budulcowe komórki, ich niewielkie stężenia w środowisku wodnym stanowić mogą czynniki ograniczające wzrost organizmów. Ustalone współczynniki korelacji dla poszczególnych stref estuarium wykazały istotność współzależności ilościowych jedynie dla azotu całkowitego ( $r = 0,23$ ) i organicznego ( $r = 0,17$ ) (rys. 10) oraz fosforu organicznego ( $r = 0,25$ ), ale jedynie w wodach rzecznych (rys. 9).

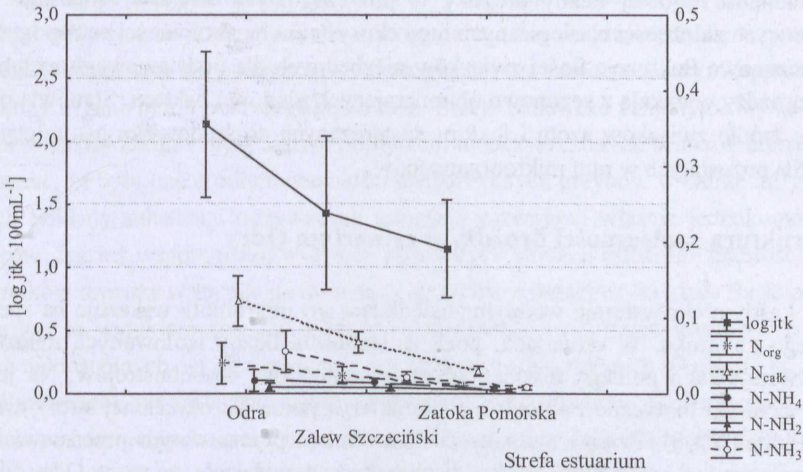


Rys. 9. Zależność występowania drożdży od fosforanowych związków biogennych w wodach estuarium.  $\log jtk$ :  $F(2;360) = 78,205892$ ,  $p = 0,0000$ ;  $P_{całk}$ :  $F(2;462) = 68,1598617$ ,  $p = 0,0000$ ;  $P_{całk \ org}$ :  $F(2;462) = 73,1929939$ ,  $p = 0,0000$ ;  $P_{rozp \ calk}$ :  $F(2;462) = 66,6381885$ ,  $p = 0,0000$ ;  $P_{rozp \ calk}$ :  $F(2;462) = 215,120368$ ,  $p = 0,0000$

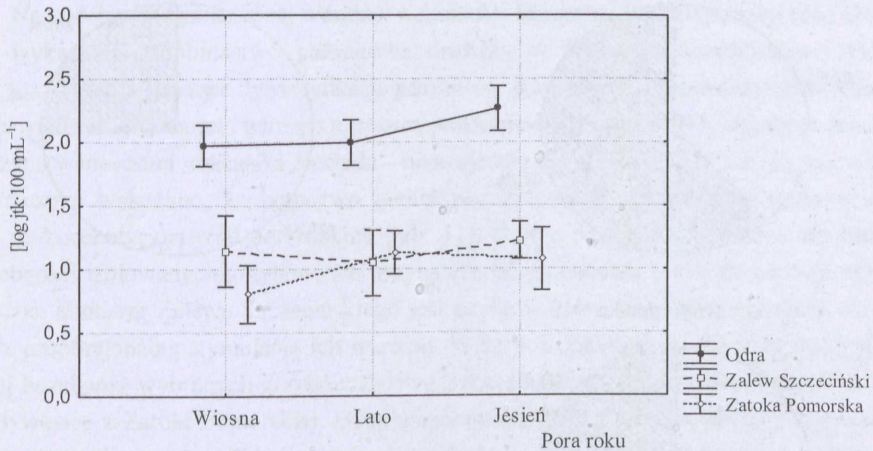
Ustalone współzależności, ograniczone do strefy estuarium o najintensywniejszym wpływie aglomeracji miejskiej, sugerują istotny związek ze stałym napływem do Odry zanieczyszczeń miejskich. Potwierdzeniem jest istotna statystycznie zależność wyznaczona dla NPL bakterii grupy *coli* typu kałowego i ogólnej liczby drożdży ( $r = 0,273$ , przy  $p < 0,05$ ). Sugestie dotyczące oddziaływania antropogenicznego na kształtujące się mykocenozy stają się uzupełnieniem w wielu procesach biochemicznych zachodzących w środowisku naturalnym i odzwierciedlają aktywność całej mikrobioty. Wyznaczone współzależności ograniczone jedynie do odcinka rzecznego



skłaniają do wniosku, iż zdecydowana większość oznaczanych mikroorganizmów eukariotycznych była wprowadzona do wód jako biota towarzysząca zanieczyszczeniom komunalnym.



Rys. 10. Zależność występowania drożdży od azotanowych związków biogenych w wodach estuarium. log jtk:  $F(2;360) = 78,205892$ ,  $p = 0,0000$ ,  $N_{org}$   $F(2;465) = 71,212756$ ,  $p = 0,0000$ ,  $N_{catk}$ :  $F(2;465) = 492,401399$ ,  $p = 0,0000$ ,  $N-NH_4$ :  $F(2;465) = 35,0988404$ ,  $p = 0,0000$ ,  $N-NH_2$ :  $F(2;465) = 29,7991606$ ,  $p = 0,0000$ ,  $N-NH_3$ :  $F(2;465) = 216,932909$ ,  $p = 0,0000$



Rys. 11. Liczbowe zróżnicowanie drożdży w poszczególnych sezonach badawczych. Poziom istotności różnic wyznaczono dla stacji: Odra:  $F(2;140) = 3,6314$ ,  $p = 0,0290$ ,  $KW-H(2;143) = 8,9769$ ,  $p = 0,0112$ ; Zalew Szczeciński:  $F(2;54) = 0,6818$ ,  $p = 0,5100$ ,  $KW-H(2;57) = 1,2778$ ,  $p = 0,5279$ ; Zatoka Pomorska:  $F(2;44) = 3,3654$ ,  $p = 0,0437$ ,  $KW-H(2;47) = 6,6502$ ,  $p = 0,0360$

Poza wyznaczonym zróżnicowaniem przestrzennym drożdży wykazano również zmiany w ich liczebności w poszczególnych porach roku (rys. 11). Ustalono, że częstość drożdży izolowanych z obszaru Odry była znacznie mniejsza w okresie wiosennym od ich liczby uzyskiwanej jesienią (0,037, przy  $p < 0,05$ ). W przypadku Zatoki Pomorskiej istotność różnic

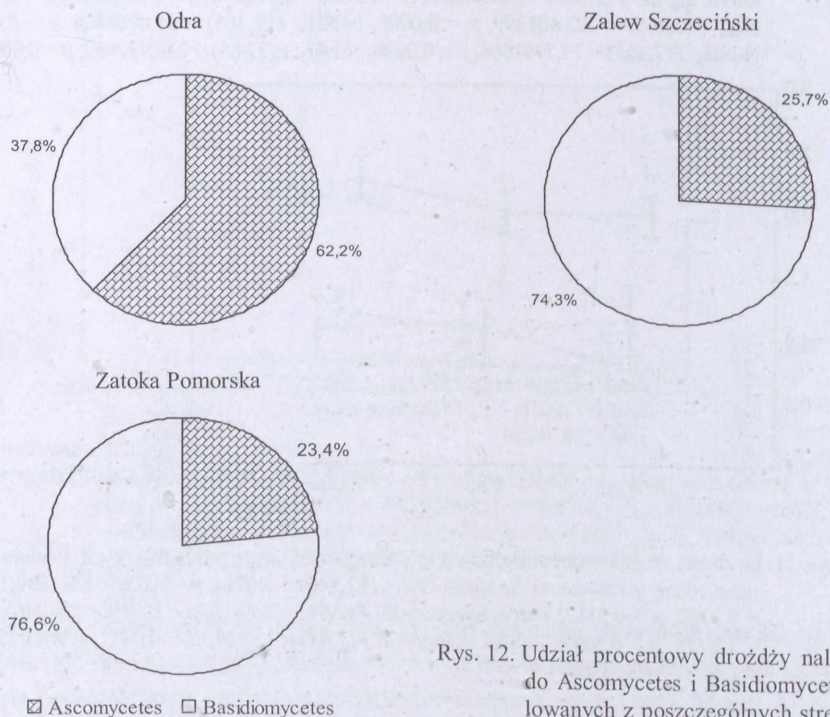


wykazano pomiędzy ogólną liczbą drożdży wiosną a latem (0,0451, przy  $p < 0,05$ ). Zróżnicowania sezonowego w wodach Zalewu nie stwierdzono.

Zmienność ogólnej liczby drożdży w poszczególnych strefach estuarium wynika z podstawowych zależności ekologicznych tego ekosystemu i z aktywności antropogenicznej. Ponadto sezonowe fluktuacje ilości związków niezbędnych dla podstawowego metabolizmu komórek drożdży wynikają z sezonowo obumierających glonów i bakterii. Stanowią one bardzo ważne źródło związków azotu i fosforu dostarczanych do środowiska naturalnego i dostępnych dla pozostałych w nim mikroorganizmów.

#### 4.2. Struktura społeczności drożdży w estuarium Odry

W każdym ekosystemie wodnym zasiedlająca go mikrobiota wskazuje na specyficzność danego zbiornika. W estuariach, poza zmiennością liczby izolowanych mikroorganizmów, dywersyfikacji podlega również struktura gatunkowa drobnoustrojów. Na jej skład wpływają czynniki biotyczne i abiotyczne charakterystyczne dla określonej strefy estuarium (Kutty i Philips 2008). Przeprowadzona analiza udziału procentowego przedstawicieli poszczególnych gromad grzybów w ogólnej liczbie drożdży wykazała, że wody Odry zdominowane były przez przedstawicieli Ascomycota, klasy Ascomycetes – 62,2% (rys. 12).



Rys. 12. Udział procentowy drożdży należących do Ascomycetes i Basidiomycetes, izolowanych z poszczególnych stref estuarium Odry

Udział gatunków jednokomórkowych grzybów uległ zmianie wraz ze zmianą obszaru badanych stref estuarium. W próbach pobranych z warstwy powierzchniowej wód Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej dominowały gatunki drożdży i grzybów drożdżopodob-



nych, umiejscowionych przez Kockova-Kratochvilova (1990) w gromadzie Basidiomycota, klasie Basidiomycetes, których udział wyniósł odpowiednio 74,3% i 76,6% (rys. 12). Stwierdzone w ogólnej populacji drożdży fluktuacje były zapewne konsekwencją zmian potencjalnych źródeł odżywczych dostępnych dla mikroorganizmów znajdujących się w poszczególnych strefach estuarium, ich plastyczności ekologicznej oraz zależności wynikających z relacji pomiędzy organizmami poszczególnych nisz. Stacje badawcze znajdujące się na odcinku Odry szczeecińskiej zasilane były stałym dopływem nieoczyszczonych ścieków komunalnych. Można uznać, że były one źródłem obecności analizowanych grzybów w Odrze lub że zawarte w nich pokłady substancji odżywczych sprzyjają rozwojowi właśnie jednokomórkowych workowców. Jak już wspomniano, w dwóch pozostałych strefach estuarium częstość izolowanych gatunków drożdży wskazuje na dominację grzybów należących do klasy Basidiomycetes. Zapewne jest to wynikiem znacznie większej możliwości wykorzystywania związków odżywczych niedostępnych dla Ascomycetes i ich zdolności adaptacyjnych (Gadano i in. 2006).

Wyznaczone proporcje opisujące zmienność liczby drożdży Ascomycetes i Basidiomycetes w poszczególnych strefach estuarium Odry nie korelują z ich gatunkowym podobieństwem. W celu scharakteryzowania mykocenoz stref estuarium Odry zastosowano wskaźnik Jaccarda ( $JJ$ ) oraz wskaźnik Margalefa ( $d$ ). Wartość wskaźnika Jaccarda określa stopień podobieństwa gatunkowego poszczególnych zbiorowisk, natomiast wskaźnik Margalefa jest miarą „bogactwa” gatunkowego.

Na podstawie wyznaczonej wartości wskaźnika Jaccarda i jej interpretacji (van Ooyen 2003) wykazano podobieństwo gatunkowe drożdży w Zalewie Szczecińskim i Odrze ( $JJ_{\text{Odra, Zalew}} = 0,83$ ). Znaczące dywersyfikacje jakościowe pomiędzy jednostkami systematycznymi izolowanymi z wód estuarium górnego a dwoma pozostałymi strefami zostały wyrażone znacznie mniejszymi wartościami wskaźnika Jaccarda – odpowiednio  $JJ_{\text{Zalew, Zatoka}} = 0,56$  i  $JJ_{\text{Zatoka, Odra}} = 0,48$ . Jednoznacznie wykazano, że bogactwo gatunkowe Zalewu Szczecińskiego odzwierciedla jakość mykocenotyczną wód odrzańskich (tab. 11). Biorąc pod uwagę wyznaczone zmiany w liczebności izolowanych grzybów, ich przypaleźność gatunkową i miejsce izolacji, można stwierdzić, iż obszar Zalewu Szczecińskiego jest strefą, w której bogactwo gatunków nie koreluje z proporcjonalną stymulacją ich wzrostu. W przeciwieństwie do dywersyfikacji jakościowej liczebność wybranych grzybów Zalewu Szczecińskiego kształtowana była przez wody wpływające z Zatoki Pomorskiej. Uzupełnieniem charakterystyki mykobioty w poszczególnych strefach estuarium Odry są wartości wskaźnika Margalefa wskazujące na bogactwo gatunkowe grzybów mikroskopowych. Ustalona na podstawie liczby gatunków izolowanych z poszczególnych stref estuarium, w odniesieniu do całkowitej ich liczby (tab. 11), różnorodność gatunkowa stopniowo się zmniejszała od strefy górnej, gdzie wskaźnik Margalefa  $d$  był równy 4,33, poprzez strefę środkową przy  $d = 3,59$ , aż po Zatokę Pomorską, w wodach której wartość wskaźnika oznaczono na poziomie  $d = 2,85$ .

W próbach wody pobieranych z poszczególnych stref estuarium Odry oznaczono stale obecnych przedstawicieli drożdży należących do rodzajów: *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* oraz *Candida*. W zależności od strefy estuarium zostały wyznaczone korelacje pomiędzy najczęściej izolowanymi przedstawicielami drożdży określonych rodzajów a ogólną liczbą drożdży.



Tabela 11. Częstość występowania drożdży [%] w próbach estuarium Odry

Oznaczony gatunek	Stacje badawcze														
	Odra							Zalew Szczeciński					Zatoka Pomorska		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Aureobasidium</i> sp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3	0,3	0,7	0,0	0,7	0,0	1,3	4,7	9,7
<i>C. albicans</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	3,7	10,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	5,3	3,3	0,0
<i>C. boidinii</i>	0,7	0,3	0,7	1,7	1,7	0,7	0,7	0,3	1,0	0,5	0,3	0,0	0,3	0,0	0,0
<i>C. colliculosa</i>	0,7	0,0	0,3	0,0	0,0	1,7	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. famata</i>	27,2	21,2	20,8	5,2	24,0	50,3	0,3	4,3	1,7	1,5	0,7	2,0	1,0	2,0	1,0
<i>C. holmii</i>	0,0	1,3	0,0	0,7	2,7	0,0	0,0	0,0	0,7	0,5	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. inconspicua</i>	1,0	0,7	1,8	0,0	1,0	0,3	0,0	0,0	0,3	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. kefyra</i>	0,0	1,3	0,0	0,3	2,3	1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. krusei</i>	4,3	0,7	0,3	0,0	1,0	3,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	1,7	0,0
<i>C. lambica</i>	12,3	6,2	6,0	3,7	5,0	9,7	2,0	2,3	1,3	0,0	7,5	0,0	0,7	0,0	0,3
<i>C. lipolytica</i>	7,7	7,0	10,0	6,3	3,7	8,0	3,7	3,0	1,7	0,5	1,0	0,0	2,3	0,0	0,3
<i>C. lusitaniae</i>	3,3	7,3	7,0	13,5	7,8	6,2	2,0	0,5	0,0	0,0	0,7	0,0	0,3	0,0	0,3
<i>C. membranaefaciens</i>	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	5,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. norvegica</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>	0,7	0,0	0,7	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	3,8	0,0	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>C. pelliculosa</i>	0,7	2,0	1,7	4,0	0,0	0,0	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. pulcherrima</i>	15,5	0,0	0,3	0,7	10,3	0,7	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0
<i>C. quilliermondii</i>	0,0	1,0	0,0	5,3	1,3	0,0	2,0	4,0	0,7	0,0	0,4	0,0	6,5	6,3	0,0
<i>C. tropicalis</i>	4,0	8,0	16,0	29,7	31,0	16,0	3,3	1,3	0,3	0,0	0,3	0,0	10,3	0,3	0,0
<i>C. utilis</i>	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0



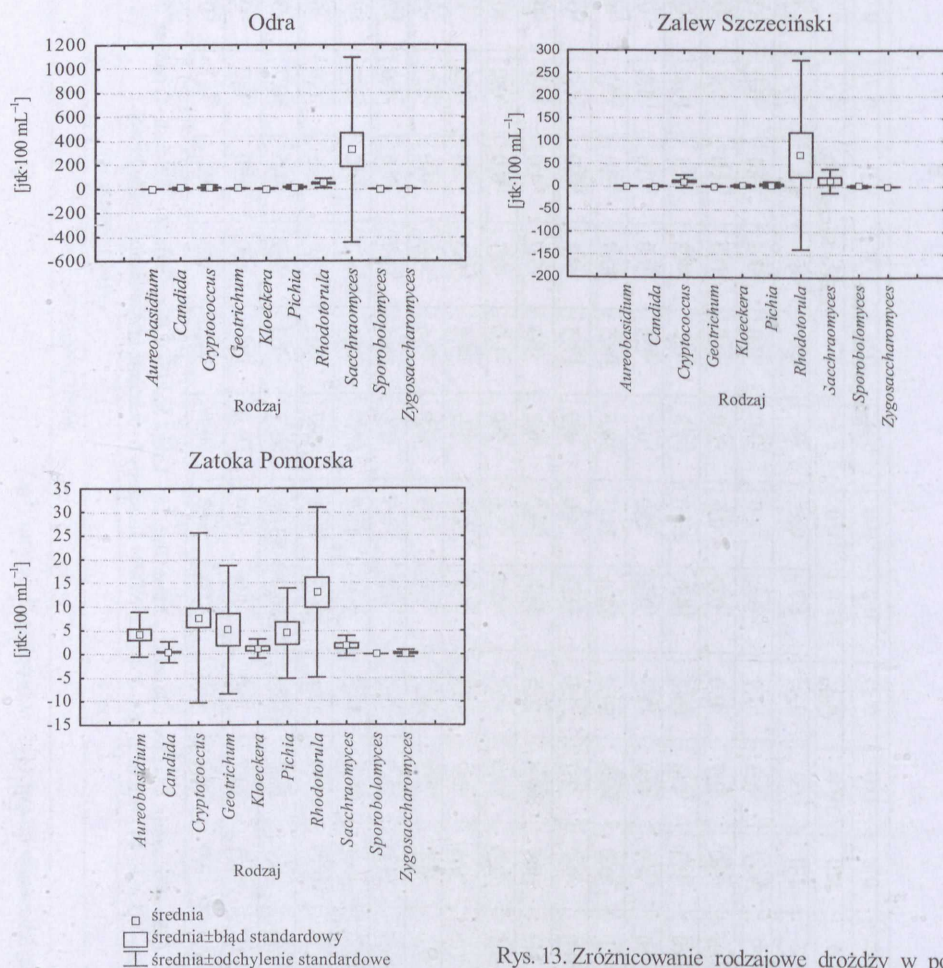
cd. tab. 11

Oznaczniki gatunek	Stacje badawcze														
	Odra							Zalew Szczeciński					Zatoka Pomorska		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>C. sake</i>	18,7	20,7	6,3	3,7	3,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. zeylanoides</i>	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0
<i>Cr. albidus</i>	11,0	0,3	8,0	16,3	14,0	20,0	14,8	6,2	14,2	2,5	16,0	0,0	6,0	0,0	6,3
<i>Cr. humicolus</i>	0,0	0,0	0,0	1,3	0,3	0,0	0,7	1,5	9,0	1,0	5,8	0,0	0,3	2,8	3,0
<i>Cr. laurenti</i>	6,0	0,0	16,5	54,3	62,6	21,3	28,8	16,5	20,7	3,0	37,7	4,0	48,3	25,5	20,7
<i>Cr. neoformans</i>	0,0	0,0	2,7	1,0	31,3	4,0	4,0	17,5	9,3	0,0	1,7	0,0	0,3	11,7	2,7
<i>Cr. uniguttulatus</i>	1,7	0,7	14,8	16,7	48,8	9,0	6,2	1,3	5,7	4,0	4,7	0,0	0,7	4,3	8,3
<i>Geotrichum spp</i>	0,7	2,3	1,0	7,7	4,7	5,0	7,0	1,0	0,3	0,0	0,0	40,0	0,3	0,3	0,3
<i>Kl. apiculata</i>	1,8	9,8	2,7	4,8	1,2	1,3	1,3	4,8	0,3	3,0	0,0	1,0	0,7	0,3	1,3
NOZN	9,0	6,7	2,7	4,3	3,0	3,3	6,0	3,6	4,0	0,0	2,7	2,0	5,0	10,0	13,0
<i>P. carsonii</i>	20,7	11,0	2,7	3,2	0,3	4,7	1,0	8,1	3,7	1,0	1,0	17,5	6,7	2,5	0,3
<i>Rh. glutinis</i>	36,0	30,1	97,8	44,5	51,1	41,7	42,7	48,0	308,2	3,0	17,7	7,5	21,0	25,7	15,0
<i>Rh. mucilaginosa</i>	12,6	35,0	20,7	34,0	76,8	49,8	45,7	33,7	9,7	1,5	6,0	6,5	8,3	23,3	4,7
<i>S. cerevisiae</i>	6,0	6,3	21,0	318,3	2066,0	832,8	83,2	1,3	0,7	4,5	30,7	3,5	2,3	0,7	3,0
<i>S. kluyverii</i>	0,7	1,3	0,7	0,0	1,0	0,0	0,0	13,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Sp. salmonidae</i>	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	3,2	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0

1 – Widuchowa, 2 – Gryfino, 3 – Odra Wschodnia, 4 – Most Clowy, 5 – Most Długi, 6 – Urząd Morski w Szczecinie, 7 – Police, 8 – Trzebież, 9 – Kanał Piastowski, 10 – Dziwna, 11 – WWE, 12 – Świnoujście, 13 – 0,5 mili, 14 – 1,5 mili, 15 – 3,0 mile, NOZN – szczepy o nieznanym przynależności gatunkowej.



Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej ustalono, że w wodach rzecznych wzrostowi jtk drożdży towarzyszyła zwiększająca się liczba oznaczanych szczepów z rodzaju *Saccharomyces* ( $r = 0,69$ , przy  $p < 0,05$ ). Mykocenozy II strefy estuarium były kształtowane przez gatunki z rodzaju *Rhodotorula* ( $r = 0,90$ , przy  $p < 0,05$ ), *Cryptococcus* ( $r = 0,79$ , przy  $p < 0,05$ ) i *Saccharomyces* ( $r = 0,65$ , przy  $p < 0,05$ ). Natomiast w wodach Zatoki Pomorskiej zwiększenie ogólnej liczby drożdży było skorelowane z częstością izolacji gatunków z rodzaju *Rhodotorula* ( $r = 0,65$ , przy  $p < 0,05$ ) – rys. 13.



Rys. 13. Zróżnicowanie rodzajowe drożdży w poszczególnych strefach estuarium Odry

### 4.3. Ryby jako środowisko mykocenozy wodnych

#### 4.3.1. Struktura gatunkowa drożdży izolowanych ze śluzu ryb

Drożdże zalicza się do naturalnie występującej mikrobioty ryb (Gatesoupe 2007). W większości przypadków stanowią one jej część. Jedynie w sporadycznych przypadkach liczebność izolowanych drożdży dominuje nad mikrobiotą bakteryjną. Takie przypadki



stwierdzono w przewodzie pokarmowym węgorzy morskich *Synphobranchus kaupi* (Ohwada i in. 1980) oraz ryb hodowlanych *Oncorhynchus masou* (Yoshimizu i in. 1976). Oznaczone populacje mykocenoz, uznanych za naturalnie występujące w jelicie przewodu pokarmowego, nie przekraczają zazwyczaj wartości  $10^7$  jtk·g<sup>-1</sup> (Gatesoupe 2007). Według Gatesoupe'a (2007) grzyby jednokomórkowe stanowią zazwyczaj niewielki odsetek (5,0%) całkowitej puli mikrobioty ryb. Pomimo to ww. autor podkreśla, że nie należy pomijać obecności tych grzybów ze względu na ich fizjologiczne znaczenie.

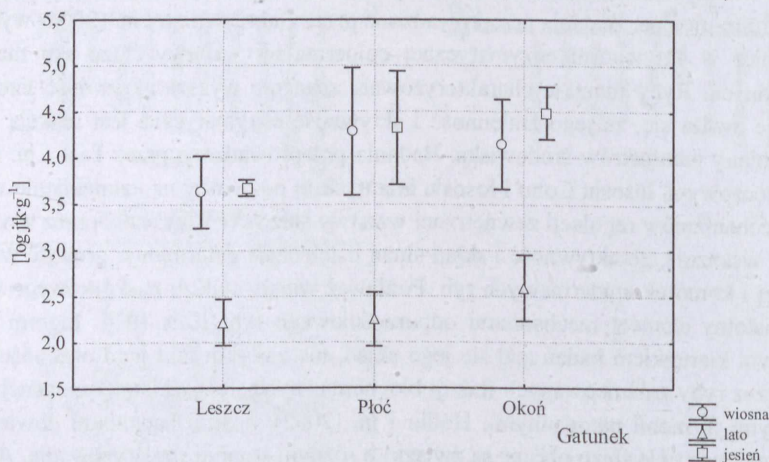
Stopień kolonizacji mikrobiologicznej odzwierciedla kondycja fizjologiczna ryb oraz ekologiczny charakter środowiska, w którym ryby zajmują określone nisze. Za kluczowy element odporności ryb uznawany jest śluz naskórkowy. Jako warstwa powierzchniowa, będąca na styku naskórka ryb z ich środowiskiem bytowania, śluz wydzielany jest stale, co zapobiega ich kolonizacji przez pasożyty, bakterie i grzyby (Fouz i in. 1990, Ebran i in. 2000). Ograniczenie ryzyka mikrobiologicznego uzależnione jest jednak od jego ilościowo-jakościowego profilu biochemicznego (Ellis 2001, Subramanian i in. 2008). W większości przypadków selektywne oddziaływanie warstwy śluzu skierowane jest na bakterie Gram-dodatnie lub Gram-ujemne. Badania przeprowadzone przez Subramanian i in. (2008) wykazały istotne różnice w aktywności enzymatycznej epidermalnej warstwy śluzu ryb morskich i słodkowodnych. Ryby morskie charakteryzowała znacznie wyższa aktywność lizozymu. Powszechnie uważa się, że jego zmienność i aktywność enzymatyczna jest reakcją ichtiofauny na zmiany parametrów środowiska. Badania przeprowadzone przez Fast i in. (2002) na pstrągu tęczowym, łososiu Coho i łososiu atlantyckim pozwoliły na uzupełnienie wiedzy na temat mechanizmów regulacji zewnętrznej warstwy śluzowej. Uzyskane przez ww. autorów wyniki wskazują, że aktywność i skład śluzu ostatecznie determinuje grubość warstwy naskórkowej i komórek epidermalnych ryb. Ponieważ warstwa śluzu naskórkowego uznana została za istotny element mechanizmu odpornościowego ryb (Ellis 1974, Ingram 1980), podstawowym kierunkiem badań stał się jego skład, nie zaś sam fakt jego obecności. Wydzielanie przez ryby zróżnicowanych frakcji biochemicznych stanowi istotę prewencji przed niepożądanymi formami patogennymi. Hellio i in. (2002) swoimi badaniami dowiedli, że w zewnętrznej warstwie śluzu obecne są związki o różnym stopniu spolaryzowania. Autorzy ci zwrócili uwagę na korelację pomiędzy polarnością ekstraktu a jego antymikrobiologiczną aktywnością. Analiza 78 próbek pobranych z 13 gatunków ryb wykazała, że im wyższy jest stopień polarności frakcji śluzu, tym niższa jest jego aktywność inhibitująca. W większości przypadków działanie bójcze lub statyczne poszczególnych frakcji skierowane było przeciwko bakteriom z rodzaju: *Bacillus*, *Streptococcus* oraz *St. aureus*, *E. coli*, *Ps. vulgaris* i *Ps. aeruginosa*, w znacznie mniejszym stopniu – przeciwko testowanym przez autorów grzybom: *C. krusei*, *C. albidus*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* i *I. orientalis*.

Mechanizm ochronny ryb rozpatrywany jest na wiele sposobów. Najbardziej interesujące, poza niespecyficznymi czynnikami ochrony, są oznaczone w warstwie epidermalnego śluzu immunoglobuliny, lektyny, lizozym i antymikrobiologiczne polipeptydy (Yano 1996, Cole i in. 1997, Robinette i in. 1998). Zróżnicowanie aktywności antymikrobiologicznych związków w śluzie ryb wpływa na jego kompozycję i strukturę, która różnicuje oporność osobnika na infekcje w środowisku wodnym (Fast i in. 2002, Subramanian i in. 2008). Subramanian i in. (2007) sugerują nawet, że to właśnie w sile działania lizozymu i proteaz, jako antymikrobiologicznych składników epidermalnej warstwy śluzu, ukryta jest tajemnica zdro-



wotności ryb. Obecność lizozymu jest warunkowana obecnością genów konstytutywnych (Paulsen i in. 2001), ale jego aktywność determinowana jest warunkami środowiskowymi (Balfry i Iwama 2004, Subramian i in. 2008) i kondycją ryby (Mock i Peters 1990, Caruzo i Lazard 1999, Fevolden i in. 2001).

W okresie jesienno-wiosennym ryba przebywa w warunkach mniej sprzyjających, co w przypadku np. obniżającej się temperatury prowadzi do znacznego zmniejszenia efektywności działania jej układu immunologicznego (czy lizozymu). Zapewne konsekwencją tych zmian były wyniki niniejszych badań. W powierzchniowej warstwie śluzu analizowanych gatunków ryb w okresie wiosny i jesieni ogólna liczba drożdży była statystycznie większa od stwierdzonej w sezonie letnim (rys. 14). Przy decydującej roli lizozymu w aktywności antymikrobiologicznej śluzu ryb ważnym aspektem interpretacji wyników pozostaje zmienność jego koncentracji. W okresie zimowo-wiosennym (grudzień–kwiecień) następuje znaczny spadek koncentracji tego hydrolitycznego białka. Staje się to zapewne bezpośrednim powodem wzrostu liczebności oznaczonych w badaniach własnych grzybów, czego efektem może być wzrost ilości ATP-az oznaczanych w epidermalnej warstwie śluzu ryb (Schrock i in. 2001).



Rys. 14. Analiza ilościowa drożdży w warstwie śluzowej skóry ryb. Wiosna:  $F(2;21) = 0,0301184503$ ,  $p = 0,9704$ ; lato:  $F(2;21) = 3,46893338$ ,  $p = 0,0499$ ; jesień:  $F(2;21) = 0,130324454$ ,  $p = 0,8785$

Już minimalna ilość lizozymu może ograniczać ewentualną reprodukcję niektórych drożdży, jednak żywotność komórek zazwyczaj nie ulega zasadniczej zmianie (Lopera i in. 2008). Trudno określić dokładną fizjologiczną koncentrację tego enzymu w rybach. Wiadomo jedynie, że zakres jej zmienności wynosi  $18\text{--}66 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  w śluzie skóry *Oncorhynchus kisutch* i  $20\text{--}127 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  w śluzie *O. tshawytscha* (Schrock i in. (2001)). Według Fast i in. (2002) naturalna koncentracja nie przekracza  $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Zmiana pory roku i warunków bytowania ryb inicjuje zwiększenie jego ilości, wskutek czego efektywność fungistycznego mechanizmu może prowadzić do ultrastrukturalnych i morfologicznych zmian form pączkujących i strzępkujących (Lopera i in. 2008) i do zmniejszenia liczby oznaczanych drożdży. Efekt działania lizozymu zależy od ilości tego enzymu, którego już minimalne wartości regulują rozwój mykocenozy (Wu i in. 1999). Schrock i in. (2001) w śluzie pstrąga oznaczyli jego stężenie na poziomie  $18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Niestety, w przeciwieństwie do aktywności hydrolitycznej polegającej na lizie wiązań pomiędzy N-acetyloglukozaminą i N-acetylmuraminą w warstwie



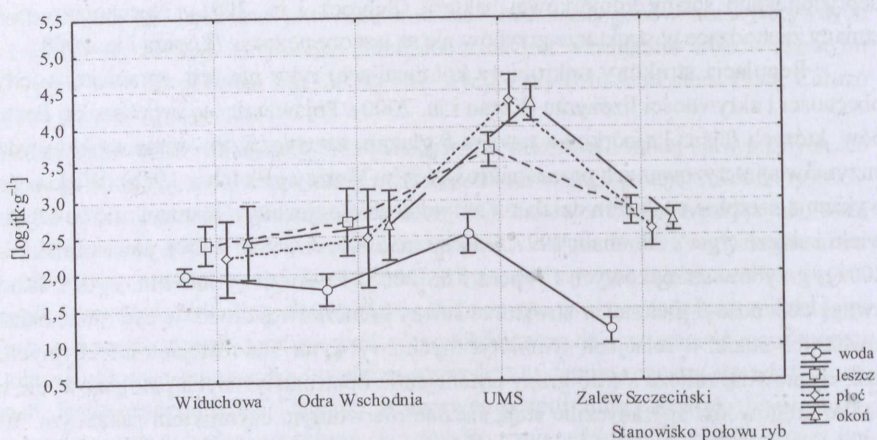
peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii (Schrock i in. 2001), mechanizmy regulujące zmiany zachodzące w strukturze grzybów nie są jeszcze poznane (Lopera i in. 2008).

Regulacja struktury mikrobioty kolonizującej ryby nie jest ograniczona jedynie do obecności i aktywności lizozymu (Ebran i in. 2000). Pojawienie się zwiększonej liczby grzybów, których ściana komórkowa zawiera  $\beta$ -glukan, zazwyczaj powoduje wzrost wydzielania enzymów syntetyzowanych przez makrofagi ryb (Murray i Fletcher 1976). Większość z nich wykazuje szerokie spektrum działania antymikrobiologicznego. Hamują one bowiem rozwój wielu bakterii (Iger i Abraham 1997, Smith i in. 2000, Aranishi 2000), pierwotniaków (Jones 2001), grzybów strzępkowych (Lopera i in. 2008) i wirusów (Cho i in. 2002). Biorąc pod uwagę obecność  $\beta$ -glukanu w strukturze ściany komórkowej drożdży, być może należy podkreślić ich udział w relacjach symbiotycznych z rybą, nie zaś relacjach infekcyjnych. Drożdże, co prawda, zalicza się do grupy potencjalnie oportunistycznych patogenów, ale w przypadku kręgowców sporadycznie stają się one pierwotnym czynnikiem zakaźnym. W odpowiednich więc dla ryb warunkach ekologicznych, a za takie uznano estuarium Odry, nie powinny zatem stanowić zagrożenia.

Z przeglądu literatury wynika, iż warunki siedliskowe estuarium Odry są sprzyjające dla wybranych gatunków ryb. Załachowski i Więski (1998) wykazali, że leszcze zasiedlające ten obszar charakteryzowało dobre tempo wzrostu, a nawet lepsze od średniej krajowej (Kompowski 1999). W przypadku płoci (Więski 1998) oraz okonia (Neja i Wandzel 1999) szybkie tempo wzrostu ryb ichtiolodzy oznaczyli na obszarze od Widuchowej do Szczecina. Stwierdzony brak istotnie statystycznych różnic pomiędzy liczbą izolowanych drożdży ze śluzu leszcza ( $5,33 \cdot 10^4$  jtk $\cdot$ g $^{-1}$ ), płoci ( $1,16 \cdot 10^4$  jtk $\cdot$ g $^{-1}$ ) i okonia ( $1,67 \cdot 10^4$  jtk $\cdot$ g $^{-1}$ ) wynikał więc jedynie z cech osobniczych określonego gatunku (rys. 15). Wykorzystywane bowiem przez badane gatunki ryb środowiska cząstkowe charakteryzuje podobieństwo warunków ekologicznych (Elliot i Hemingway 2002).

Wyznaczona zależność potwierdza, że poziom kolonizacji ryb przez jednokomórkowe grzyby jest zależny od jakości mykologicznej wody. Niektóre gatunki ichtiofauny uznaje się za bioindykatory jakości ekosystemów wodnych (Marchand i in. 2002). W tym miejscu należałoby podkreślić, iż stopień zanieczyszczenia siedlisk ryb, zwłaszcza dzikich, w istotny sposób wpływa na ich zdrowotność. W krytycznych okolicznościach może to doprowadzić do śmierci niektórych gatunków ichtiofauny. Wyższa koncentracja zanieczyszczeń może natomiast sprzyjać patogeniezie i rozwojowi chorób ryb (Austin i Austin 1999). Największym problem stają się wówczas chorobotwórcze dla ryb bakterie. Ich inwazyjność rozpatrywana jest jako bezpośredni czynnik etiologiczny schorzeń; mogą również sprzyjać rozwojowi form nadkażających, takich jak grzyby jednokomórkowe i grzyby pleśniowe. Przeprowadzone na tym samym materiale badawczym analizy w kierunku oceny jakości bakteriologicznej (Czeszejko 2003) i mykologicznej wykazały, że udział grzybów w epidermalnej warstwie śluzu przekraczał 2,0% całkowitej mikrobioty. Jest to istotne, ponieważ taka liczebność drożdży była większa od wyznaczonego przez Gatesoupe'a (2007) progu mykobioty fizjologicznej. Liczba izolowanych drożdży w niektórych przypadkach znacznie przekracza wartości wskazane przez Gatesoupe'a (2007). Ohwada i in. (1980) stwierdzili bowiem u węgorza morskiego *Synaphobranchus kaupii* w ogólnej liczbie mikroorganizmów udział grzybów jednokomórkowych w zakresie 50–90% (bez konsekwencji chorobowych). Sporadyczność występowania takich przypadków jednak nie potwierdza reguły.





Rys. 15. Ogólna liczba drożdży w śluzie skóry ryb i strefy ich połowu. Oznaczone współczynniki korelacji: dla leszcza  $r = 0,95$ ,  $p = 0,000$ ; dla płoci  $r = 0,78$ ,  $p = 0,000$ ; dla okonia  $r = 0,89$ ,  $p = 0,000$

Tabela 12. Procentowy udział gatunków drożdży izolowanych ze śluzu ryb

Gatunek drożdży	Gatunek ryby								
	leszcz			płoć			okoń		
	wiosna	lato	jesień	wiosna	lato	jesień	wiosna	lato	jesień
<i>C. colliculosa</i>	1,0	2,0	8,0	1,0	1,8	3,2	0,0	0,0	0,0
<i>C. famata</i>	2,5	7,0	1,0	19,0	5,8	10,0	3,0	10,0	10,0
<i>C. qualermondii</i>	0,0	3,3	0,0	0,0	5,8	6,0	10,0	8,0	0,0
<i>C. farinosa</i>	0,0	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. holmii</i>	2,0	1,0	0,0	0,0	0,0	3,8	0,0	0,0	0,0
<i>C. melbiose</i>	0,0	2,0	0,0	0,0	5,8	2,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. membranofaciens</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	2,0	15,0	2,0	25,0
<i>C. sake</i>	4,2	1,0	0,0	2,0	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cr. humicolus</i>	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cr. laurenti</i>	3,1	5,0	8,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cr. uniguttulatus</i>	22,0	21,4	9,0	35,0	5,8	12,0	15,0	10,0	15,0
<i>P. carsonii</i>	7,0	2,0	10,0	5,0	4,0	5,0	7,0	23,0	3,0
<i>Rh. glutinis</i>	5,0	15,0	15,0	18,0	25,4	20,0	20,0	10,0	32,0
<i>Rh. minuta</i>	1,0	2,0	0,0	0,0	5,8	3,0	5,0	2,0	0,0
<i>Rh. mucilaginosae</i>	40,0	32,1	45,0	20,0	32,3	17,0	25,0	31,0	15,0
<i>S. cerevisiae</i>	2,0	2,2	2,0	0,0	2,0	0,0	0,0	2,0	0,0
<i>Tr. mucoides</i>	10,2	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NOZN	0,0	0,0	1,0	0,0	3,8	0,0	0,0	2,0	0,0

NOZN – szczepy o nieznanym przynależności gatunkowej.

Rozważania na temat zdrowotności ryb nie mogą ograniczać się jedynie do analizy poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego, bowiem równie ważny jest skład jakościowy

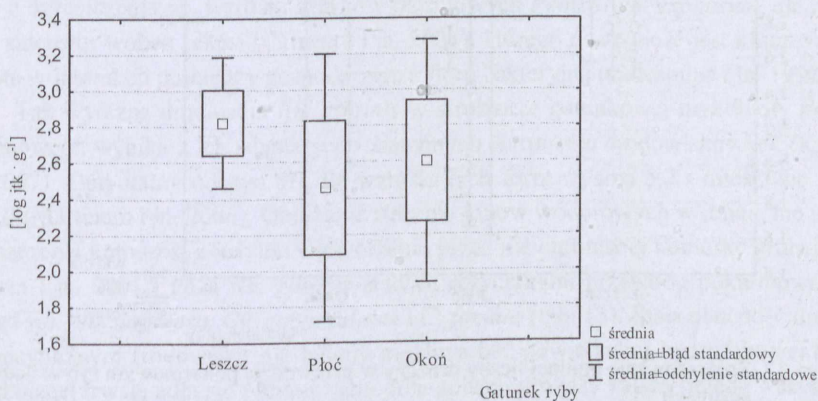


wy tej mikrobioty. Spośród wyznaczonych w toni wodnej 36 gatunków drożdży 17 było obecnych w śluzie ryb. Najmniej zróżnicowaną gatunkowo biotę jednokomórkowych grzybów oznaczono na powierzchni okonia – 10 przedstawicieli drożdży; w przypadku leszcza i płoci zidentyfikowano odpowiednio 17 i 15 gatunków. Zdecydowanie dominującymi w strukturze gatunkowej drożdży badanych ryb i stale izolowanymi byli przedstawiciele klasy Basidiomycetes: *Cr. uniguttulatus*, *Rh. glutinis* i *Rh. mucilaginosa*. W przypadku Ascomycetes we wszystkich analitach stwierdzono jedynie obecność *P. carsonii*; przedstawiciele Deuteromycetes izolowano sporadycznie (tab. 12).

#### 4.3.2. Struktura gatunkowa drożdży izolowanych z przewodu pokarmowego ryb

Przedstawiciele wszystkich poddanych analizie mykologicznej gatunków ryb łączący obszar żerowania – miękkie dno oraz łąki trawy morskiej (Elliot i Hemingway 2002). W łańcuchu troficznym zajmują one jednak różne miejsca. Na podstawie podziału ichtiofauny estuarium Odry, dokonanego przez Krzykawskiego i Szypułę (1993), leszcz wraz z linem, karasiem jazgarzem i sieją są przedstawicielami ryb bentosożernych. W strukturze gatunkowej ryb drapieżnych w wodach estuarium Odry, poza okoniem, wyróżniono: szczupaka, sandacza, sumę, węgorza, bolenia i miętusa. Płoc natomiast została uznana za jedyną w tym ekosystemie gatunek ryb wszystkożernych. Preferencje pokarmowe stały się podstawowym kryterium różnicującym anatomiczne i fizjologiczne cechy przewodu pokarmowego ryb. Pod koniec lat 70. ub. wieku na przykładzie pstrąga tęczowego Lesel i Ponter (cyt. za: Ringo i in. 2003) stwierdzili, że liczba bakterii izolowana z poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego jest porównywalna. Austin i Al-Zahrani (1988) zweryfikowali powyższe dane o liczbę bakterii zaadherowanych do ściany żołądka, szacując ich obecność na poziomie < 0,001% całkowitej mikrobioty przewodu pokarmowego.

Wyniki badań własnych wykazały, że w przewodzie pokarmowym analizowanych ryb, charakteryzujących się różnym sposobem odżywiania, istotne różnice w ogólnej liczbie izolowanych drożdży stwierdzono jedynie pomiędzy leszczem a płocią (0,0066, przy  $p < 0,05$ ) – rys. 16.



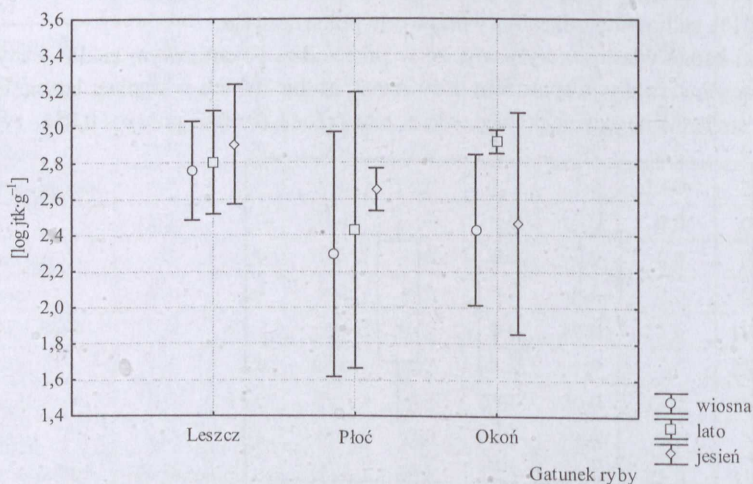
Rys. 16. Średnia liczba drożdży w przewodzie pokarmowym ryb.  $\log \text{jtk g}^{-1}$ :  $F(2;33) = 4,2639$ ,  $p = 0,0225$ ; KW-H (2;36) = 7,091,  $p = 0,0289$

Na podstawie porównywalnych wartości oznaczanych drobnoustrójów można stwierdzić, iż rozważanie obecności drożdży w przewodzie pokarmowym nie może być oceniane



jedynie w kontekście biernego ich pobierania z pokarmem ryb i skorelowane z obecnością treści pokarmowej. W interpretacji wyników należy uwzględnić zdolność do stałej kolonizacji przewodu pokarmowego przez mikroekriotyczne drobnoustroje. Możliwość przeżycia drożdży jako form heterotroficznycch zależna jest od materii organicznej, której obecność w przewodzie pokarmowym ryb nie zawsze musi odzwierciedlać ich wymagania pokarmowe. W takich warunkach ekologicznych strategia przeżycia drożdży jest prawdopodobnie oparta na zdolności adherencji do śluzu jelita i wykorzystania jego komponentów jako źródła nutrientów i energii (Andlid i in. 1998). W składzie śluzu występują bowiem białka oraz znaczne ilości lipidów (Brasitus 1984).

Zestawienie dokonane przez Gatesoupe'a (2007) wykazało, że w przewodzie pokarmowym ryb nawet 84–100% ogólnej liczby drobnoustrojów mogą stanowić drożdże. Dominujący udział tych grzybów jest jednak charakterystyczny dla gatunków hodowlanych: *Oncorhynchus masou* (84,0–100,0%; 4–5 log jtk·g<sup>-1</sup>), *O. mykiss* (3,0–18,0%; 5–7 log jtk·g<sup>-1</sup>), *O. tschawytscha* (0,0–80,0%; 0–4 log jtk·g<sup>-1</sup>) oraz *Pagrus major* (3,0–19,0%; 2–3 log jtk·g<sup>-1</sup>). W przewodzie pokarmowym ryb wolno żyjących ogólna liczba oznaczanych drożdży mieściła się w zakresie 1–5 log jtk·g<sup>-1</sup> u *Tachurus symmetricus* i *Beryx splendens*, nie przekraczała zaś 2 log jtk·g<sup>-1</sup> u *Girella punctata* i *Platichthys flexus*. Porównywalną do powyższej liczby grzybów jednokomórkowych liczbę drożdży oznaczono w przewodzie pokarmowym ryb odławianych z estuarium Odry: leszcza (7,2·10<sup>2</sup> jtk·g<sup>-1</sup>), płoci (3,8·10<sup>2</sup> jtk·g<sup>-1</sup>) oraz okonia (5,05·10<sup>2</sup> jtk·g<sup>-1</sup>) – rys. 16. W przypadku leszcza i płoci nie ustalono istotnych statystycznie różnic w ogólnej liczbie drożdży izolowanych w poszczególnych porach roku. Stwierdzono jedynie nieznaczny wzrost ich liczby w okresie od wiosny do jesieni (rys. 17).



Rys. 17. Zróżnicowanie ogólnej liczby drożdży w przewodzie pokarmowym ryb w badanych sezonach

Leszcza charakteryzuje osobliwy sposób żerowania. Odżywia się on przede wszystkim skorupiakami i larwami bytującymi w osadach. Czas jego najintensywniejszego żerowania przypada na okresy letni i jesienny. Na przykładzie zróżnicowania mikrobiologicznego sedymentów Zalewu Szczecińskiego właśnie w miesiącach jesiennych w osadach możli-



wy jest intensywny rozwój drożdży (Daczkowska-Kozon i in. 1996, Bogusławska-Wąs i Dąbrowski 1999). Grzyby należące do Basidiomycota, w tym przede wszystkim *Rhodotorula* i *Sporobolomyces*, równie chętnie jak w osadach rozwijają się na powierzchni skorupiaków (Nagahama i in. 2001). Prawdopodobnie średnia liczebność oznaczonych drożdży w przewodzie pokarmowym leszcza była większa niż w przewodzie pokarmowym pozostałych gatunków w wyniku pobierania grzybów z dna i/lub wraz z pokarmem.

Podobną do leszcza zmienność sezonową stwierdzono w przypadku drożdży izolowanych z przewodu pokarmowego płoci (rys. 17). Jest to ryba, która – w przeciwieństwie do wielu innych – nie zapada w odrętwienie zimowe i nie wykazuje preferencji pokarmowych, a więc intensywność jej żerowania jest względnie stała. Zastanawiające jest jedynie duże odchylenie od średniej statystycznej liczby oznaczanych grzybów, co stwierdzono również u okonia. Być może jest to odzwierciedleniem trybu życia ryb. W przypadku okonia wszystkie pozyskane osobniki przeszły już z planktonowego na drapieżny tryb życia i rozpoczęły intensywne żerowanie.

Z punktu widzenia ryzyka mikrobiologicznego zasiedlenie ryb przez określone gatunki drożdży może mieć istotne znaczenie w kształtowaniu relacji z innymi drobnoustrojami (Vázquez-Juárez i in. 1993, Ringo i in. 2003). Procesy biokontroli polegają przede wszystkim na inhibicji wzrostu patogenów lub na ich metabolicznej aktywności. Ponieważ obecność *Rhodotorula glutinis* w przewodzie pokarmowym analizowanych gatunków ryb jest stała i dominująca (tab. 13), pojawia się możliwość rozważenia ich symbiotycznego oddziaływania. Zdolność wytwarzania związków antybakteryjnych przez te karotenoidowe drożdże może być wykorzystywana przez ryby w walce z bakteriami patogennymi, np. *Pseudomonas* (McCormack i in. 1994). Badania przeprowadzone przez Calvente i in. (1999) pozwoliły na sformułowanie tezy, iż wytwarzane przez *Rh. glutinis* siderofory (Atkin i in. 1970) odgrywają istotną rolę w procesach żelazozależnej wirulencji grzybiczej (Calvente i in. 2001). Inhibicja poprzez kompleksy żelazowe z kwasem rodotorulowym drożdży wynika nie z ograniczenia np. wzrostu grzybów pleśniowych *Penicillium expansum*, ale z konkurencji siderofor wobec żelaza (Calvente i in. 2001), którego dostępność jest kluczowym elementem w interakcji pomiędzy gospodarzem a florą bakteryjną (Gatesoupe i in. 1997).

Tak wyraźna dominacja *Rh. glutinis* w strukturze gatunkowej mykobioty przewodu pokarmowego wynika z ich adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych (Krzyściak i in. 2007). Optymalny odczyn pH dla wzrostu tych form wynosi 5,2 i mieści się zakresie 4,0–7,0 (Martinem i in. 2006). Obniżenie stężenia jonów wodorowych w jelicie nie powoduje zniszczenia komórek, a jedynie wytworzenie przez nie chroniącej komórkę grubej otoczki (Nguyen i in. 2001). Poza *Rh. glutinis* stałymi rezydentami przewodu pokarmowego były również *Rh. mucilaginosa*, *Cr. uniguttulatus* i *C. famata* (tab. 13). Stała obecność drożdży w tak specyficznym środowisku nie byłaby możliwa bez powierzchni hydrofobowej komórki warunkującej trwałą adhezję i kolonizację. Siła adhezji drożdży zależy przede wszystkim od struktury powierzchni ściany komórkowej (Hanzen 1990) oraz od fizjologicznej aktywności kultury. Jej zwiększenie w czasie Andlid i in. (1998) odnotowali podczas wszystkich faz wzrostu komórek, co wskazywało na obecność dostępnych związków odżywczych w środowisku. Zdolność do przylegania zmniejszała się natomiast w fazie stacjonarnej i w wydłuża-



jącym się okresie głodzenia (Vazquez-Juarez i in. 1994), czego efektem może być ograniczone żerowanie ryb.

Proces adhezji i kolonizacji odzwierciedla synergistyczne zależności pomiędzy powierzchnią ściany komórkowej drożdży a rodzajem powierzchni, do której komórki przylegają. Na intensywność takiego procesu wpływają w znacznym stopniu czynniki środowiskowe (Bogusławska-Wąs i in. 2005). Pomimo że przedstawicielom drożdży nadano status form kwasolubnych, środowisko zasadowe generuje ich własności hydrofobowe. Taką zależność, stosując metodę MATH (ang. Microbial Adhesion to Hydrocarbons), ustalono we wcześniejszych badaniach własnych. W przypadku wszystkich testowanych szczepów *Rhodotorula* i większości *Cryptococcus* nasilenie własności hydrofobowych było znacznie większe w warunkach zasadowych niż w środowisku kwaśnym. W przypadku szczepów *Candida*, których obecność w przewodzie pokarmowym ryb oznaczano sporadycznie (tab. 13), tak jednoznacznych zależności nie stwierdzono.

Tabela 13. Procentowy udział gatunków drożdży izolowanych w przewodzie pokarmowym ryb

Gatunek drożdży	Gatunek ryby								
	leszcz			płoc			okoń		
	wiosna	lato	jesień	wiosna	lato	jesień	wiosna	lato	jesień
<i>C. colliculosa</i>	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. famata</i>	3,0	16,0	10,0	10,0	16,0	10,0	3,0	5,0	5,3
<i>C. gualermondi</i>	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	8,0	0,0	2,0	0,0
<i>C. holmii</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0
<i>C. membran.</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	3,8	0,0	0,0	2,0	0,0
<i>C. sake</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cr. laurenti</i>	2,0	11,0	5,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0
<i>Cr. uniguttulatus</i>	4,0	13,0	20,0	5,0	7,0	9,0	5,0	10,0	29,45
<i>P. carsonii</i>	10,0	5,0	10,0	0,0	0,0	2,0	0,0	5,0	0,0
<i>Rh. glutinis</i>	55,0	25,0	37,0	60,0	45,0	45,0	25,0	15,0	29,4
<i>Rh. mimuta</i>	0,0	0,0	1,0	0,0	6,6	5,5	0,0	0,0	0,0
<i>Rh. mucilaginosae</i>	20,0	10,0	15,0	25,0	17,6	11,0	73,0	60,0	23,0
<i>S. cerevisiae</i>	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,50	0,0	1,0	22,9
<i>Tr. mucoides</i>	1,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Przyczyny kolonizacji przez drożdże, przede wszystkim błony śluzowej jelita, wydają się oczywiste. W żołądku ryb drapieżnych stężenie jonów wodorowych jest na tyle niskie (pH 3,5–4,0), że może wspomagać trawienie i eliminować znaczne ilości drobnoustrojów. Jedynie w przypadku ryb karpiowatych (leszcza, płoci) kwaśny odczyn jest neutralizowany. Podstawowym pokarmem tych ryb są skorupiaki, których pH jest tak silnie zasadowe, że likwiduje kwaśny odczyn w żołądku. Nadtrawiony pokarm z żołądka przemieszcza się do jelita. Tam następuje jego dalsze trawienie i wchłanianie przyswajalnych składników. Dostępność związków odżywczych stymuluje rozwój heterotroficznych grzybów, a lekko zasadowe pH w jelicie (Gislasen i in. 1996) wspomaga cechy hydrofobowe ściany komórkowej



drożdży. Według Vazquez-Juareza i in. (1997) specyficzna adhezja drożdży wspomagana jest również poprzez obecność glikoproteinowych mucyn, wydzielanych przede wszystkim przez nabłonkowe komórki układu pokarmowego. Cechą charakterystyczną mucyn jest znaczna zawartość reszt serynowych, od których obecności uzależniony jest proces adhezji grzybów. Według Andlid i in. (1998) komórki drożdży znacznie silniej przylegają do fosfatydyloseryny (PS) niż do pozostałych fosfolipidów (PL), fosfatydylocholine (PC) i fosfatydyloetanolaminy (PE) zawartych w śluzie; przyczyną tego według ww. autorów jest systemem adsorpcji komórki do PS jako aminokwasu serynowego.

W tak zweryfikowanym schemacie zachowań należałoby może odnaleźć wyjaśnienie dywersyfikacji gatunkowej drożdży przewodu pokarmowego leszcza, płoci i okonia. W badanych próbach ustalono stałych rezydentów drożdży (bez względu na porę roku i miejsce w łańcuchu troficznym ryb) – tab. 13. Według Andlid i in. (1995) obecność drożdży w przewodzie pokarmowym jest na tyle bezpieczna, że nawet znaczna ich liczba nie wywołuje oznak chorobowych ryb. Większość obecnych w wodzie grzybów jednokomórkowych nie stanowi zagrożenia dla ich zdrowotności, jednak tak długo jak długo ryba znajduje się w dobrej kondycji. Opisane przez Mullera i Whislera (1994) przypadki zmian chorobowych ryb wskazują, iż czynnikiem etiologicznym infekcji były drożdże występujące w rybach zdrowych. Wszelkie zmiany w prawidłowo funkcjonującym organizmie mogą bowiem prowokować do nadmiernego rozwoju mikroflory potencjalnie chorobotwórczej.

Powszechne występowanie grzybów z rodzaju *Rhodotorula* i dominujący ich udział w ogólnej strukturze gatunkowej drożdży według ichtologów nie powinien być rozpatrywany w kontekście chorobowym. Drożdże izolowane z ryb słodkowodnych i morskich (Andlid 1995, Gatesoupe i in. 2005 a) zostały uznane za potencjalnie bezpieczne. Być może drożdże jako oportunistyczne patogeny nie są rozpoznawane przez ryby jako czynniki zagrażające ich bezpieczeństwu, a wręcz przeciwnie – traktowane są jako formy symbiotyczne. Zasiadlony przez drożdże przewód pokarmowy staje się niszą, w której zostaje zachowana aktywność fizjologiczna grzybów, a zdolność do produkcji poliamin (Buts i in. 1994, Vazquez-Juarez i in. 1997) i immunostymulacja dzięki obecności drożdżowego  $\beta$ -glukanu (Sakai 1999) zostaje wykorzystana w licznych procesach biologicznych metabolizmu ryb.

Przeprowadzone analizy wybranych struktur mykocenotycznych z estuarium Odry wykazały obecność dominujących gatunków w tym ekosystemie. W górnej strefie estuarium zdominowanym przez gromadę Ascomycota najczęściej i stale izolowanym gatunkiem był *S. cerevisiae*. W pozostałych strefach estuarium w składzie mykocenozy przeważali przedstawiciele Basidiomycota. Jak wykazano, istotny udział w kształtowaniu liczbowo-jakościowego profilu jednokomórkowych grzybów miały gatunki z rodzaju *Cryptococcus* i *Rhodotorula*. Dominacja określonych gatunków jest zazwyczaj uzależniona od czynników środowiskowych. W kontekście przeprowadzonego w poprzednich rozdziałach wniosku pozostaje ustalenie ewentualnego pochodzenia dominujących gatunków drożdży i stopnia ich zróżnicowania. Stanowi to podstawę rozpoczętego studium ekologii drożdży z tego obszaru. Ze względu na przeprowadzone już przez Bogusławską-Wąs i in. badania (2001, 2005, 2006, 2007), dotyczące występowania *S. cerevisiae* w środowisku estuarium Odry, w dalszej części niniejszej pracy skoncentrowano się na rodzajach *Rhodotorula* i *Cryptococcus*.



## 4.4. Ekologia rodzaju *Cryptococcus*

### 4.4.1. Wprowadzenie

Izolacja przedstawicieli rodzaju *Cryptococcus* z różnych biocenoz (Bogusławska-Wąs i Dąbrowski 1999, Bogusławska-Wąs i Dąbrowski 2001, Butinar i in. 2007, Pedroso i in. 2007, Cafarchia i in. 2008) spowodowała, że jego ekologiczna rola i miejsce w środowisku są rozbieżnie interpretowane. Przedstawiciele rodzaju *Cryptococcus* zidentyfikowano w subpolarnej strefie Arktyki, która jeszcze do niedawna była uważana za środowisko abiotyczne (de Garcia i in. 2007, Connell i in. 2008). Sugestie dotyczące łączenia tych form z ekosystemami o niewielkich zasobach pokarmowych wynikają z ich możliwości metabolicznych. Kimura i in. (1998) wykazali w swoich badaniach, że drożdże należące do klasy Basidiomycetes charakteryzuje zdolność do wykorzystywania związków odżywczych niedostępnych dla Ascomycetes. Stalo się to powodem dominacji określonych gatunków drożdży w środowisku i domniemania o ich powinowactwie z wodami oligotroficznymi (Brizzio i van Brocko 1998). Rosario i in. (2005) wskazują na możliwość wykorzystania substratów bogatych w niebiałkowe związki azotu do stymulacji wzrostu niektórych gatunków. Butinar i in. (2007) natomiast podkreślają zdolność tych grzybów do rozkładu azotu i długołańcuchowych związków węgla. Oparte na badaniach własnych obserwacje sugerują, że obecność *Cryptococcus* spp. w środowisku wodnym należy rozpatrywać jednak w odniesieniu do środowiska lądowego i zanieczyszczonego. Obecność kryptokoków oznaczana była bowiem w środowiskach o wysokim zanieczyszczeniu (Slavikova i Vadkertiova 1997, Pedroso i in. 2007, Medeiros i in. 2008). Powszechnie drobnoustroje te izolowane są z gleby i roślin. Ponadto kryptokoki uznaje się za naturalną część populacji mikrobiologicznej owadów i zwierząt. Wydaje się, że migracje tych drobnoustrojów zależne są od warunków atmosferycznych (Pedroso i in. 2007), kierunku wiatrów (Vishniac 2006) i wędrówki dzikich ptaków (Cafarchia i in. 2006), a więc utożsamianie tej grupy drobnoustrojów z wodami oligotroficznymi prawdopodobnie jest wynikiem błędnego wnioskowania.

Za sukces przeżycia grzybów z rodzaju *Cryptococcus* w środowisku o zmiennym profilu fizykochemicznym uznaje się ich zdolność do funkcjonowania w stanie długotrwałej anabiozy (Butimar i in. 2007), wysokiej tolerancji na głodzenie (Kimura i in. 1998), jak również zdolność do wytwarzania otoczki (Vishniac 2006). Ta zewnątrzkomórkowa struktura uznana jest za jeden z czynników wirulencji, której obecność najczęściej opisywana jest w związku z patogennym *Cr. neoformans*. Jej rola pomijana jest natomiast w przypadku innych gatunków tego rodzaju. Doering (2000) zwraca uwagę na ekologiczne znaczenie otoczki *Cr. laurenti*. Jej podstawowe funkcje rozpatruje się w kontekście protekcji. Przede wszystkim stanowi ona barierę fizyczną, oddzielającą komórkę drożdży od środowiska wraz z jego czynnikami hamującymi wzrost i namnażanie (Slavikova i Vadkertiova 2000). Odpowiedzią komórki na wszelkie fluktuacje zachodzące w środowisku są zmiany w strukturze otoczki lub jej grubości, co wpływa na przetrwanie tych drobnoustrojów w niekorzystnych warunkach (Vishniac 2006, Pedroso i in. 2007). Głównym polimerem otoczki jest glukuronoksylomannan (GXM), stanowiący 90% jej masy; pozostałe 7,0% stanowi galaktoksylomannan (GalXM). GXM budują trimery mannozy, pomiędzy nimi zaś usytuowane są reszty kwasu glukuronowego oraz ksyloza. Proces syntetyzowania otoczki jest bardzo skompliko-



wany i zależny od wielu parametrów. Granger i in. (1985) zauważyli, że czynnikami stymulującymi jest odpowiednie stężenie  $\text{CO}_2$  i  $\text{HCO}_3^-$ . Jest to prawdopodobnie związane z wykorzystaniem zasymilowanych związków węgla do produkcji polisacharydów, których część zostaje wykorzystana na potrzeby budowy otoczki, a część jest wydzielana do podłoża.

Zdolność kryptokoków do zasiedlania różnych środowisk, czego wyrazem jest ich heterogeniczny profil zdolności do wykorzystywania zróżnicowanych związków organicznych, była podstawą zaliczenia rodzaju *Cryptococcus* do drobnoustrojów kosmopolitycznych. Ostatecznie możliwość zasiedlenia przez te mikroekariotyczne organizmy odmiennych siedlisk spowodowała trudność w statystycznym wnioskowaniu o ich pochodzeniu, rozmieszczeniu i utrzymaniu się w naturalnych ekosystemach.

#### 4.4.2. Zróżnicowanie biochemiczne *Cr. laurenti* na tle rodzaju *Cryptococcus*

Mykologiczne studium drożdży estuarium Odry, oparte na konwencjonalnych technikach identyfikacyjnych, pozwoliło na stwierdzenie obecności czterech gatunków: *Cr. albidus*, *Cr. laurenti*, *Cr. neoformans* i *Cr. uniguttulatus*.

Na podstawie biochemicznej charakterystyki szczepów *Cryptococcus* spp. oraz ich zdolności do wzrostu w trzech temperaturach inkubacji został utworzony dendrogram obrazujący stopień podobieństwa analizowanych szczepów. Na podstawie analizy skupisk wyodrębniono główne grupy hierarchiczne (A, B, C i D), odzwierciedlające profil gatunku i jego zróżnicowanie enzymatyczne (rys. 18). W przypadku wyznaczonych grup wykazano wysokie zróżnicowanie biochemiczne badanych mikroorganizmów. Oparte na wybranych cechach biochemicznych zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe: *Cr. uniguttulatus* (grupa C-2), *Cr. neoformans* (grupa C-1) oraz *Cr. albidus* (grupa D) nie odzwierciedlało miejsca ich izolacji (rys. 18). Zgrupowane szczepy, opisane jako A i B, zostały utworzone jedynie przez *Cr. laurenti*. Interesujący wydaje się wynik analizy skupień określający powiązanie szczepów z zasiedlanymi przez nie strefami estuarium Odry. Jedynie w grupie A-1 znalazły się izolaty z różnych miejsc pobierania prób. Pozostałe profile enzymatyczne powstałe w obrębie *Cr. laurenti* występowały wyłącznie w wodach Odry szczecińskiej – grupa A-2, Zatoki Pomorskiej – B-1 oraz B-2 grupująca izolaty pochodzące z Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej (rys. 18).

Powiązanie obecności *Cr. laurenti* z poszczególnymi strefami estuarium powinno uwzględniać ich profil fizjologiczny; interpretacja kombinacji cech może być wówczas uzupełnieniem charakterystyki ekosystemu, z którego zostały wyizolowane poszczególne szczepy. Zdolność wykorzystania substratów w zastosowanych testach była różna w różnych grupach hierarchicznych. Szczepy izolowane z Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej (B-2) wyróżniała niezdolność do rozkładu glicerolu i erytrytolu.

Nieco odmiennie zarysowuje się profil grup B-1 i B-3, dla których – poza cechami opisującymi gatunek (Fell i in. 2000) – wykazano niezdolność asymilacji inozytolu i/lub glukozaminy. W badaniach prowadzonych przez Wang i in. (2007) taka rozbieżność była wystarczająca do zaproponowania wydzielenia nowego anamorficznego gatunku – *Cr. tibetensis* sp. nov. o profilu biochemicznie zbliżonym z fenotypową charakterystyką tybetańskiej grupy drożdży. Co prawda skorelowanie relacji enzymatycznych z miejscem izolacji szczepów *Cr. laurenti*



zostało potwierdzone, jednak wydaje się to niewystarczające do wyłonienia nowego gatunku. Bardziej poprawne wydaje się rozpatrywanie obecności grup o zbliżonym profilu aktywności enzymatycznej jako cesze właściwej szczepom *Cr. laurenti* i ich auksotroficznym wymaganiach niż „tworzenie” nowych jednostek taksonomicznych. Dlatego w kolejnych badaniach przeprowadzono analizę genetyczną tych szczepów, co pozwoliło ustalić ich ewentualne pochodzenie i poziom zróżnicowania genetycznego.

#### 4.4.3. Zróżnicowanie genetyczne *Cr. laurenti*

Behawioralne mechanizmy dotyczące drożdży z rodzaju *Cryptococcus* wskazują na euryekologiczny charakter tych mikroorganizmów (Khawcharoenporn i in. 2007). W układzie systematycznym, opartym na LSU rDNA regionu D1/D2, przedstawiciele tego rodzaju umieszczono w czterech różnych kładach: *Cystofilobasidiales*, *Filobasidiales*, *Trichosporonales* i *Tremellales* z klasy *Hymenomyces* (Fell i Kutzman 1990, Fell i in. 2000). Fizjologiczno-morfologiczny profil drożdży, na którym oparty jest status taksonomiczny rodzaju *Cryptococcus*, według Renker i in. (2004) jest wciąż zbyt mało precyzyjny i pozwala na rozpoznanie niewielkiej liczby gatunków w stosunku do rzeczywiście występujących.

Z uwagi na polifiletyczną naturę rodzaju *Cryptococcus* definiowanie powiązań ekologicznych drożdży w środowisku estuarium Odry, oparte jedynie na konwencjonalnych testach biochemicznych, może prowadzić do błędnych wniosków. Stają się one wówczas wyłącznie spekulacjami ekologicznymi. W celu uzyskania profilu pokrewieństwa genetycznego szczepów *Cryptococcus* w obrębie gatunku wykorzystano jedną z technik reakcji łańcuchowej polimerazy – RAPD-PCR. Jest to technika, która pozwala na szybką analizę zróżnicowania genetycznego dużej grupy szczepów, w obrębie których powielane są przypadkowe fragmenty DNA. Mogą być one unikatowe dla danego organizmu, ale być nimi nie muszą. Sposób grupowania szczepów i uzyskiwane wyniki ich różnicowania genetycznego zależą od empirycznie dobranej startera. Pomimo że technika RAPD uznana została za jedną z lepiej różnicujących w metodach PCR (Olive i Bean 1999) i odpowiednią dla drożdży (Baleiras Couto i in. 1994, Grahań i in. 1994, Andrighetto i in. 2000), w niektórych przypadkach nie jest możliwe uzyskanie jednoznacznych rezultatów. Najczęściej jest to wynikiem mało rygorystycznych warunków, w których następuje przypadkowe przyłączanie się starterów do matrycy DNA. Skutkiem np. niskiej temperatury hybrydyzacji może być niepełne łączenie się starterów i uzyskanie tzw. białych prążków i zmniejszenie powtarzalności oznaczeń. Często wspomniany brak stabilności i odtwarzalności zastosowanej metody wynika z doboru reagentów PCR (Teylor i in. 1997), jak również z warunków technicznych (Grundmann i in. 1997, Blixt i in. 2003). W badaniach własnych przeprowadzona standaryzacja metody RAPD-PCR zminimalizowała jednak pojawianie się niepożądanych efektów i uzyskiwanie powtarzalnych wyników analiz.

Analizę zróżnicowania genetycznego oparto na szczepach *Cr. laurenti* ze względu na ich stałą obecność we wszystkich próbach badawczych. Analiza klasterowa wyizolowanych szczepów *Cr. laurenti* pozwoliła na wyróżnienie pięciu grup izolatów o znacznym stopniu zróżnicowania profili genetycznych RAPD (rys. 19). Zgrupowanie wszystkich wyizolowanych szczepów tego gatunku w zakresie 10–20% wskazuje na ich odmienną genetyczną i brak pokrewieństwa. W obrębie poszczególnych grup, w których zgodność wzorów RAPD szczepów ustalono



na poziomie podobieństwa  $50\% < S < 70\%$ , wyróżniono izolaty o prawdopodobnym pokrewieństwie. Wydzielone typy genetyczne łączy środowisko izolacji. Genotypy szczepów: I/A, I/B, II/A i II/B, IV oraz V/A i V/B pochodziły jedynie z wód Odry. Sporadycznie izolowane z ryb szczepy *Cr. laurenti* były również zawarte w powyższych układach klasterowych; w pozostałych ich obecności nie stwierdzono (tab. 14).

Tabela 14. Obecność genotypów *Cr. laurenti* w poszczególnych strefach estuarium Odry

Grupa	Typ genetyczny	Środowisko izolacji szczepów			
		Odra	Zalew Szczeciński	Zatoka Pomorska	ryby
		podtyp genetyczny			
$S < 50,0\%*$	$50,0\% < S < 70,0\%*$	$S > 70,0\%*$			
I	A	+	-	-	-
	B	+	-	-	-
II	A	+	-	-	+
	B	+	-	-	+
	C	+	+	-	-
	D	+	+	-	-
III	A	+	+	-	-
	B	+	+	-	-
IV	A	+	-	-	-
V	A	+	-	-	+
	B	+	-	-	+
	C	+	+	+	-
	D	+	+	+	-
	E	+	+	-	-
	F	-	+	-	-
	G	-	+	-	-

\* Poziom podobieństwa wyznaczony przy współczynniku Dice wynoszącym 3,0%.

Mimo że w większości przypadków stopień podobieństwa pomiędzy szczepami ( $S > 75\%$ ) mógłby wskazywać na ich bliskie pokrewieństwo, obecność aż sześciu genotypów wskazuje na różne źródła ich pochodzenia. Podobny wniosek można sformułować również w przypadku pozostałych skupień: II/C, II/D, III/A, III/B i V/E (rys. 19). W tym jednak przypadku za podstawowy powód różnorodności przyjęto miejsce izolacji zgromadzonych w genotypach szczepów z Odry i Zalewu Szczecińskiego (tab. 14). Zastanawiająca jest sporadyczność oznaczenia niektórych genotypów *Cr. laurenti*, np. I/A, V/F czy V/G (rys. 19). Ich występowanie, ograniczone do określonej strefy estuarium, może wskazywać na allochtoniczne pochodzenie tych szczepów. Być może zawleczone z obszarów śródładowych nie przeżywają w nietypowym dla siebie środowisku lub przechodzą w stan anabiozy. Z powodu plastyczności ekologicznej grzybów z rodzaju *Cryptococcus* i ich zdolności adaptacyjnych bardziej prawdopodobne jest to, iż są to formy, które nie preferują tworzenia społeczności planktonowych (co opisano w rozdz. 4.6); ich obecność w toni wodnej jest ograniczona.



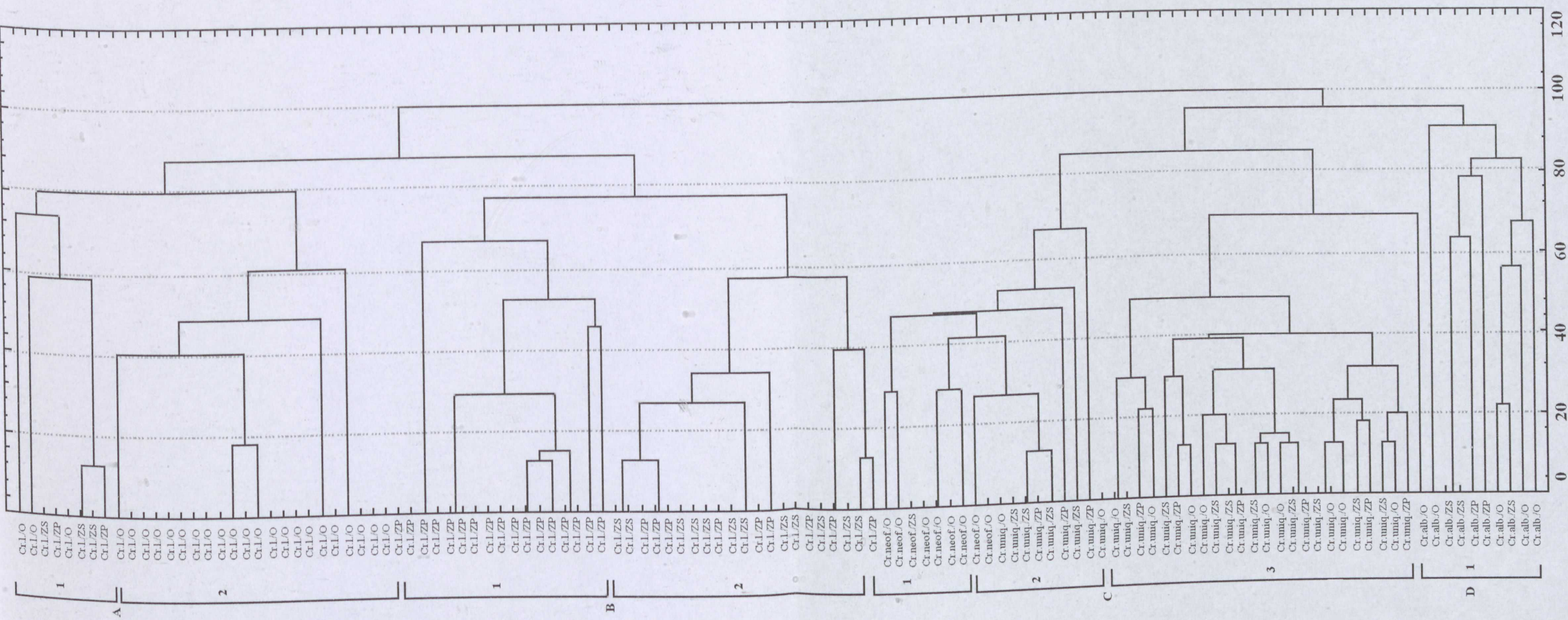
Tabelaryczne zestawienie wyróżnionych genotypów wskazuje, iż szczepy *Cr. laurenti*, obecne w Zalewie Szczecińskim i Zatoce Pomorskiej, zostały zawleczone z górnego estuarium Odry. Istotny stopień zróżnicowania genetycznego, ustalony na podstawie uzyskanych profili RAPD, może świadczyć o ich różnym pochodzeniu. Wysoka heterogeniczność profili uzyskanych z amplifikacji DNA genowego szczepów *Cr. laurenti* sugeruje, że mało prawdopodobne jest to, że są to szczepy autochtoniczne. Wprawdzie niektóre gatunki z rodzaju *Cryptococcus* znane są z możliwości tworzenia kompleksów z innymi mikroorganizmami, co może determinować ich odmienność genetyczną i biochemiczną, ale nie jest to wystarczające do wyjaśnienia istotnych różnic pomiędzy wyznaczonymi genotypami. Z dużym dystansem należy podejść do poszukiwania jednoznacznego powinowactwa profilu genetycznego tego gatunku i jego pochodzenia. Środowisko naturalne poddane silnej antropopresji nie jest układem biologicznie stabilnym. Kryptokoki uznane są za naturalną mikrobiotę gleby (Vishniac 1995, Lachance i Starter 1998, Wuczkowski i Prillinger 2004), z której wraz z roztopami mogą być wprowadzane do wód estuariowych i współtworzyć naturalną mykocenozę wód. Istotnym źródłem szczepów z rodzaju *Cryptococcus* jest również ptactwo wędrujące (Rosario i in. 2005), w tym obecne na badanym obszarze mewy.

#### 4.5. Ekologia rodzaju *Rhodotorula*

##### 4.5.1. Wprowadzenie

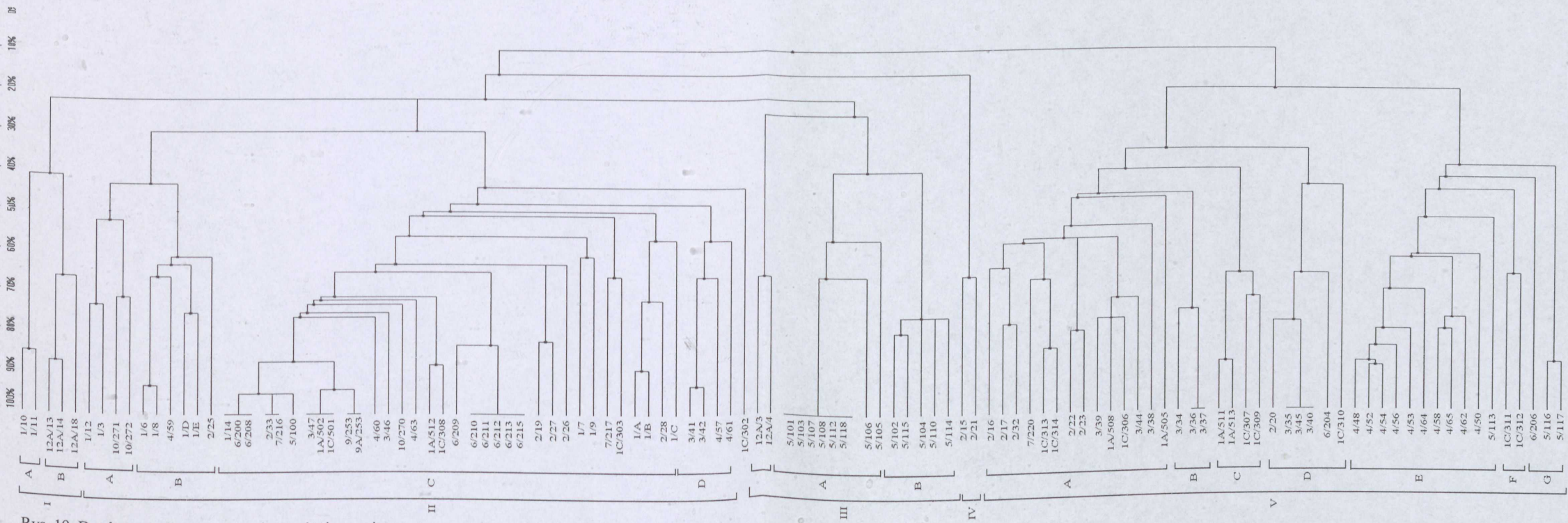
Jednostką systematyczną wspólną dla dominujących w estuarium Odry rodzajów drożdży – *Cryptococcus* i *Rhodotorula* w gromadzie Basidiomycota jest jedynie klasa Urediniomycetes. W przypadku obu rodzajów możemy rozważać kosmopolityczny charakter grzybów i ich duże zdolności adaptacyjne. Z ekologicznego punktu widzenia formy te zostały powiązane ze środowiskiem wodno-łądowym (Nagahama 2006). Obecność drożdży, w tym analizowany w niniejszej rozprawie rodzaj karotenogenicznych grzybów *Rhodotorula* opisywany jest w związku z bardzo różnymi środowiskami. Grzyby te izolowane są powszechnie z wód słodkich (Bogusławska-Wąs i Dąbrowski 2001, Krzyściak i in. 2007, Niewolak i in. 2009), ze ścieków komunalnych, z osadów dennych (Bogusławska-Wąs i Dąbrowski 1999, Nagahama i in. 2001) roślin, zwierząt i powietrza (Krzyściak i in. 2007). Butimar i in. (2007) ustalili obecność tych grzybów w lodowcach arktycznych, w których populacja przedstawicieli rodzaju *Rhodotorula* była zadziwiająco duża ( $4,0 \cdot 10^3$  jtk  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), w porównaniu z wodami polodowcowymi (0,0–0,25 jtk  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>). Ta grupa mikrogrzybów stanowi również ważną część mikrobioty obecnej w glebach Antarktydy oraz w wiecznej zmarzlinie Syberii (Krzyściak i in. 2007). Według Butimara i in. (2007) drożdże izolowane z subpolarnych środowisk reprezentują grupę psychrofilnych i halofilnych mikroorganizmów. Według tych autorów istnieje związek pomiędzy adaptacją drożdży do niskiej temperatury a tolerancją zwiększonego zasolenia wody. Powyższa hipoteza została oparta na przykładzie *Rh. mucilaginoso* – jednego z dominujących gatunków izolowanych z lodowca, który był zdolny do reprodukcji w niskiej temperaturze i przy wysokim stężeniu chlorku sodu (17,0%). Natomiast Libkind i in. (2003) przeanalizowali zbiorniki wodne w północnej Patagonii w Argentynie (jeziora, rzeki i zatoki) o zróżnicowanym stopniu oligotrofii. W swoich badaniach wykazali, że w większości prób obecne były tzw. czerwone drożdże, które stanowiły 50,0%





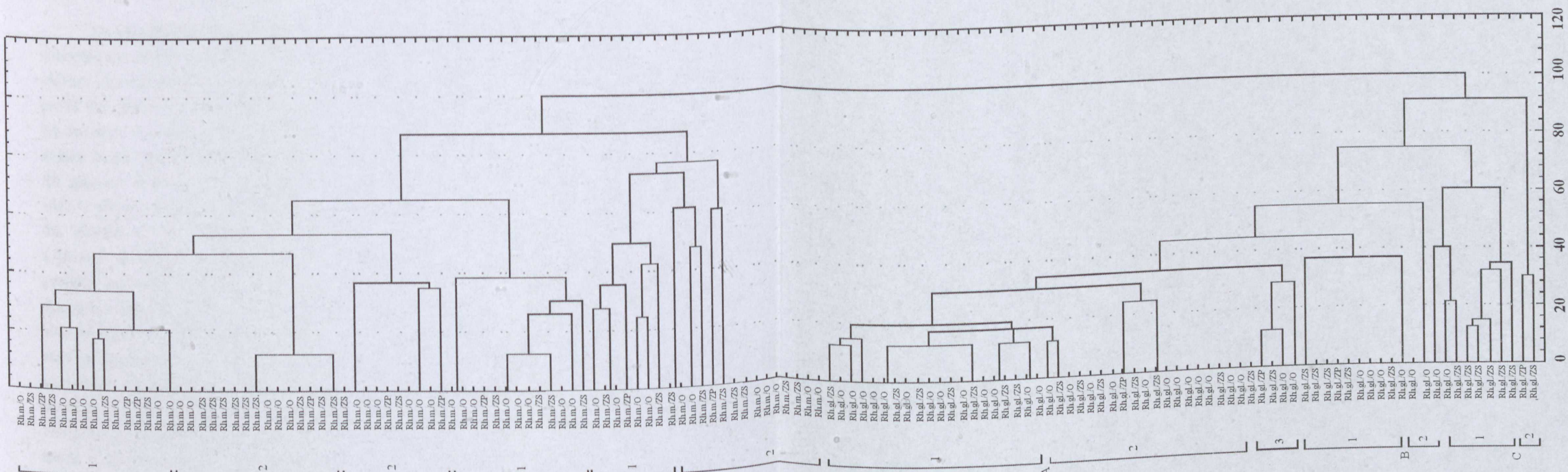
Rys. 18. Stopień zróżnicowania biochemicznego szczepów *Cryptococcus* spp. Cr.l. - *Cr. laurenti*, Cr. neof. - *Cr. neoformans*, Cr. uniq. - *Cr. uniguttulatus*, Cr. alb. - *Cr. albidus*, O - Odra, ZS - Zalew Szczeciński, ZP - Zatoka Pomorska





Rys. 19. Dendrogram obrazujący poziom zróżnicowania genetycznego szczepów *Cr. laurenti*.  
 Poziom podobieństwa wyznaczono przy współczynniku Dice wynoszącym 3,0%





Rys. 20. Zróżnicowanie biochemiczne szczepów *Rhodotorula* spp. Rh. m. – *Rh. mucilaginosa*, Rh. gl. – *Rh. glutinis*, O – Odra, ZS – Zalew Szczeciński, ZP – Zatoka Pomorska



ogólnej liczby izolowanych grzybów. Jedynie w środowiskach o nieznacznym wpływie aktywności ludzkiej częstość ich izolacji była znacznie mniejsza; obecności przedstawicieli *Rh. mucilaginosa* nie stwierdzono w żadnej z prób. W ekosystemach charakteryzujących się ograniczonym oddziaływaniem antropogenicznym nisze zdominowane były przez ballistosporeniczne gatunki zaliczane do *Sporidiobolus longiusculus* i *Sporobolomyces patagonicus* (Libkind i in. 2005). Libkind i in. (2003) wykazali, że zwiększająca się liczebność drożdży, w tym drożdży czerwonych, stanowić może jedynie szacunkowe odzwierciedlenie intensywności wpływu czynników biotycznych i abiotycznych kształtowanych przez siedliska ludzkie.

#### 4.5.2. Zróżnicowanie biochemiczne *Rh. mucilaginosa* i *Rh. glutinis*

Dywersyfikacja przestrzenna szczepów *Rhodotorula* w wodach o zróżnicowanej zasobności nutrientów wynika z ich umiejętności dostosowania własnego metabolizmu do charakteru ekologicznego zajmowanej niszy. Uzyskane wyniki badań własnych wskazują, że profil enzymatyczny szczepów *Rh. glutinis* i *Rh. mucilaginosa* nie był zależny od miejsca ich izolacji. W wyniku przeprowadzonej analizy skupień uzyskano cztery grupy charakteryzujące stopień podobieństwa pomiędzy izolatami *Rh. mucilaginosa* i trzy charakteryzujące *Rh. glutinis*. W przypadku obu gatunków jedynie ze szczepów izolowanych z ryb utworzone zostały grupy o największym podobieństwie fenotypowym – *Rh. mucilaginosa* A-2 (> 80,0%), *Rh. glutinis* A-1 (> 70,0%). Ważne jest to, że nie miało znaczenia miejsce połowu ryby, z których pochodziły szczepy (rys. 20). Sporadyczność szczepów środowiskowych w tych grupach może świadczyć o specyficzności cech – właściwych jedynie dla szczepów pozyskanych z ichtiofauny, których obecność należałoby rozważyć jedynie poprzez pryzmat auksoτροφicznych czynników stymulujących ich wzrost. Poprawny wydaje się wniosek, że egzystencja grzybów z rodzaju *Rhodotorula* w środowisku estuarium Odry wynika przede wszystkim z metabolicznych cech tych drobnoustrojów, w mniejszym zaś stopniu warunkowana jest profilem ekologicznym środowiska. Na uwagę zasługuje również fakt, iż we wszystkich grupach oznaczono szczepy izolowane z górnej strefy estuarium, co świadczyć może o ich pierwotnym śródładowym pochodzeniu. Takie przypuszczenie wyjaśnia brak specyficzności biochemicznej szczepów *Rh. glutinis* i *Rh. mucilaginosa* w przypadku substratów z określonym źródłem węgla (rys. 20), izolowanych z różnych stref estuarium.

W przeciwieństwie do *Cr. laurenti* w przypadku grzybów z rodzaju *Rhodotorula* nie wykazano powinowactwa profilu enzymatycznego z miejscem ich izolacji. Zastanawiające jest w związku z tym to, czy przy braku odpowiedzi enzymatycznej drożdży karotenoidowych na warunki środowiskowe ich zróżnicowanie genetyczne umożliwi wyznaczenie stopnia pokrewieństwa i ewentualnego pochodzenia badanych szczepów.

#### 4.5.3. Zróżnicowanie genetyczne *Rh. mucilaginosa* i *Rh. glutinis*

Typowaniu metodą RAPD-PCR poddano 108 szczepów *Rh. mucilaginosa*. Na podstawie podobieństwa uzyskanych wzorów genetycznych wyróżniono sześć typów, dla któ-



rych stopień pokrewieństwa został oznaczony na poziomie  $S < 50,0\%$ . Fakt jego stwierdzenia na tak niskim poziomie wskazuje na całkowicie odmienne pochodzenie badanych szczepów. W typach I i IV zgromadzono najmniej przedstawicieli tego gatunku izolowanych z Odry. Wyznaczony stopień podobieństwa w tych genotypach mieścił się w zakresie  $50,0\% < S < 70\%$ . W II typie genetycznym zgromadzono najwięcej szczepów wyizolowanych z całego obszaru estuarium. Wyznaczony pomiędzy genotypami II/A i II/B stopień podobieństwa może wskazywać na ich prawdopodobne pokrewieństwo. W większości przypadków zgodność wzorów uzyskanych w reakcji RAPD-PCR ustalono na  $S > 70,0\%$ . Szczegółowa analiza dendrogramu (rys. 21) wskazuje, że najmniejsze zróżnicowanie genetyczne charakteryzuje typ II/B-2, w którym zgrupowano szczepy o bliskim pokrewieństwie ( $S > 80,0\%$ ). Obecne w nim drożdże izolowane były ze wszystkich stref estuarium (tab. 15). Wyjątkami były nielicznie reprezentowane przez szczepy *Rh. mucilaginosa* podtypy A-4 i B-3, których obecność oznaczono jedynie w wodach Odry i sporadycznie w śluzie ryb (rys. 21). Nieznacznym zróżnicowaniem gatunkowym analizowanych szczepów charakteryzowały również genotypy III/A i III/B. W przeciwieństwie jednak do typu II wyznaczono je w określonych strefach estuarium (rys. 21).

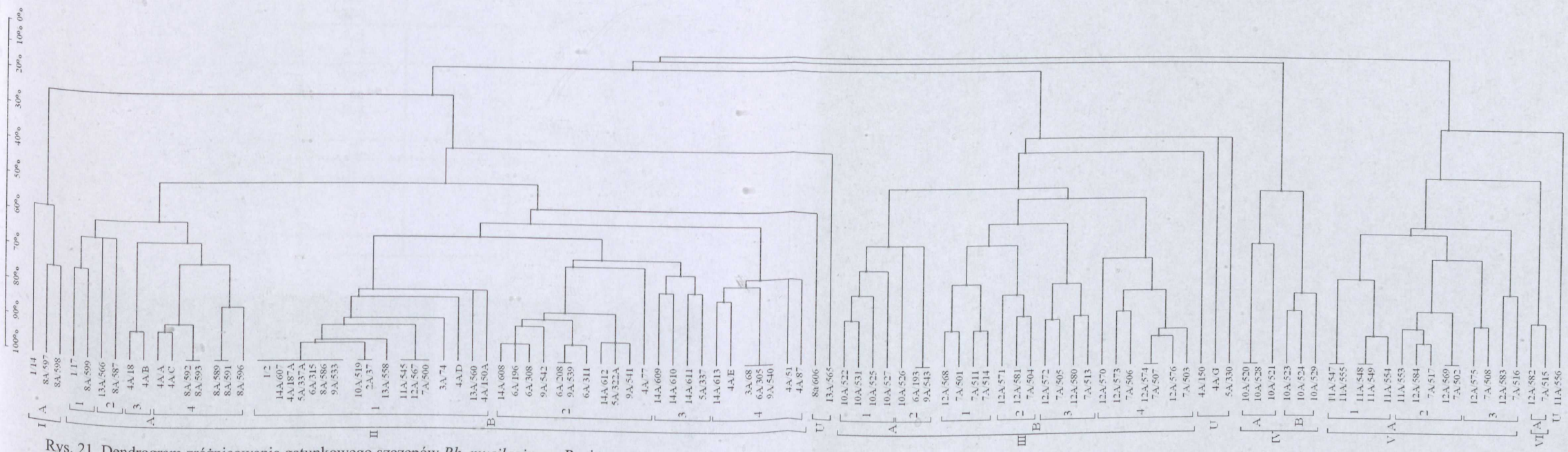
Najbardziej odmiennym profilem uzyskanych wzorów RAPD (rys. 22) charakteryzowała się grupa V, którą stanowiły szczepy izolowane wyłącznie z ryb. Ustalono, że odrębny profil genetyczny charakteryzował szczepy izolowane wyłącznie z przewodu pokarmowego ryb i opisane jako V/A i VI/A (tab. 15). Wydaje się również istotne, że w większości przypadków koreluje on z gatunkiem ryby, z której został pozyskany. Takiej zależności nie stwierdzono w przypadku uzyskanych profili genetycznych szczepów II/A i II/B izolowanych ze śluzu (tab. 15). Stopień podobieństwa do szczepów „wodnych” wskazuje, że ich obecność w warstwie śluzowej ryb była wynikiem przypadkowej adherencji drożdży obecnych w środowisku bytowania badanych przedstawicieli ichtiofauny.

Na podstawie zestawienia tabelarycznego genotypów *Rh. mucilaginosa* (tab. 15) stwierdzono, że obecność tego gatunku w środowisku estuarium jest wynikiem zawleczenia z obszaru śródlądowego. W zasadzie wszystkie wyznaczone genotypy izolowane były z pierwszych stacji badawczych wyznaczonych na obszarze estuarium, co potwierdza niniejsze wnioskowanie. Istotne jest również znacznie większe podobieństwo szczepów typowanych metodą RAPD, co może świadczyć o mniejszym wpływie środowiska lądowego na ekologię tego gatunku.

Zbliżony stopień zróżnicowania genetycznego uzyskano dla szczepów *Rh. glutinis*, których przeanalizowano 70. Dla uzyskanych profili genetycznych, przy współczynniku Dice wynoszącym  $3,0\%$  i poziomie podobieństwa  $S < 50,0\%$ , wyznaczono dwie grupy (I, II). Najliczniejsza była grupa I, w której na podstawie stopienia podobieństwa  $50,0\% < S < 70,0\%$  wyznaczono trzy genotypy (A, B, C) z blisko spokrewnionymi podtypami przy  $S > 75,0\%$  (rys. 23).

Na podstawie wzorów amplifikonów *Rh. glutinis* stwierdzono, że wyróżnione typy genetyczne nie były specyficzne dla miejsca izolacji, bowiem w każdym podtypie genetycznym ustalono obecność przedstawicieli pochodzących z różnych obszarów estuarium (tab. 16).



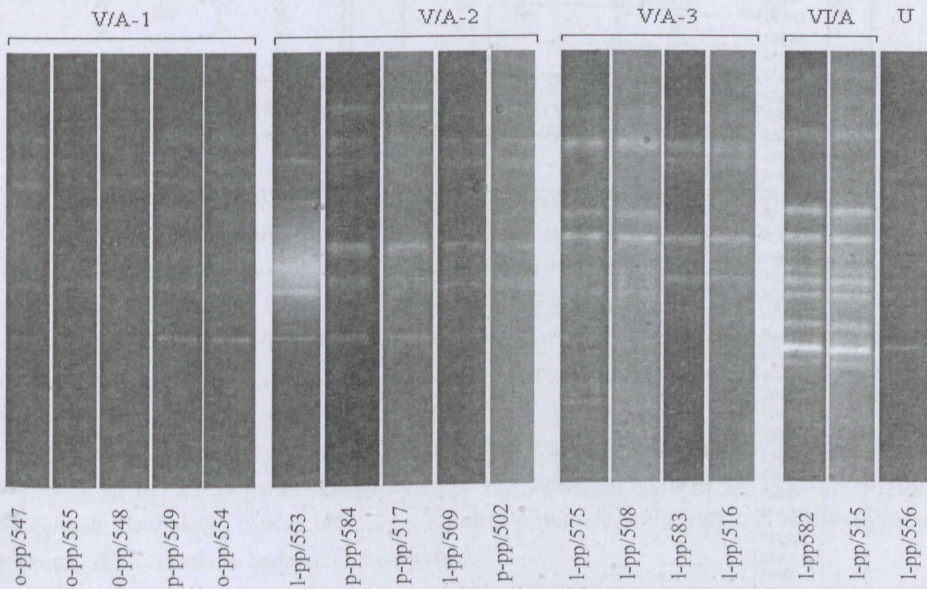


Rys. 21. Dendrogram zróżnicowania gatunkowego szczepów *Rh. mucilaginosa*. Poziom podobieństwa wyznaczono przy współczynniku Dice wynoszącym 3,0%



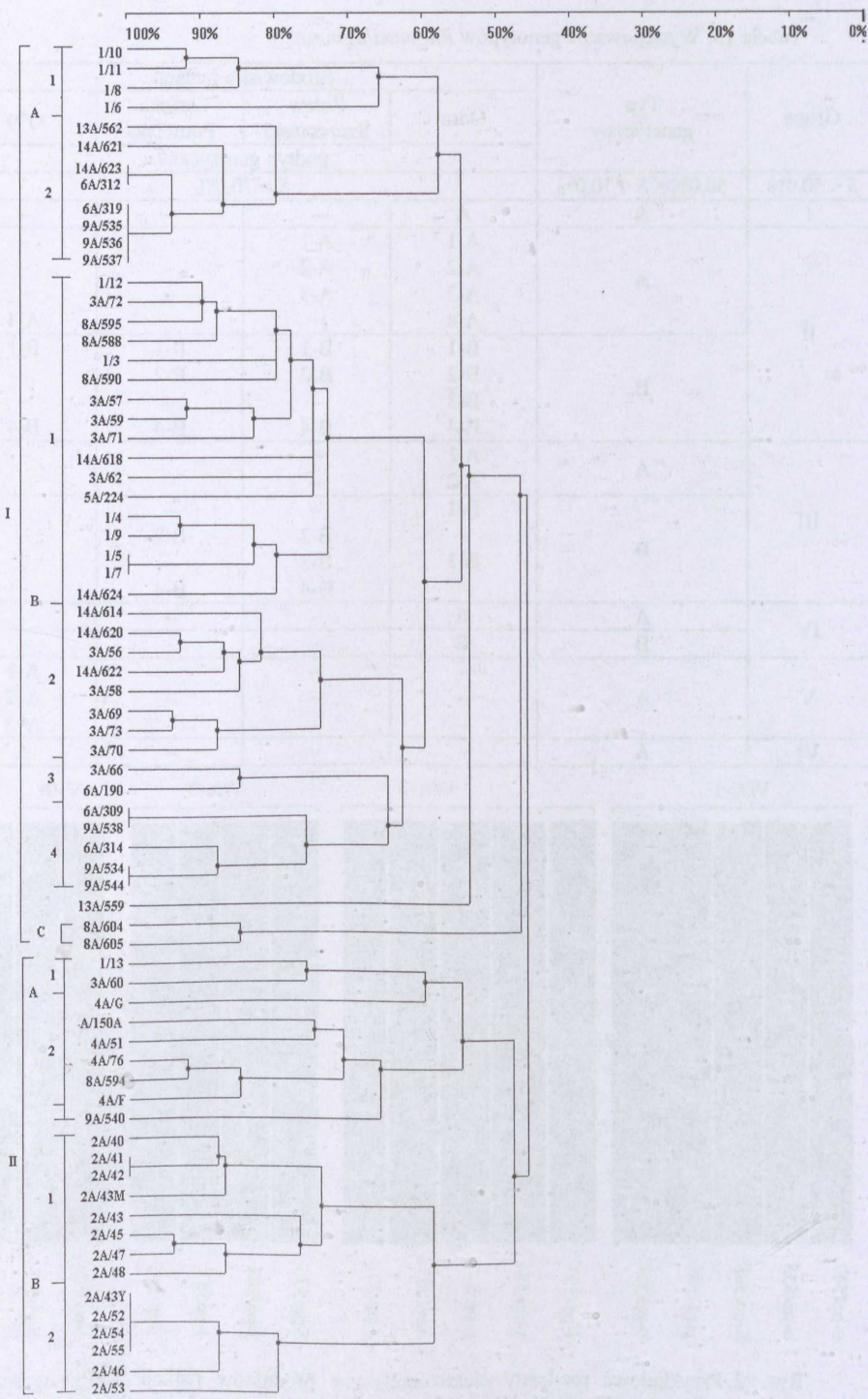
Tabela 15. Występowanie genotypów *Rh. mucilaginosa*

Grupa	Typ genetyczny	Środowisko izolacji			
		Odra	Zalew Szczeciński	Zatoka Pomorska	ryby
		podtyp genetyczny			
$S < 50,0\%$	$50,0\% < S < 70,0\%$	$S > 70,0\%$			
I	A	A	–	–	–
II	A	A-1	A-1	–	–
		A-2	A-2	–	–
		A-3	A-3	–	–
		A-4	–	–	A-4
	B	B-1	B-1	B-1	B-1
		B-2	B-2	B-2	–
		B-3	–	–	–
		B-4	B-4	B-4	B-4
III	A	A-1	–	–	–
		A-2	–	–	–
	B	B-1	–	–	–
		–	B-2	B-2	–
		B-3	B-3	–	–
		–	B-4	B-4	–
IV	A	A	–	–	–
	B	B	–	–	–
V	A	–	–	–	A-1
		–	–	–	A-2
		–	–	–	A-3
VI	A	–	–	–	A



Rys. 22. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów reakcji RAPD wybranych szczepów *Rh. mucilaginosa* izolowanych z przewodu pokarmowego ryb. o – okoń, l – leszcz, p – płoć, pp – przewód pokarmowy, U – genotyp unikatowy, V/A, VI/A – grupy typów genetycznych

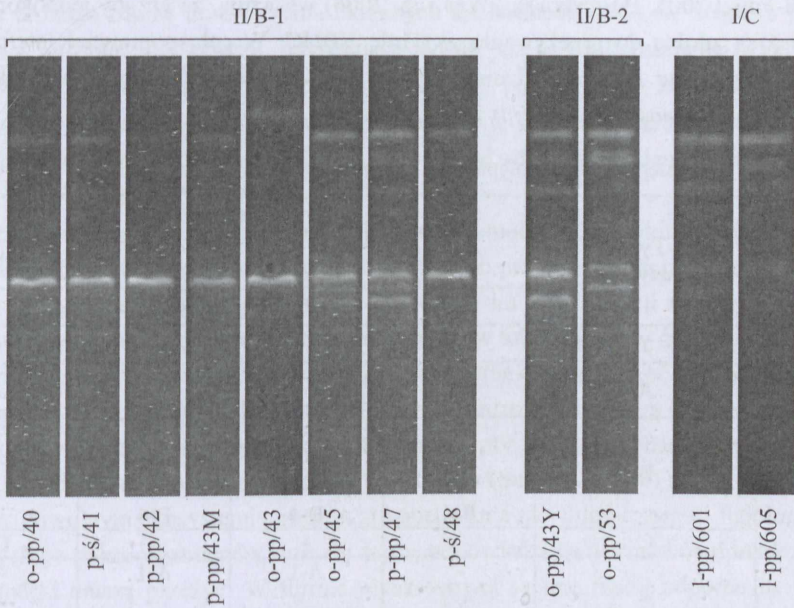




Rys. 23. Dendrogram różnicowania gatunkowego szczepów *Rh. glutinis*. Poziom podobieństwa wyznaczono przy współczynniku Dice wynoszącym 3,0%



Nieco odmiennym zgrupowaniem analizowanych szczepów charakteryzował się typ II. Szczególną uwagę zwrócono na genotyp II/B. Jego profil został bowiem utworzony jedynie ze wzorów RAPD pochodzących z ryb i powiązanych na poziomie  $S = 60,0\%$  z profilem genetycznym szczepów pochodzących z Odry. Tak jak w przypadku odrębnego „rybiego” genotypu *Rh. mucilaginosa* również w przypadku *Rh. glutinis* przeanalizowano wzory profili uzyskane po rozdziale elektroforetycznym (rys. 24).



Rys. 24. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów reakcji RAPD dla wybranych szczepów *Rh. glutinis* izolowanych z ryb. o – okoń, p – płoć, l – leszcz, pp – przewód pokarmowy, ś – śluz, II/B-1, II/B-2, I/C – typy genetyczne

Wyznaczony statystycznie poziom podobieństwa pomiędzy poszczególnymi szczepami *Rh. glutinis* izolowanymi z ryb (typ II/B) był niewystarczający do jednoznacznego stwierdzenia preferencji do zasiedlania przez nie niszy ekologicznej. W wyodrębnionym typie znalazły się szczepy izolowane z przewodu pokarmowego ryb, jak również ze śluzu. Ponadto typ genetyczny II/B nie obejmował szczepów pochodzących z leszcza. Izolowane z osobników tego gatunku drożdże wykazały podobieństwo (na poziomie  $S > 50,0\%$ ) jedynie do szczepów zgrupowanych w typie I (tab. 16).

Podobnie jak w przypadku *Rh. mucilaginosa* najwięcej genotypów *Rh. glutinis* pochodziło z górnej strefy estuarium Odry (tab. 16). Sporadyczność oznaczenia genotypów wyłącznych dla Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej świadczy o śródlądowym pochodzeniu *Rh. glutinis* w badanym ekosystemie.

Zawarte w tab. 16 profile genetyczne wskazują, iż granicą ekologiczną dla przeżywalności i/lub rozwoju drożdży tego gatunku jest Zalew Szczeciński. Dotyczy to również oznaczonych w estuarium Odry *Cr. laurenti* i *Rh. mucilaginosa*. Ponadto opisane w niniejszym rozdziale wyniki doświadczeń upoważniają do wniosku, iż badane szczepy drożdży



zostają do środowiska zalewu i zatoki zawleczone z wodami Odry. Sprzyjający przeżyciu tych form profil ekologiczny estuarium umożliwił szczepom allochtonicznym współtworzenie rdzennej mikrobiocenozy, stając się wtórnie autochtoniczną (ang. *indigenous*) mykobiota estuarium Odry. Przyjęcie jednak *a priori* takiego wniosku obarczone może być znacznym błędem. Drobnoustroje bakteryjne w warunkach niesprzyjających przechodzą w formę komórek żywych, ale niehodowlanych – VBNC. Pojedyncze publikacje (Divol i Lonvaud-Funel 2005, Bogusławska-Wąs i in. 2006) wskazują, że grzyby jednokomórkowe również są zdolne do przeżywania w stanie VBNC. W celu poprawnej interpretacji uzyskanych wyników przeprowadzono testy przeżywalności zróżnicowanych filogenetycznie *Rh. mucilaginosa*, *Rh. glutinis* i *Cr. laurenti*.

Tabela 16. Występowanie genotypów *Rh. glutinis*

Grupa	Typ genetyczny	Środowisko izolacji			
		Odra	Zalew Szczeciński	Zatoka Pomorska	ryby
		podtyp genetyczny			
$S < 50,0\%$	$50,0\% < S < 70,0\%$	$S > 70,0\%$			
I	A	A-1	A-1	–	–
		A-2	A-2	A-2	–
	B	B-1	B-1	–	B-1
		B-2	B-2	–	B-2
	–	B-3	–	B-3	
	B-4	B-4	B-4	–	
	C	–	–	–	C
II	A	–	A-1	A-1	–
		A-2	–	–	–
		A-3	A-3	–	–
	B	–	–	–	B-1
B-2		–	–	B-2	

## 4.6. Strategie przeżycia drożdży w środowisku estuarium Odry

### 4.6.1. Wprowadzenie

W środowisku naturalnym obecność określonego drobnoustroju i forma wzrostu jest wypadkową jego możliwości fizjologicznych oraz serii czynników fizykochemicznych. Wszelkie zmiany temperatury, wilgotności, pH, dostępności związków odżywczych czy pojawienie się substancji toksycznych stają się przyczyną zmian kształtu komórki, aktywności metabolicznej czy tempa namnażania. W systemach o ściśle określonych zależnościach ekologia mikroorganizmów opiera się na wzajemnych relacjach biotycznych, w których mikroorganizmy żyjące pojedynczo mają znacznie mniejsze szanse na przeżycie. Dlatego coraz częściej ich funkcjonowanie w formie pojedynczej rozpatrywane jest jako przypadkowe lub sporadyczne.

Wśród organizmów naturalnie bytujących w ekosystemach wodnych zaliczane do mikroorganizmów: bakterie, grzyby i pierwotniaki uważa się za formy zdolne do formowa-



nia złożonych społeczności (Marechal i in. 2004). Ich struktura i funkcja są determinowane cechami form współtworzących mikrosystem oraz warunkami środowiskowymi. Według Costerton i in. (1987) na przebieg procesów metabolicznych takich społeczności, poza wymaganiem pokarmowymi, istotnie wpływa struktura sieci mikrobiologicznej ekosystemu. Z obserwacji własnych wynika, że obecne w środowisku filtratory (np. *Daphnia magna*), poza bakteriami, odżywiają się również jednokomórkowymi grzybami. Dla wyżeraczy I stopnia drożdże zdolne do tworzenia złożonych społeczności stają się źródłem pokarmu bogatym w substancje odżywcze. Interesujące jednak jest to, że konsumenci wykorzystują przede wszystkim wydzielane przez mikroorganizmy polimeryczne związki zewnątrzkomórkowe. Ich wydzielanie do środowiska zewnętrznego i zróżnicowanie chemiczne zależą od profilu genetycznego drobnoustroju, jak również od adaptacji do danych warunków otoczenia (Sutherland 2001, Yin i in. 2005).

Zawieszona w powstałym *matrix* pojedyncze komórki tworzą biofilm, którego podstawową rolę jest ich ochrona. Wynika to zapewne z faktu przestrzennego ograniczenia drobnoustrojów przez związki pozakomórkowe i ułatwienia im komunikacji międzykomórkowej, dzięki której w odpowiedzi na pojawienie się czynników toksycznych w środowisku następuje spowolnienie tempa wzrostu, limitowanie konsumpcji oraz ekspresja genów oporności. Należy jednak pamiętać, że w formie planktonowej mikroorganizmy również są zdolne do formowania wielokulturowych społeczności, których komponenty egzopolisacharydowego *matrix* są tożsame z produktami klasycznie rozumianego biofilmu (Sutherland 2001).

W dowolnym ekosystemie poziom zróżnicowania morfologicznego i fizjologicznego tworzących go mikroorganizmów staje się formą odpowiedzi na warunki środowiska, w których komórki muszą przeżyć. W formie planktonowej są one mniej odporne na niektóre czynniki chemiczne niż komórki schronione w biofilmie (Marx i in. 2004, Theraud i in. 2004, Jin i in. 2005). Zatem w przypadku większości drobnoustrojów naturalną konsekwencją zmian jest preferencja do formowania społeczności, których podstawową rolę jest ich ochrona i utrzymanie funkcji życiowych. W związku z tym obecność pojedynczych komórek rozpatrywana jest zazwyczaj jako etap przejściowy pomiędzy uwolnieniem komórek z biofilmu a zainicjowaniem tworzenia nowej zorganizowanej społeczności mikrobiologicznej.

Rozwój biofilmu w środowisku wodnym przez formy mykocenotyczne jest praktycznie nieznaną. Wiedza na ten temat oparta jest przede wszystkim na opracowaniach medycznych i dotyczy przede wszystkim *C. albicans* (Chandra i in. 2001, Yin i in. 2005) oraz laboratoryjnych szczepów *S. cerevisiae* (Guldal i Broach 2006). Studia nad formowaniem ewentualnych społeczności stały się niezbędne do zrozumienia ekofizjologicznych procesów zachodzących w środowisku naturalnym. W kontekście omówionej w rozdz. 4.1 i 4.2 zmienności liczby i struktury gatunkowej drożdży pojawiła się konieczność wykazania ewentualnych możliwości przeżycia tych drobnoustrojów w warunkach estuarium Odry.

#### 4.6.2. Przeżywalność drożdży w wodach estuarium Odry

Adaptacja komórek do panujących w środowisku warunków oraz proces ich reprodukcji zależy od czynników wywołujących tzw. stres komórkowy (Fröhlich i Madeo 2001,



Granot i in. 2003, Mattanovich i in. 2004). Kierując się zasadami ekologii mikroorganizmów, rozważono obecność zróżnicowanych form wzrostu społeczności mikrobiologicznych. W naturalnych ekosystemach dostępność składników odżywczych jest ograniczona, w związku z czym przeżywalność form autochtonicznych, a tym bardziej allochtonicznych wymusza na komórce konieczność uruchomienia systemów umożliwiających jej przeżycie. Drobnoustroje przyjmują bardzo zróżnicowane strategie. Konsekwencją jednej z nich może być przejście z tzw. formy żywej hodowlanej w żywą, ale niehodowlaną (VBNC).

Przy założeniu, że jednym z podstawowych czynników warunkujących preferencje behawioralne testowanych grzybów jest koncentracja substancji odżywczych (Daveley i O'toole 2000, Chandra i in. 2001, Czaczyk 2004), hodowle prowadzone w podłożu optymalnym (YNB) potraktowano jako próbę odniesienia. Odpowiednie dla rozwoju *Cryptococcus* spp. i *Rhodotorula* spp. warunki hodowli sprzyjały szybszemu zwiększeniu liczby drożdży, co ustalono na podstawie gęstości komórek (OD) w zawieszynie (tab. 17). Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że bez względu na profile genetyczny i biochemiczny testowane szczepy charakteryzowała aktywność życiowa w próbach wody pochodzących z różnych stref estuarium Odry. Na uwagę zasługuje jednak fakt, iż w warunkach minimalnego stężenia dostępnych związków odżywczych nastąpiło zwolnienie tempa wzrostu w wyniku wydłużenia czasu jednej generacji szczepów i zminimalizowanie ich aktywności metabolicznej (tab. 17).

Tabela 17. Czas jednej generacji drożdży w różnych strefach estuarium Odry

Środowisko hodowlane	<i>Rh. mucilaginosa</i>	<i>Rh. glutinis</i>	<i>Cr. laurenti</i>
	min		
Podłoże YNB	204,52	252,20	90,15
Woda ZP	705,61	2092,50	143,95
Woda UMS	2765,53	521,96	302,30
Woda Wid.	1693,78	669,38	447,38

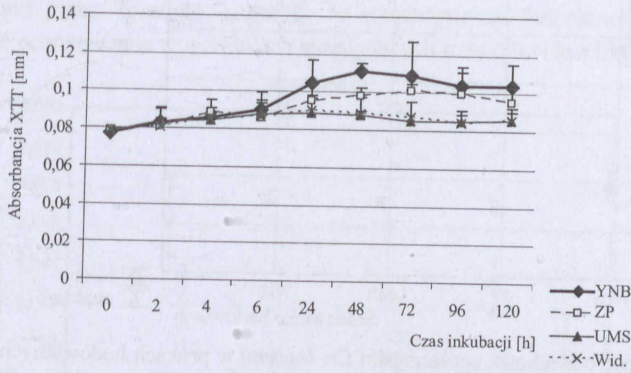
Objaśnienia oznaczeń podano na s. 31.

Przeprowadzona analiza statystyczna pozwoliła na uzupełnienie profilu zachowań testowanych drożdży o preferencje tworzenia struktury biofilmu. W celu określenia ekologicznego statusu życiowego *Cr. laurenti*, *Rh. mucilaginosa* i *Rh. glutinis* wykorzystano aktywność oddechową komórek. Zastosowano metodę redukcji soli tetrazoliny (XTT) do formazanu (Ramage i in. 2001, Jin i in. 2004). Mechanizm reakcji oparty jest na aktywności mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej, będącej wskaźnikiem sprawności metabolicznej komórek grzybów. W procesie tym wykorzystywana jest obecność prawidłowo funkcjonujących mitochondriów, których inaktywacja zachodzi w kilka minut po śmierci komórki.

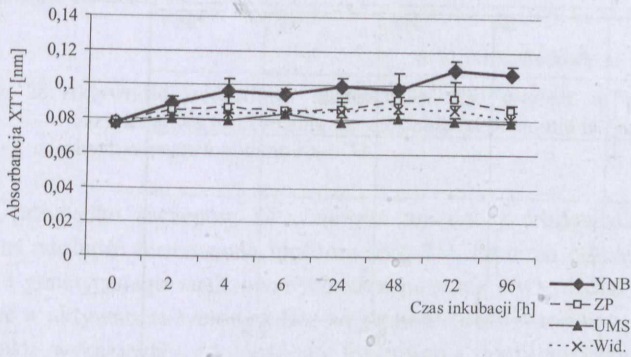
W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że dostępność odpowiedniej ilości substratu w otoczeniu komórki w istotny sposób wpłynęła na stopień adsorpcji do powierzchni aktywnych oddechowo komórek *Cr. laurenti* (rys. 25, 26), *Rh. glutinis* (rys. 25, 28) i *Rh. mucilaginosa* (rys. 25, 27). Ustalono bowiem obecność biofilmu we wszystkich hodowlach prowadzonych w warunkach optymalnych (podłoże YNB).



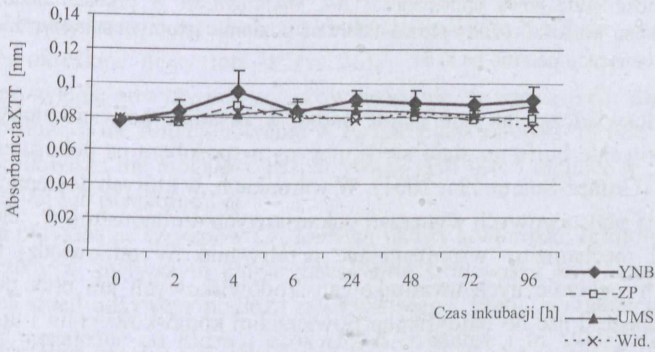
*Cr. laurenti*



*Rh. mucilaginosa*

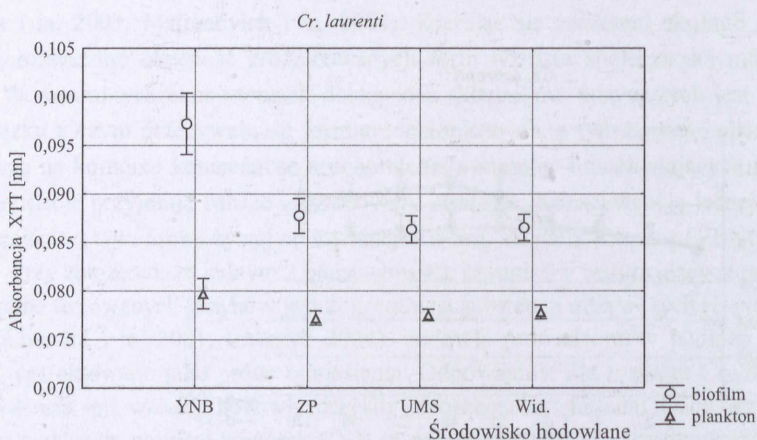


*Rh. glutinis*

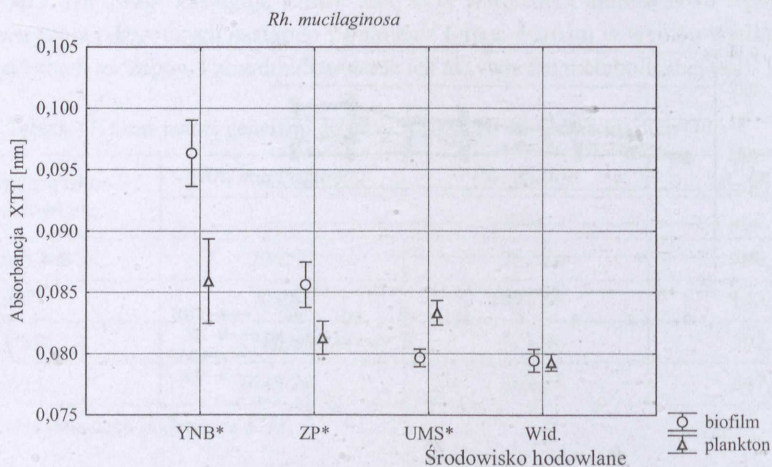


Rys. 25. Aktywność oddechowa komórek drożdży oznaczona w biofilmie. Objasnienia oznaczeń podano na s. 31





Rys. 26. Aktywność oddechowa społeczności *Cr. laurenti* w próbkach hodowlanych. Uzyskane wartości różniły się od siebie na poziomie istotnym statystycznie. Objaśnienia oznaczeń podano na s. 31

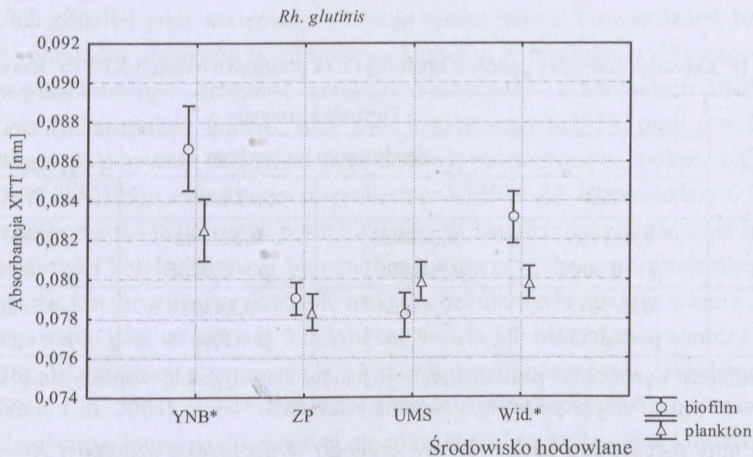


Rys. 27. Aktywność oddechowa społeczności *Rh. mucilaginosa* w próbkach hodowlanych. \*Uzyskane wartości różniły się od siebie na poziomie istotnym statystycznie. Objaśnienia oznaczeń podano na s. 31

Zakończenie doświadczeń na tym etapie badań w zasadzie potwierdziłoby opinię, zgodnie z którą formowanie biofilmu stało się skutecznym sposobem na pozostanie w korzystnym środowisku (Gomez-Suarez i in. 2001). W warunkach, w których dostępne związki odżywcze nie spełniają podstawowych wymagań pokarmowych drobnoustrojów, ich komórki muszą uruchomić mechanizmy wspomagające przetrwanie. W odpowiedzi na stres, zmienność fizycznych i chemicznych uwarunkowań środowiskowych lub brak podstawowych źródeł energii może dojść do modyfikacji powierzchni komórkowej (Jin i in. 2004 a, Geoghegan i in. 2008). Jest to o tyle istotne, iż niekonstytutywnie zależna genetyczna zdolność adherowania komórek regulowana jest właśnie makromolekularnymi strukturami ściany komórkowej (Mercie-Bonin i Fonade 2002 a). Od nich zależy przebieg pierwszego i krytycznego etapu tworzenia biofilmu na powierzchni materiału kolonizowanego. We wszyst-



kich hodowlach, w których tworzony był biofilm, czas niezbędny do uzyskania statystycznie istotnego poziomu zaadherowania komórek do powierzchni ustalono pomiędzy 6 a 24 godziną trwania doświadczenia (rys. 25). Porównywalny czas, niezbędny do zainicjowania tworzenia mikrokolonii przez komórkę, sugeruje, że rozpatrywanie funkcjonowania biofilmu jedynie w aspekcie pozostawania w warunkach sprzyjających rozwojowi jest błędne.



Rys. 28. Aktywność oddechowa społeczności *Rh. glutinis* w próbkach hodowlanych.  
\*Uzyskane wartości różniły się od siebie na poziomie istotnym statystycznie. Objasnienia oznaczeń podano na s. 31

W przypadku szczepów *Cr. laurenti* zmienność środowiska zawieszającego nie wpłynęła na zdolność formowania biofilmu (rys. 25). Pomimo odmiennego profilu biochemicznego i genetycznego analizowanych szczepów nie stwierdzono pomiędzy nimi istotnych różnic w aktywności życiowej. Bez względu na profil warunków hodowlanych szczepy tego gatunku wykazywały zdolność do formowania biofilmu trwale związanego z powierzchnią (rys. 25, 26).

Analiza parametrów wskazujących na przeżywalność drożdży, wyznaczona na podstawie OD i redukcji XTT, wykazała, że we wszystkich hodowlach wzrost gęstości komórek korelował z aktywnością metaboliczną drobnoustrojów w biofilmie jako podstawową formą kolonizacji określonej niszy (tab. 18, rys. 26).

Zestawienie powyższych wyników wskazuje, że szczepy *Cr. laurenti* preferują tworzenie biofilmu, a nie funkcjonowanie w formie planktonowej. W tym wypadku jednak parametry środowiska nie mogą być rozpatrywane jako determinujące w „wyborze” tworzenia formy osiadłej lub planktonowej.

Na przykładzie szczepów *Cr. laurenti* należy stwierdzić, iż zdolne do tworzenia biofilmu szczepy w pierwszym etapie zasiedlania środowiska kolonizują powierzchnię bez względu na skład odżywczy podłoża zawieszającego. Etapy tworzonego biofilmu są bardzo podobne i niezależne od rodzaju ekosystemu (Chandra i in. 2001, Różalska i Sadowska 2004). Jego obecność na powierzchni abiotycznej nie wymaga tworzenia warstwy kontaktowej (odżywczej), a jedynie jej obecności w środowisku płynnym otaczającym drobnoustroje. W latach 90. ub. wieku pojawiły się sugestie, iż adhezja komórki do czystej powierzchni jest



poprzedzona tworzeniem tzw. warstwy kontaktowej, czyli adsorpcją warstwy organicznej pochodzącej ze środowiska płynnego. Nie potwierdzono jednak, czy obecność tej warstwy jest absolutnie niezbędna dla wszystkich form mikrobiologicznych (Žutić i in. 1999). Wydaje się, że w przypadku drożdży nie ma to znaczenia, gdyż ich komórki odznaczają się nadzwyczajną zdolnością przylegania do powierzchni abiotycznych i biotycznych (Verstrepen i Klis 2006).

Tabela 18. Korelacja pomiędzy gęstością optyczną OD a poziomem redukcji XTT *Cr. laurenti*

Rodzaj społeczności	Gęstość komórek			
	środowisko hodowlane			
	YNB	ZP	UMS	Wid.
Biofilm	<b>0,431759</b> <i>p</i> = 0,0000	<b>0,318053</b> <i>p</i> = 0,0001	<b>0,221561</b> <i>p</i> = 0,0086	<b>0,249377</b> <i>p</i> = 0,0029
Plankton	0,079073 <i>p</i> = 0,3530	-0,112347 <i>p</i> = 0,1863	<b>-0,242918</b> <i>p</i> = 0,0038	<b>-0,272671</b> <i>p</i> = 0,0012

Czcionką pogrubioną wyróżniono poziom korelacji istotny statystycznie; współczynnik korelacji ustalono na poziomie  $\alpha = 0,05$ . Objasnienia oznaczeń podano na s. 31.

Nieco inny mechanizm zachowań stwierdzono w przypadku szczepów *Rh. glutinis* i *Rh. mucilaginosa* – wykazano obecność potencjału warunkującego tworzenie biofilmu. Adherencja do powierzchni oznaczona została na poziomie istotnym statystycznie w hodowlach *Rh. mucilaginosa* prowadzonych w podłożu YNB i ZP (rys. 27). Najprawdopodobniej w najbardziej wysuniętej ku morzu strefie estuarium Odry szczepy tego gatunku zasiedlają nisze ekologiczne w formie biofilmu, w przeciwieństwie do środowiska stacji badawczej UMS. W próbach tych tworzenie formy osiadłej było zminimalizowane na korzyść form planktonowych (rys. 27).

Sformułowane wnioski potwierdziła analiza statystyczna – wyniki korelacji pomiędzy OD a poziomem redukcji XTT przyjęły wartości istotne statystycznie. W przypadku stacji Wid. i UMS takich zależności nie potwierdzono (tab. 19).

Tabela 19. Korelacja pomiędzy OD a poziomem redukcji XTT *Rh. mucilaginosa*

Rodzaj społeczności	Gęstość komórek			
	środowisko hodowlane			
	YNB	ZP	UMS	Wid.
Biofilm	<b>0,730443</b> <i>p</i> = 0,00000	<b>0,609958</b> <i>p</i> = 0,00000	-0,050039 <i>p</i> = 0,694564	0,103244 0,416878
Plankton	<b>0,642865</b> <i>p</i> = 0,00000	<b>0,470649</b> <i>p</i> = 0,00009	0,238742 <i>p</i> = 0,057451	-0,180160 0,154283

Czcionką pogrubioną wyróżniono poziom korelacji istotny statystycznie. Objasnienia oznaczeń podano na s. 31.

W próbach wody pobranych ze stacji ZP i inokulowanych szczepami *Rh. glutinis* aktywność oddechowa drożdży była porównywalna z próbami planktonowymi i zaadherowanymi do powierzchni mikroplatek. W hodowlach prowadzonych w podłożu UMS, tak jak



w przypadku *Rh. mucilaginosa*, wyznaczono dla form planktonowych istotnie statystycznie większe wartości absorbancji farmazanu tetrazoliny (rys. 28).

Obecność form wolnopływających interpretowana jest zazwyczaj jako tymczasowy etap służący przemieszczaniu się komórek w celu poszukiwania nowej niszy ekologicznej. Uzyskane wyniki wskazują, że poprawne jest rozpatrywanie tworzenia się formy planktonowej i/lub osiadłej jako następstwa rozwoju społeczności. Potwierdzono bowiem ścisłą zależność pomiędzy aktywnością oddechową komórek w biofilmie a aktywnością oddechową form planktonowych. Istotność korelacji wyznaczono w hodowlach YNB i Wid. dla *Rh. glutinis* (odpowiednio 0,3806, przy  $p = 0,0019$  oraz 0,2959, przy  $p = 0,0176$ ). Dla *Rh. mucilaginosa* powyższe zależności, poza hodowlą prowadzoną w podłożu YNB (0,241094, przy  $p = 0,0152125$ ), wyznaczono w próbach z UMS i ZP (odpowiednio 0,361258, przy  $p = 0,003359$  oraz 0,438293, przy  $p = 0,000292$ ). W zasadzie fakt oznaczenia istotnej statystycznie wartości korelacji można by uznać za oczywisty. Hipoteza wzajemnego oddziaływania oparta jest bowiem na kontroli makromolekularnych struktur ściany komórkowej i funkcjonowaniu genów, które są indukowane w celu ich biologicznej syntezy (Geoghagan i in. 2008). Warunkowane genetycznie i kontrolowane pozagenowo (Friedman i Cormach 2004, Halme i in. 2004) etapy tworzenia biofilmu wymagają sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, której zarys transkrypcji genowej nie różni się od zachodzącej w komórkach planktonowych (Chandra i in. 2001). Przeanalizowanie przez Guo i in. (2000) pięciu genów odpowiedzialnych za flokulację *S. cerevisiae* wykazało, iż cztery z nich (FLO 1, 5, 9 i 10) charakteryzują zdolność „wiązania” komórki z komórką. Natomiast tylko jeden – FLO 11 odpowiedzialny jest za adhezję do substratu i powierzchni abiotycznych. W przypadku pojawienia się czynnika limitującego, np. azotu czy węgla, zdolność zaadherowania pozwala na skolonizowanie podłoża w celu aktywnego pozyskania nowych źródeł związków ograniczających wzrost (Kron 1997, Gagiano i in. 2002). Wydaje się więc poprawne przyjęcie ogólnej zasady, iż mechanizm zróżnicowania ekspresji określonego typu adhezyn jest wyrazem wyboru przez komórkę formy przeżycia i dostosowania do nowego środowiska. Nie we wszystkich jednak wariantach badawczych uzyskano współzależności pomiędzy wyznaczonymi wartościami OD a ilością formazanu tetrazoliny (tab. 19, 20).

Wyznaczone współczynniki korelacji wykazały, iż jedynie w hodowli prowadzonej w podłożu YNB zachodzi proces reprodukcji komórek, których liczba odzwierciedla uzyskane wartości absorbancji (tab. 20).

Tabela 20. Korelacja pomiędzy OD a poziomem redukcji XTT *Rh. glutinis*

Rodzaj społeczności	Gęstość komórek			
	środowisko hodowlane			
	YNB	ZP	UMS	Wid.
Biofilm	0,230880 $p = 0,066429$	0,061948 $p = 0,626768$	0,099518 $p = 0,433982$	-0,025637 $p = 0,840631$
Plankton	<b>0,302124</b> $p = 0,015252$	-0,036063 $p = 0,777246$	-0,241420 $p = 0,045206$	-0,025147 $p = 0,843639$

Czcionką pogrubioną wyróżniono poziom korelacji istotny statystycznie.



Brak istotnej statystycznie zależności pomiędzy wyznaczonymi parametrami OD a poziomem redukcji XTT wskazuje na utrzymanie wartości *constans* przynajmniej jednej ze współzależnych w czasie prowadzenia doświadczenia (tab. 20).

W interpretacji niniejszych wyników należy więc uwzględnić: niezdolność reprodukcyjną komórek w środowisku estuarium Odry i/lub zdolność przechodzenia szczepów drożdży w formy VBNC. Taki mechanizm zachowań nie wyklucza międzykomórkowego porozumiewania się drożdży. Zdolność do adhezji w warunkach ograniczających może być wyrazem strategicznego działania mającego na celu przetrwanie mikroorganizmu, pod warunkiem zmiany formy metabolicznej. Co prawda drobnoustroje określane jako VBNC mają możliwość odtworzenia swoich pełnych właściwości metabolicznych, ale jedynie w określonym czasie. Przekroczenie granicy tolerancji trwania komórki w fazie niehodowlanej, najprawdopodobniej w wyniku destrukcji DNA, prowadzi do jej śmierci.

Zawarte w niniejszym rozdziale wyniki i ich weryfikacja na podstawie bardzo ograniczonej liczby publikacji tematycznych mogłaby wskazywać, iż przede wszystkim w społeczności biofilmu komórki odnajdują szansę na przeżycie w środowisku wodnym. Jasne staje się wówczas to, dlaczego drobnoustroje, które samodzielnie nie są zdolne do adhezji do powierzchni, włączają się do społeczności w istniejącym już biofilmie. Bagge i in. (2001) ustalili, że niektóre mikroorganizmy jedynie w hodowlach mieszanych wykazują znaczną adhezję. Podstawowym warunkiem jest jednak hydrofobowy profil ściany komórkowej drobnoustroju, co umożliwia jej „związanie” z powierzchnią lub penetrację do wnętrza biofilmu poprzez kanały i pory struktury *matrix*. Mieszane populacje mikroorganizmów mogą zatem wspomagać tworzenie biofilmu, jak również stać się siedliskiem organizmów patogennych niezdolnych do uruchomienia systemu tworzenia struktury złożonej.

Stwierdzone w niniejszym rozdziale zdolności do tworzenia społeczności w formie planktonowej i biofilmu związanego z powierzchnią stały się podstawą do rozważenia, w jakim stopniu dominujące gatunki jednokomórkowych grzybów mogą kolonizować bytujące w estuarium Odry hydrobionty i wpływać na ich rozwój. Ich obecność była już rozważana pod kątem występowania i roli w osadach (Bogusławska-Wąs i in. 1998), organizmach dennych (Nagahama i in. 2001) i roślinności wodnej (Inacio i in. 2002). W tym miejscu należy podkreślić, że w mikrobiologii rybackiej problematyka mykologiczna jest poruszana sporadycznie, mimo że jej znaczenie w rozwoju ichtiofauny jest bardzo istotne.

#### **4.7. Ikra jako miejsce rozwoju mikroorganizmów**

Okresowa kolonizacja zróżnicowanych nisz ekologicznych i konieczność ich zmiany wynika zazwyczaj z wyczerpujących się z czasem zasobów substratowych oraz ze zmienności warunków fizykochemicznych. W społecznościach mikrobiologicznych proces ten opisywany jest jako etap dojrzewania i starzenia się, w wyniku czego system chemicznego porozumiewania się wymusza na komórkach ich opuszczenie i poszukiwanie nowego siedliska. Zdolność do migracji drobnoustrojów pozwala im na ponowny rozwój i zachowanie ciągłości gatunkowej. Rozprzestrzenianie się wielu organizmów ma charakter przypadkowy, na co wpływa aktywne lub bierne przemieszczanie się tych form (Salysers i Whiitt 2003).



W zbiornikach wodnych wszelkie powierzchnie pokrywane są przez biofilmy, których struktura biologiczna zdominowana jest przez heterotroficzne bakterie i grzyby (Lock i in. 1984). W tak zróżnicowanych biocenotycznie systemach zastanawiająca jest relacja pomiędzy wszechobecnymi w estuarium Odry drożdżami a ikrą ryb. Jest to interesujące tym bardziej, że przedstawiciele rodzaju *Cryptococcus* i *Rhodotorula*, jako formy dominujące w mykobiocenozie estuarium, zdolne są do inicjowania tworzenia biofilmów. Powstaje zatem pytanie: Czy złożona przez ryby ikra może być podłożem kolonizacji dla obecnych w ekosystemie drożdży i jaki jest ich ewentualny wpływ na rozwój zarodkowy jaj? Hansen i Olafsen (1989) wykazali w swoich badaniach, że powierzchnia ikry ryb morskich jest doskonałym substratem dla rozwoju zdolnych do adherencji bakterii. W naturalnym środowisku bytowania ikra ryb najczęściej kolonizowana jest przez bakterie z rodzaju *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* i *Moraxella*, natomiast *Aeromonas*, *Flexibacter*, *Flavobacterium* i *Cytophaga* stanowi mikrobiotę jedynie towarzyszącą (Miguez i Combarro 2003). Sam fakt stwierdzenia obecności populacji bakteryjnej na powierzchni rybich jaj nie musi oznaczać zagrożenia ich rozwoju. Miguez i in. (2004) w swoich badaniach wykazali, że obecność bakterii w zakresie  $10^2$ – $10^4$  jtk·g<sup>-1</sup> nie wpływa na przeżywalność ikry sardynki.

Hansen i Olafsen (1989) stwierdzili, że ikra ma właściwości regulujące kolonizację mikrobiologiczną własnej powierzchni, tworząc właściwą dla gatunku epibiotę. Wynika to z obecności receptorów na powierzchni jaj, czego konsekwencją jest selektywna kolonizacja bakterii. Według ww. autorów naturalnie zaadherowane mikroorganizmy mogą chronić jaja w poszczególnych etapach rozwoju embrionalnego (Hansen i Olafsen 1999). Natomiast mikroorganizmy w strukturze jaja znajdują bogate źródło substancji odżywczych – białko, tłuszcze, witaminy oraz mikroelementy. Sama śluzowa powierzchnia jaj dostarcza odpowiednich substratów mikroorganizmom oraz ułatwia ich adhezję. „Skorupkę” jaja tworzą hydrofobowe białka, których głównym składnikiem jest pseudokeratyna (*ichthulokeratin*) oraz glikoproteiny. Ważną rolę odgrywają również węglowodany (2–3%) zdominowane przez: galaktozę, mannozę, N-acetyloglukozaminę, kwas N-acetyleneuraminowy (Arukwe i in. 1997). Struktura jaja jest przepuszczalna dla gazów, wody i związków nieorganicznych (Hansen i Olafsen 1999).

Znacznie częściej, niż pozytywne, opisywane są negatywne skutki rozwoju mikroorganizmów na powierzchni jaj. Nadmierny rozwój drobnoustrojów prowadzi zazwyczaj do ich zniszczenia. Najczęściej za przyczyny destrukcji podawano niedotlenienie embrionu i toksyczne oddziaływanie produktów metabolicznych bakterii. Wytwarzane przez drobnoustroje NH<sub>3</sub> lub H<sub>2</sub>S powoduje uszkodzenie rozwijającego się embrionu (Hansen i Olafsen 1999). Egzoproteolityczna aktywność epibioty może także spowodować uszkodzenie osłon jajowych – chorionu lub warstwy *zona radiata* (Barker i in. 1989, Morrisom i in. 1999), co sprzyja kolonizacji form potencjalnie chorobotwórczych niezdolnych do samodzielnego naruszenia ich zewnętrznej struktury.

Możliwość rozwoju drobnoustrojów na powierzchni rybich jaj lub w jej bezpośrednim otoczeniu jest warunkowana przede wszystkim wytworzeniem przez ikrę niespecyficznych mechanizmów ochrony, których celem jest zrekompensowanie niedojrzałego systemu immunologicznego (Olafsen 2001). Bierna odporność jaj jest oparta na mieszaninie związków – lizozymu, białek laktynopodobnych i immunoglobulin (Hansen i Olafsen 1999).



W systemie odpornościowym ikry istotną rolę odgrywają wspomniane cząsteczki immunoreaktywne, do których zalicza się lizozym występujący w różnych wydzielinach śluzu ryb (Swain i Nabak 2009). Szczególnie wysoka jego zawartość została stwierdzona w jajach ryb łososiowatych: *Oncorhynchus kisutch*, *O. tshawytscha*, *O. mykiss*. Na podstawie opisanego przez Lovolla i in. (2006) transferu oporności pionowej można wnioskować, że obecność lizozymu na jajach ryb staje się źródłem „pamięci” i zabezpieczenia ikry przed chorobami pochodzenia mikrobiologicznego. Poza formami bakteryjnymi aktywność lizozymu wpływa również na obecność grzybów, w tym też występujących w środowisku wodnym drożdży (Paulsen i in. 2001). Niestety, wiedza na temat wpływu tej grupy mikroorganizmów na rozwój rybich jaj jest na tyle uboga, że wyników niniejszych badań nie można skonfrontować z innymi publikacjami.

Do porównania behawioralnych mechanizmów bioty mikrobiologicznej zasiedlającej powierzchnię ikry wykorzystano materiał pochodzący od troci wędrownej (*Salmo trutta trutta* m. *trutta* Linnaeus, 1758) oraz okonia (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758).

Okoń (*Perca fluviatilis*) należy do rodziny okoniowatych (*Percidae* Bonaparte, 1832), rodzaju *Perca* Linnaeus, 1758. Ikra tych ryb należy do najbardziej kleistych. Samice składają jaja w postaci długich wstęg na roślinności podwodnej lub bezpośrednio na kamienisto-żwirowym dnie. Ze względu na charakter rozrodu okoń zaliczany jest do ryb nieochraniających jaj zarówno fitofilnych, jak i litofilnych (Brylińska 2000). Powierzchnia jaj okonia ma strukturę porowatą, o nieregularnych kształtach tworzących wzór podobny do plastra miodu (Diehl i Bless 1995). Mansour i in. (2009) w swoich badaniach wykazali, że osłonka (chorion) pojedynczego ziarna ikry utworzona jest z grubej warstwy białkowej *zona radiata interna* (ZRI) i cienkiej mukoproteinowej warstwy *zona radiata externa* (ZRE). Szczegółowa elektroforeza ZRE wykazała, że w jego strukturze znajduje się 12 zróżnicowanych białek. Unikatowość ikry okonia wynika z reakcji płynu jajnikowego, w przypadku którego konfiguracja białek w reakcji z białkami ZRE i w kontakcie z wodą prawdopodobnie ulega zmianie, formując żelopodobne fibryle łączące składane jaja (Mansour i in. 2009). W wyniku odizolowania jaj od środowiska zawieszającego warstwę o żelowej strukturze powstaje rodzaj siedliska sprzyjającego mechanizmom rozwojowym ikry (Rizzo i in. 2002) i jej adhezji do podłoża (Mansour i in. 2009, 2009 a). Podstawowym jego zadaniem jest ograniczenie ryzyka zakażenia mikrobiologicznego (Paxton i Willoughby 2000) oraz ochrona ziaren ikry przed uszkodzeniem mechanicznym (Korzelecka i in. 1998).

Troć wędrowna (*Salmo trutta trutta*) należy do rodziny łososiowatych (*Salmonidae* Rafinesque, 1815), rodzaju *Salmo* Linnaeus, 1758. Ryby tego gatunku preferują oligotroficzny profil wód śródlądowych i charakteryzują się dużą wrażliwością na zmiany powodowane oddziaływaniem antropogenicznym (Finn 2007). Troć wędrowna jest gatunkiem należącym do ryb dwuśrodowiskowych, które po osiągnięciu dojrzałości płciowej spływają z morza do swoich endemicznych wód słodkich, aby tam złożyć ikrę. Tarło odbywa się w potokach o chłodnej wodzie, w której tarlaki budują gniazda na podłożu kamienistym lub kamienisto-żwirowatym.

W przeciwieństwie do bardzo charakterystycznej ikry składanej przez okonia jaja troci nie są chronione przez dodatkową lepłą warstwę. Komórka jajowa formowana w jajniku troci jest zamknięta w miękkiej kleistej osłonce. Wydalenie jej do wodnego środowiska rozpoczyna proces „wodnego usztywniania” i utraty kleistości ikry. Nadanie jaju ostatecznego obrysu i jego utwardzenie staje się formą protekcji antymikrobiologicznej i stanowi



ochronę przed mechanicznym uszkodzeniem (Landergrén i Vallin 1998). Warstwa zewnętrzna ikry troci jest gładka i pozbawiona dodatkowych widocznych struktur (Szulc 2007). Jej wrażliwość na warunki środowiskowe opisana jest w wielu publikacjach (Dumas i Darolles 1999, Luckenbach i in. 2003, Armstrong i Nislow 2006, Borsuk i in. 2006). Według ww. autorów stała się ona podstawowym czynnikiem ograniczającym rozwój ikry składanej w europejskich rzekach (Luckenbach i in. 2003, Borsuk i in. 2006). Przed progresywnym zanieczyszczeniem naturalnych cieków jaja ryb łososiowatych bronią się, wykorzystując jedynie dostępne niespecyficzne mechanizmy ochrony. Jest to jedyny możliwy do wykorzystania substytut niedojrzałego jeszcze systemu immunologicznego, skierowany przeciw mikroorganizmom chętnie kolonizującym powierzchnię jaj (Swain i Nabak 2009).

Różnorodność wskazywanych źródeł mikrobioty zdolnej do zasiedlenia powierzchni jaj odzwierciedla różne poglądy prezentowane w publikacjach (Knouft i in. 2003, Miguez i in. 2004). W celu ich zweryfikowania w pierwszym etapie badania wykonano wstępne analizy mikrobiologiczne wody, z której zostały wyłowione tarlaki, a także śluzu tarlaków, ikry złożonej w miejscu naturalnego tarła ryb oraz ikry pozyskanej i zapłodnionej w warunkach naturalnych. Stwierdzono, że poziom oznaczonej mikrobioty na ikrze pozyskanej z jej naturalnego środowiska w przypadku bakterii nie przekraczał  $10^3$  jtk·g<sup>-1</sup> na jajach okonia i  $10^2$  jtk·g<sup>-1</sup> na ziarnach ikry troci. W przypadku drożdży oznaczona liczebność kolonii była mniejsza od  $10^1$  jtk·g<sup>-1</sup> (tab. 21). Oznaczone wartości były o rząd wielkości mniejsze od oznaczonej ogólnej liczby badanych drobnoustrojów w wodzie. Oznaczona mikrobiota ikry pozyskanej w warunkach laboratoryjnych mieściła się natomiast w zakresie  $0,47-8,01 \cdot 10^1$  jtk·g<sup>-1</sup>; obecności drożdży nie stwierdzono (tab. 21).

Tabela 21. Ogólna liczba drobnoustrojów izolowanych ze środowiska okonia i troci wędrowniej

Badane środowisko	Bakterie* [jtk·ml <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> ]		Drożdże [jtk·ml <sup>-1</sup> ·g <sup>-1</sup> ]	
	okoń	troć wędrownia	okoń	troć wędrownia
Woda	5,78E + 04	1,80E + 02	1,17E + 01	0,70E + 01
Śluz tarlaków	8,33E + 05	3,50E + 03	1,69E + 04	1,00E + 02
Ikra środowiskowa	1,88E + 03	3,80E + 01	3,80E + 00	2,00E + 00
Ikra laboratoryjna	8,01E + 01	4,71E + 00	0,00E + 00	0,00E + 00

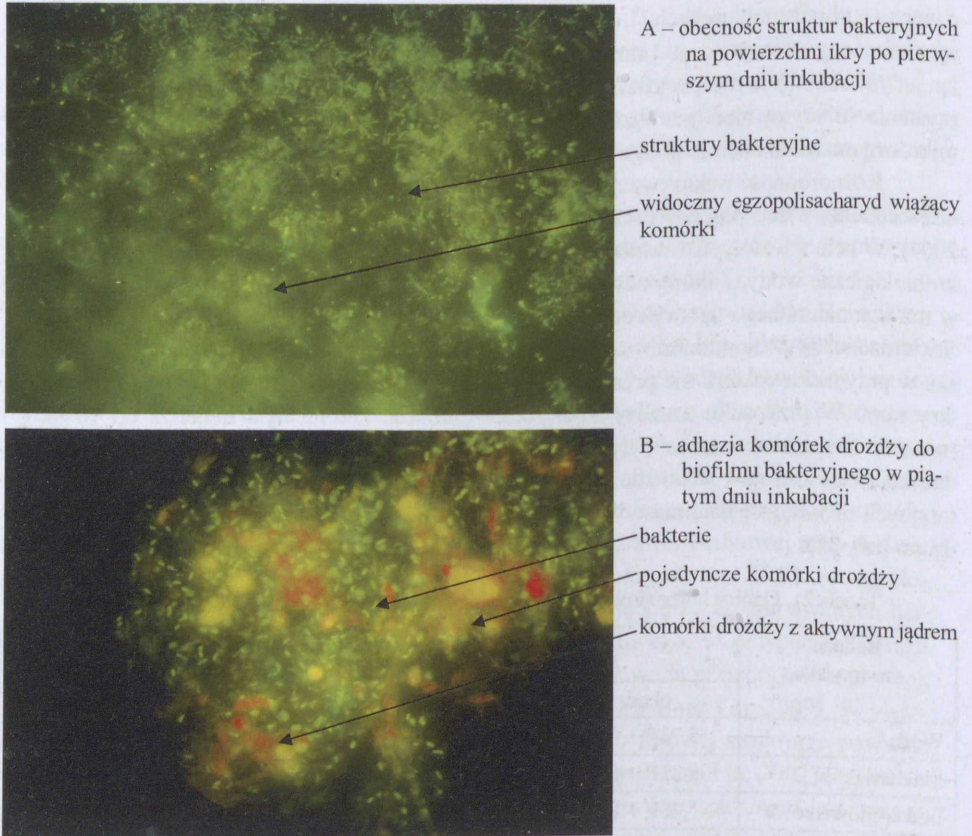
\* Czeszejko (2003).

W strukturze jakościowej dominującymi wspólnymi gatunkami izolowanymi z wody i śluzu okonia oraz troci wędrowniej były *Pseudomonas* sp, *Aeromonas* sp, *Micrococcus* sp. W przypadku obu gatunków ryb na powierzchni ikry oznaczono jedynie *Pseudomonas* sp. W przypadku jaj troci wędrowniej i śluzu tarlaków oznaczono również: *Ochrobactrum* sp, *Aeromonas hydrophila*, *Brevundimonas diminuta* oraz *Flexibacter* sp. W badanym materiale stwierdzono też obecność grzybów wodnych z rodzaju *Saprolegnia*, *Penicillium* i *Mucor*. Obecności tych form nie stwierdzono na powierzchni ikry okonia.

Przeprowadzone doświadczenia umożliwiły również monitorowanie kolonizacji materiału badawczego przez formy eukariotyczne. Co prawda oznaczona liczebność drożdży izolowanych z materiału badawczego była sporadyczna, jednak zdolność do przeżycia i tworzenia złożonych struktur w środowisku estuarium Odry może sugerować o ich znacznej roli



w cyklu rozwojowym ichtiofauny. Grzyby mogą powodować pierwotną infekcję, jednakże najczęściej pojawiają się w wyniku zaistniałych już zmian chorobowych spowodowanych biotą bakteryjną lub pasożytniczą (Meyer 1991). Skutkiem infekcji jest wówczas degeneracja tkanek prowadząca do zakłócenia równowagi osmotycznej.

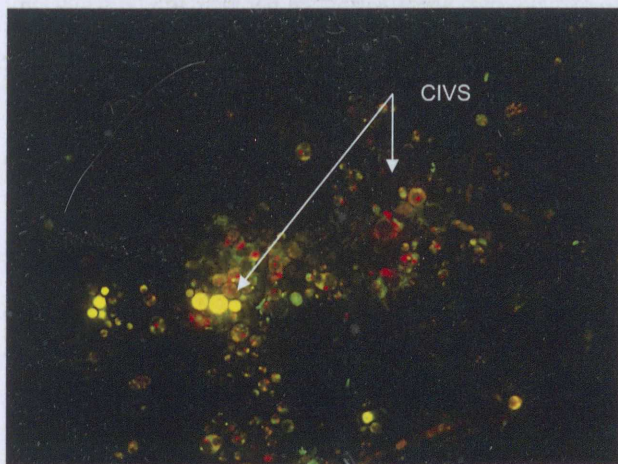


Rys. 29. Kolonizacja mikrobiologiczna jaj troci wędrowniej przez *Rh. mucilaginosa*. Biofilm mikrobiologiczny zobrazowano przy zastosowaniu barwników fluorescencyjnych FUN-1 Calcofluor™ White M2R. Obserwacje prowadzono w świetle filtru EX/BA 450-490/505-520nm (Nikon)

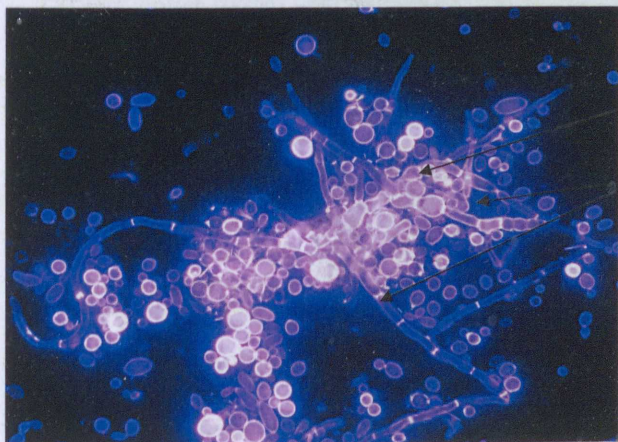
W celu ustalenia możliwości kolonizacji jaj troci przez drożdże do inkubowanej ikry (inkubację prowadzono zgodnie z metodą podaną przez Nakata i in. 2003) wprowadzono wybrane szczepy *Cr. laurenti* i *Rh. mucilaginosa*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono możliwość kolonizacji jaj troci przez testowane grzyby jednokomórkowe. Zastosowanie w niniejszej pracy metod fluorochromowych pozwoliło na ocenę rzeczywistej dywersyfikacji społeczności mikrobiologicznej w poszczególnych hodowlach. Analiza mikroskopowa wykazała, że proces inicjacji tworzenia mikrobiocenozy na powierzchni ikry troci rozpoczynają formy bakteryjne (rys. 29 A). Dopiero w kolejnym etapie do utworzonej przez nie społeczności przyłączają się pojedyncze komórki drożdży, wzbogacając tym samym jej gatunkową strukturę (rys. 29 B).



Wydaje się, że mechanizm współtworzenia biofilmu nie jest przypadkowy. Na podstawie pomiarów absorbancji formazanu tertrazoliny stwierdzono, że rozwój drożdży na kolonizowanej powierzchni, na poziomie istotnym statystycznie (0,0000, przy  $p < 0,05$ ), stwierdzono od piątego dnia hodowli. W próbach nieinokulowanych drożdżami zmiany w pomiarach absorbancji zaobserwowano dopiero w 16 dniu prowadzenia doświadczenia (0,0093, przy  $p < 0,05$ ), co było efektem rozwoju organizmów bakteryjnych (zob. rys. 32).



A – struktury CIVS, w filtrze EX/BA 420 nm w dziewiątym dniu inkubacji



B – struktura biofilmu w filtrze DAPI w 12 dniu inkubacji

komórki drożdży zawieszono w EPS

formy mycelialne

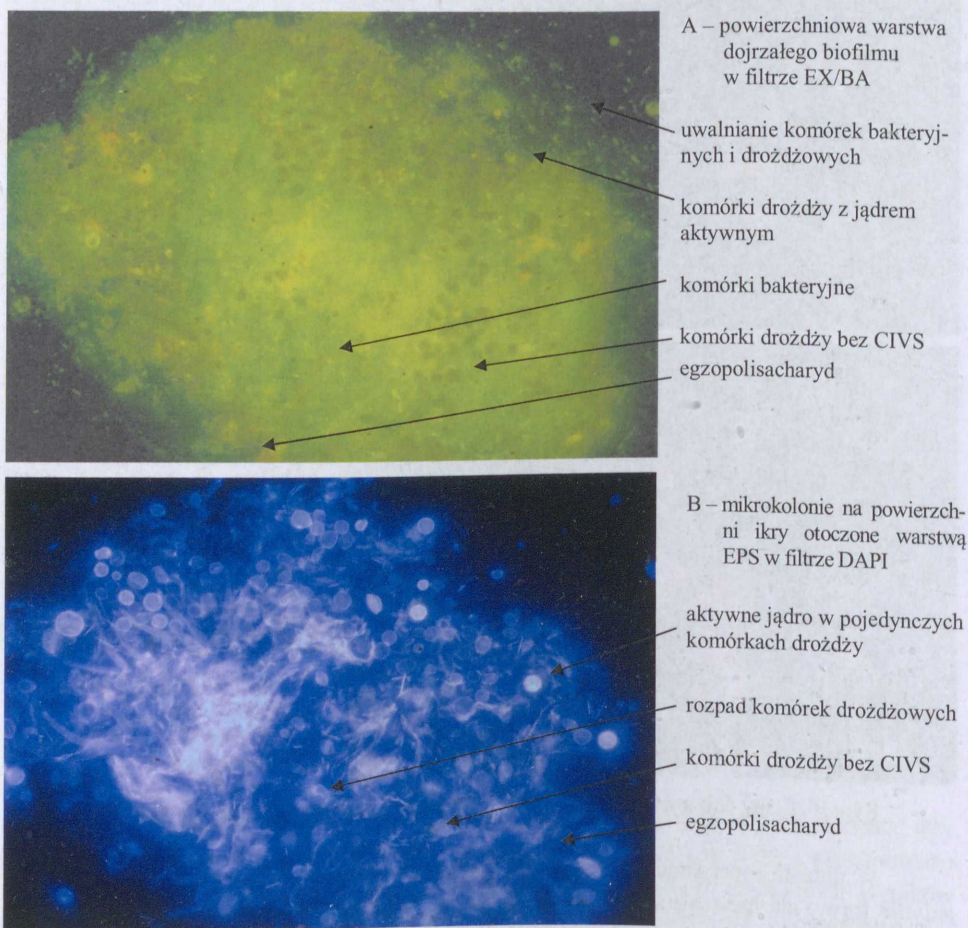
Rys. 30. Etapy dojrzewania biofilmu *Rh. mucilaginosa* na powierzchni jaja troci

W dniach poprzednich następowało tworzenie mikrokolonii, w czym uczestniczyły jedynie formy aktywne metabolicznie (rys. 30 A). Wykorzystanie specyficzności wiązania barwnika FUN-1 z kwasami nukleinowymi pozwoliło na uwidocznienie w cytoplazmie tzw. CIVS (ang. Cylindrical Intravascular Structures) wskazujących na żywotność i metaboliczną aktywność komórek drożdży (Fouda i in. 2006). Dla drożdży jest to bardzo ważny etap w tworzeniu biofilmu. Zawieszono w zewnątrzkomórkowej macierzy (EPS) komórki mogą ulec zróżnicowaniu morfologicznemu, dzięki czemu zwiększa się prawdopodobieństwo ich pozostania w środowisku. Utworzenie bowiem zwartej biomasy biofilmu staje się możliwe



jedynie przy udziale form mycelialnych, których obecność uwidoczniła jest na rys. 30 B. Homogeniczność oparta wyłącznie na jednokomórkowych strukturach nie wyklucza, co prawda, rozwoju społeczności, ale jego struktura jest szczątkowa (Baillie i Douglas 2000, Dorocka-Bobkowska i Konopka 2003).

Utrzymywanie procesu reprodukcji (rys. 32) przez komórkę oznaczane było do końcowego etapu rozwoju biofilmu. Prawdopodobnie od 13 dnia hodowli przyłączanie się pojedynczych komórek i ich możliwość rozwoju była sporadyczna, co potwierdził porównywalny w czasie czterech kolejnych dni pomiar absorbancji formazanu terazoliny (rys. 32). Ostateczne uformowanie społeczności mikrobiologicznej zakończyło znaczny przyrost substancji pozakomórkowej aż do całkowitego otoczenia przez nią powstałych mikrokolonii (rys. 31 A, B).

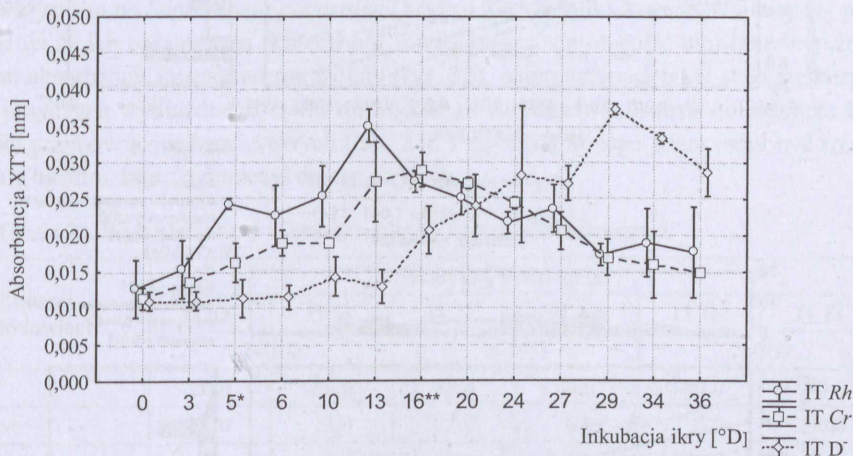


Rys. 31. Dojrzały biofilm *Rh. mucilaginosana* na powierzchni ikry otoczony EPS

Od tego czasu pomiary absorbancji redukowanego przez drożdże XTT wskazywały na powolny spadek wartości oznaczanego wskaźnika (rys. 32). W obrazach mikroskopowych uformowanego biofilmu stwierdzono również zmianę fazy życia poszczególnych komórek. Znacznie zmniejszyła się liczba komórek z obecnością CIVS. Niezdolne do wzrostu drożdże



w warunkach *in vitro* monitorowano w preparatach barwionych barwnikami fluorescencyjnymi Calcofluor<sup>TM</sup> White M2R. Zachowanie integralności błony komórkowej przez pojedyncze komórki dało podstawę do stwierdzenia, iż komórki drożdży przechodziły w stan VBNC (rys. 30). Istotnie statystycznie zmniejszenie ilości pomiarowej absorbancji formazanu tetrazoliny i obecność form niehodowalnych towarzyszyła wzrostowi liczby komórek aktywnych metabolicznie w środowisku otaczającym jaja (rys. 33). W przypadku hodowli inokulowanej wybranymi szczepami *Rh. mucilaginosa* współczynnik korelacji ustalono na poziomie  $r = -0,4116$ , przy  $\alpha = 0,05$ , *Cr. laurenti* natomiast na poziomie  $r = -0,6220$ , przy  $\alpha = 0,05$ .

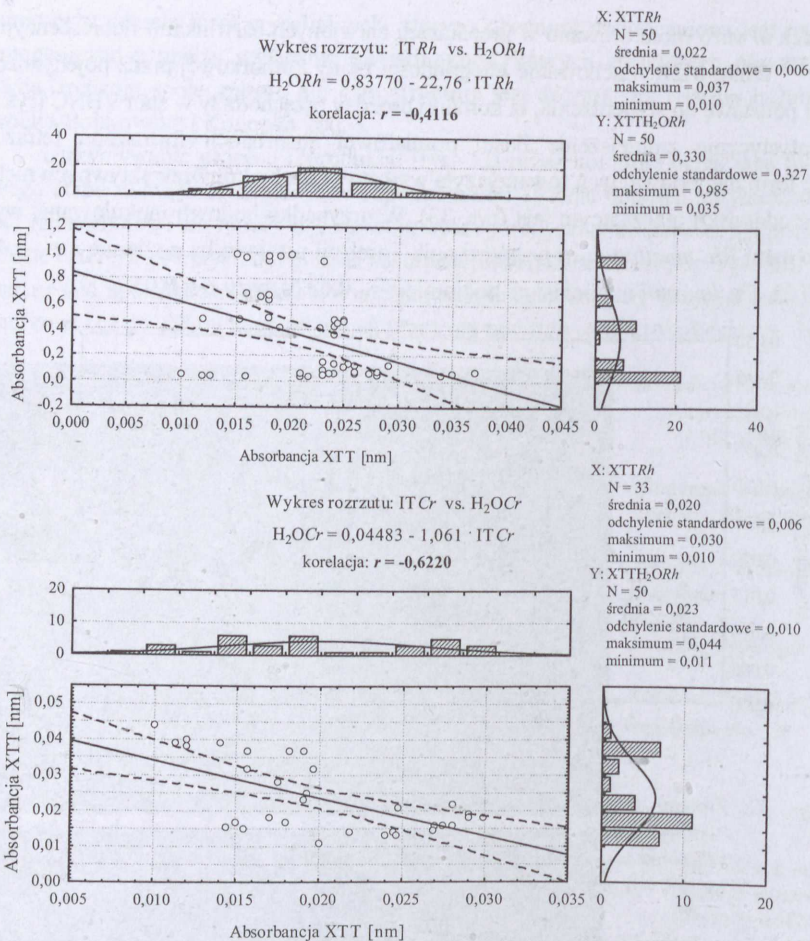


Rys. 32. Zmiany aktywności oddechowej drożdży w trakcie prowadzenia hodowli ikry.  
 \*Istotny wzrost absorbancji na powierzchni ikry w hodowlach IT *Rh* i IT *Cr*.  
 \*\*Istotny wzrost absorbancji na powierzchni ikry w hodowli IT *D* (próba kontrolna); IT – ikra troci, *Rh* – *Rh. mucilaginosa*, *Cr* – *Cr. laurenti*

Ustalone zależności wskazują, że postępujące zmiany w dotychczasowym siedlisku drożdży spowodowały zahamowanie tworzenia biofilmu i zainicjowanie etapu rozpraszania komórek zdolnych do tworzenia nowych mikrokolonii. Na tym etapie rozwoju społeczności Mitchell i Blankenship (2006) obserwowali wysoką aktywność zewnątrzkomórkowego związku sygnałowego – farnesolu. Według jednej z hipotez związek ten jako czynnik *quorum sensing* może powodować zahamowanie formowania biofilmu (Hogan 2006) poprzez inhibicję tworzenia strzępek (Ramage i in. 2002) i zainicjowanie etapu jego opuszczania przez pojedyncze komórki drożdży (Greenberg 2003).

W niniejszych badaniach prowadzono również kontrolę zmienności liczby mikroorganizmów żywych w hodowlach ikry, ale nieinokulowanych szczepami drożdży. Jako wskaźnik dynamiki zmian zastosowano, tak jak w pozostałych hodowlach, test kolorymetryczny redukcji XTT. Z analizy przeprowadzonych pomiarów wynika, iż zrównoważony poziom absorbancji utrzymywał się do 13 dnia inkubacji jaj. Po tym czasie nastąpił wyraźny, statystycznie istotny, wzrost wartości oznaczanego farmazanu tetrazoliny (rys. 32). Wyjaśnienia powyższej zmienności doszukiwać się można w rozwoju aktywności oddechowej rozwijającego się zarodka lub w zwiększającej się liczbie np. komórek bakteryjnych.





Rys. 33. Zależność zmian aktywności oddechowej szczepów *Rhodotorula* i *Cryptococcus* drożdży zaadherowanych do powierzchni ikry i obecnych w środowisku ją otaczającym. Czcionką pogrubioną wyróżniono wartości istotne statystycznie

Dywersyfikacja gatunkowa bioty bakteryjnej w czasie prowadzenia doświadczenia wykazała intensywny rozwój *Ps. fluorescens*. Możliwe jest to, iż nadmierny wzrost tego drobnoustroju przyczynił się do wzrostu wskaźnika aktywności oddechowej komórek. W takim jednak przypadku powinno dojść do niedotlenienia embrionu, wskutek czego czas wylęgu larwy powinien zostać opóźniony lub doprowadzić do jej obumarcia. Takiej zależności jednak nie stwierdzono (tab. 22). Zastanawiająca jest jednak zaobserwowana wyraźna odwrotnie proporcjonalna zależność statystycznie istotnego spadku aktywności metabolicznej szczepów drożdży oznaczonych w 16 dniu hodowli i statystycznie potwierzonego wzrostu wartości absorbancji w hodowlach nieinokulowanych grzybami jednokomórkowymi. Jediną z możliwych do zaakceptowania interpretacją jest zahamowanie rozwoju bakterii w wyniku statycznej i/lub bójczej aktywności *Rh. mucilaginosa*. W innym przypadku zobrazowane na rys. 32 zmiany w wariancie  $ITRh$  wykazałyby nie spadek, a jedynie postępujący wzrost oznaczonego formazanu tetrazoliny.



W piśmiennictwie podkreślana jest szczególna wrażliwość jaj ryb łososiowatych na niską koncentrację tlenu (Hamor i Garside 1976, Rombough 1988). Jedną z wielu funkcji, jakie pełni epibiota bakteryjna jaj, jest ograniczenie rozwoju drobnoustrojów, których obecność w środowisku jest niepożądana lub przypadkowa. W efekcie ich rozwoju mamy do czynienia z postępującą infekcją, której najczęstszym skutkiem jest obumarcie ikry. W przypadku jaj ryb łososiowatych ich przeżywalność jest bardzo zróżnicowana i wynosi od 0,0% do ponad 85,0% (Bromage i in. 1992). Paradoksalnie mikrobiologiczna struktura utworzona na powierzchni może jednak sprzyjać przyleganiu form grzybiczych. Mimo że funkcje ochronne jaj w postaci enzymów litycznych działają bójczo lub statycznie na grzyby, w tym przede wszystkim na *Saprolegnia parasitica* (Kudo 1992), wyniki zawarte w niniejszej pracy wskazują na ich ograniczoną skuteczność. Zwiększająca się objętość biofilmu, wyrażona wzrostem absorpcji formazanu tetrazoliny (rys. 32), najprawdopodobniej stała się bezpośrednią przyczyną wydłużonego cyklu rozwojowego zarodka w stosunku do wariantu bez obecności grzybów jednokomórkowych (tab. 22). Przyczyną takiego stanu mógł być rozrastający się biofilm, który ograniczył dostęp do tlenu.

Tabela 22. Wylęg larw troci w poszczególnych wariantach badawczych

Zmiany w hodowlach	Warianty hodowli ikry					
	IT D <sup>+</sup>	IT D <sup>-</sup>	IT D <sup>+</sup>	IT D <sup>-</sup>	IT D <sup>+</sup>	IT D <sup>-</sup>
	240°D		252°D		260°D	
Larwy	20,0	87,0	78,0	100,0	100,0	100,0
Jaja żywe	80,0	13,0	22,0	0,0	5,0	0,0
Jaja obumarłe	–	–	–	–	30,0	25,0

D<sup>+</sup> – obecność drożdży w hodowli, D<sup>-</sup> – inkubacja ikry bez drożdży (próbna kontrolna).

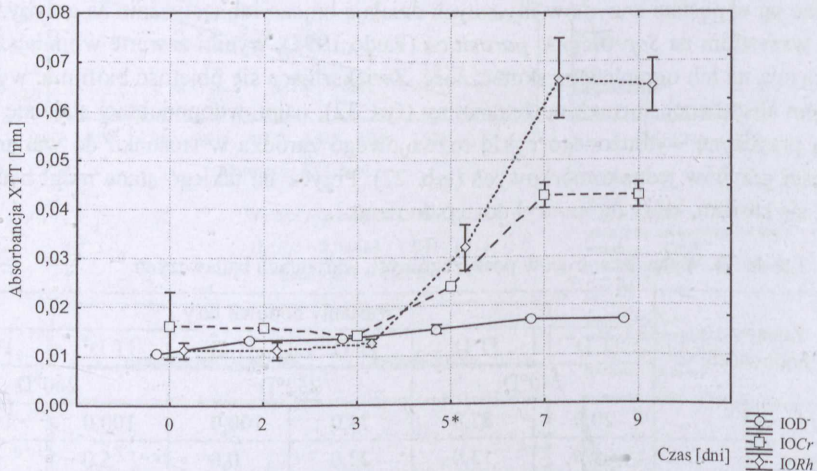
Skutki nadmiernego rozwoju mikroflory na powierzchni jaj nie stały się jednak przyczyną jej nadmiernego obumierania we wczesnych etapach rozwoju. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzono, że wyliczony pod koniec doświadczenia odsetek obumarłych jaj był porównywalny we wszystkich wariantach hodowlanych (tab. 22). Wynikało to zapewne z obecności zapasów tlenowych zgromadzonych w ciałku żółtym i płynie perywitalnym, co zaspokoilo podstawowe potrzeby rozwijającego się embrionu (Hansen i Olafsen 1999).

W przypadku zapłodnionych jaj ryb łososiowatych Ortner i in. (1993) wskazali na wysoką tolerancję deficytów tlenowych w środowisku. Zapotrzebowanie tlenowe w cyklu zarodkowym nie jest stałe – wzrasta wraz z kolejnymi etapami rozwoju embrionalnego. Niewystarczające ilości tlenu w środowisku mogą powodować obumarcie ikry, opóźnienie wylęgu (tab. 22) lub przedwczesny wylęg (Czerkies i in. 2001). Luberka-Bieńkowska (1995), powołując się na wyniki zawarte w kilku publikacjach, podkreśla, że niska koncentracja tlenu w środowisku może stymulować proces wykluwania się ryb. Autorka sugeruje, iż stan przedwczesnego wylęgu jest wynikiem zwiększającego się zapotrzebowania oddychowego zarodków i tworzenia warunków hipoksji w środowisku otaczającym. W kontekście powyższych doniesień nasuwa się jednak pytanie, czy biofilm uformowany na powierzchni jaja, będący barierą dla wymiany tlenowej, może stymulować niskie stężenie tlenu w wodzie i inicjować sekrecję enzymu wyklucia. Jeżeli przyjmiemy, że wyklucie larw jest



wynikiem interakcji odpowiedniego stadium rozwoju zarodka i oddziaływania czynników środowiska, to mikrobiocenozy na powierzchni zarodka mogą spowodować wylęg larw niedojrzałych i wysoką śmiertelność w późniejszych etapach życia.

Analogiczne badania wykonano na ikrze okonia. W kontrolnych wariantach badawczych, nieinokulowanych szczepami drożdży, wartość pomiaru produktu redukcji XTT na ikrze utrzymywała się na porównywalnym poziomie (rys. 34) i była istotnie mniejsza niż w próbach inokulowanych szczepami *Rh. mucilaginosa* (0,001, przy  $p < 0,05$ ) oraz *Cr. laurenti* (0,209, przy  $p < 0,05$ ).



Rys. 34. Aktywność oddechowa drożdży w hodowli ikry okonia. \* Istotny wzrost absorbancji na powierzchni ikry w hodowlach IORh i IOCr; IO – ikra okonia, Rh – *Rh. mucilaginosa*, Cr – *Cr. laurenti*, D<sup>-</sup> – próba kontrolna

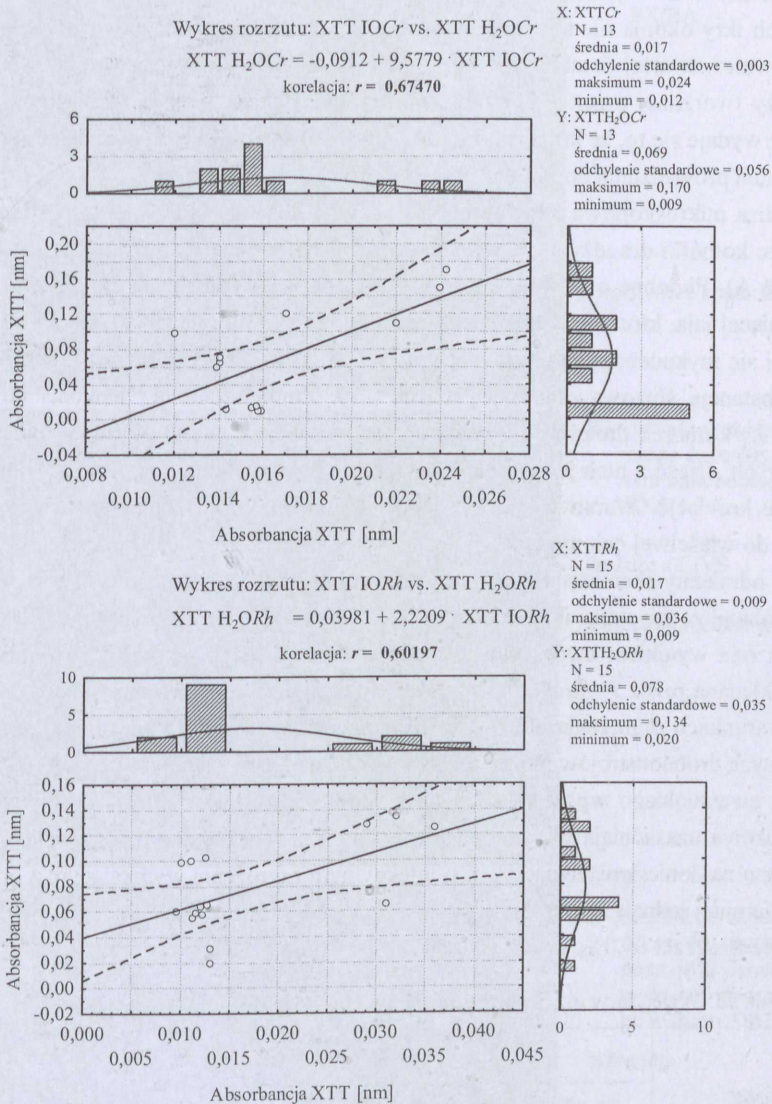
Pomimo niepotwierdzonych statystycznie różnic w wartościach absorbancji formazanu tetrazoliny, uzyskanych w poszczególnych hodowlach inokulowanych szczepami drożdży (0,236, przy  $p < 0,05$ ), wartości te pozwoliły na sformułowanie wniosku, iż powierzchnia jaj była zasiedlana przede wszystkim przez *Rh. mucilaginosa* (rys. 34), znacznie mniej intensywnie natomiast przez *Cr. laurenti*. W próbach modelowych ze szczepami *Rh. mucilaginosa* lub *Cr. laurenti* stwierdzono wzrost aktywności oddechowej komórek oznaczonych na ikrze okonia dopiero w piątej dobie prowadzonego doświadczenia – uzyskano wartości istotne statystycznie na poziomie odpowiednio 0,000157, przy  $p < 0,05$  oraz 0,0056, przy  $p < 0,05$ . Wzrost wartości absorbancji formazanu tetrazoliny utrzymywał się na porównywalnym poziomie do czasu zakończenia doświadczenia (rys. 34).

Wykazana istotność różnic pomiędzy modelami doświadczalnymi i ich środowiskami (wodą, ikrą) wyklucza wpływ mikrobioty „przypadkowej” na uzyskane wartości oznaczeń absorbancji w wariantach próby kontrolnej (IOD<sup>-</sup>) oraz IORh i IOCr (rys. 34).

Wyznaczonej tendencji zmian w czasie prowadzenia doświadczenia towarzyszyły zmiany wartości wskaźnika kolorymetrycznego zastosowanego w bezpośrednim otoczeniu ikry. Tak jak w przypadku ikry troci wędrownej również w przypadku ikry okonia obserwacje potwierdziły wyniki analizy statystycznej (rys. 35). W obu hodowlach uzyskano pozy-



tywną korelację pomiędzy poziomami absorbancji formazanu tetrazoliny w wodzie hodowlanej i na powierzchni ikry.



Rys. 35. Zależność zmian aktywności oddechowej wybranych szczepów drożdży zaadherowanych do powierzchni ikry okonia i obecnych w środowisku ją otaczającym. Czcionką pogrubioną wyróżniono wartości istotne statystycznie

Z niniejszej analizy i obserwacji zmian w strukturze ikry okonia wynika, że adherencja komórek drożdży do powierzchni jaj następowała wraz ze zmniejszaniem się lepkości mukoproteinowej warstwy otaczającej jaja. Zmiana miejsca dotychczasowego funkcjonowania komórek została przeanalizowana dzięki przeprowadzonym obserwacjom mikroskopowym.



W pierwszych trzech dniach inkubacji nie stwierdzono obecności drożdży na właściwej osłonce jaj, a obecne formy bakteryjne obserwowano sporadycznie (rys. 36 A). W przeciwieństwie do wyznaczonych etapów tworzenia biofilmu na powierzchni jaj troci w hodowlach ikry okonia nie stwierdzono obecności społeczności złożonych. Nie zaobserwowano również zwartej zamkniętej w egzopolisacharydowej *matrix* zorganizowanej mikrobiocenozy tworzonej przez zainokulowane drożdże i epibiotę ikry okonia (rys. 36 B). Interesujące wydaje się to, że komórki drożdży zachowały swoją aktywność metaboliczną do ostatniego dnia prowadzenia doświadczenia (rys. 36 B).

Analiza mikroskopowa obrazów wybarwianych zestawem FUN-1 i Calcofluor M2R wykazała, że komórki drożdży zadherowane do powierzchni jaja okonia nie tworzyły strzępek (rys. 36 A). Podobne obserwacje przeprowadzono na obrazach mikroskopowych warstwy otaczającej jaja, która była podstawowym miejscem ich przylegania (rys. 36 B). Obraz rozwijającej się mykocenozy przedstawiony na rys. 36 C sugeruje, iż drożdże ulegają związaniu z substancją śluzową otaczającą ziarna ikry. Zmniejszenie jej lepkości powoduje uwalnianie się komórek drożdży, w związku z czym zwiększa się w otoczeniu liczba form planktonowych. Część z nich jednak ulega związaniu z powierzchnią jaja, czego efektem są wyznaczone korelacje. Warstwa śluzowa jest więc naturalną barierą ograniczającą dostęp mikrobioty do właściwej osłony jaja.

Tak odmienny charakter formowanej przez mikroorganizmy społeczności wynika najprawdopodobniej ze specyfiki ikry składanej przez okonia. Paxton i Willoughby (2000) uważają, iż jest ona wynikiem ewolucyjnego dostosowania, z czego gatunek czerpie określone korzyści. Składana przez *P. fluviatilis* ikra ma jednak ograniczoną powierzchnię występowania, co w warunkach zagrożenia infekcją mikrobiologiczną lub niekontrolowanym przerostem zadherowanych drobnoustrojów może zwiększyć ryzyko zahamowania jej rozwoju. Zasadność rozważenia ewentualnego wpływu obecnych w środowisku drożdży na prawidłowy rozwój embrionu okonia uzasadniają wyniki zawarte w tab. 23. W dostępnej literaturze przedmiotu nie napotkano na doniesienia świadczące o infekcyjnym zagrożeniu wynikającym z obecności drożdży. Niemniej jednak śmiertelność jaj w wariantach inokulowanych jednokomórkowymi grzybami przekraczała 65,0%, w stosunku do 36,0% w hodowlach kontrolnych.

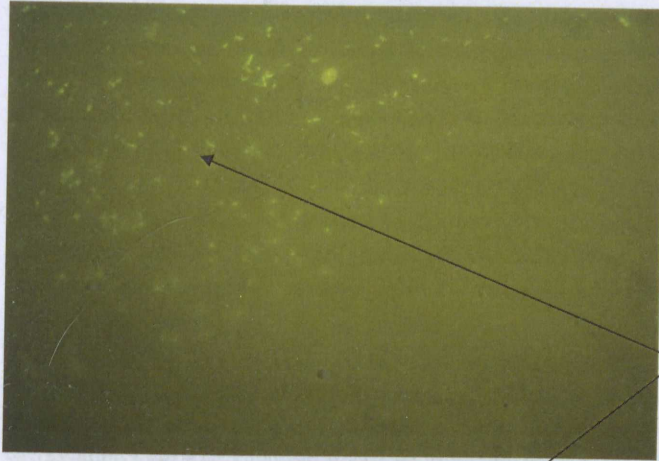
Tabela 23. Wylęg larw okonia w poszczególnych wariantach badawczych

Zmiany w hodowlach	Warianty hodowli ikry					
	IO D <sup>+</sup>	IO D <sup>-</sup>	IO D <sup>+</sup>	IO D <sup>-</sup>	IO D <sup>+</sup>	IO D <sup>-</sup>
	22°D		24°D		26°D	
Larwy	2	70	20	80	45	90
Jaja żywe	98	30	80	20	55	10
Jaja obumarłe	—	—	—	—	65,0	36,0

D<sup>+</sup> – obecność drożdży w hodowli, D<sup>-</sup> – inkubacja ikry bez drożdży (próba kontrolna).

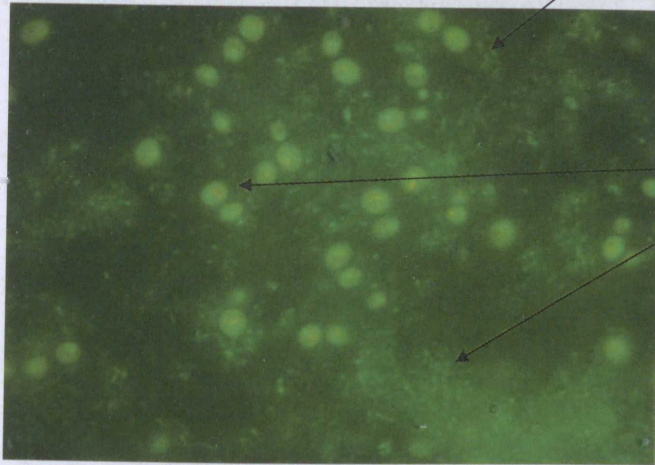


A – mikrobiota jaj w pierwszym dniu hodowli w filtrze EX/BA



pojedyncze komórki bakterii

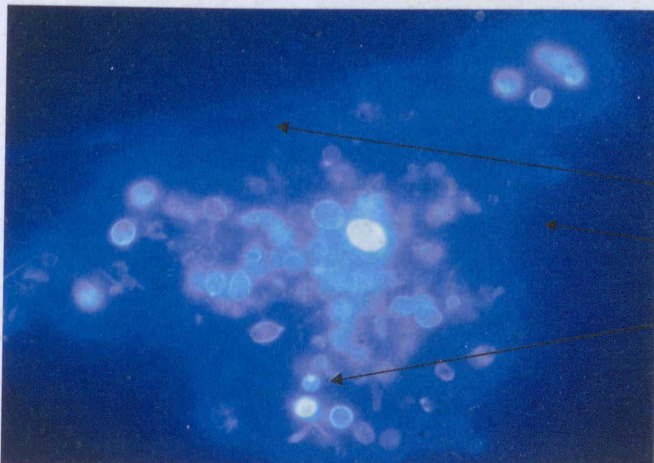
B – komórki drożdży przytwierdzone do osłony jaja w piątym dniu hodowli w filtrze EX/BA



drożdże z CIVS

mikrokolonie bakteryjne

C – komórki drożdży przytwierdzone do warstwy śluzowej otaczającej ziarna ikry w siódmym dniu hodowli, widoczne w filtrze DAPI



brzeg jaja

przestrzeń pomiędzy ziarnami ikry

komórki drożdży z aktywnym jądrem

Rys. 36. Obecność bakterii i drożdży na osłonach jaj okonia



Uzyskane wyniki badań wydają się potwierdzać hipotezę, według której zgromadzenie dużej masy połączonych ze sobą jaj sprzyjać może kolonizacji przez grzyby jednokomórkowe. Zbyt intensywny rozwój drożdży mógł spowodować ograniczenie rozwoju embrionu i, w niektórych przypadkach, jego śmierć. W 22°C w wariacie nieinokulowanym grzybami wśród jaj wykazujących żywotność aż 70,0% było larwami. W tym samym czasie inkubacji w hodowli prowadzonej z drożdżami stwierdzono jedynie 2,0% larw. Poziom ich wylęgu wzrósł do 45,0% w ostatnim dniu prowadzenia doświadczenia (tab. 23). W niektórych jednak przypadkach prowadzić to może nawet do zniszczenia całej populacji. Takiej obserwacji na ikrze ropuchy *Boreas Bufo* Baird & Girard, której charakter ikry jest bardzo zbliżony do ikry okonia, donali Blaustein i in. (1994); infekcja była wywołana wodnymi grzybami *Saprolegniaceae*.

W kontekście uzyskanych wyników zasadne jest rozważenie powinowactwa ściany komórkowej drożdży ze strukturą biochemiczną „wiązącą” pojedyncze jaja okonia. W rozwijających się i dojrzałych jajach okoniowatych istotną rolę odgrywają białka lektynopodobne. Jak już wspomniano na wstępie, mechanizm regulacji przylegania i tworzenia złożonych społeczności jest determinowany tzw. wiązaniami *lectin-like adhesion* lub *sugar-insensitive adhesion* (Verstepen i Klis 2006). Może więc powinowactwo związków współtworzących warstwę otaczającą jaja okonia i odpowiedzialnych za flokulację lub adherencję ligand drożdży stało się procesem inicjującym unieruchomienie komórek testowanych grzybów. W ten sposób lepka struktura pełni funkcję jednej z najważniejszych barier powstrzymujących penetrację mikroorganizmów i zapobiega bezpośredniej infekcji jaj przez formy eukariotyczne. Potwierdzeniem powyższej sugestii są obserwacje braku wpływu obumarłej ikry na rozwój znajdujących się w jej bezpośrednim kontakcie jaj „zdrowych”. Nie potwierdzono sugestii Kitancharoen i in. (1997) jakoby „martwa” ikra stawała się miejscem intensywniejszego rozwoju mikrobioty i przenoszenia infekcji na pozostałe ziarna.

Podobne wyniki uzyskali Paxton i Willoughby (2000), wykazując, że w kolonizacji ikry okonia przez *Saprolegnia* sp rozwój grzybów był ograniczony do jednego jaja i że nie wpływał na rozwój pozostałych jaj. W społeczności komensalnej epibioty jaj ryb bytują również formy fakultatywnie chorobotwórcze lub patogenne, w przypadku których ograniczenie rozwoju następuje na amorficznej zewnętrznej warstwie ikry. Zainfekowane jaja zostają odizolowane w wyniku obecności tej warstwy, co zapobiega rozwojowi infekcji. W tym swoim ekosystemie realne zagrożenie wynika więc z konsumpcji tlenu przez obecną w nim mikrobiotę i jego letalnego wpływu na rozwijający się embrion. W procesie rozwojowym ikry okonia i troci bardzo ważną rolę odgrywa właśnie dostępność tlenu (Smith i in. 2001).

Zbieżność obserwacji stała się potwierdzeniem protekcyjnej roli zewnętrznej warstewki ikry. Pozostaje jednak pytanie, dlaczego „zimmobilizowane” komórki drożdży nie tworzyły funkcjonującej społeczności, co opisano w przypadku ikry troci. Być może warunki biochemiczne siedliska ikry tych ryb nie inicjowały genetycznie warunkowanego procesu formowania biofilmu. Oczywiście było więc pominięcie etapu tworzenia strzępek, których obecność wyznacza jeden z etapów formowania społeczności i pozostania komórek w mikroekosystemie (rys. 36).

Wyniki niniejszej analizy mykologicznej wody zawieszającej jaja okonia uzupełniają powyższe wnioski. Wzrost wartości absorpcji formazanu tetrazoliny w czasie trwa-



nia doświadczenia oraz prawdopodobna dostępność związków, w tym przede wszystkim białkowych, w środowisku hodowanym była sprzyjająca dla utrzymania ich aktywności metabolicznej również w formie planktonowej.

Uzyskane wyniki badań wykazały, że obecność *Rh. mucilaginosa* i *Cr. laurenti* nie była pierwotnym czynnikiem prowadzącym do obumarcia 65,0% jaj okonia i 30,0% troci wędrawnej. Bez wątplenia aktywność metaboliczna grzybów mikroskopowych przyczyniła się do opóźnienia wylęgu larw i stała się pośrednim czynnikiem letalnym w przypadku pozostałych jaj. Najprawdopodobniej było to wynikiem obecności drożdży w zewnętrznej warstwie lepkiej osłonki ikry okonia oraz rozwoju biofilmu na powierzchni jaj troci wędrawnej i deficytu tlenowego.

W wodach estuarium Odry zróżnicowana gatunkowo ichtiofauna odnajduje dla siebie środowiska cząstkowe – miejsce żerowania, rozrodu i podchowu wylęgu, a także stadiów młodocianych. Warunkiem jednak ich pełnego wykorzystania jest stopień zanieczyszczenia miejsca bytowania ryb. Determinuje on bowiem swobodę przemieszczania się ryb uznanych za gatunki wskaźnikowe i poziom zmienności gatunków typowych dla określonego estuarium (Whitfield i Elliott 2002). Biorąc pod uwagę strukturę gatunkową ichtiofauny i jakość wody, Tórz (2007) uznała, że warunki bytowania ryb w Odrze mieszczą się pomiędzy „dobrymi” a „wystarczającymi”, co odpowiada wg klasyfikacji jakości estuarium Whitfield i Elliott (2002) klasie B–C.

W kontekście powyższych doniesień i wyników badań własnych wyłoniło się kolejne pytanie: Czy stała obecność drożdży w rybach i otaczającej je wodzie może odzwierciedlać jakość tego środowiska? Zwłaszcza że w piśmiennictwie naukowym, w którym przedmiotem badań była obecność lub aktywność niektórych gatunków drożdży, wyłoniła się pewna niekonsekwencja. Z jednej strony pojawiły się sugestie o współzależności wzrostu liczby jednokomórkowych grzybów i wzrostu zanieczyszczenia, z drugiej strony Hagler i Ahearn (1987) wskazują na wody oligotroficzne jako siedlisko np. niektórych gatunków z rodzaju *Rhodotorula* czy *Cryptococcus* (Lachance i Sfarter 1998). W związku z powyższym w dalszej części pracy przeanalizowano możliwość wykorzystania grzybów w ocenie mikrobiologicznej jakości wód.

#### 4.8. Drożdże jako wskaźniki zanieczyszczenia wód

Definicja wskaźników mikrobiologicznego zanieczyszczenia wód wskazuje na mikroorganizmy, których obecność w środowisku dla nich nietypowym pozwala na określenie stopnia i źródła zanieczyszczenia. Ustawodawstwo międzynarodowe (European Commission 2000) i krajowe (Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r.) w mikrobiologicznym monitoringu zanieczyszczenia wód uwzględnia przede wszystkim niepatogenne wskaźniki bakteriologiczne. Wielu autorów wskazuje jednak na ograniczone zależności pomiędzy wskaźnikami bakteryjnymi a potencjalnymi patogenami występującymi w wodzie (Arvanitidou i in. 2002). Od lat prowadzone są badania wskazujące na konieczność zwiększenia liczby wskaźników określających stan jakości wód. Uzyskane rezultaty stały się podstawą stworzenia Water Quality Foundation (WQI) powołanej przez National Sanitation Foundation (2005). Program zwiększenia liczby indykatorów, zawartych w trzech obszer-



nych kategoriach: fizycznych, chemicznych i biologicznych, nie uwzględnia jednak możliwości wykorzystania np. grzybów drożdżopodobnych jako wskaźników czystości wód. Już w latach 60. ub. wieku mykolodzy wskazywali na korelacje pomiędzy liczebnością mykocenozy drożdżowych a zaburzonym oddziaływaniem antropogenicznym i profilem ekologicznym cieków naturalnych (Cooke i in. 1960, Hedrick i Soygen 1967). Badania przeprowadzone w estuarium Odry przez Bogusławską-Wąs i Dąbrowskiego (2007) wykazały zróżnicowanie przestrzenne ogólnej liczby drożdży i grzybów drożdżopodobnych, zależne od dopływu zanieczyszczeń miejskich i związanego z tym pogarszającego się układu hydrochemicznego. Monitoring zmian w środowisku nie jest jednak warunkowany jedynie czynnikami antropogenicznymi, wynika również z naturalnej ewolucji ekosystemu.

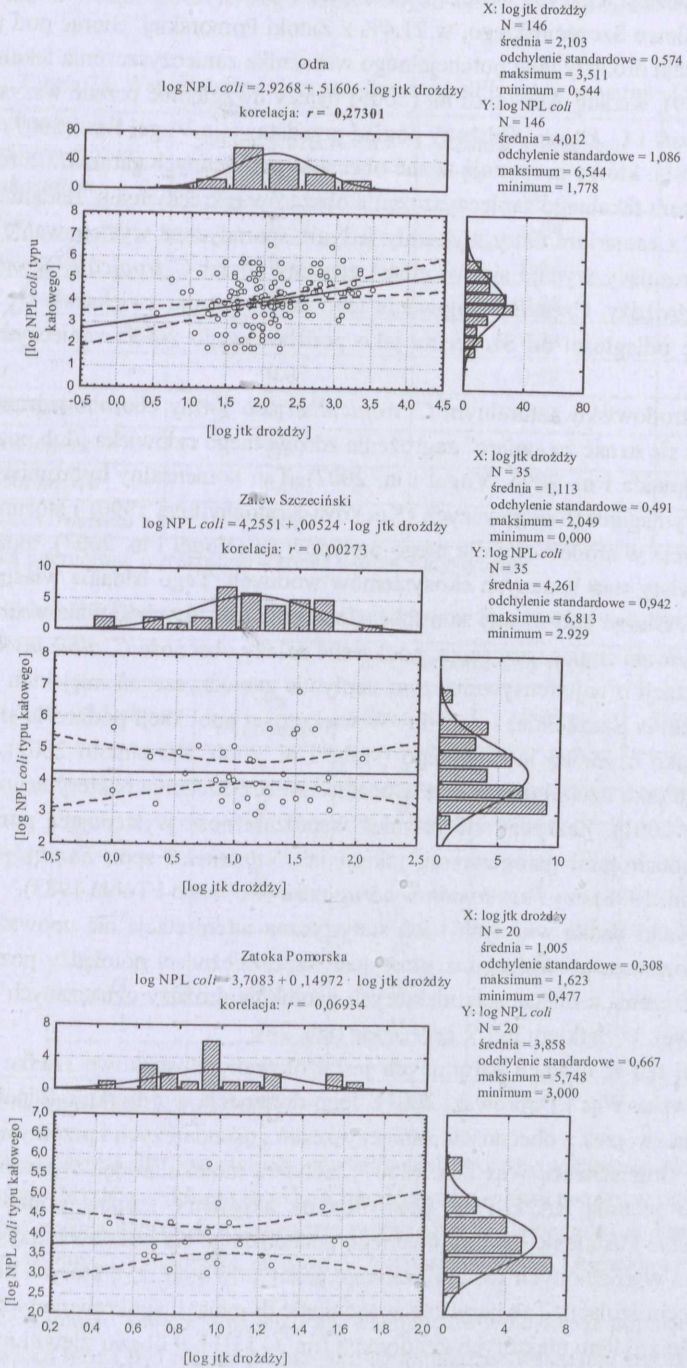
Fakt występowania grzybów mikroskopowych w korelacji z bakteryjnymi wskaźnikami określającymi jakość wód coraz częściej zostaje wykorzystywany w ocenie środowiska. El-Taweel i Shaban (2001) wykazali, że w próbach oczyszczonych ścieków, pomimo dopuszczanego przez normy poziomu standardowych indykatorów (ogólnej liczby bakterii, bakterii z grupy *coli*, bakterii *coli* typu fekalnego i enterokoków), podwyższony był poziom „nowych” wskaźników (ogólna liczba drożdży, *Candida albicans* i *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus* sp). Według ww. autorów jest to wystarczający argument do uznania proponowanych grup drobnoustrojów za obowiązujące „narzędzia” kontroli. Wydaje się jednak, że jednoznaczne wskazanie takiej zależności obarczone jest zbyt dużym błędem.

Przede wszystkim, co potwierdzają badania własne, taka korelacja nie dotyczy wszystkich typów środowisk wodnych. Wyniki badań własnych wskazują, co prawda, na ścisłą korelację pomiędzy NPL bakterii grupy *coli* typu kałowego a ogólną liczbą drożdży ( $r = 0,27$ ), ale jedynie dla obszaru rzecznoego (rys. 37). W Zalewie Szczecińskim i Zatoce Pomorskiej takich zależności nie potwierdzono (rys. 37).

Wyznaczona tendencja zmian właściwa jedynie dla określonych środowisk może sprzyjać powstaniu wątpliwości we wnioskowaniu. Poza tym niepoprawne staje się stosowanie wskaźnika, którego zależność od uznanych indykatorów nie jest stała. Nie wiadomo bowiem, od jakiego poziomu zanieczyszczenia fekalnego np. ogólna liczba drożdży staje się rzeczywistym odzwierciedleniem stanu mikrobiologicznego środowiska. Wydaje się, że podobne dylematy mieli Arvanitidou i in. (2005). Przeprowadzili oni test korelacji obejmujący ogólną liczbę bakterii heterotroficznych, całkowitą liczbę bakterii grupy *coli* typu kałowego i enterokoków, dla których została ustalona statystyczna współzależność. W przypadku jednak ogólnej liczby drożdży powyższej interpretacji analiza statystyczna nie potwierdziła. Cztery lata wcześniej zespół pod kierownictwem tego samego mikrobiologa prowadził badania na próbach wody pobranych z najdłuższej rzeki Grecji – Alikmon. Przedstawione wyniki badań (Arvanitidou i in. 2002) wskazują na ścisły związek pomiędzy oznaczoną liczbą drożdży a całkowitą liczbą bakterii z grupy *coli* i bakterii *coli* typu kałowego.

W naturalnych ciekach, których poziom wskaźników hydrochemicznych wskazuje na zrównoważony układ ekologiczny nieobciążony napływem ścieków, dominują populacje gatunków niefermentujących (Hagler i Ahern 1987). W wodach zanieczyszczonych natomiast oznacza się najczęściej obecność oportunistycznych patogenów z rodzaju *Candida* (Medeiros i in. 2008), które stanowią dominujący odsetek izolatów (Arvanitidou i in. 2005, Vogel i in. 2007).





Rys. 37. Testy korelacji pomiędzy ogólną liczbą drożdży a NPL coli typu kałowego w badanych strefach estuarium Odry. Czcionką pogrubioną wyróżniono wartości istotne statystycznie



W badaniach własnych grzyby z rodzaju *Candida* oznaczono w 64% prób pobranych z Odry, w 50,8% z Zalewu Szczecińskiego, w 21,4% z Zatoki Pomorskiej. Biorąc pod uwagę obecność tego rodzaju drożdży jako potencjalnego wskaźnika zanieczyszczenia fekalnego (Arvanitidou i in. 1999), według Almeida i in. (2005) należy uwzględnić przede wszystkim obecność *C. parapsilosis* i *C. krusei*. Zbliżony pogląd przedstawiają Vogel i in. (2007) oraz Sherry i Qureschi (1981), którzy proponują uznać obecność patogennych gatunków z rodzaju *Candida* za indykatora fekalnego zanieczyszczenia obszarów rekreacyjnych. Badania próbek wody pobranych z estuarium Odry wykazały jedynie sporadyczne występowanie tych drobnoustrojów. Interesujący wydaje się natomiast znaczny udział *C. tropicalis* w ogólnej liczbie izolowanych drożdży. Częstość izolowania tego drobnoustroju zwiększała się wraz ze zmniejszaniem się odległości od Szczecina jako podstawowego źródła zanieczyszczeń (zob. tab. 11).

Obecność w środowisku naturalnym *C. tropicalis*, jako formy chorobotwórczej dla człowieka, proponuje się uznać za „miarę” zagrożenia zdrowotnego człowieka i/lub poziomu zanieczyszczenia (Almeida i in. 2005, Vogel i in. 2007). Ten komensalny oportunistyczny patogen, o małych wymaganiach odżywczych (Kockova-Kratochvilova 1990) i stosunkowo długim czasie przeżycia w środowisku dla niego nietypowym (Vogel i in. 2007), może odzwierciedlać rzeczywisty stan badanych ekosystemów wodnych. Tego badania własne jednak nie potwierdziły. Biorąc pod uwagę sam fakt oznaczenia niektórych gatunków drożdży jako wskaźników poziomu zanieczyszczenia, podkreślić należy obecność *C. albicans* w próbach pobranych ze stacji o najintensywniejszym napływie zanieczyszczeń miejskich (Most Cłowy i Urząd Morski w Szczecinie) – tab. 11. W większości publikacji podkreśla się znaczenie *C. albicans* jako czynnika infekcyjnego (Hube i in. 2000, Kumamoto 2002), coraz częściej rozważanego jako uzupełniający test w ocenie zanieczyszczenia bakteryjnego wody (El-Tawel i Shaban 2001). Zaznacza się również współzależność występującą pomiędzy *C. albicans* a drobnoustrojami patogennymi, takimi jak *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* (Efstratiou i in. 1998) czy *Pseudomonas aeruginosa* (Robertso i Tobin 1983).

Uzyskane wyniki badań własnych i ich statystyczna interpretacja nie upoważnia do sformułowania jednoznacznego wniosku o istniejącej współzależności pomiędzy poziomem fekalnego zanieczyszczenia a obecnością niektórych gatunków drożdży oznaczanych w próbach wody estuariowej. Wyjątkiem był *S. cerevisiae* (tab. 24).

Drobnoustrój ten w ciekach naturalnych jest izolowany stosunkowo rzadko (Comi i in. 1983, Bogusławska-Wąs i Dąbrowski 2001). Jego dominacja w odsetku ogólnej liczby drożdży wskazuje na związek z obecnością zanieczyszczeń gospodarczych i przemysłowych. Zastosowana przez Bogusławską-Wąs i in. (2007) technika molekularnego typowania wewnątrzgatunkowego metodą RAPD-PCR pozwoliła na określenie stopnia podobieństwa szczepów *S. cerevisiae* i ustalenie ich ewentualnego pochodzenia. Na podstawie uzyskanych profili genetycznych wyróżnionych zostało dziewięć genotypów (tab. 25), których obecność powiązано z miejscem izolacji. Tabelaiczne zestawienie dominacji spokrewnionych szczepów wskazywało, że źródłem niektórych genotypów (np. G i H) był obszar zlewni nieobciążony wpływem dużych aglomeracji miejskich. Pojawienie się natomiast pozostałych genotypów związane było z napływem zanieczyszczeń miejskich. Podstawą wnioskowania były wyniki skorelowania parametrów środowiskowych, dywersyfikacji przestrzennej jtk *S. ce-*



*revisiae* i profilu genetycznego izolowanych szczepów (Bogusławska-Wąs i in. 2006, 2007).

Tabela 24. Współzależność wzrostu drożdży i NPL *coli* w estuarium Odry

Przynależność rodzajowa drożdży	Odra Szczecińska	Zalew Szczeciński	Zatoka Pomorska
<i>Aureobasidium</i>	-0,11	0,17	-0,41
<i>Candida</i>	-0,12	0,24	-0,40
<i>Cryptococcus</i>	0,29	0,65	-0,09
<i>Geotrichum</i>	0,15	0,38	0,07
<i>Kloeckera</i>	-0,38	0,38	0,41
<i>Pichia</i>	-0,09	0,58	0,46
<i>Rhodotorula</i>	0,34	-0,13	0,65
<i>Saccharomyces</i>	<b>0,67</b>	0,51	-0,19
<i>Sporobolomyces</i>	-0,08	0,19	0,12
<i>Zygosaccharomyces</i>	-0,09	0,07	0,46

Czcionką pogrubioną wyróżniono wartość istotną statystycznie.

Tabela 25. Obecność poszczególnych genotypów *S.cerevisiae* w stacjach badawczych

Genotypy	Miejsca pobierania prób					
	Widuchowa	Odra Wschodnia	Szczecin	Police	Trzebież	Świnoujście
-	-	A	-	-	-	-
-	B	B	-	-	-	-
-	C	C	C	-	-	-
-	D	D	D	D	-	-
-	-	E	-	E	-	-
-	-	F	F	-	-	-
G	G	G	-	-	-	-
H	-	H	-	-	-	-
-	-	I	-	-	-	-

Źródło: Bogusławska-Wąs i in. (2007).

Wyznaczone dla pozostałych przedstawicieli drożdży zależności nie były istotne statystycznie (tab. 24). Nie wyklucza to jednak poszukiwania innych rodzajów bioindykatorów wśród tradycyjnie występujących w przewodzie pokarmowym stałocieplnych lub mikroeukariotycznych form zdolnych do tworzenia hodowli w temperaturze 37°C (Almeida i in. 2005).

Reasumując, niniejsze badania upoważniają do wniosku, iż populacje drożdży obecne w środowisku mogą być rozpatrywane jako uzupełniające wskaźniki zanieczyszczenia mikrobiologicznego. Jest to jednak możliwe jedynie w warunkach stałego monitoringu jakości wód i przy ustaleniu profilu ekologicznego zbiornika.







## 5. Podsumowanie

Zdolne do formowania zespołów mikrobiologicznych drożdże są istotnym elementem mikrobioty ekosystemów wodnych. Zmiany czynników biotycznych i abiotycznych zachodzące w środowisku naturalnego bytowania drożdży mają często związek ze zmiennością ich liczby i struktury gatunkowej. Zdolność adaptacji mikroorganizmów do zmieniających się warunków jest wciąż zbyt słabo poznana. Stało się to jedną z ważniejszych przeszkód w rzeczywistym oszacowaniu obecności drożdży w ogólnej liczbie mikrobioty w określonych niszach ekologicznych.

Dywersyfikacja obecności określonych społeczności grzybów w estuarium Odry wskazuje na jego strefowość mykologiczną. Wyznaczone na podstawie danych jakościowych wartości wskaźników Jaccarda i Margalefa wskazują, że to wody Odry wzbogacają strukturę gatunkową mykobioty Zalewu Szczecińskiego; nie mają znaczenia wlewy z Zatoki Pomorskiej. Uzupełniając powyższe wyniki o określoną zmienność liczebności drożdży w poszczególnych strefach estuarium, wynioskowano, iż – w przeciwieństwie do struktury gatunkowej – częstość izolacji drożdży jest zależna od napływu wód z Zatoki Pomorskiej. Odzwierciedla się to w liczbie izolowanych drożdży należących do Ascomycota w górnej strefie estuarium i zmianie tej liczby na korzyść grzybów jednokomórkowych oznaczanych jako Basidiomycota, izolowanych ze środkowego i z dolnego obszaru estuarium.

W tym miejscu należy podkreślić, iż dla niektórych gatunków drożdży Zalew Szczeciński stanowi granicę ekologiczną ich przeżywalności i/lub aktywności metabolicznej. Powyższe wnioskowanie jest o tyle istotne, że dotyczy jedynie form zdolnych do wzrostu w warunkach laboratoryjnych. W warunkach minimalnego stężenia dostępnych związków odżywczych szczepy drożdży egzystują w stanie zminimalizowanej aktywności metabolicznej w maksymalnie wydłużonym czasie generacji. Ponadto zmienność w populacjach drożdży w poszczególnych strefach estuarium, poza ewentualną śmiercią komórek, spowodowana jest przejściem z dotychczasowej formy hodowlanej w VBNC. Niezdolność do reprodukcji w określonym czasie, przy zachowaniu aktywności oddechowej, nie wpływa jednak na ich podstawowe funkcje, jakie pełnią w ekosystemie. Jednak odzwierciedla się to w liczbie izolowanych szczepów, co może być mylnie interpretowane podczas oznaczania ich obecności. Fakt nieoznaczenia gatunku w hodowlach laboratoryjnych nie jest jednoznaczny z jego nieobecnością w środowisku. Wskazuje jedynie na przyjętą przez mikroorganizmy określoną strategię przetrwania, której nadrzędnym celem jest utrzymanie podstawowych funkcji życiowych w środowisku dla nich nietypowym.

We wszystkich strefach badanego estuarium dominującymi gatunkami drożdży były: *Rh. mucilaginosa*, *Rh. glutinis* i *Cr. laurenti*. Wyniki analiz genetycznych wykazały śródplądowe pochodzenie oznaczonych drożdży. Jednak w przypadku szczepów *Cr. laurenti* wyznaczona wysoka heterogeniczność gatunkowa świadczy o ich odmiennym pierwotnym po-



chodzeniu. Analiza wyników badań sugeruje również, iż nie mamy do czynienia z formami autochtonicznymi – pomimo obecności profili biochemicznych szczepów charakterystycznych dla miejsca ich izolacji. Istotne w ekologii tych jednokomórkowych grzybów jest to, że obecność komórek *Cr. laurenti* w formie planktonowej jest raczej przypadkowa. Bez względu na profil genetyczny szczepów i strefy estuarium drożdże *Cr. laurenti* tworzą przede wszystkim społeczności osiadłe, formując biofilm. Oczywiście stają się w związku z tym wyniki umiarkowanego zróżnicowania przestrzennego kryptokoków w poszczególnych strefach estuarium Odry i stwierdzenie, iż docelowym miejscem ich bytowania nie jest toń wodna jak w przypadku *Rhodotorula* sp.

W wodach estuarium Odry dominujący udział drożdży z rodzaju *Rhodotorula* miały gatunki *Rh. glutinis* i *Rh. mucilaginosa*. W społecznościach drożdży z Zalewu Szczecińskiego stanowiły one 34,6%, a z Zatoki Pomorskiej – 28,7%. W środowisku słodkowodnego odcinka estuarium obecność tych gatunków ustalono jedynie na poziomie 3,7%, w stosunku do ich ogólnej liczby. Tak mała frekwencja przedstawicieli tego rodzaju w ogólnej strukturze gatunkowej mykocenozy rzecznej nie była wynikiem niesprzyjających warunków. W przeciwieństwie np. do *S. cerevisiae*, którego obecność w badanym środowisku wynikała z napływu zanieczyszczeń miejskich, częstość izolacji drożdży z rodzaju *Rhodotorula* nie była skorelowana ze wskaźnikami mikrobiologicznego zanieczyszczenia. Ustalona natomiast została statystycznie istotna współzależność ich ogólnej liczby i obecności azotu organicznego. Teoretycznie więc dopuszczalne jest rozważenie tego czynnika jako stymulatora procesów metabolicznych oznaczonych drożdży karotenoidowych ( $r = 0,47$ ). Mimo że obecność wyróżnionych genotypów i stopień podobieństwa wewnątrzgatunkowego wyizolowanych szczepów wskazuje na ich śródładowe pochodzenie, wydaje się, że obszar obejmujący wody rzeczne stanowi jedynie tymczasowe miejsce bytowania szczepów *Rhodotorula*. Opisane w rozdziale 4.5 preferowanie tworzenia społeczności planktonowej w górnej strefie zbiornika wskazuje, iż w tej części estuarium grzyby z rodzaju *Rhodotorula* nie odnajdują dla siebie odpowiedniego siedliska. W przypadku *Rh. mucilaginosa* możliwe jest rozpatrywanie obecności szczepów jedynie w kontekście ich przeżywalności. Komórki drożdży zawieszane toni wodnej rzeki zostają zawleczone do Zalewu Szczecińskiego. Ustabilizowany profil biogeniczny zbiornika, stężenie azotu organicznego i mineralnego, skorelowane z liczebnością oznaczanych szczepów *Rhodotorula* ( $r = 0,61$ ), wskazują, że dopiero w środkowej strefie estuarium grzyby te znajdują siedlisko intensyfikujące ich funkcjonowanie. Zbyt krótki czas pozostawania komórek w określonych obszarach estuarium lub ich ograniczona aktywność metaboliczna spowodowała niezdolność do uruchomienia mechanizmu adaptacji do warunków środowiskowych charakterystycznych dla poszczególnych stref estuarium Odry. W badaniach własnych nie potwierdzono bowiem, aby profil enzymatyczny wyizolowanych szczepów *Rhodotorula* był charakterystyczny dla miejsca ich izolacji, z wyjątkiem szczepów izolowanych z przewodu pokarmowego ryb.

Obecność określonych związków azotu w środowisku, poza ewentualną intensyfikacją rozwoju komórek, ma istotny wpływ na zawartość  $\beta$ -karotenu w komórce. Obecność tego barwnika w organizmach wodnych ma przede wszystkim zapobiegać fotozniszczeniu komórek. Zdolność do eliminowania toksycznych promieni UV (290–400 nm) może być ważnym czynnikiem ekologicznym determinującym rozmieszczenie mikroorganizmów



w środowisku. Obecność bowiem karotenoidowych związków samodzielnie lub w kombinacji z mykosporynami sprzyja podtrzymaniu wzrostu komórek regularnie ekspozowanych na oddziaływanie promieniowania słonecznego. U drożdży „czerwonych”, należących do Basidiomycetes, synteza tych związków została oznaczona na znacznie wyższym poziomie niż u innych drożdży, w związku z czym są one mniej wrażliwe (jeśli w ogóle są) na uszkodzenia spowodowane przez UV. Najprawdopodobniej wynika to z uwarunkowanej mechanizmem molekularnym kontroli procesu gromadzenia się fotoochronnych komponentów. Proporcje związków karotenoidowych i ich stymulacja uzależnione są od warunków fizykochemicznych środowiska. Być może sukcesu ekologicznego tych mikroskopowych grzybów należy szukać przede wszystkim w związkach stymulujących gromadzenie barwników karotenoidowych.

Na uwagę zasługuje również fakt, że w wodach Odry i Zalewu Szczecińskiego przewagę liczebną w obrębie rodzaju *Rhodotorula* wykazano dla *Rh. mucilaginoso*, natomiast *Rh. glutinis* była jedynie kodominantem. Proporcje w tej międzygatunkowej asocjacji ulegały zmianie w wodach Zatoki Pomorskiej. Znacznie uboższe w związki białkowe wody zatokowe umożliwiają przetrwanie głównie gatunkom zdolnym do wykorzystania nieorganicznych związków azotu. Nie mniej ważny jest również fakt, że fluktuacje warunków bytowania drobnoustrojów wpływają na zmianę niszy ekologicznej drożdży. Dominujące w formie planktonowej w wodach Odry szczepy *Rh. mucilaginoso* w wodach Zalewu Szczecińskiego zmieniają swój profil ekologiczny na osiadły. Preferowanie adherencji komórek tych drożdży zmniejsza więc ich prawdopodobieństwo izolacji z prób wody.

Konieczność zmian w metabolizmie komórki powoduje między innymi zmiany w jej hydrofobowości. Ponieważ drożdże współtworzą mikrobiotę ryb, taka umiejętność staje się jednym z wielu czynników umożliwiających ich przeżycie. Jest to tym bardziej istotne, że obecność drożdży na powierzchni ryb i w ich przewodzie pokarmowym interpretować należy pod kątem relacji symbiotycznych, nie zaś pierwotnych czynników chorobowych. Podstawą takiego wnioskowania były wyniki analizy genetycznej *Rh. mucilaginoso*. Spośród wyróżnionych genotypów wyodrębniono grupę charakterystyczną jedynie dla przewodu pokarmowego określonych gatunków ryb. Co prawda w przypadku *Rh. glutinis* stopień podobieństwa pomiędzy profilami genetycznymi szczepów nie był tak jednoznaczny jak u *Rh. mucilaginoso*, jednak fakt zdominowania przez te drożdże mykobioty ryb wskazuje na ich istotną rolę. Umiejętność adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych, zdolność adherencji do powierzchni oraz aktywność metaboliczna szczepów *Rhodotorula* bezpośrednio wpływa na regulację procesów biokontroli w zachowaniu równowagi mikrobiologicznej ryb.

Nieco inny mechanizm oddziaływania drożdży ustalono w przypadku rybich jaj. W poszukiwaniu odpowiedniej niszy ekologicznej grzyby mikroskopowe, zdolne do adherencji i tworzenia społeczności, wraz z biotą bakteryjną formują biofilm. Nadrzędnym celem jego utworzenia jest pozostanie mikroorganizmów w warunkach dla nich sprzyjających. Idealnym podłożem dla rozwoju zróżnicowanej mikrobioty bogatej w substancje odżywcze (białko, tłuszcze, witaminy oraz mikroelementy) jest ikra ryb. Jej kolonizacja przez drobnoustroje jest selektywna i regulowana przez mechanizm biernej oporności, co prowadzi do stworzenia swoistej mikrobioty. Rozwój mikroorganizmów na powierzchni ikry może jednak doprowadzić do zniszczenia jaj. Przeprowadzone obserwacje wskazują, że obecność



drożdży nie stanowi bezpośredniego zagrożenia dla ikry. Bez wątpienia jednak rozwijający się na powierzchni jaj biofilm przyczynia się do powstawania deficytu tlenowego, którego skutkiem jest wydłużony czas dojrzewania embrionu. Rozważyć wówczas należy potencjalną niedojrzałość larw i zwiększony procent ich śmiertelności, co stwierdzono w badaniach wstępnych w hodowli szczupaka.

Prowadzone rozważania dotyczące ewentualnych mechanizmów zachowań szczepów *Rhodotorula* i *Cryptococcus*, jako przykładowych form zajmujących określone nisze ekologiczne, uzmysławiają, że rozpatrywanie pojedynczego zagadnienia w złożonym systemie może powodować niepoprawne wnioskowanie. Fakt nieizolowania drobnoustrojów z określonego środowiska nie jest jednoznaczny z jego nieobecnością. Interpretacja wyników cząstkowych badań bez uwzględniania mechanizmów warunkujących obecność drobnoustrojów w ekosystemie wydaje się obciążona znacznym błędem. Skutkiem tego jest zaniżenie do 1,0–10,0% ogólnej liczby mikroorganizmów rzeczywiście występujących w ekosystemach. Błędne oszacowanie jakościowo-ilościowej struktury drożdży powoduje pominięcie ich faktycznej roli w środowisku. Dotyczy to przede wszystkim związków w mikrobiologicznych społecznościach i roli jej pojedynczych członków. Niestety, prowadzenie badań w wąskim kontekście zależności generuje powielanie błędnych wniosków. Przyjęcie *a priori* obecności określonych gatunków drożdży w zależności od specyficzności środowiska jest niewłaściwe, co *a posteriori* wykazano w badaniach własnych.



## 6. Wnioski

1. W wodach rzecznych estuarium Odry dominowały drożdże z gromady Ascomycota, natomiast w wodach Zalewu Szczecińskiego i Zatoki Pomorskiej najczęściej izolowano drożdże należące do Basidiomycota.

2. Struktura gatunkowa mykobioty Zalewu Szczecińskiego jest kształtowana przez drożdże zawleczone wraz z wodami Odry, w przeciwieństwie do pozostałych drożdży, których liczebność jest uzależniona od napływu wód z Zatoki Pomorskiej.

3. Rzeczywista liczba drożdży oznaczanych w wodzie estuarium może być zaniżona w wyniku ich przechodzenia w formy VBNC.

4. Drożdże z estuarium Odry charakteryzuje potencjał formowania biofilmu, a jego tworzenie determinowane jest warunkami w poszczególnych strefach estuarium.

5. Fenotypowy profil szczepów *Cr. laurenti* koreluje z miejscem ich izolacji; u *Rh. mucilaginosa* i *Rh. glutinis* nie stwierdzono takiej zależności. Wyjątek stanowiły szczepy *Rhodotorula* spp. izolowane z przewodu pokarmowego ryb.

6. Profile genetyczne *Cr. laurenti*, *Rh. glutinis* i *Rh. mucilaginosa* wskazują na pochodzenie śródłądowe analizowanych drożdży; dla większości granicą ekologiczną jest Zalew Szczeciński.

7. Spośród wyróżnionych profili genetycznych *Rhodotorula* spp. wyodrębniono genotypy charakterystyczne jedynie dla przewodu pokarmowego ryb.

8. Analizowane grzyby są zdolne do zasiedlania i kolonizacji ikry ryb oraz współtworzenia biofilmu z ich epibiotą, co ma wpływ na prawidłowy rozwój jaj.

9. Obecność *Rh. mucilaginosa* w hodowlach ikry łososia hamowała rozwój *Ps. fluorescens*.

10. Drożdże obecne w środowisku estuarium Odry powinny stanowić uzupełniający wskaźnik zanieczyszczenia mikrobiologicznego.







## Piśmiennictwo

1. Adams A.S., Six D.L., Adams S.M., Holbein W.E. 2008. In vitro interactions between yeasts and bacteria and the fungal symbionts of the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*), *Microbiol. Ecol.* 56: 460–466.
2. Agapow P.M., Bininda-Emonds O.R.P., Crandall K.A., Gittleman J.L., Mace G.M., Marshall J.C., Purvis A. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *Quarterly Rev. Biol.* 79: 161–179.
3. Almeida J.M.G.C.F. de. 2005. Yeast community survey in the Tagus estuary. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53: 295–303.
4. Andlid T., Juárez R.V., Gustafsson L. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.* 30: 321–334.
5. Andlid T., Vázquez-Juárez R., Gustafsson L. 1998. Yeasts isolated from the intestine of rainbow trout adhere to and grow in intestinal mucus. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7: 115–126.
6. Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 5–9.
7. Antachopoulos Ch., Meletiadi J., Roilides E., Sein T., Walsh T. 2006. Rapid susceptibility testing of medically important Zygomycetes by XTT Assay. *J. Clin. Microbiol.* 44 (2): 553–560.
8. Aranishi F. 2000. High sensitivity of skin cathepsins L and B of European eel (*Anguilla anguilla*) to thermal stress. *Aquaculture* 182: 209–213.
9. Armstrong J.D., Nislow K.H. 2006. Critical habitat during the transition from maternal provisioning in freshwater fish, with emphasis on Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*). *J. Zool.* 269: 403–413.
10. Arukwe A., Forlin L., Goksøyr A. 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 2576–2583.
11. Arvanitidou M., Kanellou K., Constantinidis T.C., Katsouyannopoulos V. 1999. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 81–84.
12. Arvanitidou M., Kanellou K., Vagiona D.G. 2005. Diversity of *Salmonella* spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. *Environ. Res.* 99: 278–284.
13. Arvanitidou M., Kanellou K., Katsouyannopoulos V., Tsakris A. 2002. Occurrence and densities of fungi from northern Greek coastal bathing waters and their relation with faecal pollution indicators. *Water Res.* 36: 5127–5131.
14. Atkin C., Neilands J., Phaff H. 1970. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporodiobolus*, and *Sporobolomyces* and a new alanine-con taining ferriochrome from *Cryptococcus melibiosum*. *J. Bacteriol.* 103: 722–733.



15. Austin A., Al-Zahrani A.M.J. 1988. The effect of antimicrobial compounds on the gastrointestinal microflora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 33: 1–14.
16. Austin B., Austin D.A. 1999. Bacterial fish pathogens. Disease of farmed and wild fish. London, Springer Praxis Publishing.
17. Bagge D., Hjeltn M., Johansen C., Huber I., Gram L. 2001. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2319–2325.
18. Baillie G., Douglas L. 2000. Matrix polymers of *Candida* biofilm and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J. Antimicrob. Chemother. 46: 397–403.
19. Baleiras Couto M.M., Hartog B.J., Huis in't Veld J.H.J., Hofstra H., Vossen J.M.B.M. van der. 1996. Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. Food Microbiol. 13: 59–67.
20. Balfry S.K., Iwama G.K. 2004. Observations on the ingeren variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Com. Biochem. Physiol., part B 138 (3): 207–211.
21. Barcina I., Lebaron P., Vives-Rego J. 1997. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. FEMS Microbiol. Ecol. 23: 1–9.
22. Barghoorn E.S., Linder D.H. 1994. Marine fungi: their taxonomy and biology. Farlowia 1: 395–467.
23. Barker G.A., Smith S.N., Bromage N.R. 1989. The bacterial flora of rainbow trout L., eggs and its relationship to development success. J. Fish. Dis. 12: 281–293.
24. Barnett J.A., Payne R.W. Yarrow D. 1990. Yeasts characteristics and identification. 2nd edition. Cambridge, Cambridge Univ. Press.
25. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. 2000. Yeast: characteristics and identification, 3rd edition. Cambridge, Cambridge Univ. Press.
26. Baros Lopes M. de, Soden A., Martens A.L., Henschke P.A., Langridge P. 1998. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. Int. J Syst. Bacteriol. 48: 279–286.
27. Bartoszewicz M., Rygiel A. 2006. Biofilm jako podstawowy mechanizm zakażenia miejsca operowanego – metody prewencji w leczeniu miejscowym. Chir. Pol. 8: 171–178.
28. Berg D.E., Akopyantz N.S., Kersulyte D. 1994. Fingerprinting microbial genomem Rusing the RAPD or AP-PCR metod. Meth. Mol. Cell Biol. 5: 174–185.
29. Blankenship J.R., Mitchell A.P. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr. Opinion Microbiol. 9: 588–594.
30. Blaustein A.R., Rokit D.G., Holt R.A., O'Hara R.K. 1994. Pathogenic fungus contributes to amphibian losses in the Pacific Northwest. Biol. Conserv. 67: 251–254.
31. Blixt Y., Knutsson R., Borch E., Radstrom P. 2003. Interlaboratory random amplified polymorphic DNA typing of *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria. Internat. J. Food Microbiol. 83: 15–26.
32. Boekhout T., Kurtzmann C.P. 1996. Principles and methods used in yeast classification and overview of currently accepted yeast genera, in: Nonconventional yeasts in biotechnology. Ed. K. Wolf, Berlin, Springer: 1–81.
33. Bogusławska-Wąs E. 1999. Analiza mikroflory wód i osadów dennych Zalewu Szczecińskiego w aspekcie występowania drożdży i grzybów drożdżopodobnych. Praca doktorska. Szczecin, AR (maszynopis).



34. Bogusławska-Wąs E., Czekajło-Kołodziej U., Mędrala D., Dąbrowski W. 2007. Intraspecific or intraspecies differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fish, sewage and the Odra waters based on randomly amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) technique. *Pol. J. Environ. Stud.* 16: 17–22.
35. Bogusławska-Wąs E., Czekajło-Kołodziej U., Skibińska M. 2006. Przeżywalność *Saccharomyces cerevisiae* Zalewowego Estuarium Odry, w: Integracja strukturalna i funkcjonalna mikrobiocenoz ekosystemów wodnych. IV Ogólnopolska konferencja hydromikrobiologiczna, Mikołajki 21–24 maja 2006. Olsztyn, Wyd. UWM.
36. Bogusławska-Wąs E., Czeszejko K., Czekajło-Kołodziej U., Mędrala D. 2005. Intraspecies differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fish and the Odra estuary. *Elektron. J. Pol. Agric. Univ., Ser. Biotechnol.* 8 (3), [www.ejpau.media.pl](http://www.ejpau.media.pl), dostęp dn. 05.09.2005 r.
37. Bogusławska-Wąs E., Dąbrowski W. 1999. Species differentiation of yeasts and yeast-like organisms in the water and bottom sediments of the Szczecin Lagoon. *Baltic Coastal Zone* 3: 65–75.
38. Bogusławska-Wąs E., Dąbrowski W. 2001. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: 451–458.
39. Bogusławska-Wąs E., Dąbrowski W., Daczkowska-Kozon E. 1998. Analysis of Szczecin Lagoon waters mycoflora. *Acta Mycol.* 33 (1): 101–108.
40. Borsuk M.E., Reichert P., Peter A., Schager E., Burkhardt-Holm P. 2006. Assessing the decline of brown trout (*Salmo trutta*) in Swiss rivers using a Bayesian probability network. *Ecol. Modell.* 192: 224–244.
41. Brasitus T.A. 1984. Lipid dynamice and lipid-protein interaction in rat enterocyte plasma membranes, in: Attachment of organisms to the gut mucos. Ed. E.C. Boedeker, Boca Ration, CRC Press: 71–78.
42. Brinkmann F.S., Lepie D.D. 2005. Analiza filogentyczna, w: Bioinformatyka. Eds. A.D. Baxevanisa, B.F.F. Ouellettea, Warszawa, PWN: 342–383.
43. Brizzio S., van Brocko M. 1998. Characterization of wild yeats killer from Nahuel Huapi National Park (Patagonia, Argentina). *J. Food Technol. Biotechnol.* 4: 273–278.
44. Bromage N., Jones J., Randall C., Thrush M., Davies B., Springate J., Duston J., Barker G. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141–166.
45. Brylińska M. 2000. Ryby słodkowodne Polski. Warszawa, PWN.
46. Buchholtz W. 1991. Materiały do monografii Dolnej Odry. Warunki hydrologiczno-hydrograficzne. *Pr. IBW PAN* 22: 1–118.
47. Butinar L., Santos S., Spencer-Martins I., Oren A., Gunde-Cimerman N. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol. Lett.* 244: 229–234.
48. Butinar L., Spencer-Martins I., Gunde-Cimerman N. 2007. Yeasts in high Arctic glaciers: the discovery of a new habitat for eucariotic microorganisms. *Ant. Leeuw.* 91: 277–289.
49. Buts J.P., De Keyser N., De Raedemaeker L. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatr. Res.* 36: 522–527.
50. Cafarchia C., Romito D., Coccioli C., Camarda A., Otranto D. 2008. Phospholipase activity of yeasts from wile birds and possible implications for human diseases. *Med. Mycol.* 46 (5): 429–434.



51. Cafarchia C., Romito D., Iatta R., Camarda A., Montagna M.T., Otranto D. 2006. Role of birds of prey as carriers and spreaders of *Cryptococcus neoformans* and other zoonotic yeasts. *Med. Mycol.* 44 (6): 485–492.
52. Calvente V., Benuzzi D., Tosetti M.I.S. de. 1999. Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 47: 167–172.
53. Calvente V., Orellano M.E. de, Sansone G., Benuzzi D., Tosetti M.I.S. de. 2001. A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. *J. Microbiol. Methods* 47: 273–279.
54. Carlsson J. 1997. Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv. Dental Res.* 11: 75–80.
55. Caruso D., Lazard J. 1999. Subordination stress in Nile tilapia and its effect on plasma lysozyme activity. *J. Fish Biol.* 55: 451–454.
56. Carvalho A.C.T., Ruiz-Placios G.M., Cervantes P., Cervantes L.E., Jiang X., Pickering L.K. 2001. Molecular characterisation of invasive and noninvasive *C. jejuni* and *C. coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1353–1359.
57. Casey G.D., Dobson A.D.W. 2004. Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice – a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 327–335.
58. Causton H.C., Ren B., Koh S.S., Harbison Ch.T., Kanin E., Jennings E.G., Lee T.I., True H.L., Lander E.S., Young R.A. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biol. Cell.* 12: 323–337.
59. Chandra J., Kuhn D.M., Mukherjee P.K., Hoyer L.L., McCormick T., Ghannoum M.A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 183: 5385–5394.
60. Cho J.H., Park I.Y., Kim M.S., Kim S.C. 2002. Matrix metalloproteinase 2 is involved in the regulation of the antibacterial peptide parasin I production in catfish skin mucosa. *FEBS Lett.* 531: 459–463.
61. Cobb B.D., Clarkson J.M. 1994. A simple procedure for optimizing the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic. Acids. Res.* 22 (18): 3801–3805.
62. Cole A.M., Weis P., Diamond G. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of Winter flounder. *J. Biochem.* 272: 12008–12013.
63. Colwell R.R. 2000. Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *J. Inf. Chemoth.* 6: 121–125.
64. Comi G., Ruffoni B., Cantomi C., Psino L. 1983. Indigine ecologica sui lieviti delle acque di alcune specie di perci del Lago Maggiore. *Arch. Vet. Ital.* 34: 1.
65. Connell L., Redman R., Craig S., Scorzetti G., Iszard M., Rodriguez R. 2008. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. *Microbiol. Ecol.* 56: 448–456.
66. Convention on Biological Diversity. 1992. Rio de Janeiro, United Nations. Earth Summit, [www.biodiv.org/convention/articles.asp](http://www.biodiv.org/convention/articles.asp), dostęp dn. 05.09.2007 r.
67. Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G., Ladd T., Nickel J.C., Dasgupta M., Marrie T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 1921–1931.
68. Costerton W., Lewandowski Z. 1997. The biofilm lifestyle. *Adv. Dental Res.* 11: 192–195.
69. Couto B.M.M., Vossen J.M. van der, Hofstra H., Huis in't Veld J.H. 1994. RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 24: 249–260.
70. Czaczyk K. 2004. Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *Post. Mikrobiol.* 43 (3): 267–283.



71. Czerkies P., Brzuzan P., Kordalski K., Luczynski M. 2001. Critical partial pressures of oxygen causing precocious hatching in *Coregonus lavaretus* and *C. albula*. *Aquaculture* 196: 151–158.
72. Czeszejko K. 2003. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne surowca rybnego pochodzącego z Odry i Zalewu Szczecińskiego *Listeria* spp. ze szczególnym uwzględnieniem *L. monocytogenes*. Praca doktorska. Szczecin, AR (maszynopis).
73. Dackowska-Kozon E., Bogusławska-Wąs E., Dąbrowski W., Radziejewska T., Maśłowski J., Dworczak H. 1996. Effects of the Odra River discharge on microflora abundance in sediments of the Szczecin Lagoon, in: Ecology, protection, shaping of coastal zone of Southern Baltic. International Symposium, Ustka May 23–25, 1996. [b.w.].
74. Dahm H., Strzelczyk E. 2004. Żyjące lecz nie dające się hodować bakterie. *Post. Mikrobiol.* 43: 251–265.
75. Daveley M.E., O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (4): 847–67.
76. Diehl R., Bless R. 1995. First report on egg deposition and egg morphology of the endangered endemic Romanian perch. *J. Fish Biol.* 46: 1086–1090.
77. Divol B., Lonvaud-Funel A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99: 85–93.
78. Dix N.J., Webster J. 1995. *Fungal Ecology*. London, Chapman and Hall: 225–265.
79. Doering T.L. 2000. How does *Cryptococcus* get its coat? *Trends Microbiol.* 8 (12): 547–553.
80. Dorocka-Bobkowska B., Konopka K. 2003. Powstawanie biofilmu *Candida* i jego znaczenie w patogenezie zakażeń przewlekłych-przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.* 40: 405–410.
81. Dumas J., Darolles V. 1999. Environmental characteristics and egg to fry survival of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in a pyrenean foothills stream, the River Nivelles (France). *CYBIUM* 23: 29–44.
82. Dynowska M. 1995. Drożdże i grzyby drożdżopodobne jako czynniki patogenne oraz bioindykatory ekosystemów wodnych. Praca habilitacyjna. Olsztyn, WSP.
83. Ebran N., Julien S., Orange N., Auperin B., Molle G. 2000. Isolation and characterisation of novel glycoproteins from fish epidermal mucus: correlation between their pore forming properties and their antibacterial activities. *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 271–280.
84. Efstratiou M.A., Mavridou A., Richardson S.C., Papadakis J.A. 1998. Correlation of bacterial indicator organisms with *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in sea water. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 342–346.
85. Ekendahl S., O'Neill A.H., Thomsson E., Pedersen K. 2003. Characterisation of yeasts isolated from deep igneous rock aquifers of the Fennoscandian Shield. *Microb. Ecol.* 46: 416–42.
86. Elaichouni A., Emmelo J. van, Claeys G., Verschraegen G., Verhelst R., Vanechoutte M. 1994. Study of the influence of plasmids on the arbitrary primer polymerase chain reaction fingerprint of *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 115 (2–3): 335–339.
87. Elliott M., Dewailly F. 1995. Structure and components of European estuarine fish assemblages. *Netherlands J. Aquat. Ecol.* 29: 397–471.
88. Elliott M., Fernandes T.F., Jonge V.N. de. 1999. The impact of recent European Directives on estuarine and coastal science and management. *Aquat. Ecol.* 33: 311–321.
89. Elliott M., Hemingway K.L. 2002. *Fishes in estuaries*. Oxford, Blackwell Sci. Ltd.
90. Elliott M., McLusky D.S. 2002. The need for definitions in understanding estuaries. *Est. Coast. Shelf Sci.* 55: 815–827.



91. Ellis A.E. 1974. Non-specific defense mechanisms in fish and their role in disease processes. *Dev. Biol. Stand.* 49: 337–352.
92. Ellis A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 827–839.
93. El-Taweel G.E., Shaban A.M. 2001. Microbiological quality of drinking water at eight water treatment plants *Int. J. Environ. Health Res.* 11 (4): 285–290.
94. European Commission. 2000. The Water Framework Directive 60/2000/EC. Establishing a framework for the Community action in the field of water Policy. Official Journal of the European Community. Available at: <[http://Europa.eu.int/como/environment/water/water-framework/index\\_en.html](http://Europa.eu.int/como/environment/water/water-framework/index_en.html)> [Accessed October 2005].
95. Fairbrige R.W. 1980. The estuary: its definition and geochemical role, in: *Chemistry and geochemistry of estuaries*. Eds. E. Olausson, I. Coto. New York, J. Wiley: 1–35.
96. Fast M.D., Sims D.E., Burka J.F., Mustafa A. Ross N.W. 2002. Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol., Ser. A* 132: 645–657.
97. Fell J.W. 1993. Rapid identification of yeast species using three primers in polymerase chain reaction. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 174–180.
98. Fell J.W., Boekhout T., Fonseca A., Sampaio J.P. 2001. Basidiomycetous yeasts, in: *The mycota. Systematic and evolution*. Eds. D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin, P.A. Lemke. Berlin, Springer-Verlag: 3–35.
99. Fell J.W., Boekhout T., Fonseca A., Scorzetti G., Statzell-Tallman A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeast as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 50: 1351–1371.
100. Fell, J.W., Kurtzman C.P. 1999. Nucleotide sequence analysis of a variable region of the large subunit rRNA for identification of marine occurring yeasts. *Curr Microbiol.* 21: 295–300.
101. Fevolden S.E., Roed K.H., Fjalestad K.T. 2002. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 95: 53–65.
102. Finn R.N. 2007. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria. *Aquatic Toxicol.* 81: 337–354.
103. Fouda M.M.G., Knittel D., Hipler U-Ch, Elsner P., Schollmeyer E. 2006. Antimycotic influence of  $\beta$ -cyclodextrin complexes – in vitro measurements using laser nephelometry in microtiter plate. *Inter. J. Pharm.* 311: 113–121.
104. Fouz B., Devesa S., Gravningen K., Barja J., Toranzo A. 1990. Antibacterial action of the mucus of the turbot. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 10: 56–59.
105. Freeland J.R. 2008. *Ekologia molekularna*. Warszawa, PWN: 225–258.
106. Frieman M.B., Cormack B.P. 2004. Multiple sequence signals determine the distribution of glycosylphosphatidylinositol proteins between the plasma membrane and cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 150: 3105–3114.
107. Fröhlich K.-U., Madeo F. 2001. Apoptosis in yeast: a new model for aging research. *Experimental Gerontology* 37: 27–37.
108. Fry J.C. 1990. Oligotrophs, in: *Microbiology of extreme environments*. Ed. C. Edwards, Milton Keynes, Open University Press: 93.
109. Gadanho M., Almeida M.G.C.F., Sampaio J.P. 2003. Assessment of yeast diversity in marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Ant. Leeuw.* 84: 217–227.



110. Gadanho M., Sampaio J.P. 2005. Occurrence and diversity of yeasts in the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microbiol. Ecol.* 50: 408–417.
111. Gagliano M., Bauer F.F., Pretorius I.S. 2002. The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2: 433–470.
112. Garcia V. de, Brizzio S., Libkind D., Buzzini P., Brocko M. van. 2007. Biodiversity of cold-adapted yeasts from glacial meltwater rivers in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol. Ecol.* 50: 331–341.
113. Gash A.P., Spellman P.T., Kao K.M., Carmel-Harel O., Essen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biol. Cell* 11: 4241–4257.
114. Gatesoupe F.J., Aubin J., Quentel C., Labbé L. 2005 a. Ofimer probiotic study on rainbow trout. IV. The settlement of intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry submitted to probiotic treatment, in: Fish and shellfish larviculture symposium. 4th Fish and Shellfish Larviculture. Symposium. Eds. C.I. Hendry, G. van Stappen, M. Wille, P. Sorgeloos. EAS Special Publication No. 36. Ghent University, Belgium: 180–183.
115. Gatesoupe F.J., Aubin J., Quentel C., Labbé L., Forraz M. 2005. Ofimer probiotic study on rainbow trout. II. Intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) submitted to probiotic treatment with *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldardii, in: Lessons from the past to optimise the future. Eds. B. Howell, R. Flos. EAS Special Publication No. 35. Oostende, Belgium, European Aquaculture Society: 217–218.
116. Gatesoupe F.J., Zambonino Infante J.L., Cahu C., Quazuguel P. 1997. Early weaning of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*: the effect on microbiota, with particular attention to iron supply and exoenzymes. *Aquaculture* 158: 117–127.
117. Gateusoupe F.J. 2007. Live yeast in the Gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effect on fish Health and development. *Aquaculture* 267: 20–30.
118. Geoghegan M., Andrews J.S., Biggs C.A., Eboigboidin K.E., Elliott D.R., Rolfe S., Scholes J., Ojepa J.J., Romero-Gonzalez M.E., Edyvean R.G., Swanson L., Rutkaite R., Ferrnando R., Pen Y., Zhang Z., Banwart S.A. 2008. The polymer physics and chemistry microbial cell attachment and adhesion. *Faraday Discuss.* 139: 85–103.
119. Gilbert P., Das J., Foley I. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dental Res.* 11: 160–167.
120. Gislason G., Olsen R.E., Ringø E. 1996. Comparative effects of dietary Na<sup>+</sup>-lactate on Arctic char, *Salvelinus alpinus* L., and Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquac. Res.* 27: 429–435.
121. Główny Urząd Statystyczny w Szczecinie. 2005. Stan i ochrona środowiska w województwie zachodniopomorskim w 2005 r., [www.stat.gov.pl/szczec/69\\_ochrona\\_srodowiska\\_2005\\_PLK\\_HTML.htm](http://www.stat.gov.pl/szczec/69_ochrona_srodowiska_2005_PLK_HTML.htm), dostęp dn. 10.09.2009 r.
122. Gomez-Suarez C., Busscher H.J., Mei H.C. van der. 2001. Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2531–2537.
123. Graham G.C., Mayers P., Henry R.J. 1994. A Simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *BioTechniques* 16 (1): 49–50.



124. Granot D., Levine A., Dor-Hefetz E. 2003. Sugar-induced apoptosis in yeast cells. *FEMS Yeast Res.* 4: 7–13.
125. Granot D., Snyder M. 1991. Glucose induces cAMP-independent growth-related changes in stationary phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. USA* 88: 5724–5728.
126. Granot D., Snyder M. 1993. Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. *Yeast* 9: 465–479.
127. Greenberg E. 2003. Bacterial communication and group behavior. *J. Clin. Invest.* 112 (9): 1288–1290.
128. Grinde B., Lie O., Poppe T., Salte R. 1988. Species and individual variation lysozyme activity of fish in interest to aquaculture. *Aquaculture* 68: 299–304.
129. Groes M., Teilmann K., Olesen K., Poulsen F.M., Henriksen A. 2002. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the carbohydrate-binding domain of flocculin, a cell-adhesion molecule from *Saccharomyces carlsbergensis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58: 2135–2137.
130. Grundmann H.J., Towner K.J., Dijkshoorn L., Gerner-Smidt P., Mahar M., Seifert H., Vanechoutte M. 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR – based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3071–3077
131. Guffogg S.P., Thomas-Hall S., Holloway P., Watson K. 2004. A novel psychrotolerant member of the Hymenomycetous yeasts from Antarctica: *Cryptococcus waticus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 275–277.
132. Guldal C.G., Broach J. 2006. Assay for adhesion and agar invasion in *S. cerevisiae*. *J. Vis. Exp.* 8 (1): 64.
133. Guo B., Styles C.A., Feng Q., Fink G. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell adhesion and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12158–12163.
134. Hagler A.N., Ahearn D.G. 1987. Ecology of aquatic yeasts, in: *The Yeasts: Yeasts and the Environment*. Eds. A.H. Rose, J.S. Harrison. London, Academic Press.
135. Halme A., Bumgarner S., Styles C.A., Fink G.R. 2004. Genetic and epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 116: 405–415.
136. Hammond P.M. 1995. The current magnitude of biodiversity, in: *Global biodiversity assessment*. Eds. V.H. Heywood. Cambridge, Cambridge University Press: 113–138.
137. Hamor T., Garside E.T. 1976. Developmental rates of embryos of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in response to various levels of temperature, dissolved oxygen and water exchange. *Can. J. Zool.* 57: 1912–1917.
138. Hansen G.H., Olafsen J.A. 1989. Bacterial colonization of cod (*Gadus morhua* L.) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs in marine aquaculture. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1435–1446.
139. Hansen G.H., Olafsen J.A. 1999. Bacterial interactions in the early life stages of marine coldwater fish. *Microbiol. Ecol.* 38: 1–26.
140. Hansen K.C. 1990. Cell surface hydrophobicity of medically important fungi, especially *Candida* species, in: *Microbial cell surface hydrophobicity*. Eds. R.J. Doyle, M. Rosenberg. Washington, D.C., USA, American Society for Microbiology.
141. Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95: 641–655.



142. Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: 1,5 milion species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422–1432.
143. Hawksworth D.L., Lagreca S. 2007. New bottles for old wine: fruit body types, phylogeny, and classification. *Mycol. Res.* 19: 999–1000.
144. Hawksworth D.L., Mueller G.M. 2005. Fungal communities: their diversity and distribution, in: *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. Eds. J. Dighton, P. Oudemans, J. White. New York, Marcel Dekker: 27–37.
145. Hellio C., Pons A.M., Beaupoil C., Bourgougnon N., Gal Y.L. 2002. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of extracts from fish epidermis and epidermal mucus. *Inter. J. Antimicrobial Agents* 20: 214–219.
146. Hogan D. 2006. Talking to themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell* 5 (4): 613–619.
147. Holcomb M., Cloud J.G., Woolsey J., Ingermann R.L. 2004. Oxygen consumption in unfertilized salmonid eggs: an indicator of egg quality? Part A. *Comparative Biochem. Physiol.* 138: 349–354.
148. Hughes G.C. 1974. Geographical distribution of the higher marine fungi. *Veroeffentlichungen des Institutes fuer Meeresforschung Bremerhaven Suppl.* 5: 419–441.
149. Hyde K.D, Jones E.B.G., Leano E., Pointing S.B., Poonyth A.D. 1998. Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiver. Conserv.* 7: 1147–1161.
150. Iger Y., Abraham M. 1997. Rodlet cells in the epidermis of fish expose to stressors. *Tissue Cell* 29: 431–438.
151. Inacio J., Pereira P., Carvalho M. de, Fonseca A., Amaral-Collaco M.T., Spencer-Martins I. 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean – type ecosystem in Portugal. *Mikrob. Ecol.* 44: 344–353.
152. Inacio J., Portugal L., Spencer-Martins I., Fonseca A. 2005. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the *Tremellales* lineage of the *Hymenomycetes* (*Basidiomycota*) producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Res.* 5: 1167–1183.
153. Ingram G. 1980. Substances involved in the natural resistances of fish to infection. *J. Fish Biol.* 16: 23–60.
154. Jasińska E. 1991. Dynamika słonych wód w estuariach polskich rzek. *Pr. IBW PAN* 24: 1–206.
155. Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. 2005. *Modern Food Microbiology*. 7th edition. New York, Springer.
156. Jin Y., Samaranyake L.P., Samaranyake Y. 2004. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugar. *Arch. Oral Biol.* 49: 789–798.
157. Jin Y., Uip H.K., Samaranyake Y.H., Yau J.Y., Samaranyake L.P. 2004a. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2961–2967.
158. Jin Y., Zhang T., Samaranyake Y.H., Fang H.H.P., Yip H.K., Samaranyake L.P. 2005. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilm. *Mycopathology* 159: 353–360.
159. Jones S.R. 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25 (8–9): 841–852.
160. Jurkowska K., Wierzchowska E., Złoczowska I. Ocena stanu środowiska w województwie Zachodniopomorskim na podstawie badań Wojewódzkiego Inspektoratu Ochrony Środowiska. *Wody*, w: *Raport o stanie środowiska w województwie zachodniopomorskim w roku 1999*. Red. M. Landsberg-Ucziwek. Szczecin, Biblioteka Monitoringu Środowiska: 35–58.



161. Kang S.I., Choi H. 2005. Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* into modified surfaces by poly (styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. Col. Surf. B. Biointerfaces 46: 70–77.
162. Kaur R., Domergue R., Zupancic M.L., Cormack B.P. 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. Curr. Opin. Microbiol. 8: 378–384.
163. Khawcharoenporn T., Apisarnthanarak A., Mundy L.M. 2007. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. Infection 35: 51–58.
164. Kimura Y., Nakano Y., Fujita K., Miyabe S., Imasaka S., Ishikawa Y., Sato M. 1998. Isolation and characteristics of yeasts able to grow at low cocncentrations of nutrients. Yeast. 14 (3): 233–238.
165. Kitancharoen N., Hatai K. 1997. Aquatic fungus developing on eggs of salmonids. J. Aquatic Ann. Health 9: 314–316.
166. Kjelleberg S., Hermansson M., Marden P., Jones G.W. 1993. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria with emphasis on the marine environment. Annu. Rev. Microbiol. 41: 25–49.
167. Klis F.M., Boorsma A., Groot P.W. de. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 23: 185–202.
168. Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 26 (3): 239–56.
169. Klotz S.A., Gaur N.K., Lake D.F., Chan V., Rauceo J., Lipke P.N. 2004. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. Infect. Immun. 72: 2029–2034.
170. Knouft J.H., Page L.M., Plewa M.J. 2003. Antimicrobial egg clearing by the fringed darter (Perciformes: Percidae: *Etheostoma crossopeterum*): implications of novel component of parental care in fishes. Proc. R. Soc. Lond. 270: 2405–2411.
171. Kockova-Kratochvilova A. 1990. Yeasts and Yeast-like Organisms. Weinheim, VCH Publisher.
172. Kohlmeyer J. 1983. Geography of marine fungi. Aust. J. Bot. Suppl. 10: 67–76.
173. Kohlmeyer J., Kohlmeyer E. 1979. Marine mycology. The higher fungi. New York, Academic Press.
174. Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B. 1991. Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. Bot. Mar. 34: 1–61.
175. Kompowski A. 1999. Ocena stanu zasobów i racjonalności gospodarki rybackiej prowadzonej przez Rybacką Spółdzielnię Pracy „Regalica” w Gryfinie. Szczecin, Zakład Biologicznych Zasobów Morza AR w Szczecinie (materiały nieopublikowane).
176. Kondo A., Ueda M. 2004. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 28–40.
177. Korzelecka A., Bonisławska M., Winnicki A. 1998. Structure, size and spatial distribution of perch (*Perca fluviatilis* L.) egg components during incubation. Elektron. J. Pol. Agric. Univ., Ser. Fisheries 1 (1), www: ejpau.media.pl, dostęp dn. 05.09.2005 r.
178. Korzon M., Sikora-Wisniewska G., Jankowski Z., Kur J., Banach P. 1999. Clinical and pathological importance of cagA-positive *Helicobacter pylori* strains in children with abdominal complaints. Helicobacter 4: 238–242.
179. Kron S.J. 1997. Filamentous growth in budding yeast. Trends Microbiol. 5: 450–454.
180. Krzykawski S., Szypuła J. 1993. Ichtiofauna, w: Stan środowiska miasta i rejonu Szczecina. Red. J. Janowska. Szczecin, Wyd. STN: 127–146.



181. Krzyściak P., Halska A., Macura A.B. 2007. Występowanie i chorobotwórczość grzybów *Rhodotorula* spp. Post. Mikrobiol. 46 (4): 291–300.
182. Kubiak J. 1980. Studia nad eutrofizacją Zatoki Pomorskiej w rejonie oddziaływania wód Świny i Dziwniej. Praca doktorska. Szczecin, AR (maszynopis).
183. Kudo S. 1992. Enzymatic basis for protection of fish embryos by the fertilization envelope. *Experientia* 48 (3): 277–81.
184. Kumamoto C.A. 2002. *Candida* biofilm. *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (6): 608–611.
185. Kunicki-Goldfinger W.J.H. 2001. Życie bakterii. Warszawa, PWN.
186. Kurtzman C.P. 1994. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* 10: 1727–1740.
187. Kurtzman C.P. 2006. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience* 47: 65–71.
188. Kurtzman C.P. 2006. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience* 47: 65–71.
189. Kurtzman C.P., Fell J.W. 1998. The yeasts, a taxonomic study. 4th edition. Amsterdam, Elsevier.
190. Kurtzman C.P., Fell J.W. 2006. Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology, in: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Eds. C. Rosa, P. Gabor. Berlin, Springer-Verlag.
191. Kurtzman C.P., Phaff H.J. 1987. Molecular taxonomy, in: The yeasts: biology of yeasts. Eds. A.H. Rose, A.J.S. Harrison. London, Academic Press: 63–94.
192. Kurtzman C.P., Robnett C.J. 1991. Phylogenetic relationship among species *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Debaryomyces* and *Schwaniomyces*, determined from partial ribosomal RNA sequences. *Yeasts* 7: 61–72.
193. Kurtzman C.P., Robnett C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Ant. Leeuw.* 73: 331–371.
194. Kurtzman C.P., Robnett C.J., Ward J.N., Brayton C., Gorelick P., Walsh T.J. 2005. Multigene phylogenetic analysis of pathogenic *Candida* species in the *Kazachstania* (*Arxiozyma*) *telluris* complex and description of their ascosporic states as *Kazachstania bovina* sp. nov., *K. heterogenica* sp. nov., *K. pintolopesii* sp. nov., and *K. slooffiae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 43:101–111.
195. Lachance M.A. 1990. Yeast Selection in Nature, in: Yeast strain selection. Ed. Ch. Panchal. New York, Marcel Dekker, USA: 21–42.
196. Lachance M.A. 2003. The Phaff school of yeast ecology. *Int. Microbiol.* 6: 163–167.
197. Lachance M-A, Starter W.T. 1998. Ecology of yeasts, in: The yeasts, a taxonomic study, 4th edition. C.P. Kurtzmann, J.W. Fell. Amsterdam, Elsevier: 21–30.
198. Lachance M-A. 2006. Yeast biodiversity: how many and how much, in: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Eds. C. Rosa, P. Gabor. Berlin, Springer-Verlag: 1–10.
199. Lampert W., Sommer U. 1996. Ekologia wód śródlądowych. Warszawa, PWN.
200. Landergren P, Vallin L. 1998. Spawning of sea trout, *Salmo trutta* L., in brackish waters-lost effort or successful strategy? *Fish. Res.* 35: 229–236.
201. Langille S.E, Geesey G.G., Weiner R.M. 2000. Polysaccharide-specific probes inhibit adhesion of *Hypomonas rosenbergii* strain VP-6 to hydrophilic surfaces. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 25 (2): 81–85.
202. Larsson C., Morales C., Gustafsson L., Adler L. 1990. Osmoregulation of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii* grown in a chemostat at different salinities. *J. Bacteriol.* 172 (4): 1769–1774.



203. Lehman P.F., Lin D., Laser B.A. 1992. Genotyping identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3249.
204. Libkind D., Brizzio S., Ruffini A., Gadanho M., Broock M. van, Sampaio J.P. 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeast from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Ant. Leeuw.* 84: 313–322.
205. Libkind D., Gadanho M., Broock M.R. van, Sampaio I.P. 2005. *Sporidiobolus longiusculus* sp. nov. and *Sporobolomyces patagonicus* sp. nov., novel yeasts of the *Sporidiobolales* isolated from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 503–509.
206. Lipke P.N., Kurjan J. 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* 56: 180–194.
207. Lipke P.N., Wojciechowicz D., Kurjan J. 1989. AG $\alpha$ 1 is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol. Cell Biol.* 9: 3155–3165.
208. Liu H.P. 2001. Transcriptional control of dimorphism in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 728–735.
209. Lock M.A., Wallach R.R., Costerton J.W., Ventullo R.M., Charleston S.E., 1984. River epilithon: toward a structural-functional model. *Oikos* 42: 10–22.
210. Lodder J. 1971. The yeast. Amsterdam, North-Holland Publishing Company.
211. Lopandic K., Monar O., Prillinger H. 2005. Application of ITS sequence analysis, RAPD and AFLP fingerprinting in characterising the yeast genus *Fellomyces*. *Microbiol. Res.* 160: 13–26.
212. Lopera D., Aristizabal B.H., Restrepo A., Cano L.E., Gonzalez A. 2008. Lysozyme plays a dual role against the dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 50 (3): 169–175.
213. Lopez V., Fernandez-Espinar M.T., Barrio E., Ramon D., Querol A. 2003. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 63–71.
214. Lovoll M., Kilvik T., Boshra H., Bogwald J., Sunyer J.O., Dalmo R.A. 2006. Maternal transfer of complement components C3-1, C3-3, C3-4, C4, C5, C7, Bf, and Df to offspring in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Immunogenetics* 58: 168–179.
215. Luberda-Bieńkowska Z. 1995. Właściwości enzymu wyklucia zarodków ryb głabieliowatych (*Coregonidae*). *Acta Acad. Agricult. Tech. Ost. Zootech.* 42: 4–44.
216. Luckenbach T., Kilian M., Triebskorn R., Oberemm A. 2003. Assessment of the developmental success of brown trout (*Salmo trutta* f. *fario* L.) embryos in two differently polluted streams in Germany. *Hydrobiologia* 490: 53–62.
217. Maidan M.M., Rop L. de, Serneels J., Exler S., Rupp S., Tournu H. 2005. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* 16: 1971–1986.
218. Majewski A. 1972. Charakterystyka hydrologiczna estuariowych wód u polskiego wybrzeża. *Pr. PIHM* 105: 3–40.
219. Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R.A. 2009 a. Ovarian fluid plays an essential role in attachment of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* eggs. *Theriogenology* 71 (4): 586–93.



220. Mansour N., Lahnsteiner F., Patzner R.A. 2009. Physiological and biochemical investigations on egg stickiness in common carp. *Anim. Reprod. Sci.* 114: 256–268.
221. Marechal J.-P., Culiolib G., Hellio C., Thomas-Guyone H., Callowd M. E., Clarea A.S., Ortalo-Magne A. 2004. Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcariabifurcata* (*Cystoseiraceae*) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetiamarina* and *Pseudoalteromonas aloplanktis*. *J. Experiment. Marine Biol. Ecol.* 313: 47–62.
222. Markx G.H., Andrews J.A., Mason V.P. 2004. Towards microbial tissue engineering? *Trends Biotechnol.* 22 (8): 417–422.
223. Marques J.C., Pardal M.A., Nielsen S.N., Jorgensen S.E. 1997. Analysis of the properties of exergy and biodiversity along an estuarine gradient of eutrophication. *Ecol. Modelling* 102: 155–167.
224. Martinem C., Gertosio C., Labbe A., Perez R., Ganga M.A. 2006. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. *Electronic. J. Biotech.* 9: 407–413.
225. Mattanovich D., Gasser B., Hohenblum H., Sauer M. 2004. Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.* 113, 121–135.
226. Mayr E. 1942. Systematics and the origin of species. New York, Columbia University Press.
227. McCormack P.J., Wildman H.G., Jeffries P. 1994. Production of antibacterial compounds by phyloplane-inhabiting yeasts and yeast-like fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 927–931.
228. McDougald D., Rice S.A., Weichart D., Kjelleberg S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 1–9.
229. McLaughlin E., Frieders M., Lu H. 1995. A microscopist's view of heterobasidiomycete phylogeny. *Stud. Mycol.* 38: 91–110.
230. Medeiros A.O., Kohler L.M., Hamdan J.S., Missagia B.S., Bartosa F.A.R., Rosa C.A. 2008. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water Res.* 42: 3921–3929.
231. Mercie-Bonin M., Ouazzani K., Schmitz P., Lorthois S. 2002. Enzyme recovery during gas/liquid two-phase flow microfiltration of enzyme/yeast mixtures. *Biotechnol. Bioeng.* 80 (6): 610–21.
232. Mercier-Bonin M., Ouazzani K., Schmitz P., Lorthois S. 2004. Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system *J. Coll. Interf. Sci.* 271: 342–350.
233. Meyer F.P. 1991. Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.* 69: 4201–4208.
234. Middelhoven W.J., Scorzetti G., Fell J.W. 2004. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon* Behrend with the description of five novel species, viz. *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 975–986.
235. Miguez B., Combarro M.P. 2003. Bacteria associated with sardine (*Sardina pilchardus*) eggs in natural environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 329–334.
236. Miguez B., Combarro M.P., Guisande C., Vergara A.R., Riveiro I. 2004. Effect of bacterial epiflora on egg hatching of the Atlantic sardine (*Sardina pilchardus*). *FEMS Microbiol. Ecol.* 50 (2): 111–115.



237. Mikulski Z. 1967. Udział wód rzecznych w stosunkach hydrologicznych Zatoki Pomorskiej. *Biul. PIHM* 10: 452–454.
238. Mitchell A., Blankenship J. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 588–594.
239. Miyazaki S., Nevo E., Bohnert H. 2005. Adaptive oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*: interlope genetic divergence in “Evolution Canyon”. *Biol. J. Linn. Soc.* 84: 103–117.
240. Möck A., Peters G. 1990. Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *J. Fish Biol.* 37: 873–885.
241. Moller S., Sternberg C., Andersen B., Christensen B., Ramos L., Givskov M., Molin S. 1998. In situ gene expression in mixed culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 721–732.
242. Morison C., Bird C., O’Neil D., Leggiadro C., Martin-Robichaud D., Romments M., Waiwood K. 1999. Structure of the egg envelope of the haddock, *Melanogrammus aeglefonus* and effects of microbial colonization during incubation. *Can. J. Zool.* 77: 890–901.
243. Mueller G.J., Whisler H.C. 1994. Fungal parasites of salmon from the Columbia river watershed, in: Salmon saprolegniasis. Report to Bonneville Power Administration. Ed. G.J. Mueller. Washington, University of Washington: 163–188.
244. Mueller R.F. 1996. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Wat. Res.* 30: 2681–2690.
245. Murray C.K., Fletcher T.C. 1976. The immunohistochemical localization of lysozyme in place (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *J. Fish. Biol.* 9: 329–334.
246. Nagahama T. 2006. Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments, in: Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Eds. C.A. Rosa, P. Gabor. Berlin, Springer: 241–262.
247. Nagahama T., Hamamoto M., Nakase T., Takami H. 2001. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. *Ant. Leeuw.* 80: 101–110.
248. Nakata K., Matsubara H., Goshima S. 2003. Artificial incubation of Japanese crayfish (*Cambaroides japonicus*) eggs by using a simple, easy method with a microplate. *Aquaculture* 230: 273–279.
249. Nakata K., Matsubara H., Goshima S. 2004. Artificial incubation of Japanese crayfish (*Cambaroides japonicus*) eggs by using a simple, easy method with a microplate. *Aquaculture* 230: 273–279.
250. National Sanitation Foundation International. 2005. Available at: <http://www.nsf.org> [Accessed October 2005].
251. Neja Z., Wandzel T. 1999. Growth rate of perch (*Perca fluviatilis*) in the Lower Odra Valley Landscape Park. *Limnologie Aktuell Band* 9: 407–416.
252. Nguyen H.-V., Lepingle A., Gaillardin C. 2000. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 71–85.
253. Nguyen V.A.T., Senoo K., Mishima T., Hisamatsu M. 2001. Multiple tolerance of *Rhodotorula glutinis* R-1 to acid, aluminium ion and magnesium ion, and its unusual ability of neutralizing acid medium. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 366–371.
254. Norice C.T., Smith F.J. Jr, Solis N., Filler S.G., Mitchell A.P. 2007. Requirement for *C. albicans* Sun41 in biofilm formation and virulence. *Eukaryot. Cell* 6: 2046–2055.



255. Ohtomo R., Saito M. 2001. Increase in the culturable cell number of *E. coli* during recovery from saline stress: possible implication of resuscitation from the VBNC state. *Microbiol. Ecol.* 42: 208–214.
256. Olafsen J.A. 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200: 223–247.
257. Olive M., Bean P. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clinical Microbiol.* 37 (6): 1661–1669.
258. Oliver J.D. 1993. Formation of viable but non culturable cells, in: Starvation in bacteria. Ed. S. Kjellberg, New York, Plenum Press: 239–271.
259. Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43: 93–100.
260. Olofsson A.-C., Zita A., Hermansson M. 1998. Floc stability and adhesion of green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. *Microbiology* 144: 519–528.
261. Ooyen A. van. 2003. Theoretical aspects of pattern analysis, in: New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Eds. L. Dijkshoorn, K.J. Towner, M. Struelens. Amsterdam, Elsevier B.V.
262. Otto K., Silhavy T.J. 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2287–2292.
263. Paulsen S.M., Engstad R.E., Robertson B. 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast  $\beta$ -glucan and bacterial lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 11: 23–37.
264. Paxton C.G., Willoughby L.G. 2000. Resistance of perch eggs to attack by aquatic fungi. *J. Fish Biol.* 57: 562–570.
265. Pedroso R.S., Costa K.R.C. da, Ferreira J.C., Candido R.C. 2007. Evaluation of melanin production by *Cryptococcus* species in four different culture media. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40 (5): 566–568.
266. Phaff H.J., Starmer W.T. 1987. Yeasts associated with plants, insects and soil, in: The yeasts. Eds. A.H. Rose, J.S. Harrison. 2nd edition. London, Academic Press: 123–180.
267. PN-77C-04615. 1977. Oznaczenie bakterii z grupy coli typu kałowego metodą fermentacyjną próbkową.
268. Price C.W., Fuson G.B., Phaff H.J. 1978. Genome comparison in yeast systematic: Delimitation of species within *Schwaniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*. *Microbiol. Rev.* 42: 161–193.
269. Pritchard D.W. 1967. What is an estuary: a physical viewpoint. *Am. Assoc. Adv. Sci. Estuaries* 83: 3–5.
270. Ramage G., Bachmann S., Patterson T.F., Wickes B.L., Lopez-Robot J.L. 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. *J. Antimicrobial. Chemotherapy* 49: 973–980.
271. Ramage G., Walle K.V., Wickes B.L., López-Ribot J.L. 2001. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev. Iberom. Micel.* 18: 163–170.
272. Renders N., Romling U., Verbrugh H., Belkum A. van. 1996. Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed – field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragment. *J. Clin. Microbiol.* 34: 3190–3195.
273. Renker C., Blanke V., Borstler B., Heinrichs J., Buscot F. 2004. Diversity of *Cryptococcus* and *Dioszegia* yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. *FEMS Yeast Res.* 4: 597–603.
274. Reynolds T.B., Fink G.R. 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878–881.



275. Rheinheimer G. 1977. Mikrobiologia wód. Warszawa, PWRiL.
276. Richard A.H., Gilbert P., High N.J., Kolenbrander P.E., Handley P.S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 11 (2): 94–100.
277. Rickard H. Stephen L., Laurence H., Clive B., Nicola H., Pauline H. 2002. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3644–3650.
278. Rigden D., Mello L. 2004. The PA 14 domain, a conserved all-beta domain in bacterial toxins, enzymes, adhesins and signaling molecules. *Trends Biochem. Sci.* 29 (7): 335–339.
279. Ringo E., Olsen R.E., Mayhew T.M., Myklebust R. 2003. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* 227: 395–415.
280. Rizzo E., Sato Y., Barreto R.P., Godinho H.P. 2002. Attachment and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. *J. Fish Biol.* 61: 615–32.
281. Robertson W.J., Tobin R.S. 1983. The relationship between three potential pathogens and pollution indicator organisms in Nova Scotian coastal waters. *Can. J. Microbiol.* 29: 1261–1269.
282. Robinette D., Wada S., Arroll T., Levy M.G., Miller W.L., Noga E.J. 1998. Antimicrobial activity in the skin of the channel catfish *Ictalurus punctatus*: characterization of broad-spectrum histone-like antimicrobial proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 54 (5): 467–75.
283. Rokas A., Williams B.L., King N., Carroll S.B. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 49: 309–318.
284. Rombough P.J. 1988. Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life, in: *Fish physiology*. Eds. W.S. Hoar, D.J. Randall. New York, Academic Press.
285. Rosario I., Mendoza M.H. de, Deniz S., Soro G., Alamo I., Acosta B. 2005. Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons. *Mycoses* 48: 421–424.
286. Rossello-Mora R. 2006. DNA-DNA Reassociation methods applied to microbial taxonomy and their critical evaluation, in: *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. Ed. E. Stackebrandt. Berlin, Springer-Verlag: 23–46.
287. Rossman A. 1994. A strategy for an all-taxa inventory of fungal biodiversity, in: *Biodiversity of tropical microfungi*. Eds. C.I. Peng, C.H. Chou. Taipei, Academia Sinica Monograph: 169–194.
288. Różalska B., Sadowska B. 2004. Komunikacja między drobnoustrojami. Biofilm bakteryjny, w: *Biologia molekularna w diagnostyce chorób zakaźnych i biotechnologii*. Materiały naukowe VII konferencji. Warszawa, SGGW: 120–123.
289. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 29 marca 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. DzU z 6 kwietnia 2007 r., nr 61 poz. 417.
290. Sakai M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172: 63–92.
291. Salyers A.A., Whitt D.D. 2003. Różnorodność, chorobotwórczość i środowisko. Warszawa, PWN.
292. Sampermans S., Mortier J., Soares E.V. 2005. Flocculation on set in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J. Appl. Microbiol.* 98: 525–531.
293. Sauer K., Amper A.K. 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J. Bacteriol.* 183: 6579–6589.
294. Schmitt J., Flemming H.-C. 1999. Water binding in biofilms. *Water Sci. Technol.* 39: 77–82.



295. Schoenlein-Crusius I., Milanez A., Trufem S., Pires-Zottarelli C. 2006. Microscopic fungi in the Atlantic rainforest in Cubatao, Sao Paulo. *Brazilian J. Microbiol.* 37: 267–275.
296. Schrock R.M., Smith S.D., Maule A.G., Doulos S.K., Rockowski J.J. 2001. Mucous lysozyme levels in hatchery coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and spring chinook salmon (*O. tshawytscha*) early in the parr-smolt transformation. *Aquaculture* 198: 169–177.
297. Scorzetti G., Fell J.W., Fonseca A., Statzell-Tallman A. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.* 2: 495–517.
298. Senses-Ergul S., Agoston R., Belak A., Deak T. 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Intern. J. Food Microbiol.* 108: 120–124.
299. Shearer C.A., Descals E., Kohlmeyer B., Kohlmeyer J., Marvanova L., Padgett D., Porter D., Raja H.A., Schmit J.P., Thornton H.A., Voglymayr H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habits. *Biodivers. Conserv.* 16: 49–67.
300. Sheppard D.C., Yeaman M.R., Welch W.H., Phan Q.T., Fu Y., Ibrahim A.S., Filler S.G., Zhang M., Waring A.J., Edwards J.E. Jr. 2004. Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 279: 30480–30489.
301. Sherry J.P., Qureschi A.A. 1981. Isolation and enumeration of fungi using membrane filtration, in: *Membrane filtration—applications*. Ed. B.J. Dutka. New York, Marcel Dekker.
302. Skriptunov N.A., Gorelits O.V. 2001. Wind-induced variations in water level in river mouths. *Water Res.* 28: 174–179.
303. Slavikova E., Vadkertiova R. 1995. Yeasts and yeast-like organisms isolated from fish-pond waters. *Acta Mikrobiol. Polon.* 44: 181–189.
304. Slavikova E., Vadkertiova R. 1997. Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. *Ant. Leeuw.* 72: 77–80.
305. Slavikova E., Vadkertiova R. 2000. The occurrence of yeasts in the forest soils. *J. Basic Microbiol.* 40: 207–212.
306. Słomski R. 2008. *Analiza DNA teoria i praktyka*. Poznań, Wyd. UP.
307. Smith C., Douglas A., Juranda P. 2001. Oviposition site selection and embryo mortality in perch. *J. Fish Biol.* 58: 880–882.
308. Smith V.J., Fernandes J.M.O., Jones S.J., Kemp G.D., Tatner M.F. 2000. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 10: 243–260.
309. Sondergaard M. 2000. Bacterioplankton: how many and how active. *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 27: 859–865.
310. Spencer J.F.T., Spencer D.M. 1997. Ecology: taxonomy: The names of the yeasts, in: *Yeasts in natural and artificial habitats*. Eds. J.F.T. Spencer, D.M. Spencer. Berlin, Springer-Verlag: 13–31.
311. Stackebrandt E. 2006. Exciting times: The challenge to be bacterial systematist, in: *Molecular identification, systematics, and population structure of procarriotes*. Eds. E. Stackebrandt. Berlin, Springer-Verlag: 1–21.
312. *Standard Methods for Examination of Water and Wastwater*. 1995. Washington, Am. Publ. Health Ass. Part 2050.
313. Stanley N.R., Lazazzera B.A. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiol.* 52 (4): 917–924.



314. Subramanian S., Ross N.W., MacKinnon S.L. 2008. Comparison of antimicrobial activity in the epiderma mucus extracts of fish. Part B. Comparative Biochem. Physiol. 150: 85–92.
315. Sugita T., Takashima M., Ikeda R., Nakasae T., Shinoda T. 2000. Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* as revealed by sequences of internal transcribed spacer regions and 28S rRNA gene and taxonomic position of *C. laurentii* clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 38: 1468–1471.
316. Sutherland I.W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. Trends Microbiol. 9 (5): 222–227.
317. Swain P., Nabak S.K. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. Fish Shellfish Immunol. 27: 89–99.
318. Swann E.A., Taylor J.W. 1995 a. Phylogentic diversity of yeast-producing basidiomycetes. Mycol. Res. 99: 1205–1210.
319. Swann E.A., Taylor J.W. 1995. Toward a phylogenetic systematics of the Basidiomycota: integrating yeasts and filamentous basidiomycetes using 18S rRNA gene sequences. Stud. Mycol. 38: 147–162.
320. Systematic Agenda 2000. 1994. Systematics agenda 2000: charting the biosphere. Technical report. Society of Systematic Biologists, American Society of Plant Taxonomists. New York, Willi Hennig Society, Association of Systematics Collections.
321. Szulc I. 2007. Morfo-mechaniczne (sic!) osobliwości budowy jaj i osłon jajowych ryb kostnoszkieletowych na tle warunków naturalnego rozrodu. Praca doktorska. Szczecin, AR (maszynopis).
322. Taguchi G., Wu Y. 1980. Introduction to off-line quality control. Nagoya, Japan Quality Control Organisation.
323. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.U., Michelson P.A., Murray B.E., Pershing D.H., Swaminathan B. 1995. Criteria for interpreting pulsed-field gel electrophoresis patterns. J. Clin. Microbiol. 33: 2233–2239.
324. Theraud M., Bedouin Y., Guiguen C., Gangneux J.-P. 2004. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolated in planktonic and biofilm conditions. J. Med. Microbiol. 53: 1013–1018.
325. Tórz A. 2007. Transformacje jonowe w wodach estuarium Odry i ich wpływ na warunki siedliskowe ichtiofauny. Rozpr. AR Szczec. 224.
326. Tyler K.D., Wang G., Tyler S.D., Johnson W.M. 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification – based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. J. Clin. Microbiol. 35: 339–346
327. Vaart J.M. van der, Caro L.H.P., Chapman J.W., Klis F.M., Verrips C.T. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 177: 3104–3110.
328. Vachova L., Kucerova H., Devaux F., Ulehlova M., Palkova Z. 2009. Metabolic deverification of cells during the development of yeast colonies. Environ. Microbiol. 11 (2): 494–504.
329. Valdes-Collazo L., Schultz A., Hazen T. 1987. Survival of *Candida albicans* in tropical marine and fresh waters. Appl. Environ. Microbiol. 53 (8): 1762–1767.
330. Vaughan-Martini A. 2003. Reflection on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine. Int. Microbiol. 6: 175–182.



331. Vazquez-Juarez R., Andlid T., Gustafsson L. 1994. Cell surfach hydrophobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 2: 199–208.
332. Vazquez-Juarez R., Andlid T., Gustafsson L. 1997. Adhesion of yeast isolated from fish gut to crude intestinal mucus of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6: 64–71.
333. Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Verachtert H., Delvaux F.R. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 197–205.
334. Verstrepen K.J., Klis F.M. 2006 Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiol.* 60 (1): 5–15.
335. Verstrepen K.J., Reynolds T.B., Fink G.R. 2004. Origins of variation in the fungal cell surface. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 533–540.
336. Vishniac H.S. 1995. Simulated in situ competitive ability and survival of a representative soil yeast, *Cryptococcus albidus*. *Microbial. Ecol.* 30: 309–320.
337. Vishniac H.S. 2006. A multivariate analysis of soil yeasts isolated from a latitudinal gradient. *Microbial. Ecol.* 52: 90–103.
338. Vogel C., Rogersonb A., Schatzc S., Laubache H., Tallmanf A., Fell J. 2007. Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida. *Water Res.* 41: 1915–1920.
339. Wang Q.-M., Wang S.-A., Jia J.-H., Bai F.-Y. 2007. *Cryptococcus tibetensis* sp. nov., a novel basidiomycetous anamorphic yeast species isolated from plant leaves. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53: 281–285.
340. Watari J., Takata Y., Ogawa M., Sahara H., Koshino M., Onnela M.-L., Airaksinen U., Jaatinen R., Penttila M., Keranen S. 1994. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene FLO1. *Yeast* 10: 211–225.
341. Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomem using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 8: 7213–7218.
342. Wheeler Q.D., Meier R. 2000. Species concepts and phylogenetic theory: a debate. New York, Columbia University Press.
343. White T.J., Burns T., Lee S., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: A guide to methods and applications PCR protocols. Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, T.J. Sninsky, T.J. White. San Diego CA USA, Academic Press: 315–322.
344. Whitfield A.K., Elliot M. 2002. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. *J. Fish Biol.* 62: 1467–1472.
345. Więski K. 1998. Wzrost i stan odżywienia płoci (*Rutilus rutilus* L.) w zmiennych warunkach środowiska wód ujścia Odry. Praca doktorska. Szczecin, AR (maszynopis).
346. Woese C. 1998. The universal ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6854–6859.
347. Wu M., Hancock R.E. 1999. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bac-tenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 274: 29–35.
348. Wuczowski M., Prillinger H. 2004. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria (“Nationalpark Donauauen”). *Microbiol. Res.* 159: 263–275.
349. Wuertz S., Okabe S., Hausner M. 2004. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Sci. Technol.* 49 (11–12): 327–36.



350. Yano T. 1996. The non-specific immune system: humoral Demence. *Fish Physiol.* 15: 105–157.
351. Yin Q.Y., Groot P.W.J de, Koster Ch.G. de, Klis F.M. 2007. Mass spectrometry-based proteomics of fungal wall glycoproteins. *Trends Microbiol.* 16 (1): 20–26.
352. Yin Y., Hang T., Samaranayake Y.H., Fang H.H.P., Yip H.K., Samaranayake L.P. 2005. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathology* 159: 353–360.
353. Yoshimizu M., Kimura T., Sakai M. 1976. Studies on the intestinal microflora of salmonids. I. The intestinal microflora of fish reared in freshwater and seawater. *Bull. Japn. Soc. Sci. Fish.* 42: 91–99.
354. Załachowski W., Więski K. 1998. Growth rate of bream (*Aramis brama* L.) in Lake Dąbie. *Elektron. J. Pol. Agric. Univ., Ser. Fisheries* 1, [www.ejpau.media.pl](http://www.ejpau.media.pl), dostęp dn. 05.09.2008 r.
355. Zhou J., Thompson D.K. 2002. Challenges in applying microarrays to environmental studies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 204–207.
356. Žutić V., Ivošević N., Svetličić V., Long A.R., Azam F. 1999. Film formation by marine bacteria at a model fluid interface. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 17: 231–238.
357. Zweifel U.L., Hagstrom A. 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (Ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6): 2180–2185.



# The diversity of yeast community in the Odra estuary and their influence on the development of ichthyofauna

## Summary

A comprehensive qualitative and quantitative study carried out on unicellular fungi and their ability to form populations in the Odra estuary showed mycocenotic diversity over individual zones. It was demonstrated that the area of Cedynia Park and Międzyodrze and Szczecin Lagoon and Pomeranian Bay is characterized by a homogeneous spatial distribution of yeasts, in contradiction to mycocenoses determined in the river Odra in Szczecin. The resulting total yeast count diversity in river waters correlated with the total and organic nitrogen and organic phosphorus levels.

The qualitative structure of the yeasts in the Oder estuary was dominated by Ascomycota in the river waters, whereas in the lagoon and bay waters principally Basidiomycota yeasts were isolated. It was determined that the diversity of species in Szczecin Lagoon reflects the mycocenotic quality of the incoming Oder water. Yeast species with a constant presence in the individual estuary zones were *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, and *Saccharomyces*. Variable environmental conditions, in particular estuary zones, do not influence the potential ability of biofilm formation by *Cr. laurenti* in contrast with strains of *Rhodotorula* sp. The yeast cells formed in the biofilm enter a VBNC state.

An intraspecies genetic diversity assessment of *Cryptococcus* spp and *Rhodotorula* spp indicated inland origin, for which Szczecin Lagoon remains the ecological border. Amplification profiles for the genomic DNA of *Cr. laurenti* strains isolated from the water environment revealed a high intraspecific heterogeneity, reflecting the place of their isolation. High intraspecies similarity was, however, determined for *Rh. mucilaginoso* and *Rh. glutinis*, whose profiles did not reflect their place of origin.

RAPD-PCR profiles characteristic of the digestive tract of certain species of fish were distinguished among *Rhodotorula* spp. Such a relationship was not established for *Cr. laurenti*, even though strains of this species, along with *Rhodotorula* spp, were isolated in all the samples.

It was demonstrated that *Rhodotorula* spp and *Cryptococcus* spp are capable of colonizing roe, forming biofilm together with its epiflora. The biofilm formed by the yeast on the surface of the roe contributes to a prolongation of roe incubation time.

Current yeast populations in the Odra estuary environment may be considered as complementary indicators of microbial contamination.







# Mannigfaltigkeit der Gesellschaften von Hefen im Oder – Ästuar und deren Einfluss auf die Entwicklung der Ichthyofauna

## Zusammenfassung

Die durchgeführten komplexen Untersuchungen, die die Mannigfaltigkeit der einzelnen Pilze und deren Fähigkeit zur Bildung von Gesellschaften im Oder – Ästuar berücksichtigen, weisen auf mykozönotische Veränderlichkeit in seinen einzelnen Zonen hin. Es wurde nachgewiesen, dass das Gebiet von Cedyński Landschaftspark und von "Międzyodrze" (das Gebiet zwischen den beiden Flussarmen der Oder) als auch des Stettiner Haffs und der Pommerschen Bucht durch homogene, räumliche Verteilung von Hefen gekennzeichnet sind, im Gegensatz zu der Verteilung von Pilzen im Stettiner Oderabschnitt. Die bestimmte Differenzierung der allgemeinen Menge von Hefen in Flussgewässern stand in einer Korrelation zur Konzentration von Gesamt- und organischem Stickstoff als auch organischem Phosphor.

Die qualitative Struktur von Hefen im Oder – Ästuar war in Flussgewässern von Vertretern der Schlauchpilze (Ascomycota) dominiert, dagegen in Gewässern des Stettiner Haffs und der Pommerschen Bucht wurden überwiegend Hefen isoliert, die zur Abteilung der Basidiomycota gehören. Es wurde nachgewiesen, dass sich der Artenreichtum von Hefen aus dem Stettiner Haff aus dem Heranschleppen mit der Strömung von Odergewässern ergibt. Zu den Vertretern von Hefen, die in den einzelnen Zonen des Ästuars immer anwesend waren, gehörten Pilze folgender Arten: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* und *Saccharomyces*. Die Veränderlichkeit der Umweltbedingungen in den einzelnen Zonen des Ästuars hat keinen Einfluss auf die potenzielle Fähigkeit zur Bildung des Biofilms durch *Cr. laurenti*, im Gegensatz zu den Pilzen der Art *Rhodotorula*. Im gebildeten Biofilm gehen die Zellen der Hefen in den VBNC – Zustand über.

Die mit Hilfe der RAPD-PCR – Methode durchgeführte Bewertung der genetischen Verschiedenheit innerhalb der Art *Cryptococcus* spp. und *Rhodotorula* spp. weist auf binnenländische Herkunft der untersuchten Hefen hin, für welche der Stettiner Haff eine ökologische Grenze darstellt. Die erzielten Amplifikationsprofile der genomischen DNA von *Cr. laurenti* – Stämmen wiesen eine hohe Heterogenität innerhalb der Art nach, was der Nachweis ihrer verschiedenen ursprünglichen Herkunft ist. Die durchgeführte Analyse der phänotypischen Eigenschaften von *Cr. laurenti* – Stämmen wies die Anwesenheit der für den Ort deren Isolierung charakteristischen, biochemischen Typen nach. Die bestehende Ähnlichkeit innerhalb der Art wurde dagegen für *Rh. mucilaginoso* und *Rh. glutinis* festgestellt, deren genetische und biochemische Verschiedenheit den Ort deren Isolierung nicht widerspiegelte. Aus den hervorgehobenen Genotypen von *Rhodotorula* spp. wurden Profile isoliert, die für den Verdauungskanal von bestimmten Fischarten charakteristisch sind. Solche Abhängig-



keit wurde jedoch nicht für *Cr. Laurenti* festgestellt, obwohl die Stämme sowohl dieser Art als auch von *Rhodotorula* spp. aus allen entnommenen Proben isoliert wurden.

Es wurde nachgewiesen, dass *Rhodotorula* spp. und *Cryptococcus* spp. zur Kolonisierung des Fischlaichs fähig sind und bilden gemeinsam mit seinem Epibiont einen Biofilm. Die auf der Laichoberfläche gebildeten Gesellschaften von Mikrobiozözen tragen zur Verlängerung der Inkubationszeit der Laiche bei.

Die gegenwärtigen Hefenpopulationen in der Umwelt des Oder – Ästuars können als ergänzende Kennzahlen der mikrobiologischen Verschmutzung betrachtet werden.





