

Występowanie grzybów z rodzaju *Cryptococcus* w zmienionych chorobowo narządach wewnętrznych kulbaka czarnego

LEONARD WIDERA *, EWA TRENKNER **

* Katedra Higieny Produktów Zwierzęcego Pochodzenia, Wydział Weterynaryjny
SGGW — AR

** Klinika Dermatologiczna Akademii Medycznej

Widera L.: (Department of Hygiene of Products of Animal Origin, Veterinary Faculty, Warsaw Agricultural Academy, Nowoursynowska 166), E. Trenkner: (Dermatological Clinic, Medical Academy, Gdańsk, Dębinki 7). Occurrence of fungi from the genus *Cryptococcus* in diseased internal organs of the Greenland halibut. Acta Mycol. 14 (1, 2): 135-141, 1978.

The purpose of this study was to establish if in the diseased internal organs of the Greenland halibut — mainly liver and kidney — it is possible to find *Cryptococcus* fungi and if the presence of these fungi corresponds with the pathologic changes in these organs.

The incidence of *Cryptococcus* fungi in the aquens of Labrador and New Founland in sea fishes may be an index of these organismes in the sea water.

Psychrophilic *Cryptococci* were found in the kidneys and livers of Greenland halibut caught in these regions. The presence may be correlated with the pathological changes found in these organs.

WSTĘP

Celem pracy było ustalenie, czy w chorobowo zmienionych narządach wewnętrznych ryb gatunku kulbak czarny (głównie w wątrobie i w nerce) mogą występować grzyby drożdżoidalne oraz czy grzyby te mogą mieć pewien związek ze zmianami patologicznymi w tych narządach.

Kulbak czarny (*Reinhardtius hippoglossoides*, rodz. *Pleuronectidae*, rząd *Pleuronectiformes*) o chorobowo zmienionych narządach wewnętrznych wyróżnia się także nienormalnym wyglądem zewnętrznym, głównie

* Adres autora (Autor adress): dr Leonard Widera ul. pułk. Dąbka 24a, 81-107 Gdynia.

białoszarą barwą skóry i pletw oraz ogólnym obrzękiem ciała. W czasie makroskopowych badań narządów wewnętrznych stwierdzono dużą zawartość płynu w jamie ciała oraz zniszczenie mięszu nerek i narządów międzynyerkowych, które zmienione były w bryjowatą, cuchnącą masę. Ponadto stwierdzono zwyrodnienie tłuszczowe wątroby, silne przekrwienie śledziony i gonad, rozstrzeń serca i przekrwienie błon śluzowych przewodu pokarmowego.

Kulbak czarny żyje między innymi w północnych wodach Atlantyku na znacznych głębokościach. Prowadzi denny tryb życia i żywi się innymi, drobnymi rybami, małżami, skorupiakami i robakami. Ryba ta ma duże znaczenie użytkowe i jest poławiana na skalę przemysłową.

PRZEGLĄD LITERATURY

Grzyby drożdżoidalne stanowią specyficzną grupę środowiska morskiego. Ponieważ ilościowe ich rozpowszechnianie związane jest z zawartością podłoża ograniczonego w wodzie morskiej, dlatego ich rozmieszczenie uzależnione jest od organizmów roślinnych i zwierzęcych wytwarzających taki substrat (Roth i in. 1962). Występowanie tej grupy grzybów w morzu stwierdzono niezależnie od głębokości, zasolenia i temperatury wody morskiej. Stwierdzono na przykład obecność niektórych gatunków grzybów drożdżoidalnych w wodach arktycznych na głębokości od 10 do 3450 m. Niektóre gatunki grzybów drożdżoidalnych cechuje psychrofilność. Ogółem ze środowiska morskiego wyodrębniono 358 szczepów tych grzybów, z których 98 należało do psychrofilnych. Zakres optymalnej temperatury dla wzrostu niektórych z nich znajduje się w granicach 10-15°C (Bruce, Morris 1973; Morris 1975). Niektóre gatunki grzybów drożdżoidalnych są charakterystyczne dla określonych stref morskich. Jakościowe rozpowszechnienie tej grupy grzybów cechuje pewna regularność. W rejonach mórz znajdujących się pod wpływem środowiska lądowego, a także w rejonach zawierających osady pochodzenia lądowego, najczęściej stwierdzano grzyby z rodzajów *Candida* i *Torula*. W zanieczyszczonych rejonach mórz liczba grzybów drożdżoidalnych w 1 litrze wody morskiej może wynosić od 5000 do 10 000 komórek. W rejonach mało zanieczyszczonych dominują grzyby z rodzajów *Cryptococcus* i *Rhodotorula* (Johnson, Sparrow 1961).

Grzyby drożdżoidalne występują również w tkankach roślin i zwierząt morskich, a niektóre gatunki cechuje zoopatogeniczność (Batkó 1975; Van Uden 1968). Grzyby takie wyosobniano z planktonu, glonów morskich, a także z powierzchni skóry, z warstwy śluzu skrzelowego oraz z treści jelit ryb morskich, pingwinów i jaj krabów. Obecność ich niejednokrotnie stwierdzano w pożywieniu ryb, które składało się w większości

z zooplanktonu i skorupiaków. Występowanie takich grzybów stwierdzono także w mrożonym mięsie ryb morskich (Batko 1975; Lodder 1970; Morris 1955; Wilson 1960).

Najczęściej izolowano z wody morskiej *Candida parapsilosis* (16 gatunków), *Rhodotorula mucilaginosa* (15), *Candida tropicalis* (14), *Cryptococcus albidus* (12), *Cryptococcus laurenti* (12), *Torulopsis famata* (12) i *Candida guilliermondi* (11) (Morris 1975). Inni uczeni stwierdzili obecność grzybów z rodzaju *Torula* i *Rhodotorula* w glonach morskich, np. w *Laminaria sacharina*, *Alaria esculenta* i *Fucus vesiculosus*, w planktonie oraz na powierzchni glonów morskich, a także wyizolowali z małży i krewetek grzyby z rodzajów *Rhodotorula*, *Torula*, *Candida* i *Cryptococcus*.

W dostępnym piśmiennictwie nie natrafiono na doniesienia wskazujące na istnienie związku między występowaniem grzybów drożdżoidalnych w narządach wewnętrznych a zmianami chorobowymi tych narządów u kulbaka czarnego. Niniejsze opracowanie stanowi więc próbę wykazania takiej korelacji.

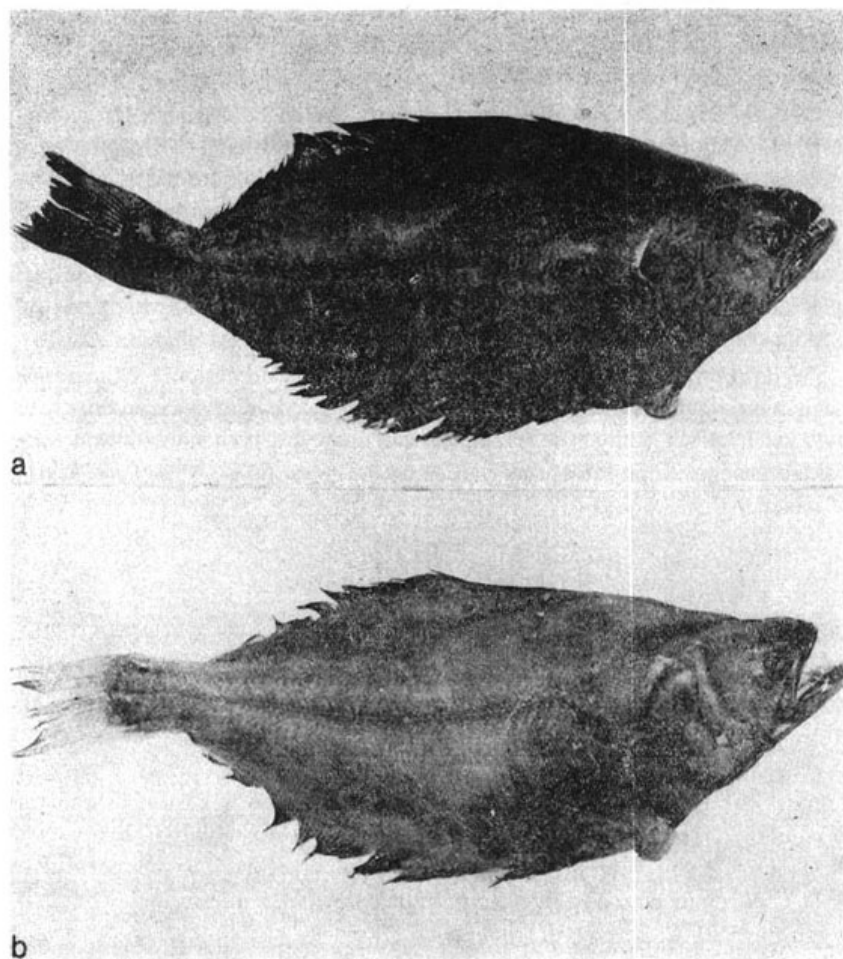
MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Przedmiotem badań były ryby z gatunku kulbak czarny, z różnych okresów połowowych w akwenach Labradoru i Nowej Funlandii. Do badań pobrano 20 ryb całkowicie zmienionych i 20 ryb niezmienionych (ryc. 1). Ryby po złowieniu niezwłocznie zamrażano w szafach kontaktowych, a następnie poddawano glazurowaniu, aby zabezpieczyć je przed wysuszką i procesami oksydacyjnymi. Następnie ryby pakowano w karton i składano w chłodni statkowej, po czym dostarczono je do portu w Gdyni. Przez cały okres rejsu ryby przechowywano w chłodni statkowej w temperaturze -23°C . W momencie dostawy temperatura wewnątrz mięśni badanych ryb wynosiła -21°C .

Po rozmrożeniu ryby poddano badaniom anatomopatologicznym, w trakcie których pobierano materiał do badań mikologicznych. W tym celu pobrano po 20 próbek z nerek, wątroby i przewodu pokarmowego ryb wykazujących zmiany chorobowe w tych narządach oraz po 20 próbek z tych samych organów ryb nie wykazujących zmian.

Z pobranych materiałów sporządzono w 0,9% roztworze NaCl (Lodder 1970) preparaty niebarwione. Ponadto sporządzono preparaty tuszowe oraz preparaty podbarwione błękitem bawełnianym w laktofenolu (Lodder 1970). W celu wykazania obecności grzybów na tle tkanek narządów wykonano także preparaty techniką histologiczną przy wykorzystaniu w barwieniu metody PAS według Mc Manusa (Burek 1973).

Próbki mięszu, zarówno ze zmienionych nerek i wątroby, jak też po-



Ryc. 1. *Reinhardtius hippoglossoides* regionu Labradoru po zamrożeniu

a — niezmielony, b — chory

Reinhardtius hippoglossoides of the Labrador region after freezing

a — unchanged, b — diseased

chodzące z narządów nie wykazujących zmian patologicznych, nanoszono bezpośrednio na agar Sabourauda i bulion Sabourauda, agar brzezkowy i agar ziemniaczany (L o d d e r 1970). Hodowle inkubowano w temperaturze $+25^{\circ}\text{C}$. Kolonie wyizolowane z podłoża stałego przenoszono na identyczny zestaw podłoży i inkubowano w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ i $+37^{\circ}\text{C}$. Z uzyskanych kolonii sporządzano preparaty niebarwione oraz preparaty podbarwione tuszem, a także błękitem bawelnianym w laktofenolu. Ho-

dowle prowadzono przez 10 tygodni. Badano również zdolność fermentowania cukrów w podstawowym zymogramie złożonym z glukozy, laktozy, maltozy, galaktozy, sacharozy i rafinozy (L o d d e r 1970).

WYNIKI BADAŃ

We wszystkich badanych preparatach barwionych i niebarwionych, sporządzonych ze zmienionych chorobowo nerek, wątroby, przewodu pokarmowego, stwierdzono obecność okrągłych, niekiedy trochę owalnych komórek posiadających otoczkę, czasem pączkujących wielobocznie (ryc. 2). W preparatach histologicznych z chorych narządów, barwionych metodą PAS, otoczka tych komórek była amarantowa. Obecności nibystrzępek nie stwierdzono.

Z posiewów próbek ze zmienionych chorobowo nerek i wątroby na podłożu stałe uzyskano w 100% wzrost kolonii białokremowych o śluzowym wyglądzie. Na bulionie Sabourauda w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$ i $+37^{\circ}\text{C}$ stwierdzono zmętnienie, wytworzenie osadu i obecność błonki na powierzchni pożywki. W preparatach z hodowli występowały komórki okrągłe z otoczką, niekiedy wielobocznie pączkujące (ryc. 2). Wytwarzania nibystrzępek nie stwierdzono. Fermentowania cukrów w podstawowym zymogramie nie stwierdzono.

W 30% preparatów niebarwionych oraz barwionych, sporządzonych z próbek niezmienionych nerek i wątroby, stwierdzono obecność komórek okrągłych z otoczką. Komórki takie stwierdzono również w 60% preparatów sporządzonych z przewodu pokarmowego. Pseudostrzępek nie znaleziono.

W preparatach wykonanych techniką histologiczną z wycinków narządów niezmienionych, barwionych metodą PAS, obecności takich komórek nie stwierdzono.

Z posiewów próbek z niezmienionych nerek i wątroby na podłoża stałe stwierdzono w 20% płytek Petriego wzrost nielicznych kolonii białokremowych o śluzowym wyglądzie. Na bulionie Sabourauda w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$ i $+37^{\circ}\text{C}$ zaobserwowano lekkie zmętnienie, obecność błonki na powierzchni pożywki oraz wytworzenie nieznacznego osadu. W preparatach z hodowli stwierdzono obecność komórek okrągłych z otoczką. Komórki te niekiedy pączkowały wielobocznie. Wytwarzania nibystrzępek nie stwierdzono. W podstawowym zymogramie nie stwierdzono fermentacji cukrów.

DYSKUSJA

Stwierdzone zarówno w próbkach narządów jak i w przewodzie pokarmowym komórki kuliste, niekiedy pączkujące wielobocznie, mogą być charakterystyczne dla określonej grupy grzybów drożdżoidalnych (B a t k o

1975; L o d d e r 1970). Podobne pokrojem komórki stwierdzono w preparatach z hodowli na podłożach stałych i płynnych. Otoczka tych komórek barwiła się w preparatach histologicznych PAS dodatnio, co świadczy, iż zbudowana jest z śluzowielocukrów (B u r c k 1975; L o d d e r 1970).

Na podstawie cech makroskopowych kolonii na podłożach stałych, charakteru wzrostu na bulionie Sabourauda, obrazu mikroskopowego hodowli, obrazu mikroskopowego w preparatach z narządów barwionych i niebarwionych oraz w preparatach wykonanych techniką histologiczną, braku zdolności fermentowania cukrów w podstawowym zymogramie jak i obecności charakterystycznej otoczki można w przybliżeniu określić przynależność stwierdzonych grzybów do rodzaju *Cryptococcus*.

Obecność tych grzybów w przewodzie pokarmowym świadczyć może, iż zakażenie nimi następuje u ryb na drodze pokarmowej. Grzyby te występowały także w narządach wewnętrznych i w przewodzie pokarmowym ryb niezmięzionych. Jednak ogólny odsetek zakażenia ryb niezmięzionych był znacznie mniejszy w porównaniu z rybami zmienionymi.

Wzrost wykrywanych grzybów w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ świadczy o ich psychrofilności.

WNIOSKI

1. W akwenach Labradoru i Nowej Fundlandii występują grzyby drożdżoidalne z rodzaju *Cryptococcus*.

2. Ryby morskie mogą być wskaźnikiem występowania grzybów drożdżoidalnych w otwartych morzach chłodnych.

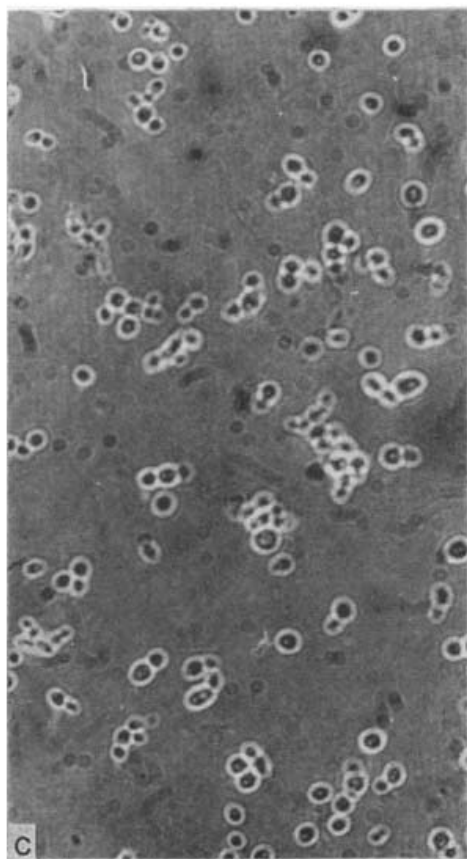
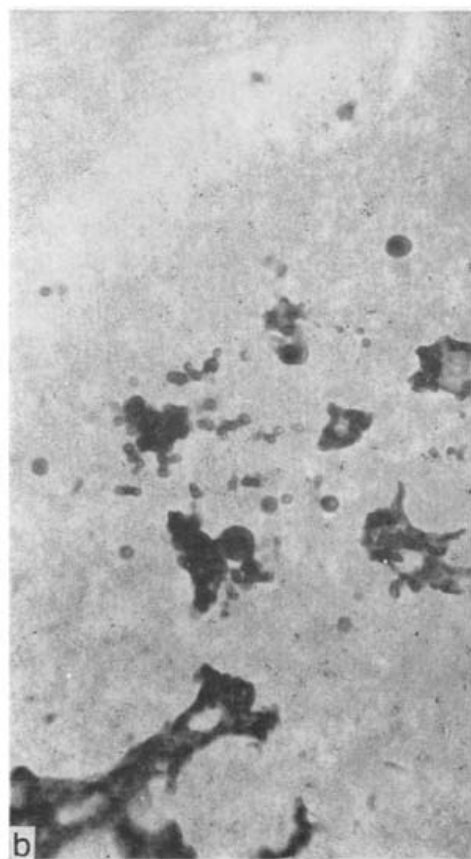
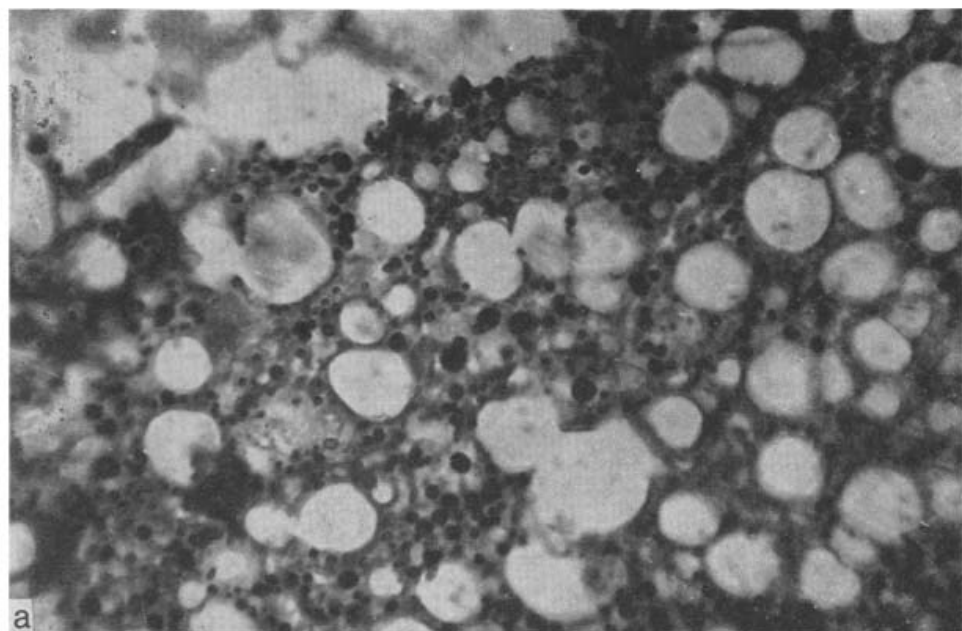
3. W wątrobie i nerkach kulbaka czarnego, odławianego w akwenach Labradoru i Nowej Fundlandii, mogą występować psychrofilne grzyby z rodzaju *Cryptococcus*.

4. Obecność grzybów rodzaju *Cryptococcus* w nerkach i wątrobie ma związek z występowaniem u kulbaka czarnego zmian chorobowych w tych narządach.

Autorzy pragną serdecznie podziękować prof. dr Alinie Skiergiełło, dr. Andrzejowi Batko, a także doc. dr. Edwardowi Strzeleckiemu za cenne i życzliwe rady oraz wskazówki, z których korzystali podczas wykonywania niniejszej pracy.

LITERATURA

- Batko A., 1975: Zarys hydromikologii, PWN, Warszawa.
Bruce I., Morris E., 1973: Psychrophilic yeasts from marine fish, *Antonie van Leeuwenhoek*, 39: 331-338.
Burck H., 1975: Technika histologiczna, PZWL, Warszawa.



- Johnson T., Sparrow F., 1961: Fungi in Oceans and Estuaries, New York.
- Lodder I., 1970: The Yeasts, North Holl, Publ. Comp., London.
- Morris E., 1955: Seaweed as a source of yeast food, J. Sci. Fd. Agric. 6: 611-618.
- Morris E., 1975: Yeasts from the Marine Environment, J. Appl. Bact. 38: 211-223.
- Roth F., Ahearn D., Fell I., Meyer S., 1962: Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates, Limnol. Oceanogr. 7: 178-183.
- Wilson I., 1960: Marine fungi, a review of the present position, Proc. Linnean Soc. Seasion 171: 53-70, London.
- Van Uden N., Fell I., 1968: Marine yeasts, Advances in the Microbiology of the sea, Acad. Press, New York.