

OCENA WYSTĘPOWANIA GRZYBÓW CHOROBOTWÓRCZYCH W ŚRODOWISKU OGRODÓW ZOOLOGICZNYCH

JURGILEWICZ Kamil¹, RÓŻAŃSKI Paweł², BAKUŁA Zofia¹, BLUSZCZ Agata¹, KRUKOWSKI Henryk², BIELECKI Jacek¹, JAGIELSKI Tomasz¹

¹Zakład Mikrobiologii Medycznej, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, Polska; ²Katedra Higieny Zwierząt i Zagrożeń Środowiska, Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Polska

STRESZCZENIE

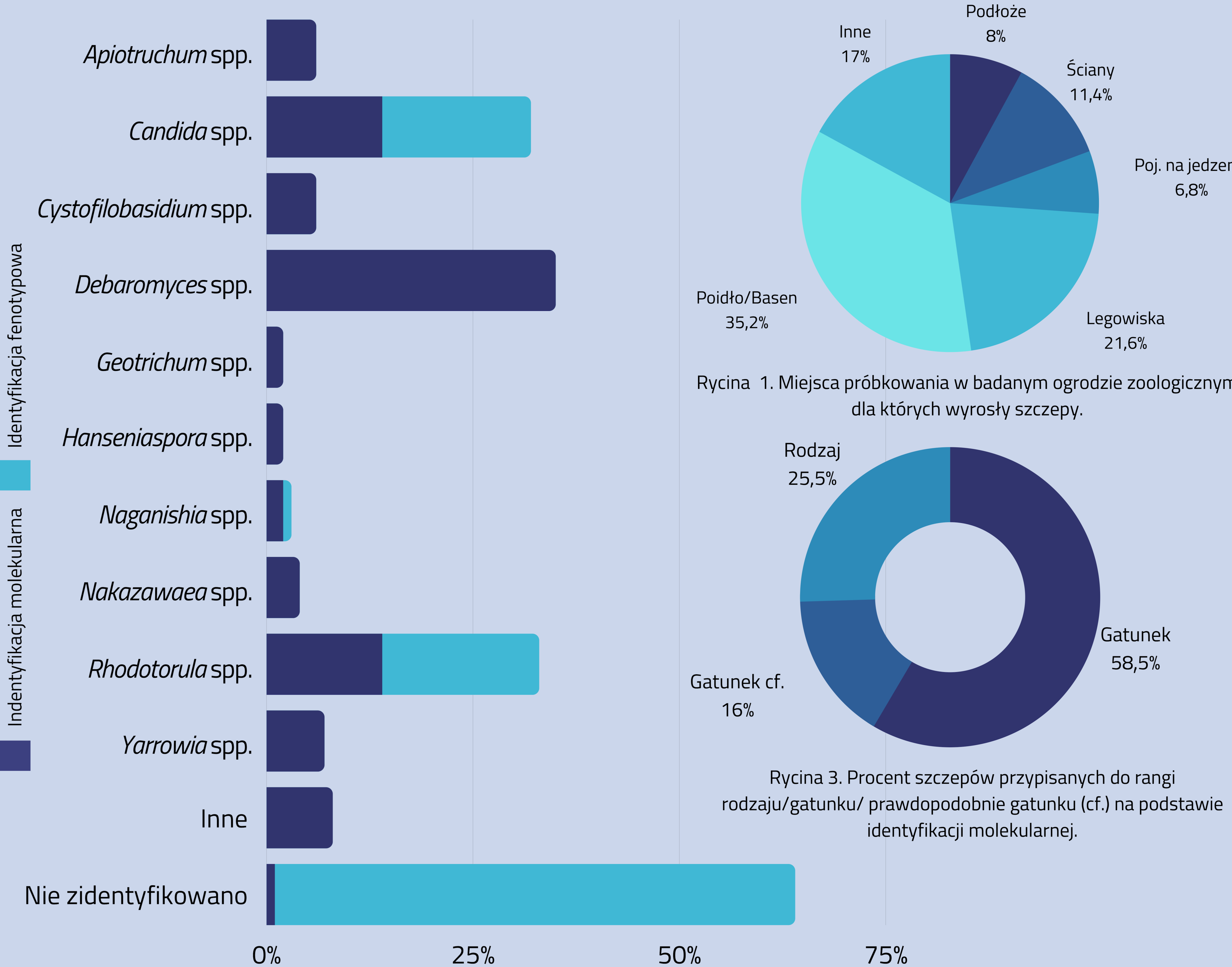
Zakażenia grzybicze są ważnym, choć często niedocenianym problemem zagrażającym zdrowiu zwierząt. Problem ten dotyczy także zwierząt żyjących w ogrodach zoologicznych. Większość doniesień piśmienniczych na temat mikrobiomu zwierząt w ogrodach zoologicznych koncentruje się na florze bakteryjnej, wirusowej lub pasożytniczej. Skład mykobiomu był dotychczas przedmiotem niewielu badań. Jako główne czynniki etiologiczne grzybic rozpoznano wówczas grzyby z rodzaju *Candida*, *Geotrichum* i *Rhizopus*.

CEL

Celem pracy była analiza flory grzybiczej występującej w bezpośrednim otoczeniu zwierząt przebywających w ogrodzie zoologicznym.

MATERIAŁY I METODY

Do badania włączono 278 prób, pobranych w formie wymazów, z otoczenia zwierząt (Ryc. 1) na terenie jednego z ogrodów zoologicznych w południowej Polsce, w 2019 r. Próby posiewano na podłoże Sabouraud Dextrose Agar (5 dni; 25°C), a wyrosłe szczepy identyfikowano przy użyciu metod fenotypowych i molekularnych. Identyfikacja fenotypowa polegała na wykonaniu testów auksanograficznych API 20C AUX (bioMérieux, Francja). W identyfikacji molekularnej, DNA grzybów izolowano stosując zestaw GenoLyse (Hain Lifescience, Niemcy). W oznaczeniu gatunkowym posłużono się analizą sekwencyjną produktów PCR fragmentów operonu rDNA tj. regionu niekodującego ITS (ang. internal transcribed spacer) i genu kodującego rRNA dużej podjednostki rybosomu (LSU, ang. large subunit). Otrzymane sekwencje wyszukiwano w BLAST – wśród sekwencji referencyjnych dla ITS i LSU. Dla identyfikacji gatunkowej/rodzajowej przyjęto następujące kryteria: (I) 100% podobieństwa sekwencji – pozytywna identyfikacja do rangi gatunku; (II) 99% podobieństwa sekwencji – prawdopodobna identyfikacja do rangi gatunku (przymek cf.); (III) 100%-96% podobieństwa sekwencji, ale różne gatunki – pozytywna identyfikacja do rangi rodzaju (Hofstetter V. et al., Fungal Diversity 96, 243–284; 2019).



Rycina 2. Udział procentowy zidentyfikowanych rodzajów uzyskany z wykorzystaniem metody molekularnej i fenotypowej.

Podsumowanie

- 38% (107/278) prób pobranych z bezpośredniego środowiska bytowania zwierząt ogrodu zoologicznego wykazała obecność grzybów, w tym grzybów potencjalnie chorobotwórczych.
- Badanie molekularne wykazało obecność 42 (42/106; 40%) gatunków potencjalnie chorobotwórczych.
- Wśród gatunków patogennych lub potencjalnie patogennych zidentyfikowano metodą genotypową m. in. *Debaryomyces nepalensis* (18/106; 17%), *Rhodotorula mucilaginosa* (7/106; 7%), *Debaryomyces hansenii* (6/106; 6%) i *Candida zeylanoides* (6/106; 6%).
- Wykorzystując metodę molekularnej identyfikacji gatunkowej, udało się zaklasyfikować do rangi gatunku jedynie połowę szczepów. Konieczne wydaje się zastosowanie dodatkowych markerów np. SSU (ang. Small Subunit Ribosomal RNA).

WYNIKI

Ogółem otrzymano 107 (107/278; 38%) hodowli grzybów. Identyfikacja fenotypowa (Tab. 1) oraz molekularna (Tab. 2) pozwoliły na przypisanie, odpowiednio 40 (40/107; 37%) i 106 (106/107; 99%) szczepów co najmniej do poziomu rodzaju. Stosując marker ITS i LSU, wyniki identyfikacji rodzajowej lub gatunkowej były niejednoznaczne dla 1 (0,9%) szczepu. Wśród grzybów, dla których identyfikacja rodzajowa w badaniu molekularnym była skuteczna, wykryto przedstawicieli głównie trzech rodzajów: *Debaryomyces* (37/106; 35%), *Candida* (15/106; 14%) oraz *Rhodotorula* (15/106; 14%) (Ryc. 2). Ponadto identyfikacja gatunkowa powiodła się dla 62 (62/106; 58%) szczepów, a prawdopodobna (cf.) identyfikacja dla 17 (17/106; 16%) szczepów (Ryc. 3). Wyniki identyfikacji genotypowej i fenotypowej były zgodne dla rangi rodzaju i gatunku odpowiednio w 22 (22/40; 55%) oraz 7 (7/40; 18%) przypadkach.

Tabela 1. Wyniki identyfikacji fenotypowej.

Rodzaj	Gatunek	Suma (n=107)	% Sumy
Identyfikacja Fenotypowa			
<i>Candida</i> spp.		19	17,76%
	<i>Candida famata</i>	3	2,80%
	<i>Candida guilliermondii</i>	2	1,87%
	<i>Candida krusei</i>	3	2,80%
	<i>Candida parapsilosis</i>	1	0,93%
	<i>Candida zeylanoides</i>	2	1,87%
<i>Cryptococcus</i> spp.		1	0,93%
	<i>Cryptococcus albidus</i>	1	0,93%
<i>Rhodotorula</i> spp.		20	18,69%
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	1,87%
	<i>Rhodotorula minuta</i>	1	0,93%
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	6	5,61%
Nie zidentyfikowano		67	62,62%

Tabela 2. Wyniki identyfikacji genotypowej.

Identyfikacja Genotypowa		
<i>Apiotruchum</i> spp.	6	5,61%
<i>Apiotruchum dulcitum</i>	1	0,93%
<i>Apiotruchum laibachii</i>	1	0,93%
<i>Apiotruchum montevidense</i>	1	0,93%
<i>Arthrographis</i> spp.	1	0,93%
<i>Arthrographis kalrae</i>	1	0,93%
<i>Candida</i> spp.	15	14,02%
<i>Candida conglobata</i>	1	0,93%
<i>Candida palmioleophila</i>	2	1,87%
<i>Candida railenensis</i>	1	0,93%
<i>Candida santamariae</i>	1	0,93%
<i>Candida zeylanoides</i>	6	5,61%
<i>Cutaneotrichosporon</i> spp.	1	0,93%
<i>Cystobasidium</i> spp.	1	0,93%
<i>Cystobasidium minutum</i>	1	0,93%
<i>Cystofilobasidium</i> spp.	6	5,61%
<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>	4	3,74%
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	2	1,87%
<i>Debaryomyces</i> spp.	37	34,58%
<i>Debaryomyces hansenii</i>	6	5,61%
<i>Debaryomyces maramus</i>	1	0,93%
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	18	16,82%
<i>Debaryomyces prosopidis</i>	5	4,67%
<i>Geotrichum</i> spp.	2	1,87%
<i>Geotrichum silvicola</i>	2	1,87%
<i>Hanseniaspora</i> spp.	2	1,87%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	2	1,87%
<i>Kodamaea</i> spp.	1	0,93%
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	0,93%
<i>Naganishia</i> spp.	2	1,87%
<i>Naganishia albida</i>	1	0,93%
<i>Nakazawaea</i> spp.	4	3,74%
<i>Phaeotremella</i> spp.	1	0,93%
<i>Rhodosporidiobolus</i> spp.	1	0,93%
<i>Rhodosporidiobolus colostri</i>	1	0,93%
<i>Rhodotorula</i> spp.	15	14,02%
<i>Rhodotorula graminis</i>	1	0,93%
<i>Rhodotorula kratochvilovae</i>	1	0,93%
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	7	6,54%
<i>Schwanniomyces</i> spp.	1	0,93%
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>	1	0,93%
<i>Trichosporon</i> spp.	1	0,93%
<i>Vishniacozyma</i> spp.	1	0,93%
<i>Yarrowia</i> spp.	7	6,54%
<i>Yarrowia brassicae</i>	2	1,87%
<i>Yarrowia lipolytica</i>	5	4,67%
Nie zidentyfikowano	1	0,93%

Grzyby patogene/potencjalnie patogene

