Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii

Numer albumu:1382

Kamila Kulesza

Drożdże izolowane ze śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.) poławianego do celów konsumpcyjnych

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii

Wydział Biologii i Biotechnologii

UWM w Olsztynie
pod kierunkiem
dr hab. Anny Biedunkiewicz

Rok 2023

University of Warmia and Mazury in Olsztyn
Faculty of Biology and Biotechnology

Album number 1382

Kamila Kulesza

Yeasts isolated from Baltic herring (*Clupea harengus membras* L.) caught for human consumption

The doctoral thesis was written
in Department of Microbiology and Mycology

Faculty of Biology and Biotechnology

UWM in Olsztyn
under the supervision of
dr hab. Anna Biedunkiewicz

Year 2023

Spis treści

STRESZCZENIE 5
ABSTRACT 7
1. Wstęp 9
1.1. Wprowadzenie do taksonomii drożdży 9
1.2. Ogólna charakterystyka drożdży 16
1.3. Woda jako rezerwuar grzybów 19
1.4. Ogólna charakterystyka wód Morza Bałtyckiego 22
1.5. Charakterystyka śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.) 25
1.6. Układ immunologiczny ryb 28
2. Cel badań i hipotezy badawcze 30
3. Materiał i metody 31
3.1. Badania rekonesansowe 31
3.2. Badania kontynuowane 31
3.3. Hodowla grzybów 32
3.4. Identyfikacja gatunkowa drożdży 33
3.4.1. Obserwacja cech mikroskopowych 34
3.4.2. Badania biochemiczne 35
3.4.2.1. Ocena zdolności fermentacji cukrów (zymogramy) 35
3.4.2.2. Ocena zdolności asymilacji cukrów (auksanogramy) 36
3.4.3. Badania molekularne 38
3.4.3.1 Izolacja DNA 38
3.4.3.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), elektroforeza i sekwencjonowanie 39
3.4.3.3. Rekonstrukcja filogenezy 40
3.4.4. Badania uzupełniające dla gatunków z rodzaju *Apiotrichum* 40
3.4.5. Identyfikacja wybranych izolatów drożdży na podstawie testów API 20C AUX 42
3.5. Ocena aktywności enzymatycznej wybranych izolatów drożdży 43
3.6. Ocena wrażliwości wybranych izolatów drożdży na leki przeciwgrzybicze 45
3.7. Analiza statystyczna 46
4. Wyniki 47
4.1. Drożdże wyizolowane z badanych ontocenoz 47
4.1.1. Drożdże izolowane z pyska 58

4.1.2. Drożdże izolowane ze skrzeli 61
4.1.3. Drożdże izolowane z wątroby 64
4.1.4. Drożdże izolowane z jelit 65
4.2. Analizy molekularne uzyskanych izolatów 67
4.3. Uzupełniające badania biochemiczne dla gatunków z rodzaju *Apiotrichum* 72
4.4. Ocena zdolności drożdży do fermentacji węglowodanów (zymogramy) 73
4.5. Ocena zdolności drożdży do asymilacji węglowodanów (auksanogramy) 75
4.6. Ocena zdolności badanych izolatów do wzrostu w 37°C 81
4.7. Ocena skuteczności identyfikacji wybranych izolatów drożdży na podstawie testów API 20C AUX 83
4.8. Ocena aktywności enzymatycznej wybranych izolatów drożdży 84
4.9. Ocena lekowrażliwości wybranych izolatów drożdży 87
4.10. Tablice 90
5. Dyskusja 112
6. Wnioski 132
7. Piśmiennictwo 134
8. Spis tabel, rycin, tablic i załączników 158
9. Załączniki 167

Olsztyn 2023

STRESZCZENIE

DROŻDŻE IZOLOWANE ZE ŚLEDZIA BAŁTYCKIEGO (*CLUPEA HARENGUS MEMBRAS* L.) POŁAWIANEGO DO CELÓW KONSUMPCYJNYCH

Kamila Kulesza

Wydział Biologii i Biotechnologii

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem *dr hab. Anny Biedunkiewicz*

Katedra Mikrobiologii i Mykologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Drożdże są organizmami kosmopolitycznymi, występującymi i krążącymi w całej biosferze, włącznie z ontosferą zwierząt i ludzi. Wszystkie kręgowce, w tym ryby, mogą być zasiedlane przez mikrogrzyby o zróżnicowanym statusie troficznym i taksonomicznym. Ryby, jako nosiciele potencjalnych zoo- i antropogenicznych drożdży workowych i podstawkowych, opisywane są rzadko. Informacje na temat mykobioty u ryb, szczególnie tych żyjących w środowiskach słonych, również nie są zbyt obszerne. Większość opracowań dotyczy występowania drożdży u osobników chorych lub żyjących w akwakulturach. Dlatego też celem niniejszych badań była ocena różnorodności gatunkowej drożdży kolonizujących różne ontocenozy zdrowych osobników śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.), poławianego do celów konsumpcyjnych, z uwypukleniem metod identyfikacji i właściwości biochemicznych wyizolowanych mikrogrzybów.

Materiał do badań stanowiły drożdże wyizolowane z pyska, skrzeli, wątroby i jelit 182 osobników śledzi poławianych do celów konsumpcyjnych. Wymazy pobierano od zwierząt w grudniu 2016 i 2019 roku oraz na przełomie kwietnia i maja 2018 roku.

Identyfikacji gatunkowej drożdży dokonywano przy użyciu metod klasycznych (analiza cech morfologicznych i fizjologicznych) oraz molekularnych, zgodnie ze standardowymi procedurami stosowanymi w laboratoriach mykologicznych. Sprawdzano również zdolność izolatów drożdży do wzrostu w 37°C w celu wyłonienia potencjalnych antropopatogenów. Dodatkowo dla jednego wybranego izolatu z każdego gatunku, wykonano testy API 20C AUX (identyfikacja gatunkowa drożdży na podstawie zdolności grzybów do przyswajania węgla z różnych źródeł), API ZYM (określenie aktywności enzymatycznej drożdży) oraz ATB FUNGUS 3 (badanie wrażliwości na leki przeciwgrzybicze).

Podczas przeprowadzonych badań łącznie uzyskano 260 izolatów drożdży, należących do 22 gatunków z 12 rodzajów. Drożdże workowe stanowiły zdecydowaną większość, w porównaniu z drożdżami podstawkowymi. Największe zróżnicowanie gatunkowe odnotowano w pysku i skrzelach, rzadziej drożdże kolonizowały jelita i wątrobę. We wszystkich badanych ontocenozach występowały: *A. domesticum, C. parapsilosis, D. hansenii, P. kudriavzevii, R. mucilaginosa* i *Y. lipolytica*. Wśród wyizolowanych drożdży odnotowano 1 gatunek uznawany jako ogólnie bezpieczny (GRAS – ang. *Generally Regardes As Safe*) oraz 10 gatunków należących do 1 grupy biobezpieczeństwa i 5 do BSL-2 (BSL – ang. *BioSafety Level*). Używając testów do identyfikacji grzybów API 20C AUX, prawidłowo określono przynależność gatunkową jedynie 3 z 22 badanych

izolatów. Drożdże wykazywały słabe zdolności fermentacyjne węglowodanów, przede wszystkim enzymatycznie przekształcały glukozę. Najczęściej asymilowanym przez drożdże cukrem również była glukoza, rzadziej maltoza, sacharoza i galaktoza. Większość drożdży wykazywało zdolność do wzrostu w podwyższonej temperaturze otoczenia. Wszystkie, spośród wybranych izolatów grzybów, charakteryzowały się aktywnością enzymatyczną fosfohydrolazy naftolowej AS-BI, fosfatazy kwaśnej, arylamidazy leucynowej, fosfatazy zasadowej, esterazy, lipazy esterazowej i arylamidazy walinowej. Najwyższą aktywność hydrolityczną obserwowano u *C. albicans* i *A. montevideense*. Drożdże wykazywały największą oporność w stosunku do itrakonazolu, rzadziej do amfoterycyny B i flukonazolu, zaś najbardziej wrażliwe były na działanie worikonazolu i 5-flucytozyny.

Uzyskane wyniki wskazują, że ontocenozy śledzia bałtyckiego są zasiedlane przez szerokie spektrum taksonomiczne drożdży o różnorodnych cechach fizjologicznych i biochemicznych. W celu identyfikacji mikrogrzybów izolowanych ze śledzi, metody klasyczne i molekularne, powinny być wzajemnie uzupełniane. Komercyjne szeregi biochemiczne wykazują niski stopień prawidłowego określenia przynależności gatunkowej drożdży izolowanych ze środowisk słonych, w związku z czym wydają się być nieprzydatne. Większość uzyskanych izolatów grzybów notowano z rezerwuarów morskich. Mikrogrzyby w ontocenozach śledzi bałtyckich stanowią część mikrobioty komesalicznej, mogą one być także potencjalnymi zoo- i antropopatogenami. Świadczy o tym m.in. zdolność do wzrostu w podwyższonej temperaturze otoczenia i aktywność enzymatyczna. W związku z częstością występowania drożdży w śledziach i środowisku ich życia, a także przetworach śledziowych, ich obecność powinna być stale monitorowana w ujęciu mykologicznym.

ABSTRACT

YEASTS ISOLATED FROM BALTIC HERRING (*CLUPEA HARENGUS MEMBRAS* L.) CAUGHT FOR HUMAN CONSUMPTION

Kamila Kulesza
Faculty of Biology and Biotechnology
The doctoral thesis was written under the supervision of dr hab. Anna Biedunkiewicz

Department of Microbiology and Mycology, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn

Yeasts are cosmopolitan organisms, found and circulating throughout the biosphere, including the ontosphere of animals and humans. All vertebrates, including fish, can be inhabited by microfungi of various trophic and taxonomic status. Fish are rarely described as carriers of potential zoo- and anthropogenic ascomycetous and basidiomycetous yeasts. Information on the mycobiota in fish, especially those living in salty environments, also is not extensive. Most studies concern the occurrence of yeasts in sick individuals or in aquaculture. Therefore, this study aimed to assess the diversity of yeast species colonizing various ontocenoses of healthy individuals of Baltic herring (*Clupea harengus membras* L.) caught for consumption, with emphasis on identification methods and biochemical properties of isolated microfungi.

The research material consisted of yeasts isolated from the mouth, gills, liver, and intestines of 182 herring individuals caught for consumption. Swabs were taken from animals in December 2016 and 2019 and between April and May 2018.

Yeast species identification was performed using classical (analysis of morphological and physiological features) and molecular methods in accordance with standard procedures used in mycological laboratories. The ability of yeast isolates to grow at 37°C was also tested to identify potential anthropopathogens. In addition, for one selected isolate from each species, API 20C AUX tests (identification of yeast species based on the capacity of fungi to absorb carbon from various sources), API ZYM tests (determination of the enzymatic activity of yeasts), and ATB FUNGUS 3 tests (sensitivity test to antifungal drugs), were performed.

During the research, a total of 260 yeast isolates were obtained, belonging to 22 species from 12 genera. Ascomycetous yeasts constituted the vast majority in comparison with basidiomycetous yeasts. The most remarkable species diversity was noted in the mouth and gills, less often yeast colonized the intestines and liver. In all the studied ontocenoses, there were: *Apiotrichum domesticum*, *Candida parapsilosis, Debaryomyces hansenii, Pichia kudriavzevii, Rhodotorula mucilaginosa* and *Yarrowia lipolytica.* Among the isolated yeasts, 1 species was recognized as generally safe (GRAS – *Generally Regardes As Safe*), and 10 species belonging to the 1st BioSafety group and 5 to BSL-2 (BSL – *BioSafety Level*), respectively, were recorded. Using the API 20C AUX fungi identification tests, only 3 of the 22 tested isolates were correctly identified as species. Yeast showed poor fermentation capacity of carbohydrates, mainly they were able to perform enzymatic conversion of glucose. Glucose was also the most frequently assimilated sugar by yeast; maltose, sucrose, and galactose less regularly. Most of the yeasts showed the ability to grow at elevated ambient temperatures. All of the selected

fungal isolates were characterized by the enzymatic activity of naphthol phosphohydrolase AS-BI, acid phosphatase, leucine arylamidase, alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, and valine arylamidase. The highest hydrolytic activity was observed in *C. albicans* and *A. montevideense*. Yeasts showed the greatest resistance to itraconazole, less frequently to amphotericin B and fluconazole. They were most sensitive to voriconazole and 5-flucytosine.

The obtained results indicate the ontocenoses of the Baltic herring are inhabited by a broad taxonomic spectrum of yeasts with various physiological and biochemical features.To identify microfungi isolated from herring, classical and molecular methods should complement each other. Commercial biochemical series show a low degree of correct determination of the species affiliation of yeasts isolated from salty environments and therefore seem useless. Most of the obtained fungal isolates were recorded from marine reservoirs. Microfungi in the Baltic herring ontocoenoses are part of the commensal microbiota, but they can also be potential zoo- and anthropopathogens. This is evidenced, among others, by the ability to grow at elevated ambient temperatures and enzymatic activity. Due to the frequency of yeast occurrence in herring and their living environment and herring products, their presence should be constantly monitored in terms of mycology.

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie do taksonomii drożdży

Grzyby stanowią jedną z ważniejszych i najbardziej zróżnicowanych grup organizmów występujących w większości ekosystemów na Ziemi (BAHRAM i NETHERWAY 2022). Są one określane jako organizmy euryekologiczne, ze względu na ich zdolności przystosowawcze do zmiennych warunków środowiska oraz różnorodność jednostek taksonomicznych (BOGUSŁAWSKA-WĄS 2010). Występowanie grzybów w środowiskach różniących się wyraźnie właściwościami fizykochemicznymi i ich szeroki zakres tolerancji na zmiany czynników środowiskowych, takich jak temperatura otoczenia, zasolenie, wilgotność, kwasowość, ciśnienie oraz nasycenie tlenem w środowisku życia, wynika z ogromnej plastyczności ekofizjologicznej i żywotności grzybów (DYNOWSKA 2018). W porównaniu z bakteriami, są organizmami mniej wymagającymi troficznie i zdolnymi do znoszenia wysokich stężeń materii organicznej. Sposób odżywania grzybów na drodze osmotrofii pierwotnej, polegającej na wydzielaniu egzoenzymów, a następnie całkowitym lub częściowym trawieniu substratów i wchłanianiu produktów rozkładu na drodze osmozy, wpływa w dużej mierze na ich plastyczność względem środowiska (DYNOWSKA 2008). Zmienność profilu ekologicznego środowiska, powoduje, że te same genotypy grzybów mogą ulegać zróżnicowaniu fenotypowemu. Z tego względu, identyfikacja gatunkowa oparta wyłącznie na podstawie określonych cech morfologicznych i fizjologicznych, spowodowała tworzenie nowych jednostek taksonomicznych dla opisanych już gatunków (BOGUSŁAWSKA-WĄS 2010). Dlatego też analizy sekwencji molekularnych, w ostatnich latach często używane przez mykologów, umożliwiły ujednolicenie części nazw gatunków, poszerzyły wiedzę na temat różnorodności filogenetycznej (WIJAYAWARDENE i in. 2017), ukazały polifiletyczny charakter wielu rodzajów grzybów (PANG i in. 2003), a także pozwoliły na konstruowanie powiązań ewolucyjnych (HYDE i in. 2017; LIU i in. 2016).

Wiedza na temat różnorodności gatunkowej grzybów wciąż jest niewystarczająca. Liczby gatunków podawane przez badaczy podczas podejmowanych prób szacowania bogactwa gatunkowego są rozbieżne. HAWKSWORTH (1991) stwierdził, że na Ziemi występuje około 1,5 miliona gatunków, z kolei BLACKWELL (2011) podał liczbę 5,1 miliona. HAWKSWORTH i LÜCKING (2017), na podstawie przeglądu danych

dotyczących różnorodności grzybów w oparciu o badania sekwencji środowiskowych zasugerowali, że liczba gatunków grzybów mieści się pomiędzy 2,2 a 3,8 miliona. Do tej pory opisanych zostało jedynie ponad 140 000 gatunków (HAWKSWORTH i LÜCKING 2017; WIJAYAWARDENE i in. 2017), z czego większość z nich zasiedla ekosystemy lądowe.

W 1767 roku Linneusz zaklasyfikował grzyby do królestwa roślin. Z tego względu wiele pojęć mykologicznych ma w swoim źródłosłowie nawiązanie do terminologii roślinnej, na przykład „flora grzybicza" aktualnie zastępowana terminem „mykobiota". Pierwsza propozycja utworzenia trzeciego królestwa została zaproponowana przez Jahn i Jahn w 1949 roku, jednak nie została przyjęta przez ICBN (ang. *International Code of Botanical Nomenclature*) i dopiero stworzony przez Moore'a opis królestwa *Fungi* w 1980 roku spotkał się z aprobatą środowiska naukowego (KRZYŚCIAK i in. 2011). Taksonomia grzybów ma dość burzliwą historię i dopiero w ostatnich latach, w miarę rozwoju genomiki i filogenomiki, zaczyna być wyjaśniana. Na podstawie obecnej wiedzy królestwo grzybów dzieli się na dziewięć typów: *Opisthosporidia, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Basidiomycota* i *Ascomycota* (NARANJO-ORITZ i GABALDÓN 2019). Jako charakterystyczne cechy wszystkich grzybów wymienia się następujące: 1) zwykle są organizmami jednokomórkowymi lub wytwarzającymi grzybnię, 2) w ich ścianie komórkowej (przynajmniej w zarodnikach) występuje chityna i β-glukan, 3) obecność szlaku kwasu amino-adypinowego w biosyntezie lizyny oraz 4) obecność spłaszczonych grzebieni mitochondrialnych. Ze względu na różnorodność grzybów istnieją jednak liczne wyjątki w tej kwestii (ADL i in. 2018). Należy zwrócić uwagę na fakt, że określenia taksonomiczne grzybów niedoskonałych: *Deuteromycota, Fungi Imperfecti,* grzyby strzępkowe *Hyphomycetes* i inne, aktualnie nie są poprawne, a większość jednostek przeklasyfikowano i przydzielono do innych taksonów, zazwyczaj do gromady *Ascomycota*. Dokonano tego dzięki intensywnym badaniom nad zależnościami między stadium doskonałym grzybów (rozmnażających się na drodze płciowej – teleomorfa) ze stadium niedoskonałym (wykazujących rozmnażanie bezpłciowe – anamorfa). Powiązania między dwoma stadiami ustalono w wyniku łączenia różnoimiennych izolatów anamorficznych z obserwacją rozwoju stadiów płciowych, a także badań nad podobieństwem genetycznym (KRZYŚCIAK i in. 2011). Drożdże stanowiące najmniejsze,

jednokomórkowe mikroorganizmy eukariotyczne (RAGHKUMAR 2017), należą do królestwa grzybów.

W przeszłości drożdże rozdzielano na drożdże właściwe i grzyby drożdżopodobne lub drożdżoidalne. Twierdzono, że drożdże właściwe stanowi wyłącznie rodzina *Saccharomycetaceae* (klasa *Ascomycetes*), wytwarzająca worki. Jako grzyby drożdżopodobne określano niejednorodną grupę, w której podstawową formą rozmnażania było pączkowanie. Należały one do różnych rodzin, tj. *Cryptococccceae* (klasa *Deuteromycetes*) czy *Sporobolomycetaceae* (klasa *Basidiomycetes*). Taki podział taksonomiczny, mimo iż sztuczny, upraszczał identyfikację oraz ułatwiał sporządzanie zwięzłych i spójnych logicznie diagnoz. Klasyfikacja drożdży właściwych i grzybów drożdżopodobnych opierała się na morfologii grzybni, zdolności do tworzenia filamentów i chlamydospor oraz porównywaniu właściwości biochemicznych izolatów, takich jak fermentacja czy asymilacja, z biegiem czasu dodając metody serologiczne i chromatograficzne (DYNOWSKA 1995). Rozwinięcie się technik biologii molekularnej umożliwiło lepsze zrozumienie powiązań filogenetycznych i aktualnie nie stosuje się podziału na drożdże właściwe i grzyby drożdżopodobne, a wszystkie określa się jako drożdże. Stanowią one polifiletyczną, heterogenną i złożoną taksonomicznie grupę morfologiczną (KUTTY i PHILIP 2008; KURTZMAN i in. 2011; FELL 2012), do której zalicza się drożdże workowe (*Ascomycota*) i podstawkowe (*Basidiomycota*) oraz dimorficzne grzyby strzępkowe (*Pezizomycotina*) – występujące również w formie drożdżowej. Cechą wspólną drożdży jest rozmnażanie przez pączkowanie lub podział, ewentualnie kombinację obu form (KRZYŚCIAK i in. 2011). Ten typ rozmnażania stanowi jedyną formę wzrostu, albo też dominuje nad wytwarzaniem strzępek lub pseudostrzępek. Te ostatnie tworzone są z reguły wskutek wydłużania się blastospor, zazwyczaj w warunkach mikroaerofilnych (DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013).

Cechą charakterystyczną grzybów zaliczanych do *Ascomycota* jest wytwarzanie w trakcie rozmnażania płciowego charakterystycznych struktur, zwanych workami, tworzonych wewnątrz owocników lub bez nich (tzw. „worki nagie"). Filogeneza drożdży workowych nadal jest niejasna. Część naukowców twierdzi, że są one prymitywnymi grzybami, natomiast pozostali uważają, że stanowią formę zredukowaną na drodze ewolucji regresywnej grzybów bardziej rozwiniętych. Drożdże workowe stanowią grupę monofiletyczną, klasyfikowaną jako jedyny rząd klasy *Saccharomycetes,* podtypu *Saccharomycotina.* W przeciwieństwie do drożdży podstawkowych posiadają one

niewielką zawartość chityny w ścianie komórkowej, mniejszą ilość guaniny i cytozyny w nDNA (DNA jądrowym), wykazują holoblastyczne tworzenie pączków (rodzaj blastycznego powstawania zarodników, podczas którego w komórce zarodnikotwórczej wszystkie warstwy ściany komórkowej są zaangażowane w jej tworzenie), a także częstszą zdolność fermentacji węglowodanów (KRZYŚCIAK i in. 2011).

Grzyby należące do typu *Basidiomycota* charakteryzują się wytwarzaniem podstawek, czyli komórek na których tworzone są zarodniki płciowe (bazydiospory). Zarówno podstawczaki, jak i workowce, mają wydłużoną fazę dwujądrowości (dikariofaza). U niektórych przedstawicieli *Basidiomycota* obserwuje się tzw. połączenia zlepne (ang. *clamp connection*), umożliwiające przemieszczanie jądra komórkowego pomiędzy dwiema sąsiadującymi komórkami. Grzyby podstawkowe stanowią monofiletyczną grupę grzybów, na co wskazują badania fenetyczne i genetyczne. Odkrycie powiązań filogenetycznych między podstawczakami, które zazwyczaj kojarzą się z grzybami wielkoowocnikowymi, a drożdżami podstawkowymi zajęło stosunkowo dużo czasu. Przełomem okazały się badania BANNO (1967), który opisał cykl życiowy wraz z wytwarzaniem teliospor przez *Rhodosporidium toruloides*. Jednak dokładne relacje genetyczne udokumentowano dopiero w 1995r. Podczas analizy 18S rDNA wykazano, że drożdże *Basidiomycota* dzielą się na trzy podtypy: *Pucciniomycotina* (rząd *Sporidiobolales*, np. rodzaj *Rhodotorula*), *Agaricomycotina* (rząd *Trichosporonales*, np. rodzaj *Trichosporon, Cryptococcus*) oraz *Ustilaginomycotina* (rząd *Malasseziales*). Określenie genetycznego pokrewieństwa drożdży podstawkowych jest utrudnione, ponieważ na podstawie podobieństwa regionów ITS i D1/D2 nie zawsze można wykazać przynależność gatunkową, jak w przypadku drożdży workowych (KRZYŚCIAK i in. 2011).

Problemy z prawidłową identyfikacją gatunków przy użyciu metod klasycznych wynikają głównie ze zmienności niektórych cech drożdży, spowodowanych ich euryekologiczną naturą, zmiennością fizjologiczną oraz zdolnością przystosowywania się do różnorodnych nisz ekologicznych. Powszechne w ostatnich latach wykorzystywanie technik biologii molekularnej do klasyfikacji mikroorganizmów, doprowadziło do gromadzenia w publicznych bazach danych całych ich genomów, a w konsekwencji wywołało ogromną rewolucję w systematyce grzybów. Przy użyciu genomiki naukowcy starają się rozwiązać problemy wyznaczania granic gatunków, przeprowadzać ich reklasyfikację oraz odkrywać nowe taksony i gatunki grzybów (HERNÁNDEZ-GARCÍA i in. 2022). Drożdże, które przez niektórych badaczy były

uznawane za prymitywną grupę, w szczególności zostały objęte reklasyfikacją. Okazało się, że ze względu na swoją polifiletyczną naturę, stanowią one jedną z najbardziej zróżnicowanych jednostek taksonomicznych, którą o wiele trudniej usystematyzować niż na przykład grzyby pleśniowe (BOGUSŁAWSKA-WĄS 2010).

Wprowadzenie metod molekularnych w celu identyfikacji gatunkowej drożdży spowodowało odkrycie wielu nowych gatunków i rodzajów. W czwartym wydaniu „The Yeasts: A Taxonomic Study (KURTZMAN i FELL 1998) wymienionych i opisanych zostało 700 gatunków należących do 97 rodzajów, podczas gdy wydanie piąte (KURTZMAN i in. 2011) obejmuje 1500 gatunków ze 150 rodzajów, a liczba ta ciągle wzrasta. Uwzględnienie sekwencji DNA w ocenie taksonomicznej, umożliwiło rekonstrukcję linii ewolucyjnej drożdży. Odnalezienie zależności genealogicznych doprowadziło do podziału drożdży na klady, czyli grupy organizmów posiadające wspólnego przodka, o wyjątkowych cechach plezjomorficznych, charakterystycznych dla danej linii ewolucyjnej. Zastosowanie analizy filogenetycznej pozwoliło na uporządkowanie taksonów w strukturze kategorii systematycznych (BOGUSŁAWSKA-WĄS 2010). Bardzo częstym problemem taksonomicznym drożdży jest fakt, że wiele rodzajów zostało opisanych na podstawie kryteriów fenotypowych, mając dwie odrębne nazwy dla stadiów anamorficznych (bezpłciowych) i teleomorficznych (płciowych). Przyczyną takiego stanu było szerokie rozpowszechnienie form rozmnażających się bezpłciowo, a także trudności z uzyskaniem w warunkach laboratoryjnych form teleomorficznych. Klasyfikacja drożdży i innych grzybów zgodnie z zasadami Międzynarodowego Kodeksu Nomenklatury Botanicznej (ang. *International Code of Botanical Nomenclature*), była używana przed rozpowszechnieniem technik biologii molekularnej i opierała taksonomię na stadiach płciowych grzybów, wymagając oddzielnych nazw dla form bezpłciowych (MCNEILL i in. 2006). Zdolność do grupowania stadiów płciowych i bezpłciowych dzięki porównywaniu sekwencji DNA grzybów w obrębie kladu, doprowadziła do zmiany zasad nazewnictwa. W ostatnich wydaniach Międzynarodowego Kodeksu Nomenklatury dla alg, grzybów i roślin (ang. *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants*) odchodzi się od podwójnego nazewnictwa grzybów, łącząc oba stadia w grupy monofiletyczne, mające wspólną nazwę rodzajową (MCNEILL i in. 2012; TURLAND i in. 2018). Filogenezy molekularne prowadzą do aktualizacji i ponownego przypisania rodzajów polifiletycznych do bardziej odpowiednich grup naturalnych, dzięki czemu tworzony jest nowy system klasyfikacji grzybów (KURTZMAN i in. 2015).

Pierwszym krokiem w uzupełnieniu metod fenotypowych o analizy molekularne podczas identyfikacji drożdży było odróżnienie grzybów należących do gromad *Ascomycota* i *Basidiomycota.* Charakterystyka genetyczna drożdży rozpoczęła się od określenia podstawowego składu DNA, standardowo wyrażanego jako zawartość CG (cytozyna-guanina) w nDNA, co dostarczało informacji o odmienności dwóch mikroorganizmów (HERNÁNDEZ-GARCÍA i in. 2022). KURTZMAN i FELL (1991) ustalili, że u drożdży z gromady *Ascomycota* stosunek CG wynosi 28-50%, zaś u *Basidiomycota* 50-70%. Rozróżnienie w oparciu o zawartość cytozyny-guaniny w nDNA, ze względu na szerokie przedziały okazały się być jednak niewystarczające jako elementy identyfikacji gatunków. Wpływ na taksonomię drożdży, miało użycie technik reasocjacji jądrowej DNA-DNA lub hybrydyzacji technik DNA-DNA. Mimo iż były one pracochłonne i nie rozwiązywały problemu zróżnicowania blisko spokrewnionych gatunków, miały duży wkład w identyfikację drożdży (KURTZMAN 1993).

Pojawienie się techniki sekwencjonowania genów i fragmentów niekodujących DNA okazały się uniwersalną, ekonomiczną i prostą do wykonania metodą. W badaniach molekularnych przede wszystkim wykorzystywana jest łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. *polymerase chain reaction*), której zaletą jest łatwość wykonania oraz wysoka czułość i specyficzność. W metodzie PCR stosuje się startery sekwencji charakterystycznej dla rodzaju oraz gatunku grzybów, które pozwalają na wybiórcze zamplifikowanie (powielenie) dowolnego fragmentu DNA przy użyciu enzymu – polimerazy. W genomie grzybów występują regiony charakteryzujące się wysokim zróżnicowaniem międzygatunkowym, wykorzystywane jako markery molekularne. Zalicza się do nich operony rDNA zlokalizowane w mitochondrialnym i jądrowym DNA. W analizach molekularnych stosuje się regiony zarówno o wysokiej konserwatywności (podjednostki rybosomalne 18S, 5.8S, 26S i 28S), jak i o dużej zmienności genetycznej, na przykład regiony niekodujące ITS (ang. *Internal Trancribed Regions*; KURNATOWSKA i KHALID 2018). Początkowo w identyfikacji molekularnej drożdży jako marker używana była domena 2 dużej podjednostki 26S rybosomalnego RNA (rRNA). Sekwencjonowanie domen D1/D2 26S rRNA stało się popularnym narzędziem do identyfikacji grzybów workowych, jednak nie pozwalało na wykrywanie nowych i rozróżnienie blisko spokrewnionych gatunków oraz rekonstrukcję filogenezy drożdży. Następnie jako uniwersalny kod kreskowy uznano region ITS, który jest krótszy od fragmentu D1/D2 oraz bardziej zmienny, szybciej ewoluujący i częściej utrwalający mutacje.

Rozpowszechnienie identyfikacji przy użyciu metod molekularnych oraz poszerzające się bazy danych o sekwencje ITS i D1/D2 pozwoliły na rozpoznanie wielu nowych gatunków, przede wszystkim tych pozyskiwanych ze środowiska. Aktualnie oba wyżej wymienione regiony są uznawane za kody kreskowe służące do identyfikacji grzybów, a analizy molekularne są niezwykle przydatne w uniwersalnej taksonomii filogenetycznej drożdży (HERNÁNDEZ-GARCÍA i in. 2022). Oprócz klasycznej metody PCR do identyfikacji molekularnej grzybów stosuje się jej liczne odmiany, tj. nested PCR, multiplex PCR, RT-PCR (ang. *Reverse Transcription PCR*), PCR-EIA, RFLP-PCR (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*), ALFP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) oraz Real-Time PCR (reakcja PCR w czasie rzeczywistym; KURNATOWSKA i KHALID 2018).

Innymi metodami biologii molekularnej służącymi do identyfikacji gatunkowej grzybów są m.in. fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH – ang. *fluorescence in situ hybrydyzation*) czy PNA FISH (ang. *peptide nucleic acid fluorescence in situ hybrydyzation*). FISH polega na hybrydyzacji sekwencji DNA lub RNA wraz ze specyficznymi sondami wyznakowanymi barwnikami fluorescencyjnymi. Dzięki sondom można określić specyficzną pozycję docelowej sekwencji na analizowanej nici DNA w genomie grzybów, a obserwacja tego zjawiska odbywa się przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. FISH jest stosowany jako uzupełnienie metod hodowlanych lub PCR. Obiecującą odmianą tej metody wydaje się być PNA FISH, w której sondami są cząsteczki kwasu peptydonukleinowego (PNA) naśladującego cząsteczkę DNA. Ograniczeniem tej metody jest jednak fakt, iż sekwencje używanych powszechnie sond oligonukleotydowych nie mogą być przeniesione na sekwencje sond PNA i są od nich krótsze. Przede wszystkim jednak koszty tej metody są bardzo wysokie (KURNATOWSKA i KHALID 2018).

Jednymi z najnowszych metod molekularnych, służących lepszemu poznaniu i dokładniejszej identyfikacji grzybów, są NASBA (ang. *nucleic acis sequence based amplification*) oraz spektroskopia. NASBA jest techniką zbliżoną do amplifikacji mRNA, jednak wykorzystującą mieszaninę trzech enzymów: polimerazy DNA, rybonukleazy H oraz odwrotnej transkryptazy. Wykazanie wysokiej wrażliwości tej metody daje nadzieję na wykorzystanie jej w przyszłości jako testu skriningowego. Spośród metod spektroskopowych pozwalających na identyfikację grzybów, w ostatnich latach coraz większą popularnością cieszy się MALDI-TOF MS (ang. *matrix assisted laser desorption*

ionization). Jest to metoda jonizacji próbki połączona z pomiarem jej masy w spektrometrze masowym MS (ang. *mass spectrometry*). Oznaczenie grzybów na poziomie rodzaju, gatunku czy nawet szczepu wykonuje się poprzez bezpośrednie porównanie otrzymanych widm badanych mikroorganizmów z oznaczonymi wcześniej widmami wzorcowymi. Warto nadmienić, że metoda ta wymaga założenia wstępnej hodowli grzybów (KURNATOWSKA i KHALID 2018).

Zastosowanie różnych metod molekularnych pozwoliło na szybszą i dokładniejszą identyfikację gatunkową drożdży. Dostęp do pełnych genomów ma istotny wpływ na taksonomię, filogenezę, identyfikację i reklasyfikację gatunków grzybów (HERNÁNDEZ-GARCÍA i in. 2022).

1.2. Ogólna charakterystyka drożdży

Drożdże to grupa jednokomórkowych, najmniejszych organizmów eukariotycznych odżywiających się osmoheterotroficznie (RAGHKUMAR 2017). Są one określane jako mikroorganizmy kosmopolityczne, występujące we wszystkich strefach klimatycznych w całej biosferze, tj. aerosferze, litosferze, hydrosferze a także ontosferze zwierząt i ludzi. Głównymi rezerwuarami drożdży są biotopy bogate w węglowodany oraz inne związki organiczne (DYNOWSKA i KURNATOWSKA 2018). Różnorodność gatunkowa grzybów zależy od rodzaju i stężenia związków organicznych, z kolei warunki środowiskowe mają wpływ na rozmieszczenie, liczbę i charakterystykę metaboliczną grzybów (KUTTY i PHILIP 2008). Grzyby osiągnęły jeden z najwyższych stopni zdolności adaptacyjnych, objawiających się szybkim tempem wzrostu, możliwością zmiany sposobu odżywiania wraz z precyzyjnie ukierunkowaną i wysoką aktywnością enzymatyczną, a także uniezależnieniem się stadium płciowego i bezpłciowego w cyklu rozwojowym (BOGUSŁAWSKA-WĄS i DĄBROWSKI 2001; DYNOWSKA 2018). W związku z tym, te same gatunki mogą być równocześnie w jednych bioukładach kooperantami, zaś w innych eksploatatorami (DYNOWSKA 2018).

Czynniki środowiskowe, determinujące aktywność metaboliczną oraz wzrost, rozwój i przeżywalność drożdży, dzieli się na biotyczne i abiotyczne. Do najważniejszych czynników abiotycznych, fizycznych i chemicznych, zalicza się temperaturę, ciśnienie, światło, pH, dostępność składników pokarmowych i wody, ilość tlenu, jak również obecność związków przeciwdrobnoustrojowych (DELORT i in. 2010). Z kolei jako czynniki biotyczne określa się interakcje z innymi organizmami, tj. bakteriami, grzybami,

roślinami czy zwierzętami, a także protistami i wirusami (DEÁK 2006). Interakcje te mogą działać w obie strony lub jednokierunkowo, są neutralne, synergiczne lub antagonistyczne (BUZZINI i in. 2017).

Rola drożdży w środowisku naturalnym jest zbliżona do funkcji pozostałych grzybów. Zwykle są one zaliczane do pospolicie występujących saprotrofów, które przekształcają organiczne substancje pochodzenia roślinnego i zwierzęcego w związki nieorganiczne lub rzadziej do fakultatywnych fitopatogenów (DYNOWSKA i KURNATOWSKA 2018; KUTTY i PHILIP 2008). Niektóre z nich mogą jednak wykazywać zdolności chorobotwórcze lub potencjalnie chorobotwórcze wobec człowieka i zwierząt, stanowiąc zagrożenie dla ich zdrowia i życia (KUTTY i PHILIP 2008). Zmiany klimatu, wynikające z presji antropogenicznej, doprowadziły do przystosowania wielu wcześniej uznawanych za niegroźne gatunków grzybów do roli czynników zakaźnych (CASADEVALL i in. 2019). Podwyższenie się średniej temperatury na świecie i bardziej wilgotne środowisko w niektórych obszarach Ziemi, skutkują z kolei ciągłym poszerzaniem się zasięgu geograficznego dotychczas notowanych patogenów (FRIEDMAN i SCHWARTZ 2019). Grzyby określane jako oportunistyczne, preferują siedliska niezależne od organizmu żywiciela, a do zakażenia doprowadzają jedynie po przypadkowym przejściu przez bariery ochronne układu odpornościowego gospodarza (CASADEVALL i PIROFSKI 2000). Z kolei grzyby prawdziwie patogeniczne wykorzystują żywiciela, którego organizm jest niezbędny do pozyskiwania składników odżywczych, wzrostu i reprodukcji (SEYEDMOUSAVI i in. 2015).

Grzyby są związane z makroorganizmami wszystkich poziomów troficznych jako symbionty, pasożyty lub saprotrofy. Grzyby symbiotyczne mogą być komensalami lub mutualistami dla gospodarza. Komensale żyją na organizmie lub wewnątrz niego, nie prowadząc do infekcji osobników zdrowych. Mutualiści przynoszą korzyść swoim gospodarzom, ale czerpią również pożytek dla siebie. Pasożyty nie są użyteczne dla swoich żywicieli, zaś te które negatywnie wpływają na ich zdrowie są określane jako patogeny. Wyróżnia się pasożyty bezwzględne (obligatoryjne), gdy grzyb nie może żyć poza organizmem żywiciela oraz względne (fakultatywne) w przypadku gdy grzyb może występować w formie komensalicznej (RAGHUKUMAR 2017). Drożdże w organizmach żywych występują w dwóch fazach: drożdżoidalnej – Y, w postaci komórek pączkujących lub mycelialnej – M, w formie pseudostrzępek. Forma strzępkowa jest uznawana za bardziej patogeniczną, ze względu na jej wyższą aktywność enzymatyczną

oraz zdolnościami przylegania i wirulencji (DYNOWSKA 1995; DYNOWSKA i EJDYS 1999; KURNATOWSKA 2006; KURNATOWSKI i KURNATOWSKA 2018).

W ujęciu potencjalnej chorobotwórczości grzybów w stosunku do gospodarza, biorąc pod uwagę dynamikę ich naturalnej zmienności, należy zwrócić uwagę na układ makroorganizm-grzyby-bakterie. Układ ten jest regulowany przez mechanizmy homeostazy, w których kluczowe znaczenie ma sprawna odpowiedź immunologiczna gospodarza. Gdy środowisko pozostaje niezakłócone, w układzie tym rozwija się zespół mikroorganizmów, gdzie antagonistyczne i korzystne zależności osiągają stan równowagi. Wyłącznie w przypadku zakłóceń środowiskowych, zaburzających tę dobrze zorganizowaną społeczność, obcy mikroorganizm jest w stanie zasiedlić daną ontocenozę. Im więcej mikroorganizmów wchodzi w skład ontocenozy zdrowego makroorganizmu, tym patogen ma mniejsze szanse na jej kolonizację. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż prawie połowa grzybów wnikająca do organizmu gospodarza jest w stanie przystosować się do warunków w nim panujących (DYNOWSKA 2018). Do przejścia grzyba z formy oportunistycznej w patogeniczną dochodzi wyłącznie w przypadku wcześniejszego wystąpienia czynników immunosupresyjnych. Grzyby przedostają się do ustroju gospodarza różnymi drogami: inhalacyjną, pokarmową, płciową, przez uszkodzoną skórę, błonę śluzową czy rogówkę (DYNOWSKA i KURNATOWSKA 2018). Przykładami grzybów uznawanych za oportunistyczne i jednocześnie stanowiące komponent normalnej bioty u ludzi i zwierząt, są grzyby zaliczane do rodzaju *Candida* czy *Geotrichum,* a także *Cryptococcus, Malassezia, Rhodotorula* i *Trichosporon* (DWORECKA-KASZAK i KASZAK 2018).

Infekcje grzybicze są stosunkowo rzadkimi chorobami u zdrowych ludzi i zwierząt, z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, w porównaniu z bakteriami i wirusami, mimo iż w środowisku znajdują się duże ilości grzybów zdolnych do infekcji makroorganizmów, a kontakt z nimi jest nieunikniony (GNAT i in. 2021). W ostatnich latach obserwuje się na całym świecie rosnącą liczbę zgłaszanych patogenów grzybowych, będących przyczyną chorób ludzi i zwierząt (GOZLAN i in. 2014; GNAT i in. 2021), wzrost zachorowalności na wywołane przez grzyby infekcje, poszerzenie zasięgu geograficznego i zwiększoną zjadliwość patogenów. Wciąż notowane są nowe gatunki lub występowanie znanych szczepów grzybów u nowych gospodarzy, zaś czynniki wpływające na wzrost liczby infekcji grzybiczych pozostają nadal niewystarczająco wyjaśnione (GOZLAN i in. 2014).

1.3. Woda jako rezerwuar grzybów

Występowanie grzybów zazwyczaj kojarzy się ze środowiskiem lądowym, jednak to woda stanowi drugi co do wielkości (po litosferze) naturalny rezerwuar mikrogrzybów, zróżnicowanych taksonomicznie i troficznie. Grzyby bytujące w wodach mogą mieć pochodzenie autogeniczne i allogeniczne. Występują one w różnych zbiornikach wodnych, o szerokim spektrum czynników fizykochemicznych oraz biologicznych, w wodach słodkich oraz słonych, stojących i płynących, powierzchniowych i podziemnych (DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013). Pojęcie „grzybów wodnych" jest trudne do zdefiniowania i wyraźnego odgraniczenia od „grzybów lądowych". W sensie taksonomicznym grzyby wodne określa się jako grzyby wyraźnie przystosowane do występowania w środowisku wodnym, rozprzestrzeniające się za pomocą zoospor (pływek) bądź innych zarodników przystosowanych do przenoszenia w wodzie. W ujęciu ekologicznym mianem grzybów wodnych określa się gatunki bytujące wyłącznie lub najczęściej w środowisku wodnym (BATKO 1975). Pojęcie „grzybów wodnych" wydaje się również nie do końca jasne, ze względu na występowanie w wodzie gatunków, dla których jest ona środowiskiem II rzędu, do którego migrują z materią allochtoniczną i mogą w niej wykazywać wysoką aktywność biologiczną. Gatunki te zazwyczaj są związane z glebą, fyllosferą i kaulosferą roślin, stanowią ważny komponent bioaerozolu powietrza, a także są notowane w ontosferze ludzi i zwierząt jako komensale lub czynniki etiologiczne wielu chorób. Część grzybów wodnych wydaje się być więc gatunkami lądowymi, zdolnymi jedynie do utrzymania aktywności biologicznej w środowisku wodnym przez pewien czas (DYNOWSKA 1995; DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013). Te z nich, które nie występują poza środowiskiem wodnym, a ich cykl życiowy jest uzależniony od wody, określa się mianem rezydentów stanowiących formy autochtoniczne (HAWKSWORTH i LAGRECA 2007). Pojęcie „grzyby wodne" dotyczy również gatunków imigrujących do zbiorników wraz z materią allochtoniczną, dla których siedliska wodne stanowią alternatywne środowisko życia. Komórki tych grzybów,
w zależności od możliwości adaptacyjnych, ulegają wymieraniu albo stanowią nierozłączną część danego akwenu (DIX i WEBSTER 1995).

Na biologię grzybów bytujących w ekosystemach wodnych w istotny sposób wpływają właściwości wody, tj. skład chemiczny, natlenienie, temperatura, ciśnienie, dostępność światła, ruchliwość czy ciągłość czasowa i przestrzenna. Jednym

z najważniejszych czynników limitujących występowanie grzybów w środowiskach wodnych, jest zawartość związków organicznych. Dla saprotrofów i grzybów ubikwistycznych (grzyby pleśniowe, drożdże) jest to czynnik stymulujący, natomiast dla grzybów typowo wodnych ograniczający (DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013). Z mykologicznego punktu widzenia, wraz ze wzrostem zanieczyszczenia wody związkami organicznymi, staje się ona dobrym podłożem odżywczym, płynnym źródłem pokarmu, który jest łatwo dostępny dla saprotrofów (BATKO 1975). Wiele z nich to grzyby oportunistyczne, komensaliczne w stosunku do człowieka i zwierząt, które przy zachwianiu równowagi ogólnobiologicznej i spadku odporności gospodarza mogą być przyczyną różnych schorzeń: alergii, mykotoksykoz, grzybic powierzchniowych i narządowych, a nawet nowotworów (DYNOWSKA 1995; DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013). Oprócz tego, że zbiorniki wodne są uważane za ogromny, naturalny rezerwuar grzybów potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka i zwierząt dzięki zdolności do wychwytywania i metabolizowania substancji organicznych, odgrywają one także ogromną rolę w procesie samooczyszczania się wód. Drożdże występujące w wodzie pełnią w niej funkcje charakterystyczne dla destruentów i mogą stanowić mikroorganizmy przydatne w bioindykacji (DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013).

Grzyby występujące w ekosystemach wodnych to gatunki kosmopolityczne, ograniczone raczej czynnikami ekologicznymi niż geograficznymi. Biorąc pod uwagę nieciągłość przestrzenną i specyficzność biotopów, kosmopolityzm grzybów jest zaskakującym zjawiskiem. Prawdopodobnie, jednym z czynników sprzyjających rozprzestrzenianiu się grzybów jest ich przenoszenie przez zwierzęta związane z ekosystemami wodnymi (głównie ptaki), człowieka oraz prądy powietrza. Dzięki tym wektorom, grzyby bytujące w środowiskach wodnych przedostają się do wszystkich części biosfery, a w przypadku gdy są to zoo- i antropopatogeny mogą stanowić bezpośrednie zagrożenie dla zdrowia oraz życia zwierząt i ludzi (DYNOWSKA i PACYŃSKA 2009; DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013).

Grzyby morskie po raz pierwszy zostały zdefiniowane przez KOHLMEYER i KOHLMEYER (1979) jako grzyby rosnące i wytwarzające zarodniki jedynie w siedlisku morskim lub w ujściach rzek. Pojęcie to zostało rozszerzone przez JONES i in. (2015) o grzyby pochodzenia morskiego, które zostały określone jako rozmnażające się bezpłciowo, izolowane z różnorodnych substratów i dominujące w siedliskach przybrzeżnych. Najbardziej dokładną definicję podali PANG i in. (2016), którzy

stwierdzili, że każdy grzyb, który był wielokrotnie izolowany z siedlisk morskich, potrafiący rosnąć i/lub zarodnikować, wykazujący aktywność metaboliczną w środowisku słonym, tworzący związki symbiotyczne z innymi organizmami morskimi albo taki, który przystosował się i ewoluował na poziomie genetycznym, powinien być określany jako morski. Obserwowany w ciągu ostatniej dekady wzrost liczebności grzybów morskich jest spowodowany włączeniem do definicji drożdży, grzybów zoosporowych i grzybów pochodzenia morskiego (JONES i in. 2015; PANG i in. 2016), a także coraz większym zainteresowaniem środowiskiem morskim.

Każdy ekosystem wodny jest zasiedlany przez grzyby z różnych grup ekologicznych i jednostek taksonomicznych. Zgodnie z danymi dostępnymi na stronie internetowej www.marinefungi.org (ostatnia aktualizacja strony: 15.07.2022r.), poświęconej grzybom morskim, w środowiskach słonych występuje 1857 gatunków należących do 769 rodzajów, 88 rzędów, 226 rodzin, 22 klas i 7 typów, a nowe taksony są wciąż opisywane. Lista ta zawiera wyłącznie w pełni zidentyfikowane gatunki grzybów. Udokumentowanie niespełna 1900 gatunków w ciągu prawie 130 lat badań prowadzonych w ekosystemach morskich sugeruje, że jest to wciąż niedostatecznie poznana grupa, w porównaniu z innymi mikroorganizmami (MAGWAZA i in. 2017; RAGHUKUMAR 2017). JONES (2011) oszacował, że liczba grzybów morskich może wynosić od 10 000 do 12 500 gatunków.

Grzyby morskie są zbiorowiskiem ekologicznym obejmującym wszystkie klasy workowców (najliczniejsza grupa), podstawczaków i skoczkowców (RAGHUKUMAR 2017; JONES i in. 2019). JONES i in. (2015) podzielili gromadę *Ascomycota* na sześć klas grzybów morskich (*Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Leotiomycetes, Orbiliomycetes* i *Sordariomycetes*) do których włączono 943 gatunki, *Basidiomycota* na trzy klasy (*Agaricomycetes, Exobasidiomycetes* i *Ustilaginomycetes*) z całkowitą liczbą 96 gatunków, zaś do *Chytridiomycota* zaliczono 27 gatunków z 13 rodzajów. W przypadku drożdży morskich wymienili 213 gatunków należących do 61 rodzajów, w tym z gromady *Ascomycota* 138 gatunków z 35 rodzajów i 75 gatunków z *Basidiomycota* należących do 26 rodzajów.

Zróżnicowanie gatunkowe drożdży zależy od stopnia czystości wody, głębokości oraz rodzaju zbiornika wodnego. Największą liczebność notuje się w zbiornikach zeutrofizowanych, zanieczyszczonych i poddanych silnej antropopresji, ze

względu na ich zdolność tolerancji na duże ilości związków organicznych i nieorganicznych. Niektóre gatunki są wyłącznie związane z silnie zdegradowanymi ekosystemami, na przykład z rodzaju *Candida, Cryptococcus, Rhodotorula* czy *Trichosporon* (DYNOWSKA 1995; BIEDUNKIEWICZ 2007; KULESZA i in. 2018). Powszechność występowania różnorodnych mikrogrzybów, zdolność metabolizowania przez nie wielu substancji i łatwość do wychwytywania źródeł energii oraz pierwiastków biogennych, nieodstępnych dla innych organizmów sprawia, że drożdże powinny być uwzględniane w badaniach dotyczących funkcjonowania środowisk wodnych i aktywności heterotroficznej. Szczególną uwagę należałoby zwrócić na występowanie drożdży w wodach zmienionych antropogenicznie. Mikroorganizmy te powinny być wykorzystywane w monitoringu wód (BIEDUNKIEWICZ i OZIMEK 2009; BIEDUNKIEWICZ i SCHULZ 2012; KULESZA i in. 2018).

Drożdże stanowią stały komponent większości mykocenoz wód śródlądowych (DYNOWSKA 1995, 1997; BIEDUNKIEWICZ i in. 2007, 2013; BIEDUNKIEWICZ i GÓRALSKA 2016; MUSZYŃSKA i in. 2017; KULESZA i in. 2018) oraz morskich (BOGUSŁAWSKA-WĄS i DĄBROWSKI 2001; BOGUSŁAWSKA-WĄS 2010; HASSETT i in. 2020). Doniesienia literaturowe dotyczące drożdży występujących w morzach są stosunkowo nieliczne, co świadczy o słabym poznaniu tej grupy mikroorganizmów (KUTTY i PHILIP 2008). Rozległe obszary Morza Bałtyckiego wydają się więc być zaniedbane pod względem badań mykologicznych i nadal oczekują na eksplorację (TIBELL i in. 2020).

1.4. Ogólna charakterystyka wód Morza Bałtyckiego

Morze Bałtyckie zajmujące powierzchnię około 360 tys. km^2, jest jednym z największych akwenów wód słonawych na świecie, o stosunkowo krótkiej i zmieniającej się historii (OJAVEER i KALEJS 2005). W ciągu ostatnich 15 tys. lat przekształciło się ono z morza słonego, dobrze skomunikowanego z Oceanem Atlantyckim, w słodkowodne jezioro zasilane z topniejących lodowców, a ostatecznie w morze słonawe z dużymi amplitudami zasolenia w zależności od położenia geograficznego (ZILLÉN i in. 2008), wahającymi się od 2-3‰ na północy, do ponad 10‰ na południowym zachodzie (BERNREUTHER 2007). Bałtyk stanowi unikalny ekosystem, ponieważ jest zbiornikiem płytkim, półzamkniętym i śródlądowym (RYDEN 2003; BERGSTRÖM i in. 2021), którego roczna amplituda temperatur jest wyższa niż w Oceanie Atlantyckim (SNOEIJS-LEIJONMALM i in. 2017). Szacuje się, że wymiana wody w Morzu

Bałtyckim trwa 25-40 lat. Bardziej słona i natleniona woda z Morza Północnego dopływa do niego przez Bełty i Cieśninę Sund. Od początku lat 80-tych obserwuje się jednak coraz rzadsze dopływy wody do Bałtyku, co w konsekwencji obniżyło jego poziom zasolenia i natlenienia głębokich basenów (SCHMIDT i in. 2003). Dość powolny przepływ wody sprzyja zaleganiu zanieczyszczeń (PERSSON 2010a), przez co Morze Bałtyckie jest uznawane za jedno z najbardziej zanieczyszczonych mórz na świecie. Bałtyk jest otoczony przez 9 uprzemysłowionych państw: Dania, Estonia, Finlandia, Litwa, Łotwa, Niemcy, Polska, Rosja i Szwecja (Ryc. 1). Dopływa do niego około 250 rzek, z czego największe to Wisła, Odra, Newa, Niemen, Dźwina, Kemijoki i Gota. Położenie geograficzne Morza Bałtyckiego sprawia, iż ponad 80% zanieczyszczeń trafiających do jego wód pochodzi z lądu, natomiast niewielka część dotyczy źródeł morskich, tj. rybołówstwa, żeglugi i innych działalności morskich (DOBRZYCKA-KRAHEL i BOGALECKA 2022). Rzeki dostarczają około 80% całkowitego dopływu fosforu i 90% azotu do wód Bałtyku (BERGSTRÖM i in. 2021). W związku z tym, że większość tych rzek jest zlokalizowanych na południu Morza Bałtyckiego, stężenie związków biogennych w tej części jest największe (DOBRZYCKA-KRAHEL i BOGALECKA 2022). Wzrost biogenów spowodował eutrofizację, a w następstwie spadek stężenia tlenu w strefie wód przybrzeżnych oraz otwartych głębinach (RHEINHEIMER 1998). Głównymi źródłami zanieczyszczeń antropogenicznych w spływach rzecznych i lądowych są odpady komunalne, przemysłowe i rolnicze. Pomimo dążeń do zmniejszenia stężenia substancji niebezpiecznych w Morzu Bałtyckim, ich ładunek nadal jest znaczny, co jest związane z trwałością i długim okresem degradacji tych związków (SONESTEN i in. 2021).

Procesy naturalne i czynniki antropogeniczne wpływają na dynamikę akwenu Bałtyku, stanowiąc wyzwanie dla zwierząt w nim żyjących, szczególnie dla gatunków rodzimych. W wyniku zanieczyszczeń, eutrofizacji czy niedoboru tlenu (BONSDORFF 2006), mogą one lokalnie zanikać, zaś skutki ocieplenia klimatu są przyczyną ich stresu fizjologicznego (OCCHIPINTI-AMBROGI 2007). Zanieczyszczenie wód oraz zmiana klimatu, szczególnie rosnące temperatury, sprzyjają z kolei wzrostowi liczebności gatunków obcych, szczególnie tych pochodzących z ciepłych regionów świata (DOBRZYCKA-KRAHEL i MEDINA-VILLAR 2020; DOBRZYCKA-KRAHEL i in. 2022). Bałtyk jest środowiskiem życia ubogiej społeczności ryb (MACKENZIE i in. 2007), z czego śledź, dorsz i szprot to najważniejsze gatunki, które przystosowały się do specyficznych warunków w nim panujących (OJAVER i in. 2010). Globalna zmiana klimatu wpłynęła na

spadek zasolenia i zmniejszenie ilości morskiego zooplanktonu w ekosystemie Morza Bałtyckiego, co wpływa na pogorszenie warunków żywienia śledzia, dorsza i szprota. Niska liczebność preferowanej zdobyczy wraz ze wzrostem wewnątrz- i międzygatunkowej konkurencji o pokarm, może przyczyniać się do obniżenia stanu odżywienia, kondycji, tempa wzrostu, a w konsekwencji wielkości stada śledzia bałtyckiego (RAJASILTA i in. 2014).



Rycina 1. Mapa Morza Bałtyckiego (źródło: https://chronbaltyk.pl/o-baltyku/podstawowe-informacje/)

Figure 1. Map of the Baltic Sea (origin: https://chronbaltyk.pl/o-baltyku/podstawowe-informacje/)

Analizując uwarunkowania środowiskowe dla rozwoju bałtyckiej ichtiofauny przez pryzmat stanu zdrowotności poszczególnych gatunków priorytetem staje się określenie stopnia zasiedlenia ich mikroorganizmami o wysokim potencjale

patogeniczności. Do takich drożdże, zdolne do kolonizacji organizmów zdrowych, ale w przypadku spadku odporności gospodarza mogących wywoływać choroby.

1.5. Charakterystyka śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.)

Zdecydowaną większość społeczności ryb w Bałtyku, pod względem biomasy i liczebności stanowią dorsz – *Gadus morhua callarias* L., szprot – *Sprattus spratus* L. i śledź – *Clupea harengus* L. (DONELLY i in. 2021). Śledź bałtycki (*Clupea harengus membras* L.) jest ważnym i powszechnym surowcem dla rybołówstwa w Polsce. W 2021 roku morskie połowy krajowe wynosiły około 123,1 tys. ton (5,5% mniej niż rok wcześniej), z czego połowy śledzi sięgały 27 345 tys. ton (spadek o 27% w stosunku do ubiegłego roku). Głównym czynnikiem decydującym o wielkości osiąganych połowów są kwoty połowowe dostępne dla Polski, które w przypadku śledzia w 2021 r. wynosiły 28 564 tys. ton, a więc zostały wykorzystane w 96%. Spadek wielkości połowów wynikał z obniżenia całkowitych dopuszczalnych połowów (TAC- ang. *Total Allowable Catches*) śledzi stada centralnego Bałtyku, ze względu na pesymistyczne oceny kondycji tych ryb przez ICES (ang. *International Council for the Exploration of the Sea* – Międzynarodowa Rada Badań Morza). Stan śledzi stada zachodniego został oceniony zdecydowanie gorzej, jednak obniżenie TAC aż o 50%, nie wpłynęło znacząco na polskie rybołówstwo, ze względu na niewielką wysokość kwoty połowowej ryb z części zachodniej (HRYSZKO 2022). Spadek zasobów rybnych obserwowany na całym świecie spowodowany jest utratą siedlisk, przełowieniem, a także chorobami wywołanymi przez patogeny (GOZLAN i in. 2006). W Polsce konsumuje się głównie ryby morskie (80,2%). Ich spożycie w porównaniu z 2020 r. zwiększyło się o 8,3%. Jednym z najczęściej wybieranych przez Polaków gatunków ryb jest śledź, którego spożycie w 2021 r. zwiększyło się do 3% i wynosiło około 2,82 kg na mieszkańca rocznie (HRYSZKO 2022).

Śledź jest rybą kostnoszkieletową z rodziny śledziowatych (*Clupeidae*), szeroko rozpowszechnioną we wszystkich zlewniach Bałtyku. Jako ryba pelagiczna żyje w dużych ławicach w otwartej toni wodnej i migruje w celach tarłowych oraz żerowych (CZERNIEJEWSKI i CZERNIAWSKI 2016). Tempo wzrostu ryb jest uzależnione od różnych czynników zewnętrznych, z czego temperatura, zasolenie i dostępność tlenu oraz pokarmu są uważane za najważniejsze (RAJASILTA i in. 2011). Śledź jako ryba planktonożerna, stanowi ważne ogniwo w łańcuchu pokarmowym, będąc połączeniem

między poziomami troficznymi i przekazując energię z planktonu do wyższych poziomów (RAGHUKUMAR 2012). Śledź żywi się przede wszystkim zooplanktonem, głównie widłonogami z rzędu *Calanoida*: *Pseudocalanu*s spp., *Temora longicornis* i *Acartia* spp., skorupiakami i larwami ryb. ARRHENIUS i HANSSON (1993) stwierdzili, że szprot i śledź konsumują 60-80% rocznej produkcji zooplanktonu. Mimo, iż korzystniejsza energetycznie jest konsumpcja dorosłych osobników widłonogów, podczas której ryba uzyskuje taką samą ilość energii spędzając mniej czasu na żerowaniu, śledź żywi się zarówno stadiami starszymi, jak i młodszymi, w zależności od dostępności pokarmu (DALPADADO i in. 2000). Największą aktywność żerową wykazuje wiosną i latem, ze względu na okres rozrodu oraz dostępność widłonoga *Pseudocalanus* spp., który jest najbardziej pożądaną przez śledzia ofiarą (RENZ i HIRCHE 2006). Średnie i duże osobniki śledzia wybierają jako pokarm makroplankton i organizmy bentosowe, np. lasonogi, zaliczane do skorupiaków, ze względu na ich dostępność podczas chłodniejszych pór roku, tj. jesienią i zimą (MÖLLMAN i in. 2000). Dorosłe osobniki śledzia są ważnym składnikiem diety zwierząt znajdujących się wyżej w sieci pokarmowej, tj. ryb drapieżnych (np. dorsza), ptaków morskich (np. nurnika) i ssaków (np. fok; PERSSON 2010a). Oprócz tego są one żywicielami paratenicznymi dla nicieni *Anisaxis simplex* (PODOLSKA 2009), a lasonogi literalne (*Mysidacea*) żerują na ikrze śledzia (TORNIAINEN i LEHETINIEMI 2008).

Badania genetyczne oraz obserwacje zachowania podczas tarła wskazują na fakt, iż śledź wykazuje lokalną strukturę populacji w Bałtyku (JØRGENSEN i in. 2005). Sekwencjonowanie całego genomu śledzia atlantyckiego (*Clupea harengus* L.) wykazało istnienie około dziesięciu głównych grup, które są genetycznie przystosowane do zróżnicowanych warunków środowiska (HAN i in. 2020). Grupy te różnią się między sobą okresem tarła (wiosna lub jesień), stopniem tolerancji wobec temperatury otoczenia i zasolenia wody, niezbędnymi do odbycia tarła (ANDERSSON i in. 2023). Ryby żyjące w środkowej i północnej części Bałtyku, ze względu na różnice cech morfologicznych i biologicznych, określane są jako podgatunek *Clupea harengus membras*. W porównaniu ze śledziem atlantyckim są one zazwyczaj mniej tłuste, mają mniejsze rozmiary, większą głowę i mniej kręgów, a także charakteryzują się słabszą płodnością i krótszym okresem tarła, co jest wynikiem adaptacji do warunków środowiska i wpływem czynników stresogennych (PONGOLINI i NILSON 2014). Śledź występujący w Morzu Bałtyckim żyje w warunkach zasolenia odmiennych niż te panujące w sąsiadującym z nim Morzu

Północnym, a także Oceanie Atlantyckim. Zasolenie jest główną barierą izolacyjną pomiędzy śledziami bytującymi w obu morzach (JØRGENSEN i in. 2005). Mimo iż dorosłe śledzie są organizmami euryhalinowymi, mogącymi żyć nawet w jeziorach, to słona woda jest niezbędna do ich sukcesu reprodukcyjnego. W przypadku śledzia bałtyckiego poziom zasolenia niezbędny do rozmnażania wynosi od 2-3 do 8-9 PSU (ang. *Practical Salinity Unit*; jednostka zasolenia wody), w zależności od odległości tarliska od cieśnin duńskich, stanowiących jedyną drogę napływania wód z Oceanu Atlantyckiego (RAJASILTA i in. 2011).

Śledź osiąga dojrzałość płciową w wieku 2-3 lat, z wyjątkiem osobników żyjących na zachodnim wybrzeżu Szwecji, gdzie okres ten wynosi od 3 do 4 lat (BIGNERT i in. 2017). Większość populacji śledzia odbywa tarło wiosną, ale niektóre z nich także jesienią (PERSSON 2010b). Tarło śledzia bałtyckiego determinowane jest w głównej mierze temperaturą wody, w związku z czym jest uzależnione od czasu trwania zimy w danym roku (ARRHENIUS i HANSON 1996). ARULA i in. (2019) zaobserwowali, że ostrzejsze zimy powodowały opóźnienie tarła i wylęgu larw, a w konsekwencji prowadziły do niedopasowania czasowego z odpowiednim pokarmem i podwyższonej śmiertelności larw ryb. Zmiany klimatyczne wpływają na sukces reprodukcyjny śledzi, które do zainicjowania tarła potrzebują temperatury na poziomie 4°C (± 0,5°C). W związku z tym, zmiany klimatu stanowią zagrożenie dla różnorodności biologicznej i trwałości zasobów naturalnych (POLTE i in. 2021). Zły stan ryb podczas procesu dojrzewania może doprowadzić do znacznego obniżenia płodności, zmiany sezonu tarła, a w skrajnych przypadkach do jego pominięcia (BUCHOLTZ i in. 2013). Tarło śledzia odbywa się w obszarach przybrzeżnych, gdzie panuje zwiększona dostępność pokarmu i wyższe stężenie tlenu, w celu stworzenia korzystnych warunków do wylęgu i rozwoju larw (ARULA i in. 2016). Po okresie tarła późną wiosną i wczesnym latem dorosłe osobniki wędrują do głębszych wód, aby znaleźć pokarm i poprawić kondycję przed nadchodzącą zimą (ARULA i in. 2019).

Komentarz do Narodowego Szwedzkiego Programu Monitorowania Zanieczyszczeń Bioty Morskiej wskazuje na zmniejszenie wielkości stada śledzia, pogorszenie stanu ryb, obniżenie zawartości tłuszczu w ich ciele, a także tendencję spadkową średniej masy ciała śledzia w Morzu Bałtyckim (BIGNERT i in. 2017). Jako przyczynę obniżenia kondycji śledzia podaje się zmiany hydrograficzne Bałtyku związane z klimatem, m.in. zmniejszenie zasolenia wody (RÖNKKÖNEN i in. 2004),

zwiększone opady atmosferyczne oraz wyższe średnie temperatury (DONELLY i in. 2021), a także drapieżnictwo dorsza w stosunku do śledzia i konkurencja pokarmowa z coraz liczniejszą populacją szprota (CASINI i in. 2004).

1.6. Układ immunologiczny ryb

Ryby żyjące w środowisku wodnym są regularnie narażone na kolonizację bakteriami, wirusami i mikrogrzybami, o różnym statusie troficznym, dla których woda jest jednym z naturalnych rezerwuarów. W związku z tym, że większość drobnoustrojów jest zdolnych do trawienia i degradacji tkanek oraz wywoływania chorób u gospodarza, o tym czy kolonizacja zmieni się w nosicielstwo czy też dojdzie do infekcji, decyduje odporność danego osobnika (ELLIS 2001).

Układ odpornościowy ryb i kręgowców wyższych pod względem fizjologicznym jest do siebie zbliżony. Układ wrodzony (nieswoisty) jest u ryb podstawowym mechanizmem obronnym, ponieważ są one organizmami wolnożyjącymi od wczesnych stadiów embrionalnych (MOKHTAR i in. 2023). Na mechanizmy wrodzone składają się bariery fizyczne oraz komórkowa i humoralna odpowiedź immunologiczna (RIERA ROMO i in. 2016). Zapobiegają one adherencji, inwazji i namnażaniu drobnoustrojów na lub w tkance makroorganizmu. Zaletami odporności wrodzonej jest niespecyficzność względem mikroorganizmów wnikających do wnętrza gospodarza, szybkość reakcji i względna niezależność od temperatury. Szczególnie częściowe uniezależnienie odpowiedzi immunologicznej od temperatury środowiska jest niezwykle istotne dla organizmów zmiennocieplnych. Mechanizmy odporności wrodzonej są więc pierwszą linią obrony i zapewniają odpowiednią ochronę przed chorobami w przypadku zdrowych populacji ryb, poddawanych jedynie niewielkiej presji infekcyjnej ze strony patogenów występujących w środowisku (ELLIS 2001). Na skuteczność odporności wrodzonej wpływają różne czynniki wewnętrzne i zewnętrzne. Zmiany temperatury otoczenia, występowanie patogenów w środowisku życia oraz czynniki stresogenne oddziałują negatywnie, natomiast niektóre dodatki do żywności i środki immunostymulujące mogą działać korzystnie na ten typ odpowiedzi immunologicznej u ryb (URIBE i in. 2011). Istotnym elementem wrodzonego mechanizmu odpornościowego u ryb jest śluz skórny, który stanowi pierwszą fizyczną i chemiczną obronę przed mikroorganizmami patogenicznymi (SUBRAMANIAN i in. 2007). Ciągle produkowany śluz pokrywający skórę i skrzela, zapobiega wnikaniu patogenów do

wnętrza organizmu, a także zawiera czynniki przeciwdrobnoustrojowe, takie jak lizozym czy lektyny (DASH i in. 2018). Odporność niespecyficzna odgrywa także kluczową rolę w nabytej odporności immunologicznej oraz utrzymaniu homeostazy organizmu ryby poprzez system białek receptorowych, rozpoznających cząsteczki typowe dla mikroorganizmów chorobotwórczych i nie występujące na powierzchni organizmów wielokomórkowych. W przypadku utrzymywania się patogenu w organizmie przez dłuższy czas, ochronę zapewnia nabyty układ odpornościowy, który jest wysoce specyficzny dla danego antygenu i ma zdolność do zapewnienia długotrwałej odporności (ALBERTS i in. 2002). Mimo mechanizmów obronnych ryb, wiele patogenów posiada zdolność do ich unikania, a po naruszeniu obrony pierwotnej, są w stanie namnażać się i być przyczyną chorób (ELLIS 2001).

Choroby grzybicze są wynikiem interakcji ryb, patogenu i środowiska. Złe warunki życia, niewłaściwe zarządzanie gospodarką wodną oraz znajdowanie się w środowisku chorych i martwych ryb, stanowiących źródło rozkładającego się materiału organicznego, są głównymi stresorami wpływającymi negatywnie na kondycję i zdrowie ryb (RAMAIAH 2006). Choroby wywołane przez patogeny grzybowe są postrzegane u ryb, podobnie jak u innych zwierząt i człowieka, jako zjawisko wtórne. Ze względu na zjadliwość grzybów i coraz częstsze pojawianie się ich w akwakulturach oraz populacjach dzikich ryb żyjących w środowiskach naturalnych, stanowią one ogromne ryzyko dla populacji ryb i powinny być stale monitorowane (GOZLAN i in. 2014).

2. Cel badań i hipotezy badawcze

Przystępując do badań sformułowano następujące hipotezy badawcze (I-II) oraz określono cel pracy:

I. Ontocenozy zdrowych osobników śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.) są zasiedlane przez szerokie spektrum taksonomiczne drożdży z różną częstotliwością.
II. Cechy fizjologiczne i biochemiczne drożdży izolowanych ze śledzi przekładają się na potencjał patogeniczny w stosunku do ryb oraz innych zwierząt i człowieka.

Celem badań była ocena różnorodności gatunkowej drożdży kolonizujących różne ontocenozy zdrowych osobników śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.), poławianego do celów konsumpcyjnych, z uwypukleniem metod identyfikacji i właściwości biochemicznych wyizolowanych mikrogrzybów.

Do realizacji celu badań przyjęto następujące zadania badawcze:

1. Określenie zróżnicowania taksonomicznego drożdży w badanych ontocenozach – identyfikacja grzybów metodami klasycznymi i molekularnymi.
2. Wyselekcjonowanie izolatów należących do konkretnych gatunków, wykorzystanych następnie do testów komercyjnych.
3. Ocena skuteczności identyfikacji wybranych izolatów drożdży na podstawie zdolności do asymilacji węglowodanów z wykorzystaniem testów API 20C AUX.
4. Ocena aktywności enzymatycznej wybranych izolatów z wykorzystaniem testów API ZYM.
5. Ocena lekowrażliwości wybranych izolatów przy użyciu testów ATB FUNGUS 3.
6. Ocena zdolności drożdży do wzrostu w temperaturze 37°C.

3. Materiał i metody

3.1. Badania rekonesansowe

Badania wstępne miały charakter przesiewowy. Przeprowadzone zostały w okresie od listopada do grudnia 2016 roku oraz od września do października 2017 roku. Ryby poławiano na obszarze Morza Północnego oraz Morza Bałtyckiego. Występowanie drożdży sprawdzano u 10 gatunków ryb, tj. śledzia bałtyckiego (*Clupea harengus membras* L.), storni (*Platichthys flesus* L.), szczupaka pospolitego (*Esox lucius* L.), dorsza bałtyckiego (*Gadus morhua callarias* L.), sandacza pospolitego (*Sander lucioperca* L.), belony pospolitej (*Belone belone* L.), okonia pospolitego (*Perca fluviatilis* L.), siei pospolitej (*Coregonus lavaretus* L.), troci wędrownej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) i płoci (*Rutilus rutilus* L.). Podczas trwania badań przesiewowych sprawdzano obecność drożdży w pysku, skrzelach, wątrobie i jelitach ryb. Badania te wyłoniły rybę charakteryzującą się największą różnorodnością mikrogrzybów. Był to śledź bałtycki (*Clupea harengus membras* L.), wybrany do dalszych analiz mykologicznych, także ze względu na jego znaczenie gospodarcze i ekonomiczne.

3.2. Badania kontynuowane

Dalszym badaniom poddano 182 osobniki śledzia bałtyckiego przeznaczonego do celów konsumpcyjnych, poławianego w wodach przybrzeżnych południowego Morza Bałtyckiego (Zatoka Pomorska) w grudniu 2016 i 2019 roku oraz w okresie od kwietnia do maja 2018 roku (Tab. 1). Śledzie były przetransportowane do laboratorium w warunkach chłodniczych. Materiał biologiczny pobierano jałową, bawełnianą wymazówką z pyska oraz powierzchni skrzeli, wątroby i jelit – świeżych, niepatroszonych ryb.

Badania prowadzono w laboratorium mykologicznym Katedry Mikrobiologii i Mykologii, Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie oraz laboratorium molekularnym Zespołu Interakcji Roślina-Patogen, Zakładu Genetyki Patogenów i Odporności Roślin w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Tabela 1. Ontocenozy śledzi bałtyckich analizowane w badaniach rekonesansowych i kontynuowanych (+ – miejsce pobierania wymazów)

Table 1. Ontocenoses of Baltic herrings analysed in reconnaissance and follow-up studies (+ – sampling site)

data poboru	**liczba osobników**	**ontocenoza**			
		pysk	**skrzela**	**wątroba**	**jelita**
badania rekonesansowe					
05.12.2016	3	+	+	–	+
06.12.2016	3	+	+	–	+
08.12.2016	1	+	+	–	+
16.12.2016	3	+	+	+	–
badania kontynuowane					
23.04.2018	22	+	+	+	+
07.05.2018	50	+	+	+	+
09.12.2019	100	+	+	+	+
razem	**182**	**182**	**182**	**175**	**179**

3.3. Hodowla grzybów

Wymazówki wraz z materiałem biologicznym, umieszczano w podłożu płynnym Sabourauda, aby umożliwić namnożenie się drożdży wolniej rosnących i inkubowano w temperaturze 25°C przez 72 godziny.

Następnie, metodą „drop plate", przy użyciu pipety automatycznej, przenoszono 200µl płynnej hodowli grzybów na stałe podłoże Sabourauda z antybiotykiem (gentamycyna 0,05%) i inkubowano w temperaturze 25°C przez 24-72 godziny. Podczas trzydniowej obserwacji określano cechy makroskopowe kolonii drożdży, takie jak: barwa, kształt, struktura powierzchni i brzegu, wyniosłość ponad powierzchnię agaru czy konsystencja.

W celu odróżnienia komórek drożdży od komórek bakteryjnych, z wyrosłych kolonii wykonywano przyżyciowe preparaty mikroskopowe w kropli wody z dodatkiem 2% błękitu metylenowego. Kolonie drożdży pasażowano na skosy Sabourauda z dodatkiem antybiotyku (gentamycyna 0,05%) i inkubowano w temperaturze 25°C przez

72 godziny. Po okresie inkubacji skosy przechowywano w temperaturze 4°C do dalszych analiz, kontrolując co miesiąc ich jakość oraz żywotność komórek drożdży. W celu dodatkowego zabezpieczenia hodowli, kolonie przenoszono wyżarzoną ezą do pustych, jałowych probówek typu Eppendorf i zamrażano w temperaturze -20°C.

W celu wyłonienia potencjalnych antropopatogenów, dodatkowo sprawdzono zdolność wzrostu uzyskanych izolatów w temperaturze 37°C, prowadząc hodowlę na agarze Sabourauda z antybiotykiem (gentamycyna 0,05%) przez 72 godziny.

Bulion Sabourauda (KURNATOWSKA i KHALID 2018):

- glukoza 40g
- pepton 10g
- chlorek sodu NaCl 5g
- woda destylowana 1000ml

pH 7,2

Podłoże agarowe Sabourauda (KURNATOWSKA i KHALID 2018):

- glukoza 40g
- pepton 10g
- agar 18g
- gentamycyna 0,5g
- woda destylowana 1000ml

pH 5,6-5,8

Skosy Sabourauda z antybiotykiem (KULESZA i in. 2021):

– glukoza 40g
– pepton 10g
– agar 22g
– gentamycyna 0,5g
– woda destylowana 1000ml

3.4. Identyfikacja gatunkowa drożdży

Identyfikacji gatunkowej dokonywano przy użyciu metod klasycznych, zgodnie ze standardową procedurą zalecaną w laboratoriach mykologicznych, uwzględniając

cechy makroskopowe na podłożu Sabourauda z gentamycyną (0,05%), mikromorfologiczne na agarze Nickersona i biochemiczne (zymogramy i auksanogramy), używając specjalistycznych kluczy do identyfikacji grzybów (KURTZMAN i FELL 1998; KURTZMAN i in. 2011; DE HOOG i in. 2000, 2020). Drożdże identyfikowano także metodami molekularnymi: izolaty uzyskane w okresie od grudnia 2016 roku do maja 2018 roku na podstawie sekwencji regionu ITS (ang. *Internal Transcribed Spacer*) rDNA oraz domeny D1/D2 dużej podjednostki rybosomu, natomiast izolaty pozyskane w grudniu 2019 roku wyłącznie na podstawie sekwencji regionu ITS. Analiza sekwencji nukleotydowych stanowiła także złoty standard służący do oceny skuteczności identyfikacji na podstawie zdolności asymilacji węglowodanów przy użyciu testów API 20C AUX firmy bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francja).

Uzyskane gatunki drożdży, na podstawie danych literaturowych (DE HOOG i in., 2000, 2020) zaklasyfikowano do jednej z czterech grup poziomu biobezpieczeństwa (BSL – ang. *BioSafety Level*). Kategorie zdefiniowano w następujący sposób:

GRAS – (ang. *Generally Regardes As Safe* – ogólnie uważane za bezpieczne) – grzyby należące do tej grupy uznawane są za nieszkodliwe mikroorganizmy, często stosowane przy produkcji żywności.

BSL-1 – saprotrofy lub patogeny roślinne, zajmujące nisze ekologiczne bezkręgowców oraz komensale. Infekcje wywołane przez grzyby z tej grupy są przypadkowe, powierzchowne i nieinwazyjne lub łagodne.

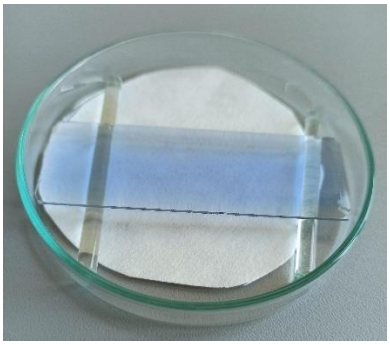
BSL-2 – grzyby głównie bytujące w niszach ekologicznych bezkręgowców, ze stosunkowo dobrą zdolnością do utrzymania się w tkance kręgowców. Mogą powodować głębokie, oportunistyczne grzybice u pacjentów z obniżoną odpornością. Do tej grupy zaliczane są także patogeny wywołujące infekcje powierzchowne.

BSL-3 – grzyby potencjalnie zdolne do wywołania ciężkich, głębokich grzybic u zdrowych osób.

3.4.1. Obserwacja cech mikroskopowych

Z uzyskanych izolatów wykonano mikrohodowle na szkiełkach podstawowych pokrytych cienką warstwą agaru Nickersona. Podłoże zaszczepiano drożdżami przechowywanymi na skosach Sabourauda. Hodowlę wzbogacano kilkoma kroplami surowicy króliczej z bulionem bakteriologicznym, zmieszanych w stosunku 1:1

i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Po umieszczeniu mikrohodowli w komorze wilgotnej (Ryc. 2), całość inkubowano w temperaturze 25°C przez 72 godziny. W mikroskopie świetlnym Olympus BX51 oceniano morfologię: wielkość i kształt komórek wegetatywnych, wytwarzanie i umiejscowienie blastospor, chlamydospor, pseudostrzępek oraz strzępek prawdziwych.



Rycina 2. Komora wilgotna do mikrohodowli na agarze Nickersona
Figure 2. Wet chamber for microculture on Nickerson agar

Podłoże Nickersona (EJDYS i in. 2011):

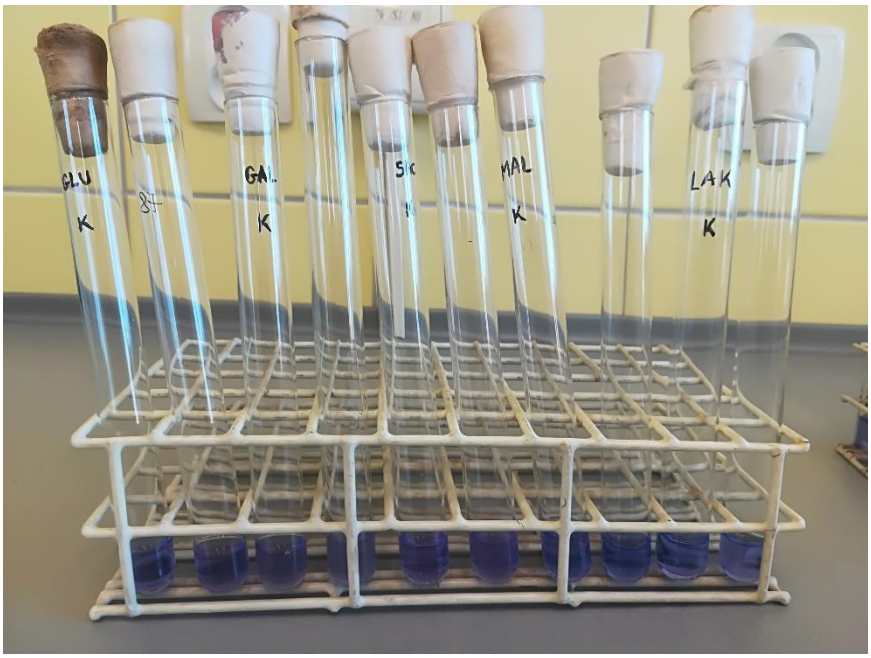
- glukoza 20g
- wodorofosforan (V) dipotasu K_2HPO_4 4g
- diwodorofosforan (V) potasu KH_2PO_4 2g
- azotan (V) amonu NH_4NO_3 1g
- ekstrakt drożdżowy 1g
- chlorek sodu 1g
- biotyna 2,5g
- agar 15g
- błękit trypanowy 0,1g
- woda destylowana 1000ml

3.4.2. Badania biochemiczne

3.4.2.1. Ocena zdolności fermentacji cukrów (zymogramy)

W celu określenia zdolności wyizolowanych drożdży do fermentacji pięciu węglowodanów (glukoza, galaktoza, sacharoza, maltoza, laktoza) wykonano zymogramy (Ryc. 3). Przygotowano zawiesinę drożdży w 2ml jałowej wody, o zmętnieniu odpowiadającym 3 w skali McFarlanda. Stopień zmętnienia ustalano przy użyciu

densytometru Grant DEN-1. Następnie pipetą automatyczną przenoszono po 60µl sporządzonej zawiesiny do probówek z podłożem do zymogramu. Wynik odczytywano po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C. Fioletowe zabarwienie wskazywało na brak zdolności fermentacji cukru przez badany izolat. Zmiana zabarwienia pożywki na żółtą oznaczała zmianę pH podłoża, wynikającą z przeprowadzenia procesu fermentacji cukru przez drożdże.



Rycina 3. Probówki z podłożem do zymogramu

Figure 3. Tubes with zymogram medium

Podłoże do zymogramu (modyfikacja własna):

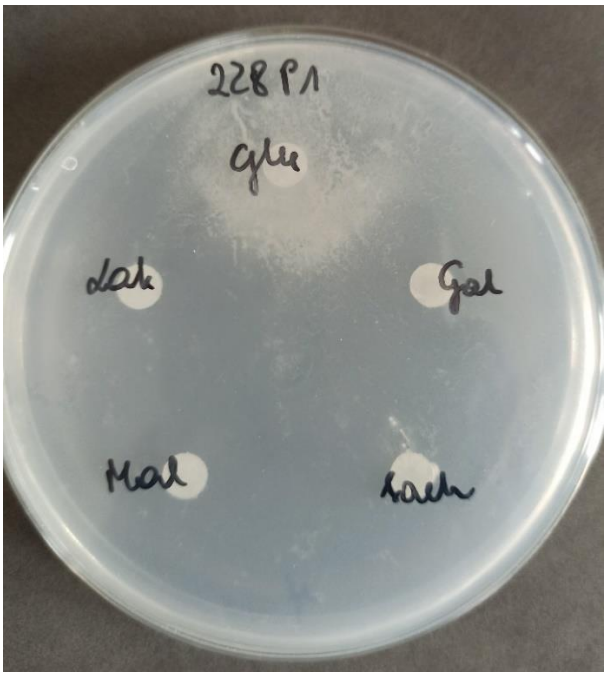
- cukier (glukoza, galaktoza, sacharoza, maltoza, laktoza) 2g
- pepton kazeinowy 0,5g
- woda destylowana 100ml
- 0,1% błękit bromowo-tymolowy w 95% alkoholu etylowym kilka kropli
- 0,1% purpura bromokrezolowa w 50% alkoholu etylowym kilka kropli
- wodorotlenek sodu NaOH do uzyskania fioletowego zabarwienia

pH 7,72

3.4.2.2. Ocena zdolności asymilacji cukrów (auksanogramy)

W celu sprawdzenia zdolności drożdży do asymilacji węgla z 5 cukrów (glukoza, galaktoza, sacharoza, maltoza, laktoza) wykonano auksanogram

węglowodanowy, sporządzając zawiesinę drożdży w płynnym ubogim podłożu, pozbawionym cukrów (źródło węgla), o zmętnieniu odpowiadającym 3 w skali McFarlanda. Inkubację prowadzono przez 7 dni w temperaturze 25°C. Następnie 500µl zawiesiny przenoszono na stałe podłoże auksanograficzne i rozprowadzano za pomocą jałowej głaszczki po powierzchni agaru. Po 30 minutach wykładano krążki bibułowe nasączone 10% roztworami cukrów i inkubowano w temperaturze 25°C przez 48 godzin. Zdolność do asymilacji węglowodanów określano na podstawie pojawienia się zmętniałego, ciemniejszego pola wokół krążków, wskutek nagromadzenia się komórek drożdży (Ryc. 4).



Rycina 4. Podłoże auksanograficzne z krążkami nasączonymi badanymi cukrami (widoczne ciemniejsze pole przy krążku z glukozą)
Figure 4. Auxanographic medium with discs soaked in the tested sugars (visible darker field next to the glucose disc)

Płynne podłoże ubogie (EJDYS i in. 2011):

- pepton 10g
- chlorek sodu NaCl 5g
- woda destylowana 1000ml

pH 7

Stałe podłoże auksanograficzne (EJDYS i in. 2011):

- diwodorofoforan (V) potasu KH_2PO_4 1g
- siarczan (VI) magnezu $MgSO_4$ 0,5g
- agar 16g
- woda destylowana 1000ml
  pH 6,5

3.4.3. Badania molekularne

3.4.3.1 Izolacja DNA

Do izolacji genomowego DNA badanych izolatów drożdży użyto zestawu GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx, Gdańsk, Polska), zgodnie z zaleceniami producenta. Do minikolumny dodano 30µl buforu aktywacyjnego Buffer P i pozostawiono w temperaturze pokojowej. Drożdże z 48-godzinnej hodowli na agarze Sabourauda z gentamycyną (0,05%) przenoszono do probówki typu Eppendorf o objętości 2ml, a następnie homogenizowano w ciekłym azocie przy użyciu patyczka z końcówką o specjalnie dopasowanym kształcie i dodawano 400µl buforu Lyse F. Do zawiesiny przenoszono po 3µl RNase i 10µl Proteinase L. Wszystkie próby zworteksowano i inkubowano w temperaturze 65°C przez 30 minut. Następnie dodawano 130µl buforu AC, dokładnie wymieszano i inkubowano w lodzie przez 5 minut. Próby odwirowano z prędkością 15 000 x g przy użyciu wirówki laboratoryjnej Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg, Niemcy). Delikatnie przenoszono 400µl supernatantu znad osadu do nowej probówki, dodawano 350µl buforu Sol P i 250 µl 96% etanolu, mieszano i wirowano z prędkością 14 000 x g przez minutę. Do uprzednio przygotowanej minikolumny, znajdującej się w probówce odbierającej, przenoszono supernatant i wirowano z prędkością 14 000 x g przez 1 minutę. Po usunięciu przesączu z probówki odbierającej, dodawano 500µl buforu płuczącego Wash PX i wirowano z prędkością 14 000 x g przez minutę, powtarzając czynność dwukrotnie. Po umieszczeniu minikolumny w nowej probówce typu Eppendorf, dodawano 150µl buforu Elution i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 2 minuty a następnie wirowano z prędkością 14 000 x g przez minutę. Koncentrację genomowego DNA dla każdej próbki mierzono przy użyciu spektrofotometru widzialnego NanoDrop 1000 UV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Ekstrakty DNA przechowywano w temperaturze -20˚C.

3.4.3.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), elektroforeza i sekwencjonowanie

Amplifikację fragmentu D1/D2 dużej podjednostki rybosomu regionu kodującego 26S rDNA wykonano przy użyciu starterów NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') i NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'), zaś amplifikację wewnętrznej sekwencji transkrybowanej (ang. *Internal Trancribed Spacer* - ITS) z użyciem starterów ITS4, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' oraz ITS5, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3', zgodnie z metodyką podaną przez KOZŁOWSKĄ i in. (2018). Amplifikację DNA przeprowadzono w 50 µl mieszaniny reakcyjnej, zawierającej: 1,3µl (1 unit/µl) polimerazy Color Taq DNA (EURx, Gdańsk, Polska), 5 µl 10x buforu reakcyjnego Pol B (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1mM, 1 mM ditiotreitolu, 15 mM $MgCl_2$), 2 µl mieszaniny deoksynukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) o stężeniu 0,2 mM każdego dNTP, po 0,1 µl każdego primera o stężeniu 0,5 µM i około 20 ng DNA drożdży oraz 41,5 µl wody do PCR.

Reakcję łańcuchowej polimerazy w termocyklerze (Bio-Rad, seria C-1000) poprzedziła inkubacja probówek w temperaturze 95°C przez 5 minut. Reakcja składała się z 35 cykli, a każdy a nich z trzech etapów: denaturacji (temperatura 95°C przez 1 minutę), hybrydyzacji (temperatura 56°C przez 1 minutę) i elongacji (temperatura 72°C przez 1 minutę). Reakcję łańcuchowej polimerazy zakończono inkubacją probówek w temperaturze 72°C przez 7 minut.

Jakość DNA oraz efektywność reakcji PCR sprawdzano przeprowadzając rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym (EURx, Gdańsk, Polska) z dodatkiem barwnika służącego do barwienia kwasów nukleinowych SimplySafe (0,5 µg/ml; EURx, Gdańsk, Polska). Produkty amplifikacji DNA zwizualizowano w świetle UV, przy użyciu zestawu do archiwizacji żelów.

Uzyskane amplikony oczyszczono przy użyciu egzonukleazy I (ThermoScientific) oraz fosfatazy alkalicznej FastAP (ThermoScientific) w programie: 37°C przez 30 minut i 80°C przez 15 minut. Fragmenty DNA znakowano poszczególnymi starterami oraz kitem BigDyeTerminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie strącono 96% etanolem z dodatkiem octanu sodu (80µl octanu sodu w 1 ml etanolu). Amplikony PCR

zsekwencjonowano w aparacie Applied Biosystems 3130 w Laboratorium Technik Biologii Molekularnych Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Uzyskane sekwencje analizowano za pomocą algorytmu BLASTn i porównywano z sekwencjami referencyjnymi z bazy danych GenBank, określając ich najbliższe pokrewieństwa filogenetyczne oraz zachowując takie same parametry przeszukiwania baz dla wszystkich badanych izolatów.

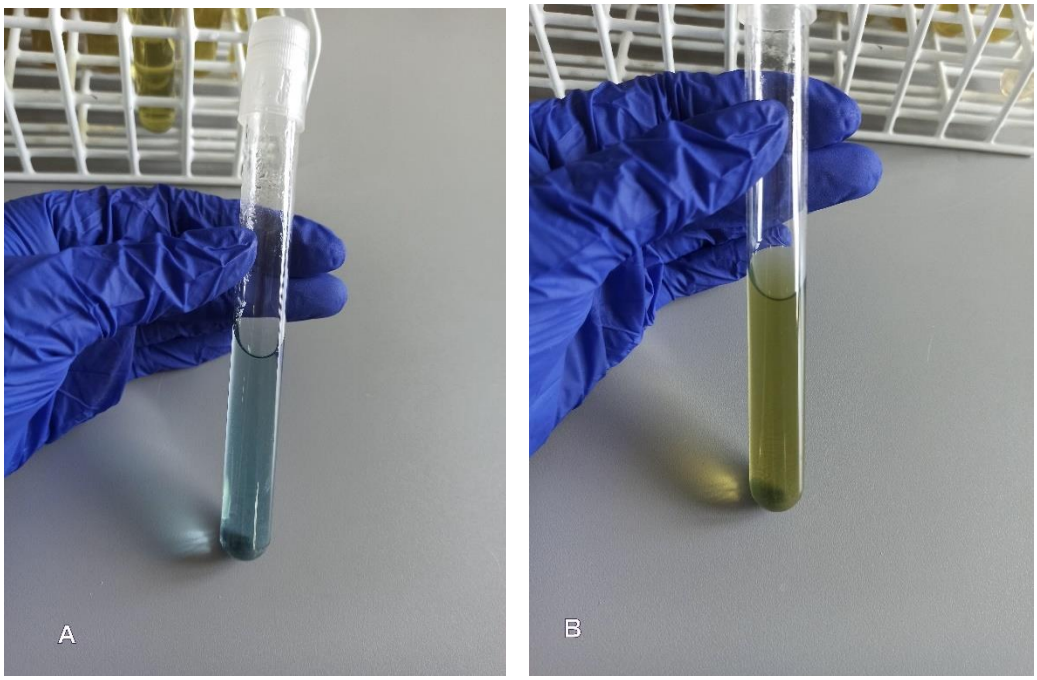
3.4.3.3. Rekonstrukcja filogenezy

W celu dopasowania sekwencji użyto ClustalW (THOMPSON i in. 2002) w programie BioEdit 7.2 Sequence Alignment Editor. Wszystkie pozycje zawierające luki zostały uzupełnione i zrekonstruowane filogenetycznie przy użyciu programu MEGA11 (podejście z maksymalną oszczędnością, włączone heurystyki wymiany najbliższego sąsiada z ustawieniami domyślnymi, 1000 iteracji ładowania początkowego; KUMAR i in. 2016).

3.4.4. Badania uzupełniające dla gatunków z rodzaju *Apiotrichum*

Ze względu na niejednoznaczną identyfikację na podstawie metod klasycznych i molekularnych, przeprowadzono dodatkowe badania biochemiczne dla gatunków *Apiotrichum domesticum* i *A. montevideense*. Gatunki różnią się między sobą metabolizmem glukonianu. *A. montevideense* utylizuje glukonian, zaś *A. domesticum* nie wykazuje tej zdolności (KURTZMAN i in. 2011).

W 10ml płynnego podłoża YNB (ang. *Yeast Nitrogen Base*) z dodatkiem 20% glukonianu sodu zawieszano po pół oczka ezy kolonii określonych jako *Apiotrichum* sp., pobranych z 48-godzinnej hodowli na skosach i inkubowano w 37°C przez 48 godzin. Po tym czasie dodawano 1ml odczynnika Benedicta w celu zwizualizowania reakcji i umieszczono probówkę w łaźni wodnej na 10 minut (Ryc. 5). Barwa zielono-niebieska świadczyła o braku reakcji, natomiast pomarańczowa poświata o jej zajściu.



Rycina 5. Podłoże YNB z 20% dodatkiem glukonianu sodu i odczynnikiem Benedicta (A – przed zagotowaniem w łaźni wodnej, B – po zagotowaniu, kontrola negatywna)
Figure 5. Figure 4. YNB medium with 20% sodium gluconate and Benedict's reagent (A - before boiling in a water bath, B - after boiling, negative control)

Podłoże YNB – Yeast Nitrogen Base (KURTZMAN i in. 2011):

- siarczan amonu NH_4SO_4 5g
- L-histydyny chlorowodorek 10mg
- DL-metionina 20mg
- DL-tryptofan 20mg
- witaminy 13,62mg
- kwas borowy 500µg
- siarczan miedzi (II) $CuSO_4$ 40µg
- jodek potasu KI 100µg
- chlorek żelaza (II) $FeCl_2$ 200µg
- siarczan manganu (II) $MnSO_4$ 400µg
- molibdenian sodu Na_2MoO_4 200µg
- siarczan cynku $ZnSO_4$ 400µg
- wodorofosforan (V) dipotasu K_2HPO_4 0,15g
- diwodorofosforan (V) potasu KH_2PO_4 0,85g
- siarczan magnezu $MgSO_4$ 0,5g

- chlorek sodu NaCl 0,1g
- chlorek wapnia $CaCl_2$ 0,1g
- woda destylowana 1000ml

3.4.5. Identyfikacja wybranych izolatów drożdży na podstawie testów API 20C AUX

Do oceny skuteczności identyfikacji na podstawie testów API 20C AUX firmy bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francja) wybrano po jednym izolacie z każdego gatunku, którego sekwencja uzyskana podczas badań molekularnych była najbardziej zbliżona do sekwencji referencyjnych z bazy danych GenBank. Testy API 20C AUX to biochemiczny szereg identyfikacyjny opierający się na zdolności grzybów do przyswajania węgla (auksanogram) z 19 różnych związków (Tab 2).

W ampułce z API Suspension Medium wykonano zawiesinę z 24-godzinnej hodowli drożdży, odpowiadającej zmętnieniem 2 jednostkom w skali McFarlanda. Następnie przeniesiono 100µl pierwotnej zawiesiny do API C Medium. Przy użyciu pipety pasterowskiej wypełniono mikroprobówki, unikając tworzenia pęcherzyków powietrza. Inkubację prowadzono w temperaturze 29°C przez 24-72 godziny. Dodatkowo sprawdzano wymagane cechy morfologiczne (wytwarzanie strzępek lub pseudostrzępek) na podstawie fotografii izolatów wykonanych z mikrohodowli na agarze Nickersona.

Tabela 2. Zestawienie badanych związków węglowych w testach API 20C AUX
Table 2. List of carbon compounds tested in API 20C AUX tests

Skrót nazwy związków	**Aktywne składniki**
GLU	D-glukoza
GLY	glicerol
2KG	2-keto-glukonian wapnia
ARA	L-arabinoza
XYL	D-ksyloza
ADO	adonitol
XLT	ksylitol
GAL	D-galaktoza
INO	inozytol

SOR	D-sorbitol
MDG	L-metylo-D-glukozyd
NAG	N-acetylo-D-glukozamina
CEL	D-celobioza
LAC	D-laktoza
MAL	D-maltoza
SAC	D-sacharoza
TRE	D- trehaloza
MLZ	D-melezytoza
RAF	D-rafinoza

W studzienkach, w których zmętnienie było większe niż w próbie kontrolnej (Ryc. 6), reakcję uznawano za pozytywną. Zgodnie z zasadą numerycznej identyfikacji, polegającej na punktacji wyników uzyskanych w 7 grupach ocenianych 19 właściwości biochemicznych drożdży i 1 cechy morfologicznej (strzępki/pseudostrzępki), ustalano profil numeryczny, który porównano z podanymi w katalogu producenta (Analytical Profile Index, bioMérieux, Lyon, Francja, 1990).



Rycina 6. Przykładowy pasek testu API 20C AUX (widoczne zmętnienie w mikrostudzienkach GLU i GLY)
Figure 6. Sample API 20C AUX test strip (visible turbidity in GLU and GLY microwells)

3.5. Ocena aktywności enzymatycznej wybranych izolatów drożdży

Zdolności enzymatyczne 22 wybranych izolatów każdego gatunku sprawdzano przy użyciu testów API ZYM firmy bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francja), zawierających substraty do oceny aktywności hydrolitycznej 19 enzymów (Tab. 3).

Do sprawdzenia aktywności enzymatycznej użyto izolatów drożdży z 48-godzinnej hodowli na skosach Sabourauda, z których wykonano zawiesinę w API Suspension Medium o zmętnieniu odpowiadającym 5 w skali McFarlanda. Do każdej studzienki nanoszono po 65µl zawiesiny, a następnie inkubowano przez 4 godziny

w temperaturze 37°C. Po okresie inkubacji do studzienek dodawano po 1 kropli odczynników ZYM A i ZYM B i pozostawiano na 5 minut w celu wywołania reakcji barwnej, doświetlając paski testowe lampą (Ryc. 7). Zgodnie z zaleceniami producenta wykorzystano 5-stopniową skalę, określającą aktywność enzymów w nanomolach hydrolizowanego substratu:

0 – 0 nanomoli

1 – 5 nanomoli

2 – 10 nanomoli

3 – 20 nanomoli

4 – 30 nanomoli

5 – powyżej 40 nanomoli



Rycina 7. Przykładowa reakcja barwna testu API ZYM

Figure 7. Exemplary color reaction of the API ZYM test

Tabela 3. Zestawienie badanych enzymów i hydrolizowanych substratów testów API ZYM wraz z oczekiwaną reakcją barwną

Table 3. List of tested enzymes and hydrolyzed substrates of API ZYM tests along with the expected color reaction

Oznaczenie enzymu	**Enzym**	**Substrat**	**Wynik**	
			dodatni	**ujemny**
E2	fosfataza zasadowa	2-naftylofosforan	fioletowy	bezbarwny lub blady żółty
E3	esteraza (C4)	2-naftylomaślan	fioletowy	
E4	lipaza esterazowa (C8)	2-naftylokapronian	fioletowy	
E5	lipaza (C14)	2-naftylomirystynian	fioletowy	
E6	arylamidaza leucynowa	L-leucylo-2-naftyloamid	pomarańczowy	
E7	arylamidaza walinowa	L-walino-2-naftyloamid	pomarańczowy	
E8	arylamidaza cystynowa	L-cystynylo-2-naftyloamid	pomarańczowy	

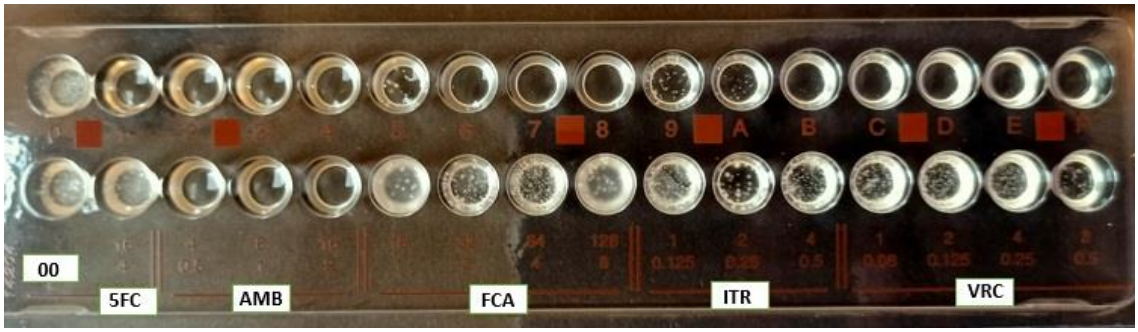
E9	trypsyna	N-benzylo-DL-arginino-2-naftyloamid	pomarańczowy	bezbarwny lub blady żółty
E10	α-chymotrypsyna	N-glutarylo-fenyloalanino-2-naftyloamid	pomarańczowy	
E11	fosfataza kwaśna	2-naftylofosforan	fioletowy	
E12	fosfohydrolaza naftolowa AS-BI	naftylo-AS-BI-fosforan	Niebieski	
E13	α-galaktozydaza	6-Br-2-naftylo-α-D-galaktopiranoza	fioletowy	
E14	β-galaktozydaza	2-naftylo-β-D-glukopiranoza	fioletowy	
E15	β-glukoronidaza	naftolu-AS-BI-β-D-glukuronid	niebieski	
E16	α-glukozydaza	2-naftylo-α-D-glukopiranoza	fioletowy	
E17	β-glukozydaza	6-Br-2-naftylo-β-D-glukopiranoza	fioletowy	
E18	N-acetylo-β-glukozyloaminidaza	1-naftylo-N-acetylo-β-glukozyloamid	brązowy	
E19	α-mannozydaza	6-Br-2-naftylo-α-mannopyranozydaza	fioletowy	
E20	α-fukozydaza	2-naftylo-α-L-fukopiranoza	fioletowy	

3.6. Ocena wrażliwości wybranych izolatów drożdży na leki przeciwgrzybicze

Badanie wrażliwości wybranych 22 izolatów, których sekwencje były najbardziej zbliżone do sekwencji referencyjnych w bazie danych GenBank, przeprowadzono przy użyciu testów ATB FUNGUS 3 firmy bioMérieux (Marcy-l'Étoile, Francja). Testy pozwalają na określenie minimalnego stężenia hamującego (ang. MIC – *Minimal Inhibitory Concentration*) pięciu leków przeciwgrzybiczych w różnych stężeniach: 5-flucytozyna (5-fluorocytozyna; 4 i 16 μg/ml), amfoterycyna B (0,5–16 μg/ml), flukonazol (1–128 μg/ml), itrakonazol (0,125–4 μg/ml) i worikonazol (0,06–8 μg/ml).

W celu określenia lekowrażliwości izolatów wykonano zawiesinę z 48-godzinnej hodowli drożdży na skosach, w ampułce z API NaCl 0,85% Medium, o zmętnieniu odpowiadającym 2 w skali McFarlanda. Następnie 20μl zawiesiny

przenoszono do ampułki z ATB F2 Medium. Do 16 studzienek nanoszono po 135µl uprzednio sporządzonej zawiesiny i inkubowano 35°C/24 godziny. Po inkubacji paski odczytywano i zgodnie z zaleceniami producenta, wartości MIC określano na podstawie wyniku wzrostu dla każdej ze studzienek w porównaniu z mikroprobówką kontrolną (Ryc. 8). Minimalne stężenie hamujące dla amfoterycyny B (AMB) odpowiadało najniższemu stężeniu powodującemu całkowite zahamowanie wzrostu (wynik = „0”). W przypadku 5-flucytozyny (5FC), flukonazolu (FCA), itrakonazolu (ITR) i worikonazolu (VRC) wartość MIC odpowiadała najmniejszemu stężeniu antymykotyku, dla którego przypisuje się ocenę „2” (wyraźne zahamowanie wzrostu), „1” (bardzo słaby wzrost) i”0” (brak wzrostu). Wrażliwość izolatów na podstawie minimalnego stężenia hamującego określano zgodnie z sugerowanymi przez producenta.



Rycina 8. Przykładowy pasek ATB FUNGUS 3
Figure 8. Example of ATB FUNGUS 3 strip

3.7. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wykorzystano oprogramowanie STATISTICA 13.3 (firma StatSoft, licencja Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie). Przy użyciu metody analizy wariancji (ANOVA), dla wszystkich analiz poziom istotności wynosił $\alpha=0,05$. Do każdej przeprowadzanej analizy zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, ze względu na policzalne wartości danych.

4. Wyniki

4.1. Drożdże wyizolowane z badanych ontocenoz

Ogółem, z 718 pobranych prób mikrogrzyby stwierdzono w 230 (32%). Łącznie uzyskano i przeanalizowano 260 izolatów drożdży należących do 22 gatunków z 12 rodzajów (Tab. 4, Zał. 1 i 2). W tabeli 5 przedstawiono aktualne stanowisko systematyczne wyizolowanych grzybów, a w tabeli 6 skróconą charakterystykę analizowanych gatunków, na podstawie danych literaturowych.

Tabela 4. Liczebność gatunków drożdży wyizolowanych ze wszystkich badanych ontocenoz

Table 4. Number of yeast species isolated from all studied ontocenoses

Gatunek	**Liczba izolatów**				
	pysk	**skrzela**	**wątroba**	**jelita**	**łącznie**
Apiotrichum domesticum	7	3	2	5	17
A. montevideense	1	2	0	1	4
Candida albicans	1	1	0	0	2
C. oleophila	0	0	1	0	1
C. parapsilosis	1	3	1	3	8
C. sake	1	0	0	0	1
Cutaneotrichosporon curvatum	4	3	0	3	10
Debaryomyces hansenii	7	2	5	8	22
Exophiala dermatitidis	0	0	0	1	1
Holtermanniella takashimae	1	0	0	1	2
Kluyveromyces marxianus	1	1	0	0	2
Meyerozyma caribbica	1	0	0	0	1
M. guilliermondii	0	3	4	3	10
Pichia fermentans	5	7	3	0	15
P. kudriavzevii	48	44	8	14	114
Rhodotorula mucilaginosa	8	1	1	2	12
Saccharomyces cerevisiae	1	0	0	0	1
Yarrowia alimentaria	6	1	0	1	8
Y. bubula	0	1	0	0	1
Y. deformans	3	3	0	3	9
Y. divulgata	5	1	0	1	7
Y. lipolytica	3	4	3	2	12

Tabela 5. Stanowisko systematyczne wyizolowanych gatunków drożdży na podstawie stron internetowych: www.mycobank.org i www.indexfungorum.org

Table 5. Systematic position of isolated yeast species based on the websites: www.mycobank.org and www.indexfungorum.org

Lp.	**Gatunek**	**Rodzina**	**Rząd**	**Klasa/ Podklasa**	**Gromada/ Typ**
1	*Candida albicans* (Robin) Berkhout (1923)	*Debaryomycetaceae*	*Serinales*		*Ascomycota*
2	*C. oleophila* Kaisha & Iizuka (1967)				
3	*C. parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (1932)				
4	*C. sake* (Saito & Oda) van Uden & H.R. Buckley (1983)				
5	*Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder & Kreger (1952)				
6	*Meyerozyma caribbica* (Vaughan-Mart., Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill) Kurtzman & M. Suzuki (2010)				
7	*M. guilliermondii* (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki (2010)				
8	*Exophiala dermatitidis* (Kano) de Hoog (1977)	*Herpotrichiellaceae*	*Chaetothyriales*	*Eurotiomycetes*	
9	*Kluyveromyces marxianus* (E.C. Hansen) Van der Walt, Antonie van Leeuwenhoek (1965)	*Saccharomycetaceae*	*Saccharomycetales*	*Saccharomycetes*	
10	*Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen (1838)				
11	*Pichia fermentans* Lodder (1932)	*Pichiaceae*	*Pichiales*		
12	*P. kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson (1965)				

13	*Yarrowia alimentaria* (Knutsen, V. Robert & M.T. Sm.) Gouliam., R.A. Dimitrov, M.T. Sm. & M. Groenew. (2017)		*Dipodascales*	*Dipodascomycetes*	
14	*Y. bubula* Ed. Nagy, Dlauchy & G. Péter, Antonie van Leeuwenhoek (2014)				
15	*Y. deformans* (Zach) M. Groenew. & M.T. Sm., Antonie van Leeuwenhoek (2013)				
16	*Y. divulgata* (Zach) M. Groenew. & M.T. Sm., Antonie van Leeuwenhoek (2013)				
17	*Y. lipolytica* (Wick., Kurtzman & Herman) Van der Walt & Arx, Antonie van Leeuwenhoek (1980)				
18	*Apiotrichum domesticum* (Sugita, Nishikawa & Shinoda) Yurkov & Boekhout (2015)	*Trichosporonaceae*	*Trichosporonales*	*Tremellomycetes*	*Basidiomycota*
19	*A. montevideense* (Queiroz) Yurkov & Boekhout (2015)				
20	*Cutaneotrichosporon curvatum* (Diddens & Lodder) Yurkov, X.Z. Liu, F.Y. Bai, M. Groenew. & Boekhout (2015)				
21	*Holtermanniella takashimae* Wuczkowski, Passoth, Andersson, Turchetti, Prillinger, Boekhout (2010)		*Holtermanniales*		
22	*Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison (1928)	*Sporidiobolaceae*	*Sporidiobolales*	*Microbotryomycetes*	

Tabela 6. Charakterystyka cech diagnostycznych wyizolowanych drożdży na podstawie danych źródłowych z uwzględnieniem BSL (DE HOOG i in. 2000, 2020; KURTZMAN I FELL 1998; KURTZMAN i in. 2011; WUCZKOWSKI i in. 2011; NAGY i in. 2013; NAGY i in. 2014; GAIKWAD i in. 2021; + – reakcja pozytywna, - – reakcja negatywna, v- reakcja zmienna, w- reakcja słaba)

Table 6. Characteristics of diagnostic features of isolated yeasts based on source data including BSL (DE HOOG et al. 2000, 2020; KURTZMAN and FELL 1998; KURTZMAN et al. 2011; WUCZKOWSKI et al. 2011; NAGY et al. 2013; NAGY et al. 2014; GAIKWAD et al. 2021; + – positive reaction, - – negative reaction, v – variable reaction, w – weak reaction)

Lp	Gatunek	Cechy											Naturalne rezerwuary	BSL
		makroskopowe	mikroskopowe	biochemiczne										
				fermentacja					asymilacja					
				GL	GA	S	M	L	GL	GA	S	M	L	
1	*Apiotrichum domesticum*	kolonie kremowe do jasnożółtych, półbłyszczące, krostkowate lub mózgowato pofałdowane, brzeg porośnięty strzępkami	komórki wegetatywne kuliste lub jajowate, 2-4,5 x 2,5-10µm, występujące pojedynczo lub parami, obecne pseudostrzępki i septowane strzępki z artrokonidiami	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	litosfera, człowiek	1
2	*A. montevideense*	kolonie blade do cytrynowożółtych, matowe, mózgowate do pofałdowanych, brzeg promieniście pofałdowany	komórki wegetatywne kuliste do jajowatych, 2,5-5 x 2,5-12µm, występujące pojedynczo lub parami, obecne septowane strzępki z artrokonidiami	–	–	–	–	–	+	+	v	+	+	człowiek	–
3	*Candida albicans*	kolonie białe do kremowych, gładkie, lśniące lub matowe, zapach drożdży	komórki wegetatywne kuliste, rzadziej cylindryczne, 2-7 x 4-8µm, cienkościenne komórki ułożone groniasto wokół rozgałęzionych pseudostrzępek, tworzy pojedyncze, szczytowe, boczne i śródstrzępkowe chlamydospory	+	v	v	+	–	+	+	v	+	–	aerosfera, hydosfera, litosfera, rośliny, zwierzęta, człowiek	2
4	*C. oleophila*	kolonie białawe, matowe, gładkie lub delikatnie pomarszczone, brzeg zwykle z kilkoma kępkami wzrostu pseudostrzępek	większość komórek wegetatywnych jajowatych do wydłużonych, 3-4 x 4-6,5µm, występujące pojedynczo, w parach lub krótkich rozgałęzionych i nierozgałęzionych łańcuszkach,	+	+	-	v	–	+	+	+	+	–	rośliny	–

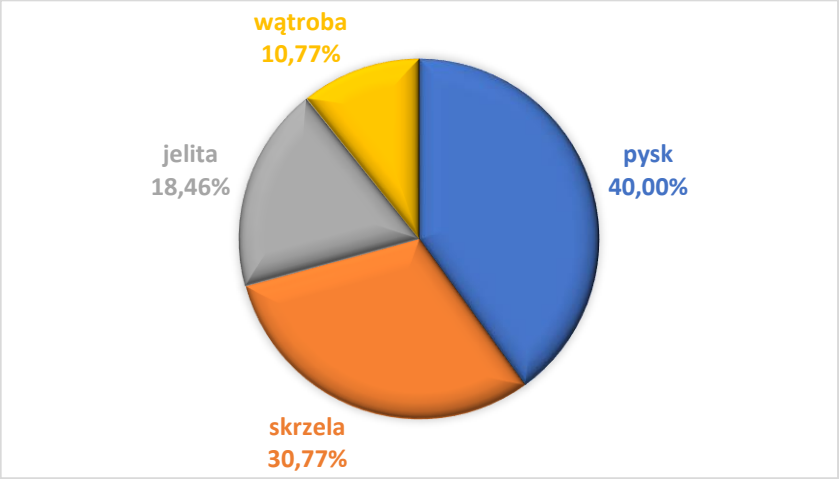
			pseudostrzępki złożone z rozgałęzionych łańcuchów cylindrycznych komórek, czasami z jajowatymi blastokonidiami												
5	*C. parapsilosis*	kolonie kremowe do żółtawych, matowe lub błyszczące, miękkie, płaskie lub wyniosłe, maślane, gładkie lub pomarszczone	komórki wegetatywne okrągłe do jajowatych, 1,5-2,5 x 3-5,5µm, występujące pojedynczo lub parami, pseudogrzybnia i składające się z rozgałęzionych łańcuchów podłużnych komórek w układzie mniej więcej jak drzewko choinkowe, boczne gałęzie stopniowo krótsze w kierunku wierzchołka strzępki, worki trwałe, 1-2 askospory szorstkich lub gładkich ścianach	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	hydrosfera, żywność, owady, człowiek	1
6	*C. sake*	kolonie białe do kremowych, gładkie, koronkowe lub pomarszczone, miękkie, brzeg cały lub nieregularny	komórki wegetatywne kuliste, jajowate, wydłużone lub cylindryczne, 2,5-6 x 3-7µm, występujące pojedynczo, w parach, krótkich łańcuchach lub małych skupiskach, pseudostrzępki złożone z kilku krótkich łańcuchów komórek lub długich, rozgałęzionych łańcuchów cylindrycznych komórek z dobrze zróżnicowanymi blastokonidiami	v	v	v	v	–	+	+	v	v	–	hydrosfera, litosfera, żywność, rośliny, człowiek	1
7	*Cutaneotrichosporon curvatum*	kolonie od żółtawych do brązowych, śluzowate, miękkie, gładkie lub pomarszczone	komórki wegetatywne jajowate, w kształcie kiełbasy, często zakrzywione, 2,7-4,7 x 3,3-9,4µm, pseudogrzybnia składa się z rozgałęzionych łańcuchów krótkich pseudostrzępek lub długich falistych pseudostrzępek z kilkoma blastosporami	–	–	–	–	–	+	+	+	+/w	+	hydrosfera, żywność, człowiek	2

8	*Debaryomyces hansenii*	kolonie białe do kremowych, błyszczące lub matowe, maślane, gładkie lub pomarszczone	komórki wegetatywne elipsoidalne, 3,5-5 x 2-3,5µm, pseudogrzybnia nieobecna, worki trwałe, 1-2 askospory o chropowatych ścianach	w/–	w/–	w/–	w/–	–	+	+	+	+	v	hydrosfera, litosfera, żywność, rośliny, człowiek	1
9	*Exophiala dermatitidis*	kolonie z brązowym pigmentem wydzielającym się do podłoża, płaskie, gładkie, woskowate	komórki wegetatywne obfite, komórki konidiogenne interkalarne lub wolne, w kształcie kolby, konidia elipsoidalne, 2,5-4 x 2-3µm, mogą występować kuliste fialidia z dużymi, delikatnymi kołnierzykami, fialokonidia małe, elipsoidalne do cylindrycznych, czasami tworzy ciała sklerotyczne	–	–	–	–	–	+	+	+	+	w	środowiska ekstremalne, hydrosfera, człowiek	2
10	*Holtermanniella takashimae*	kolonie bladoróżowe, wypukłe, okrągłe, konsystencja pasty	komórki wegetatywne owalne do wydłużonych, 3-5 x 2-4µm, nie wytwarza grzybni	–	–	–	–	–	+	+	+	+	v	litosfera, rośliny	–
11	*Kluyveromyces marxianus*	kolonie białe, kremowe do brązowych, maślane, gładkie lub lekko pofałdowane, zapach winny	komórki wegetatywne kuliste, elipsoidalne do cylindrycznych, 2-6 x 6-10µm, występują pojedynczo, parami lub w krótkich łańcuchach, brak strzępek, pseudostrzępki silnie rozgałęzione z kilkoma blastokonidiami, worki zanikające, 1-4 elipsoidalne, gładkościenne askospory	+	+	+	–	v	+	+	+	–	v	hydrosfera, żywność, rośliny, owady, człowiek	1
12	*Meyerozyma caribbica*	kolonie opalizująco-białe, gładkie i lśniące lub matowe i pomarszczone, brzegi płatowate	komórki wegetatywne jajowate do wydłużonych, 1,5-5 x 2-6 µm, występują pojedynczo, w parach lub krótkich łańcuszkach, pseudostrzępki obfite, rozgałęzione lub nieobecne, brak strzępek prawdziwych, worki rzadkie,1-2 askospory	+	+	+	v	–	+	+	+	+	–	litosfera, rośliny, człowiek	1

13	*M. guilliermondii*	kolonie kremowe do żółtych, płaskie lub kopulaste, wilgotne, maślane, gładkie i lśniące lub matowe i pomarszczone, brzegi płatowate	komórki wegetatywne jajowate do wydłużonych, 1,5-4,8 x 2-15µm, występują pojedynczo lub w krótkich łańcuszkach, pseudogrzybnia obfita, silnie rozgałęziona, składająca się z cienkościennych, wydłużonych komórek, z okółkowo ułożonymi blastokonidiami, brak strzępek prawdziwych, tworzy worki, 1-4 askospor w kształcie kapelusza	+	v	+	–	–	+	+	+	+	–	aerosfera, litosfera, owady, zwierzęta, rośliny, człowiek	1
14	*Pichia fermentans*	kolonie białe i matowe, powierzchnia pomarszczona, brzegi płatowate, zapach lekko estrowy	komórki wegetatywne jajowate do elipsoidalnych, 1,9-6,5 x 4-14,4µm, występują pojedynczo, w parach i krótkich łańcuchach, pseudostrzępki umiarkowanie rozgałęzione, brak strzępek prawdziwych, tworzy worki, 2-4 askospory	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	żywność, zwierzęta, człowiek	1
15	*P. kudriavzevii*	kolonie kremowe do brązowo-białych, maślane, suche, zapach lekko kwaśny	komórki wegetatywne elipsoidalne do cylindrycznych, 1,3-6 x 3,3-14µm, z płaskimi i dobrze odgraniczonymi bliznami, występują pojedynczo lub parami, pseudogrzybnia często obecna, worki trwałe, 1-2 kulistych, gładkich lub szorstkich askospor	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	litosfera, rośliny, żywność, człowiek	2
16	*Rhodotorula mucilaginosa*	kolonie koralowe, różowe do czerwonych, błyszczące, gładkie lub szorstkie, miękkie, śluzowate	komórki wegetatywne kuliste do elipsoidalnych, 2,5-6,5 x 2-5,5µm, jednobiegunowe, występują pojedynczo lub w parach, może być obecna pseudogrzybnia	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	litosfera, hydrosfera, rośliny, człowiek	1
17	*Saccharomyces cerevisiae*	kolonie białe lub kremowe, gładkie, lśniące, wilgotne, zwykle płaskie, czasami wypukłe, zapach drożdży	komórki wegetatywne kuliste, jajowate lub wydłużone, 3-8 x 5-10µm, występują pojedynczo lub w małych skupiskach, pseudostrzępki nie występują	+	–	+	+	–	+	v	+	+	–	litosfera, hydrosfera, żywność, rośliny,	GRAS

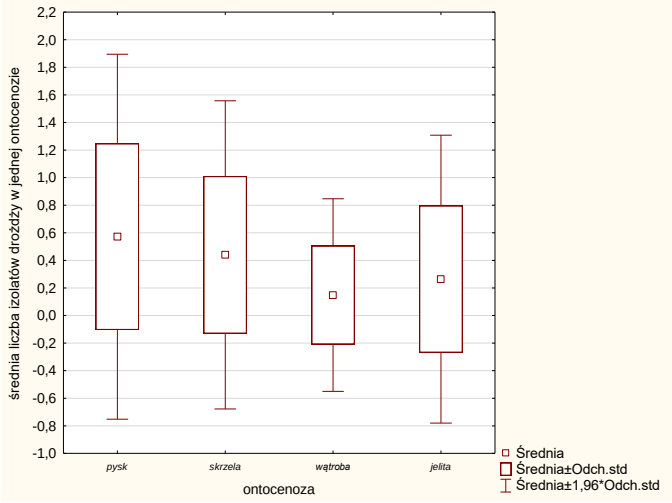
			lub są szczątkowe, tworzy worki, 1-4 kulistych askospor											zwierzęta, człowiek	
18	*Yarrowia alimentaria*	brak danych	komórki wegetatywne jajowate do kulistych, 3-6 x 4-7µm, występują pojedynczo, w parach i małych skupiskach, pączkowanie wielostronne, pseudostrzępki i strzępki prawdziwe obecne	–	–	–	–	–	+	w	–	–	–	żywność	–
19	*Y. bubula*	kolonie kremowe, maślane, gładkie do lekko szorstkich, płaskie lub lekko wypukłe, matowe lub lekko błyszczące, brzeg drobno klapowany	komórki wegetatywne elipsoidalne, 2-6 x 2,5-14,5µm, występują pojedynczo, w parach, krótkich łańcuchach i małych skupiskach, obecne pseudostrzępki i strzępki prawdziwe	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	żywność, zwierzęta	–
20	*Y. deformans*	kolonie kremowe, pomarszczone, wilgotne i śluzowate lub sfałdowane, włochate i matowe	komórki wegetatywne jajowate, 3-5 x 5-11µm, obfite pseudostrzępki i strzępki prawdziwe	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	zwierzęta, człowiek	–
21	*Y. divulgata*	kolonie kremowe, maślane, prawie gładkie lub pofałdowane, matowe, płaskie lub umiarkowanie wzniesione, brzeg klapowany	komórki wegetatywne sferoidalne, subsferoidalne lub elipsoidalne, 2,5-6 x 3,5-10µm, występują pojedynczo, w parach, krótkich łańcuchach i małych skupiskach, obecne pseudostrzępki i strzępki prawdziwe, brak askospor	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	hydrosfera, zwierzęta, żywność	–
22	*Y. lipolytica*	kolonie brązowo-białe, maślane	komórki pączkujące obecne lub nie, strzępki proste i sztywne, 2-4µm, konidia elipsoidalne do cylindrycznych, tworzy worki, 2-4 subsferyczne lub elipsoidalne askospory	–	–	–	–	–	+	v	–	–	–	hydrosfera, żywność, człowiek	1

Najwięcej izolatów drożdży pochodziło z pyska śledzi, co stanowiło 40% wszystkich przypadków (104 z 260 izolatów). Ze skrzeli uzyskano 30,77% grzybów (80 izolatów). Mniej izolatów notowano na powierzchni jelit – 18,46% (48 izolatów) oraz wątroby – 10,77% wszystkich mikrogrzybów (28 izolatów; Ryc. 9, Zał. 3).



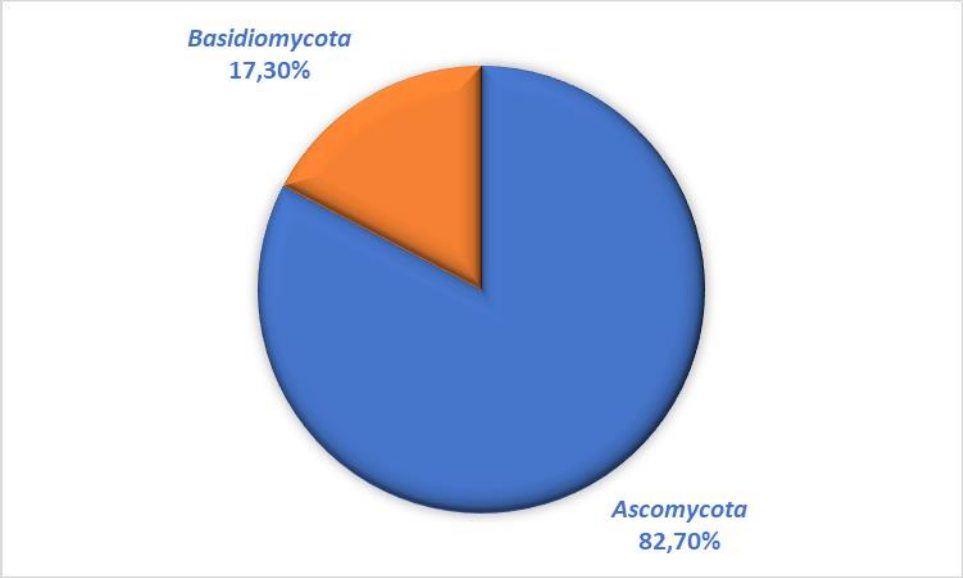
Rycina 9. Częstość występowania izolatów w poszczególnych ontocenozach [%]
Figure 9. Frequency of isolates in individual ontocenoses [%]

Analiza wariancji (ANOVA), przeprowadzona przy poziomie istotności 0,05, wykazała różnice istotne statystycznie między liczbą izolatów drożdży w poszczególnych ontocenozach (Ryc. 10). Stwierdzono występowanie różnic między pyskiem i wątrobą (p=0,00), pyskiem i jelitami (p=0,000096), skrzelami i wątrobą (p=0,000146) oraz skrzelami i jelitami (p=0,028428).



Rycina 10. Różnice w średniej liczbie izolatów drożdży w poszczególnych ontocenozach
Figure 10. Differences in the average number of yeast isolates in individual ontocenoses

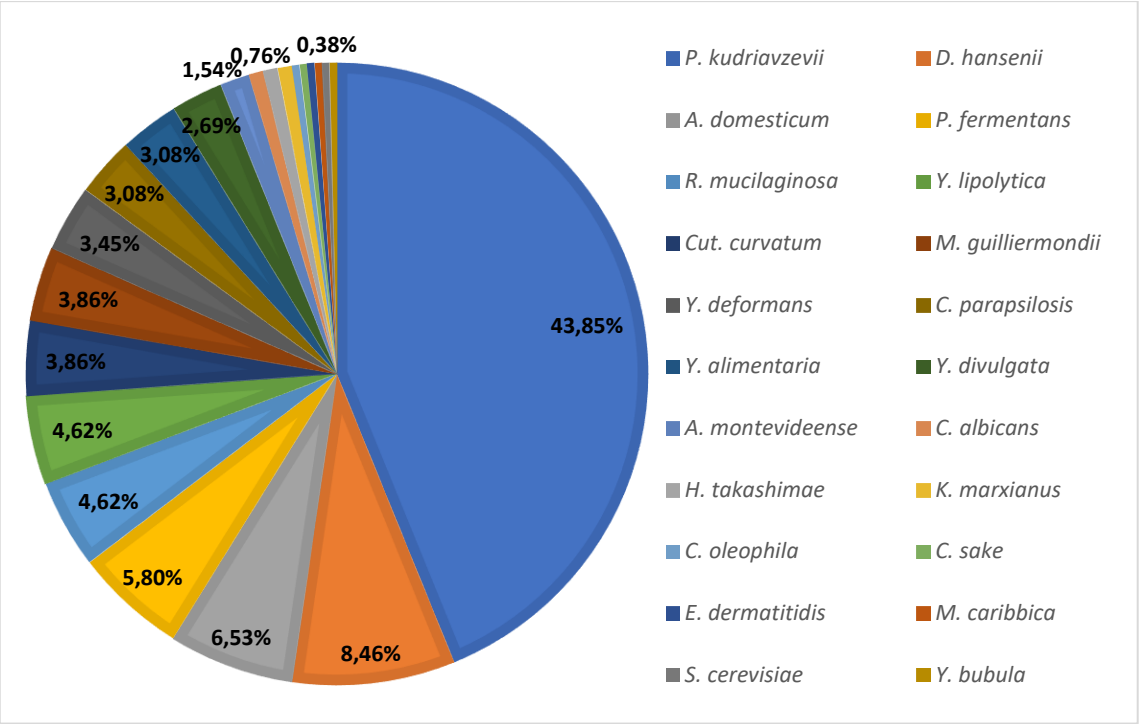
Większość uzyskanych w badaniach drożdży należało do gromady *Ascomycota* – 82,7% (215 izolatów). Drożdże należące do *Basidiomycota* stanowiły jedynie 17,3% (45 uzyskanych) wszystkich izolatów (Ryc. 11).



Rycina 11. Podział wyizolowanych drożdży według gromad [%]
Figure 11. Division of isolated yeasts by phylum [%]

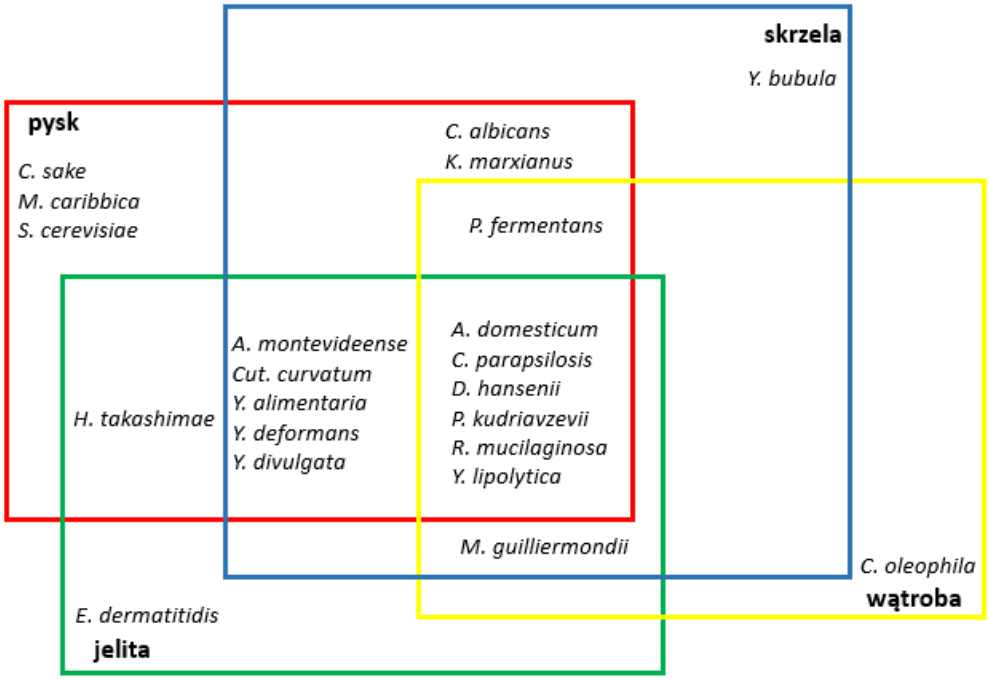
W strukturze gatunkowej drożdży, wyizolowanych ze wszystkich ontocenoz śledzia bałtyckiego, gatunkiem dominującym była *P. kudriavzevii*, którą stwierdzono w 43,85% przypadków (114 izolatów). Rzadziej notowanymi gatunkami były: *D. hansenii* – 8,46% (22 izolaty), *A. domesticum* – 6,53% (17 izolatów), *P. fermentans* – 5,8% (15 izolatów), *R. mucilaginosa* i *Y. lipolytica* – 4,62% (po 12 izolatów), *Cut. curvatum* i *M. guilliermondii* – 3,86% (po 10 izolatów), *Y. deformans* – 3,45% (9 izolatów), *C. parapsilosis* i *Y. alimentaria* – 3,08% (po 8 izolatów), *Y. divulgata* – 2,69% (7 izolatów) oraz *A. montevideense* – 1,54% (4 izolaty). Gatunki *C. albicans, H. takashimae* i *K. marxianus* izolowano dwukrotnie, co stanowiło po 0,76% (2 izolaty każdy), zaś *C. oleophila, C. sake, E. dermatitidis, M. caribbica, S. cerevisiae* i *Y. bubula* uzyskano po jednym izolacie, co łącznie wynosiło 2,28% (Ryc. 12).

Analiza wariancji przeprowadzona przy poziomie istotności 0,05, nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy różnorodnością gatunkową w poszczególnych ontocenozach (p=0,1326).



Rycina 12. Drożdże wyizolowane z badanych ontocenoz śledzia bałtyckiego [%]
Figure 12. Yeasts isolated from the investigated Baltic herring ontocenoses [%]

Zaobserwowano, że dla wszystkich badanych ontocenoz, wspólnych było 6 gatunków: *A. domesticum, C. parapsilosis, D. hansenii, P. kudriavzevii, R. mucilaginosa* i *Y. lipolytica*. W pysku, skrzelach i jelitach współwystępowało 5 gatunków (*A. montevideense, Cut. curvatum, Y. alimentaria, Y. deformans* i *Y. divulgata*), zaś po jednym w pysku, skrzelach i wątrobie (*P. fermentans*) oraz w skrzelach, wątrobie i jelitach (*M. guilliermondii*). Dwa takie same gatunki odnotowano w pysku i skrzelach (*C. albicans* i *K. marxianus*), a jeden w pysku i jelitach (*H. takashimae*). Gatunkami notowanymi tylko w pysku były *C. sake, M. caribbica* i *S. cerevisiae*. W skrzelach występowała wyłącznie *Y. bubula*, w wątrobie *C. oleophila*, zaś w jelitach *E. dermatitidis* (Ryc. 13).



Ryc. 13. Zróżnicowanie gatunkowe drożdży w badanych układach

Figure. 13. Species of yeasts differentiation in investigated systems

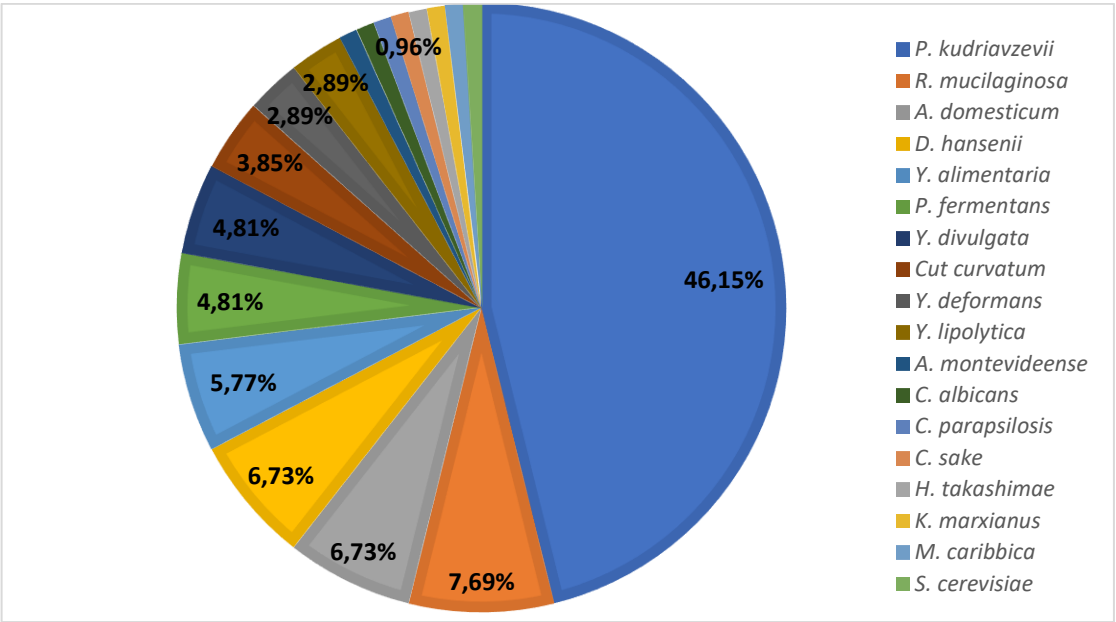
4.1.1. Drożdże izolowane z pyska

Ze 182 pobranych prób, u 89 osobników śledzia odnotowano drożdże (48,9%). Z pyska śledzia bałtyckiego uzyskano 104 izolaty drożdży, należące do 18 gatunków z 11 rodzajów (Tab. 7). Dominującym gatunkiem była *P. kudriavzevii,* którą stwierdzono w 46,15% przypadków (48 izolatów). Zdecydowanie rzadziej notowano *R. mucilaginosa* – 7,69%, *A. domesticum* i *D. hansenii* – po 6,73%, *Y. alimentaria* – 5,77%, *P. fermentans* i *Y. divulgata* – 4,81%, *Cut. curvatum* – 3,85% oraz *Y. deformans* – 2,89%. Uzyskano także po 1 izolacie: *A. montevideense, C. albicans, C. sake, H. takashimae, K. marxianus, M. caribbica* i *S. cerevisiae*, stanowiących po 0,96% wszystkich uzyskanych (Ryc. 14, Zał. 3).

Tabela 7. Gatunki drożdży występujące w pysku

Table 7. Yeast species found in the mouth

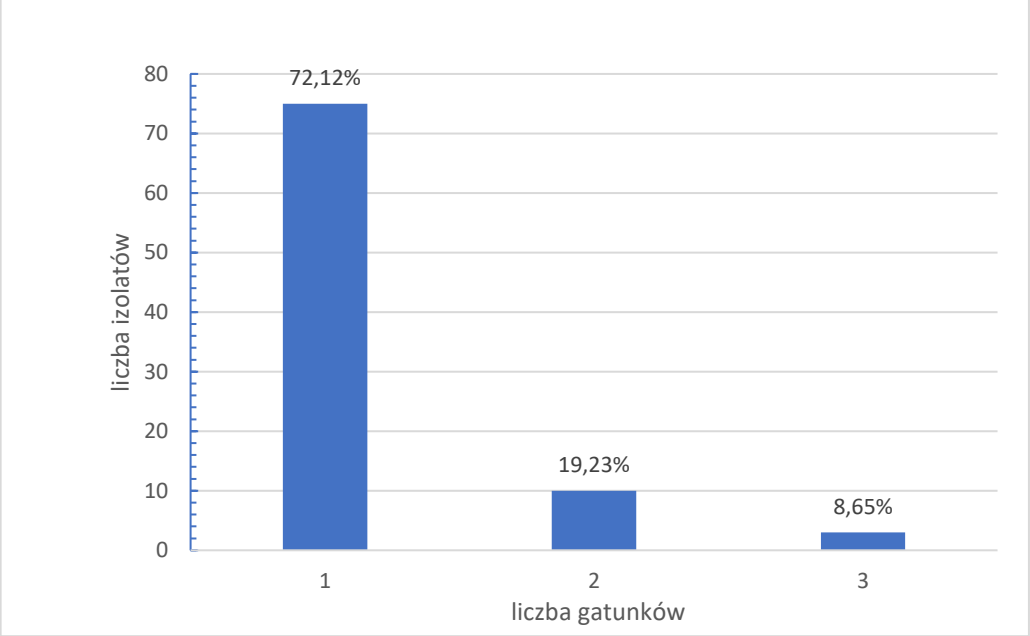
Lp.	Gatunek	Liczba izolatów	Udział %
1	*A. domesticum*	7	6,73
2	*A. montevideense*	1	0,96
3	*C. albicans*	1	0,96
4	*C. parapsilosis*	1	0,96
5	*C. sake*	1	0,96
6	*Cut. curvatum*	4	3,85
7	*D. hansenii*	7	6,73
8	*H. takashimae*	1	0,96
9	*K. marxianus*	1	0,96
10	*M. caribbica*	1	0,96
11	*P. fermentans*	5	4,81
12	*P. kudriavzevii*	48	46,15
13	*R. mucilaginosa*	8	7,69
14	*S. cerevisiae*	1	0,96
15	*Y. alimentaria*	6	5,77
16	*Y. deformans*	3	2,89
17	*Y. divulgata*	5	4,81
18	*Y. lipolytica*	3	2,89



Rycina 14. Drożdże wyizolowane z pyska śledzia bałtyckiego [%]

Figure 14. Yeasts isolated from mouth of Baltic herring [%]

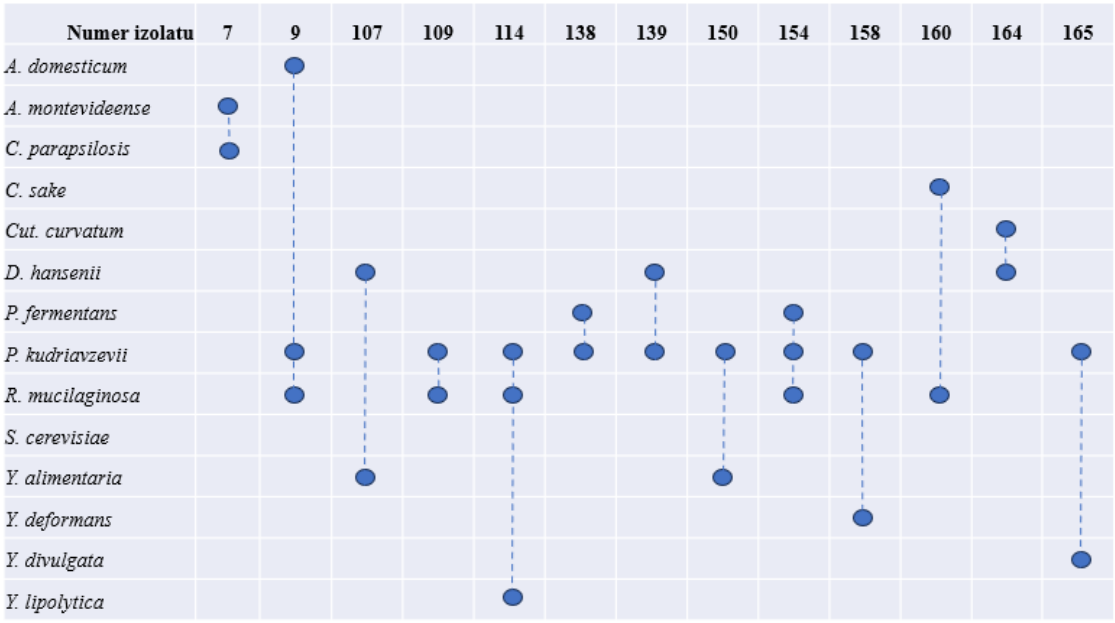
Wśród badanych drożdży, oprócz izolatów jednogatunkowych, które stanowiły zdecydowaną większość – 72,12%, notowano także izolaty dwu- i trzygatunkowe, stanowiące odpowiednio 19,23% oraz 8,65% (Ryc. 15).



Rycina 15. Liczba izolatów jedno-, dwu- i trzygatunkowych w pysku śledzia bałtyckiego [%]

Figure 15. Number of one, two, and triple species isolates from mouth of Baltic herring [%]

Najczęstszymi komponentami izolatów wielogatunkowych były *P. kudriavzevii* (8 razy) oraz *R. mucilaginosa* (5 razy), wchodzące w skład każdej kultury trzygatunkowej. W skład izolatów mieszanych wchodziły także *D. hansenii* (3 razy), *P. fermentans* i *Y. alimentaria* (po 2 razy). Większość gatunków występowała w izolatach wielogatunkowych wyłącznie jeden raz (Ryc. 16).



Rycina 16. Występowanie w pysku śledzi bałtyckich izolatów dwu- i trzygatunkowych

Figure 16. Occurrence of two, and triple species isolates Baltic herring isolates in the mouth

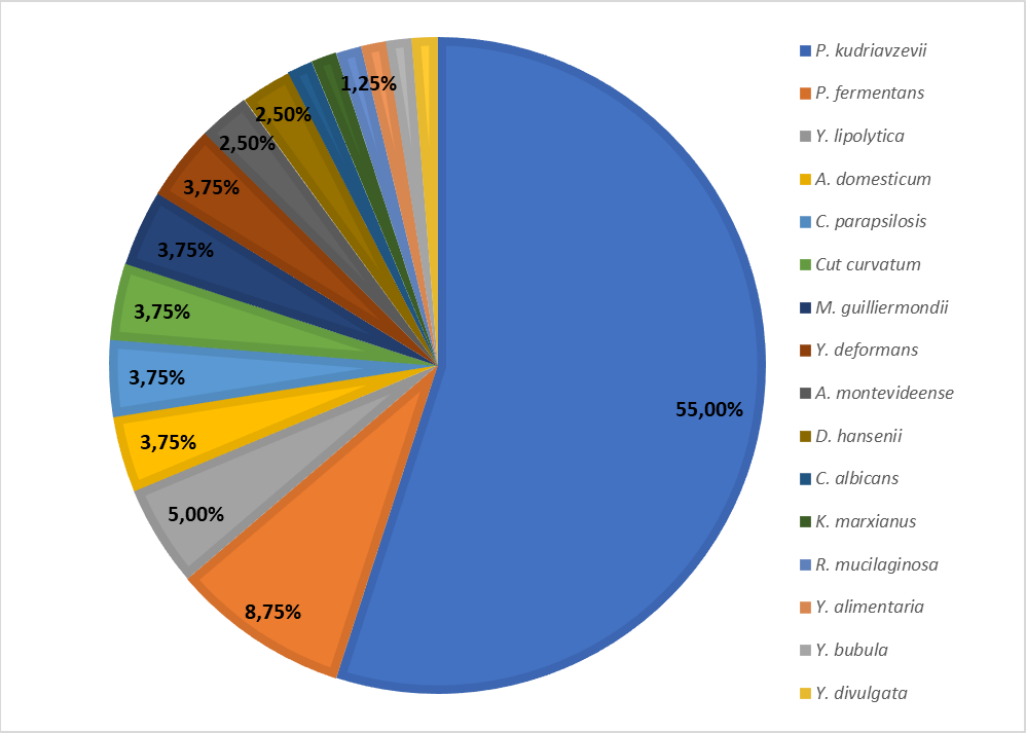
4.1.2. Drożdże izolowane ze skrzeli

Ze 182 pobranych z powierzchni skrzeli wymazów, od 73 osobników śledzia wyizolowano drożdże (40,1%). Po przeanalizowaniu 80 izolatów pochodzących ze skrzeli stwierdzono 16 gatunków drożdży, należących do 9 rodzajów (Tab. 8). Gatunkiem dominującym była *P. kudriavzevii*, stanowiąca 55% wszystkich izolatów. Rzadziej notowano: *P. fermentans* (8,75%), *Y. lipolytica* (5%), *A. domesticum, Cut. curvatum, M. guilliermondii* i *Y. deformans* (po 3,75%) oraz *A. montevideense* i *D. hansenii* (po 2,5%). Pozostałe gatunki stanowiły łącznie 7,5% wszystkich izolatów i były notowane wyłącznie jeden raz (Ryc. 17, Zał. 3).

Tabela 8. Gatunki drożdży wyizolowane ze skrzeli

Table 8. Yeast species isolated from the gills

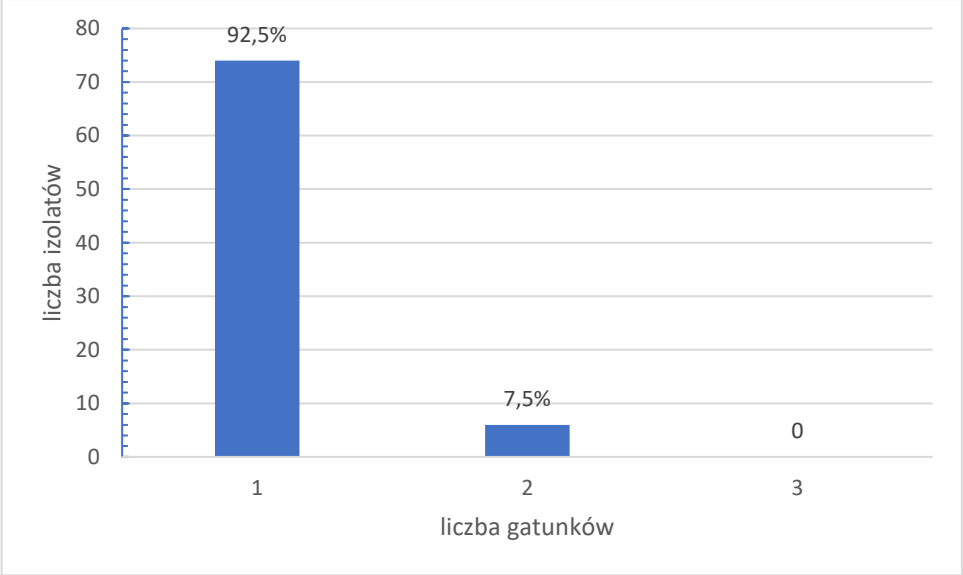
Lp.	Gatunek	Liczba izolatów	Udział %
1	*A. domesticum*	3	3,75
2	*A. montevideense*	2	2,5
3	*C. albicans*	1	1,25
4	*C. parapsilosis*	3	3,75
5	*Cut. curvatum*	3	3,75
6	*D. hansenii*	2	2,5
7	*K. marxianus*	1	1,25
8	*M. guilliermondii*	3	3,75
9	*P. fermentans*	7	8,75
10	*P. kudriavzevii*	44	55
11	*R. mucilaginosa*	1	1,25
12	*Y. alimentaria*	1	1,25
13	*Y. bubula*	1	1,25
14	*Y. deformans*	3	3,75
15	*Y. divulgata*	1	1,25
16	*Y. lipolytica*	4	5



Rycina 17. Drożdże wyizolowane ze skrzeli [%]

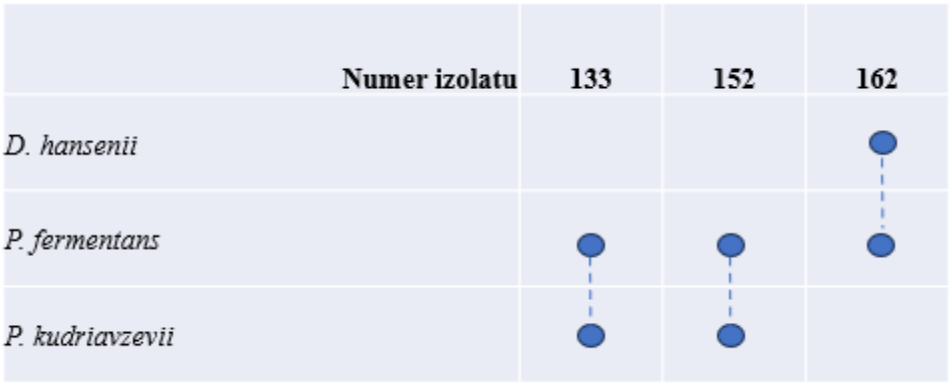
Figure 17. Yeasts isolated from liver surface [%]

W skrzelach przeważały izolaty jednogatunkowe – 92,5% (Ryc. 18). Odnotowano 3 izolaty dwugatunkowe, które stanowiły łącznie 7,5% wszystkich. Nie stwierdzono izolatów składających się z trzech gatunków.



Rycina 18. Liczba izolatów jedno-, dwu- i trzygatunkowych na powierzchni skrzeli
Figure 18. Number of one, two and triple species isolates on the gill surfaces

W uzyskanych ze skrzeli izolatów dwugatunkowych, *P. kudriavzevii* była komponentem wszystkich z nich, *P. fermentans* współwystępowała 2-krotnie, zaś *D. hansenii* raz (Ryc. 19).



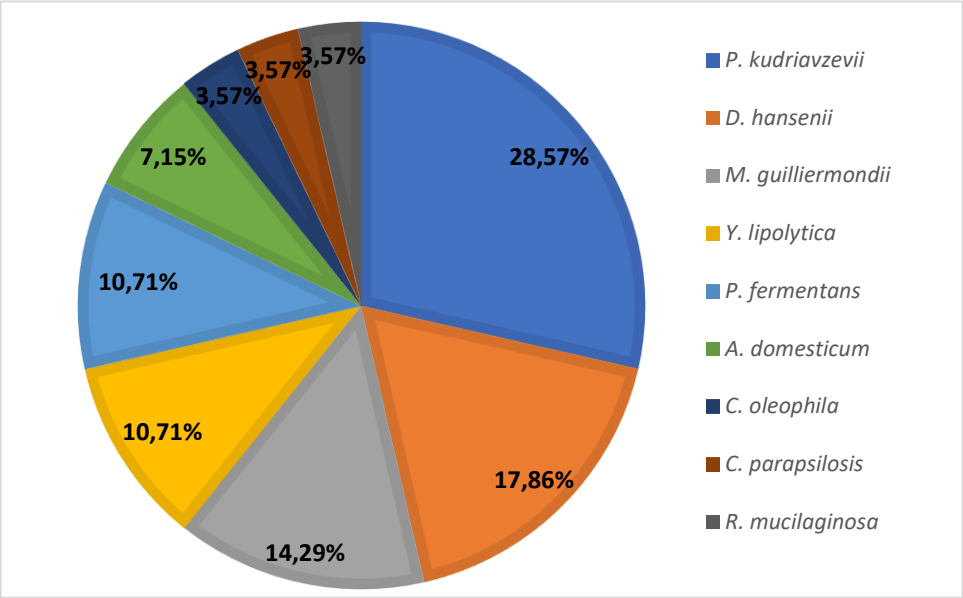
Rycina 19. Komponenty izolatów dwugatunkowych w skrzelach
Figure 19. Components of two species isolates in the gills

4.1.3. Drożdże izolowane z wątroby

Ze 175 pobranych prób, u 28 śledzi stwierdzono mikrogrzyby (16%). Z wymazów pobranych z wątroby uzyskano 28 izolatów, należących do 9 gatunków z 7 rodzajów (Tab. 9, Zał. 3). Wśród izolatów pochodzących z powierzchni wątroby dominowała *P. kudriavzevii* – 28,57%. Rzadziej notowano *D. hansenii* (17,86%), *M. guilliermondii* (14,29%), *P. fermentans* i *Y. lipolytica* (po 10,71%) oraz *A. domesticum* (7,15%). Pozostałe gatunki były izolowane raz i stanowiły po 3,95% wszystkich izolatów (Ryc. 20).

Tabela 9. Drożdże stwierdzone w izolatach pochodzących z powierzchni wątroby
Table 9. Yeasts stated in isolates originated from liver surface

Lp.	Gatunek	Liczba izolatów	Udział %
1	*A. domesticum*	2	7,15
2	*C. oleophila*	1	3,57
3	*C. parapsilosis*	1	3,57
4	*D. hansenii*	5	17,86
5	*M. guilliermondii*	4	14,29
6	*P. fermentans*	3	10,71
7	*P. kudriavzevii*	8	28,57
8	*R. mucilaginosa*	1	3,57
9	*Y. lipolytica*	3	10,71



Rycina 20. Drożdże wyizolowane z powierzchni wątroby [%]
Figure 20. Yeasts isolated from liver surface [%]

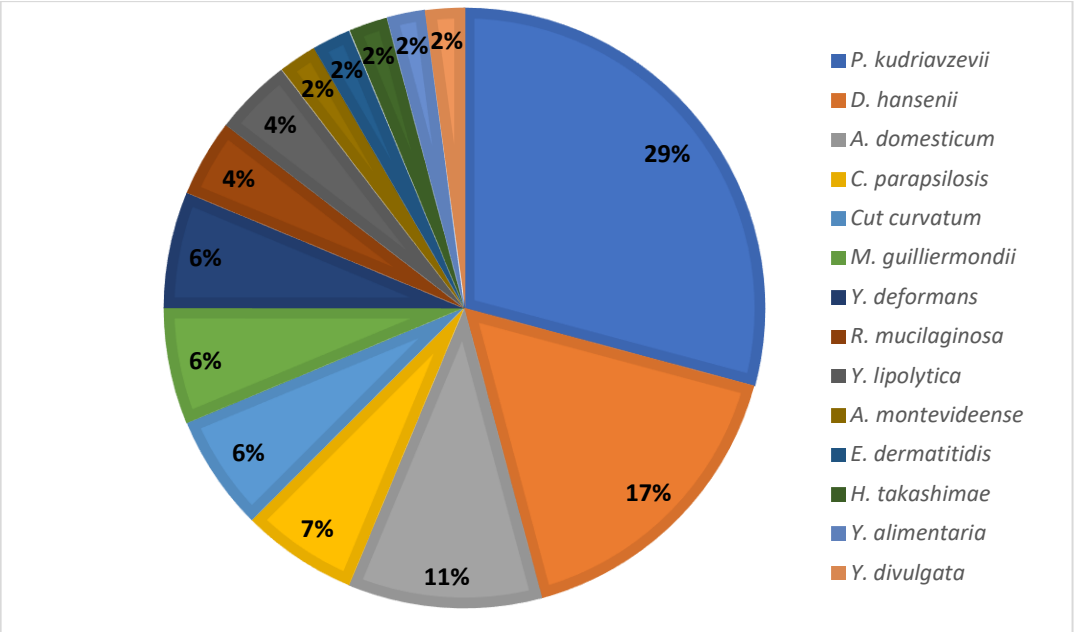
W wymazach z wątroby stwierdzono wyłącznie izolaty jednogatunkowe.

4.1.4. Drożdże izolowane z jelit

W jelitach ze 179 pobranych prób, u 41 badanych osobników odnotowano drożdże (22,9%). Uzyskano 48 izolatów pochodzących z powierzchni jelit, należących do 14 gatunków z 10 rodzajów (Tab. 10). Najczęściej występującym gatunkiem była *P. kudriavzevii* – 29,17%. Wysoki odsetek izolatów odnotowano także dla *D. hansenii* (16,67%) i *A. domesticum* (10,42%). Rzadziej stwierdzano gatunki: *C. parapsilosis, Cut. curvatum, M. guilliermondii* i *Y. deformans* – po 6,25%, natomiast *R. mucilaginosa* i *Y. lipolytica* stanowiły po 4,17% wszystkich izolatów. Pozostałe gatunki notowano jednokrotnie, co stanowiło łącznie 10,4% (Ryc. 21, Zał. 3).

Tabela 10. Drożdże stwierdzone w izolatach pochodzących z powierzchni jelit
Table 10. Yeasts stated in isolates originated from intestines surface

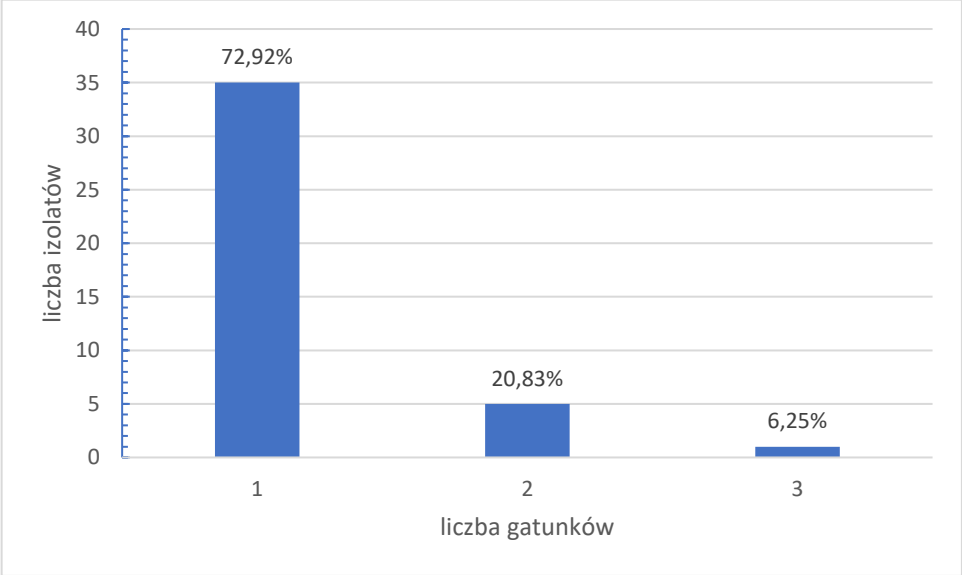
Lp.	Gatunek	Liczba izolatów	Udział %
1	*A. domesticum*	5	10,42
2	*A. montevideense*	1	2,08
	C. parapsilosis	3	6,25
4	*Cut. curvatum*	3	6,25
5	*D. hansenii*	8	16,67
6	*E. dermatitidis*	1	2,08
7	*H. takashimae*	1	2,08
8	*M. guilliermondii*	3	6,25
9	*P. kudriavzevii*	14	29,17
10	*R. mucilaginosa*	2	4,17
11	*Y. alimentaria*	1	2,08
12	*Y. deformans*	3	6,25
13	*Y. divulgata*	1	2,08
14	*Y. lipolytica*	2	4,17



Rycina 21. Drożdże wyizolowane z powierzchni jelit [%]

Figure 21. Yeasts isolated from intestines surface [%]

Izolaty jednogatunkowe stanowiły 72,92% badanych kultur, dwugatunkowe – 20,83%, zaś trzygatunkowe – 6,25% (Ryc. 22).

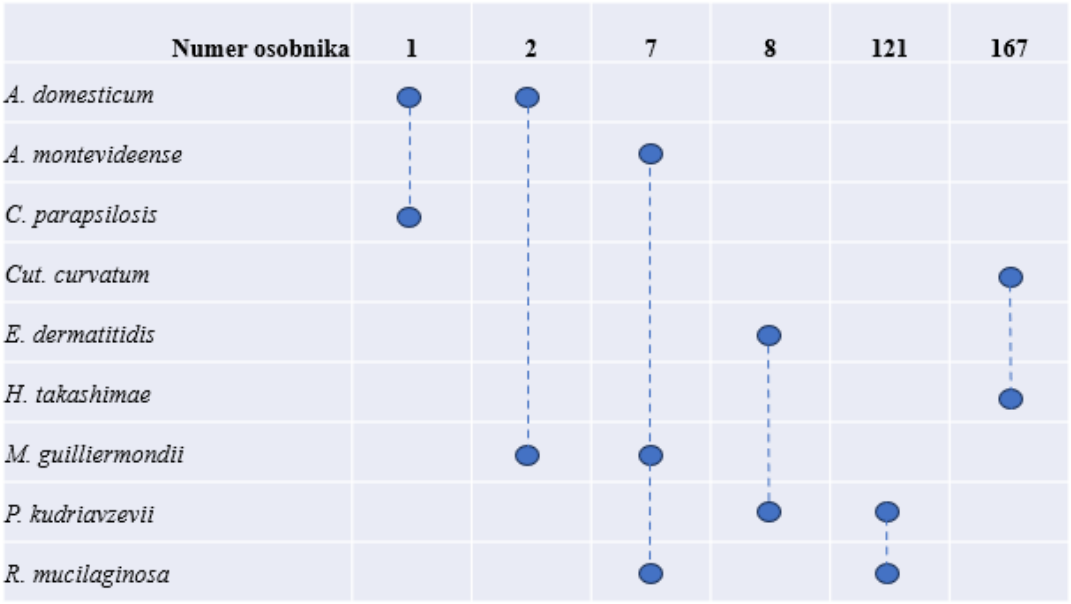


Rycina 22. Liczba izolatów jedno-, dwu- i trzygatunkowych w pysku śledzia bałtyckiego

Figure 22. Number of one, two and triple species isolates from mouth of Baltic herring

W skład izolatu trzygatunkowego wchodziły *A. montevideense*, *M. guilliermondii* i *R. mucilaginosa*. Gatunkami współwystępującymi dwukrotnie

z innymi były *A. domesticum, M. guilliermondii, P. kudriavzevii* i *R. mucilaginosa*. Pozostałe gatunki tworzyły kultury dwugatunkowe wyłącznie raz (Ryc. 23).

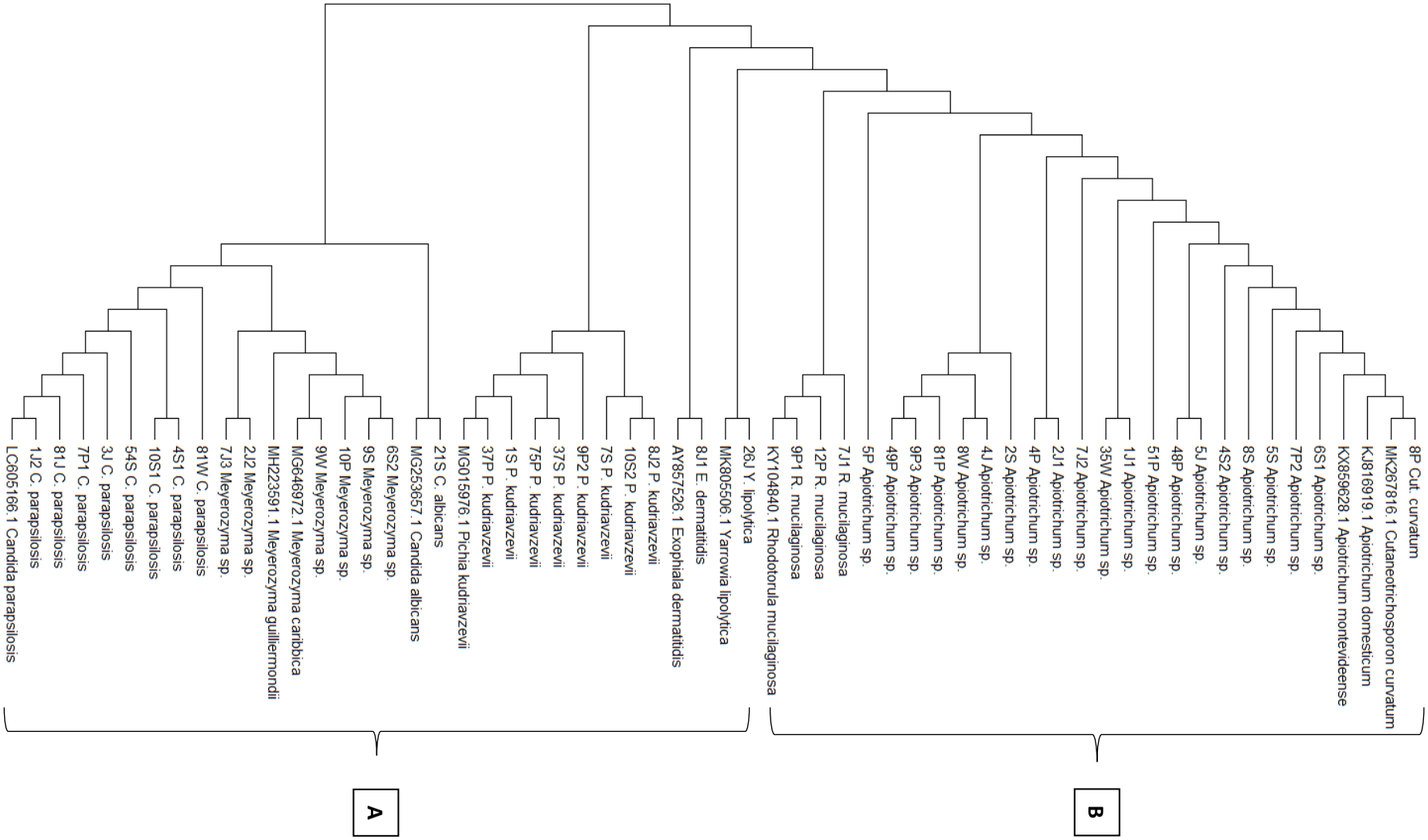


Rycina 23. Występowanie izolatów wielogatunkowych w jelitach
Figure 23. Occurrence of multispecies isolates in the intestines

4.2. Analizy molekularne uzyskanych izolatów

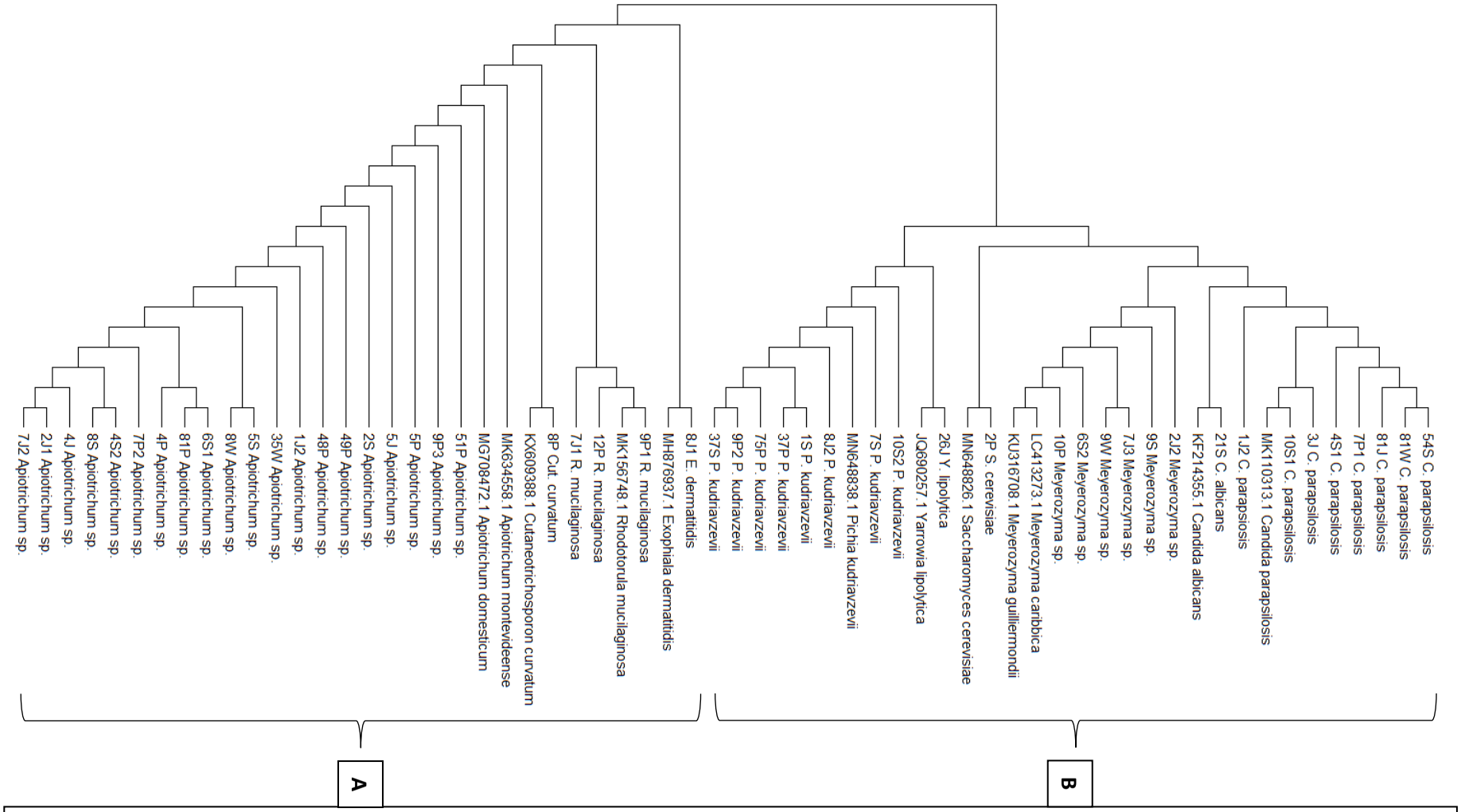
Podczas badań molekularnych łącznie uzyskano 359 sekwencji nukleotydowych. Jednego izolatu (*S. cerevisiae*) nie udało się zidentyfikować używając startera ITS5, jednak został on określony podczas analizy sekwencji D1/D2.

W celach porównawczych, do konstrukcji drzew wykorzystano sekwencje z bazy danych GenBank. Drzewo obrazujące zależności filogenetyczne pomiędzy izolatami drożdży pozyskanymi w 2016 i 2018r., na podstawie sekwencji regionu ITS zostały przedstawione na Ryc. 24, zaś w oparciu o sekwencje domen D1/D2 na Ryc. 25. Na obu drzewach widać pogrupowanie drożdży na gromady *Asco-* i *Basidiomycota*. Powiązania filogenetyczne na podstawie analizy sekwencji regionu ITS izolatów grzybów uzyskanych w grudniu 2019 roku przedstawiono na Ryc. 26 – wszystkie gatunki spoza rodzaju *Pichia* i Ryc. 27 – dla gatunków *Pichia.* Zdecydowano się na takie rozwiązanie ze względu na dużą liczbę izolatów zaliczanych do *Pichia*, co wpływało na czytelność drzew filogenetycznych.



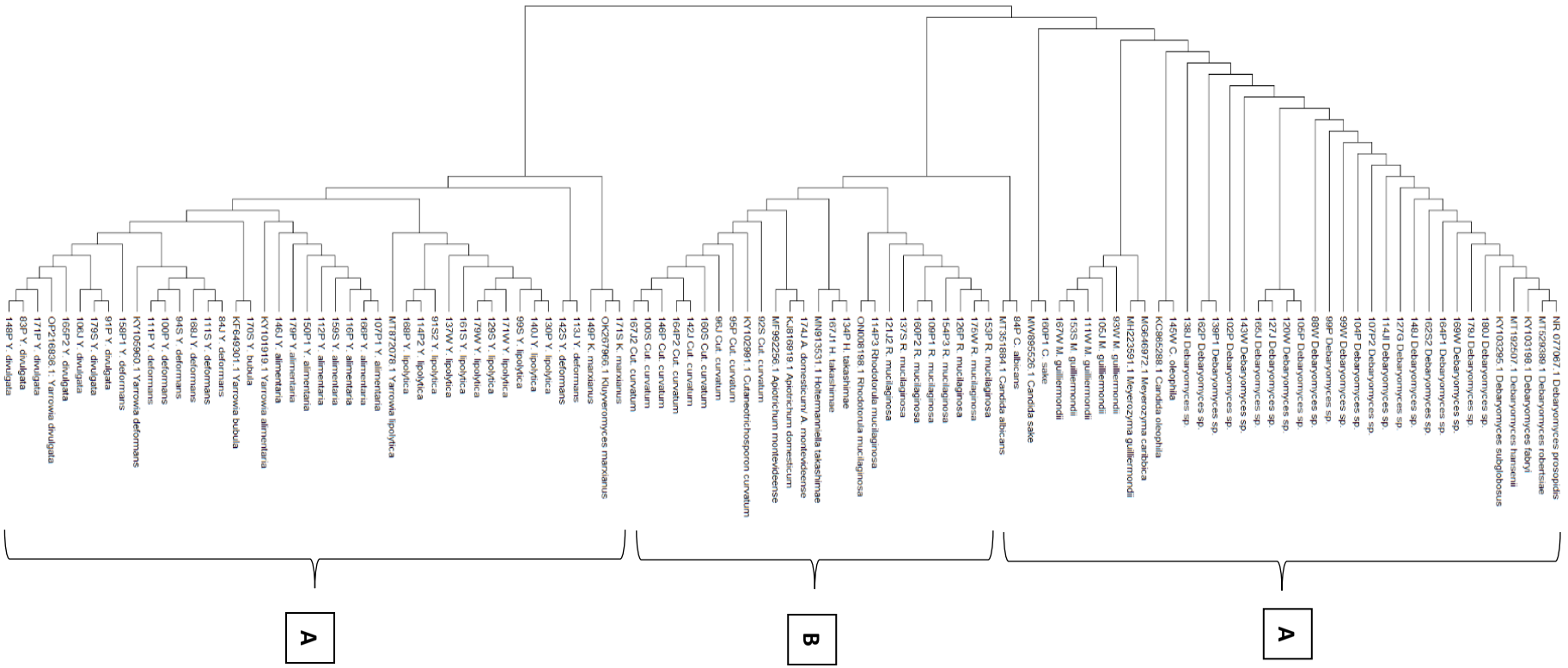
Rycina 24. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu ITS5 5.8 rDNA uzyskanych z drożdży wyizolowanych w latach 2016-2018. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 60 sekwencji (49 badanych izolatów oraz 11 sekwencji pozyskanych z GenBank; A – *Ascomycota,* B – *Basidiomycota*)

Figure 24. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS5 5.8 rDNA region obtained from yeast isolated in 2016-2018. The rooted tree was built based on 60 sequences (49 isolates tested and 11 sequences obtained from GenBank; A – *Ascomycota,* B – *Basidiomycota*)



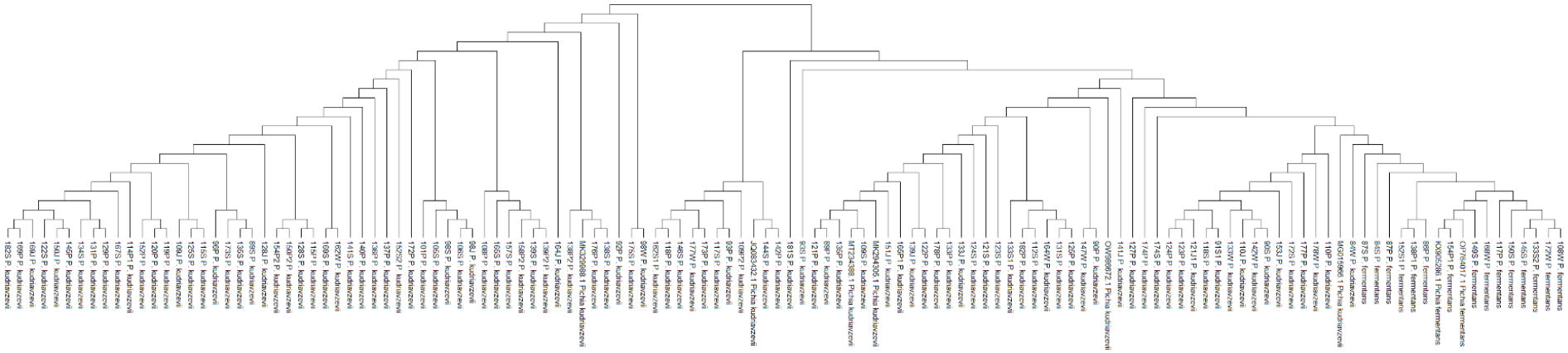
Rycina 25. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu D1/D2 dużej podjednostki rDNA uzyskanych z drożdży wyizolowanych w latach 2016-2018. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 62 sekwencji (50 badanych izolatów oraz 12 sekwencji pozyskanych z GenBank; A – *Ascomycota*, B – *Basidiomycota*)

Figure 25. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the D1/D2 region of the large rDNA subunit obtained from yeast isolated in 2016-2018. The rooted tree was built based on 62 sequences (50 isolates tested and 12 sequences obtained from GenBank; A – *Ascomycota*, B – *Basidiomycota*)



Rycina 26. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu ITS5 5.8 rDNA uzyskanych z drożdży (poza rodzajem *Pichia*) wyizolowanych w 2019 roku. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 109 sekwencji (88 badanych izolatów oraz 21 sekwencji pozyskanych z GenBank; A – *Ascomycota*, B – *Basidiomycota*)

Figure 26. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS5 5.8 rDNA region obtained from yeast (except *Pichia* genus) isolated in 2019. The rooted tree was built based on 109 sequences (88 tested isolates and 21 sequences obtained from GenBank; A – *Ascomycota*, B – *Basidiomycota*)

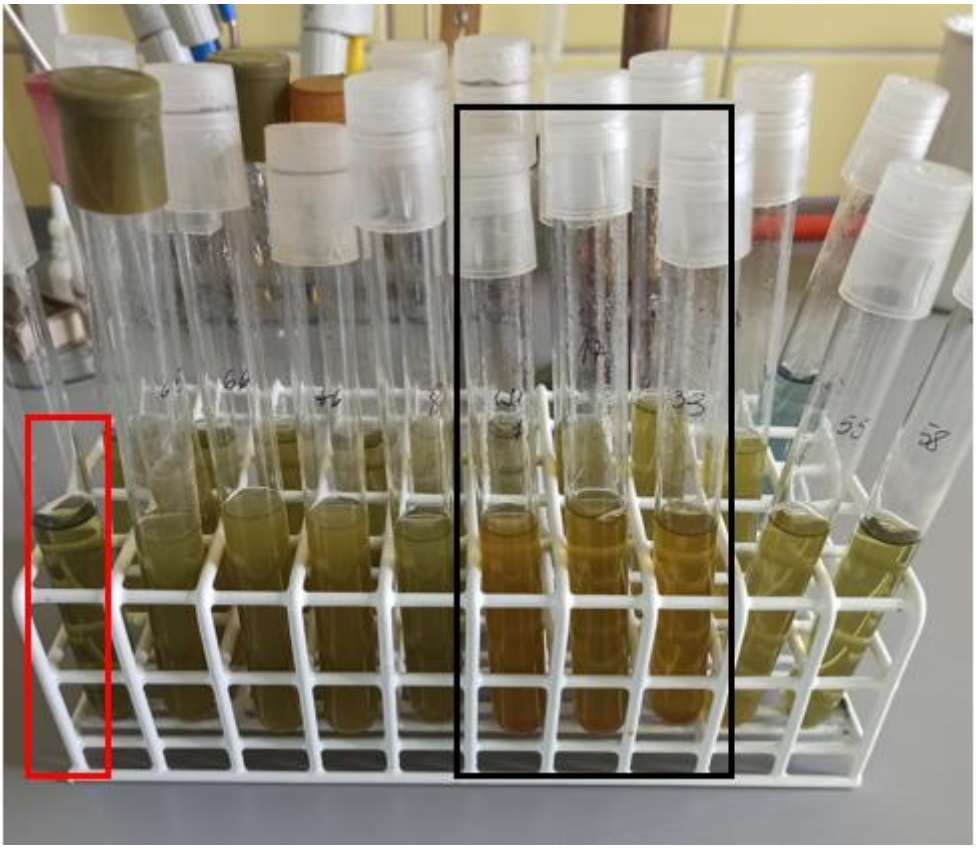


Rycina 27. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu ITS5 5.8 rDNA uzyskanych z drożdży z rodzaju *Pichia* wyizolowanych w roku 2019. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 128 sekwencji (120 badanych izolatów oraz 8 sekwencji pozyskanych z GenBank)

Figure 27. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the ITS5 5.8 rDNA region obtained from *Pichia* yeast isolated in 2019. The rooted tree was built based on 128 sequences (120 tested isolates and 8 sequences obtained from GenBank)

4.3. Uzupełniające badania biochemiczne dla gatunków z rodzaju *Apiotrichum*

W celu potwierdzenia identyfikacji uzyskanej na podstawie cech morfologicznych i analiz molekularnych, dla gatunków z rodzaju *Apiotrichum*, wykonano dodatkowe badanie zdolności biochemicznych. Analizie rozkładu glukonianu sodu poddano 21 izolatów, które zostały zidentyfikowane jako gatunki z rodzaju *Apiotrichum*. Reakcję dodatnią objawiającą się zmianą zabarwienia na pomarańczową wykazały 4 izolaty – 19%, które określono na tej podstawie jako *A. montevideense*. Z kolei jako gatunek *A. domesticum* uznano 17 izolatów – 81%, które nie posiadały zdolności do utylizacji glukonianu sodu, o czym świadczyło zabarwienie uzyskane po zagotowaniu z odczynnikiem Benedicta, zbliżone do kontroli negatywnej (Ryc. 28).

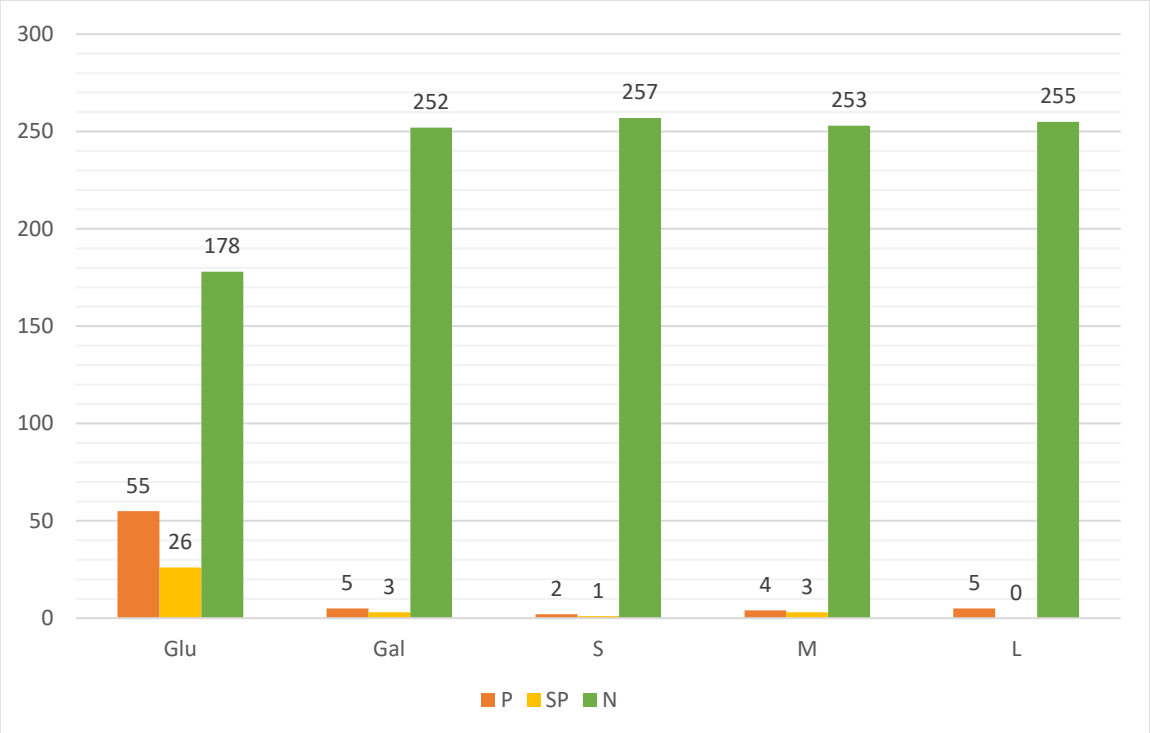


Rycina 28. Reakcje barwne rozkładu glukonianu sodu przez gatunki z rodzaju *Apiotrichum* (ramka czerwona – próba kontrolna, ramka czarna – reakcje pozytywne)
Figure 28. Color reactions of sodium gluconate decomposition by species of the genus *Apiotrichum* (red frame - control sample, black frame - positive reactions)

4.4. Ocena zdolności drożdży do fermentacji węglowodanów (zymogramy)

Najczęściej fermentowanym przez uzyskane drożdże węglowodanem była glukoza, której enzymatyczne przekształcanie przeprowadzało 81 z 260 izolatów (31,15%). W stosunku do pozostałych cukrów wykazano niewielkie zdolności fermentacyjne. Zdolność przemiany galaktozy wykazywało 8 izolatów (3,07%), maltozy – 7 (2,3%), laktozy – 5 (1,92%), a sacharozy wyłącznie 3 izolaty (1,15%; Ryc. 29, Zał. 3).

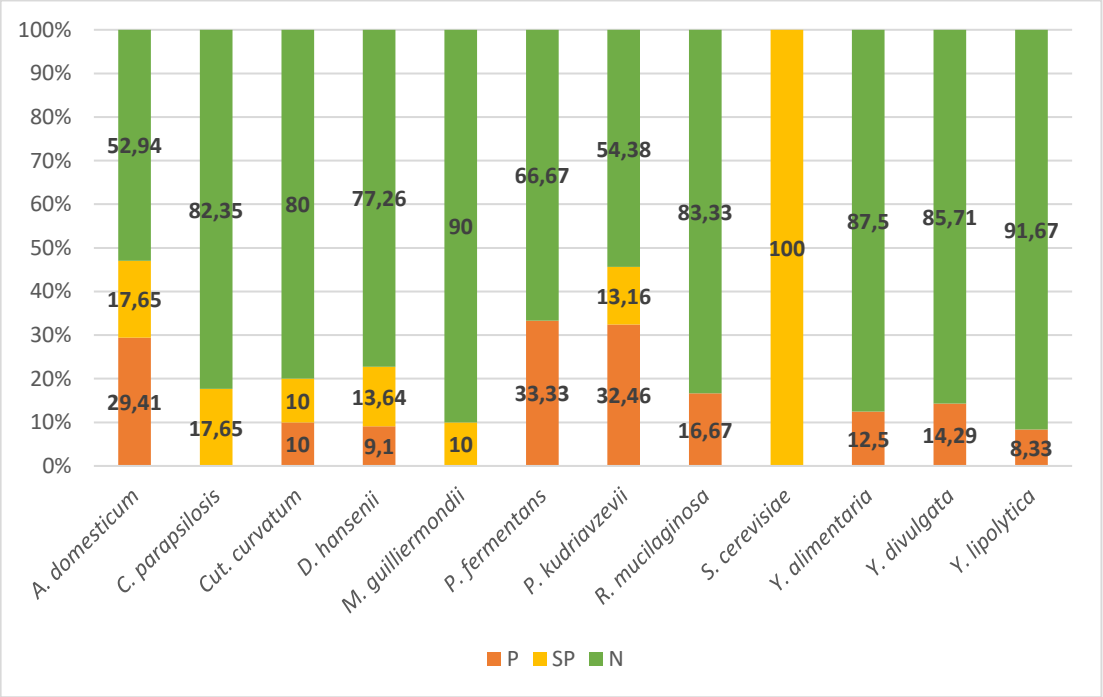
Analiza wariancji (ANOVA), przeprowadzona przy poziomie istotności 0,05, wykazała istotne statystycznie różnice pomiędzy zdolnością fermentacji glukozy, a pozostałych cukrów.



Rycina 29. Zdolności fermentacyjne izolatów drożdży (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)
Figure 29. Fermentation capacity of yeast isolates (P - positive reaction, SP - slightly positive reaction, N - negative reaction)

Gatunkami, których największy odsetek izolatów charakteryzował się dobrą lub słabą zdolnością do fermentacji glukozy były: *A. domesticum* – 47,06% (8 z 17 izolatów), *P. kudriavzevii* – 45,62% (52 ze 114 izolatów) oraz *P. fermentans* – 33,33% (5 z 15

izolatów), a także jedyny uzyskany izolat *S. cerevisiae* (100%). Rzadziej proces przekształcania glukozy do alkoholu i dwutlenku węgla przeprowadzały: *C. parapsilosis* – 25% (2 z 8 izolatów), *D. hansenii* – 22,74% (5 z 22 izolatów), *Cut. curvatum* – 20% (2 z 10 izolatów) i *R. mucilaginosa* – 16,67% (2 z 12 izolatów). Zdolności fermentacyjne względem glukozy miały także pojedyncze izolaty: *M. guilliermondii*, *Y. alimentaria*, *Y. divulgata* i *Y. lipolytica* (Ryc. 30, Zał. 3).



Rycina 30. Zdolności fermentacji glukozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)
Figure 30. Glucose fermentation capacity of particular yeast species [%] (P - positive reaction, SP - slightly positive reaction, N - negative reaction)

Fermentację galaktozy przeprowadzały: 2 izolaty *A. domesticum* i *D. hansenii* (odpowiednio 11,76% i 9,1%) oraz 1 izolat: *Cut. curvatum* (10%), *M. guilliermondii* (10%), *R. mucilaginosa* (8,33%) i *P. kudriavzevii* (0,88%). Z kolei sacharozę przekształcały enzymatycznie: *M. guilliermondii* (10%), *R. mucilaginosa* (8,33%) i *P. kudriavzevii* (0,88%) – po 1 izolacie. Maltoza była fermentowana przez 2 izolaty *C. parapsilosis* (12,5%) i *D. hansenii* (9,1%) oraz jeden izolat *P. fermentans* (6,67%) i *P. kudriavzevii* (0,88%), zaś laktoza przez 3 izolaty *P. kudriavzevii* (2,63%) oraz po 1 izolacie *Y. lipolytica* (14,29%) i *R. mucilaginosa* (8,33%; Ryc. 31, Zał. 3).

Analiza wariancji (ANOVA) nie wykazała różnic istotnych statystycznie (α=0,05) w zdolności fermentacji cukrów przez poszczególne izolaty drożdży.



Rycina 31. Zdolności fermentacji galaktozy, sacharozy, maltozy i laktozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna,
N – reakcja negatywna)

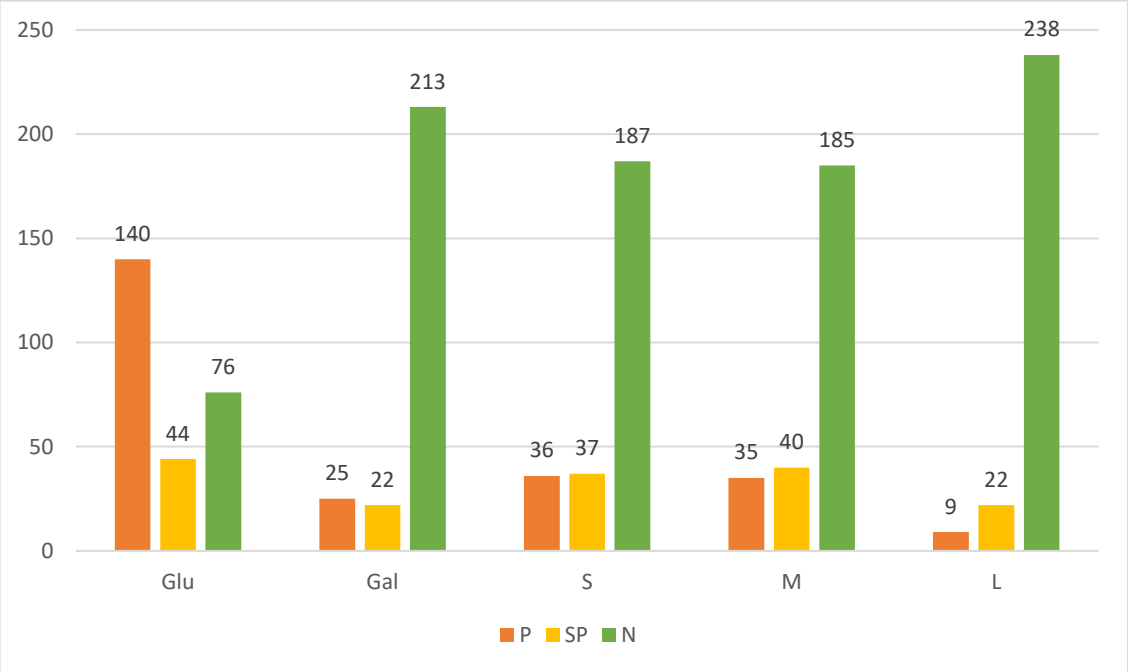
Figure 31. Fermentation capacity of galactose, sucrose, maltose and lactose by particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N – negative reaction)

4.5. Ocena zdolności drożdży do asymilacji węglowodanów (auksanogramy)

Drożdże najczęściej charakteryzowała dobra lub słaba zdolność do asymilacji glukozy – 184 izolaty (70,77%). Rzadziej przyswajanymi cukrami były: maltoza – 75

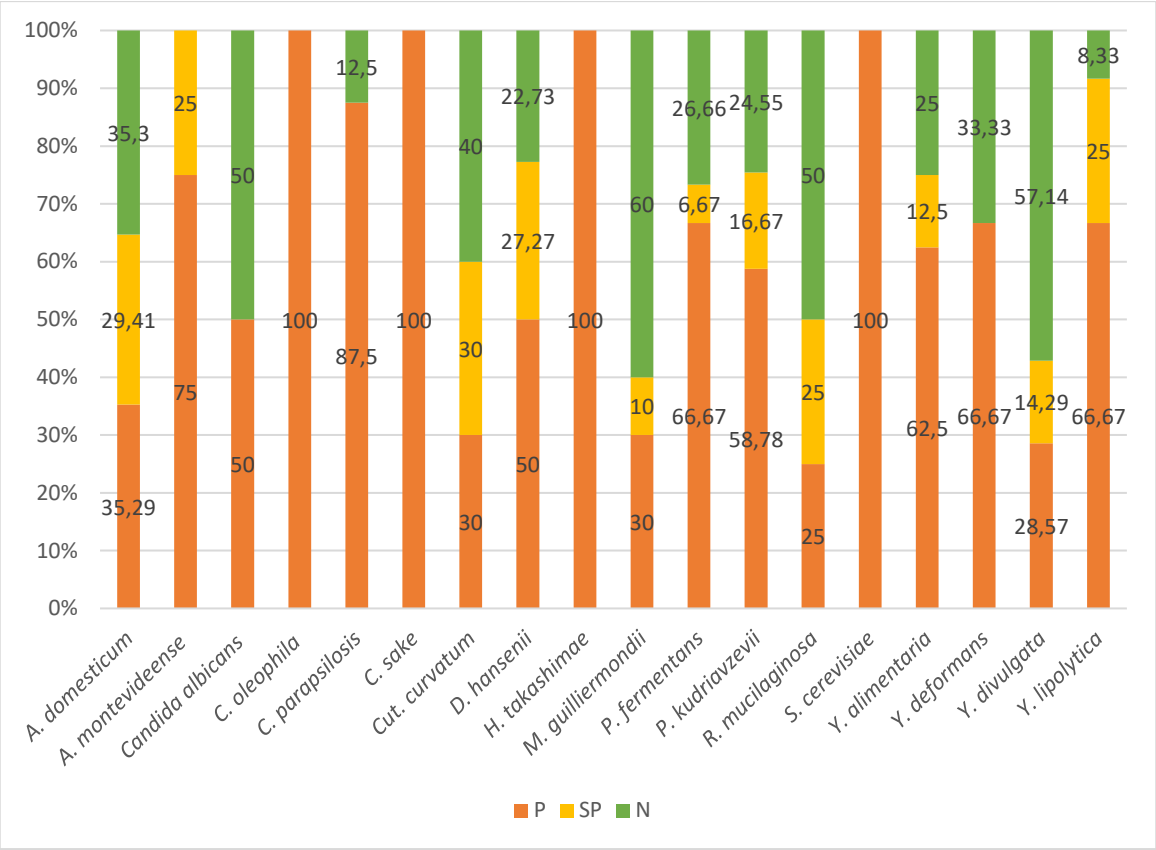
izolatów (28,85%), sacharoza – 73 izolaty (28,08%) i galaktoza – 47 izolatów (18,08%). Laktozę asymilowało jedynie 31 izolatów (11,92%; Ryc. 32, Zał. 3).

Istotne statystycznie różnice pomiędzy zdolnością asymilacji glukozy, a pozostałych cukrów (p=0,00) wykazano przeprowadzając analizę wariancji (ANOVA) przy poziomie istotności 0,05.



Rycina 32. Zdolności asymilacyjne izolatów drożdży (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)
Figure 32. Assimilation capacity of yeast isolates (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N – negative reaction)

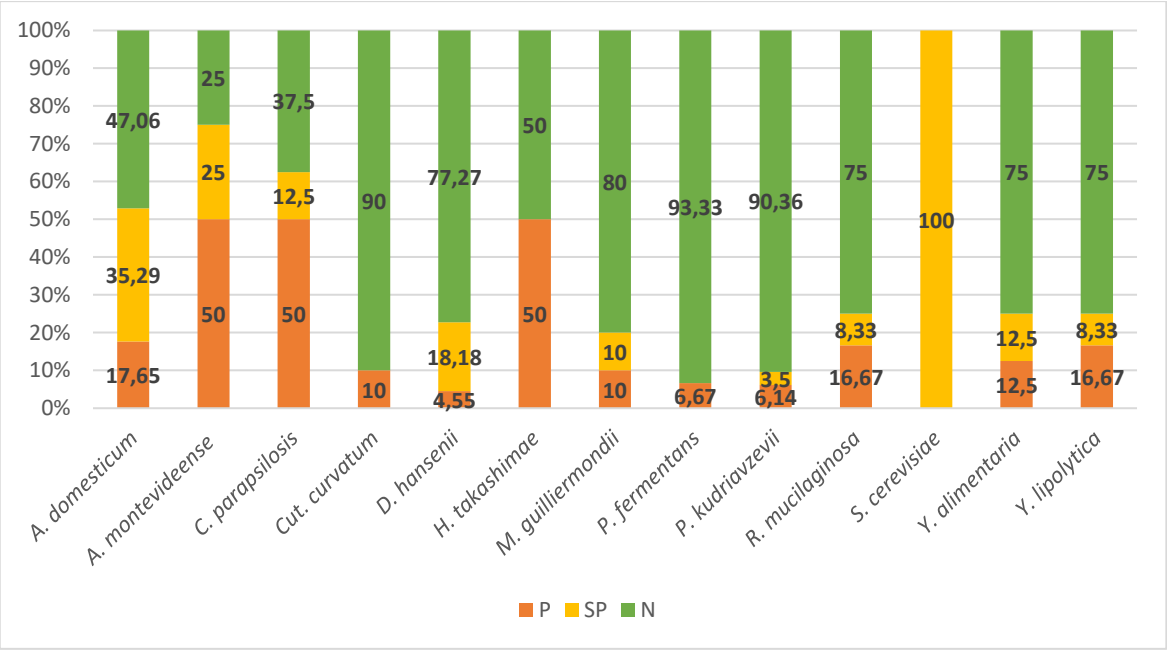
Zdolność do asymilacji glukozy miały izolaty: *C. oleophila, C. sake, H. takashimae, S. cerevisiae* i *A. domesticum* – 100% wszystkich uzyskanych izolatów. Nieco mniejszą przyswajalność tego cukru wykazywały: *Y. lipolytica* – 97,67%, *C. parapsilosis* – 87,5%, *D. hansenii* – 77,27%, *P. kudriavzevii* – 75,45%, *Y. alimentaria* – 75%, *P. fermentans* –73,34%, *Y. deformans* – 66,67%, *A. domesticum* – 64,71%, *Cut. curvatum* – 60% oraz *C. albicans* i *R. mucilaginosa* – po 50% wszystkich uzyskanych izolatów. Asymilację glukozy obserwowano także u 40% izolatów *Y. divulgata* i *M. guilliermondii* (Ryc. 33, Zał. 3).



Rycina 33. Zdolności asymilacji glukozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)

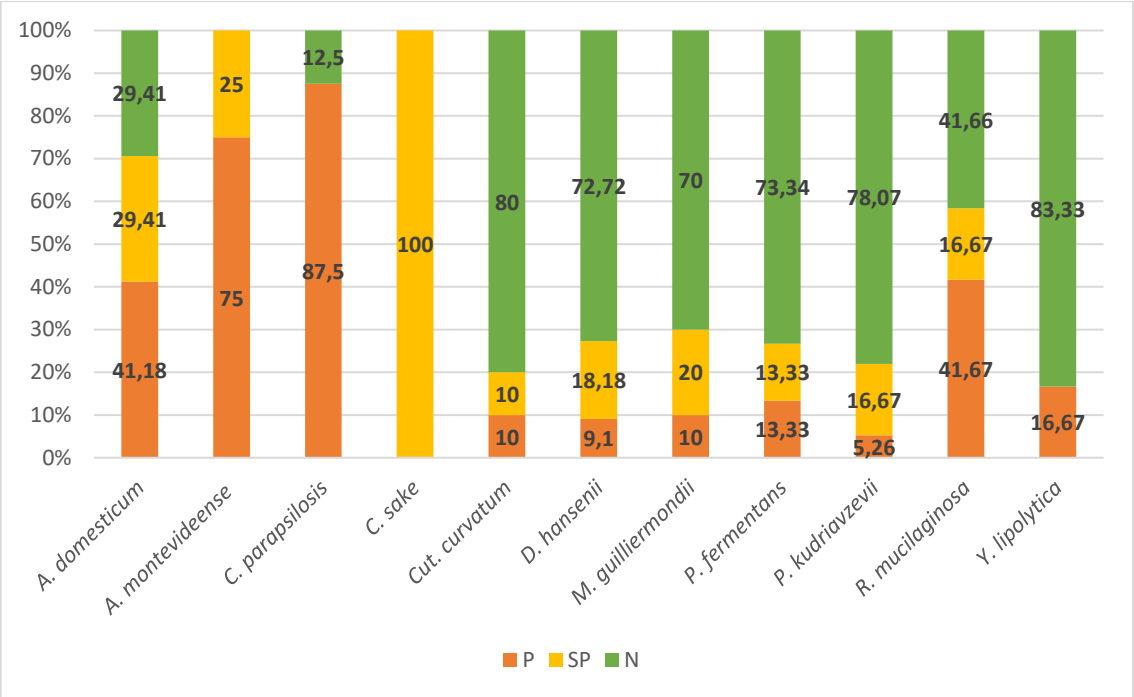
Figure 33. Glucose assimilation capacity of particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N – negative reaction)

Galaktoza była przyswajana przez izolaty należące do 13 gatunków. Najczęściej ten węglowodan asymilowały izolaty *S. cerevisiae* – 100%, *A. montevideense* – 75%, *C. parapsilosis* – 72,5%, *A. domesticum* – 52,94% i *H. takashimae* – 50% wszystkich uzyskanych. Rzadziej zdolność tę wykazywały *R. mucilaginosa*, *Y. alimentaria* i *Y. lipolytica* – po 25%, *D. hansenii* – 22,73% i *M. guilliermondii* – 20% wszystkich uzyskanych izolatów. Rzadko asymilację galaktozy przeprowadzały *Cut. curvatum* – 10%, *P. kudriavzevii* – 9,64% i *P. fermentans* – 6,67% badanych izolatów (Ryc. 34, Zał. 3).



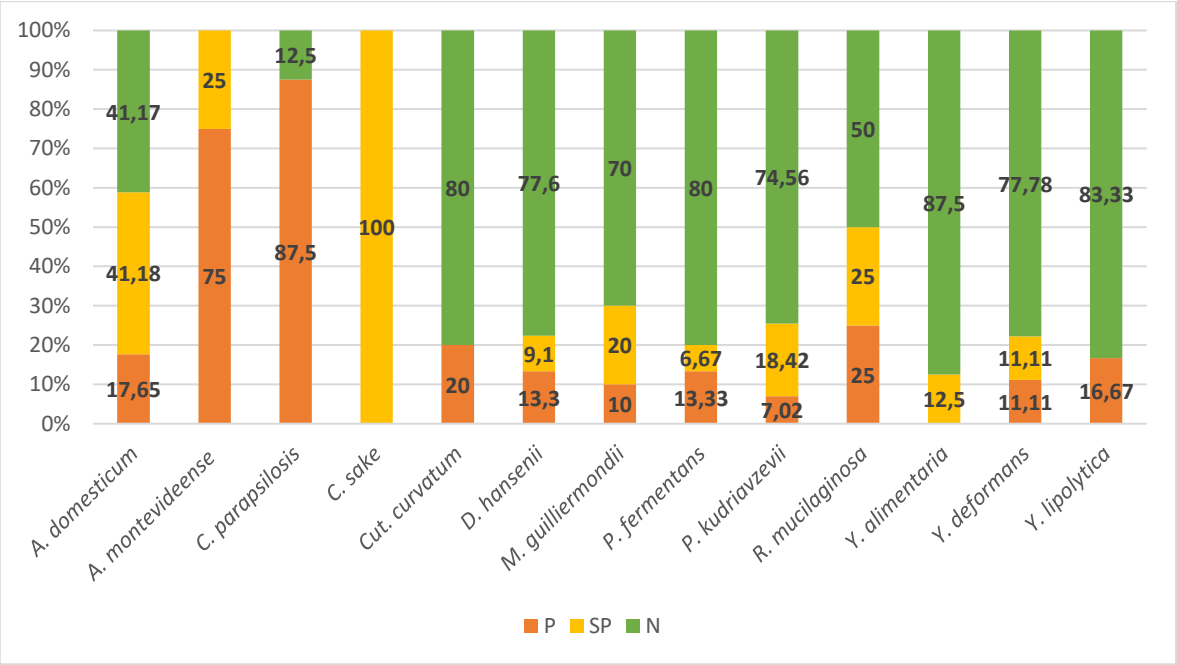
Rycina 34. Zdolności asymilacji galaktozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)
Figure 34. Galactose assimilation capacity of particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – weakly positive reaction, N – negative reaction)

Sacharoza była przyswajana przez izolaty należące do 11 gatunków drożdży. Najwyższy stopień asymilacji sacharozy wykazywały: *A. montevideense* i *C. sake* – 100%, *C. parapsilosis* – 87,5%, *A. domesticum* –70,55% i *R. mucilaginosa* – 58,34% uzyskanych izolatów. Rzadziej cukier ten był przyswajany przez *M. guilliermondii* – 30%, *D. hansenii* – 27,28%, *P. fermentans* – 26,66%, *P. kudriavzevii* – 21,93%, *Cut. curvatum* – 20%, zaś najrzadziej przez izolaty *Y. lipolytica* – 16,67% wszystkich izolatów (Ryc. 35, Zał. 3).



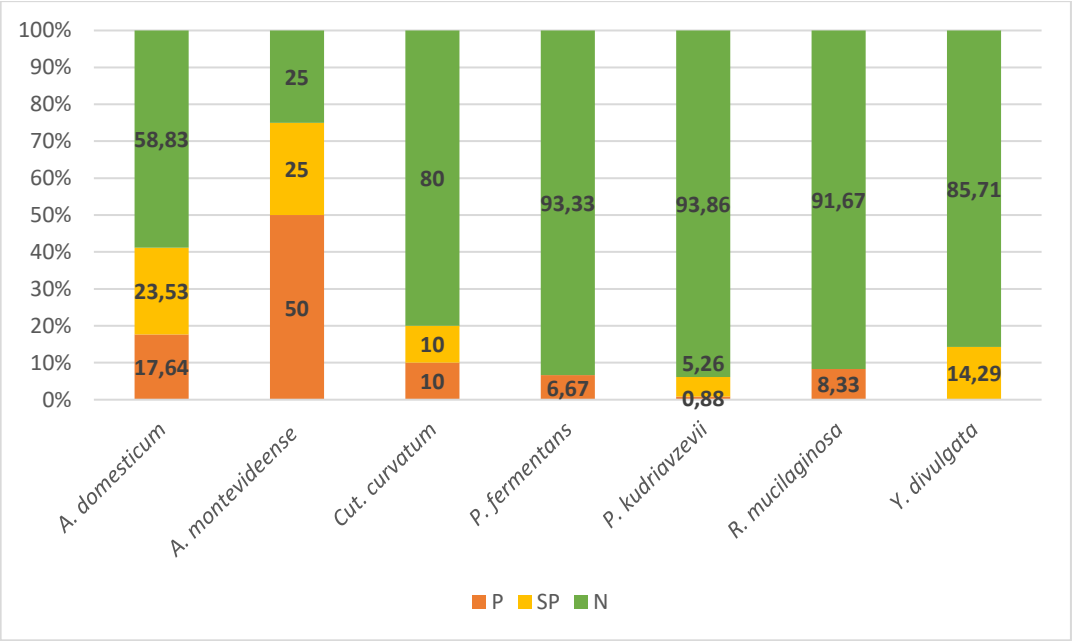
Rycina 35. Zdolności asymilacji sacharozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)
Figure 35. Sucrose assimilation capacity of particular yeast species (P – positive reaction, SP – weakly positive reaction, N – negative reaction)

Z kolei maltoza asymilowana była w największym stopniu przez *A. montevideense* i *C. sake* – po 100% izolatów, *C. parapsilosis* – 87,5%, *A. domesticum* – 58,83% i *R. mucilaginosa* – 50%. Rzadziej maltozę przyswajały *M. guilliermondii* – 30%, *P. kudriavzevii* – 25,44%, *P. fermentans* – 22,43%, *D. hansenii* – 22,4%, *Y. deformans* – 22,22% i *Cut. curvatum* – 20% wszystkich izolatów. W najmniejszym stopniu cukier ten asymilowały *Y. lipolytica* – 16,67% i *Y. alimentaria* – 12,5% wszystkich izolatów (Ryc. 36, Zał. 3).



Rycina 36. Zdolności asymilacji maltozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)
Figure 36. Maltose assimilation capacity of particular yeast species (P – positive reaction, SP – weakly positive reaction, N – negative reaction)

Zdolność do przyswajania laktozy wykazywały drożdże należące do 7 gatunków. Najwyższy stopień asymilacji laktozy posiadały: *A. montevideense* – 75% i *A. domesticum* – 41,17% wszystkich uzyskanych izolatów. Węglowodan ten rzadziej przyswajały: *Cut. curvatum* – 20%, *Y. divulgata* – 14,29% wszystkich izolatów. Laktoza była asymilowana w najmniejszym stopniu przez *R. mucilaginosa* – 8,33%, *P. fermentans* – 6,67% i *P. kudriavzevii* – 6,14% wszystkich izolatów (Ryc. 37, Zał. 3).

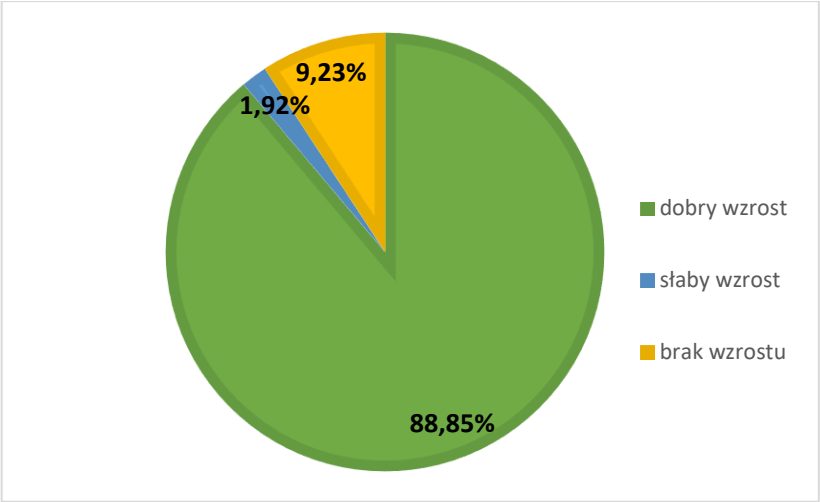


Rycina 37. Zdolności asymilacji laktozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna)
Figure 37. Lactose assimilation capacity of particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N – negative reaction)

Izolaty identyfikowane jako *E. dermatitidis*, *K. marxianus*, *M. caribbica* i *Y. bubula* nie wykazywały zdolności do przyswajania żadnego z badanych węglowodanów.

4.6. Ocena zdolności badanych izolatów do wzrostu w 37°C

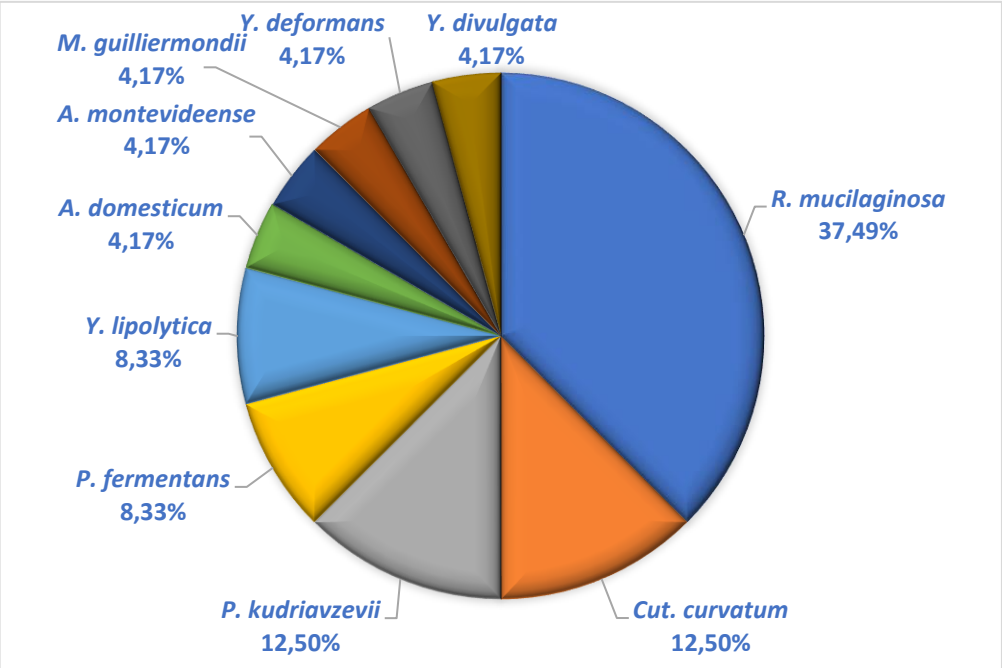
Spośród 260 analizowanych izolatów, 231 wykazywało wzrost w temperaturze 37°C, co stanowiło 88,85% wszystkich. Słaby wzrost prezentowało 5 izolatów – 1,92%, zaś 24 nie rosły w podwyższonej temperaturze inkubacji – 9,23% (Ryc. 38, Zał. 3).



Rycina 38. Zdolność wzrostu uzyskanych izolatów drożdży w 37°C [%]

Figure 38. Growth capacity of yeast isolates obtained at 37°C [%]

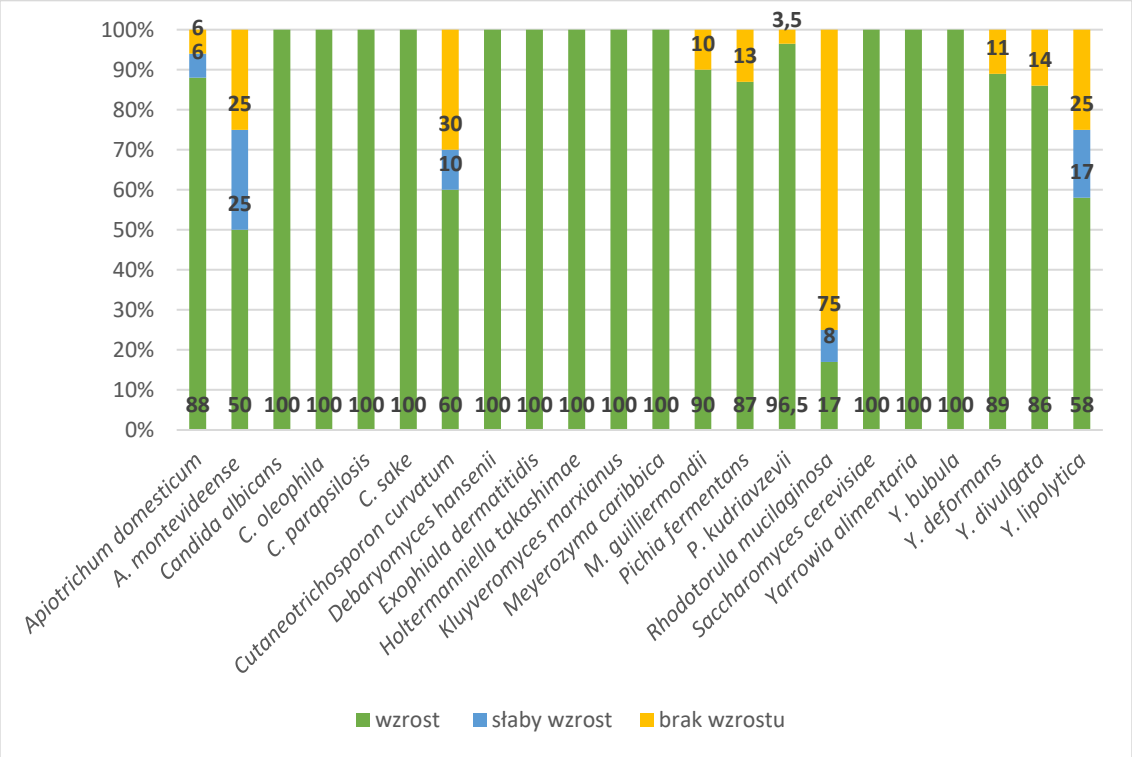
Spośród izolatów, które nie posiadały zdolności do wzrostu w temperaturze 37°C największy odsetek stanowiła *R. mucilaginosa* – 37,49%, mniejszy *Cut. curvatum* i *P. kudriavzevii* – po 12,5%. Izolaty zidentyfikowane jako *P. fermentans* i *Y. lipolytica* stanowiły po 8,33% wszystkich izolatów nie mających zdolności do wzrostu w podwyższonej temperaturze, zaś *A. domesticum*, *A. montevideense*, *M. guilliermondii*, *Y. deformans* i *Y. lipolytica* po 4,17% każdy (Ryc. 39).



Rycina 39. Gatunki drożdży nie wykazujące wzrostu w temperaturze 37°C [%]

Figure 39. Yeast species not growing at 37°C [%]

Zdolności do wzrostu w temperaturze 37°C najczęściej nie miały izolaty określone jako *R. mucilaginosa* – 75% (9 z 12 izolatów). Rosnąć w podwyższonej temperaturze nie potrafiło także 30% izolatów *Cut. curvatum* oraz po 25% *A. montevideense* oraz *Y. lipolytica* (Ryc. 40).



Rycina 40. Zdolność izolatów drożdży do wzrostu w temperaturze 37°C

Figure 40. Ability of yeast isolates to grow at 37°C

4.7. Ocena skuteczności identyfikacji wybranych izolatów drożdży na podstawie testów API 20C AUX

Identyfikacja izolatów przy użyciu metod molekularnych została wykorzystana jako złoty standard do porównania skuteczności identyfikacji przy użyciu testów API 20C AUX firmy bioMérieux. Z 22 wybranych do analizy izolatów prawidłowo określono przynależność gatunkową trzech – *C. parapsilosis, R. mucilaginosa* i *M. guilliermondii* (dawna nazwa: *Candida guilliermondii*), co stanowiło 13,63% wszystkich badanych izolatów (Tab. 11, Zał. 4). Trzy izolaty udało się także zidentyfikować do rodzaju – *A. domesticum* został oznaczony jako *Trichosporon inkin* (*Trichosporon* – poprzednia nazwa rodzaju *Apiotrichum*), zaś *C. albicans* i *C. oleophila* jako *C. krusei* lub *C. incospicua*. Dla 27,27% badanych izolatów w ogóle nie znaleziono profilu numerycznego w katalogu producenta (Analytical Profile Index, bioMérieux).

Tabela 11. Identyfikacja gatunkowa drożdży na podstawie testów API 20C AUX w porównaniu z metodami molekularnymi

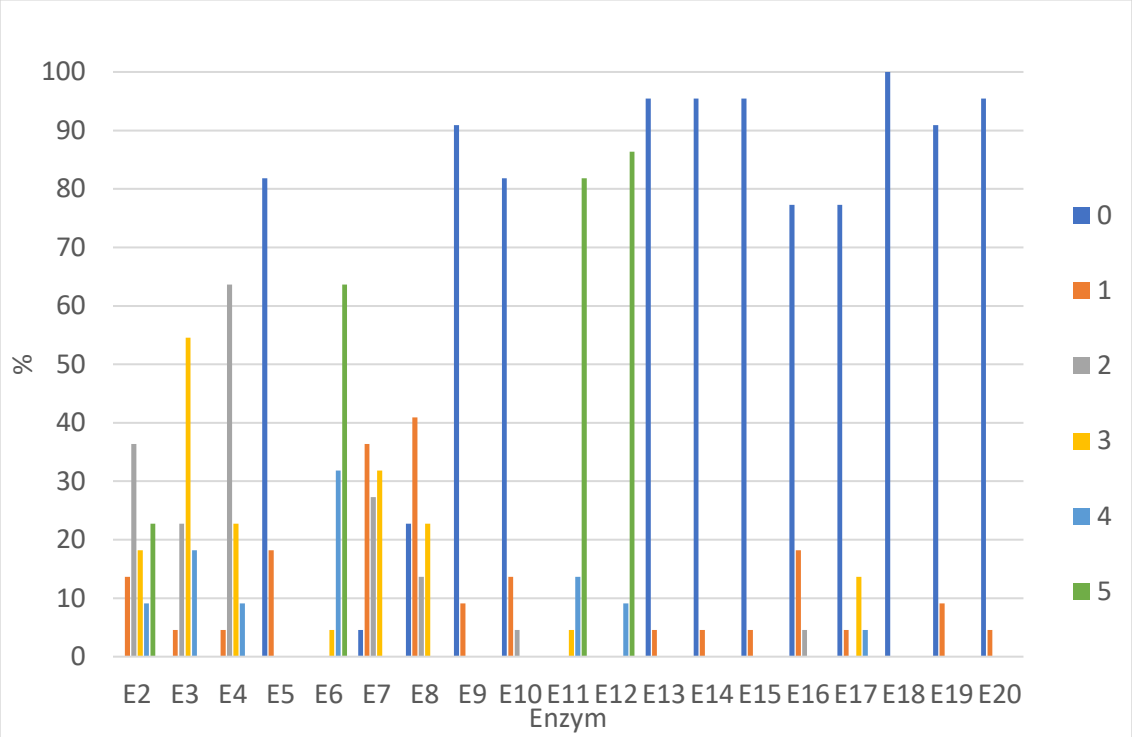
Table 11. Yeast species identification based on API 20C AUX tests compared to molecular methods

Oznaczenie izolatu	**Gatunek zidentyfikowany na podstawie sekwencji nukleotydowej**	**Gatunek zidentyfikowany na podstawie klucza do testów API 20C AUX**
174J	*A. domesticum*	–
6S1	*A. montevideense*	*T. inkin*
21S	*C. albicans*	*C. krusei/ C. incospicua*
145W	*C. oleophila*	*C. krusei/ C. incospicua*
7P1	*C. parapsilosis*	*C. parapsilosis*
160P1	*C. sake*	–
8P	*Cut. curvatum*	*C. parapsilosis*
165J	*Debaryomyces sp.*	–
8J1	*E. dermatitidis*	*Rhodotorula* sp.
134P	*H. takashimae*	–
149P	*K. marxianus*	*C. krusei/ C. incospicua*
10P	*M. caribbica*	*C. krusei/ C. incospicua*
7J3	*M. guilliermondii*	*C. guilliermondii*
133S2	*P. fermentans*	–
75P	*P. kudriavzevii*	*C. parapsilosis*
7J1	*R. mucilaginosa*	*R. mucilaginosa*
2P	*S. cerevisiae*	*C. guilliermondii*
146J	*Y. alimentaria*	*C. zeylanoides*
170S	*Y. bubula*	–
94S	*Y. deformans*	*C. krusei/ C. incospicua*
179S	*Y. divulgata*	*Cryptococcus humicolus*
26J	*Y. lipolytica*	*C. krusei/ C. incospicua*

4.8. Ocena aktywności enzymatycznej wybranych izolatów drożdży

Badane izolaty drożdży wykazywały najwyższą aktywność hydrolityczną dla fosfohydrolazy naftolowej AS-BI – średnio 4,86±0,24 w przyjętej skali, fosfatazy kwaśnej – 4,77±0,37 oraz arylamidazy leucynowej – 4,59±0,2. Wysoką aktywność stwierdzono także dla fosfatazy zasadowej – 2,91±1,18, esterazy (C4) – 2,86±0,56 i lipazy esterazowej (C8) – 2,36±0,59. Średni poziom arylamidazy walinowej wynosił 1,86±0,8, zaś arylamidazy cystynowej – 1,36±0,92. Niewielką aktywność zanotowano dla β-glukozydazy – 0,63±0,98, α-glukozydazy – 0,27±0,42, a dla α-chymotrypsyny –

0,23±0,37. Dla pozostałych testowanych enzymów notowano tylko pojedyncze przypadki lub nie stwierdzano aktywności (Ryc. 41, Zał. 5).

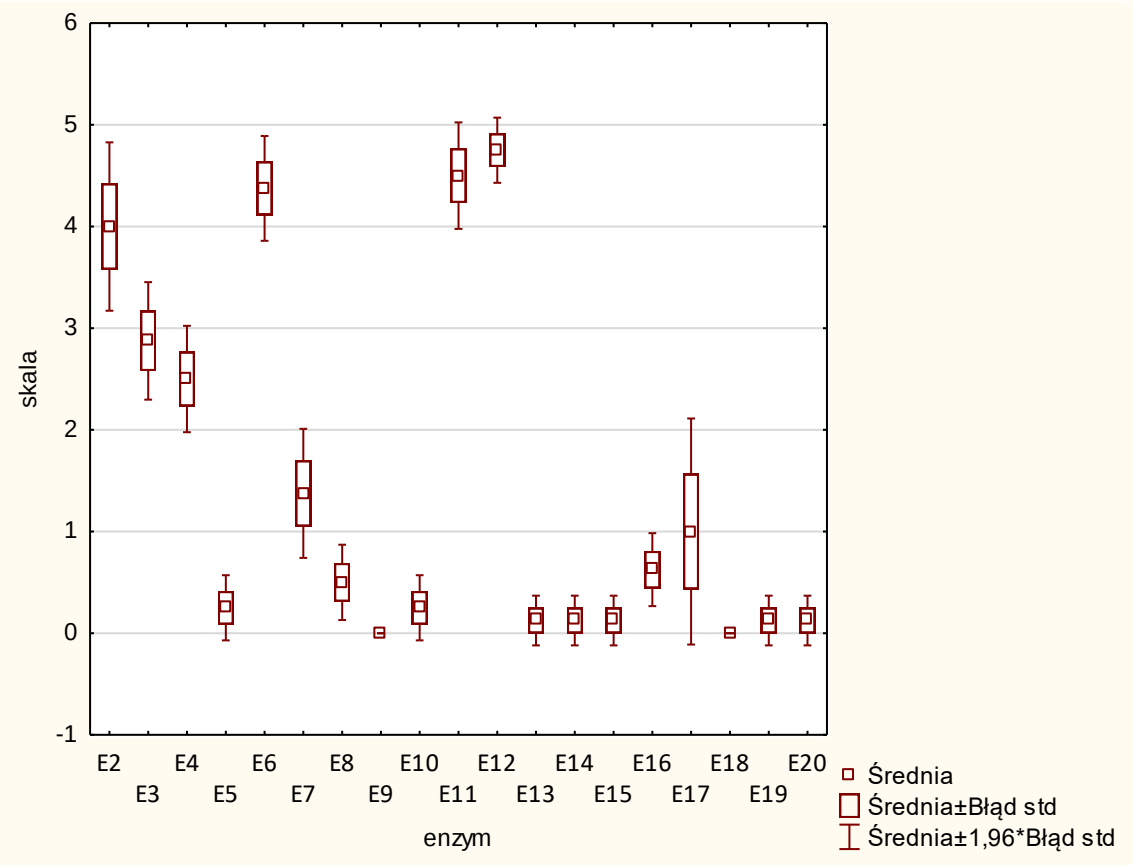


E2 – fosfataza zasadowa
E3 – esteraza (C4)
E4 – lipaza esterazowa (C8)
E5 – lipaza (C14)
E6 – arylamidaza leucynowa
E7 – arylamidaza walinowa
E8 – arylamidaza cystynowa
E9 – trypsyna
E10 –α- chymotrypsyna
E11 – fosfataza kwaśna
E12 – fosfohydrolaza naftolowa AS-BI
E13 – α-glukozydaza
E14 – β-galaktozydaza
E15 – β-glukoronidaza
E16– α-glukozydaza
E17 – β-glukozydaza
E18 – N-acetylo-β-glukozyloaminidaza
E19 – α-mannozydaza
E20 – α-fukozydaz

Rycina 41. Aktywność enzymatyczna wybranych drożdży ze śledzia bałtyckiego (0-5 – skala określająca aktywność enzymów w nanomolach hydrolizowanego substratu)
Figure 41. Enzymatic activity of selected yeasts from Baltic herring (0-5 – a scale specifying enzyme activity in nanomoles of hydrolyzed substrate)

Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy aktywnością poszczególnych enzymów (Ryc. 42). Największe różnice aktywności wykazano pomiędzy fosfohydrolazą naftolową AS-BI, a N-acetylo-β-glukozyloaminidazą ($p=0,0008$) i trypsyną ($p=0,0008$). Natomiast najmniejsze różnice, jednak wciąż istotne statystycznie występowały pomiędzy fosfatazą zasadową, a α-glukozydazą ($p=0,0197$),

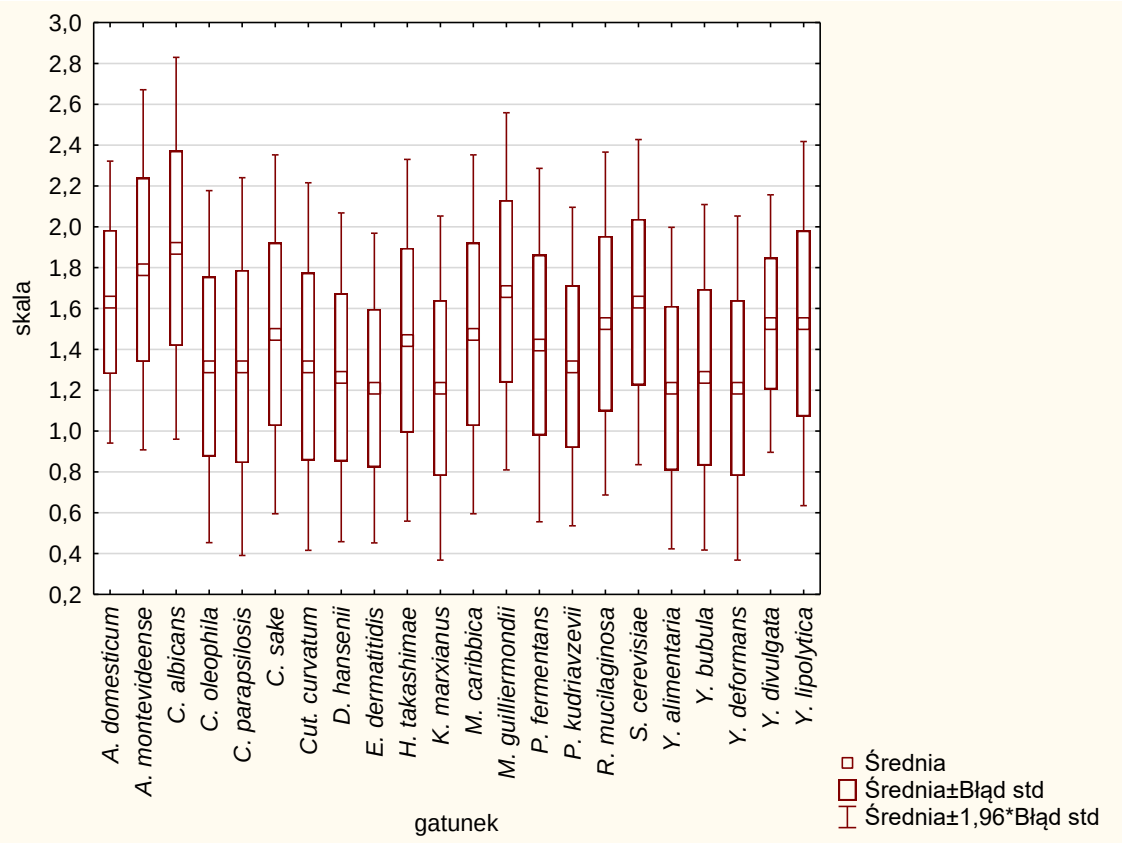
α-galaktozydazą (p=0,0197), β-galaktozydazą (p=0,0197), β-glukoronidazą (p=0,0197), α-mannozydazą (p=0,0197) i α-fukozydazą (p=0,0197) oraz między fosfatazą kwaśną a lipazą (p=0,0197) i α-chymotrypsyną (p=0,0197).



Rycina 42. Różnice w aktywności enzymatycznej badanych izolatów drożdży

Figure 42. Differences in the enzymatic activity of the tested yeast isolates

Najwyższą aktywność hydrolityczną obserwowano u izolatów *C. albicans* i *A. montevideense*. Nieco słabsze zdolności enzymatyczne charakteryzowały *M. guilliermondii*, *A. domesticum* i *S. cerevisiae*. Z kolei najsłabszą aktywność enzymatyczną wykazywały gatunki *D. hansenii*, *E. dermatitidis* i *K. marxianus*. Analiza wariancji dotycząca aktywności enzymatycznej nie wykazała różnic istotnych statystycznie (α=0,05) pomiędzy poszczególnymi izolatami drożdży (p=0,084, Ryc. 43).

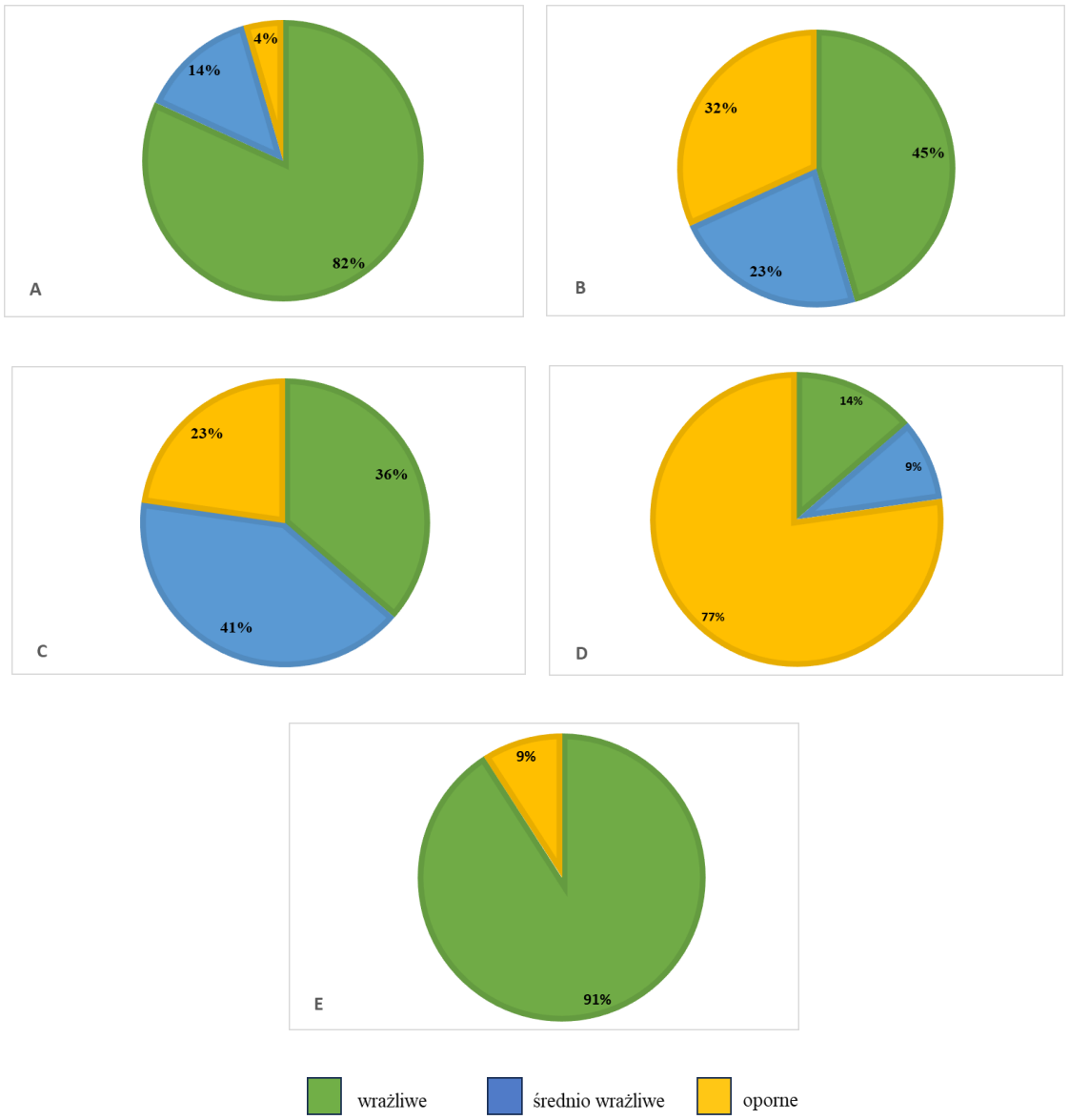


Rycina 43. Różnice aktywności enzymatycznej pomiędzy badanymi gatunkami drożdży
Figure 43. Differences in enzymatic activity between the tested yeast species

4.9. Ocena lekowrażliwości wybranych izolatów drożdży

Stwierdzono wyraźne różnice w lekowrażliwości grzybów wyizolowanych z badanych ontocenoz śledzi. Różnice dotyczyły stopnia i charakteru wrażliwości na testowane antymykotyki. Najwięcej izolatów opornych drożdży zanotowano w przypadku itrakonazolu – 77,27%. Znacznie mniej opornych odnotowano w przypadku amfoterycyny B – 31,82% i flukonazolu – 22,73%. Badane izolaty drożdży były najbardziej wrażliwe na worikonazol – 90,91% oraz 5-flucytozynę – 81,82%. (Ryc. 44, Zał. 6).

Przy użyciu analizy wariancji (ANOVA) wykazano różnice istotne statystycznie, przy poziomie istotności 0,05, pomiędzy wrażliwością izolatów drożdży na 5-fluzytozynę i flukonazol (p=0,041), 5-flucytozynę i itrakonazol (p=0,019), flukonazol i worikonazol (p=0,0025) oraz itrakonazol i worikonazol (p=0,0098).



Rycina 44. Lekowrażliwość [%] drożdży odnotowanych u śledzi: A – 5-flucytozyna, B – amfoterycyna B, C – flukonazol, D – itrakonazol, E – worikonazol

Figure 44. Drug-susceptibility [%] of yeasts noted in herrings: A – 5-flucytosine, B – amphotericin B, C – fluconazole, D – itraconazole, E – voriconazole

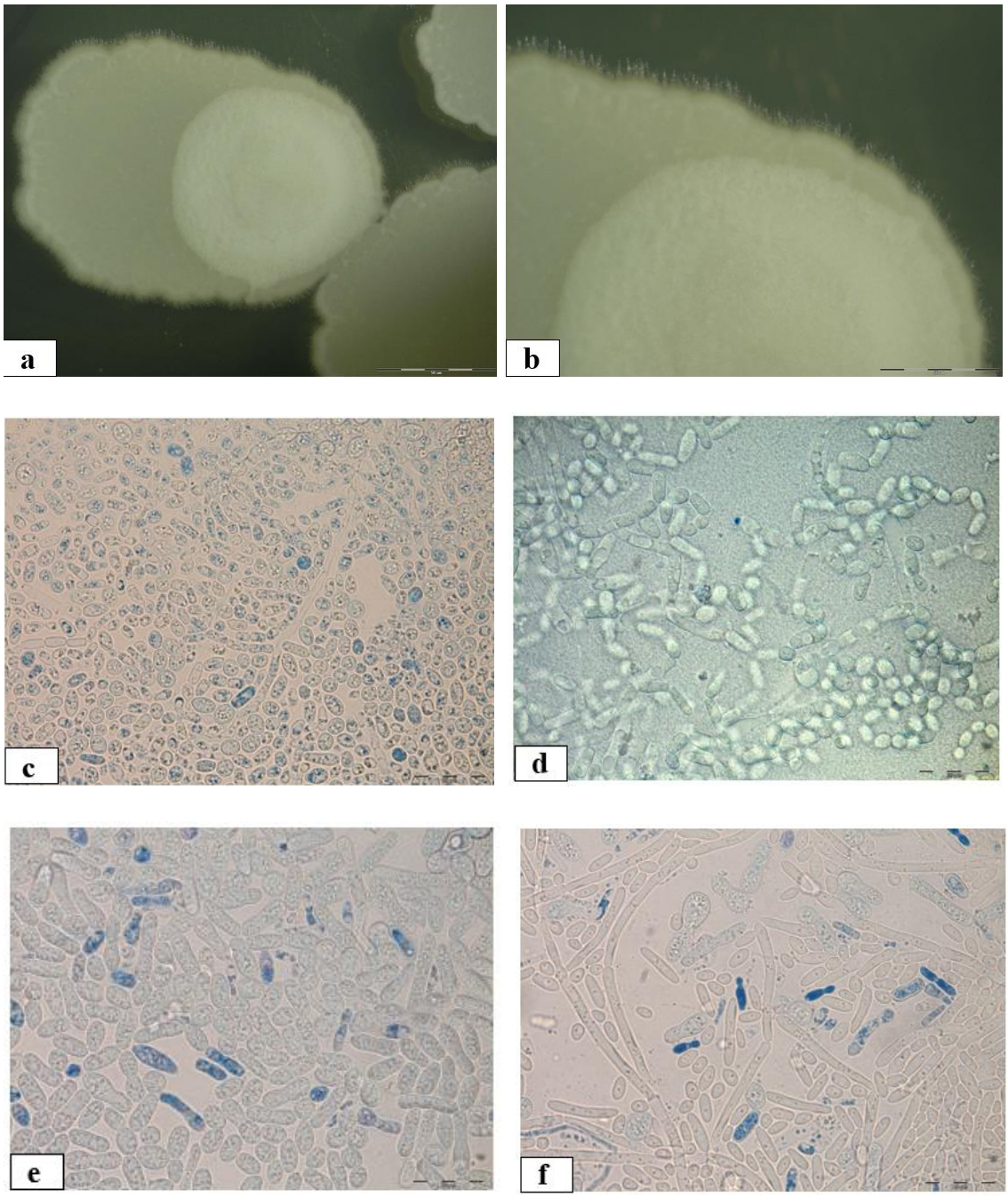
Gatunki *K. marxianus* i *M. caribbica* były oporne w stosunku do 3 badanych antymykotyków: flukonazolu, itrakonazolu i worikonazolu. Połowa izolatów nie wykazywała wrażliwości na jeden lek, natomiast 31,82% na dwa. Izolat *C. parapsilosis* był wrażliwy w stosunku do wszystkich antymykotyków (Tab. 12). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie (α=0,05) w stopniu wrażliwości na leki przeciwgrzybicze pomiędzy badanymi izolatami drożdży (p=0,89).

Tabela 12. Minimalne stężenia hamujące badanych antymykotyków wraz z opornością izolatów (5FC – 5-flucytozyna, AMB – amfoterycyna B, FCA – flukonazol, ITR – itrakonazol, VRC – worikonazol; w –wrażliwe, sw – słabo wrażliwe, o – oporne)

Table 12. Minimum inhibitory concentrations of tested antimycotics with resistance of isolates (5FC – 5-flucytosine, AMB – amphotericin B, FCA – fluconazole, ITR – itraconazole, VRC – voriconazole; w – susceptible, sw – intermediate, o – resistant)

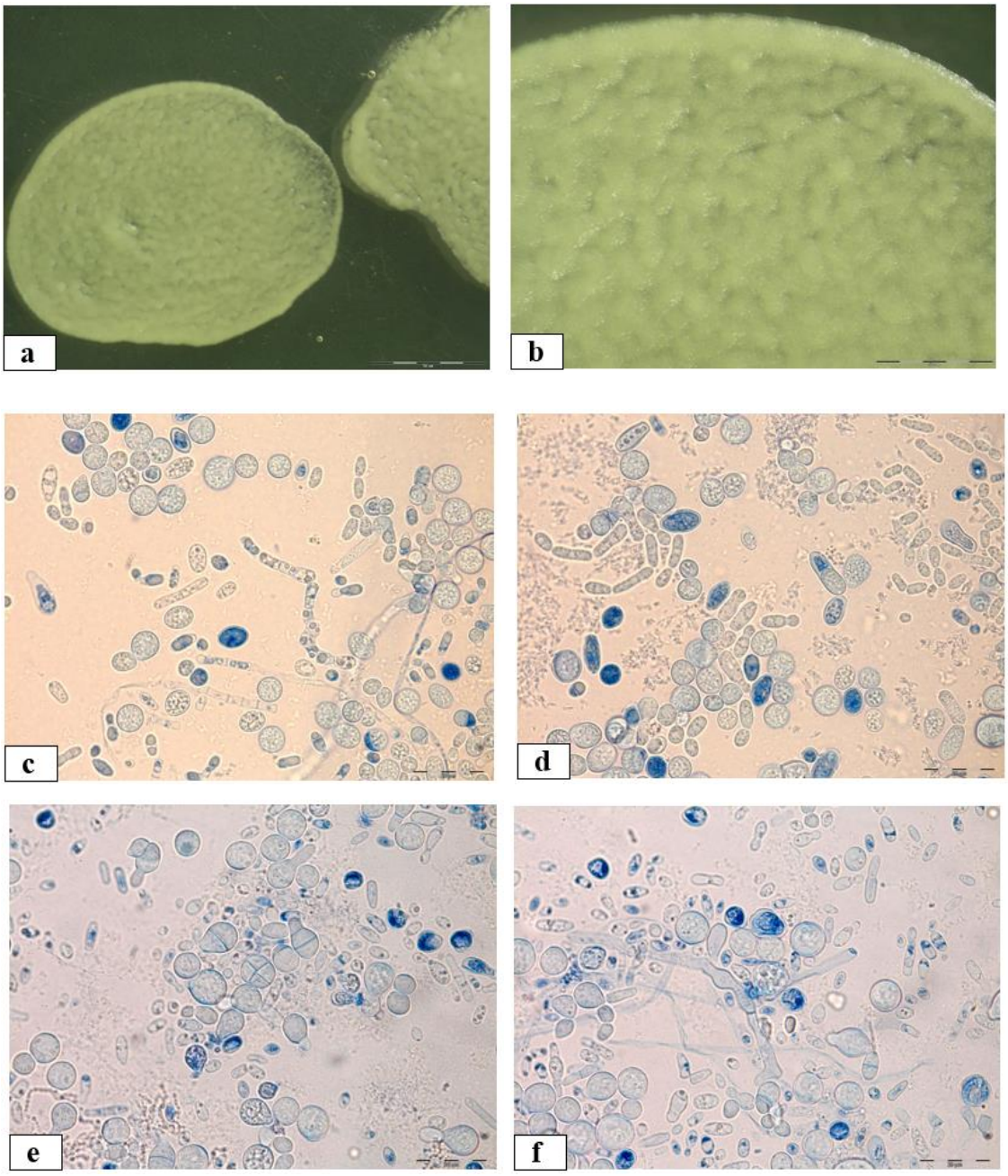
Gatunek	**MIC (µg/mL)**									
	5FC		**AMB**		**FCA**		**ITR**		**VRC**	
A. domesticum	4	w	1	w	32	sw	2	o	1	w
A. montevideense	16	o	16	o	4	w	0,25	sw	0,25	w
C. albicans	16	w	4	o	4	w	1	o	0,25	w
C. oleophila	16	w	2	sw	64	o	1	o	1	w
C. parapsilosis	0	w	2	sw	4	w	0,125	w	0,25	w
C. sake	16	w	2	sw	32	sw	1	o	1	w
Cut. curvatum	0	w	4	o	4	w	0,125	w	0,25	w
D. hansenii	16	w	1	w	32	sw	2	o	1	w
E. dermatitidis	4	w	4	o	32	sw	0,5	sw	0,25	w
H. takashimae	1	w	0,5	w	32	sw	2	o	1	w
K. marxianus	16	w	1	w	64	o	4	o	2	o
M. caribbica	16	sw	1	w	64	o	1	o	2	o
M. guilliermondii	0	w	1	w	16	sw	4	o	0,5	w
P. fermentans	0	w	0,5	w	8	w	1	o	1	w
P. kudriavzevii	0	w	8	o	4	w	0,125	w	0,25	w
R. mucilaginosa	0	w	2	sw	64	o	4	o	0,5	w
S. cerevisiae	4	w	1	w	8	w	2	o	1	w
Y. alimentaria	16	w	2	sw	32	sw	2	o	1	w
Y. bubula	4	w	1	w	32	sw	1	o	1	w
Y. deformans	16	w	1	w	64	o	1	o	1	w
Y. divulgata	4	sw	16	o	32	sw	4	o	1	w
Y. lipolytica	16	sw	4	o	8	w	4	o	0,5	w

4.10. Tablice



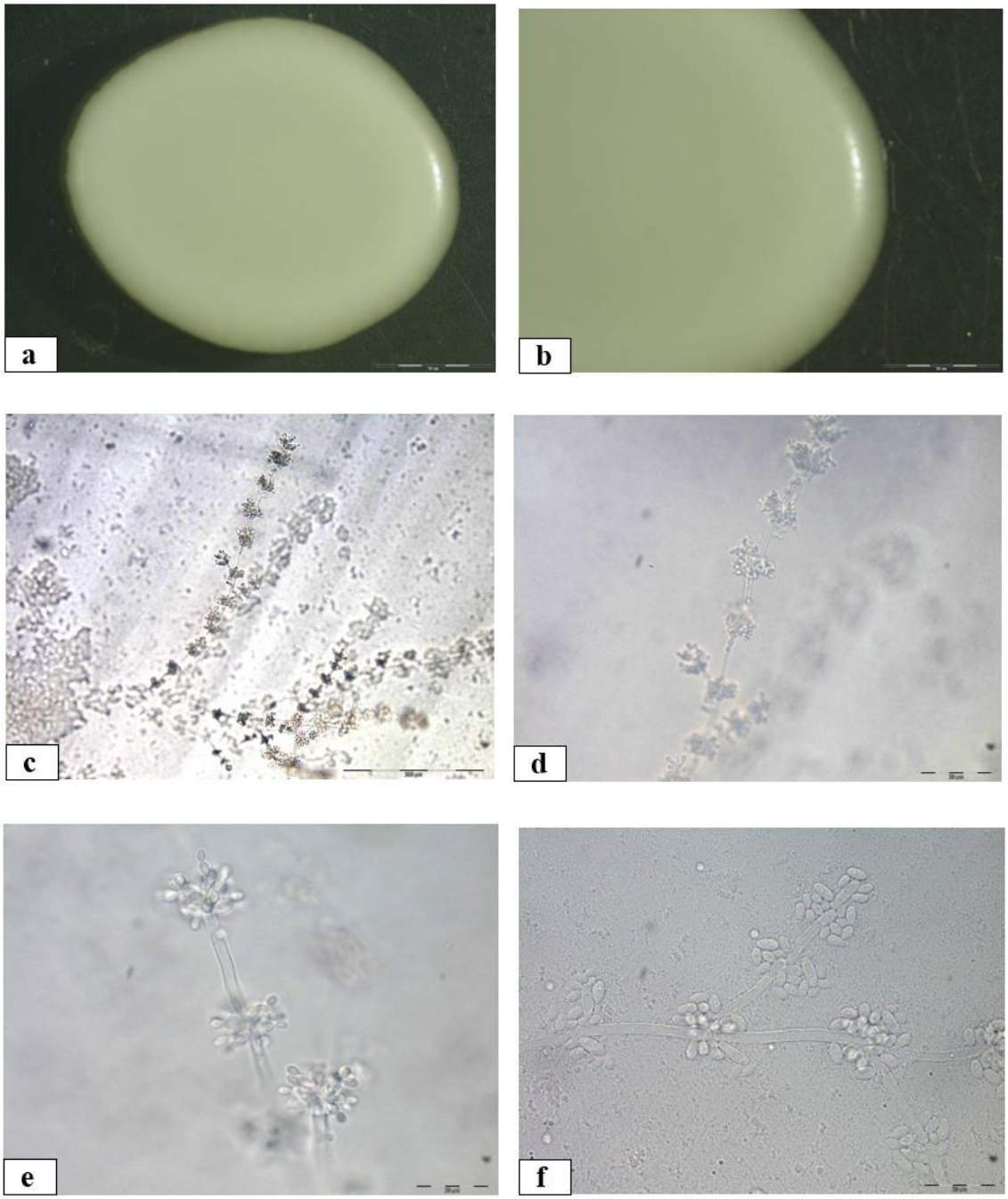
Tablica I. *Apiotrichum domesticum*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 400x, d–f:1000x

Board I. *Apiotrichum domesticum*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c – 400x, d–f: 1000x



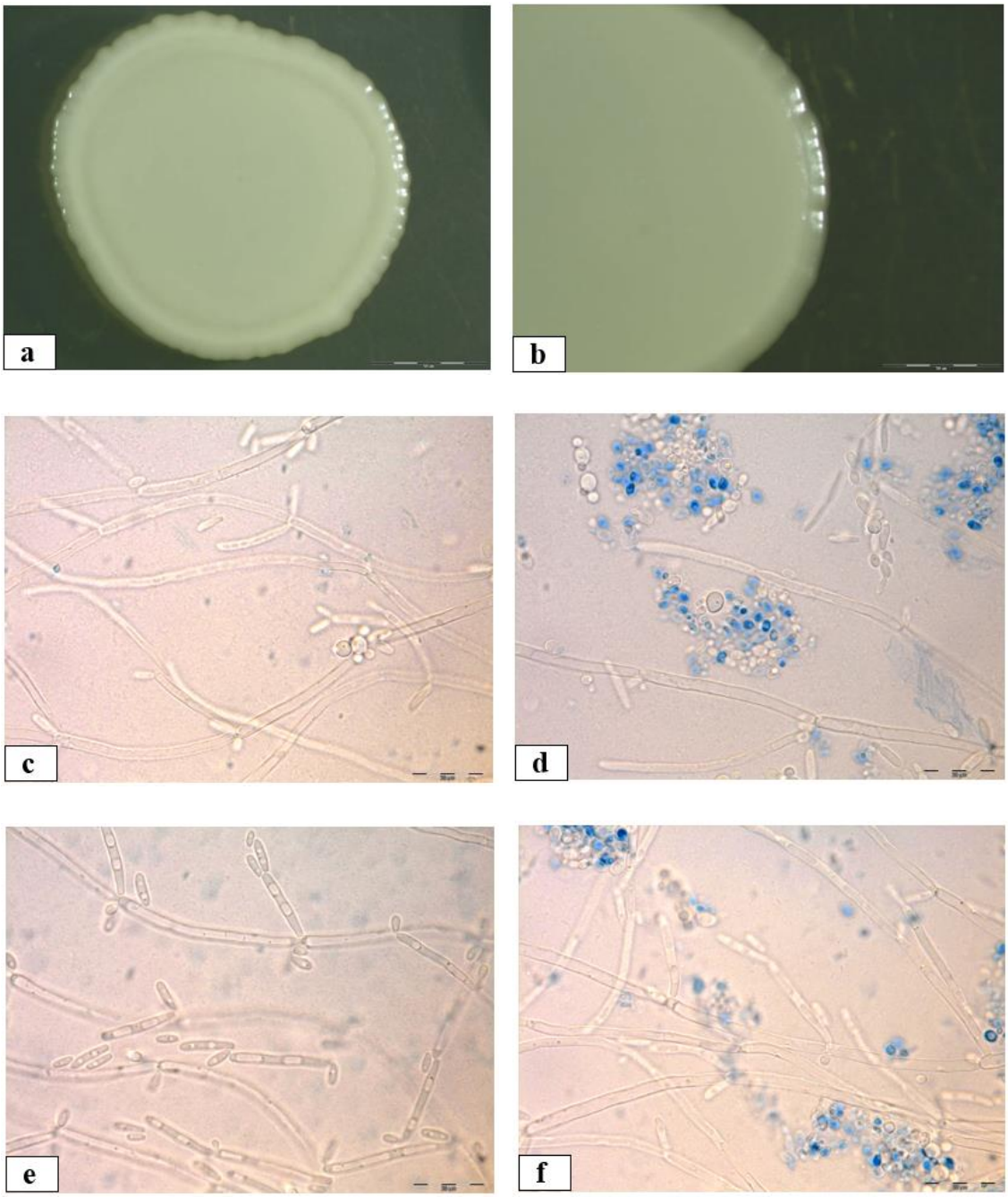
Tablica II. *Apiotrichum montevideense*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 20x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board II. *Apiotrichum montevideense*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 20x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



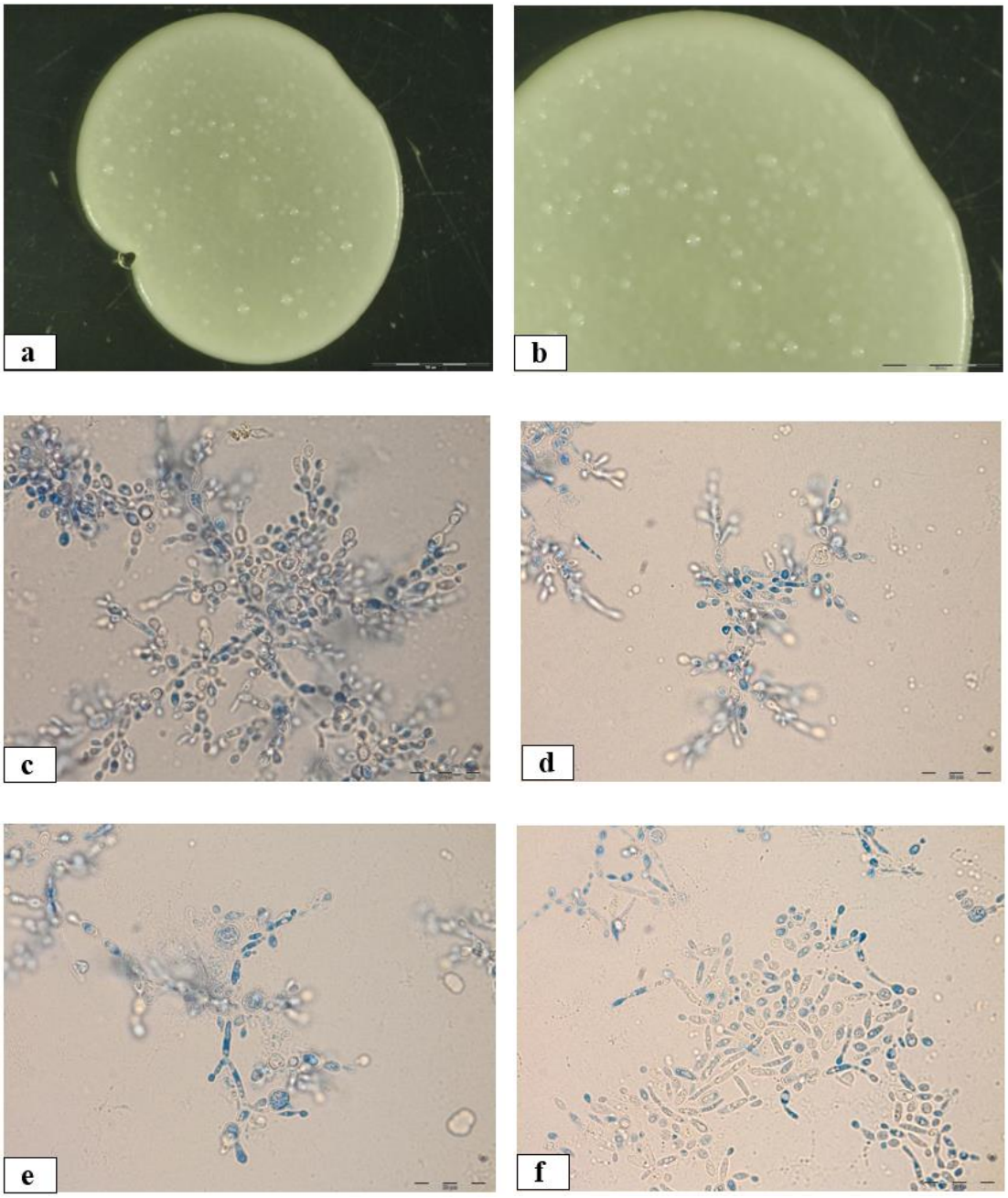
Tablica III. *Candida albicans*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 100x, d – 200x, e–f: 1000x

Board III. *Candida albicans*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c – 100x, d – 200x, e–f: 1000x



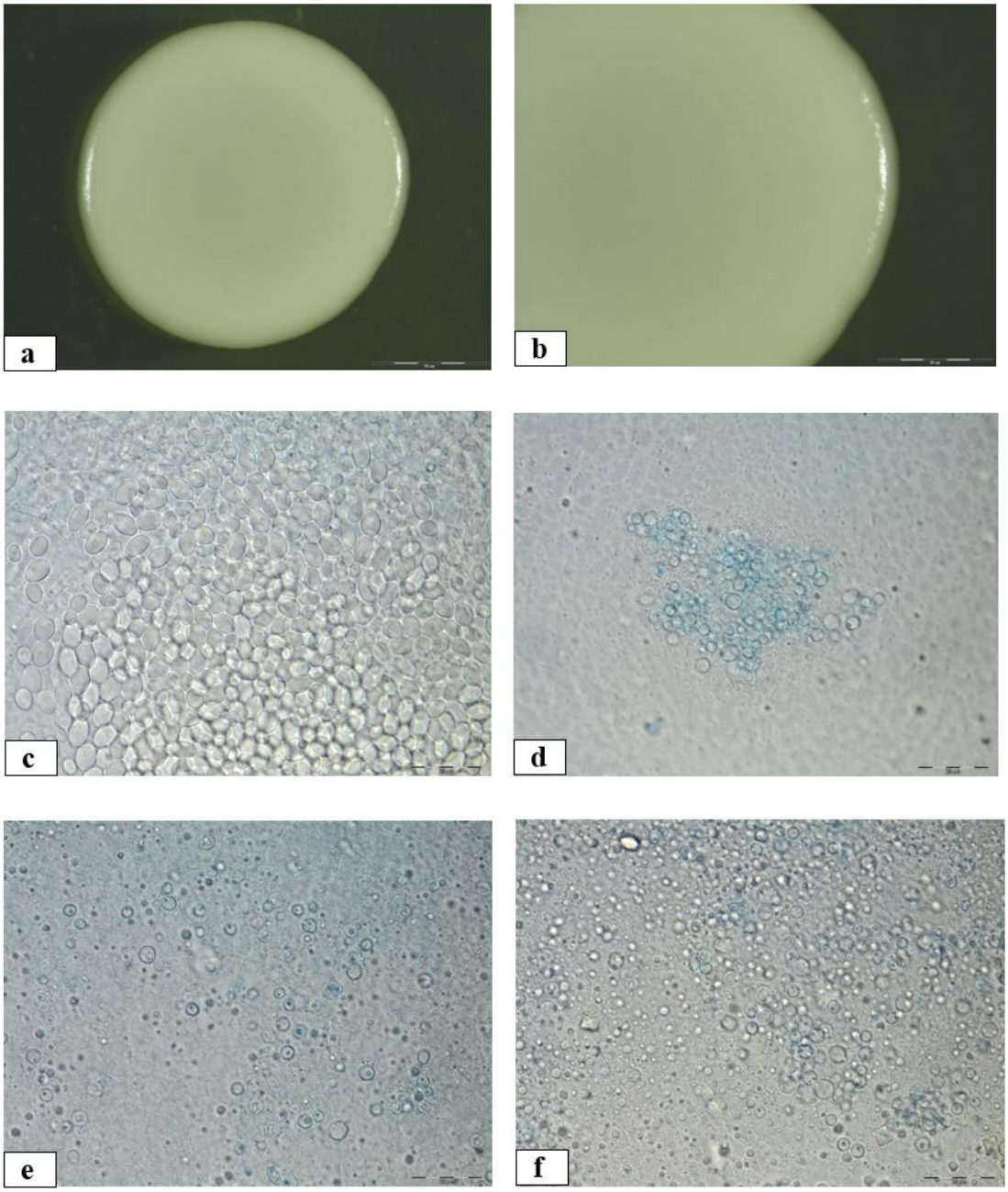
Tablica IV. *Candida oleophila*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board IV. *Candida oleophila*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: e–f: 1000x



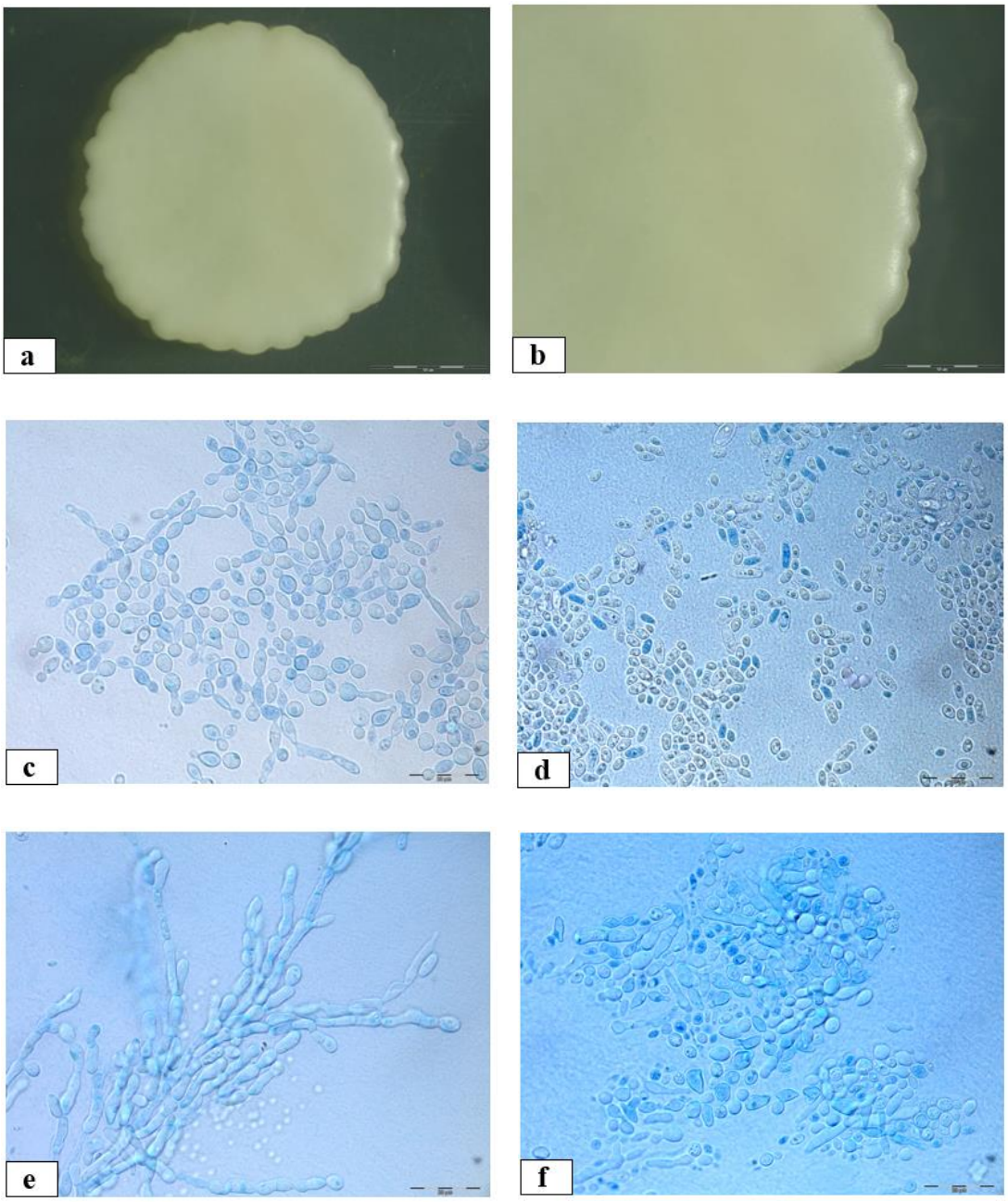
Tablica V. *Candida parapsilosis*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b –10x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board V. *Candida parapsilosis*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 10x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



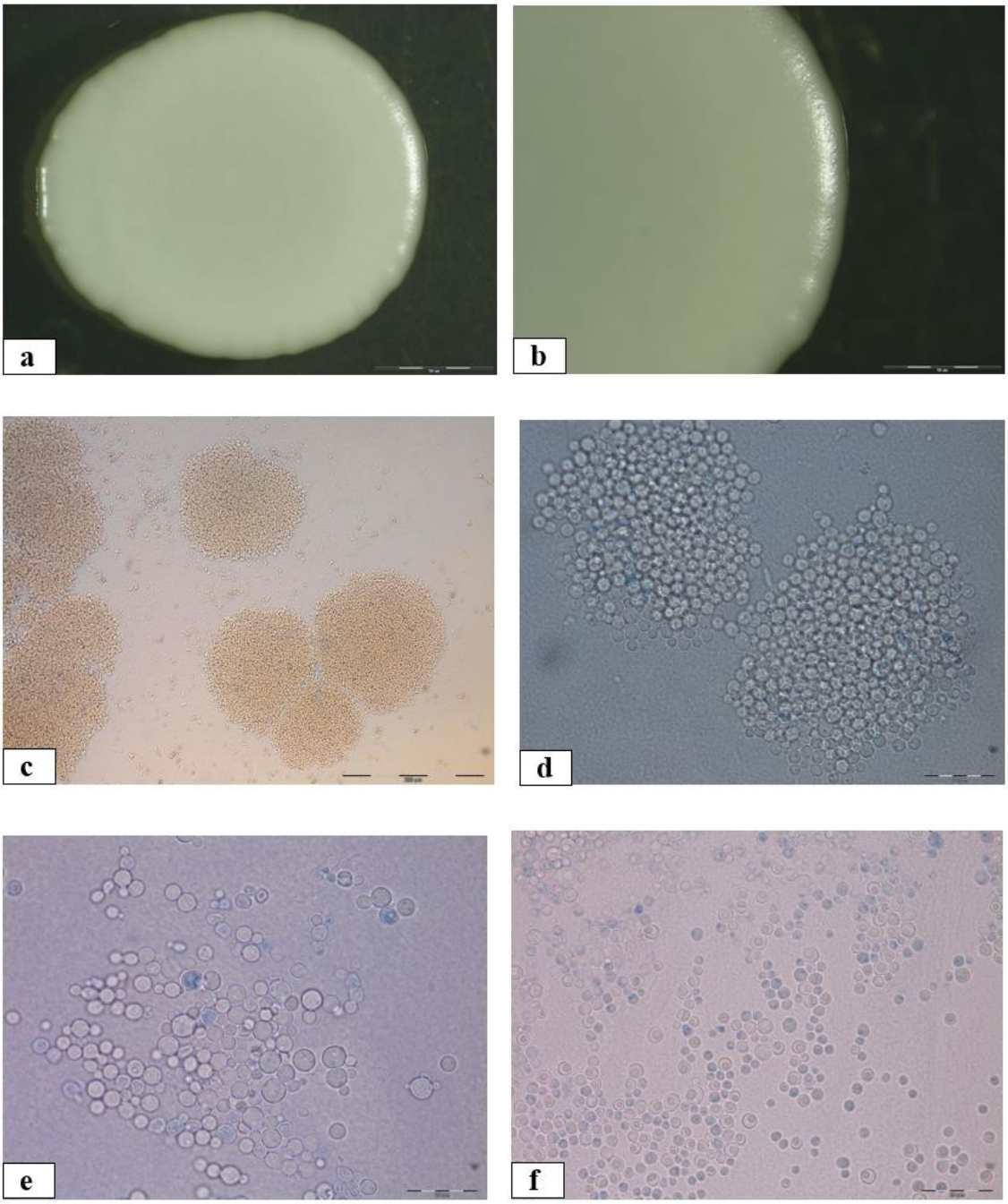
Tablica VI. *Candida sake*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board VI. *Candida sake*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



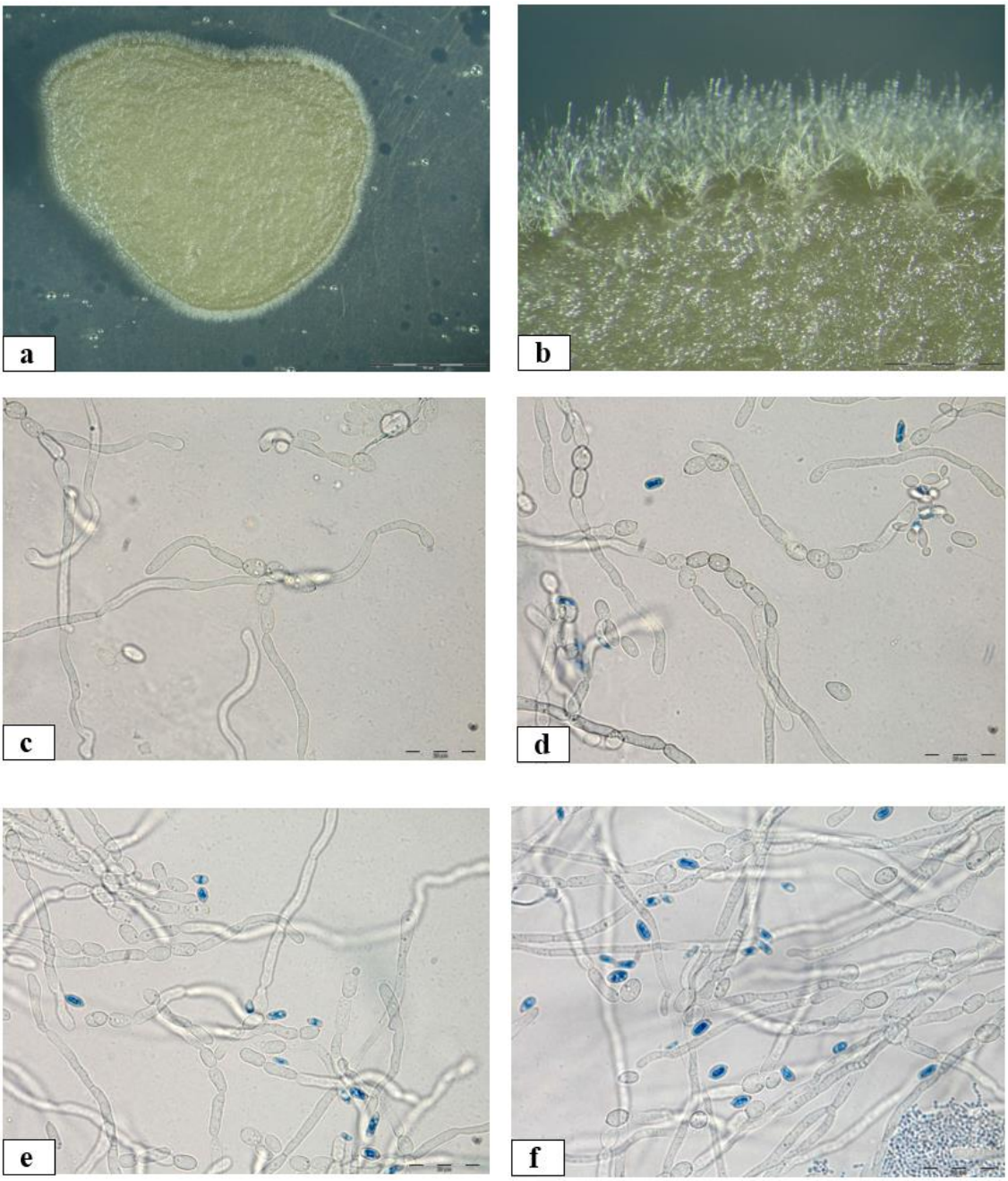
Tablica VII. *Cutaneotrichosporon curvatum*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board VII. *Cutaneotrichosporon curvatum*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



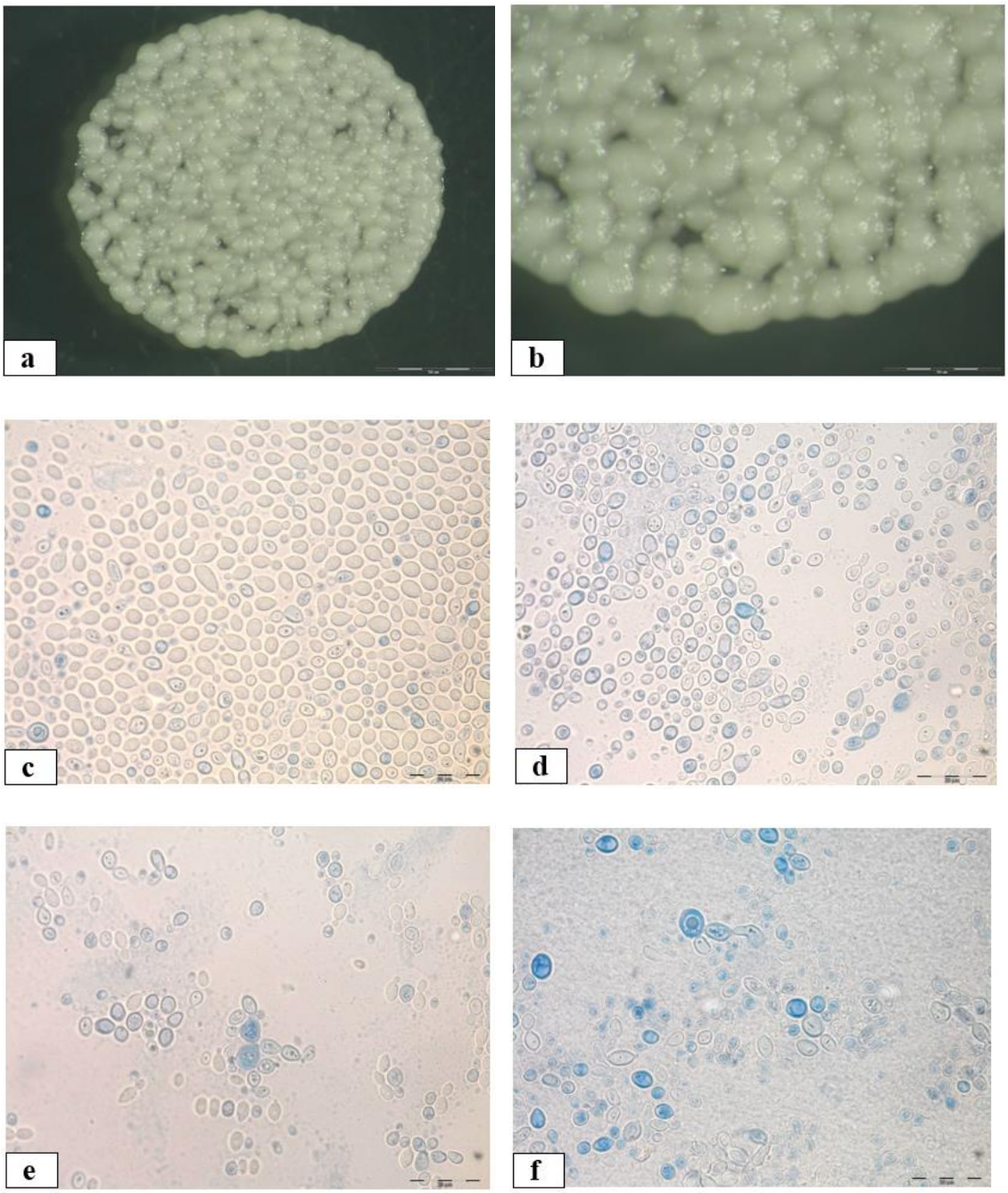
Tablica VIII. *Debaryomyces hansenii*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x

Board VIII. *Debaryomyces hansenii*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x



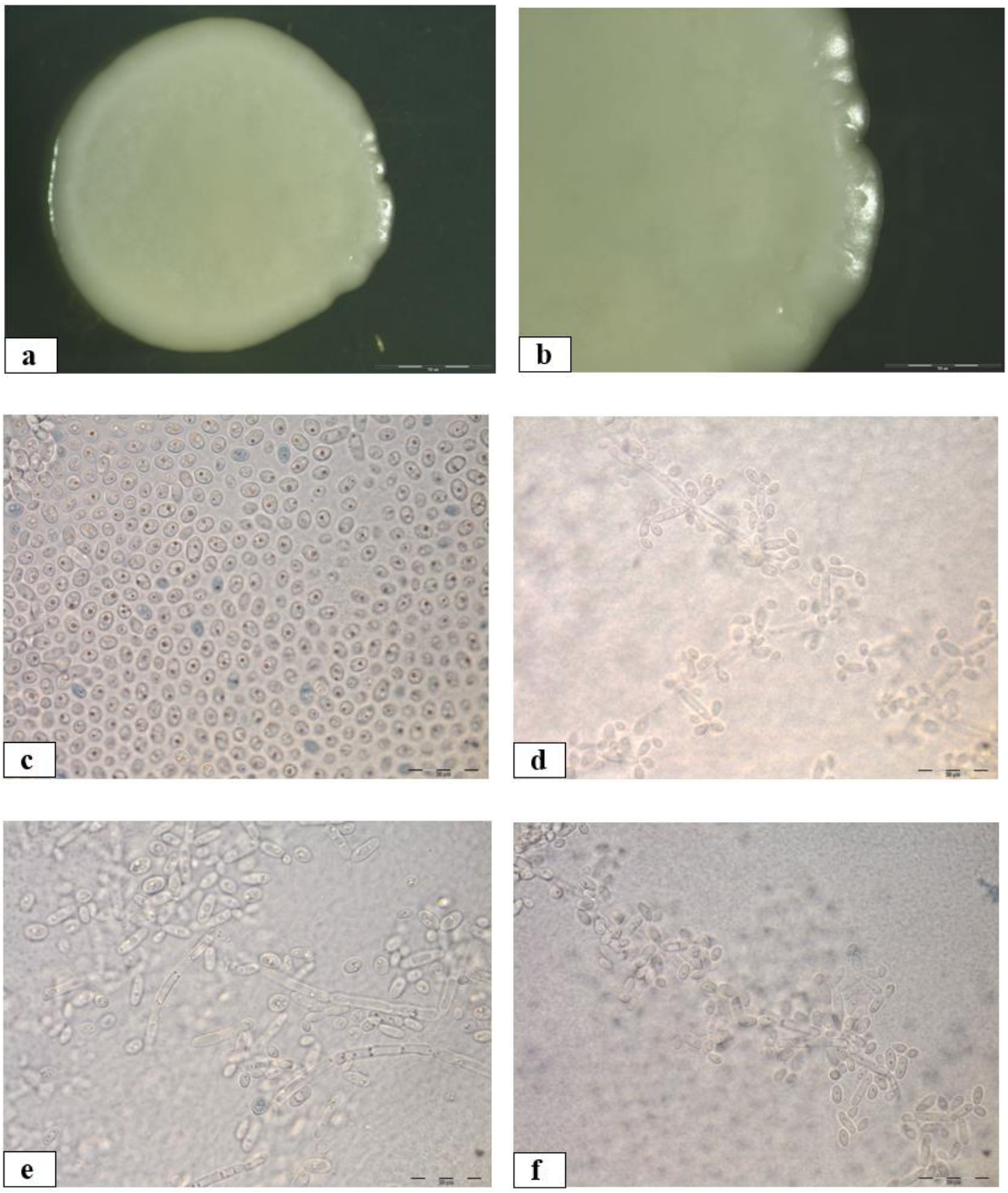
Tablica IX. *Exophiala dermatitidis*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 32x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board IX. *Exophiala dermatitidis*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 32x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



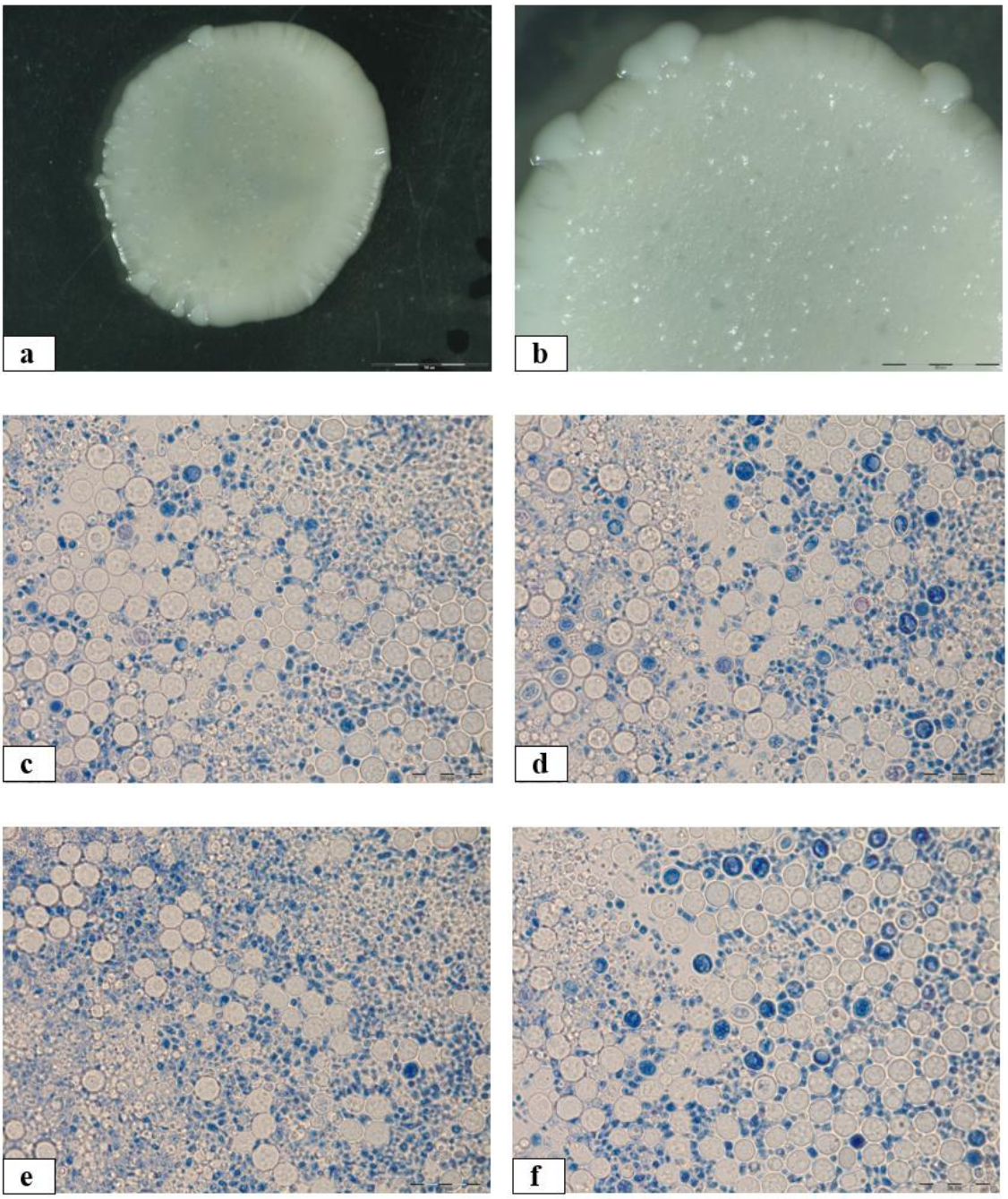
Tablica X. *Holtermanniella takashimae*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 12,5x, b – 25x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board X. *Holtermanniella takashimae*. Macroscopic appearance of the colony: a – 12,5x, b – 25x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



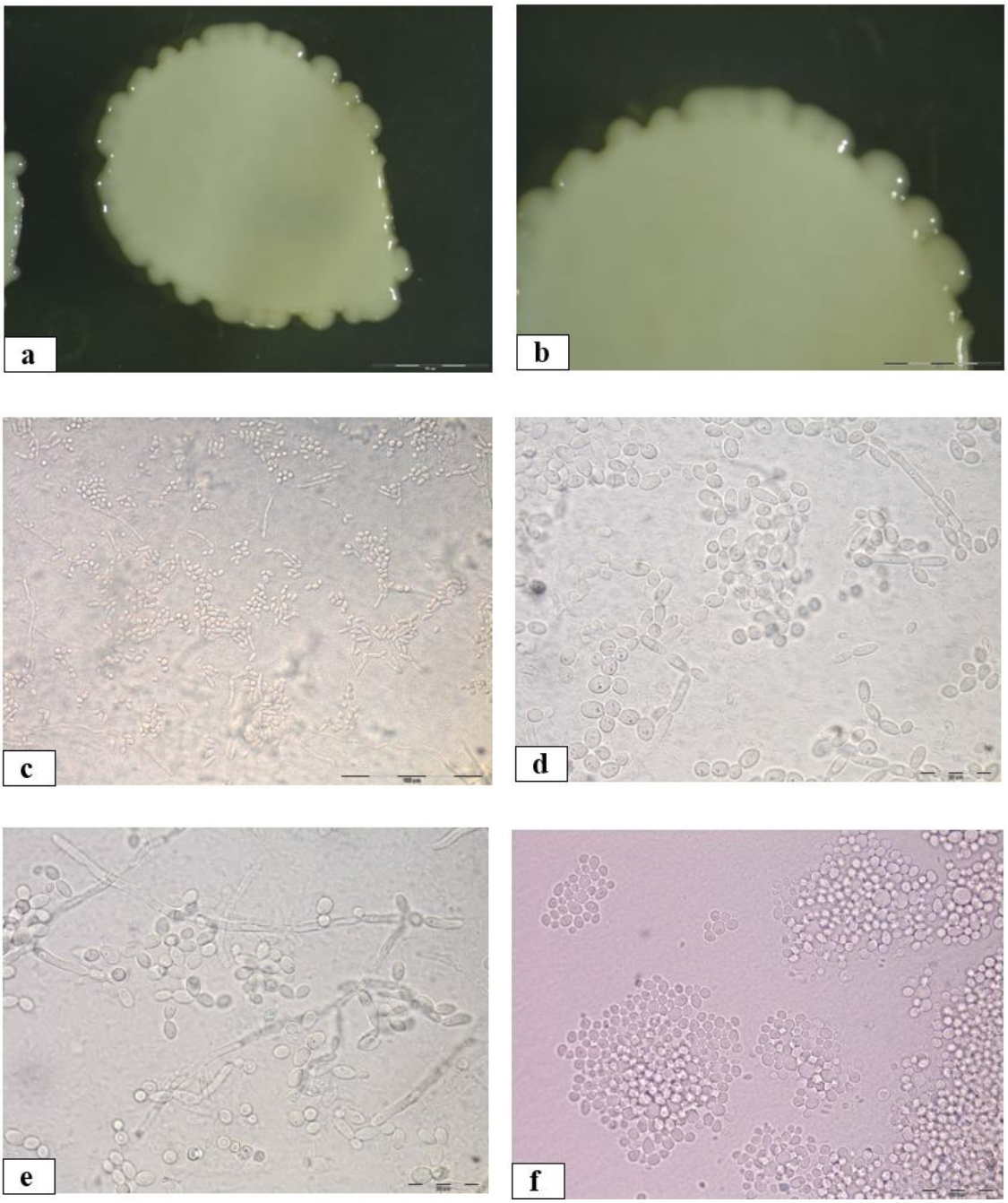
Tablica XI. *Kluyveromyces marxianus*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board XI. *Kluyveromyces marxianus*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



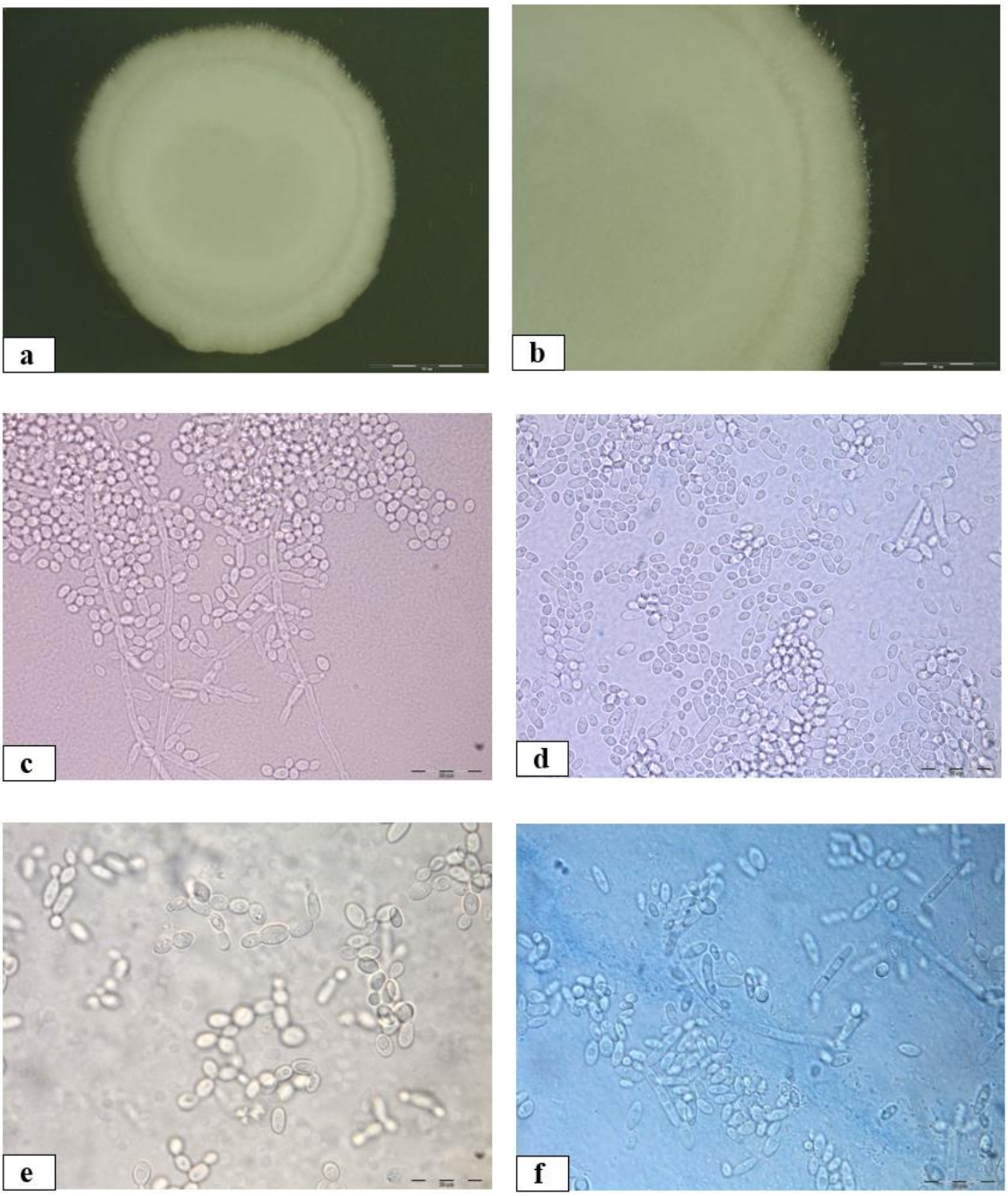
Tablica XII. *Meyerozyma caribbica*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board XII. *Meyerozyma caribbica*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



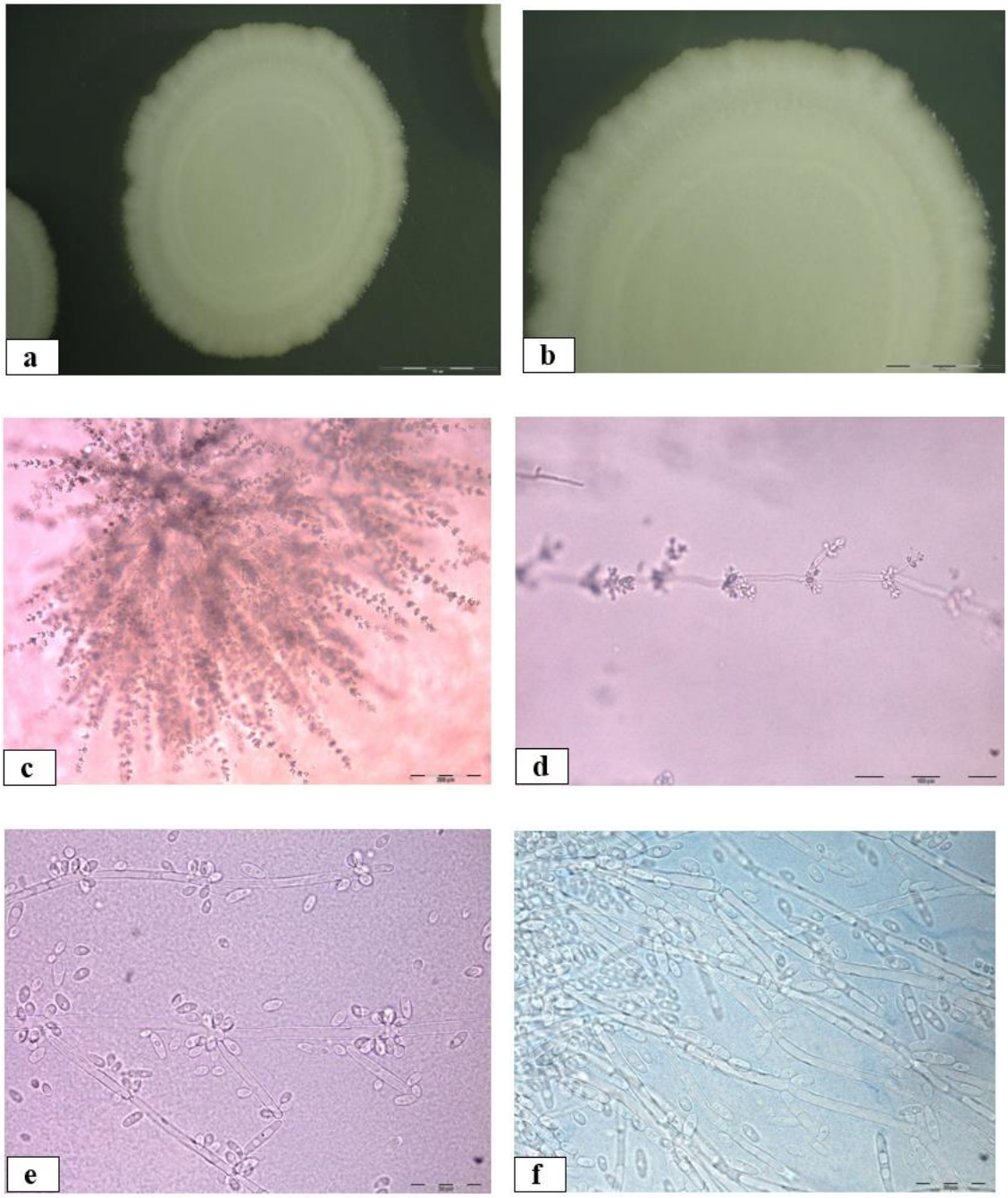
Tablica XIII. *Meyerozyma guilliermondii*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 400x, d–f: 1000x

Board XIII. *Meyerozyma guilliermondii*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 400x, d–f: 1000x



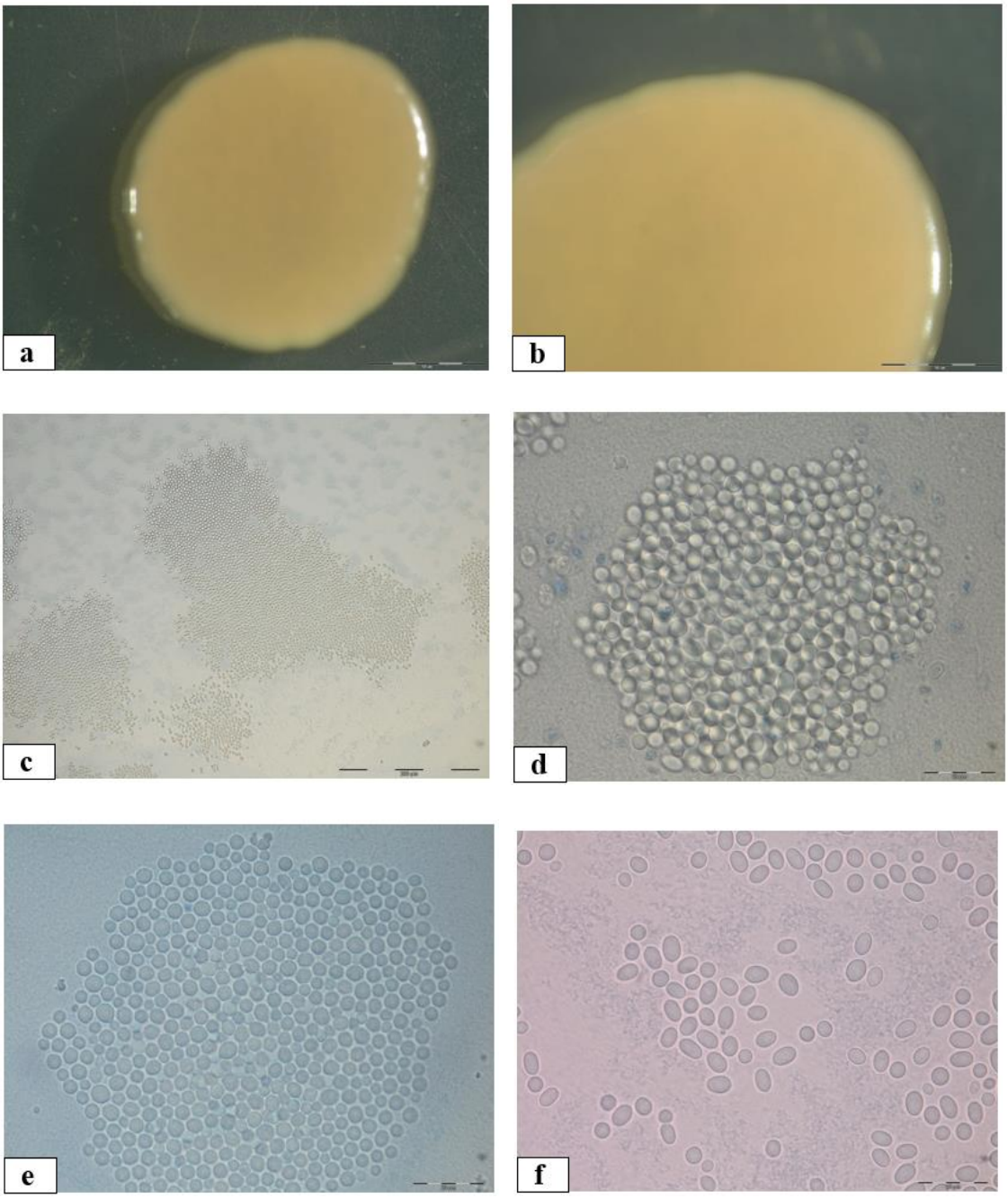
Tablica XIV. *Pichia fermentans*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board XIV. *Pichia fermentans*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



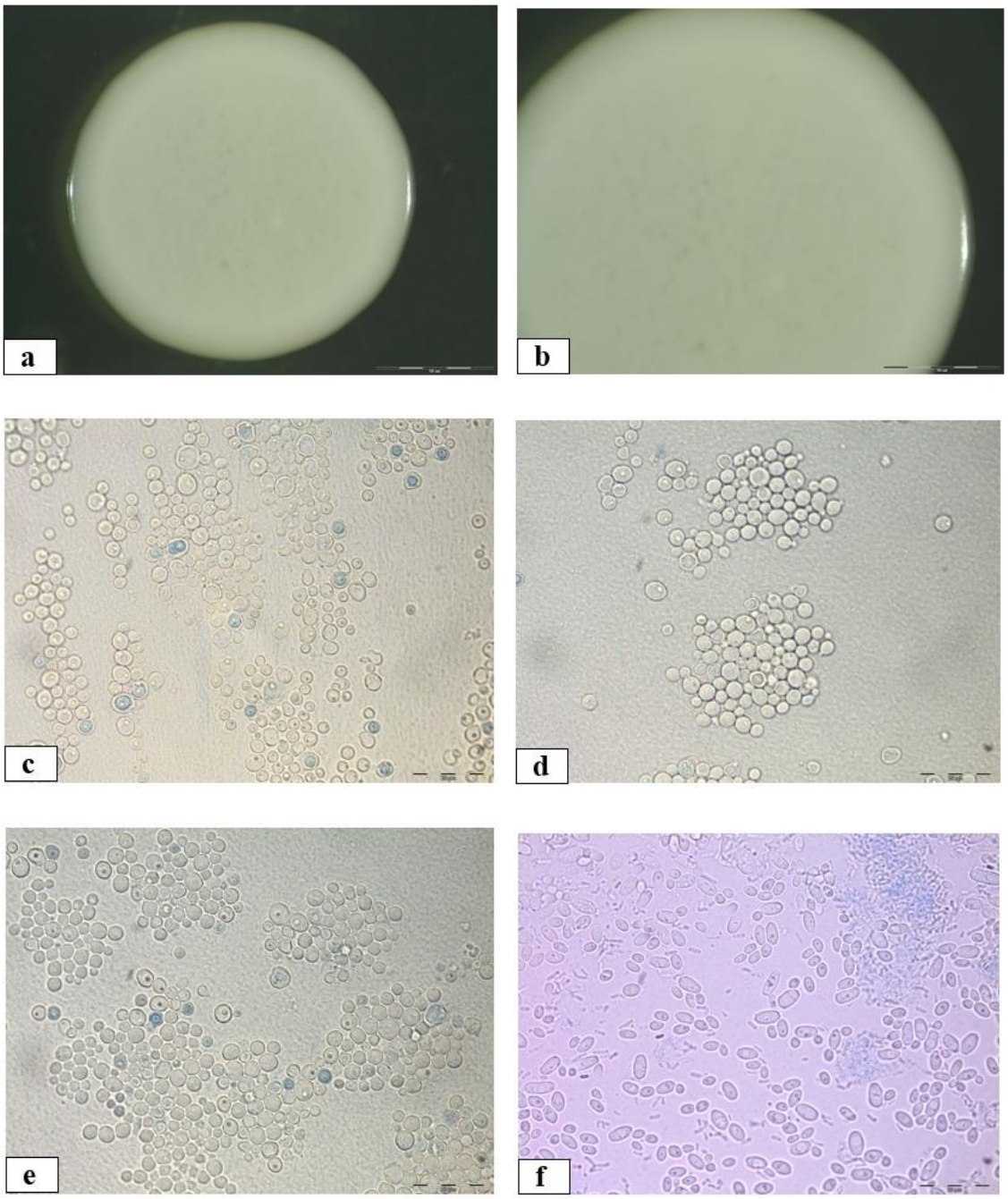
Tablica XV. *Pichia kudriavzevii*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 10x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 100x, d – 400x, e–f: 1000x

Board XV. *Pichia kudriavzevii*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 10x; microcultures on Nickerson's agar: c – 100x, d – 400x, e–f: 1000x



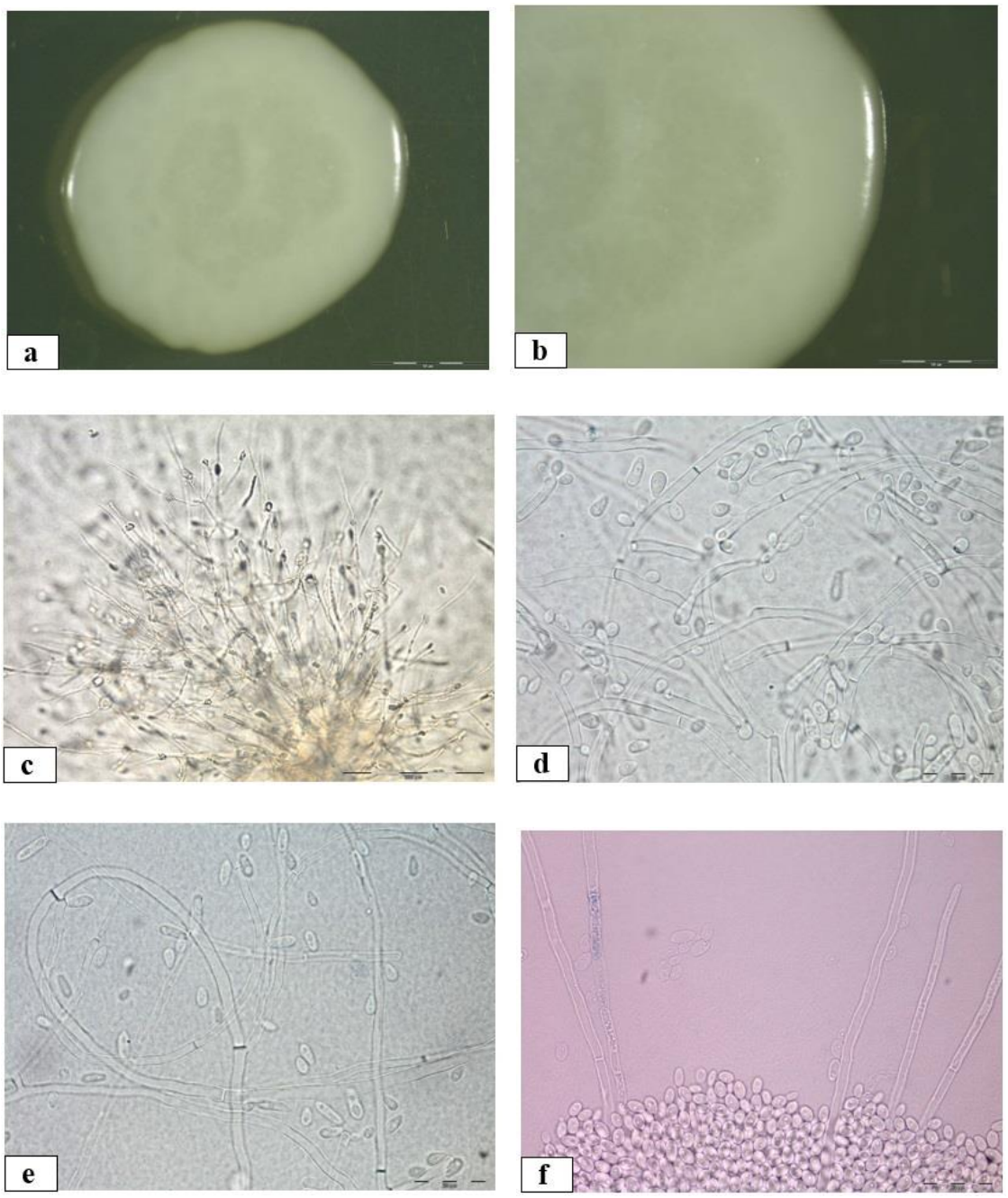
Tablica XVI. *Rhodotorula mucilaginosa*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x

Board XVI. *Rhodotorula mucilaginosa*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x



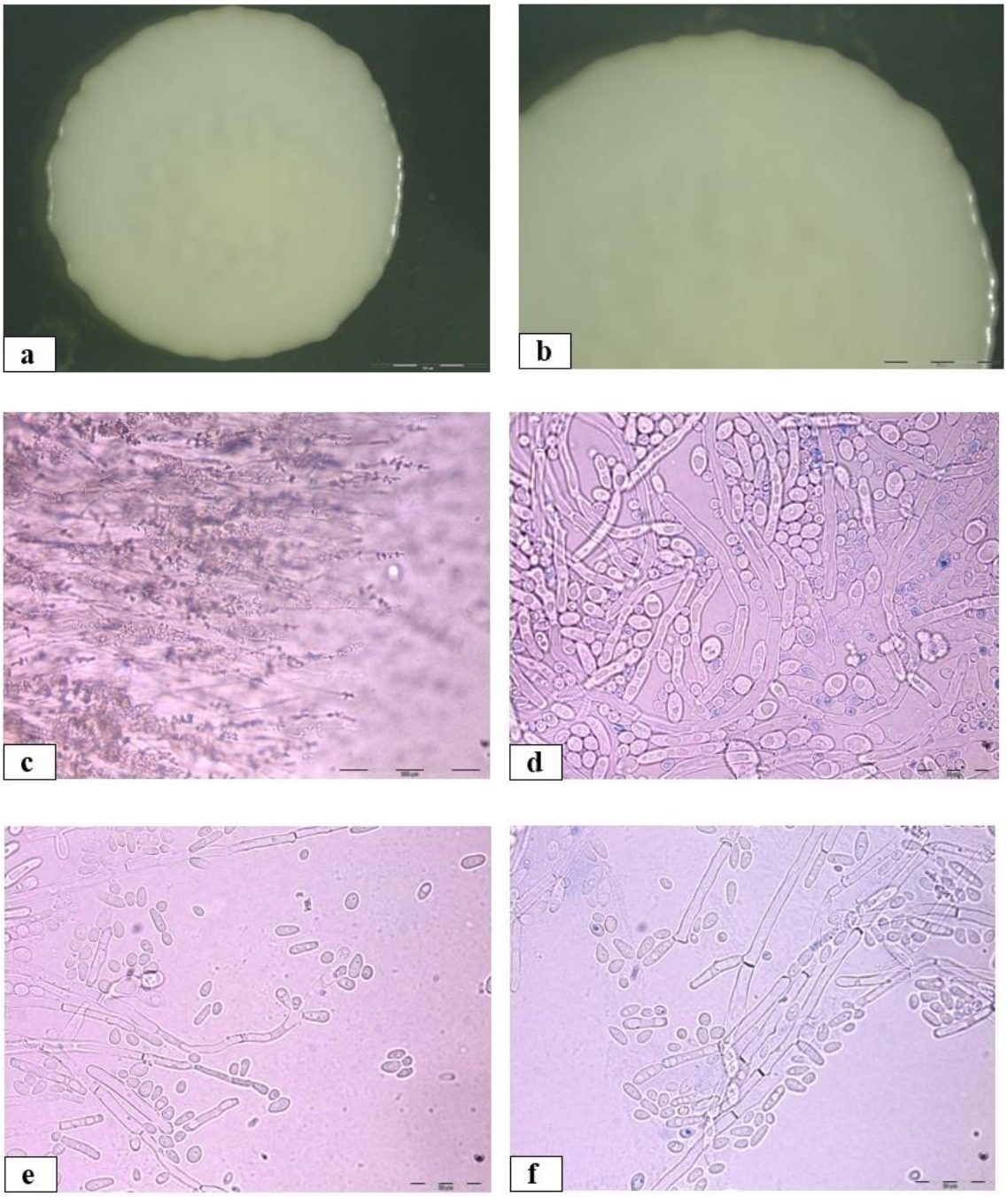
Tablica XVII. *Saccharomyces cerevisiae*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 12,5x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board XVII. *Saccharomyces cerevisiae.* Macroscopic appearance of the colony: a – 12,5x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



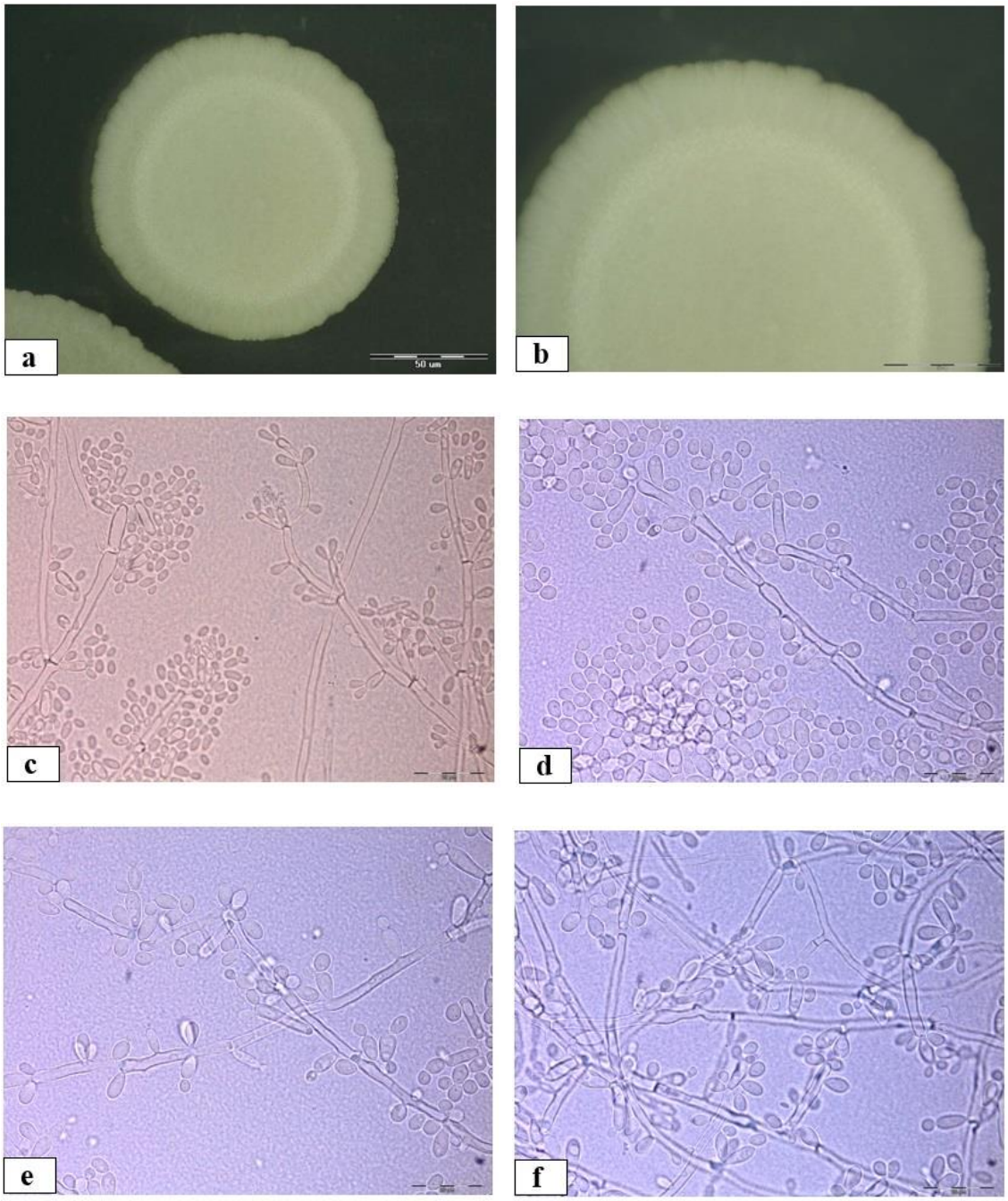
Tablica XVIII. *Yarrowia alimentaria.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b –16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x

Board XVIII. *Yarrowia alimentaria.* Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x



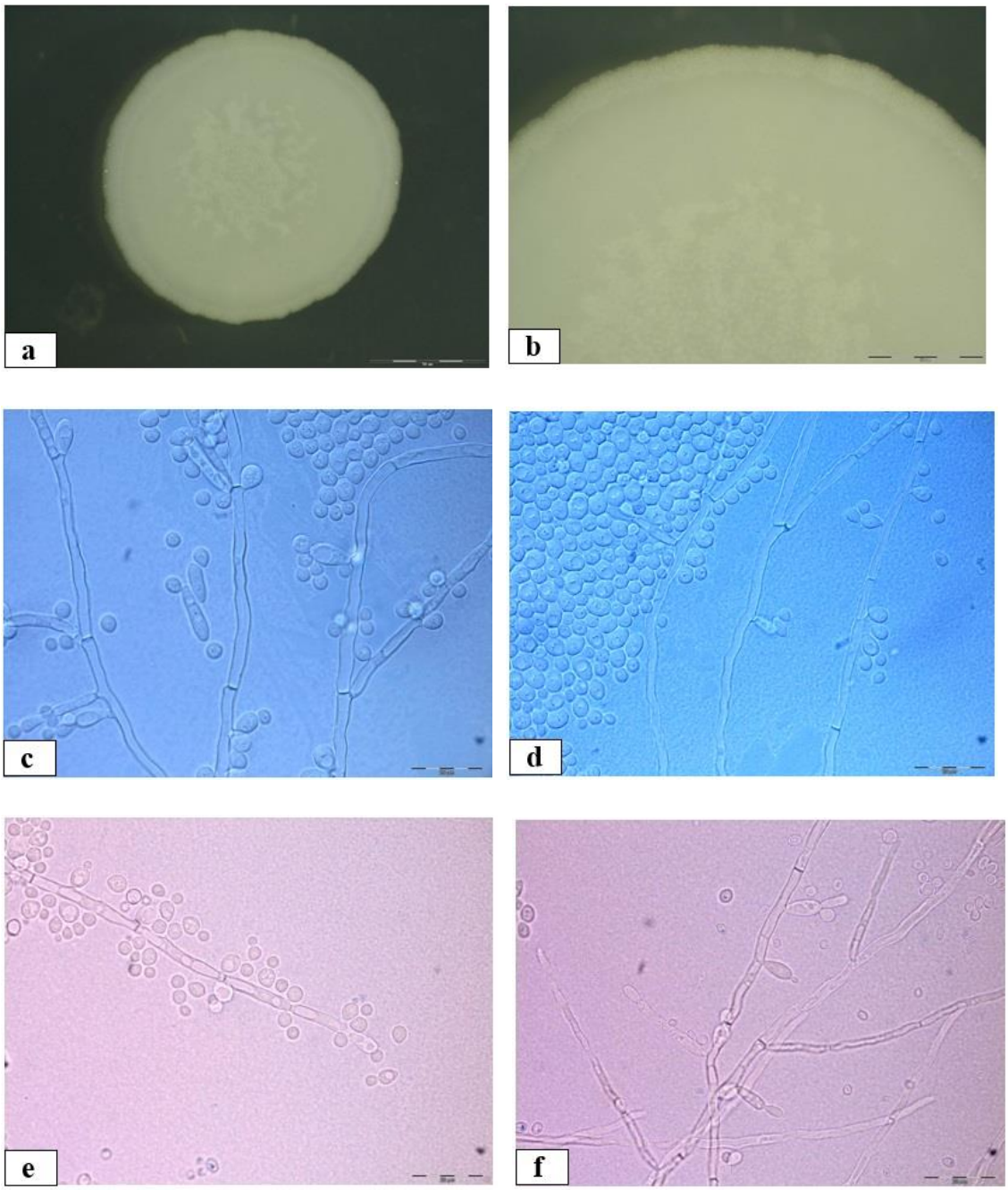
Tablica XIX. *Yarrowia bubula.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x

Board XIX. *Yarrowia bubula.* Macroscopic appearance of the colony: a – 10, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x



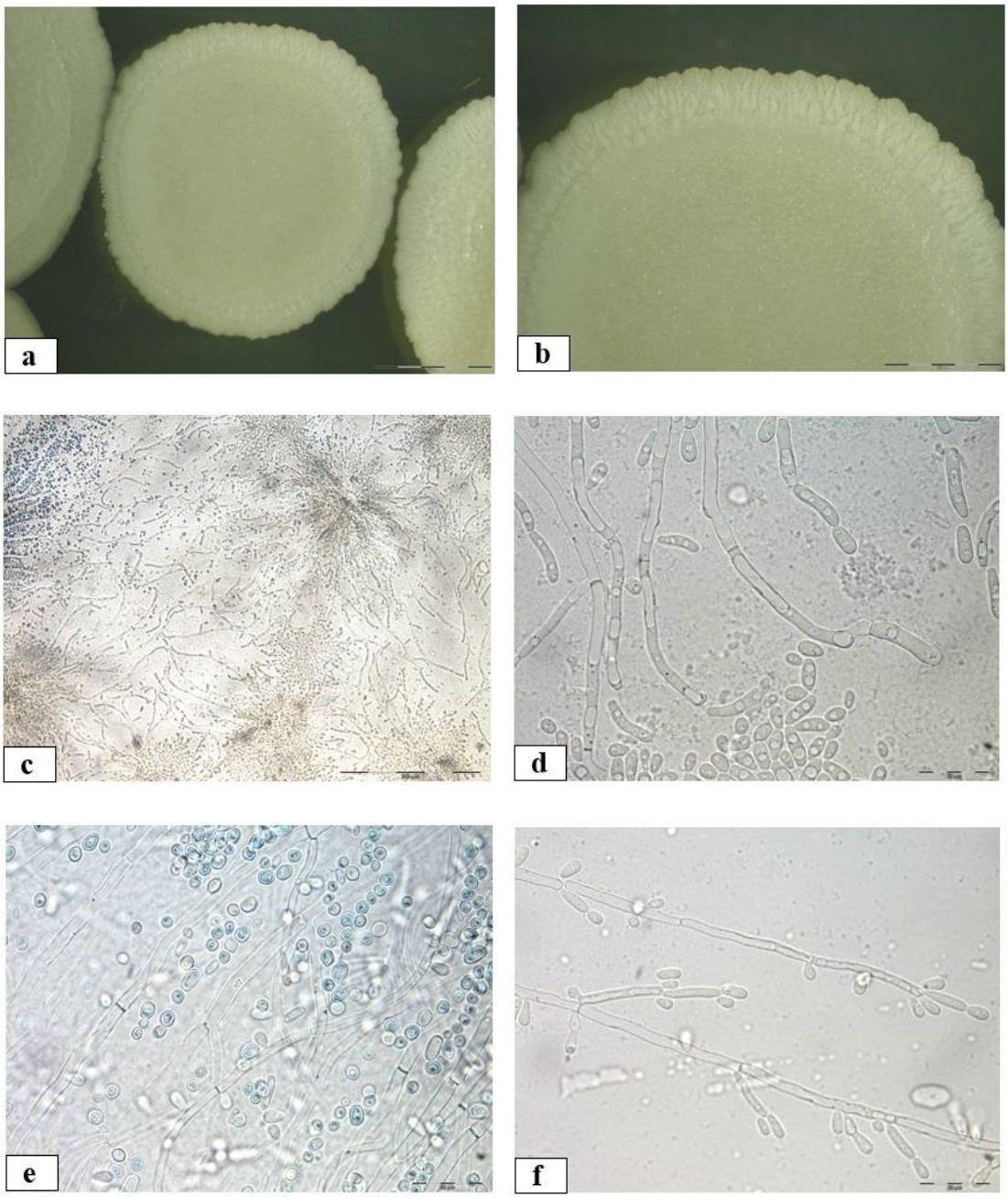
Tablica XX. *Yarrowia deformans.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board XX. *Yarrowia deformans.* Macroscopic appearance of the colony: a – 8, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



Tablica XXI. *Yarrowia divulgata.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x

Board XXI. *Yarrowia divulgata.* Macroscopic appearance of the colony: a – 8, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x



Tablica XXII. *Yarrowia lipolytica.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x

Board XXII. *Yarrowia lipolytica.* Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000

5. Dyskusja

Drożdże w środowiskach słonych zostały odkryte w 1894 roku przez Fishera, który izolując z Oceanu Atlantyckiego różowe i białe kolonie, wówczas określił je jako *Torula* sp. i *Mycoderma* sp. Po tym odkryciu wzrosło zainteresowanie drożdżami bytującymi w morzach i oceanach, które następnie notowano nie tylko w wodzie morskiej, ale także w osadach dennych, na roślinności oraz u ryb, ssaków czy ptaków morskich (KUTTY i PHILIP 2008). KOHLMEYER i KOHLMEYER (1979) na podstawie zasięgu występowania oraz cech ekofizjologicznych grzybów morskich dokonali ich podziału na obligatoryjne (bezwzględne) i fakultatywne (względne). Mianem gatunku obligatoryjnego określili grzyby, których występowanie ograniczało się wyłącznie do ekosystemów morskich. Z kolei jako fakultatywne mikrogrzyby morskie uznali gatunki często notowane ze źródeł lądowych, takich jak owoce, gleba, a także zwierzęta czy ludzie. Według autorów były one przenoszone do mórz i oceanów głównie przez rzeki, ścieki lub z pyłem wodnym.

Grzyby odgrywają kluczową rolę w ekosystemach morskich biorąc udział w degradacji różnorodnych substratów (O'RORKE i in. 2013), wchodząc w związki symbiotyczne z innymi organizmami morskimi (YARDEN 2014), a niekiedy w relacje antagonistyczne i wówczas są przyczyną chorób (BIEDUNKIEWICZ i in. 2015; TARTOR i in. 2018). Występowanie drożdży w wodzie jest powszechne. Liczebność i różnorodność gatunkowa tych mikrogrzybów zależy od rodzaju i czystości wód (DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013), zdolności dostosowania się mikrogrzybów do profilu czynników abiotycznych oraz relacji z innymi mikro- i makroorganizmami, współtworzącymi część biotyczną zasiedlanej niszy. W ekosystemach naturalnych występowanie drożdży postrzega się zatem przez pryzmat ich udziału w chemicznej i biologicznej dynamice zmian, gdzie odgrywają one ważną rolę jako reducenci, konsumenci, konkurenci czy, jak zaznaczono wyżej, symbionty (SHEARER i in. 2007; BOGUSŁAWSKA-WĄS 2010). Mimo, iż dotychczas nie wyjaśniono dokładnego mechanizmu przystosowania się grzybów do życia w środowisku wodnym, wyodrębniono kilka cech, które wydają się im sprzyjać w zasiedlaniu hydrosfery. Zazwyczaj grzyby występujące w wodach to formy niesporulujące, tlenowe, słabo fermentujące węglowodany i wymagające co najmniej jednego czynnika wzrostowego, na przykład w postaci witamin. Ze względu na zdolność wielu gatunków do wzrostu

w stężeniach chlorku sodu wyższych niż te panujące w wodach słonych, uważa się że tolerancja na zasolenie panujące w środowiskach morskich nie charakteryzuje drożdży morskich (KUTTY i PHILIP 2008).

Najnowszą listę grzybów notowanych dotychczas w środowiskach morskich przedstawili w swojej pracy JONES i in. (2019). Spośród gatunków izolowanych ze śledzi i zaprezentowanych w niniejszej pracy, aż 15 z 22 zaliczono do grzybów pochodzenia morskiego. Należały do nich: *C. albicans, C. oleophila, C. parapsilosis, C. sake, Cut. curvatum, D. hansenii, E. dermatitidis, K. marxianus, M. caribbica, M. guilliermondii, P. fermentans, P. kudriavzevii, R. mucilaginosa, S. cerevisiae* i *Y. lipolytica.* Warto zwrócić uwagę, iż pozostałe gatunki, których obecność nie była dotychczas udokumentowana w literaturze dotyczącej środowisk morskich, zgodnie z informacjami podanymi na stronach www.indexfungorum.org i www.mycobank.org, zostały opisane stosunkowo niedawno, tj. *H. takashimae* – 2010r., *Y. deformans* i *Y. divulgata* – 2013r., *Y. bubula* – 2014r., *A domesticum* i *A. montevideense* – 2015r., *Y. alimentaria* – 2017r. Wysoki stopień pokrycia gatunkowego w środowisku morskim i w śledziach, może świadczyć o tym, że źródłem tych mikrogrzybów i przyczyną kolonizacji zwierząt jest środowisko ich życia. Jest to zgodne z wnioskami LIAO i in. (2023), którzy potwierdzili w swoich badaniach wpływ wody morskiej na kolonizację jelit ryb raf koralowych przez mikrogrzyby. Do organizmu gospodarza grzyby wnikają przez naturalne otwory ciała, głównie przez pysk, który jest pierwszym odcinkiem przewodu pokarmowego (BIEDUNKIEWICZ i in. 2015) oraz skrzela, stale obmywane przez wodę. W badaniach własnych drożdże najczęściej izolowano właśnie z tych dwóch ontocenoz, mających kontakt ze środowiskiem zewnętrznym (pysk – 48,9%, skrzela – 40,1% osobników u których notowano drożdże). Stopień zasiedlenia mikrogrzybami narządów wewnętrznych był znacznie niższy. W jelitach drożdże występowały u 22,9%, zaś w wątrobie u 16% osobników.

Istnieje pogląd, iż drożdże morskie nie są organizmami kosmopolitycznymi, a ich występowanie ogranicza się jedynie do określonych warunków środowiskowych lub do związków z konkretnymi makroorganizmami (NAGAHAMA 2006). Większość zwierząt ma własną i wysoce specyficzną mykobiotę, a stosunki między grzybami i zwierzętami mają różnorodny charakter, tj. drapieżniczy (grzyby są związane z bezkręgowcami i algami), pasożytniczy (na powierzchni ciała albo w przewodzie pokarmowym) lub komensaliczny (BATKO 1975). Na podstawie szkód wyrządzanych

przez grzyby, mykoparazytolodzy ryb wyróżnili pasożyty letalne i nieletalne, gdzie granica pomiędzy pasożytnictwem nieletalnym a komensalizmem jest bardzo nieostra (BIEDUNKIEWICZ i in. 2015). Drożdże są określane jako część naturalnej mikrobioty, zarówno ryb dzikich, jak i hodowlanych (NAVARRETE i TOVAR-RAMÍREZ 2014). W sporadycznych przypadkach liczebność tych mikrogrzybów dominuje nad bakteriami (BOGUSŁAWSKA-WĄS 2010). Kręgowce, w tym ryby, są bezobjawowymi nosicielami licznych, potencjalnych czynników etiologicznych, których obecność jest ujawniana w momencie spadku odporności ryb oraz naruszenia naturalnych barier obronnych organizmu. W pierwszej kolejności grzyby atakują skórę, płetwy, skrzela i okolice oczu, zaś spośród narządów wewnętrznych przewód pokarmowy (HUANG i in. 2020), skąd mogą przedostać się do krwi, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia i życia gospodarza. Równoczesne występowanie w zbiornikach wodnych ryb i mikrogrzybów, mogących być potencjalnymi zoopatogenami, nie wpływa negatywnie na zwierzęta, o ile jest zachowana równowaga ogólnobiologiczna w układzie „makro-mikroorganizm-środowisko" (BIEDUNKIEWICZ i in. 2015; HASHEM i in. 2020). U zdrowych osobników ryb, będących w dobrej kondycji biologicznej i posiadających sprawny układ odpornościowy, zasiedlające je drożdże, wydają się być kolonizatorami współdziałającymi z gospodarzem na zasadzie komensalizmu (DYNOWSKA 1995).

W badaniach własnych częstość izolowania drożdży od zdrowych osobników śledzia bałtyckiego wynosiła ogólnie 32%. VALDERRAMA i in. (2021) w jelitach zdrowych osobników hodowlanych chilijskich ryb morskich, tj. *Seriolella violacea* i *Genypterus chilensis*, drożdże uzyskali odpowiednio u 13,2% i 50% osobników. Z kolei RAGGI i in. (2014) w treści jelitowej mięsożernych ryb dzikich i hodowlanych (*Salmo salar*, *Oncorhynchus kisutch*, *O. mykiss*, *Seriola lalandi* i *Cilus gilberti*) odnotowali mikrogrzyby u 85,4% zdrowych osobników. TARTOR i in. (2018) natomiast, u trzech gatunków ryb słodkowodnych (*Oreochromis* sp., *Clarias gariepinus*, *Mugil cephalus*), wykazujących objawy chorobowe, wyizolowali drożdże od 51,2% badanych zwierząt. Można przypuszczać, że wysoki stopień kolonizacji drożdżami ontocenoz u zdrowych ryb, jest związany z komensalicznym charakterem ich relacji z gospodarzem.

W większości badań ekosystemów morskich, *Ascomycota* jest dominującą grupą taksonomiczną (HATTORI i in. 2014; POLI i in. 2018; JONES i in. 2019; www.marinefungi.org). Drożdże izolowane ze śledzi w przedstawionych badaniach, częściej należały do gromady *Ascomycota*, niż do *Basidiomycota*, co potwierdza

obserwacje u ryb morskich notowane w literaturze (RAGGI i in. 2014; VALDERRAMA i in. 2021; LIAO i in. 2023). W badaniach VALDERRAMA i in. (2021) u zdrowych osobników *S. violacea* i *G. chilensis* drożdże workowe stanowiły 78%, a podstawkowe 22%, co koresponduje z wynikami własnymi – odpowiednio 82,7% i 17,3%.

Drożdże izolowano dotychczas od różnych zwierząt morskich, na przykład z bezkręgowców, gąbek, krewetek i ich jaj, krabów czy ryb (RAGHUKUMAR 2017). W literaturze, drożdże występujące u ryb notowano dotychczas głównie ze skóry, skrzeli, pyska czy treści jelitowej (KUTTY i PHILIP 2008). Na przykład, u zdrowych osobników pstrąga tęczowego występowały gatunki z rodzaju *Candida* i *Rhodotorula* (GALUPPI i in. 2001; GATESOUPE i in. 2005). ANDLID i in. (1995) z jelit tego samego gatunku ryb wyizolowali przede wszystkim *D. hansenii, S. cerevisiae, R. rubra* i *R. glutinis.* Drożdże z czerwonym pigmentem stanowiły aż 90% izolatów. Z kolei RAGGI i in. (2014) stwierdzili obecność gatunków z rodzaju *Candida* spp., *C. zeylanoides,* a także *Filobasidium uniguttuatum, Trichosporon* spp., *R. mucilaginosa, R. glutinis, Y. lipolytica, P. kudriavzevii* i *D. hansenii* w jelicie ryb mięsożernych. Zaobserwowali także zdecydowanie częstsze występowanie *S. cerevisiae* w jelitach ryb hodowlanych, niż dzikich. Obserwacje te mogą wyjaśniać uzyskanie wyłącznie jednego izolatu *S. cerevisiae* ze śledzi bałtyckich, żyjących w środowisku naturalnym. Natomiast BIEDUNKIEWICZ i in. (2015) z pyska pstrągów bytujących w Morskim Oku (Polska) wyizolowali: *C. albicans, C. glabrata, C. krusei, C. pelliculosa* i *R. glutinis.* W śledziach badanych w niniejszej pracy odnotowano występowanie niektórych z wyżej wymienionych drożdży, tj. gatunków z rodzaju *Candida, D. hansenii, P. kudriavzevii, R. mucilaginosa, S. cerevisiae* i *Y. lipolytica.* Może to sugerować, że występowanie tych gatunków drożdży jest związane z organizmami ryb, niezależnie od środowiska ich życia.

Zdrowe osobniki śledzia bałtyckiego zawierają potencjalnie istotne klinicznie dla człowieka gatunki drożdży. Wśród mikrogrzybów wyizolowanych ze śledzi w niniejszych badaniach odnotowano gatunki należące do BSL-2, takie jak: *C. albicans, Cut. curvatum, E. dermatitidis* i *P. kudriavzevii*, a więc potencjalne patogeny, które mogą wywołać objawy chorobowe u osobników z osłabionym układem immunologicznym, zranionych lub z obniżonym potencjałem oksydacyjno-redukcyjnym w tkankach. Poza tym dziesięć gatunków, tj. *A. domesticum, C. parapsilosis, C. sake, D. hansenii, K. marxianus, M. caribbica, M. guilliermondii, P. fermentans, R. mucilaginosa* i *Y. lipolytica*, mimo iż są zaliczane do grupy saprotrofów z BSL-1, w sprzyjających

warunkach ekofizjologicznych także mogą wyzwolić swój potencjał chorobotwórczy i doprowadzić do infekcji gospodarza (DE HOOG i in. 2000, 2020).

RAGHUKUMAR (2017) jako niepatogeniczne drożdże symbiotyczne u zwierząt żyjących w morzach podaje gatunki: *C. parapsilosis, D. hansenii, P. guilliermondii* (aktualnie *M. guilliermondii*), *R. glutinis, R. rubra* (aktualnie *R. mucilaginosa*), *S. cerevisiae, Torulopsis candida* (aktualnie *Candida saitoana*) i *Trichosporon cutaneum* (aktualnie *Cutaneotrichosporon cutaneum*). Cztery z wymienionych gatunków, tj. *C. parapsilosis, D. hansenii, M. guilliermondii* i *S. cerevisiae*, odnotowane zostały u śledzi bałtyckich. Oprócz ostatniego z nich, który przez DE HOOG i in. (2020) uznany został jako gatunek ogólnie uznany za bezpieczny (GRAS), trzy pozostałe należą do grupy BSL-1. Wydaje się więc, że *C. parapsilosis, D. hansenii* i *M. guilliermondii*, mimo tego, iż zostały uznane przez RAGHUKUMAR (2017) za symbionty, mogą być gatunkami potencjalnie chorobotwórczymi dla ryb.

Drożdże stają się potencjalnie szkodliwe w organizmie gospodarza w przypadku obniżenia odporności, wynikającej z niekorzystnych warunków środowiskowych albo infekcji bakteryjnych lub wirusowych (TARTOR i in. 2018). Istotną rolę w patogenezie chorób ryb odgrywa również stres (BARTON 1997), słabe natlenienie zbiornika wodnego, zagęszczenie populacji oraz konkurencja o pokarm, zwiększająca ryzyko uszkodzeń powłok ciała (BIEDUNKIEWICZ i in. 2015). TARTOR i in. (2018) podczas eksperymentalnie przeprowadzonego zakażenia drożdżami z rodzajów *Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Rhodotorula, Debaryomyces* i *Pichia*, pozornie zdrowych osobników tilapii (*Oreochromis* sp.) wykazali, że większość mikrogrzybów powodowała u ryb zbliżone objawy kliniczne, tj. spowolnienie ruchów, nie przyjmowanie pokarmu, utratę odruchu ucieczki oraz gwałtowne wdychanie powietrza znad powierzchni wody. Wśród zmian pośmiertnych wymienili wyraźne przekrwienie narządów wewnętrznych, głównie nerek, wątroby i jelit. Najwyższą śmiertelność wykazali po zaaplikowaniu *C. uniguttulatus* – 100%, *C. lipolytica* (aktualnie *Y. lipolytica*) – 80,95%, *C. albicans* – 71,43% oraz *T. mucoides* (aktualnie *Cutaneotrichosporon mucoides*) – 61,9%. W swojej pracy opisali także objawy charakterystyczne dla infekcji spowodowanej przez konkretny gatunek drożdży. Wykazali, że gatunki grzybów przedstawione także w niniejszej pracy, takie jak: *C. albicans, M. guilliermondii, R. mucilaginosa, Y. lipolytica* i *P. kudriavzevii* mogą powodować zmiany chorobowe i być przyczyną śmierci zwierząt. *C. albicans* wywoływała zaczerwienie pyska i rumień skóry oraz była przyczyną wysokiej

śmiertelności ryb (TARTOR i in. 2018). Obecność tego gatunku w pysku i skrzelach śledzi bałtyckich nie wydaje się być jednak niepokojąca, ponieważ w niniejszych badaniach był on notowany jedynie dwukrotnie. W literaturze *C. albicans* jest określana jako czynnik etiologiczny wielu chorób, ale także jako komensal i część naturalnej mikrobioty u zwierząt i ludzi (DE HOOG i in. 2000, 2020; GATESOUPE i in. 2007). *C. guilliermondii* (aktualnie *M. guilliermondii*; śmiertelność 38,1%) powodowała u ryb krwotoki u podstawy płetw grzbietowych i piersiowych oraz ich gnicie (TARTOR i in. 2018). Izolaty określone jako ten gatunek w przedstawianej pracy stanowiły łącznie jedynie 3,86%. W „Atlas of Clincal Fungi" (DE HOOG i in. 2020) *M. guilliermondii* została sklasyfikowana jako BSL-1, a wymienione przypadki infekcji u ludzi, tj. zapalenie wsierdzia, przełyku, kości i szpiku, infekcje skórne czy odcewnikowe, wydają się być sporadyczne. Należy jednak nadmienić, że ze względu na wymienione przez autorów przypadki śmiertelne u ludzi z obniżoną odpornością układu immunologicznego oraz powodowanie względnie wysokiej śmiertelności u zwierząt, gatunek ten wydaje się być oportunistycznym w stosunku do gospodarza. W badaniach TARTOR i in. (2018), *Y. lipolytica* powodowała śmierć ryb z charakterystycznie otwartym pyskiem (śmiertelność, jak podano wyżej – 80,95%) oraz rumień na skórze i u podstawy płetw, a *R. mucilaginosa* rumień skóry oraz zgniliznę i krwotok u podstawy płetw (śmiertelność na poziomie 42,86%). W niniejszych badaniach oba te gatunki stanowiły po 4,62% wszystkich uzyskanych izolatów i należą do 1 grupy biobezpieczeństwa. *R. mucilaginosa* była wielokrotnie spotykana w próbkach klinicznych, na przykład u pacjentów hematologicznych czy stosujących wentylację mechaniczną, przy zapaleniu pęcherza moczowego, otrzewnej, opon mózgowych, rogówki, a także u pacjentów z wirusem HIV. Opisywano także przypadki zakażeń oportunistycznych u ludzi, zaś jako czynniki zwiększające ryzyko infekcji podaje się stosowanie antybiotyków, kortykosteroidów, leków cytotoksycznych oraz cewników dożylnych (DE HOOG i in. 2000, 2020). Z kolei *Y. lipolytica*, mimo zastosowania w przemyśle przy produkcji lipazy, była przyczyną zakażeń rozsianych, zaburzeń przewodu pokarmowego czy zakażenia odcewnikowego, a także wywołała epidemię na oddziale intensywnej opieki medycznej (DE HOOG i in. 2000, 2020). WALSH i in. (1989) podają, że gatunek ten u zwierząt jest patogenem o niskiej zjadliwości, czemu z kolei zaprzeczają obserwacje TARTOR i in. (2018) u ryb. Należałoby więc przyjrzeć się dokładniej izolatom *Y. lipolytica*, w celu określenia ich relacji z organizmem gospodarza. U ryb celowo zainfekowanych *P. kudriavzevii*, mimo braku zewnętrznych objawów, widoczne były zmiany pośmiertne, takie jak żółte

przebarwienie wątroby wraz z powiększeniem pęcherzyka żółciowego, jednak śmiertelność ryb była nieduża i wynosiła 4,76% (TARTOR i in. 2018). W niniejszej pracy gatunek ten był dominujący w mykobiocie śledzi – izolaty stanowiły aż 43,85% wszystkich. DE HOOG i in. (2020) podkreślili, iż mimo znaczenia biotechnologicznego *P. kudriavzevii*, na przykład w produkcji glicerolu, znane są przypadki wywołania śmiertelnej kandydozy ogólnoustrojowej u osób z upośledzoną odpornością wrodzoną, śmiertelnego zakażenia opłucnej, zapalenia stawów u pacjentów z chłoniakiem, zapalenia pochwy czy w okolicy cewnika. Wydaje się, że czynnikiem predysponującym do zakażenia tym gatunkiem jest stosowanie antymykotyków. Oprócz częstej izolacji od ludzi, *P. kudriavzevii* był notowany jako przyczyna chorób u zwierząt, na przykład przy śmiertelnej infekcji ogólnoustrojowej u żółwia olbrzymiego (IANNACCONE i in. 2018). Pomimo niewielkiej śmiertelności wykazanej u ryb z akwakultury (TARTOR i in. 2018), przynależność *P. kudriavzevii* do BSL-2 oraz doniesienia literaturowe dotyczące infekcji u ludzi i zwierząt związanych z tym gatunkiem sprawiają, że jego rozpowszechnienie w ontocenozach śledzia może być niepokojące i powinno być szerzej rozpatrzone w dalszych badaniach. HATAI i EGUSA (1975) zaobserwowali, że *C. sake* był przyczyną rozdęcia płynem żołądka u *Oncorhynchus rhodurus*. Należy pamiętać, że gatunek ten w przeszłości często był błędnie identyfikowany. DE HOOG i in. (2000) sklasyfikowali te drożdże jako BSL-1, zaś izolaty notowano u pacjentów zakażonych wirusem HIV i cierpiących na kandydozę jamy ustnej i gardła. W badaniach własnych gatunek ten został wyizolowany wyłącznie raz, w pysku, co może wskazywać na jego przypadkową transmisję do organizmu śledzia ze środowiska morskiego. Niepokoi jednak fakt, że izolat posiadał zdolność do wzrostu w temperaturze 37°C, podczas gdy doniesienia literaturowe wskazują, iż temperatura powyżej 30°C jest dla *C. sake* czynnikiem limitującym (DE HOOG i in. 2000). Jako patogen ryb często podaje się gatunki z rodzaju *Exophiala* (DE HOOG i in. 2011; HATAI i in. 2012; JONES i in. 2019). W przedstawianych badaniach *E. dermatitidis* notowano wyłącznie w jelitach jednego osobnika. Występowanie u zdrowych śledzi bałtyckich, gatunków drożdży wykazujących tak wysoką śmiertelność i wywołujących różnorodne objawy chorobowe u innych ryb oraz zwierząt i ludzi, wydaje się więc być niepokojące i w konsekwencji może prowadzić do negatywnego wpływu na kondycję tych ryb, jakość produktów śledziowych, a także na zdrowie konsumentów.

Ryby są podatne na choroby wywołane przez wirusy, bakterie, grzyby i protisty, a liczba zgłaszanych patogenów grzybiczych wzrasta na całym świecie. Ze względu na patogeniczność grzybów i częste obserwowanie ich w populacjach dzikich ryb, rutynowe/ przesiewowe badania tych zwierząt, szczególnie przeznaczonych do celów konsumpcyjnych, oprócz analiz bakteriologicznych, powinny zostać poszerzone o badania mykologiczne (GOZLAN i in. 2014; BIEDUNKIEWICZ i in. 2015).

Powszechnie znane jest pozytywne oddziaływanie bakterii na makroorganizm, natomiast wciąż za mało wiadomo na temat korzystnego wpływu drożdży na kondycję i żywienie ryb (RAGGI i in. 2014; VADERRAMA i in. 2021). W całkowitej mikrobiocie ryb, grzyby jednokomórkowe stanowią około 5% wszystkich mikroorganizmów. Uważa się, że nawet jeśli ich liczebność wynosi mniej niż 1%, mogą one mieć dla gospodarza znaczenie fizjologiczne (GATESOUPE 2007). Ze względu na udział mikrobioty w zdrowiu i rozwoju ryb, ważnym obszarem badań jest określenie jej prawidłowego składu (BATES i in. 2006; RAGGI i in. 2014; HUANG i in. 2020; LIAO i in. 2023) oraz ich potencjału biochemicznego (VALDERRAMA i in. 2021). W związku z występowaniem wielu różnic międzyosobniczych, istotnym zadaniem badawczym wydaje się być określenie mikrobioty rdzennej, wspólnej dla danego gatunku ryby i stabilnej w czasie oraz mikrobioty przejściowej, zmieniającej się w zależności od nawyków żywieniowych zwierzęcia lub warunków środowiska (RAGGI i in. 2014).

RAGGI i in. (2014) zasugerowali, że *D. hansenii* i *R. mucilaginosa* stanowią rdzenną mikrobiotę jelitową u dzikich ryb łososiowatych (*Salmo salar, Oncorhynchus kisutch* i *O. mykiss*) oraz u *Seriola lalandi* i *Cilus gilberti*. Stwierdzili oni, że te gatunki drożdży są lepiej przystosowane do bytowania w jelitach ryb mięsożernych, niezależnie od statusu udomowienia, zasolenia wody czy położenia geograficznego. W badaniach własnych, podobnie jak w doświadczeniu WACHÉ i in. (2006) u *O. mykiss*, oba gatunki drożdży zostały odnotowane w jelitach śledzi bałtyckich. Izolaty *D. hansenii* stanowiły niecałe 17%, zaś *R. mucilaginosa* około 4%. Niższa częstość występowania tych gatunków może być spowodowana faktem, iż śledź nie jest typowym mięsożercą, a żywi się głównie zooplanktonem. Potwierdza to fakt, że *D. hansenii* i *R. mucilaginosa* mogą stanowić drożdże powszechnie występujące w jelitach ryb mięsożernych i jest to związane z poziomem troficznym gospodarza (RAGGI i in. 2014), podobnie jak w przypadku bakterii (WONG i RAWLS 2012). *D. hansenii* jest gatunkiem szeroko rozpowszechnionym w mykobiocie zdrowych ryb oraz środowisku morskim (ANDLID

i in. 1995; GATESOUPE i in. 2007; NAVARRETE i TOVAR-RAMÍREZ 2014; RAGGI i in. 2014). Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy wydaje się jednak, że w przypadku *C. harengus membras* L., spośród wymienionych gatunków, jedynie *D. hansenii* można określić jako gatunek rdzenny. Wysoka częstość izolacji *P. kudriavzevii* we wszystkich badanych ontocenozach, może także sugerować, że drożdże te także stanowią część mikrobioty rdzennej u śledzi bałtyckich. W niniejszych badaniach własnych można zaobserwować, że *C. parapsilosis* oraz gatunki z rodzaju *Apiotrichum* występowały w śledziach przede wszystkim w latach 2016 i 2018, zaś gatunki z rodzaju *Yarrowia*, były izolowane głównie podczas sezonu 2019. Wydaje się więc, że ich obecność w śledziach jest czasowa i zależna od warunków środowiska, co może sugerować że stanowią one mykobiotę przejściową śledzia bałtyckiego. W celu sprawdzenia i potwierdzenia tych domniemań, należy jednak prowadzić dalsze badania w kolejnych sezonach połowowych.

Oprócz niekorzystnego działania, prowadzącego do wywołania chorób u ryb, drożdże mogą wykazywać pozytywny wpływ na te zwierzęta, na przykład stymulując odpowiedź immunologiczną. Jest to możliwe dzięki β-glukanom lub innym związkom wchodzącym w skład ściany komórkowej, tj. mannoproteinom i chitynie. Karmienie ryb paszą z dodatkiem drożdży wpływa na kolonizację jelitową narybku, a w konsekwencji na rozwój ryb, poprzez przyspieszanie dojrzewania układu pokarmowego oraz stymulację i poprawę metabolizmu (GATESOUPE 2007; HUYBEN i in. 2018). Drożdże dzięki zdolności produkcji różnych enzymów, wykorzystują szerokie spektrum prostych i złożonych związków organicznych, co również korzystnie wpływa na odżywianie gospodarza (GAO i in. 2007). Dodatkowo gatunki, które wytwarzają poliaminy, biorą pośrednio udział w dojrzewaniu przewodu pokarmowego larw ryb (REYES i in. 2008).

Wraz z postępem technologicznym, coraz bardziej popularne staje się wykorzystywanie drożdży jako alternatywne źródło białka lub suplementy diety dla ryb, szczególnie tych żyjących w akwakulturach, ale także dla larw krewetek i ryb morskich (GLENCROSS i in. 2020). Poszczególne gatunki drożdży różnią się między sobą zawartością związków organicznych (MAHDY i in. 2022). W swoim składzie komórki drożdży mają szerokie spektrum składników mineralnych, takich jak sód, cynk, wapń miedź, żelazo, mangan i selen (BERTOLO i in. 2019) oraz witamin, np. witamina B i kwas foliowy (HUYBEN i in. 2018). Mikrogrzyby te zostały więc uznane za odpowiednią paszę zarówno dla ryb hodowlanych, jak i dzikich, pełniąc funkcję w odżywianiu, poprawie

odporności i zdrowia, a także mając korzystny wpływ na jakość wody i różnorodność mikroorganizmów w niej żyjących (MAHDY i in. 2022). Niektóre gatunki drożdży wyizolowane ze śledzi w niniejszych badaniach, były notowane w literaturze jako korzystnie wpływające na ryby i stosowane w ich żywieniu. Na przykład, *S. cerevisiae* stosowany jako dodatek do pasz działał immunostymulująco i antyoksydacyjnie oraz zwiększał wydajność wzrostu ryb (BANU i in. 2020). Stosowanie w diecie *P. fermentans* i *M. caribbica* również wpływało korzystnie na wzrost ryb (ISLAM i in. 2021). Dodawanie do pokarmu *R. mucilaginosa* wraz z *Bacillus licheniformis* działało pozytywnie na zdrowie jelit ryb (REYES-BECERRIL i in. 2020). Zastosowanie dodatku drożdży z rodzaju *Rhodotorula* sp. i *Metschnikowia* sp. wpływało na poprawę kondycji przewodu pokarmowego, układu odpornościowego i zwiększenie tolerancji ryb w stosunku do amoniaku (MA i in. 2019). Z kolei wykorzystanie m.in. *K. marxianus,* jako składnika białkowego w paszy, pozwalało zastąpić mączkę rybną i białko sojowe w żywieniu łososia atlantyckiego i pstrąga tęczowego, zwiększając wydajność ich wzrostu (AGBOOLA i in. 2021). Wydaje się więc, że drożdże kolonizujące śledzie mają pozytywny wpływ na ich kondycję i zdrowie. Być może uzyskane izolaty posiadają właściwości fizjologiczne i biochemiczne, dzięki którym mogłyby być w przyszłości wykorzystywane jako dodatek do pasz dla ryb.

Pomimo rozwoju coraz nowszych technik pozwalających na dokładniejszą identyfikację gatunkową drożdży, ogromną rolę wciąż odgrywają metody fenotypowe, takie jak: mikroskopia bezpośrednia, badanie właściwości biochemicznych i hodowla mikrogrzybów (SENSES-ERGUL i in. 2006; POSTERARO i in. 2015). Ze względu na niewystarczające rozróżnienie gatunkowe drożdży, przy użyciu metod wykorzystujących cechy morfologiczne i fizjologiczne, dokładna identyfikacja taksonomiczna staje się wyzwaniem. Konieczne i uzasadnione wydaje się więc uzupełnienie jej o analizy molekularne (CRISEO i in. 2015; ARASTEHFAR i in. 2019). Identyfikacja drożdży metodami klasycznymi jest czasochłonna. Wymaga też doświadczenia mykologów oraz dokładnej kontroli warunków hodowli, co może mieć wpływ na niejednoznaczność wyników, szczególnie w przypadku drożdży rzadko notowanych (AGUSTINI i in. 2014). Gatunki występujące w środowiskach wodnych, szczególnie morskich, charakteryzujące się specyficznymi właściwościami biochemicznymi i wysoką plastycznością ekologiczną, powinny być identyfikowane przy użyciu dostępnych aktualnie najdokładniejszych metod, takich jak sekwencjonowanie Sangera i MALDI-TOF MS

(CRISEO i in. 2015; ASLANI i in. 2018). Amplifikacja i sekwencjonowanie genów są niezwykle przydatne w przypadku gatunków trudnych do zidentyfikowania przy użyciu standardowo stosowanych metod. Jednak techniki biologii molekularnej nie zawsze są dostępne w rutynowej identyfikacji i we wszystkich laboratoriach diagnostycznych (PETTI 2007; CRISEO i in. 2015). Dodatkowo należy zwrócić uwagę na fakt, iż dokładność i prawidłowość identyfikacji na podstawie analiz molekularnych zależy od jakości sekwencji zdeponowanych w bazach danych (ZHAO i in. 2018), np. GenBank. Mimo, że porównywanie sekwencji jest regularnie stosowaną procedurą, wspomina się również o jej ograniczeniach taksonomicznych, prowadzących do niewłaściwej lub niewystarczającej identyfikacji (NILSSON i in. 2006; VALDERRAMA i in. 2021). Optymalne wydaje się więc wzajemne uzupełnianie metod, wykorzystujących cechy fenotypowe i metody molekularne. Tak postąpiono w przypadku izolatów należących do rodzaju *Apiotrichum.* Na podstawie wyłącznie badań molekularnych nie można było prawidłowo określić przynależności gatunkowej izolatów. W związku z tym zostały one poddane dodatkowej analizie biochemicznej, polegającej na sprawdzeniu zdolności rozkładu glukonianu, co uzupełniło badania molekularne i rozwiało wątpliwości dotyczące przynależności gatunkowej tych izolatów. Inni autorzy sugerują analizę regionu IGS (ang. *intergenic spacer region*), w celu rozróżnienia blisko spokrewnionych gatunków z rodzaju *Apiotrichum*. Jednak w przypadku niniejszych badań, ze względu na brak odpowiedniego startera, nie było takiej możliwości (CHAGAS-NETO i in. 2009; TAKASHIMA i SUGITA 2019).

Do identyfikacji gatunkowej oraz analiz filogenetycznych drożdży najczęściej stosowaną aktualnie metodą jest sekwencjonowanie regionów ITS i D1/D2 rDNA (ZHAO i in. 2018) oraz regionu IGS (CHAGAS-NETO i in. 2009; TAKASHIMA i SUGITA 2019). W publicznych bazach danych dostępne są bogate zestawy sekwencji dla regionów ITS i D1/D2. W niniejszych badaniach obserwowano większą zgodność sekwencji regionu D1/D2 z dostępnymi w bazie GenBank. Jeden izolat, *S. cerevisiae,* nie został zidentyfikowany podczas sekwencjonowania regionu ITS rDNA, co jest interesujące ze względu na jego rozpowszechnienie w przyrodzie oraz częste stosowanie w różnego rodzaju gałęziach przemysłu, szczególnie w przemyśle spożywczym (GODDARD i GREIG 2015; MORARD i in. 2023). Należy jednak wziąć pod uwagę, że uzyskanie nieprawidłowej sekwencji, nie pozwalającej na identyfikację tego wszechobecnego gatunku, prawdopodobnie wynika z błędu popełnionego podczas badań, np. zanieczyszczenia

próbki lub niewłaściwą izolację materiału genetycznego, w związku z czym nie należy się w pełni sugerować tym wynikiem.

Dzięki sekwencjonowaniu regionu ITS ujawniono występowanie u chorych ryb następujących gatunków, wcześniej nie zidentyfikowanych, tj. *P. kudriavzevii* i *C. maritima* w skórze i nerkach *Mugil cephalus*, *Y. lipolytica* i *C. kefyr* w wątrobie, *C. uniguttulatus* w nerkach i *T. mucoides* w skrzelach u *Oreochromis* sp., *C. terebra* w skrzelach, *C. catenulata* w skrzelach i wątrobie, a *D. hansenii* na skórze *Clarias gariepinus* (KUTTY i PHILIP 2008). W niniejszych badaniach śledzi również odnotowano niektóre z wymienionych gatunków, tj. *D. hansenii*, *P. kudriavzevii* i *Y. lipolytica*. Być może drożdże te są stałym komponentem mykobioty ryb.

Identyfikacja gatunkowa jest wspomagana przez analizy biochemiczne. Należy jednak nadmienić, że w związku z niejednoznacznością profili biochemicznych grzybów, nie powinno się oznaczać izolatów wyłącznie na podstawie zdolności biochemicznych. Systemy do identyfikacji drożdży oparte na właściwościach biochemicznych mikrogrzybów, takie jak: RapID Yeast Plus (Remel) oraz API 20C AUX, API ID 32C, Vitek ID YST (bioMérieux) i Auxacolor (Bio-Rad) są szeroko stosowane w laboratoriach (ZHAO i in. 2018). Warto jednak zwrócić uwagę na fakt, że zestawy do szybkiej identyfikacji, zostały zaprojektowane z użyciem szczepów klinicznych, w związku z czym profile numeryczne zawarte w katalogu producenta są ograniczone jedynie do kilkunastu gatunków drożdży (TARTOR i in. 2018). Dodatkowo testy te są pracochłonne i kosztowne, interpretacja profili asymilacji cukrów bywa subiektywna, a dodatkowo konieczne jest sprawdzanie zdolności szczepów do wytwarzania strzępek prawdziwych lub pseudostrzępek w mikrohodowlach (GUO i in. 2011). Drożdże izolowane z innych rezerwuarów niż organizm ludzki oraz gatunki rzadko notowane mogą więc zostać nieprawidłowo określone i w celu dokładnej identyfikacji niezbędne jest prowadzenie dalszych analiz (SANGUINETTI i in. 2007; TARTOR i in. 2018). Jako złoty standard do sprawdzenia skuteczności identyfikacji przy użyciu szybkich testów biochemicznych API 20C AUX w przedstawionej pracy zastosowano metody molekularne.

ARASTEHFAR i in. (2019) w swoich badaniach opierając się na sekwencjonowaniu dużej podjednostki domeny D1/D2 rDNA (LSU rDNA), porównali dokładność identyfikacji klinicznych szczepów drożdży z różnych ontocenoz człowieka przy użyciu testów API 20C AUX, uzyskując skuteczność na poziomie 83,7% oraz

MALDI-TOF MS z dokładnością na poziomie 98,3%. Z kolei ZHAO i in. (2018), określili prawidłowo 78,9% szczepów klinicznych przy użyciu systemu API 20C AUX oraz 80,3% wykorzystując testy Vitek. W badaniach własnych, używając testów API 20C AUX prawidłowo określono przynależność jedynie 3 gatunków – *C. parapsilosis, M. guilliermondii, R. mucilaginosa,* co stanowiło 13,63% analizowanych izolatów. Tak niska skuteczność identyfikacji może być związana z pochodzeniem prób, ponieważ drożdże występujące w środowisku i organizmach morskich są dotychczas słabo poznane i rzadziej notowane w literaturze niż szczepy typowo kliniczne. Zaskakujące jest jednak, iż gatunki uznawane za pospolite i często izolowane z prób klinicznych, jak na przykład *C. albicans*, zostały błędnie zidentyfikowane przy użyciu tego systemu. Oprócz prawidłowej identyfikacji *C. parapsilosis,* jako ten sam gatunek określono także *Cut. curvatum* i *P. kudriavzevii.* Podobna sytuacja wystąpiła w przypadku szczepów zidentyfikowanych jako *C. guilliermondii,* gdzie *M. guilliermondii* (nowa nazwa) został określony prawidłowo, natomiast *S. cerevisiae* został błędnie zidentyfikowany jako ten sam gatunek. *Cut. curvatum* również został niepoprawnie zidentyfikowany jako *C. parapsilosis,* z kolei w badaniach ARASTEHFAR i in. (2019) jako *Trichosporon asahii*. System identyfikacji biochemicznej nie jest przystosowany do wykrywania gatunków rzadko spotykanych, również w próbkach klinicznych. Przykładem może być *E. dermatitidis,* dla której nie są dostępne profile referencyjne w katalogu producenta. Dostępne dane w komercyjnych zestawach do identyfikacji gatunkowej należałoby więc poszerzyć, ze względu na ich ograniczenie do niewielkiej liczby gatunków drożdży, z niejednoznaczną identyfikacją drożdży rzadkich (TARTOR i in. 2018; ZHAO i in. 2018).

Nawiązując do tytułu dysertacji, w którym poruszana jest kwestia przeznaczenia śledzi do celów konsumpcyjnych, warto przeanalizować dane literaturowe dotyczące jakości mykologicznej surowca i produktów śledziowych. W przemyśle spożywczym niezbędna jest stała kontrola produktów, ze względu na obecność w nich mikroorganizmów mogących wywoływać procesy biochemiczne decydujące o jakości produktu oraz mogące zmieniać jego właściwości odżywcze i smak. Występowanie w surowcu lub gotowym produkcie organizmów saprotroficznych może być przyczyną degradacji tych produktów, zaś namnażanie się mikroorganizmów chorobotwórczych lub potencjalnie chorobotwórczych może doprowadzić do całkowitej nieprzydatności żywności do spożycia. Dlatego istotnym aspektem jest ustalenie czynników predysponujących do namnażania się mikroorganizmów oraz określenie ich liczby

i różnorodności w produktach spożywczych. Oprócz tego, że mogą one wpływać na jakość produktów, w konsekwencji mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów (PAŠKEVIČIUS i VARNAITĖ 2010; IBRAHIM i in. 2017). Ryby i przetwory rybne są narażone na szybkie psucie się, nawet gdy są przechowywane w warunkach chłodniczych, ponieważ mikroorganizmy psychrofilne są zdolne do wzrostu w surowcu w temperaturze 0-4°C (PAŠKEVIČIUS i VARNAITĖ 2010). Aby spowolnić procesy rozkładu, stosowane są różne technologie, głównie polegające na zamrażaniu. Proces ten prowadzi do zabicia lub przejścia w stan anabiozy (spoczynku) większości mikroorganizmów bytujących w rybach, co zapobiega ich rozprzestrzenianiu oraz degradacji surowca (NARKEVIČIUS 2004). Badania PAŠKEVIČIUS i VARNAITĖ (2010) dowiodły, iż największa liczebność drożdży występowała w filetach wędzonych i w oleju, szczególnie tych z dodatkiem niewielkiej ilości soli. Wydaje się więc, że sól jest czynnikiem limitującym rozwój drożdży w produktach śledziowych (IANIEVA i OGIRCHUK 2018), co należałoby sprawdzić w dalszych badaniach. W przetworach ze śledzi PAŠKEVIČIUS i VARNAITĖ (2010) stwierdzili gatunki takie jak: *C. glabrata, D. hansenii, P. membranifaciens, R. mucilaginosa, S. cerevisiae* i *Y. lipolytica*, zaś w surowych filetach *C. blankii, C. glaebosa, D. hansenii* i *Y. lipolytica*. W badaniach własnych u zdrowych osobników śledzi przeznaczonych do celów konsumpcyjnych uzyskano także *D. hansenii, R. mucilaginosa, S. cerevisiae* i *Y. lipolytica*. Występowanie tych samych drożdży w surowcu i przetworach śledziowych może świadczyć o tym, że procesy wykorzystywane w zakładach przetwórczych nie są do końca skuteczne, a jakość mykologiczna ryb wpływa na jakość produktu oraz pośrednio na zdrowie konsumentów. W związku z tym powinna być monitorowana.

Dla wzrostu grzybów chorobotwórczych optymalne temperatury mieszczą się w zakresie 10-48°C, jednak niektóre z nich mogą także rozwijać się w temperaturach znacznie niższych, nawet poniżej wartości 0°C. Grzyby bytujące w narządach wewnętrznych zazwyczaj mają wyższą górną granicę temperatur. Gatunki grzybów wykazujące zdolność do wzrostu i rozwoju w szerokim zakresie temperatur nazywane są eurytermicznymi (DYNOWSKA i KURNATOWSKA 2018). Na przykładzie *C. albicans* wykazano, że podwyższona temperatura otoczenia jest jednym z głównych czynników indukujących przemianę z jednokomórkowych pączkujących drożdży w formy mycelialne (strzępki i pseudostrzępki). Zdolność do odwracalnej zmiany, pomiędzy dwiema formami morfologicznymi drożdży, jest jedną z ważniejszych cech

pozwalających na przekraczanie w organizmie gospodarza granicy komensal–patogen (CHOW i in. 2021). Niepokojące wydaje się więc, że zdecydowana większość drożdży (88,85%) izolowanych ze śledzi, będących zwierzętami zmiennocieplnymi, wykazywała wzrost w podwyższonej temperaturze otoczenia (37°C). Może to świadczyć o zdolności tych mikrogrzybów do przetrwania w tkankach zwierząt i ludzi, kolonizowania organizmu gospodarza, a w ostateczności do wywołania infekcji. Drożdże izolowane ze śledzi posiadają więc cechy pozwalające im być zarówno zoo-, jak i antropopatogenami.

Wykonane w prezentowanych badaniach testy zdolności fermentacji i asymilacji cukrów przez drożdże wykazały, iż poszczególne izolaty zidentyfikowane jako ten sam gatunek różnią się między sobą właściwościami biochemicznymi, co jest związane wysoką zmiennością ekofizjologiczną tych drożdży (DYNOWSKA 1995). Dodatkowo, jak wspomniano wcześniej, drożdże posiadają charakterystyczne cechy predysponujące do występowania w środowisku morskim, na przykład słabą fermentację węglowodanów (KUTTY i PHILIP 2008). Potwierdzono to w niniejszych badaniach, ponieważ enzymatyczne przekształcanie cukrów przeprowadzało 83 izolaty (36%), z czego najczęściej fermentowana była glukoza.

Drożdże uznaje się za mikroorganizmy ekspansywne i niezmiernie aktywne w przekształcaniu zajmowanej niszy ekologicznej, co koresponduje z ich wysoką aktywnością hydrolityczną (DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2002). W powiązaniu z żywotnością i tempem namnażania się drożdży, aktywność enzymatyczna określa zdolności adaptacyjne do zmieniających się warunków środowiskowych poszczególnych gatunków oraz wskazuje na ich potencjalne właściwości bioindykacyjne (DYNOWSKA i BIEDUNKIEWICZ 2013). Aktywność enzymatyczna odgrywa główną rolę na różnych etapach infekcji gospodarza, zaś spektrum działania enzymów jest zależna od stanu morfologicznego i fizjologicznego tkanki oraz etapu zakażenia (DYNOWSKA 1995; DZIERŻANOWSKA 2006). Enzymy syntetyzowane przez grzyby chorobotwórcze, katalizujące hydrolizę wiązań C–O, C–N i C–C, określane są ogólnie jako hydrolazy. Wśród nich wyróżnia się esterazy, glikozydazy, peptydazy i endopeptydazy czy enzymy hydrolizujące, np. ureazę (DYNOWSKA i KURNATOWSKA 2018). Aktywność enzymatyczna uznawana jest za istotny czynnik determinujący ich patogenność (KRZYŚCIAK 2011). Enzymy drożdży odgrywają ogromną rolę również w metabolizmie gospodarza, ze względu na związek z obiegiem fosforu i węgla oraz zmniejszaniem zjadliwości bakterii w jelitach (REINOSO i in. 2023).

W niniejszej pracy przeanalizowano aktywność 19 enzymów hydrolitycznych przy użyciu testów API ZYM, które są wygodną, wystandaryzowaną metodą, dającą możliwość porównania wyników własnych, z uzyskanymi przez innych badaczy. Spośród analizowanych w badaniach własnych izolatów drożdży, wszystkie wykazywały aktywność fosfohydrolazy naftolowej AS-BI, fosfatazy kwaśnej, arylamidazy leucynowej, fosfatazy zasadowej, esterazy, lipazy esterazowej i arylamidazy walinowej. Wyniki te częściowo pokrywają się z wykazaną aktywnością enzymatyczną drożdży izolowanych z treści jelit zdrowych osobników ryb morskich z Chile. Wyjątek stanowiła fosfataza zasadowa, która nie była aktywna u wszystkich mikrogrzybów izolowanych z *S. violacea* i *G. chilensis* (VADERRAMA i in. 2021). W badaniach drożdży przewodu pokarmowego morskiej ryby – kobii (*Rachycentron canadum*) wykryto 11 enzymów, z czego wszystkie izolaty wykazywały aktywność esterazy, lipazy esterazowej, arylamidazy leucynowej i walinowej (REINOSO i in. 2023). We wszystkich wymienionych wyżej pracach oraz w niniejszych badaniach odnotowano wysoką aktywność fosfohydrolazy naftolowej AS-BI i fosfatazy kwaśnej. Zbliżony profil enzymatyczny drożdży wyizolowanych z ontocenoz śledzi żywiących się głównie zooplanktonem i ryb mięsożernych, może sugerować, że wpływ na aktywność enzymatyczną ma dieta zwierząt. Wydaje się, że wysoka zawartość białka i lipidów oraz niewielka ilość węglowodanów w diecie śledzia, sprzyja zwiększonej aktywności proteaz i lipaz. Na uwagę zasługuje stwierdzenie u większości szczepów aktywności aminopeptydaz, tj. arylamidazy leucynowej, walinowej i cystynowej, co koresponduje z wynikami REINOSO i in. (2023). Wysoka aktywność esterazy i lipazy esterazowej oraz rzadkie występowanie lipazy u analizowanych szczepów drożdży, przy równoczesnym niewielkim udziale glikozydaz, również może potwierdzać wpływ sposobu odżywiania gospodarza na skład i zdolności metaboliczne mikrobiomu (RAGGI i in. 2014; LIU i in. 2016; VALDERRAMA i in. 2021). Sporadyczną aktywność lipazy, trypsyny i α-chymotrypsyny, obserwowaną również przez RAGGI i in. (2014), można wytłumaczyć produkcją tych enzymów przez ryby. U 5 z 22 badanych drożdży stwierdzono obecność β-galaktozydazy. Wykrycie tego enzymu u stosunkowo niewielu izolatów i wykazującego niską aktywność, prawdopodobnie wynika ze sposobu odżywania śledzi. β-galaktozydaza ze względu na zdolność rozkładu celulozy, jest enzymem o potencjale biotechnologicznym (REINOSO i in. 2023) i może być wykorzystywany do produkcji biopaliw z celulozowej biomasy roślinnej (TIWARI i in. 2013; LARUE i in. 2016). Fosfataza zasadowa, notowana w niniejszej pracy u wszystkich izolatów drożdży, defosforyluje i detoksyfikuje

endotoksyny będącej składnikiem bakteryjnych lipopolisacharydów, indukujących stany zapalne u żywicieli, co wskazuje na wspieranie układu odpornościowego ryb przez drożdże w walce z innymi mikroorganizmami (BATES i in. 2007). Aktywność praktycznie tych samych enzymów u izolatów pochodzących od ryb z Chile (VALDERRAMA i in. 2021) i śledzi może sugerować, że niezależnie od położenia geograficznego, mykobiota ryb wykazuje podobne właściwości enzymatyczne.

REINOSO i in. (2023) stwierdzili, że największą aktywnością enzymatyczną charakteryzowały się *D. hansenii* i *C. parapsilosis*, czego nie potwierdzono w badaniach własnych, ponieważ drożdże te wykazywały najniższe wartości aktywności hydrolitycznej. Przeprowadzone analizy potwierdziły wysoką aktywność proteolityczną izolatu *D. hansenii* i lipolityczną *Y. lipolytica*, co zostało uprzednio zaobserwowane przez PAŠKEVIČIUS i VARNAITĖ (2010). Występowanie tych gatunków w rybach oraz produktach rybnych może więc negatywnie wpływać na ich jakość.

Lekowrażliwość mikroorganizmów chorobotwórczych jest wciąż aktualnym problemem medycznym. Jako oporność określa się zdolność patogenu do namnażania się, bądź przeżywania w obecności leku, którego celem stosowania jest zniszczenie lub zahamowanie wzrostu tych mikroorganizmów. Lekooporność dzieli się na pierwotną i wtórną. Oporność pierwotna dotyczy oporności na lek, z którym grzyb nie miał dotychczas kontaktu i może być wynikiem m.in. specyficznej budowy ściany komórkowej grzyba lub wytwarzaniem przez niego enzymów, wykazujących zdolność do inaktywacji tego leku. Szczepy pierwotnie wrażliwe, nabywają w niektórych przypadkach oporność wtórną, w wyniku zmian w materiale genetycznym i selekcji wariantów lekoopornych pod wpływem zastosowanego leczenia. Obserwacja wzrastającej lekooporności grzybów skłania nie tylko do poszukiwania nowych preparatów, ale także do oceny wrażliwości szczepów wyizolowanych z organizmów żywych na dotychczas stosowane antymykotyki (BŁASZKOWSKA 2018). Wrodzoną oporność drożdży na środki przeciwgrzybicze można przewidzieć na podstawie określenia gatunku, z związku z czym szybka i prawidłowa identyfikacja mikrogrzybów kolonizujących organizm ryb oraz zdolnych do wywoływania chorób, pozwala na zaoszczędzenie czasu i dobór odpowiednich antymykotyków (MARKLEIN i in. 2009).

W niniejszym badaniu sprawdzano, przy użyciu komercyjnych testów ATB FUNGUS 3, wrażliwość izolatów drożdży na pięć powszechnie stosowanych leków

przeciwgrzybiczych, tj. 5-flucytozynę, amfoterycynę B, flukonazol, itrakonazol i worikonazol. Mikrogrzyby były najbardziej oporne w stosunku do itrakonazolu, rzadziej do amfoterycyny B i flukonazolu. Z kolei najlepsze działanie bójcze wykazywały: worikonazol i 5-flucytozyna. TARTOR i in. (2018), w badaniach drożdży izolowanych z chorych ryb słodkowodnych, również stwierdzili największy wpływ przeciwgrzybiczy w przypadku worikonazolu. Wydaje się więc, że worikonazol jest najbardziej skutecznym lekiem, działającym na drożdże kolonizujące ryby, niezależne od stanu ich zdrowia. Amfoterycyna B była jednym z najaktywniejszych leków działających na izolaty pozyskane z ryb słodkowodnych, co nie jest zgodne z badaniami własnymi. W obu doświadczeniach wykazano słabą aktywność flukonazolu względem drożdży izolowanych z ryb. Potwierdza to doniesienia o coraz częstszym braku skuteczności flukonazolu względem rzadkich patogenicznych gatunków drożdży izolowanych z materiałów klinicznych od ludzi (BORMAN i in. 2019).

W niniejszych badaniach gatunkami drożdży najbardziej opornymi w stosunku do kontrolowanych antymykotyków były *K. marxianus* i *M. caribbica*. Wrażliwa w stosunku do wszystkich leków przeciwgrzybiczych okazała się być *C. parapsilosis*. *P. kudriavzevii*, która była najczęściej izolowanym gatunkiem grzybów, była podatna na działanie wszystkich leków, z wyjątkiem amfoterycyny B. Część gatunków poddanych sprawdzeniu lekooporności w badaniach własnych i TARTOR i in. (2018) korespondowały ze sobą, co pozwoliło na porównanie oddziaływania antymykotyków na konkretne gatunki grzybów. W prezentowanej pracy obserwowano wyższą lekooporność izolatów *C. albicans* i *D. hansenii* w stosunku do 5-flucytozyny, amfoterycyny B, flukonazolu i itrakonazolu oraz *M. guilliermondii* i *P. kudriavzevii*, z wyjątkiem 5-flucytozyny. Wartości MIC dla *R. mucilaginosa* i *Y. lipolytica* były zbliżone w obu doświadczeniach. Obserwacja wyższych wartości minimalnego stężenia hamującego w przypadku drożdży izolowanych od osobników zdrowych śledzia bałtyckiego wydaje się więc niepokojąca, a badania lekooporności w populacjach dziko żyjących ryb powinny być kontynuowane.

W ostatnich latach obserwuje się zainteresowanie grzybami występującymi w morzach, ze względu na ich różnorodność strukturalną i cechy fizjologiczne. Drożdże w środowiskach morskich musiały ewoluować, aby przetrwać w niekorzystnych warunkach środowiska, charakteryzujących się wysokim zasoleniem, stężeniem związków wykazujących działanie ograniczające wzrost i rozwój oraz niskim poziomem rozpuszczalnego węgla i azotu. Z tego względu wydaje się, że drożdże środowisk

morskich wykazują interesujące właściwości przydatne do celów przemysłowych (ZAKY i in. 2016). Warto zwrócić uwagę, że te same gatunki wyizolowane z różnych ekosystemów mają inne profile metabolitów. W latach 2014-2016 liczba zgłoszonych nowo odkrytych naturalnych związków uzyskanych z grzybów morskich wynosiła 420-490, zaś w 2017 roku– 540 i stale rośnie. W porównaniu z innymi organizmami morskimi, bakteriami i roślinami, grzyby wytwarzają największą różnorodność metabolitów wtórnych, mogących mieć zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Przykładem może być cefalosporyna C, antybiotyk o szerokim spektrum działania, który został pozyskany z *Acremonium chrysogenum*, grzyba wyizolowanego m.in. z wybrzeży Sardynii (JONES i in. 2019). Inne związki izolowane z grzybów pochodzenia morskiego wykazywały na przykład: silne działanie hamujące w stosunku do wirusa H1N1 w zakażonych komórkach nerki (CHEN i in. 2015), dobrą aktywność przeciwko bakteriom oraz opornym na azole szczepom drożdży, takich jak: *C. albicans, C. glabrata* i *Cr. neoformans* (HAGA i in. 2009) czy też silne działanie hamujące *in vitro* przeciwko czterem liniom komórek nowotworowych (GAO i in. 2016). Oprócz tego, że grzyby występujące w środowiskach morskich mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, są wykorzystywane również do produkcji enzymów, pigmentów i barwników (VELMURUGAN i LEE 2012; PANG i in. 2016).

Wzrasta również zainteresowanie mykobiotą różnych zwierząt morskich, przede wszystkim mikrogrzybami występującymi w jelitach, ze względu na ich możliwe wykorzystanie w celach przemysłowych lub jako probiotyki (BANERJEE i GHOSH 2014; VALDERRAMA i in. 2021; REINOSO i in. 2023). Większość znanych na rynku mikroorganizmów stosowanych jako probiotyki to bakterie (THIRUMURUGAN i VIGNESH 2015), jednak w ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się badaniom drożdży (REINOSO i in. 2023). Ponieważ drożdże są częstymi komensalami jelit ryb (RAGGI i in. 2014), są zazwyczaj oporne na związki przeciwbakteryjne (NEUT i in. 2017), łatwo przylegają do śluzu ryb (ANDLID i in. 1998) i mają zdolność do przeżywania w przewodzie pokarmowym (CARUFFO i in. 2015). W związku z tymi cechami mogą okazać się więc dobrymi probiotykami. *P. kudriavzevii* (LATA i in. 2022) czy *R. mucilaginosa* (WANG i in. 2023) prawdopodobnie posiadają właściwości probiotyczne. Dodatkowo drożdże są źródłem kilku związków o wysokiej wartości odżywczej i biologicznej, tj. białek, lipidów, witamin, barwników (KUTTY i PHILIP 2008), enzymów (RAGGI i in. 2014; VALDERRAMA i in. 2021) i poliamin (TOVAR-RAMÍREZ i in. 2004). Ze

względu na wartość odżywczą drożdże stanowią również dodatek do pasz dla ryb, jak wspomniano wcześniej (KUTTY i PHILIP 2008; NAVARRETE i TOVAR-RAMÍREZ 2014; HUYBEN i in. 2018).

Wzrost zainteresowania drożdżami jest związany z ich potencjałem biochemicznym i biotechnologicznym (BUZZINI i MARTINI 2002; SOLIMAN i in. 2017; REINOSO i in. 2023), a w niniejszej pracy zidentyfikowano drożdże mające potencjalne właściwości biotechnologiczne. Na przykład gatunek *Cut. curvatum* cieszy się dużym zainteresowaniem przy produkcji olejów mikrobiologicznych (CUI i in. 2012), ze względu na zdolność kumulowania lipidów do 60% suchej masy komórek oraz możliwość wykorzystywania różnych odnawialnych źródeł węgla, takich jak celuloza i hemiceluloza do produkcji trójglicerydów (HOFMEYER i in. 2016). Z kolei *R. mucilaginosa* może być przydatna w bioremediacji środowiska, dzięki wykorzystywaniu jednopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (IDE-PÉREZ i in. 2020). Ze względu na zdolność do wytwarzania pigmentu może służyć do produkcji barwników karotenoidowych na skalę przemysłową (LIBKIND i VAN BROCK 2006). Szczepy *M. guilliermondii* są obiecującym źródłem ryboflawiny (BORETSKY i in. 2007; ABBAS i SIBIRNY 2011), ksylitolu (RODRIGUES i in. 2006), enzymów, np. inulinazy (GUO i in. 2009), biopaliwa (SCHIRMER-MICHEL i in. 2008) czy aromatów (WAH i in. 2013).

W związku z tym, że informacje dostępne w literaturze na temat mykobioty ryb, szczególnie morskich, są niewystarczające, prezentowane badania poszerzają wiedzę na temat różnorodności gatunkowej drożdży izolowanych z ontocenoz zdrowych osobników śledzi bałtyckich, poławianych do celów konsumpcyjnych. Aspekt ten wydaje się być istotny ze względu na znaczenie gospodarcze i ekonomiczne tego gatunku ryb.

6. Wnioski

1. Identyfikacja gatunkowa drożdży, ze względu na ich zmienną naturę, powinna być dokonywana na podstawie metod klasycznych (morfologicznych i biochemicznych) oraz molekularnych, a analizy te powinny być wzajemnie kompatybilne.
2. Do identyfikacji drożdży pochodzących ze środowiska i zwierząt morskich, w tym ryb, nie zaleca się stosowania komercyjnych testów polegających na sprawdzaniu zdolności biochemicznych izolatów, ze względu na niski stopień prawidłowego określenia przynależności gatunkowej tych mikrogrzybów.
3. Większość gatunków drożdży izolowanych ze śledzi była często notowana w środowisku morskim, co może wskazywać na transmisję drożdży z wód Bałtyku do ontocenoz badanych śledzi.
4. Wyższa częstość kolonizacji pyska i skrzeli przez drożdże, w porównaniu z wątrobą i jelitami, sugeruje że naturalne otwory ciała gospodarza stanowią główną drogę wnikania mikrogrzybów do ontosfery śledzia.
5. Drożdże kolonizujące śledzie częściej były zaliczane do gromady *Ascomycota* niż *Basidiomycota*. Potwierdza to dane literaturowe i sugeruje, że drożdże workowe są bardziej charakterystyczne dla środowiska morskiego i zwierząt morskich niż drożdże podstawkowe.
6. Częstość występowania drożdży w ontocenozach zdrowych osobników śledzia bałtyckiego może świadczyć o powszechności występowania tych mikrogrzybów oraz komensalicznym charakterze relacji „mikro-makroorganizm".
7. Izolowanie ze zdrowych śledzi gatunków drożdży należących do różnych grup biobezpieczeństwa (BSL), notowanych jako potencjalne patogeny zwierząt i ludzi, może wskazywać na zagrożenie ze strony mikrogrzybów u tych ryb i ich konsumentów. Szczególnie narażone na infekcje są osobniki z obniżoną odpornością ogólnoustrojową.
8. Częstość występowania u zdrowych śledzi drożdży z rodzajów: *Apiotrichum, Candida, Cutaneotrichosporon, Debaryomyces, Meyerozyma, Pichia, Rhodotorula* i *Yarrowia* może wskazywać na fakt, iż stanowią one naturalną mykobiotę ryb. Wydaje się, że gatunki *D. hansenii* i *P. kudriavzevii* mogą stanowić rdzenną mykobiotę śledzi bałtyckich. Przypuszcza się również, że

C. parapsilosis oraz gatunki z rodzajów *Apiotrichum* i *Yarrowia* mogą być mykobiotą przejściową śledzi, co należy potwierdzić podczas badań w kolejnych sezonach połowów tych ryb.

9. Zdolność większości izolatów drożdży pozyskanych ze śledzi do wzrostu w temperaturze 37°C wskazuje, że mogą one być nie tylko potencjalnymi zoopatogenami, ale także potencjalnymi antropopatogenami.
10. Występowanie w śledziach bałtyckich tych samych gatunków drożdży, które notowane były w produktach śledziowych przez innych badaczy, może świadczyć o tym, że surowiec stanowi jedno z głównych źródeł kontaminacji mikrogrzybami przetworów rybnych. W związku z tym sugeruje się konieczność prowadzenia kontroli mykologicznej tych przetworów oraz wprowadzenie stałego, szeroko rozumianego monitoringu mykologicznego środowiska morskiego i żyjących w nim zwierząt.

7. Piśmiennictwo

1. ABBAS C.A., SIBIRNY A.A. 2011. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 75: 321-360. https://doi.org/10.1128/MMBR.00030-10
2. ADL S.M., BASS D., LANE C.E., LUKEŠ J., SCHOCH C.L., SMIRNOV A., AGATHA S., BERNEY C., BROWN M.W., BURKI F., CÁRDENAS P., ČEPIČKA I., CHISTYAKOVA L., DEL CAMPO J., DUNTHORN M., EDVARDSEN B., EGLIT Y., GUILLOU L., HAMPL V., HEISS A.A., HOPPENRATH M., JAMES T.Y., KARNKOWSKA A., KARPOV S., KIM E., KOLISKO M., KUDRYAVTSEV A., LAHR D.J.G., LARA E., LE GALL L., LYNN D.H., MANN D.G., MASSANA R., MITCHELL E.A.D., MORROW C., PARK J.S., PAWLOWSKI J.W., POWELL M.J., RICHTER D.J., RUECKERT S., SHADWICK L., SHIMANO S., SPIEGEL F.W., TORRUELLA G., YOUSSEF N., ZLATOGURSKY V., ZHANG Q. 2018. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. J. Eukaryot. Microbiol., 66(1): 4-119. https://doi.org/10.1111/jeu.12691
3. AGBOOLA J.O., ØVERLAND M., SKREDE A., HANSEN J.Ø. 2021. Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: A review of the implications for aquaculture production. Rev. Aquac., 13: 949-970. https://doi.org/10.1111/raq.12507
4. AGUSTINI B.C., SILVA L.P., BLOCH C., BONFIM T.M.B., DA SILVA G.A. 2014. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. Appl. Microbiol. Biotechnol., 98: 5645–5654. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5686-7
5. ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (red.) 2002. Molecular biology of the Cell. Garland Science, Nowy Jork, 1464ss.
6. ANDERSSON L., ANDRÉ C., JOHANNESSON K., PETTERSSON M. 2023. Ecological adaptation in cod and herring and possible consequences of future climate change in the Baltic Sea. Front. Mar. Sci., 10: 1-8. https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1101855

7. ANDLID T., JUAREZ R.V., GUSTAFSSON L. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Microb. Ecol., 30: 321–334. https://doi.org/10.1007/BF00171938
8. 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.
9. ARASTEHFAR A., DANESHNIA F., KORD M., ROUDBARY M., ZARRINFAR H., FANG W., HASHEMI S.J., NAJAFZADEH M.J., KHODAVAISY S., PAN W., LIAO W., BADALI H., REZAIE S., ZOMORODIAN K., HAGEN F., BOEKHOUT T. 2019. Corrigendum: Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA Sequencing for a Wide Range of Clinically Isolated Yeast Species: Improved Identification by Combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an Alternative Strategy for Developing Countries. Front. Cell Infect. Microbiol., 9: 1-9. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00176
10. ARRHENIUS F., HANSSON S. 1993. Food consumption of larval, young and adult herring and sprat in the Baltic Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser., 96: 125-137.
11. ARRHENIUS F., HANSSON S. 1996. Growth and seasonal changes in energy content of young Baltic Sea herring (*Clupea harengus* L.). ICES J. Mar. Sci., 53(5): 792-901. https://doi.org/10.1006/jmsc.1996.0100
12. ARULA T., RAID T., SIMM M., OJAVEER H. 2016. Temperature-driven changes in early life-history stages influence the Gulf of Riga spring spawning herring (*Clupea harengus m*.) recruitment abundance. Hydrobiologia, 767: 125-135. https://doi.org/10.1007/s10750-015-2486-8
13. ARULA T., SHPILEV H., RAID T., SEPP E. 2019. Thermal conditions and age structure determine the spawning regularities and condition of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) in the NE of the Baltic Sea. Peer J., 1-22. https://doi.org/10.7717/peerj.7345
14. ASLANI N., JANBABAEI G., ABASTABAR M., MEIS J.F., BABAEIAN M., KHODAVAISY S., BOEKHOUT T., BADALI H. 2018. Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. BMC Infect Dis., 18(24): 3-11. https://doi.org/10.1186/s12879-017-2916-5
15. BAHRAM M., NETHERWAY R. 2022. Fungi as mediators linking organisms and ecosystems. FEMS Microbiol. Rev., 46: 1-16. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab058

16. BANERJEE S., GHOSH K. 2014. Enumeration of gut associated extracellular enzyme-producing yeasts in some freshwater fishes. J. Appl. Ichthyol., 30: 986-993. https://doi.org/10.1111/jai.12457
17. BANNO I. 1967. Studies on the sexuality of *Rhodotorula*. J. Gen. Appl. Microbiol., 13: 167-196.
18. BANU M.R., AKTER S., ISLAM M.R., MONDOL M.N., HOSSAIN M.A. 2020. Probiotic yeast enhanced growth performance and disease resistance in freshwater catfish gulsa tengra, *Mystus cavasius*. Aquac. Rep., 16: 1-6. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100237
19. BARTON B.A. 1997. Stress in finfish: past, present and future – a historical perspective. W: IWAMA G.K., PICKERING A.D., SUMPTER J.P., SCHRECK C.B. (red.). Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press: 1-33.
20. BATES J.M., AKERLUND J., MITTGE E., GUILLEMIN K. 2007. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in Zebrafish in response to the gut microbiota. Cell Host Microbe, 2: 371–382. https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.010
21. BATES J.M., MITTGE E., KUHLMAN J., BADEN K.N., CHEESMAN S.E., GUILLEMIN K. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. Dev. Biol., 297: 374–386. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.006
22. BATKO A. 1975. Zarys hydromykologii. PWN, Warszawa, 478ss.
23. BERGSTRÖM L., ERLANDSSON M., PUTNIS I., STØTTRUP J.G., KALLASVUO M., BERGSTRÖM U., JOKINEN H., PLIKŠS M., TAAL I., KOKKALIS A., BROWN E., HUSA S., SAKS L., SELNES T., SVIRGSDEN R., SUNDSTRÖM L., YURTSEVA A.O., USTUPS D. 2021. Essential fish habitats in the Baltic Sea – Identification of potential spawning, recruitment and nursery areas. https://jukuri.luke.fi/handle/10024/547874 (15.06.2023)
24. BERNREUTHER M. 2007. Investigations on the feeding ecology of Baltic Sea herring (*Clupea harengus* L.) and sprat (*Sprattus sprattus* L.). Hamburg, 182ss.
25. BERTOLO A.P., BIZ A.P., KEMPKA A.P., RIGO E., CAVALHEIRO D. 2019. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): Evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. J. Food. Sci. Technol., 56: 3697-3706. https://doi.org/10.1007/s13197-019-03833-3

26. BIEDUNKIEWICZ A. 2007. Grzyby w ocenie sanitarno-epidemiologicznej wybranego kąpieliska. W: GARBACZ J.K. (red.). Diagnozowanie stanu środowiska. Metody badawcze – prognozy. Prace Komisji Ekologii i Ochrony Środowiska Bydgoskiego Towarzystwa Naukowego: 107-121.
27. BIEDUNKIEWICZ A., DYNOWSKA M., DYNOWSKI P., KOZŁOWSKI J. STAŃCZAK K. 2015. Badania rekonesansowe mikrogrzybów wyizolowanych z wybranych ontocenoz ryb Morskiego Oka (Tatrzański Park Narodowy). Nauka Tatrom, tom II: 13-17.
28. BIEDUNKIEWICZ A., DYNOWSKA M., EJDYS E., SUCHARZEWSKA E. 2013. Species diversity of yeast-like fungi in some eutrophic lakes in Olsztyn. Acta Mycol., 48: 61-71. https://doi.org/10.5586/am.2013.008
29. BIEDUNKIEWICZ A., GÓRALSKA K. 2016. Microfungi potentially pathogenic for humans reported in surface waters utilized for recreation. CLEAN – Soil, Air, Water., 44: 599-609. https://doi.org/10.1002/clen.201500696
30. BIEDUNKIEWICZ A., OZIMEK T. 2009. Quantitative and qualitative changes of potentially pathogenic fungi in a hydrophyte wastewater treatment plant. Pol. J. Environ. Stud., 18(2): 161-166.
31. BIEDUNKIEWICZ A., SCHULZ Ł. 2012. Fungi of the genus *Exophiala* in tap water – potential etiological factors of phaeohyphomycoses. Mikol. Lek., 19(1): 23-26.
32. BIEDUNKIEWICZ A., SILICKI A., MAZURKIEWICZ-ZAPAŁOWICZ K. 2007. Yeast-like fungi in selected bath of Szczecin. Limn. Rev., 3: 3-10.
33. BIGNERT A., DANIELSSON S., FAXNELD S., EK C., NYBERG E. 2017. Comments Concerning the National Swedish Contaminant Monitoring Programme in Marine Biota. Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 341ss.
34. BLACKWELL M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? Am. J. Bot., 98 (3): 426-38. https://doi.org/10.3732/ajb.1000298
35. BŁASZKOWSKA J. 2018. Oznaczanie *in vitro* wrażliwości grzybów na leki. W: KURNATOWSKA A., KURNATOWSKI P. (red.). Mykologia medyczne. Edra Urban & Partner, Wrocław: 275-291.
36. BOGUSŁAWSKA-WĄS E. (red.) 2010. Różnorodność społeczności drożdży w estuarium Odry i ich wpływ na rozwój ichtiofauny. Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie, Szczecin, 124ss.

37. 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. https://doi.org/10.1078/1438-4639-00056
38. BONSDORFF E. 2006. Zoobenthic diversity-gradients in the Baltic Sea: Continuous post-glacial succession in a stressed ecosystem. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 330: 383–391. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.12.041
39. BORETSKY Y.R., PYNYAHA Y.V., BORETSKY V.Y., KUTSYABA V.I., PROTCHENKO O.V., PHILPOTT C.C., SIBIRNY A.A.. 2007. Development of a transformation system for gene knock-out in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. J. Microbiol. Methods, 70(1): 13-19. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.004
40. BORMAN A.M., MULLER J., WALSH-QUANTICK J., SZEKELY A., PATTERSON Z., PALMER M.D., FRASER M., JOHNSON E.M. 2019. Fluconazole resistance in isolates of uncommon pathogenic yeast species from the United Kingdom. Antimicrob. Agents Chemother., 63: 1-12. https://doi.org/10.1128/AAC.00211-19
41. BUCHOLTZ H.R., TOMKIEWICZ J., NYENGAARD J.R., ANDERSEN J.B. 2013. Oogenesis, fecundity and condition of Baltic herring (*Clupea harengus* L.): A stereological study. Fisher. Res., 145(1): 100-113. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2013.02.003
42. BUZZINI P., LACHANCE M.A., YURKOW A. (red.). 2017. Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology. Springer, Cahm, 293ss.
43. BUZZINI P., MARTINI A. 2002. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. J. Appl. Microbiol., 93: 1020-2025. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x
44. CARUFFO M., NAVARRETE N., SALGADO O., DÍAZ A., LÓPEZ P., GARCÍA K., FEIJÓO C.G., NAVARRETE P. 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. Front. Microbiol., 6: 1-9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01093
45. CASADEVALL A., KONTOYIANNIS D.P., ROBERT V. 2019. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. mBio., 10(4): 1-7. https://doi.org/10.1128/mBio.01397-19
46. CASADEVALL A., PIROFSKI L.A. 2000. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. Infect. Immun., 68: 6511–6518. https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6511-6518.2000

47. CASINI M., CARDINALE M., ARRHENIUS F. 2004. Feeding preferences of herring (*Clupea harengus*) and sprat (*Sprattus sprattus*) in the southern Baltic Sea. ICES J. Mar. Sci., 61: 1267-1277. https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2003.12.011
48. CHAGAS-NETO T.C., CHAVES G.M., MELO A.S., COLOMBO A.L. 2009. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. J. Clin. Microbiol., 47(4): 1074-1081. https://doi.org/10.1128/JCM.01614-08
49. CHEN X., SI L., LIU D., PROKSCH P., ZHANG L., ZHOU D., LIN W. 2015. Neoechinulin B and its analogues as potential entry inhibitors of influenza viruses, targeting viral hemagglutinin. Eur. J. Med. Chem., 93: 182–195. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.006
50. CHOW E.W.L., PANG L.M., WANG Y. 2021. From Jekyll to Hyde: The Yeast – Hyphal Transition of *Candida albicans*. Pathogens, 10: 1-29. https://doi.org/10.3390/pathogens10070859
51. CRISEO G., SCORDINO F., ROMEO O. 2015. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. J. Microbiol. Methods, 111: 50–56. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.02.004
52. CUI Y., BLACKBURN J.W., LIANG Y. 2012. Fermentation optimization for the production of lipid by *Cryptococcus curvatus*: Use of response surface methodology. Biomass Bioenergy, 47: 410-417. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.017
53. CZERNIEJEWSKI P., CZERNIAWSKI R. 2016. Ryby morskie i słodkowodne Polski. Wydawnictwo Naukowe FREL, Warszawa, 93ss.
54. DALPADADO P., ELLERTSEN B., MELLE W., DOMMASNES A. 2000. Food and feeding conditions of Norwegian spring-spawing herring (*Clupea harengus*) throught its feeding migrations. ICES J. Mar. Sci., 57: 843-857. https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0573
55. DASH S., DAS S. K., SAMAL J., THATOI H. N. 2018. Epidermal mucus, a major determinant in fish health: a review. Iran. J. Vet. Res., 19, 72–81.
56. DE HOOG G.S., GUARRO J., GENÉ J., AHMED S., AL-HATMI A.M.S., FIGUERAS M.J., VITALE R.G. (red.) 2020. Atlas of Clinical Fungi, 4th edition. Hilversum, 1600ss.

57. DE HOOG G.S., GUARRO J., GENÉ J., FIGUERRAS M.J. (red.) 2000. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Reus, 1126ss.
58. DE HOOG., VICENTE V.A., NAJAFZADEH M.J., HARRAK M.J., BADALI H. 2011. Waterbone *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. Persoonia, 27: 46-72. https://doi.org/10.3767/0003158511X614258
59. DEÁK T. 2006. Environmental factors influencing yeasts. W: ROSA C.A., GABOR P. (red.). Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer: 155–174. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_8
60. DELORT A.M., VAÏTILINGOM M., AMATO P., SANCELME M., PARAZOLS M., MAILHOT G., LAJ P., DEGUILLAUME L. 2010. A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. Atmos.Res., 9: 249–260. https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2010.07.004
61. DIX N.J., WEBSTER J. 1995. Fungal Ecology. Chapman and Hall, Londyn, 225-265ss.
62. DOBRZYCKA-KRAHEL A., BOGALECKA M. 2022. The Baltic Sea under Anthropopressure – The Sea of Paradoxes. Water, 14(22): 1-20. https://doi.org/10.3390/w14223772
63. DOBRZYCKA-KRAHEL A., KEMP J.L., FIDALGO M.L. 2022. Cold-tolerant traits that favour northwards movement and establishment of Mediterranean and Ponto-Caspian aquatic invertebrates. Aquat. Sci., 84: 47. https://doi.org/10.1007/s00027-022-00879-y
64. DOBRZYCKA-KRAHEL A., MEDINA-VILLAR S. 2020. Alien species of Mediterranean origin in the Baltic Sea Region: Current state and risk assessment. Environ. Rev., 28: 339–356. https://doi.org/10.1139/er-2019-0074
65. DONELLY C., TOMCZAK M., HØNNELAND G. 2021. Poland herring and sprat midwater trawl and grill net. Sprat component. Public Comment Draft Report. 769ss.
66. DWORECKA-KASZAK B., KASZAK I. 2018. Grzybice u zwierząt. W: KURNATOWSKA A., KURNATOWSKI P. (red.). Mykologia medyczne. Edra Urban & Partner, Wrocław: 275-291.
67. DYNOWSKA M. 1995. Drożdże i grzyby drożdżopodobne jako czynniki patogenne i bioindykatory ekosystemów wodnych. Praca habilitacyjna. Studia i materiały WSP, Nr 77, Olsztyn, 82ss.

68. DYNOWSKA M. 1997. Yeast-like fungi possessing bio-indicator properties isolated from the Łyna River. Acta Mycol., 32(2): 279-286.
69. DYNOWSKA M. 2008. Współczesne poglądy na taksonomię, pochodzenie i naturę grzybów. W: BARAN E. (red.). Mikologia – co nowego? Cornetis: 127-137.
70. DYNOWSKA M. 2018. Zmienność natury grzybów i jej znaczenie. W: KURNATOWSKA A., KURNATOWSKI P. (red.). Mykologia medyczna. Edra Urban & Partner, Wrocław: 17-25.
71. DYNOWSKA M., BIEDUNKIEWICZ A. 2002. Aktywność enzymatyczna grzybów drożdżopodobnych izolowanych ze ścieków komunalnych. W: Materiały zjazdowe II Ogólnopolskiej Konferencji Hydromikrobiologicznej nt. Mikroorganizmy w funkcjonowaniu ekosystemów wodnych. Toruń-Ciechocinek: 17–18.
72. DYNOWSKA M., BIEDUNKIEWICZ A. 2013. Mikrogrzyby o potencjalnych właściwościach bioindykacyjnych. W: CIECIERSKA H., DYNOWSKA M. (red.). Biologiczne metody oceny stanu środowiska. Tom II. Ekosystemy wodne. Podręcznik metodyczny. Wydawnictwo Mantis: 284-311.
73. DYNOWSKA M., EJDYS E. 1999. Grzyby chorobotwórcze dla człowieka. Biologia w szkole, 262: 21-26.
74. DYNOWSKA M., KURNATOWSKA A. 2018. Budowa i bioekologia grzybów chorobotwórczych. W: KURNATOWSKA A., KURNATOWSKI P. (red.). Mykologia medyczne. Edra Urban & Partner, Wrocław: 4-16.
75. DYNOWSKA M., PACYŃSKA J. 2009. Miejsce grzybów w monitoringu środowiskowym. W: GARBACZ J.K. (red.). Diagnozowanie stanu środowiska. Materiały badawcze- prognozy. Prace Komisji Ekologii i Ochrony Środowiska Bydgoskiego Towarzystwa Naukowego,: 55-61.
76. DZIERŻANOWSKA D. (red.). 2006. Zakażenia grzybicze- wybrane zagadnienia. Alfa medica Press, Bielsko-Biała, 168ss.
77. EJDYS E. DYNOWSKA M., BIEDUNKIEWICZ A. 2011. Zalecenia ogólne i szczegółowe dotyczące pracy w laboratorium mikologicznym. W: DYNOWSKA M., EJDYS E. (red.). Mikologia laboratoryjna. Przygotowanie materiału badawczego i diagnostyka. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie: 166-175.

78. ELLIS A.E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol., 25: 827-839. https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00038-6
79. FELL J. 2012. Yeasts in marine environments. W: JONES E.B.G., PANG K.L. (red.). Marine fungi and fungal-like organisms. Walter de Gruyter: 91–102.
80. FRIEDMAN D.Z.P., SCHWARTZ I.S. 2019. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. J. Fungi., 5 (3): 1-19. https://doi.org/10.3390/jof5030067
81. GAIKWAD P., JOSHI S., MANDLECHA A., RAVIKUMAR A. 2021. Phylogenomic and biochemical analysis reassesses temperate marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3590 to be *Yarrowia bubula*. Sci. Rep., 11: 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83914-6
82. GALUPPI R., FIORAVANTI M.L., DELGADO MONTERO M.L., QUAGLIO F., CAFFARA M., TAMPIERI M.P. 2001. Segnalazione di due casi di micosi della vescica natatoria in *Sparus aurata* e *Carassius auratus.* Boll. Soc. Ital. Patol. Ittica., 13: 26-34.
83. GAO L.M., CHI Z.M., SHENG J., WANG L., LI J., GONG F. 2007. Inulinase-producing marine yeasts: evaluation of their diversity and inulin hydrolysis by their crude enzymes. Microb. Ecol., 54: 722–729. https://doi.org/10.1007/s00248-007-9231-4
84. GAO X.W., LIU H.X., SUN Z.H., CHEN Y.C., TAN Y.Z., ZHANG W.M. 2016. Secondary metabolites from the deep-sea derived fungus *Acaromyces ingoldii* FS121. Molecules, 21: 1-7. https://doi.org/10.3390/molecules21040371
85. GATESOUPE F.J. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. Aquac., 267: 20-30. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.005
86. GATESOUPE F.J., AUBIN J., QUENTEL C., LABBÉ L. 2005. Ofimer probiotic study on rainbow trout. IV. The settlement of intestinal microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry submitted to probiotic treatment. W: HENDRY C.I., VAN STAPPEN G., WILLE M., SORGELOOS P. (red.) Fish and Shellfish Larviculture Symposium. European Aquaculture Society, Oostende: 180-183.
87. GLENCROSS B.D., HUYBEN D., SCHRAMA J.W. 2020. The application of singlecell ingredients in aquaculture feeds- a review. Fishes, 5(22): 1-22. https://doi.org/10.3390/fishes5030022

88. GNAT S., ŁAGOWSKI D., NOWAKIEWICZ A., DYLĄG M. 2021. A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidioses. J. Appl. Microbiol., 131: 2095-2113. https://doi.org/10.1111/jam.15032
89. GODDARD M.R., GREIG D. 2015. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? FEMS Yeast. Res., 15: 1-6. https://doi.org/10.1093/femsyr/fov009
90. GOZLAN R.E., MARSHALL W.L., LILJE O., JESSOP C.N., GLEASON F.H., ANDREUO S. 2014. Current ecological understanding of fungal-like pathogens of fish: what lies beneath? Front. Microbiol., 5(62): 1-16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00062
91. GOZLAN R.E., PEELER E.J., LONGSHAW M. ST-HILLARE S., FEIST S.W. 2006. Effect of microbial pathogens on the diversity of aquatic populations, notably in Europe. Microbes Infect., 8: 1358-1364. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.010
92. GUO M., CHEN Y., DU Y., DONG Y. H., GUO W., ZHAI S. ZHANG H., DONG S., ZHANG Z., WANG Y., WANG P., ZHENG X. 2011. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. PLoS Pathog., 7(2): 1-22. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001302
93. GUO N., GONG F., CHI Z., SHENG J., LI J. 2009. Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36: 499–507. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0519-2
94. HAGA A., TAMOTO H., ISHINO M., KIMURA E., SUGITA T., KINOSHITA K. TAKAHASHI K., SHIRO M., KOYAMA K. 2009. Pyridone alkaloids from a marine-derived fungus, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, and their activities against azole-resistant *Candida albicans*. J. Nat. Prod.,76(4): 750-754. https://doi.org/10.1021/np300876t
95. HAN F., JAMSANDEKAR M., PETTERSSON M.E., SU L., FUENTES-PARDO A.P., DAVIS B.W. BEKKEVOLD D., BERG F., CASINI M., DAHLE G., FARRELL E.D., FOLKVORD A., ANDERSSON L. 2020. Ecological adaptation in Atlantic herring is associated with large shifts in allele frequencies at hundreds of loci. Genome Biol. Evol., 9: 1-20. https://doi.org/10.7554/eLife.61076

96. HASHEM O., ZAKI V., ADAWY R. 2020. Incidence and molecular characterization of fungi and yeast isolated from cultured catfish and Nile tilapia. Mansoura Vet. Med. J., 21: 61-66. https://doi.org/10.21608/MVMJ.2020.21.311
97. HASSETT B.T., VONNAHME T.R., PENG X., JONES E.B.G. HEUZÉ C. 2020. Global diversity and geography of planktonic marine fungi. Bot. Mar., 63(2): 121-139. https://doi.org/10.1515/bot-2018-0113
98. HATAI K. 2012. Diseases of Fish and Shellfish Caused by Marine Fungi. W: RAGHUKUMAR C. (red.). Biology of Marine Fungi. Springer: 15-52. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23342-5
99. HATAI K., EGUSA S. 1975. *Candida sake* from gastro-tympanites of amago, *Oncorhynchus rhodurus*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 41: 993.
100. HATTORI T., SAKAYAROJ J., JONES E.B.G., SUETRONG S., PREEDANON S., KLAYSUBAN A. 2014. Three species of *Fulvifomes* (Basidiomycota, Hymenochaetales) associated with rots on mangrove tree *Xylocarpus granatum* in Thailand. Mycoscience, 55(5): 344-354. https://doi.org/10.1016/j.myc.2014.01.001
101. HAWKSWORTH D.L., LAGRECA S. 2007. New bottles for old wine: fruit body types, phylogeny, and classification. Mycol. Res., 19: 999-1000. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.10.002
102. HAWKSWORTH D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. Mycol. Res., 95: 641–655. https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80810-1
103. HAWKSWORTH D.L., LÜCKING R. 2017. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. Microbiol. Spectr., 5(4). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016
104. HERNÁNDEZ-GARCÍA J., DIEGO-MARTIN B., KUO P.H. JAMI-ALAHMADI Y., VASHISHT A.A., WOHLSCHLEGEL J., JACOBSEN S.E., BLÁZQUEZ M.A., GALLEGO-BARTOLOMÉ J. 2022. Comprehensive identification of SWI/SNF complex subunits underpins deep eukaryotic ancestry and reveals new plant components. Commun. Biol., 5: 1-11. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03490-x
105. HOFMEYER T., HACKENSCHMIDT S., NADLER F., THÜRMER A., DANIEL R., KABISCH J. 2016. Draft genome sequence of *Cutaneotrichosporon curvatus* DSM 101032 (formerly *Cryptococcus curvatus*), an oleaginous yeast producing

polyunsaturated fatty acids. Genome Announc., 4(3): 1-2. https://doi.org/10.1128/genomeA.00362-16

106. HRYSZKO K. 2022. Analizy Rynkowe. Rynek ryb. Stan i perspektywy. Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej Państwowy Instytut Badawczy. 33: 3-19.

107. HUANG Q., SHAM R.C., DENG Y., MAO Y., WANG C., ZHANG T., LEUNG K.M.Y. 2020. Diversity of gut microbiomes in marine fishes is shaped by host-related factors. Mol. Ecol., 29: 5019-5034. https://doi.org/10.1111/mec.15699

108. HUYBEN D., SUN L., MOCCIA R., KIESSLING A., DICKSVED J., LUNDH T. 2018. Dietary live yeast and increased water temperature influence the gut microbiota of rainbow trout. J. Appl. Microbiol., 124: 1377-1392. https://doi.org/10.1111/jam.13738

109. HYDE K.D., MAHARACHCHIKUMBURA S.S.N., HONGSANAN S., SAMARAKOON M.C., LÜCKING R., PEM D., HARISHCHANDRA D., JEEWON R., ZHAO R.L., XU J.C., LIU J.K., AL-SADI A.M., BAHKALI A.H., ELGORBAN A.M. 2017. The ranking of fungi – a tribute to David L. Hawksworth on his 70th birthday. Fungal Divers., 84: 1–23. https://doi.org/10.1007/s13225-017-0383-3

110. IANIEVA O.D., OGIRCHUK K.S. 2018. Yeasts associated with salted herring and brine, Ukraine. Mikrobiolohichnyi zh., 80(2): 40-51. https://doi.org/10.15407/microbiolj80.02.080

111. IANNACCONE M., BASSO P.R., CONGIU T., CAVICCHIO P., ULIVI V., CAMPOLO M. 2018. Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) induced by *Candida krusei* in an Aldabra giant tortoise (*Aldabrachelys gigantea)* and confirmed by electron microscopy analysis. Med. Mycol. Case Rep., 21: 44-48. https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2018.04.002

112. IBRAHIM H.M., EL SABAGH R.A., EL-ROOS A., NAHLA A. 2017. Mycotic quality of locally manufactured smoked herring fish. BVMJ, 32(1): 113-120. https://doi.org/10.21608/bvmj.2017.31165

113. IDE-PÉREZ M.R., FERNÁNDEZ-LÓPEZ M.G., SÁNCHEZ-REYES A., LEIJA A., BATISTA-GARCÍA R.A., FOLCH-MALLOL J.L., SÁNCHEZ-CARBENTE, M.D.R. 2020. Aromatic hydrocarbon removal by novel extremotolerant *Exophiala* and *Rhodotorula* spp. from an oil polluted site in Mexico. J. Fungi, 6(135): 1-17. https://doi.org/10.3390/jof6030135

114. ISLAM F., SALAM M.A., RAHMAN M.A., PAUL S.I., DAS T.R., RAHMAN M.M., SHAHA D.C., GUPTA D.R., ALAM M.S., ISLAM T. 2021. Plant endophytic yeasts *Pichia fermentans* and *Meyerozyma caribbica* improve growth, biochemical composition, haematological parameters and morphology of internal organs of premature *Barbonymus gonionotus*. Aquac. Rep., 19: 1-13. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100575

115. JONES E.B.G. 2011. Fifty years of marine mycology. Fungal Divers., 50: 73-112. https://doi.org/10.1007/s13225-011-0119-8

116. JONES E.B.G., PANG K.L., ABDEL-WAHAB M., SCHOLZ B., HYDE K.D., BOEKHOUT T., EBEL R., RATEB M.E., HENDERSON L., SAKAYAROJ J., SUETRONG S., DAYARATHNE M.C., KUMAR V., RAGHUKUMAR S., SRIDHAR K.R., BAHKALI A.H.A, GLEASON F.H., NORPHANPHOUN C. 2019. An online resource for marine fungi. Fungal Divers., 96: 347-433. https://doi.org/10.1007/s13225-019-00426-5

117. JONES E.B.G., SUETRONG S., SAKAYAROJ J., BAHKALI A.H., ABDEL-WAHAB M.A., BOEKHOUT T., PANG K.L. 2015. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. Fungal Divers., 73:1-72. https://doi.org/10.1007/s13225-015-0339-4

118. JØRGENSEN H.B.H., HANSEN M.M., BEKKEVOLD S., RUZZANTE D.E., LOESCHKE V. 2005. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. Mol. Ecol., 14: 3219-3234. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02658.x

119. KOHLMEYER J., KOHLMEYER E. 1979. Marine Mycology. The Higher Fungi. Academic Press, Nowy Jork, 690 ss.

120. KOZŁOWSKA E., HOC N., SYCZ J., URBANIAK M., DYMARSKA M., GRZESZCZUK J., KOSTRZEWA-SUSŁOW E., STĘPIEŃ Ł., PLĄSKOWSKA E., JANECZKO T. 2018. Biotransformation of steroids by entomopathogenic strains of *Isaria farinosa*. Microb. Cell Fact., 17(1): 1-11. https://doi.org/10.1186/s12934-018-0920-0

121. KRZYŚCIAK P. 2011. Ocena aktywności enzymatycznej izolowanych od ludzi grzybów z rodzaju *Rhodotorula* wykonana testem API ZYM. Mikol. Lek., 18(2): 65-70.

122. KRZYŚCIAK P., SKÓRA M., MACURA A.B. (red.) 2011. Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. MedPharm Polska, Wrocław, 342ss.

123. KULESZA K., BIEDUNKIEWICZ A., NOWACKA K., DYNOWSKA M., URBANIAK M., STĘPIEŃ Ł. 2021. Dishwashers as an extreme environment of potentially

pathogenic yeast species. Pathogens, 10: 1-17. https://doi.org/10.3390/pathogens10040446

124. KULESZA K., BIEDUNKIEWICZ A., NOWACKA K., GLINKA P. 2018. Potentially pathogenic fungi of the *Candida* genus isolated from the Łyna River – a 20-year study. Ann. Parasitol., 64(3): 217-222. https://doi.org/10.17420/ap6403.155
125. KUMAR S., STECHER G., TAMURA K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol., 33(7): 1870-1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054
126. KURNATOWSKA A. 2006. Biologia i ekologia grzybów chorobotwórczych. W: KURNATOWSKA A., KURNATOWSKI P. (red.). Mikologia medyczna. Promedi: 23-52.
127. KURNATOWSKA A., KHALID K. 2018. Badania diagnostyczne. W: KURNATOWSKA A., KURNATOWSKI P. (red.). Mykologia medyczna. Edra Urban & Partner, Wrocław: 26-47.
128. KURNATOWSKI P., KURNATOWSKA A.J. 2018. Układ żywiciel-grzyb. W: KURNATOWSKA A., KURNATOWSKI P. (red.). Mykologia medyczna. Edra Urban & Partner, Wrocław: 166-174.
129. KURTZMAN C.P. 1993. DNA-DNA hybridization approaches to species identification in small genome organisms. Methods Enzymol., 224: 335-48. https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)24025-P
130. KURTZMAN C.P., FELL J.W. (red.). 1998. The Yeasts, A Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier, Amsterdam, 1055ss. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81312-1.X5000-X
131. KURTZMAN C.P., FELL J.W. 1991. Molecular relatedness between the basidiomycetous yeasts *Sporidiobolus ruinenii* and *Sporobolomyces coprophilus*. Mycologia, 83: 107-10. https://doi.org/10.1080/00275514.1991.12025984
132. KURTZMAN C.P., FELL J.W., BOEKHOUT T. 2011. The Yeast. A Taxonomic Study. 5th ed. Elsevier, Tokyo, 2354ss.
133. KURTZMAN C.P., MATEO R.Q., KOLECKA A., THEELEN B., ROBERT V., BOEKHOUT T. 2015. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. FEMS Yeast Res., 15(6): 1-17. https://doi.org/10.1093/femsyr/fov050
134. KUTTY S., PHILIP R. 2008. Marine yeasts – a review. Yeast, 25: 465–483. https://doi.org/10.1002/yea.1599

135. LARUE K., MELGAR M., MARTIN V.J.J. 2016. Directed evaluation of a fungal β-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Biofuels., 9(52): 1-15. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0470-9

136. LATA P., KUMARI R., SHARMA K.B., RANGRA S. 2022. In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. J. Genet. Eng. Biotechnol., 20(1): 1-10. https://doi.org/10.1186/s43141-022-00416-2

137. LIAO X., YANG J., ZHOU Z., WU J., XU D., YANG Q., ZHONG S., ZHANG X. 2023. Diversity and antimicrobial activity of intestinal fungi from three species of coral reef fish. J. Fungi, 9: 1-14. https://doi.org/10.3390/jof9060613

138. LIBKIND D., VAN BROOCK M. 2006. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. World J. Microbiol. Biotechnol., 22: 687–692. https://doi.org/10.1007/s11274-005-9091-3

139. LIU H., GUO X., GOONERATNE R., LAI1 R., ZENG C., ZHAN F., WANG W. 2016. The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. Sci. Rep., 6: 1-12. https://doi.org/10.1038/srep24340

140. LIU Y., SINGH P., LIANG Y., LI J., XIE N., SONG Z., DAROCH M., LENG K., JOHNSON Z.I., WANG G. 2017. Abundance and molecular diversity of thraustochytrids in coastal waters of southern China. FEMS Microbiol. Ecol., 5: 89. https://doi.org/10.1093/femsec/fix070

141. MA Y.X., LI L.Y., LI M., CHEN W., BAO P.Y., YU Z.C., CHANG Y.Q. 2019. Effects of dietary probiotic yeast on growth parameters in juvenile sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. Aquac., 499: 203-211. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.043

142. MACKENZIE B.R., GISLASON H., MOLLMANN C., KOSTER F.W. 2007. Impact of 21st century climate change on the Baltic Sea fish community and fisheries. Glob. Chang. Biol., 13: 1348–1367. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01369.x

143. MAGWAZA N.M., NXUMALO E.N., MAMBA B.B., MSAGATI T.A.M. 2017. The occurrence and diversity of waterborne fungi in African aquatic systems: their impact on water quality and human health. Int. J. Environ. Res. Public Health, 14(546): 1-10. https://doi.org/10.3390/ijerph14050546

144. MAHDY M.A., JAMAL M.T., AL-HARB M., AL-MUR B.A., HAQUE M.F. 2022. Use of yeasts in aquaculture nutrition and immunostimulation: A review. J. Appl. Biol. Biotechnol., 10(5): 59-65. https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100507

145. MARKLEIN G., JOSTEN M., KLANKE U., MULLER E., HORRE R., MAIER T., WENZEL T., KOSTRZEWA M., BIERBAUM G., HOERAUF A., SAHL H.G. 2009. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J. Clin. Microbiol., 47: 2912–2917. https://doi.org/10.1128/JCM.00389-09

146. MCNEILL J., BARRIE F.R., BUCK W.R., DEMOULIN V., GREUTER W., HAWKSWORTH D.L. i in. 2012. International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code). Regnum Veg., 154. Koelz Scientific Books, Koenigstein, Germany.

147. MCNEILL J., BARRIE F.R., BURDET H.M., DEMOULIN V., HAWKSWORTH D.L. i in. 2006. International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) Regnum Veg., 146. Gantner, Ruggell, Liechtenstein.

148. MOKHTAR D.M., ZACCONE G., ALESCI A, KUCIEL M., HUSSEIN M.T. SAYED R.K.A. 2023. Main components of fish immunity: an overview of the fish immune system. Fishes, 8 (93): 1-24. https://doi.org/10.3390/fishes8020093

149. MÖLLMAN C., KORNILOVS G., SIDREVICS L. 2000. Long-term dynamics of main mesozooplankton species in the Central Baltic Sea. J. Plankton Res., 22: 2015-2038. https://doi.org/10.1093/plankt/22.11.2015

150. MORARD M., PÉREZ-TRAVÉS L., PERPIÑÁ C., LAIRÓN-PERIS M., COLLADO M.C., PÉREZ-TORRADO R., QUEROL A. 2023. Comparative genomics of infective *Saccharomyces cerevisiae* strains reveals their food origin. Sci. Rep., 13: 1-9. https://doi.org/10.1038/s41598-023-36857-z

151. MUSZYŃSKA E., KIZIEWICZ B., GODLEWSKA A., JANKOWSKA D., ORDAK M. 2017. Fungi and fungus-like organisms growing in selected lotic oxbow lakes and tributaries of Narew River. Oceanol. Hydrobiol., 46(1): 85-95. https://doi.org/10.1515/ohs-2017-0009

152. NAGAHAMA T. 2006. Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments. W: CARLOS A.R., GÁBOR P. (red.) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer: 241-262.

153. NAGY E., DLAUCHY D., MEDEIROS A.O., PÉTER G., ROSA C.A. 2014. *Yarrowia porcina* sp. nov. and *Yarrowia bubula* f.a. sp. nov., two yeast species from meat

and river sediment. Antonie van Leeuwenhoek, 105: 697–707. https://doi.org/10.1007/s10482-014-0125-4

154. NAGY E., NISS M., DLAUCHY D., ARNEBORG N., NIELSEN D.S., PÉTER G. 2013. *Yarrowia divulgata* f.a., sp. nov., a yeast species from animal-related and marine sources. Int. J. Syst. Evol., 63: 4818–4823. https://doi.org/10.1099/ijs.0.057208-0

155. NARANJO-ORITZ M., GABALDÓN T. 2019. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the *Fungi*. Biol. Rev., 94: 2101-2137. https://doi.org/10.1111/brv.12550

156. NARKEVIČIUS R. 2004. Problems in assuring safety of cold smoked fish: *Listeria monocytogenes* (review). Food Chem. Technol., 38: 29-34.

157. NAVARRETE P., TOVAR-RAMÍREZ D. 2014. Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. W: HERNANDEZ-VERGARA P., PEREZ-ROSTRO C.I (red.). Sustainable Aquaculture Techniques. Intechopen: 135-172.

158. NEUT C., MAHIEUX S., DUBREUIL L.J. 2017. Antibiotic susceptibility of probiotic strains: Is it reasonable to combine probiotics with antibiotics? Med. Mal. Infect., 47: 477–483. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2017.07.001

159. NILSSON R.H., RYBERG M., KRISTIANSSON E., ABARENKOV K., LARSSON K.H., KOLJALG U. 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. PLoS ONE, 1: 1-5. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000059

160. O'RORKE R., LAVERY S. D., WANG M., NODDER S. D., JEFFS A. G. 2013. DETERMINING the diet of larvae of the red rock lobster (*Jasus edwardsii*) using high-throughput DNA sequencing techniques. Mar. Biol., 161: 551–563. https://doi.org/10.1007/s00227-013-2357-7

161. OCCHIPINTI-AMBROGI A. 2007. Global change and marine communities: Alien species and climate change. Mar. Pollut. Bull., 55: 342–352. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.11.014

162. OJAVEER E., KALEJS M. 2005. The impact of climate change on the adaptation of marine fish in the Baltic Sea. ICES J. Mar. Sci., 62: 1492-1500. https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2005.08.002

163. OJAVEER H., JAANUS A., MACKENZIE B.R., MARTIN G., OLENIN S., RADZIEJEWSKA T., TELESH I., ZETTLER M.L., ZAIKO A. 2010. Status of

biodiversity in the Baltic Sea. PLoS ONE, 5(9): 1-19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012467

164. PANG K.L., OVERY D.P., JONES E.B.G., DA LUZ CALADO M., BURGAUD G., WALKER A.K., JOHNSON J.A., KERR R.G., CHA H.J., BILLS G.F. 2016. 'Marine fungi' and 'marine-derived fungi' in natural product chemistry research: toward a new consensual definition. Fungal Biol. Rev., 30: 163-175. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.08.001

165. PANG K.L., VRIJMOED L.L.P., KONG R.Y.C., JONES E.B.G. 2003. Polyphyly of *Halosarpheia* (*Halosphaeriales, Ascomycota*): implications on the use of unfurling ascospore appendages as a systematic character. Nova Hedwig., 77: 1–18. https://doi.org/10.1127/0029-5035/2003/0077-0001

166. PAŠKEVIČIUS A., VARNAITĖ R. 2010. Yeast occurrence in herring products and processing environment and their biochemical peculiarities. Polish J. Food Nutr. Sci., 60(4): 369-373.

167. PERSSON L. 2010a. Sweden's fisheries catches in the Baltic Sea (1950-2007). W: ROSSING P., BOOTH S., ZELLER D. (red.). Total marine fisheries extractions by country in the Baltic Sea: 1950-present. Fisheries Centre Research Reports: 18(1): 225-263.

168. PERSSON M. 2010b. Changes in condition of herring (*Clupea harengus*) in Swedish coastal waters. Unpublished bachelor thesis. School of Life Sciences, Södertörns Högskola, 4ss.

169. PETTI C.A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. Med. Microbiol., 44: 1108–1114. https://doi.org/10.1086/512818

170. PODOLSKA M. 2009. Larwy *Anisakis simplex* w śledziach bałtyckich jako organizmy wskaźnikowe w badaniach biologicznych i rybackich. I. Śledź bałtycki i nicienie *A. simplex*: modele infekcji pasożytniczej i wskaźniki migracji ryb. Wiad. Parazytol., 55(3): 201-210.

171. POLI A., VIZZINI A., PRIGIONE V., VARESE G.C. 2018. Basidiomycota isolated from the Mediterranean Sea - phylogeny and putative ecological roles. Fungal Ecol., 36: 51-62. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.09.002

172. POLTE P., GRÖHSLER T., KOTTERBA P., VON NORDHEIM L., MOLL D., SANTOS J., RODRIGUEZ-TRESS P., ZABLOTSKI Y., ZIMMERMANN C. 2021. Reduced reproductive success of Western Baltic herring (*Clupea harengus*) as a response

to warming winters. Front. Mar. Sci., 8: 1-13. https://doi.org/10.3389/fmars.2021.589242

173. PONGOLINI L., NILSON H. (red.). 2014. Herring. An analysis of spawning ground management, ecological conditions and human impacts in Greifswald Bay, Vistula Lagoon and Hanö Bight. CA Andersson, Malmö, 13-14 ss.

174. POSTERARO D., VERRETT J., MARIC M., SERVIO P. 2015. New insights into the effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) concentration on methane hydrate growth. 1. Growth rate. Chem. Eng. Sci., 126, 99-105. https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.12.009

175. RAGGI P., LOPEZ P., DIAZ A., CARRASCO D., SILVA A.,VELEZ A., OPAZO R., MAGNE F., NAVARRETE P.A. 2014. *Debaryomyces hansenii* and *Rhodotorula mucilaginosa* comprised the yeast core gut microbiota of wild and reared carnivorous salmonids, croaker and yellowtail. Environ. Microbiol., 16(9): 2791-2803. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12397

176. RAGHUKUMAR C. (red.). 2012. Biology of marine fungi. Springer, Nowy Jork, 334ss.

177. RAGHUKUMAR S. 2017. Animals in coastal benthic ecosystem and aquaculture systems. RAGHUKUMAR S. (red.). Fungi in coastal and oceanic marine ecosystems. Marine Fungi. Springer: 163-184.

178. RAJASILTA M., HÄNNINEN J., VUORINEN I. 2014. Decreasing salinity improves the feeding conditions of the Baltic herring (*Clupea harengus membras*) during spring in the Bothnian Sea, northern Baltic. ICES J. Mar. Sci., 71(5): 1148-1152. https://doi.org/10.1093/icesjms/fsu047

179. RAJASILTA M., LAINE P., PARANKO J. 2011. Current growth, fat reserves and somatic condition of juvenile Baltic herring (*Clupea harengus membras*) reared in different salinities. Helgol. Mar. Res., 65: 59-66. https://doi.org.10.1007/s10152-010-0201-8

180. RAMAIAH N. 2006. A review on fungal diseases of algae, marine fishes, shrimps and corals. IJMS, 35(4): 380-387.

181. REINOSO S., GUTIÉRREZ M.S., DOMÍNGUEZ-BORBOR C., ARGÜELLO-GUEVARA W., BOHÓRQUEZ-CRUZ M., SONNENHOLZNER S., NOVA-BAZA D., MARDONES C., NAVARRETE P. 2023. Selection of autochthonous yeasts isolated from the intestinal tracts of cobia fish (*Rachycentron canadum*) with probiotic potential. J. Fungi, 9 (274): 1-24. https://doi.org/10.3390/jof9020274

182. RENZ J., HIRCHE H.J. 2006. Life cycle of *Pseudocalanus acuspes* Giesbrecht (Copepoda, Calanoida) in the Central Baltic Sea: seasonal and spatial distribution. Mar. Biol., 148: 567-580. https://doi.org/10.1007/s00227-005-0103-5

183. REYES B.M., TOVAR R.D., ASCENCIO V.F., CIVERA C.R., GRACIA L.V., BARBOSA S.V. 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. Aquacul., 280: 39-44. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.03.056

184. REYES-BECERRIL M., ANGULO M., SANCHEZ V., GULUARTE C., ANGULO C. 2020. β-D-glucan from marine yeast *Debaryomyces hansenii* BCS004 enhanced intestinal health and glucan-expressed receptor genes in Pacific red snapper Lutjanus peru. Microbial. Pathog., 143: 1-10. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104141

185. RHEINHEIMER G. 1998. Pollution in the Baltic Sea. Naturwissenschaften, 85: 318–329. https://doi.org/10.1007/s001140050508

186. RIERA ROMO M., PÉREZ-MARTÍNEZ D., CASTILLO FERRER C. 2016. Innate immunity in vertebrates: An overview. Immunol., 148: 125-139. https://doi.org/10.1111/imm.12597

187. RODRIGUES R.C., SENE L., MATOS G.S., ROBERTO I.C., PESSOA A., FELIPE M.G. 2006. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. Curr. Microbiol., 53: 53–59. https://doi.org/10.1007/s00284-005-0242-4

188. RÖNKKÖNEN S., OJAVEER E. RAID T., VIITASALO M. 2004. Long-term changes in Baltic herring (*Clupea harengus membras*) growth in the Gulf of Finland. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 61: 219-229. https://doi.org/10.1139/f03-167

189. RYDEN L. (red.). 2003. Environmental sciences, understanding, protecting, and managing the environment in the Baltic Sea region, The Baltic University Press, Uppsala, 824ss.

190. SANGUINETTI M., POSTERARO B., ROMANO L., BATTAGLIA F., LOPIZZO1 T., DE CAROLIS E., FADDA G. 2007. In vitro activity of *Citrus bergamia* (bergamot) oil against clinical isolates of dermatophytes. J. Antimicrob. Chemother., 59: 305-308. https://doi.org/10.1093/jac/dkl473

191. SCHIRMER-MICHEL A.C., FLORES S.H., HERTZ P.F., MATOS G.S., AYUB M.A. 2008. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant

Candida guilliermondii NRRL Y-2075. Bioresour. Technol., 99: 2898–2904. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.042

192. SCHMIDT M., BOTZ R., FABER E., SCHMITT M., POGGENBURG J., GARBE-SCHÖNBERG D., STOFFERS P. 2003. High-resolution methane profiles across anoxic brine-seawater boundaries in the Atlantis-II, Discovery, and Kebrit deeps (Red Sea). Chem. Geol., 200: 359–376. https://doi.org/10.1016/S0009-2541(03)00206-7
193. SENSES-ERGUL S., AGOSTON R., BELÁK A., DEÁK T. 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. Int. J. Food Microbiol., 108(1): 120-4. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.014
194. SEYEDMOUSAVI S., GUILLOT J., TOLOOE A., VERWEIJ P.E., DE HOOG, G.S. 2015. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. Clin. Microbiol. Infect., 21: 416–425. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.031
195. SHEARER C.A., DESCALS E., KOHLMEYER B., KOHLMEYER J., MARVANOVÁ L., PADGETT D. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodivers. Conserv., 16: 49–67. https://doi.org/10.1007/s10531-006-9120-z
196. SNOEIJS-LEIJONMALM P., SCHUBERT H., RADZIEJEWSKA T. (red.). 2017. Biological Oceanography of the Baltic Sea. Springer, Stockholm, 683. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0668-2
197. SOLIMAN A.M., COYNE K.S., ZAISER E., CASTELLI-HALEY J., FULDEORE M.J. 2017. The burden of endometriosis symptoms on health-related quality of life in women in the United States: a cross-sectional study. J. Psychosom. Obstet. Gynaecol., 38(4): 238-248. https://doi.org/10.1080/0167482X.2017.1289512
198. SONESTEN L., UNDEMAN E., SVENDSEN M.L., FRANK-KAMENETSKY D. HAAPANIEMI J. 2021. Inputs of hazardous substances to the Baltic Sea. Balt. Sea Environ. Proc., 179: 1-41. https://helcom.fi/wp-content/uploads/2019/08/BSEP162.pdf
199. SUBRAMANIAN S., MACKINNON S.L., ROSS N.W. 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 148, 256–263. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.06.003
200. TAKASHIMA M., SUGITA T. 2019. Draft Genome Analysis of Trichosporonales Species That Contribute to the Taxonomy of the Genus *Trichosporon* and Related Taxa. Med. Mycol. J., 60(2): 51-57. https://doi.org/10.3314/mmj.19.003

201. TARTOR Y., TAHA M., MAHBOUB H., EL GHAMERY M. 2018. Yeast species associated with diseased fish: Occurrence, identification, experimental challenges and antifungal susceptibility testing. Aquac., 488: 134-144. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.01.033.

202. THIRUMURUGAN R., VIGNESH V. 2015. Probiotics: Live boon to aquaculture. W: PERUMAL S., THIRUNAVUKKARASU A., PACHIAPPAN P. (red.). Advances in Marine and Brackishwater Aquaculture. Springer: 51-61.

203. THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS S.G. 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Curr. Protoc. Bioinformatics. Curr. Protoc. Bioinformatics, 2: 1-22. https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00

204. TIBELL S., TIBELL L., PANG K-L., CALABON M., JONES E.B.G. 2020. Marine fungi of Baltic Sea. Mycol., 11(3): 195-213. https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1729886

205. TIWARI P., MISRA B. N., SANGWAN N. S. 2013. β-Glucosidases from the Fungus *Trichoderma*: An Efficient Cellulase Machinery in Biotechnological Applications. Biomed Res. Int., 2013: 1-10. https://doi.org/10.1155/2013/203735

206. TORNIAINEN J., LEHTINIEMI M. 2008. Potential predation pressure of littoral mysids on herring (*Clupea harengus membras* L.) eggs and yolk-sac larvae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 367(2): 247-252. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.10.007

207. TOVAR-RAMÍREZ D., ZAMBONINO-INFANTE J.L., CAHU C.L., GATESOUPE F.J., VÁZQUEZ-JUÁREZ R. 2004. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. 234: 415–427. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.01.028

208. TURLAND N.J., WIERSEMA J.H., BARRIE F.R., GREUTER W., HAWKSWORTH D.L. i in. 2018. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Shenzhen Code). Regnum Veg., 159. Glashütten: Koeltz Botanical Books. https://doi.org/10.12705/Code.2018

209. URIBE C., FOLCH H., ENRIQUES R., MORAN G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Vet. Med., 56(10): 486-503. https://doi.org/10.17221/3294-VETMED

210. VALDERRAMA B., RUIZ J.J., GUTIÉRREZ M.S., ALVEAL K., CARUFFO M., OLIVA M., FLORES H., SILVA A., TORO M., REYES-JARA A., NAVARETTE P. 2021. Cultivable Yeast Microbiota from the Marine Fish Species *Genypterus chilensis*

and *Seriolella violacea*. J. Fungi, 7(515): 1-10. https://doi.org/10.3390/jof7070515

211. VELMURUGAN N., LEE Y.S. 2012. Enzymes from marine fungi: current research and future prospects. W: JONES E.B.G., PANG K.L. (red.). Marine and fungal-like organisms. De Gruyter, Germany: 441–474.
212. WACHÉ Y., AUFFRAY F., GATESOUPE F.J., ZAMBONINO J., GAYET V., LABBÉ L., QUENTEL C. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, fry. Aquacul., 258: 470-478. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.002
213. WAH T.T., WALAISRI S., ASSAVANIG A., NIAMSIRI N., LERTSIRI S. 2013. Coculturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation. Int. J. Food Microbiol., 160: 282–289. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.022
214. WALSH T.J., SALKIN I.F., DIXON D.M., HURD N.J. 1989. Clinical, microbiological, and experimental animal studies of *Candida lipolytica*. J. Clin. Microbiol., 27(5): 927–931. https://doi.org/10.1128/jcm.27.5.927-931.1989
215. WANG B., LIU Y., LUO K., ZHANG S., WEI C., WANG L., QIU Y., TIAN X. 2023. 'Biotic' potential of the red yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain JM-01 on the growth, shell pigmentation, and immune defense attributes of the shrimp, Penaeus vannamei. Aquacul., 572: 1-11. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739543
216. WIJAYAWARDENE N.N., HYDE K.D., RAJESHKUMAR K.C., HAWKSWORTH D.L. i in. 2017. Notes for genera: *Ascomycota*. Fungal Divers., 86: 1–594. https://doi.org/10.1007/s13225-017-0386-0
217. WONG S., RAWLS J.F. 2012. Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. Mol. Ecol., 21: 3100–3102. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05646.x
218. WUCZKOWSKI M., PASSOTH V., TURCHETTI B., ANDERSSON A.C., OLSTORPE M., LAITILA A., THEELEN B., VAN BROOCK M., BUZZINI P., PRILLINGER H., STERFLINGER K., SCHNÜRER J., BOEKHOUT T., LIBKIND D. 2011. Description of *Holtermanniella* gen. nov., including *Holtermanniella takashimae* sp. nov. and four new combinations, and proposal of the order *Holtermanniales* to

accommodate tremellomycetous yeasts of the *Holtermannia* clade. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 61: 680-689. https://doi.org/10.1099/ijs.0.019737-0

219. YARDEN O. 2014. Fungal association with sessile marine invertebrates. Front. Microbiol., 5: 1-6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00228

220. ZAKY A.S., GREETHAM S., LOUIS E.J., TUCKER G.A., DU C. 2016. A new isolation and evaluation method for marine-derives Yeast spp. with potential applications in industrial biotechnology. J. Microbiol. Biotechnol., 26(11): 1891-1907. https://doi.org/10.4014/jmb.1605.05074

221. ZHAO Y., TSANG CC., XIAOL M., CHAN J.F.W., LAU S.K.P., KONG F., XUL Y., WOO P. 2018. Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI–TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting. Med. Mycol., 56: 816-827. https://doi.org/10.1093/mmy/myx118

222. ZILLÉN L., CONLEY D.J., ANDRÉN T., ANDRÉN E., BJÖRCK S. 2008. Past occurrences of hypoxia in the Baltic Sea and the role of climate variability, environmental change and human impact. Earth Sci. Rev., 91: 77-92. https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2008.10.001

8. Spis tabel, rycin, tablic i załączników

Tabele:

1. Tabela 1. Ontocenozy śledzi bałtyckich analizowane w badaniach rekonesansowych i kontynuowanych (+ – miejsce pobierania wymazów) – str. 32
   Table 1. Ontocenoses of Baltic herrings analyzed in reconnaissance and follow-up studies (+ – sampling site) – p. 32
2. Tabela 2. Zestawienie badanych związków węglowych w testach API 20C AUX – str. 42
   Table 2. List of carbon compounds tested in API 20C AUX tests – p. 42
3. Tabela 3. Zestawienie badanych enzymów i hydrolizowanych substratów testów API ZYM wraz z oczekiwaną reakcją barwną – str. 44
   Table 3. List of tested enzymes and hydrolyzed substrates of API ZYM tests along with the expected color reaction – p. 44
4. Tabela 4. Liczebność gatunków drożdży wyizolowanych ze wszystkich badanych ontocenoz – str. 47
   Table 4. Number of yeast species isolated from all studied ontocenoses – p. 47
5. Tabela 5. Stanowisko systematyczne wyizolowanych gatunków drożdży na podstawie stron internetowych: www.mycobank.org i www.indexfungorum.org – str. 48
   Table 5. Systematic position of isolated yeast species based on the websites: www.mycobank.org and www.indexfungorum.org – p. 48
6. Tabela 6. Charakterystyka cech diagnostycznych wyizolowanych drożdży na podstawie danych źródłowych z uwzględnieniem BSL (DE HOOG i in. 2000, 2020; KURTZMAN i FELL 1998; KURTZMAN i in. 2011; WUCZKOWSKI i in. 2011; NAGY i in. 2013; NAGY i in. 2014; GAIKWAD i in. 2021; + – reakcja pozytywna, - – reakcja negatywna, v- reakcja zmienna, w- reakcja słaba) – str. 50
   Table 6. Characteristics of diagnostic features of isolated yeasts based on source data including BSL (DE HOOG et al. 2000, 2020; KURTZMAN and FELL 1998; KURTZMAN et al. 2011; WUCZKOWSKI et al. 2011; NAGY et al. 2013; NAGY et al. 2014; GAIKWAD et al. 2021; + – positive reaction, - – negative reaction, v – variable reaction, w – weak reaction) – p. 50
7. Tabela 7. Gatunki drożdży występujące w pysku – str. 59
   Table 7. Yeast species found in the mouth – p. 59
8. Tabela 8. Gatunki drożdży wyizolowane ze skrzeli – str. 62
   Table 8. Yeast species isolated from the gills – p. 62
9. Tabela 9. Drożdże stwierdzone w izolatach pochodzących z powierzchni wątroby – str. 64
   Table 9. Yeasts stated in isolates originated from liver surface – p. 64
10. Tabela 10. Drożdże stwierdzone w izolatach pochodzących z powierzchni jelit – str. 65
    Table 10. Yeasts stated in isolates originated from intestines surface – p. 65

11. Tabela 11. Identyfikacja gatunkowa drożdży na podstawie testów API 20C AUX w porównaniu z metodami molekularnymi – str. 84
Table 11. Yeast species identification based on API 20C AUX tests compared to molecular methods – p. 84
12. Tabela 12. Minimalne stężenia hamujące badanych antymykotyków wraz z opornością izolatów (5FC – 5-flucytozyna, AMB – amfoterycyna B, FCA – flukonazol, ITR – itrakonazol, VRC – worikonazol; w – wrażliwe, sw – słabo wrażliwe, o – oporne) – str. 89
Table 12. Minimum inhibitory concentrations of tested antimycotics with resistance of isolates (5FC – 5-flucytosine, AMB – amphotericin B, FCA – fluconazole, ITR – itraconazole, VRC – voriconazole; w- susceptible, sw – intermediate, o – resistant) – p. 89

Ryciny:

1. Rycina 1. Mapa Morza Bałtyckiego (źródło: https://chronbaltyk.pl/o-baltyku/podstawowe-informacje/) – str. 24
Figure 1. Map of the Baltic Sea (origin: https://chronbaltyk.pl/o-baltyku/podstawowe-informacje/) – p. 24
2. Rycina 2. Komora wilgotna do mikrohodowli na agarze Nickersona – str. 35
Figure 2. Wet chamber for microculture on Nickerson agar – p. 35
3. Rycina 3. Probówki z podłożem do zymogramu – str. 36
Figure 3. Tubes with zymogram medium – p. 36
4. Rycina 4. Podłoże auksanograficzne z krążkami nasączonymi badanymi cukrami (widoczne ciemniejsze pole przy krążku z glukozą) – str. 37
Figure 4. Auxanographic medium with discs soaked in the tested sugars (visible darker field next to the glucose disc) – p. 37
5. Rycina 5. Podłoże YNB z 20% dodatkiem glukonianu sodu i odczynnikiem Benedicta (A – przed zagotowaniem w łaźni wodnej, B – po zagotowaniu, kontrola negatywna) – str. 41
Figure 5. Figure 4. YNB medium with 20% sodium gluconate and Benedict's reagent (A - before boiling in a water bath, B - after boiling, negative control) – p. 41
6. Rycina 6. Przykładowy pasek testu API 20C AUX (widoczne zmętnienie w mikrostudzienkach GLU i GLY) – str. 43
Figure 6. Sample API 20C AUX test strip (visible turbidity in GLU and GLY microwells) – p. 43
7. Rycina 7. Przykładowa reakcja barwna testu API ZYM – str. 44
Figure 7. Exemplary color reaction of the API ZYM test – p. 44
8. Rycina 8. Przykładowy pasek ATB FUNGUS 3 – str. 46
Figure 8. Example of ATB FUNGUS 3 strip – p. 46
9. Rycina 9. Częstość występowania izolatów w poszczególnych ontocenozach [%] – str. 55
Figure 9. Frequency of isolates in individual ontocenoses [%] – p. 55

10. Rycina 10. Różnice w średniej liczbie izolatów drożdży w poszczególnych ontocenozach – str. 55
    Figure 10. Differences in the average number of yeast isolates in individual ontocenoses – p. 55
11. Rycina 11. Podział wyizolowanych drożdży według gromad [%] – str. 56
    Figure 11. Division of isolated yeasts by phylum [%] – p. 56
12. Rycina 12. Drożdże wyizolowane z badanych ontocenoz śledzia bałtyckiego [%] – str. 57
    Figure 12. Yeasts isolated from the investigated Baltic herring ontocenoses [%] – p. 57
13. Ryc. 13. Zróżnicowanie gatunkowe drożdży w badanych układach – str. 58
    Figure. 13. Species of yeasts differentiation in investigated systems – p. 58
14. Rycina 14. Drożdże wyizolowane z pyska śledzia bałtyckiego [%] – str. 59
    Figure 14 Yeasts isolated from mouth of Baltic herring [%] – p. 59
15. Rycina 15. Liczba izolatów jedno-, dwu- i trzygatunkowych w pysku śledzia bałtyckiego [%] – str. 60
    Figure 15. Number of one, two, and triple species isolates from mouth of Baltic herring [%] – p. 60
16. Rycina 16. Występowanie w pysku śledzi bałtyckich izolatów dwu- i trzygatunkowych – str. 61
    Figure 16. Occurrence of two, and triple species isolates Baltic herring isolates in the mouth – p. 61
17. Rycina 17. Drożdże wyizolowane ze skrzeli [%] – str. 62
    Figure 17. Yeasts isolated from the gills [%] – p. 62
18. Rycina 18. Liczba izolatów jedno-, dwu- i trzygatunkowych na powierzchni skrzeli – str. 63
    Figure 18. Number of one, two and triple species isolates on the gill surfaces – p. 63
19. Rycina 19. Komponenty izolatów dwugatunkowych w skrzelach – str. 63
    Figure 19. Components of two species isolates in the gills – p. 63
20. Rycina 20. Drożdże wyizolowane z powierzchni wątroby [%] – str. 64
    Figure 20. Yeasts isolated from liver surface [%] – p. 64
21. Rycina 21. Drożdże wyizolowane z powierzchni jelit [%] – str. 66
    Figure 21. Yeasts isolated from intestines surface [%] – p. 66
22. Rycina 22. Liczba izolatów jedno-, dwu- i trzygatunkowych w pysku śledzia bałtyckiego – str. 66
    Figure 22. Number of one, two and triple species isolates from mouth of Baltic herring – p. 66
23. Rycina 23. Występowanie izolatów wielogatunkowych w jelitach – str. 67
    Figure 23. Occurrence of multispecies isolates in the intestines – p. 67
24. Rycina 24. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu ITS5 5.8 rDNA uzyskanych z drożdży wyizolowanych w latach 2016-2018. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 60 sekwencji (49 badanych izolatów

oraz 11 sekwencji pozyskanych z GenBank; A – *Ascomycota*, B – *Basidiomycota*) – str. 68
Figure 24. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS5 5.8 rDNA region obtained from yeast isolated in 2016-2018. The rooted tree was built based on 60 sequences (49 isolates tested and 11 sequences obtained from GenBank; A – *Ascomycota,* B – *Basidiomycota*) – p. 68
25. Rycina 25. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu D1/D2 dużej podjednostki rDNA uzyskanych z drożdży wyizolowanych w latach 2016-2018. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 62 sekwencji (50 badanych izolatów oraz 12 sekwencji pozyskanych z GenBank; A – *Ascomycota,* B – *Basidiomycota*) – str. 69
Figure 25. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the D1/D2 region of the large rDNA subunit obtained from yeast isolated in 2016-2018. The rooted tree was built based on 62 sequences (50 isolates tested and 12 sequences obtained from GenBank; A – *Ascomycota*, B – *Basidiomycota*) – p. 69
26. Rycina 26. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu ITS5 5.8 rDNA uzyskanych z drożdży (poza rodzajem *Pichia*) wyizolowanych w 2019 roku. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 109 sekwencji (88 badanych izolatów oraz 21 sekwencji pozyskanych z GenBank; A – *Ascomycota,* B – *Basidiomycota*) – str. 70
Figure 26. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the ITS5 5.8 rDNA region obtained from yeast (except *Pichia* genus) isolated in 2019. The rooted tree was built based on 109 sequences (88 tested isolates and 21 sequences obtained from GenBank; A – *Ascomycota,* B – *Basidiomycota*) – p. 70
27. Rycina 27. Analiza filogenetyczna sekwencji nukleotydowych regionu ITS5 5.8 rDNA uzyskanych z drożdży z rodzaju *Pichia* wyizolowanych w roku 2019. Ukorzenione drzewo zostało zbudowane na podstawie 128 sekwencji (120 badanych izolatów oraz 8 sekwencji pozyskanych z GenBank) – str. 71
Figure 27. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the ITS5 5.8 rDNA region obtained from *Pichia* yeast isolated in 2019. The rooted tree was built based on 128 sequences (120 tested isolates and 8 sequences obtained from GenBank) – p. 71
28. Rycina 28. Reakcje barwne rozkładu glukonianu sodu przez gatunki z rodzaju *Apiotrichum* (ramka czerwona – próba kontrolna, ramka czarna – reakcje pozytywne) – str. 72
Figure 28. Color reactions of sodium gluconate decomposition by species of the genus *Apiotrichum* (red frame - control sample, black frame - positive reactions) – p. 72
29. Rycina 29. Zdolności fermentacyjne izolatów drożdży (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 73
Figure 29. Fermentation capacity of yeast isolates (P - positive reaction, SP - slightly positive reaction, N - negative reaction) – p. 73

30. Rycina 30. Zdolności fermentacji glukozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 74
Figure 30. Glucose fermentation capacity of particular yeast species [%] (P - positive reaction, SP - slightly positive reaction, N - negative reaction) – p. 74
31. Rycina 31. Zdolności fermentacji galaktozy, sacharozy, maltozy i laktozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 75
Figure 31. Fermentation capacity of galactose, sucrose, maltose and lactose by particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N – negative reaction) – p. 75
32. Rycina 32. Zdolności asymilacyjne izolatów drożdży (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 76
Figure 32. Assimilation capacity of yeast isolates (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N – negative reaction) – p. 76
33. Rycina 33. Zdolności asymilacji glukozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 77
Figure 33. Glucose assimilation capacity of particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N – negative reaction) – p. 77
34. Rycina 34. Zdolności asymilacji galaktozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 78
Figure 34. Galactose assimilation capacity of particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – weakly positive reaction, N – negative reaction) – p. 78
35. Rycina 35. Zdolności asymilacji sacharozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 79
Figure 35. Sucrose assimilation capacity of particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – weakly positive reaction, N – negative reaction) – p. 79
36. Rycina 36. Zdolności asymilacji maltozy przez poszczególne gatunki drożdży [%] (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 80
Figure 36. Maltose assimilation capacity of particular yeast species [%] (P – positive reaction, SP – weakly positive reaction, N – negative reaction) – p. 80
37. Rycina 37. Zdolności asymilacji laktozy przez poszczególne gatunki drożdży (P – reakcja pozytywna, SP – reakcja słabo pozytywna, N – reakcja negatywna) – str. 81

Figure 37. Lactose assimilation capacity of particular yeast species (P – positive reaction, SP – slightly positive reaction, N– negative reaction) – p. 81
38. Rycina 38. Zdolność wzrostu uzyskanych izolatów drożdży w 37°C [%] – str. 82
Figure 38. Growth capacity of yeast isolates obtained at 37°C [%] – p. 82
39. Rycina 39. Gatunki drożdży nie wykazujące wzrostu w temperaturze 37°C [%] – str. 82
Figure 39. Yeast species not growing at 37°C [%] – p. 82
40. Rycina 40. Zdolność izolatów drożdży do wzrostu w temperaturze 37°C – str. 83
Figure 40. Ability of yeast isolates to grow at 37°C – p. 83
41. Rycina 41. Aktywność enzymatyczna wybranych drożdży ze śledzia bałtyckiego (0-5 – skala określająca aktywność enzymów w nanomolach hydrolizowanego substratu) – str. 85
Figure 41. Enzymatic activity of selected yeasts from Baltic herring (0-5 – a scale specifying enzyme activity in nanomoles of hydrolyzed substrate) – p. 85
42. Rycina 42. Różnice w aktywności enzymatycznej badanych izolatów drożdży – str. 86
Figure 42. Differences in the enzymatic activity of the tested yeast isolates – p. 86
43. Rycina 43. Różnice aktywności enzymatycznej pomiędzy badanymi gatunkami drożdży – str. 87
Figure 43. Differences in enzymatic activity between the tested yeast species – p. 87
44. Rycina 44. Lekowrażliwość [%] drożdży odnotowanych u śledzi: A – 5-flucytozyna, B – amfoterycyna B, C – flukonazol, D – itrakonazol, E – worikonazol – str. 88
Figure 44. Drug-susceptibility [%] of yeasts noted in herrings: A – 5-flucytosine, B – amphotericin B, C – fluconazole, D – itraconazole, E – voriconazole – p. 88

Tablice:

1. Tablica I. *Apiotrichum domesticum*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 400x, d–f: 1000x
Board I. *Apiotrichum domesticum*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c –400x, d–f: 1000x
2. Tablica II. *Apiotrichum montevideense*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 20x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
Board II. *Apiotrichum montevideense*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 20x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
3. Tablica III. *Candida albicans*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 100x, d – 200x, e–f: 1000x
Board III. *Candida albicans*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c – 100x, d – 200x, e–f: 1000x
4. Tablica IV. *Candida oleophila*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
Board IV. *Candida oleophila*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: e–f: 1000x

5. Tablica V. *Candida parapsilosis*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b –10x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
   Board V. *Candida parapsilosis*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 10x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
6. Tablica VI. *Candida sake*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
   Board VI. *Candida sake*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
7. Tablica VII. *Cutaneotrichosporon curvatum*. Wygląd makroskopowy kolonii: a –10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
   Board VII. *Cutaneotrichosporon curvatum*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
8. Tablica VIII. *Debaryomyces hansenii*. Wygląd makroskopowy kolonii: a –10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x
   Board VIII. *Debaryomyces hansenii*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x
9. Tablica IX. *Exophiala dermatitidis*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 32x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
   Board IX. *Exophiala dermatitidis*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 32x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
10. Tablica X. *Holtermanniella takashimae*. Wygląd makroskopowy kolonii: a –12,5x, b –25x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
    Board X. *Holtermanniella takashimae*. Macroscopic appearance of the colony: a – 12,5x, b – 25x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
11. Tablica XI. *Kluyveromyces marxianus*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
    Board XI. *Kluyveromyces marxianus*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
12. Tablica XII. *Meyerozyma caribbica*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
    Board XII. *Meyerozyma caribbica*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
13. Tablica XIII. *Meyerozyma guilliermondii*. Wygląd makroskopowy kolonii: a –10x, b –16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 400x, d–f: 1000x
    Board XIII. *Meyerozyma guilliermondii*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 400x, d–f: 1000x
14. Tablica XIV. *Pichia fermentans*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b –12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
    Board XIV. *Pichia fermentans*. Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c – f: 1000x
15. Tablica XV. *Pichia kudriavzevii*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b – 10x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 100x, d – 400x, e–f: 1000x
    Board XV. *Pichia kudriavzevii*. Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 10x; microcultures on Nickerson's agar: c – 100x, d – 400x, e–f: 1000x

16. Tablica XVI. *Rhodotorula mucilaginosa*. Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b –16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x
    Board XVI. *Rhodotorula mucilaginosa*. Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x
17. Tablica XVII. *Saccharomyces cerevisiae.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 12,5x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
    Board XVII. *Saccharomyces cerevisiae.* Macroscopic appearance of the colony: a – 12,5x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
18. Tablica XVIII. *Yarrowia alimentaria.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x
    Board XVIII. *Yarrowia alimentaria.* Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x
19. Tablica XIX. *Yarrowia bubula.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 10x, b – 16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x
    Board XIX. *Yarrowia bubula.* Macroscopic appearance of the colony: a – 10x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x
20. Tablica XX. *Yarrowia deformans.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b – 12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
    Board XX. *Yarrowia deformans.* Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
21. Tablica XXI. *Yarrowia divulgata.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 8x, b –16x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c–f: 1000x
    Board XXI. *Yarrowia divulgata.* Macroscopic appearance of the colony: a – 8x, b – 16x; microcultures on Nickerson's agar: c–f: 1000x
22. Tablica XXII. *Yarrowia lipolytica.* Wygląd makroskopowy kolonii: a – 6,3x, b –12,5x; mikrohodowle na agarze Nickersona: c – 200x, d–f: 1000x
    Board XXII. *Yarrowia lipolytica.* Macroscopic appearance of the colony: a – 6,3x, b – 12,5x; microcultures on Nickerson's agar: c – 200x, d–f: 1000x

Załączniki:

1. Załącznik 1. Tabelaryczne zestawienie wyników identyfikacji izolatów drożdży na podstawie sekwencji regionu ITS rybosomalnego DNA oraz regionu D1/D2 dużej podjednostki rybosomalnej w porównaniu z sekwencjami referencyjnymi z Bazy Danych GenBank
   Attachment 1. Tabular summary of the results of identification of yeast isolates based on the sequence of the ITS region of the ribosomal DNA and the D1/D2 region of the large ribosomal subunit compared to the reference sequences from the GenBank Database
2. Załącznik 2. Tabelaryczne zestawienie wyników identyfikacji izolatów drożdży na podstawie sekwencji regionu ITS5 rybosomalnego DNA w porównaniu z sekwencjami referencyjnymi z Bazy Danych GenBank
   Attachment 2. Tabular summary of the results of identification of yeast isolates based on the sequence of the ITS5 region of ribosomal DNA compared to the reference sequences from the GenBank Database

3. Załącznik 3. Tabelaryczne zestawienie wybranych właściwości wyizolowanych drożdży
   Attachment 3. Tabular summary of the selected properties of isolated yeasts
4. Załącznik 4. Tabelaryczne zestawienie wyników identyfikacji wybranych izolatów grzybów na podstawie auksanogramów przy użyciu testów API 20C AUX
   Attachment 4. Tabular summary of the results of identification of the selected fungal isolates based on auxanograms using API 20C AUX tests
5. Załącznik 5. Zestawienie wyników aktywności enzymatycznej wybranych izolatów grzybów przy użyciu testów API ZYM
   Attachment 5. Summary of enzymatic activity results of the selected fungal isolates using API ZYM tests
6. Załącznik 6. Zestawienie tabelaryczne wyników minimalnego stężenia hamującego (MIC– minimum inhibitory concentration) wobec wybranych izolatów drożdży przy użyciu testów ATB FUNGUS 3
   Attachment 6. Tabular summary of the minimum inhibitory concentration (MIC) results against selected yeast isolates using ATB FUNGUS 3 tests

9. Załączniki

Załącznik 1. Tabelaryczne zestawienie wyników identyfikacji izolatów drożdży na podstawie sekwencji regionu ITS rybosomalnego DNA oraz regionu D1/D2 dużej podjednostki rybosomalnej w porównaniu z sekwencjami referencyjnymi z Bazy Danych GenBank

Attachment 1. Tabular summary of the results of identification of yeast isolates based on the sequence of the ITS region of the ribosomal DNA and the D1/D2 region of the large ribosomal subunit compared to the reference sequences from the GenBank Database

Oznaczenie izolatów drożdży:
1-50 – numer badanego osobnika
P- pysk, S- skrzela, W-wątroba, J- jelita
1-3 – numer izolatu uzyskanego od jednego osobnika
np. 05.12.2016- data pobierania wymazów

Numer izolatu	Oznaczenie izolatu	Zidentyfikowane gatunki drożdży	Zgodność z sekwencjami referencyjnymi dostępnymi w Bazie Danych GenBank		
			ITS5	NL1	NL4
1	1S/05.12.2016	*Pichia kudriavzevii*	93% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT321265.1, MG015971.1, MG015969.1	98% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MF461008.1, MN464130.1, MN123964.1	96% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MN846662.1, KY108857.1, EF635636.1
2	1J1/05.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	88% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MK732152.1, MK267418.1, MH094668.1	100% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: GU373786.1, MG708472.1, MK634558.1	95% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MN872920.1, MN872856.1, MG708472.1
3	1J2/05.12.2016	*Candida parapsilosis*	96% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: LC605166.1, OL687495.1, MF380667.1	99% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MK110312.1, MK110312.1, MH704191.1	97% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MT543198.1, MT444983.1, MT444982.1
4	2P/05.12.2016	*Saccharomyces cerevisiae*	–	100% zgodność z *S. cerevisiae*, numery: MT449154.1, MN6488826.1, MK908004.1	87% zgodność z *S. cerevisiae*, numery: KY888046.1, LC533773.1, MN833341.1

5	2S/05.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	95% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: KJ094038.1, MN809437.1, MT772147.1	99% zgodność z *A. domesticum*, numery: KY106113.1, JN939470.1, JN939449.1	97% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: EU862820.1, MG708472.1, KY106113.1
6	2J1/05.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	87% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: KJ094038.1, MN809437.1, KT876717.1	99% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: GU373786.1, MG708472.1, MT814231.1	95% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: HM627138.1, EU862820.1, AB492259.1
7	2J2/05.12.2016	*Meyerozyma guilliermondii*	88% zgodność z *M. caribbica / M. guilliermondii*, numery: MG016004.1, MG015985.1, MG015983.1	96% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: JQ277245.1, MK626571.1, KY952838.1	90% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: MT537588.1, MT247857.1, MN736522.1
8	3J/05.12.2016	*Candida parapsilosis*	87% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MT852403.1, KP895597.1, KP895597.1	100% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MT001266.1, EF629545.1, JN091166.1	96% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: EU556337.1, MT444983.1, MT444982.1
9	4P/06.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	90% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: KJ094038.1, MN809437.1, MK267418.1	100% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MG708472.1, KY106113.1, LC106113.1	94% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: EU862820.1, FJ468450.1, MG708472.1
10	4S1/06.12.2016	*Candida parapsilosis*	93% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MF380667.1, KP131773.1, KY075670.1	99% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MK026341.1, MT580251.1, FJ746059.1	94% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MF788162.1, MK026341.1, MK026319.1
11	4S2/06.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	97% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: MN809437.1, MT772147.1, MK267418.1	100% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: GU373786.1, MG708472.1, MK634558.1	95% zgodność z *A. montevideense*, numery: HM627138.1, EU862820.1, JX476277.1
12	4J/06.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	92% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery:	99% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery:	93% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*,

			MK973016.1, MK267418.1, MH094668.1	GU373786.1, AB492275.1, MG708472.1	numery: GU373786.1, AB482275.1, MG708472.1
13	5P/06.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	89% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: KJ816919.1, MN809437.1, MK267418.1	100% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MG708472.1, KY106113.1, JN939470.1	94% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: AB492259.1, EU862820.1, JX476277.1
14	5S/06.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	98% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MK267418.1, KY101657.1, FJ943426.1	100% zgodność z *A. domesticum*, numery: MG708472.1, NG069089.1, KY106113.1	89% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MN872920.1, MN872856.1, MN872855.1
15	5J/06.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	93% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: KJ816919.1, MH094668.1, MN809437.1	100% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: KY106113.1, KY106113.1, JN939470.1	96% zgodność z *A. montevideense*, numery: EU862820.1, MN872920.1, MN872856.1
16	6S1/06.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	99% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: KJ816919.1, MW362777.1, KX859628.1	100% zgodność z *A. domesticum*, numery: AB492259.1, MG708472.1, NG069089.1	93% zgodność z *A. montevideense*, numery: AB000103.1, MN872920.1, MN872856.1
17	6S2/06.12.2016	*Meyerozyma guilliermondii*	91% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: MT539193.1, MT441620.1, MT441600.1	100% zgodność z *M. guilliermondii / M. caribbica*, numery: JQ965868.1, KU316708.1, AB831021.1	93% zgodność z *M. caribbica / M. guilliermondii*, numery: MT251155.1, MT543174.1, MN736522.1
18	7P1/08.12.2016	*Candida parapsilosis*	96% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: LC605166.1, MF380667.1, KY102305.1	100% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MK026341.1, MT580251.1, FJ746059.1	95% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MT150839.1, MK026341.1, MK026319.1
19	7P2/08.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	92% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: MN809437.1, MH094668.1, KJ816919.1	99% zgodność z *A. domesticum*, numery: NG069089.1, KY106113.1, JN939470.1	94% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: JX476277.1, HM627138.1, NG069089.1

20	7S/08.12.2016	*Pichia kudriavzevii*	83% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KU555385.1, MG015991.1, MG015976.1	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MN648838.1, KC616318.1, EU585765.1	93% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MF461008.1, KP324970.1, HM123732.1
21	7J1/08.12.2016	*Rhodotorula mucilaginosa*	90% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KX525676.1, KX525675.1, MG957575.1	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: MT299755.1, MN846675.1, MN123981.1	94% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: MT299761.1, LC125991.1, AB439227.1
22	7J2/08.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	98% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: KJ816919.1, MK267418.1, KX859628.1	99% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: LC171721.1, EU186080.1, AB492275.1	98% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: MK634558.1, NG069089.1, MN872920.1
23	7J3/08.12.2016	*Meyerozyma guilliermondii*	83% zgodność z *M. caribbica*, numery: KY465906.1, KF750640.1, FN428935.1	99% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: KY952842.1, KR632577.1, KM872048.1	91% zgodność z *M. caribbica*, numery: MT274753.1, MT251155.1, MT543194.1
24	8P/16.12.2016	*Cutaneotrichosporon curvatum*	95% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: MK267816.1, MK267770.1, KX859712.1	99% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KX609388.1, MW916158.1, KY107310.1	96% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KY107305.1, KY107302.1, JQ070153.1
25	8S/16.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	95% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MK267418.1, MH094668.1, KX859628.1	100% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: GU373786.1, AB492275.1, KY106113.1	100% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MG708472.1, KY106113.1, JX476277.1
26	8W/16.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	92% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MK732152.1, MH094668.1, KX859628.1	100% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MG708472.1, GU373786.1, JX476277.1	100% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: EU862820.1, JX476277.1, AB492259.1
27	8J1/16.12.2016	*Exophiala dermatitidis*	85% zgodność z *E. dermatitidis*, numery: AY857526.1, MH865776.1, MH865760.1	100% zgodność z *E. dermatitidis*, numery: MH876937.1, MH876926.1, MH876809.1	97% zgodność z *E. dermatitidis*, numery: KX580974.1, MT023625.1, MT023624.1

28	8J2/16.12.2016	*Pichia kudriavzevii*	82% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT235928.1, MT321265.1, MT321167.1	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: OM995979.1, KC454395.1, MF574470.1	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KY705008.1, KX008743.1, KC544469.1
29	9P1/16.12.2016	*Rhodotorula mucilaginosa*	92% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KY104840.1, MT573375.1, LC497277.1	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: MT001279.1, MT550663.1, MT300135.1	95% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: MN075302.1, MF767615.1, KX773547.1
30	9P2/16.12.2016	*Pichia kudriavzevii*	97% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015976.1, MG015966.1, KT737219.1	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MN710525.1, MH910988.1, MK101219.1	91% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT580258.1, JQ419979.1, JQ419959.1
31	9P3/16.12.2016	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	88% zgodność z *A. domesticum*, numery: MK732152.1, MK267418.1, MH094668.1	100% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: LC171721.1, EU186080.1, JX476277.1	91% zgodność z *A. montevideense*, numery: MN872920.1, MN872856.1, MN872855.1
32	9S/16.12.2016	*Meyerozyma guilliermondii*	93% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: MG015984.1, MG015979.1, MG015977.1	99% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: MK110094.1, JF766630.1, MK110317.1	93% zgodność z *M. caribbica / M. guilliermondii*, numery: MT538322.1, LC498388.1, MN244489.1
33	9W/16.12.2016	*Meyerozyma guilliermondii*	95% zgodność z *M. caribbica / M. guilliermondii*, numery: MG646972.1, MG646971.1, MH223591.1	100% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: KY952842.1, KY952840.1, KT934953.1	91% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: KY952838.1, MT225548.1, MN075242.1
34	10P/16.12.2016	*M. caribbica*	92% zgodność z *M. caribbica*, numery: MT645412.1, MT529031.1, MT524273.1	100% zgodność z *M. caribbica / M. guilliermondii*, numery: LC413273.1, KU316708.1, KJ794726.1	100% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: KM885980.1, JQ686905.1, JQ686903.1
35	10S1/16.12.2016	*Candida parapsilosis*	93% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: KX682414.1, KP131777.1, KP131764.1	100% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MK110313.1, MK110312.1, MH704191.1	93% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MH613013.1, MT543198.1, MT444982.1

36	10S2/16.12.2016	*Pichia kudriavzevii*	85% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MH299860.1, KY457575.1, KF806463.1	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KJ794697.1, MF461295.1, LT962958.1	87% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KP324970.1, MH4811630.1, LT839050.1
37	12P/23.04.2018	*Rhodotorula mucilaginosa*	97% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KX525674.1, KF411538.1, KF411535.1	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: MT550663.1, MT422085.1, MT422080.1	96% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: MT259225.1, EF644444.1, NG068967.1
38	21S/23.04.2018	*Candida albicans*	92% zgodność z *C. albicans*, numery: MG253657.1, KP675443.1, JN606252.1	100% zgodność z *C. albicans*, numery: KF214355.1, MN121168.1, MN121166.1	93% zgodność z *C. albicans*, numery: MK026206.1, KJ624059.1, MF767787.1
39	26J/23.04.2018	*Yarrowia lipolytica*	96% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KP132926.1, KP132923.1, DQ683008.1	99% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: JQ690257.1, MZ314863.1, MZ314862.1	97% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KY110194.1, KY110181.1, KX928783.1
40	35W/07.05.2018	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	89% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MK732152.1, MK267418.1, MH094668.1	100% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: GU373786.1, AB492275.1, MT814231.1	95% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: NG069089.1, MN872920.1, MN872856.1
41	37P/07.05.2018	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: JQ419960.1, FJ770560.1, MN886501.1	90% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: JQ419921.1, JQ690268.1, JQ690265.1
42	37S/07.05.2018	*Pichia kudriavzevii*	97% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015963.1, MG015969.1, MG015972.1	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MN371941.1, MH244203.1, LT962960.1	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KP223713.1, KC544469.1, KP070744.1
43	48P/07.05.2018	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	95% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MH094668.1, KJ816919.1, KC525795.1	99% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: AB492275.1, AB492259.1, GU373786.1	97% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery:: NG069089.1, MG708472.1, KY106113.1
44	49P/07.05.2018	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	86% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery:	98% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery:	97% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*,

			MN809437.1, KJ094038.1, MT772147.1	GU373786.1, NG069089.1, KY106113.1	numery: EU862820.1, AB492259.1, JX476277.1
45	51P/07.05.2018	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	92% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: MK973016.1, MK267418.1, MH094668.1	100% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: LC171721.1, EU186080.1, JX476277.1	94% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: JX476277.1, AB492259.1, EU862820.1
46	54S/07.05.2018	*Candida parapsilosis*	94% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: OM523862.1, OM523853.1, OW985846.1	99% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: KP852497.1, MK026341.1, MF767817.1	99% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MH612993.1, MT580251.1, FJ746059.1
47	75P/07.05.2018	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015961.1, MT539198.1, MT731420.1	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: OM995979.1, KC454395.1, MT657964.1	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KY705008.1, KX008743.1, KC544469.1
48	81P/07.05.2018	*Apiotrichum domesticum / A. montevideense*	94% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: MN809437.1, MT772147.1, MH094668.1	100% zgodność z *A. montevideense / A. domesticum*, numery: GU373786.1, MG708472.1, KY106113.1	99% zgodność z *A. domesticum / A. montevideense*, numery: AB000101.1, AB000103.1, MG708472.1
49	81W/07.05.2018	*Candida parapsilosis*	90% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: JF921979.1, KX682414.1, LC605166.1	100% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: KP852497.1, MK026341.1, MT580251.1	82% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MT153736.1, MT001244.1, MK026341.1
50	81J/07.05.2018	*Candida parapsilosis*	96% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MH854532.1, MF380667.1, KY102305.1	100% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MK026341.1, KU316730.1, MK026319.1	94% zgodność z *C. parapsilosis*, numery: MK026341.1, MK026319.1, MF767817.1

Załącznik 2. Tabelaryczne zestawienie wyników identyfikacji izolatów drożdży na podstawie sekwencji regionu ITS rybosomalnego DNA w porównaniu z sekwencjami referencyjnymi z Bazy Danych GenBank

Attachment 2. Tabular summary of the results of identification of yeast isolates based on the sequence of the ITS region of ribosomal DNA compared to the reference sequences from the GenBank Database

Oznaczenie izolatów drożdży:
83-182 – numer badanego osobnika
P- pysk, S- skrzela, W-wątroba, J- jelita
1-3 – numer izolatu uzyskanego od jednego osobnika
np. 05.12.2016- data pobierania wymazów

Numer izolatu	**Oznaczenie izolatu**	**Zidentyfikowane gatunki drożdży**	**Zgodność z sekwencjami referencyjnymi dostępnymi w Bazie Danych GenBank**
51	83P/09.12.2019	*Yarrowia divulgata*	98% zgodność z *Y. divulgata*, numery: NR156000.1, KF425323.1, MT671193.1
52	84P/09.12.2019	*Candida albicans*	100% zgodność z *C. albicans*, numer: MT351884.1
53	84S/09.12.2019	*Pichia fermentans*	95% zgodność z *P. fermentans*, numery: DQ646687.1, MT645427.1, MT645422.1
54	84W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	97% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MH545928.1, MN310532.1, MN310535.1
55	84J/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	98% zgodność z *Y. deformans*, numery: KR019755.1, KU052793.1, MT671181.1
56	86P/09.12.2019	*Pichia fermentans*	97% zgodność z *P. fermentans*, numery: KY104547.1, KX859609.1, KJ804096.1
57	87P/09.12.2019	*Pichia fermentans*	94% zgodność z *P. fermentans*, numery: KY104547.1, MT635313.1, KY104548.1
58	87S/09.12.2019	*Pichia fermentans*	84% zgodność z *P. fermentans*, numer: KM374115.1
59	88W/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. subglobosus/ D. fabryi*, numery: MT192507.1, KY103295.1, KY103198.1
60	89P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	93% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MK294305.1, MZ666342.1, KC765129.1
61	89S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	87% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG0150956.1, MG015966.1
62	90P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	94% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015976.1, KF646198.1, CP093511.1

63	90S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	98% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015976.1, KT737219.1, MG015970.1
64	91P/09.12.2019	*Yarrowia divulgata*	96% zgodność z *Y. divulgata*, numery: OP216836.1, OP216830.1, OP216840.1
65	91S1/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, KU555388.1
66	91S2/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	97% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: HE660067.1, KY105986.1, KP132926.1
67	92P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	98% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015972.1
68	92S/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	98% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: ON365505.1, ON365504.1, EU649079.1
69	93P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT731420.1, MT539198.1, MG015965.1
70	93S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KC905770.1, CP039617.1, LC389023.1
71	93W/09.12.2019	*Meyerozyma guilliermondii*	100% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: MG601180.1, MG601177.1, MK990463.1
72	94S/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	100% zgodność z *Y. deformans*, numery: AM279254.1, KX859495.1, KX859493.1
73	95P/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	100% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: MK267710.1, KX426975.1, KX426955.1
74	96P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	88% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, KC905770.1,MK053819.1
75	96J/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	100% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KY102991.1, MZ133613.1, MW449591.1
76	98S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	90% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015956.1, MG015966.1
77	98W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	97% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015956.1, MG015966.1
78	98J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT102789.1, MG015972.1, MG015956.1
79	99P/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: MH429877.1, MH429879.1, MH429874.1
80	99S/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	97% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: DQ677251.1, DQ677252.1, MK805506.1
81	99W/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. subglobosus/ D. fabryi/ D. robertsiae*, numery: KM402067.1, MK394103.1, KP132014.1, MT529389.1

82	100P/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	99% zgodność z *Y. deformans*, numery: KX859495.1, KX859493.1, KX859537.1
83	100S/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	100% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KY102991.1, MZ133613.1, MW449591.1
84	101P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	91% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MK053819.1
85	102P/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. subglobosus/ D. fabryi/ D. prosopidis*, numery: KM402067.1, MK394103.1, KP132014.1, MT529389.1
86	104P/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. subglobosus/ D. fabryi/ D. prosopidis*, numery: MT181119.1, KY103198.1, MZ227346.1, MZ889104.1
87	105P/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: MH429884.1, MH429877.1, MH429874.1
88	105S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	91% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015956.1, MG015966.1
89	105J/09.12.2019	*Meyerozyma. guilliermondii*	100% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: KP109736.1, MG367466.1, KP109730.1
90	106S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	91% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015956.1, MG015966.1
91	106J/09.12.2019	*Yarrowia divulgata*	96% zgodność z *Y. divulgata*, numery: HQ914910.1, HM235699.1, KU200447.1
92	107P1/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	100% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: MH595235.1, AM279269.1, AM379268.1
93	107P2/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi*, numery: EF193070.1, EF194843.1, KY103198.1
94	108P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	88% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015961.1, MG015956.1
95	108W/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: MW710386.1, KX905284.1, KX905285.1
96	109P1/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KY104800.1, KR011317.1, AF444635.1
97	109P2/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MF285862.1, JQ425351.1, MN378409.1

98	109S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015956.1, MG015965.1
99	109J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	88% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, KC905770.1, MF685429.1
100	110P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015993.1
101	110J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT321167.1, MK886691.1, MK748988.1
102	111P/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	99% zgodność z *Y. deformans*, numery: MH310819.1, AM279254.1, KX859495.1
103	111S/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	95% zgodność z *Y. deformans*, numery: KY105961.1, KP974193.1, KR019755.1
104	111W/09.12.2019	*Meyerozyma guilliermondii*	100% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: MG015984.1, MG015977.1, EU236703.1
105	112P/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	99% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: MH595235.1, AM279268.1, AM279269.1
106	112S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MH545928.1, MN310532.1, MK894151.1
107	113J/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	89% zgodność z *Y. deformans*, numery: KR078406.1, KX859496.1, KX859496.1
108	114P1/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	87% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MT102789.1, KP068964.1
109	114P2/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	100% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KY105989.1, EF643579.1, EF643578.1
110	114P3/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: MK268126.1, MG519725.1, KX385849.1
111	114J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi*, numery: MT180776.1, MT181119.1, KY103198.1
112	115P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT731420.1, JQ425351, MN378409.1
113	115S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	88% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MT102789.1, MG015972.1
114	116P/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	99% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: MH595235.1, AM279268.1, KY101919.1
115	117P/09.12.2019	*Pichia fermentans*	99% zgodność z *P. fermentans*, numery: DQ646687.1, LC473128.1, KY104546.1
116	117S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015956.1, MT731420.1

117	118P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: CP039612.1, CP039617.1, CP039615.1
118	118S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
119	119P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MT102789.1, KP068964.1
120	120P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	88% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MT203789.1, KP068964.1
121	120W/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: MH429884.1, LC529168.1, MW764691.1
122	121P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	91% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MK294305.1, MG757420.1, KU291169.1
123	121S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MK343434.1, MW856009.1, CP039612.1
124	121J1/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
125	121J2/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KY104800.1, KR011317.1, AF444635.1
126	122P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	95% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: JQ083432.1, MG015961.1, MW856013.1
127	122S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	85% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MF685429.1, MF685416.1
128	123P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
129	123S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT539198.1, CP039612.1, MT731420.1
130	124P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
131	124S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MH545928.1, MK343434.1, MN310532.1
132	125P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: CP039612.1, CP0287733.1, MK329990.1
133	125S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, KC905770.1, MF685429.1
134	126P/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KR011317.1, KY104800.1, AF444635.1

135	126J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: MK268125.1, LC412693.1, KP132011.1
136	127P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015964.1, MT321167.1, MK886691.1
137	127S/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. subglobosus/ D. fabryi/ D. prosopidis*, numery: MT187616.1, MT183071.1, KY103196.1
138	127J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: MK156305.1, MK352093.1, MK352079.1
139	128S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KC905770.1, MG015964.1, MG015966.1
140	128J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MG015972.1, MG015961.1
141	129P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, EU315752.1, MG015957.1
142	129S/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	98% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: MK267983.1, MK267982.1, MK267981.1
143	130P/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	97% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KF908251.1, HE660067.1, MH459414.1
144	131P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	81% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: EU315752.1, LC567131.1, MG015961.1
145	131S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MK329990.1, KT737219.1, CP039612.1
146	133P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	98% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015961.1, MG015956.1
147	133S1/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: LC389037.1, KX376253.1, KY104567.1
148	133S2/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: KX905286.1, KY104548.1, MW592919.1
149	133W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
150	133J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT539198.1, MN378409.1, MN378408.1
151	134P/09.12.2019	*Holtermanniella takashimae*	100% zgodność z *H. takashimae*, numery: MW895075.1, NR137721.1, MN913531.1
152	134S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	82% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: EU315752.1, MG015959.1, MF685430.1
153	135P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	93% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MK294305.1, MG757420.1, JQ083432.1

154	135S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	87% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MK267928.1, KY104691.1, KC905770.1
155	136P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	90% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KC905770.1, MF685429.1, MF685416.1
156	137P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	90% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MF685429.1, MF685416.1
157	137S/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KY104800.1, AF444635.1, KR011317.1
158	137W/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	97% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KF908251.1, KY105972.1, KF908250.1
159	138P1/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: KX905285.1, KX905284.1, KX905286.1
160	138P2/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	97% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015964.1, MH545928.1, MN310532.1
161	138S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	95% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MK329988.1
162.	138J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	99% zgodność z *D. hansenii*, numery: MW959728.1, MW959732.1, MZ702995.1
163	139P1/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. subglobosus/ D. fabryi/ D. prosopidis*, numery: MT502795.1, MT187616.1, MT183071.1, MK156303.1
164	139P2/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	91% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MH979676.1, MZ930149.1, MZ677198.1
165	139S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	88% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MH979676.1, MZ930149.1, MT234388.1
166	139J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	94% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KU291169.1, MG757420.1, KP171557.1
167	140P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	90% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG550149.1, MT136539.1, MT731420.1
168	140J/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	97% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KF908250.1, HE660067.1, MT355635.1
169	141S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015965.1, MG015964.1, MN378409.1
170	141J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KY794727.1, LC389030.1, LC389007.1
171	142P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	97% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015965.1, MF285863.1, LC389027.1
172	142S/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	96% zgodność z *Y. deformans*, numery: AM279256.1, MT534181.1, KY105963.1
173	142W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	98% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015974.1, MT875240.1, MH545928.1
174	142J/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	100% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KX376267.1, KY173558.1, KY102991.1
175	143W/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: LC412697.1, FR686595.1, FR686593.1
176	144S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015961.1, MF285863.1, MT731420.1

177	145P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	82% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MF685430.1, MF685429.1
178	145S/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: KX905285.1, KX905284.1, KX905286.1
179	145W/09.12.2019	*Candida oleophila*	99% zgodność z *C. oleophila*, numery: KC865288.1, JX188106.1, MW624469.1
180	146P/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	100% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KY102991.1, MK267822.1, MZ613315.1
181	146S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KC905770.1, MG015964.1, MG015966.1
182	146J/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	100% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: KY101919.1, MH595235.1, AM279268.1
183	147W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KT737219.1, KU555385.1, MT539200.1
184	148P/09.12.2019	*Yarrowia divulgata*	99% zgodność z *Y. divulgata*, numery: NR156000.1, MT671193.1, KF425323.1
185	148J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi*, numery: MT180776.1, MT181119.1, KY103198.1
186	149P/09.12.2019	*Kluyveromyces marxianus*	100% zgodność z *K. marxianus*, numery: HG532087.1, MT187614.1, HG532083.1
187	149S/09.12.2019	*Pichia fermentans*	99% zgodność z *P. fermentans*, numery: MK044076.1, KX905285.1, MW710650.1
188.	150P1/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	98% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: MH595235.1, AM279268.1, KY101919.1
189	150P2/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, KC905770.1, MG015964.1
190	150S/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: MW710386.1, DQ646687.1, KM029994.1
191	150J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	82% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MG015976.1, MG015972.1
192	151J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	93% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: JQ083432.1, MG015961.1, MW856013.1
193	152P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	88% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, KM396282.1, MT102789.1
194	152S1/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: KY104548.1, KX905285.1, KY104537.1
195	152S2/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	92% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015965.1, MG015964.1, CP039617.1

196	153P/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KY104800.1, AF444635.1, KR011317.1
197	153S/09.12.2019	*Meyerozyma guilliermondii*	100% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: EU236703.1, MG646972.1, MH223591.1
198	153J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
199	154P1/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: KX905285.1, KF646201.1, KX905286.1
200	154P2/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MG015966.1, KT737219.1
201	154P3/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KR011317.1, KY104800.1, AF444635.1
202	157S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	87% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MZ930149.1, MH979676.1, MZ677198.1
203	158P1/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	98% zgodność z *Y. deformans*, numery: OP216842.1, OP216838.1, MN509050.1
204	158P2/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	89% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MZ930149.1, MH979676.1, MZ677198.1
205	159S/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	100% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: AM711411.1, MH595235.1, FR682309.1
206	160P1/09.12.2019	*Candida sake*	98% zgodność z *C. sake*, numery: MN340287.1, LC412744.1, MF801627.1
207	160P2/09.12.2019	*Rhodotorula mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KR011317.1, KY104800.1, AF444635.1
208	160S/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	92% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: MK267822.1, MZ613315.1, AB035573.1
209	161S/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	95% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: LC050530.1, DQ677252.1, GQ458037.1
210	162P/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi*, numery: MT180776.1, MK737876.1, KY103198.1
211	162S1/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KC905770.1, MG015964.1, MG015975.1
212	162S2/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi/ D. robertsiae/ D. subglobosus/ D. prosopidis*, numery: MT529389.1, MT181119.1, MK394103.1, KP132014.1, MZ889104.1
213	162W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	90% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KC905770.1, KP068964.1, MF685429.1

214	164P1/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi/ D. robertsiae/ D. subglobosus/ D. prosopidis*, numery: MT529389.1, MT181119.1, MK394103.1, KP132014.1, MZ889104.1
215	164P2/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	100% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KY102991.1, MK267822.1, MZ613315.1
216	164W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: CP039612.1, CP028773.1, MT731420.1
217	164J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	97% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MF685421.1, KC905770.1, MK053819.1
218	165P1/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	96% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: JQ083432.1, MG015961.1, KP132508.1
219	165P2/09.12.2019	*Yarrowia divulgata*	99% zgodność z *Y. divulgata*, numery: NR156000.1, KF425323.1, MT671193.1
220	165S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	86% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MZ677198.1, FJ231424.1, MZ930149.1
221	165J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: OL687506.1, KF307731.1, KF292211.1
222	166P/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	100% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: MH595235.1, AM279268.1, KY101919.1
223	167S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	87% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, EU315752.1, MZ666360.1
224	167W/09.12.2019	*Meyerozyma guilliermondii*	100% zgodność z *M. guilliermondii*, numery: MK267607.1, MH211588.1, LC317503.1
225.	167J1/09.12.2019	*Holtermanniella takashimae*	100% zgodność z *H. takashimae*, numery: MN913531.1, MW895075.1, NR137721.1
226	167J2/09.12.2019	*Cutaneotrichosporon curvatum*	100% zgodność z *Cut. curvatum*, numery: KY102991.1, MZ133613.1, MW449591.1
227	168P/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	100% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KY105989.1, EF643579.1, EF643578.1
228	168W/09.12.2019	*Pichia fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: KX905285.1, KX905286.1, KY104537.1
229	168J/09.12.2019	*Yarrowia deformans*	100% zgodność z *Y. deformans*, numery: MN509050.1, MT534181.1, KU052793.1
230	169P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	84% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, MT102789.1, MK547220.1
231	169S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	90% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015964.1, MT321167.1, MK886691.1
232	169W/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii*, numery: KM402067.1, EF643588.1, EF192224.1

233	169J/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	84% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015959.1, EU315752.1, MK547220.1
234	170S/09.12.2019	*Yarrowia bubula*	100% zgodność z *Y. bubula*, numery: KF649301.1, MH487624.1, MH487627.1
235	171P/09.12.2019	*Yarrowia divulgata*	100% zgodność z *Y. divulgata*, numery: NR156000.1, KF425323.1, MT671193.1
236	171S/09.12.2019	*Kluyveromyces marxianus*	98% zgodność z *K. marxianus*, numery: HG532083.1, MT187614.1, LR738883.1
237	171W/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	96% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: EF568021.1, DQ677251.1, KF908250.1
238	172P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	92% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG550149.1, KP068964.1, MT136539.1
239	172S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
240	172W/09.12.2019	*P. fermentans*	100% zgodność z *P. fermentans*, numery: KX905285.1, KX905284.1, KX905286.1
241	173P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MT731427.1
242	173S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	87% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MT102789.1, MG015972.1, MG015956.1
243	174P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KU555387.1, KC905770.1, KU555388.1
244	174S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
245	174J/09.12.2019	*A. domesticum*	99% zgodność z *A. domesticum/ A. montevideense*, numery: KJ816919.1, MH094668.1, KC525856.1
246	175S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.2, MG015976.2
247	175W/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	100% zgodność z *R. mucilaginosa*, numery: KY104800.1, AF444635.1, KR011317.1
248	176P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	96% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MK329988.1, MG015957.1, MG015966.1
249	177P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
250	177S/03.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	99% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
251	178P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	98% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015972.1, MG015961.1, MG015956.1

252	178W/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: MG015966.1, KT737219.1, MG015976.1
253	179P/09.12.2019	*Yarrowia alimentaria*	100% zgodność z *Y. alimentaria*, numery: MH595235.1, AM279268.1, AM279269.1
254	179S/09.12.2019	*Yarrowia divulgata*	100% zgodność z *Y. divulgata*, numery: MT671193.1, NR156000.1, KF425323.1
255	179W/09.12.2019	*Yarrowia lipolytica*	99% zgodność z *Y. lipolytica*, numery: KX859661.1, DQ667977.1, MH059659.1
256	179J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi/ D. subglobosus/ D. prosopidis*, numery: KM402067.1, MK394103.1, KP132014.1, NR077067.1
257	180J/09.12.2019	*Debaryomyces hansenii*	100% zgodność z *D. hansenii/ D. fabryi*, numery: MT181119.1, MT180776.1, KY103198.1
258	181S/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: KC905770.1, MG015966.1, KT737219.1
259	182P/09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	84% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: EU315752.1, MG015959.1, MG015972.1
260	182S09.12.2019	*Pichia kudriavzevii*	100% zgodność z *P. kudriavzevii*, numery: CP039612.1, CP028773.1, MG015976.1

Załącznik 3. Tabelaryczne zestawienie wybranych właściwości wyizolowanych drożdży

Attachment 3. Tabular summary of the selected properties of isolated yeasts

P – reakcja pozytywna
SP – reakcja słabo pozytywna
N – reakcja negatywna
+ – wzrost
- – brak wzrostu
+/- – słaby wzrost

a) Wymazy z pyska:

Numer izolatu	Oznaczenie izolatu	Gatunek	Fermentacja (Zymogram)					Asymilacja (Auksanogram)					Wzrost w 37°C
			G	GA	S	M	L	G	GA	S	M	L	
4	2P/05.12.2016	*S. cerevisiae*	SP	N	N	N	N	P	SP	N	N	N	+
9	4P/06.12.2016	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
13	5P/06.12.2016	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	SP	SP	SP	SP	SP	+
18	7P1/08.12.2016	*C. parapsilosis*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
19	7P2/08.12.2016	*A. montevideense*	N	N	N	N	N	SP	SP	SP	SP	SP	-
24	8P/16.12.2016	*Cut. curvatum*	N	P	N	N	N	N	N	P	P	N	+/-
29	9P1/16.12.2016	*R. mucilaginosa*	P	N	N	N	N	N	N	P	SP	P	-
30	9P2/16.12.2016	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
31	9P3/16.12.2016	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	P	SP	P	SP	P	+
34	10P/16.12.2016	*M. caribbica*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
37	12P/23.04.2018	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
41	37P/07.05.2018	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	SP	SP	N	-
43	48P/07.05.2018	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	SP	SP	SP	N	N	+
44	49P/07.05.2018	*A. domesticum*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
45	51P/07.05.2018	*A. domesticum*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
47	75P/07.05.2018	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	P	SP	P	N	+
48	81P/07.05.2018	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
51	83P/09.12.2019	*Y. divulgata*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
52	84P/09.12.2019	*C. albicans*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
56.	86P/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
57	87P/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
60	89P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
62	90P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
64	91P/09.12.2019	*Y. divulgata*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
67	92P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	N	N	SP	N	N	+
69	93P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
73	95P/09.12.2019	*Cut. curvatum*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-
74	96P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
79	99P/09.12.2019	*D. hansenii*	SP	N	N	N	N	P	SP	SP	N	N	+

82	100P/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	P	N	N	SP	N	+
84	101P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
85	102P/09.12.2019	*D. hansenii*	SP	N	N	N	N	SP	N	SP	SP	N	+
86	104P/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
87	105P/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	SP	SP	N	N	+
92	107P1/09.12.2019	*Y. alimentaria*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
93	107P2/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	N	SP	P	P	N	+
94	108P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
96	109P1/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	SP	N	SP	SP	N	-
97	109P2/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
100	110P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
102	111P/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	-
105	112P/09.12.2019	*Y. alimentaria*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
108	114P1/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	SP	N	+
109	114P2/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
110	114P3/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-
112	115P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
114	116P/09.12.2019	*Y. alimentaria*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
115	117P/09.12.2019	*P. fermentans*	P	N	N	N	N	P	N	P	P	P	+
117	118P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	N	N	SP	N	N	+
119	119P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	P	N	N	+
120	120P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
122	121P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	SP	N	+
126	122P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
127	122S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	SP	+
128	123P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
130	124P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
132	125P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
134	126P/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	-
136	127P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
141	129P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
143	130P/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+/-
144	131P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
146	133P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
151	134P/09.12.2019	*H. takashimae*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
153.	135P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
155	136P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
156	137P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
159	138P1/09.12.2019	*P. fermentans*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
160	138P2/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	P	N	P	N	P	N	N	SP	N	+
163	139P1/09.12.2019	*D. hansenii*	SP	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
164	139P2/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	SP	SP	N	N	N	+
167	140P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	SP	N	SP	SP	SP	+

171	142P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
177	145P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
180	146P/09.12.2019	*Cut. curvatum*	P	N	N	N	N	P	N	SP	N	N	+
184	148P/09.12.2019	*Y. divulgata*	P	N	N	N	P	P	N	N	N	N	+
186	149P/09.12.2019	*K. marxianus*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
188	150P1/09.12.2019	*Y. alimentaria*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
189	150P2/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	P	P	SP	N	SP	SP	+
193	152P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	P	SP	N	N	N	N	+
196	153P/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	P	P	P	N	P	SP	N	P	N	N	+
199	154P1/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
200	154P2/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
201.	154P3/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	N	SP	SP	N	N	-
203	158P1/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
204	158P2/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	-
206	160P1/09.12.2019	*C. sake*	N	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
207	160P2/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-
210	162P/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
214	164P1/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
215	164P2/09.12.2019	*Cut. curvatum*	N	N	N	N	N	P	P	N	P	P	+
218	165P1/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	P	N	+
219	165P2/09.12.2019	*Y. divulgata*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
222	166P/09.12.2019	*Y. alimentaria*	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	+
227	168P/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	-
230	169P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
235	171P/09.12.2019	*Y. divulgata*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
238	172P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
241	173P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	SP	N	N	+
243	174P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
248	176P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
249	177P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
251	178P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
253	179P/09.12.2019	*Y. alimentaria*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
259	182P/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	SP	SP	SP	SP	+

b) Wymazy ze skrzeli:

Numer izolatu	Oznaczenie izolatu	Gatunek	Fermentacja (Zymogram)					Asymilacja (Auksanogram)					Wzrost w 37°C
			G	GA	S	M	L	G	GA	S	M	L	
1	1S/05.12.2016	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
5	2S/05.12.2016	*A. domesticum*	P	N	N	N	N	SP	N	P	SP	SP	+
10	4S1/06.12.2016	*C. parapsilosis*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
11	4S2/06.12.2016	*A. domesticum*	SP	SP	N	N	N	P	P	P	P	N	+
14	5S/06.12.2016	*A. montevideense*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
16	6S1/06.12.2016	*A. montevideense*	SP	N	N	N	N	P	N	P	P	P	+
17	6S2/06.12.2016	*M. guilliermondii*	SP	SP	N	N	N	N	N	N	N	N	+
20	7S/08.12.2016	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
25	8S/16.12.2016	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
32	9S/16.12.2016	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
35	10S1/16.12.2016	*C. parapsilosis*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
36	10S2/16.12.2016	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
38	21S/07.05.2018	*C. albicans*	P	P	P	P	N	P	N	P	P	N	+
42	37S/07.05.2018	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	P	SP	P	N	+
46	54S/07.05.2018	*C. parapsilosis*	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	+
53	84S/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	P	N	N	SP	N	-
58	87S/09.12.2019	*P. fermentans*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
61	89S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	N	N	N	P	N	+
63	90S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
65	91S1/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
66	91S2/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
68	92S/09.12.2019	*Cut. curvatum*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	SP	+
70	93S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	SP	N	N	+
72	94S/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
76	98S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
80	99S/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
83	100S/09.12.2019	*Cut. curvatum*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
88	105S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	SP	N	N	+
90	106S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	P	N	+
98	109S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
103	111S/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
106	112S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	SP	N	+
113	115S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	-
116	117S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
118	118S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
123	121S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	+
127	122S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	SP	+
129	123S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+

131	124S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	SP	P	+
133	125S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
137	127S/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
139	128S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
142	129S/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	+
145	131S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
147	133S1/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
148	133S2/09.12.2019	*P. fermentans*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
152	134S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
154	135S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
157	137S/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	N	N	N	SP	N	+/-
161	138S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	SP	N	N	+
165	139S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
169	141S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
172	142S/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
176	144S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
178	145S/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	P	N	SP	N	N	+
181	146S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
187	149S/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	P	N	P	N	SP	N	N	+
190	150S/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
194	152S1/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
195	152S2/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
197	153S/09.12.2019	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
202	157S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
205	159S/09.12.2019	*Y. alimentaria*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
208	160S/09.12.2019	*Cut. curvatum*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-
209	161S/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
211	162S1/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	SP	N	N	N	+
212	162S2/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	+
220	165S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
223	167S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
231	169S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
234	170S/09.12.2019	*Y. bubula*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
236	171S/09.12.2019	*K. marxianus*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
239	172S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
242	173S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
244	174S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
246	175S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
250	177S/03.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
254	179S/09.12.2019	*Y. divulgata*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	SP	-
258	181S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
260	182S/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+

c) Wymazy z wątroby:

Numer izolatu	Oznaczenie izolatu	Gatunek	Fermentacja (Zymogram)					Asymilacja (Auksanogram)					Wzrost w 37°C
			G	GA	S	M	L	G	GA	S	M	L	
26	8W/16.12.2016	*A. domesticum*	P	N	N	N	N	SP	SP	SP	SP	SP	+
33	9W/16.12.2016	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
40	35W/07.05.2018	*A. domesticum*	SP	N	N	N	N	P	SP	SP	SP	N	+
49	81W/07.05.2018	*C. parapsilosis*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
54	84W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
59	88W/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
71	93W/09.12.2019	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	P	N	N	SP	N	+
77	98W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
81	99W/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
95	108W/09.12.2019	*P. fermentans*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-
104	111W/09.12.2019	*M. guilliermondii*	N	N	SP	N	N	N	N	N	N	N	+
121	120W/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
149	133W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
158	137W/09.12.2019	*Y. lipolytica*	P	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
173	142W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
175	143W/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	N	SP	N	N	+
179	145W/09.12.2019	*C. oleophila*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
183	147W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	P	N	P	P	N	N	SP	SP	+
213	162W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
216	164W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
224	167W/09.12.2019	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
228	168W/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	+
232	169W/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	+
237	171W/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
240	172W/09.12.2019	*P. fermentans*	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	+
247	175W/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	-
252	178W/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
255	179W/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+

d) Wymazy z jelita:

Numer izolatu	Oznaczenie izolatu	Gatunek	Fermentacja (Zymogram)					Asymilacja (Auksanogram)					Wzrost w 37°C
			G	GA	S	M	L	G	GA	S	M	L	
2	1J1/05.12.2016	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	N	N	P	SP	N	+
3	1J2/05.12.2016	*C. parapsilosis*	SP	N	N	P	N	P	SP	P	P	N	+
6	2J1/05.12.2016	*A. domesticum*	SP	N	N	N	N	N	SP	P	N	SP	-
7	2J2/05.12.2016	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	N	N	SP	N	N	-
8	3J/05.12.2016	*C. parapsilosis*	SP	N	N	SP	N	P	N	P	P	N	+
12	4J/06.12.2016	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	+/-
15	5J/06.12.2016	*A. domesticum*	P	SP	N	N	N	SP	SP	SP	SP	N	+
21	7J1/08.12.2016	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	-
22	7J2/08.12.2016	*A. montevideense*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	+/-
23	7J3/08.12.2016	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
27	8J1/16.12.2016	*E. dermatitidis*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
28	8J2/16.12.2016	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	P	P	SP	N	+
39	26J/23.04.2018	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	SP	SP	N	N	N	-
50	81J/07.05.2018	*C. parapsilosis*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	N	+
55	84J/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N	+
75	96J/09.12.2019	*Cut. curvatum*	SP	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
78	98J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
89	105J/09.12.2019	*M. guilliermondii*	N	N	N	N	N	SP	SP	SP	SP	N	+
91	106J/09.12.2019	*Y. divulgata*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
99	109J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	SP	N	+
101	110J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
107	113J/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
111	114J/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
124	121J1/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	+
125	121J2/09.12.2019	*R. mucilaginosa*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-
135	126J/09.12.2019	*D. hansenii*	P	P	N	P	N	SP	N	N	SP	N	+
138	127J/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	+
140	128J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	P	N	N	N	N	P	N	SP	SP	N	+
150	133J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	N	N	SP	SP	N	+
162	138J/09.12.2019	*D. hansenii*	P	P	N	SP	N	SP	N	N	N	N	+
166	139J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
168	140J/09.12.2019	*Y. lipolytica*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
170	141J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
174	142J/09.12.2019	*Cut. curvatum*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+
182	146J/09.12.2019	*Y. alimentaria*	P	N	N	N	N	P	SP	N	SP	N	+
185	148J/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
191	150J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
192	151J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+

198	153J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	+
217	164J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	SP	N	N	N	N	P	N	P	N	N	+
221.	165J/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	P	N	P	P	N	+
225	167J1/09.12.2019	*H. takashimae*	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	+
226	167J2/09.12.2019	*Cut. curvatum*	N	N	N	N	N	SP	N	N	N	N	-
229	168J/09.12.2019	*Y. deformans*	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	+
233	169J/09.12.2019	*P. kudriavzevii*	N	N	N	N	N	P	N	N	SP	N	+
245	174J/09.12.2019	*A. domesticum*	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	+
256	179J/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	N	N	SP	N	N	+
257	180J/09.12.2019	*D. hansenii*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	+

Załącznik 4. Tabelaryczne zestawienie wyników identyfikacji wybranych izolatów grzybów na podstawie auksanogramów przy użyciu testów API 20C AUX

Attachment 4. Tabular summary of the results of identification of the selected fungal isolates based on auxanograms using API 20C AUX tests

\+ – reakcja pozytywna

– – reakcja negatywna

Numer izolatu	Oznaczenie izolatu	Gatunek	Aktywność enzymatyczna w skali 5-stopniowej																				Gatunek wg klucza do testów API 20C AUX
			GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	strzępki/ pseudo-strzępki	
245	174J	*A. domesticum*	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
16	6S1	*A. montevideense*	+	–	+	–	+	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	*T. inkin*
38	21S	*C. albicans*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	*C. krusei/ C. incospicua*
179	145W	*C. oleophila*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	*C. krusei/ C. incospicua*
18	7P1	*C. parapsilosis*	+	–	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	+	*C. parapsilosis*
206	160P1	*C. sake*	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
24	8P	*Cut. curvatum*	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	+	*C. parapsilosis*
221	165J	*D. hansenii*	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
27	8J1	*E. dermatitidis*	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	+	*Rhodotorula* sp.
151	134P	*H. takashimae*	+	+	+	+	–	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
186	149P	*K. marxianus*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	*C. krusei/ C. incospicua*
34	10P	*M. caribbica*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	*C. krusei/ C. incospicua*
23	7J3	*M. guilliermondii*	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	*C. guilliermondii*
148	133S2	*P. fermentans*	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–
47	75P	*P. kudriavzevii*	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	+	*C. parapsilosis*
21	7J1	*R. mucilaginosa*	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	+	+	+	–	+	–	*R. mucilaginosa*
4.	2P	*S. cerevisiae*	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+	–	*C. guilliermondii*

182	146J	*Y. alimentaria*	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	*C. zeylanoides*
234	170S	*Y. bubula*	+	+	+	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–
72	94S	*Y. deformans*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	*C. krusei/ C. incospicua*
254	179S	*Y. divulgata*	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	*Cr. humicolus*
39	26J	*Y. lipolytica*	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	*C. krusei/ C. incospicua*

Załącznik 5. Zestawienie wyników aktywności enzymatycznej wybranych izolatów grzybów przy użyciu testów API ZYM

Attachment 5. Summary of enzymatic activity results of the selected fungal isolates using API ZYM tests

Numer izolatu	**Oznaczenie izolatu**	**Gatunek**	**Aktywność enzymatyczna w skali 5-stopniowej**																		
			E 2	**E 3**	**E 4**	**E 5**	**E 6**	**E 7**	**E 8**	**E 9**	**E10**	**E11**	**E12**	**E13**	**E14**	**E15**	**E16**	**E17**	**E18**	**E19**	**E20**
245	174J	*A. domesticum*	2	3	2	0	3	0	0	1	1	5	5	1	1	1	1	3	0	1	1
16	6S1	*A. montevideense*	3	4	3	0	5	3	3	1	1	5	5	0	0	0	0	0	0	1	0
38	21S	*C. albicans*	5	2	4	1	5	2	1	0	2	5	5	0	0	0	0	4	0	0	0
179	145W	*C. oleophila*	1	1	2	0	5	3	3	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
18	7P1	*C. parapsilosis*	5	2	2	0	5	1	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
206	160P1	*C. sake*	2	3	2	0	5	3	3	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
24	8P	*Cut. curvatum*	5	3	2	0	5	1	0	0	0	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0
221	165J	*D. hansenii*	2	3	2	0	4	2	1	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
27	8J1	*E. dermatitidis*	3	2	2	0	5	1	1	0	1	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
151	134P	*H. takashimae*	2	3	2	0	5	2	2	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
186	149P	*K. marxianus*	1	3	2	0	5	1	1	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
34	10P	*M. caribbica*	2	3	2	0	5	3	3	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
23	7J3	*M. guilliermondii*	4	3	3	1	5	3	1	0	0	5	5	0	0	0	1	1	0	0	0
148	133S2	*P. fermentans*	2	3	2	0	5	3	2	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
47	75P	*P. kudriavzevii*	5	2	2	0	4	2	1	0	0	4	4	0	0	0	1	0	0	0	0
21	7J1	*R. mucilaginosa*	3	4	3	1	4	2	1	0	0	5	5	0	0	0	1	0	0	0	0
4	2P	*S. cerevisiae*	3	3	3	1	4	3	3	0	0	5	4	0	0	0	2	0	0	0	0
182	146J	*Y. alimentaria*	2	2	1	0	4	2	2	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
234	170S	*Y. bubula*	2	3	2	0	5	1	1	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
72	94S	*Y. deformans*	1	3	2	0	5	1	1	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
254	179S	*Y. divulgata*	4	4	3	0	4	1	0	0	0	5	5	0	0	0	0	3	0	0	0
39	26J	*Y. lipolytica*	5	4	4	0	4	1	0	0	0	4	4	0	0	0	0	3	0	0	0

Załącznik 6. Zestawienie tabelaryczne wyników minimalnego stężenia hamującego (MIC– minimum inhibitory concentration) wobec wybranych izolatów drożdży przy użyciu testów ATB FUNGUS 3

Attachment 6. Tabular summary of the minimum inhibitory concentration (MIC) results against selected yeast isolates using ATB FUNGUS 3 tests

5FC – 5-flucytozyna
AMB – amfoterycyna B
FCA – flukonazol
ITR – itrakonazol
VRC – worikonazol

Numer izolatu	**Oznaczenie izolatu**	**Gatunek**	**MIC (µg/mL)**				
			5FC	**AMB**	**FCA**	**ITR**	**VRC**
245	174J	*A. domesticum*	4	1	32	2	1
16	6S1	*A. montevideense*	16	16	4	0,25	0,25
38	21S	*C. albicans*	16	4	4	1	0,25
179	145W	*C. oleophila*	16	2	64	1	1
18	7P1	*C. parapsilosis*	0	2	4	0,125	0,25
206	160P1	*C. sake*	16	2	32	1	1
24	8P	*Cut. curvatum*	0	4	4	0,125	0,25
221	165J	*D. hansenii*	16	1	32	2	1
27	8J1	*E. dermatitidis*	4	4	32	0,5	0,25
151	134P	*H. takashimae*	1	0,5	32	2	1
186	149P	*K. marxianus*	16	1	64	4	2
34	10P	*M. caribbica*	16	1	64	1	2
23	7J3	*M. guilliermondii*	0	1	16	4	0,5
148	133S2	*P. fermentans*	0	0,5	8	1	1
47	75P	*P. kudriavzevii*	0	8	4	0,125	0,25
21	7J1	*R. mucilaginosa*	0	2	64	4	0,5
4	2P	*S. cerevisiae*	4	1	8	2	1
182	146J	*Y. alimentaria*	16	2	32	2	1
234	170S	*Y. bubula*	4	1	32	1	1
72	94S	*Y. deformans*	16	1	64	1	1
254	179S	*Y. divulgata*	4	16	32	4	1
39	26J	*Y. lipolytica*	16	4	8	4	0,5