

Studium taksonomiczne szczepu *Trichosporon beigelii* (Küch. et Rabenh.) Vuillemin z gleby

ZOFIA MACIEJOWSKA-POKACKA

Maciejowska-Pokacka Z.: (Institute of Plant Protection, Poznań, Miczurina 20, Poland). *A taxonomic study of a strain of Trichosporon beigelii* (Küch. et Rabenh.) Vuillemin from the soil, Acta Mycol. 18(2):289-296, 1982. (Küch. et Rabenh.) Vuillemin from the soil, Acta Mycol. 18(2):289-296, 1982(1986).

The morphology and physiology of a strain of *Trichosporon beigelii* was studied. Several kinds of spores and conidial stalks were observed. The observations indicate morphological characteristics should be used as positive and negative criteria in identification of species of *Trichosporon* and in distinguishing it from related genera.

WSTĘP

Trichosporon beigelii (= *T. cutaneum*) De Beurm., Gougerot et Vaucher (Ota) zaliczany jest do grupy grzybów drożdżoidalnych (*Cryptococcales*, *Cryptococcaceae*, *Trichosporoideae*). Ze względu na dużą zmienność morfologiczną szczepów i ich pleomorfizm, mało specyficzne cechy fizjologiczne i ekologiczne oraz trudności w odróżnianiu niektórych kultur od przedstawicieli rodzaju *Geotrichum*, wykonano ostatnio badania taksonomiczne mające na celu wyjaśnienie pozycji systematycznej tego gatunku. Badania te nadal wymagają uzupełnienia, ponieważ nie ustalono pełnych podstaw rozgraniczenia niektórych szczepów *Trichosporon* i *Geotrichum* wykazujących podobne cechy fizjologiczne lub morfologiczne (Carmo-Sousa 1970; Gueho 1979).

Trichosporon beigelii został po raz pierwszy wyisobniony z grzybicy włosa i opisany przez Küchenmeistera i Rabenhorsta w 1867 r. jako glon z rodzaju *Pleurococcus*. W 1869 r. Beigel stwierdził przynależność tego mikroorganizmu do gromady grzybów, a Beh-

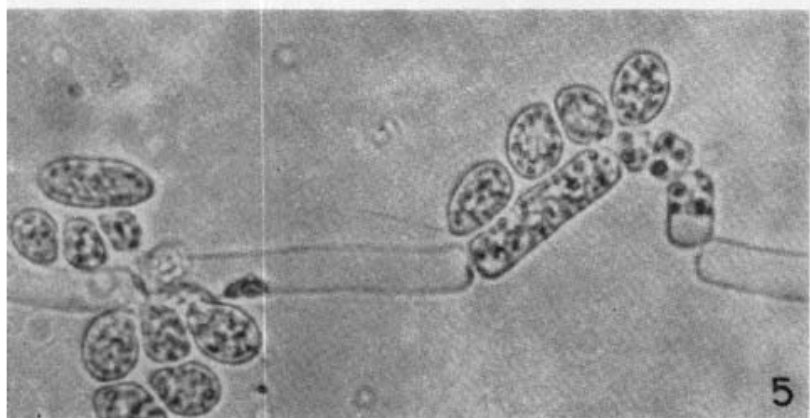
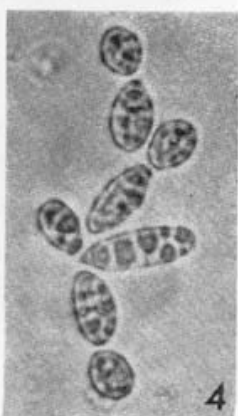
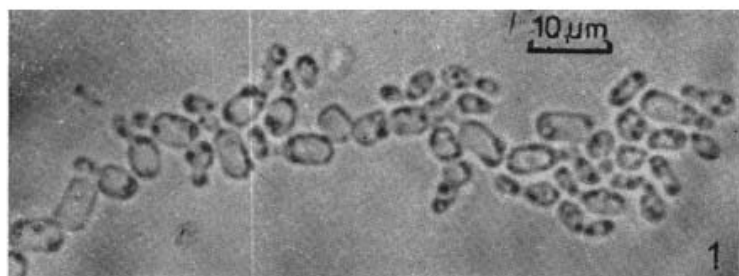
rend potwierdził to i nadał grzybowi nazwę *Trichosporon ovoides* (Behrend 1890). *Trichosporon beigelii* jest pospolitym gatunkiem o zasięgu kosmopolitycznym. Był wielokrotnie wyosobniony z grzybicy włosów ludzkich, ze zwierząt oraz z wielu środowisk naturalnych, w tym z wód słodkich i słonych, ziemi, ścieków oraz z żywego i martwego materiału roślinnego.

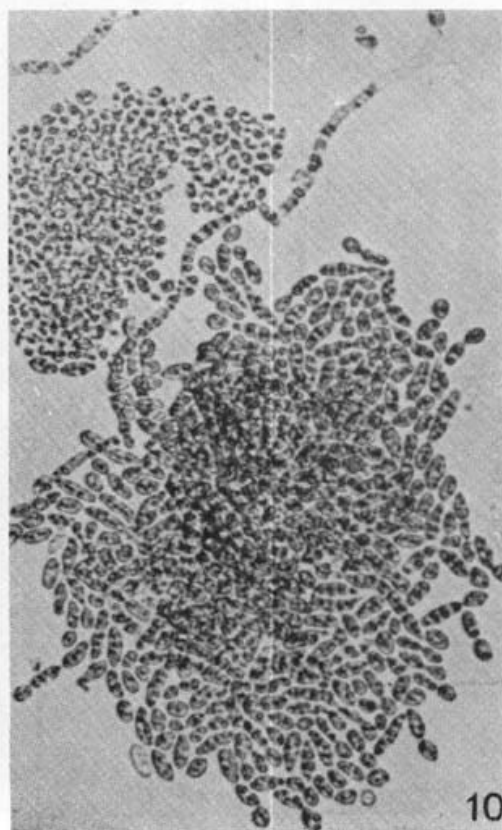
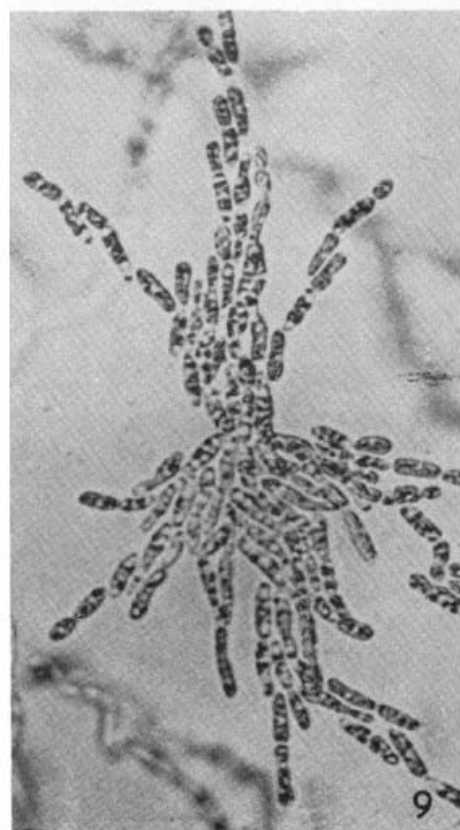
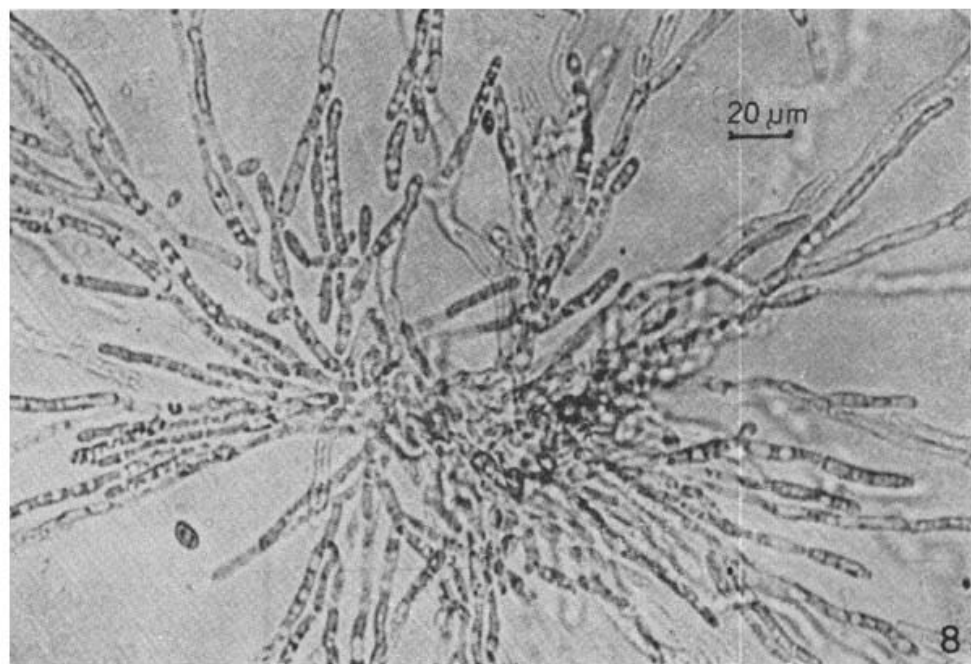
MATERIAŁ I METODY

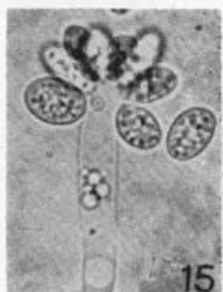
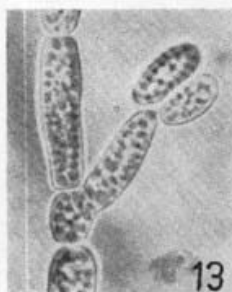
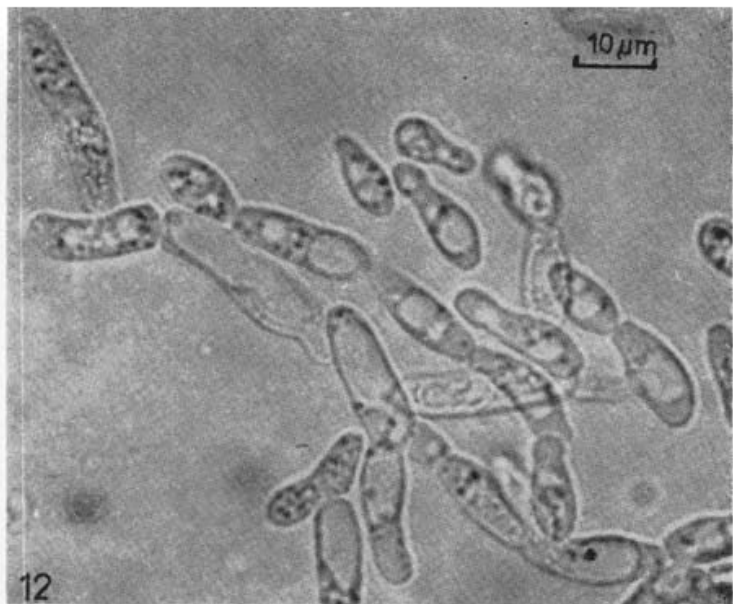
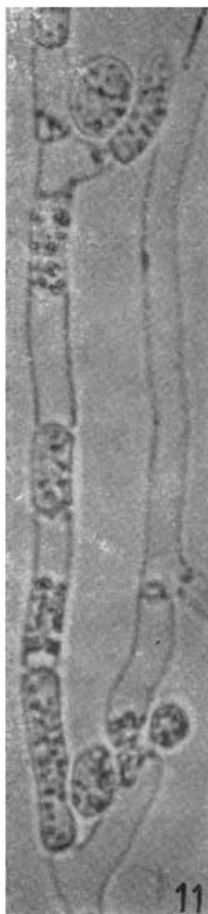
Badany szczep *Trichosporon beigelii* nr 536 R został wyosobniony w 1965 r. z gleby gliniasto-piaszczystej w Regulach k. Warszawy. Po wyosobnieniu zbadano go standardową metodą (Lodder i Kreger-van Rij 1952) i określono jako *T. cutaneum* (= *T. beigelii*). Następnie grzyb był przechowywany na skosach ziemniaczanych z dodatkiem glukozy zalanych olejem parafinowym, w temperaturze nie ogrzewanego pomieszczenia laboratoryjnego. Po upływie 11 lat przechowywania kultura została przeszczepiona na świeżą pożywkę o tym samym składzie. Po rozmnożeniu grzyba przeprowadzono poszerzone badania taksonomiczne, posługując się nową metodą (Carmono-Sousa 1970 i van der Walta 1970). Jednocześnie zwrócono szczególną uwagę na cechy morfologiczne szczepu, w których nie stwierdzono żadnych zmian w porównaniu z okresem poprzedzającym przechowywanie. Fotografie przedstawione w pracy wykonano w latach 1977-1978.

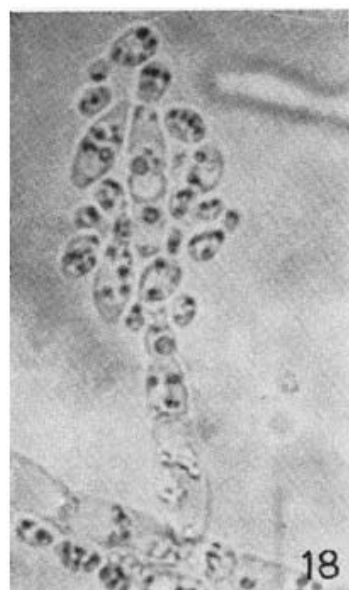
WYNIKI I DYSKUSJA

Cechy fizjologiczne szczepu *T. beigelii* nr 536 R (tab. 1), są zgodne z cechami opisywanymi dotychczas u tego gatunku. Przy badaniu zdolności pobierania azotanowej formy azotu napotkano trudności, ponieważ szczep rozwijał się dobrze w pożywce z azotanem potasu, jak i na pożywce bez źródła azotu. Stosując standardową metodę (van der Walt 1970), powtarzając wielokrotnie testy i opierając się na kryterium przezroczystości kultur, zgodnie z wymogami metody, nie stwierdzono różnic pomiędzy obydwoma kombinacjami. Kultury hodowane na pożywce z dodatkiem siarczanu amonu rozwijały się natomiast szybciej. Na podstawie braku różnic we wzroście kultur na pożywce z dodatkiem KNO_3 i na pożywce kontrolnej przyjęto, że grzyb nie zużywał azotanowej formy azotu. Zostało to potwierdzone testem auksanograficznym. Jednocześnie zakładano hodowle innych grzybów na pożywce bez źródła azotu, co dało wyniki negatywne. Natomiast szczep *T. beigelii* nr 536 R był przeszczepiany i hodowany na pożywkach bezazotowych w ciągu 3 miesięcy i rozwijał się normalnie. Uzyskane wyniki upoważniają do

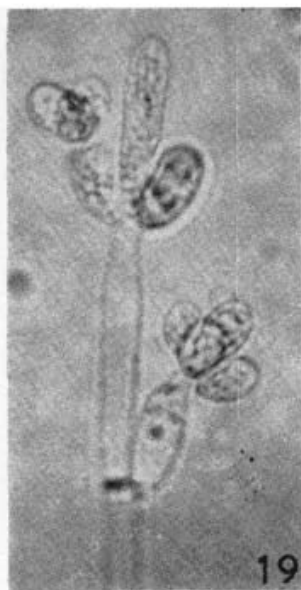




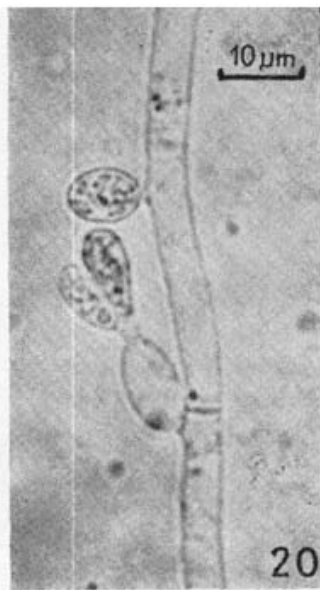
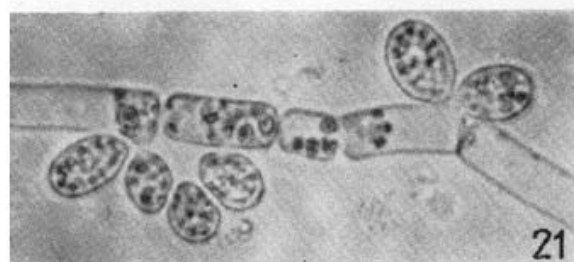




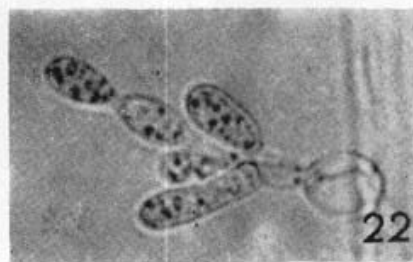
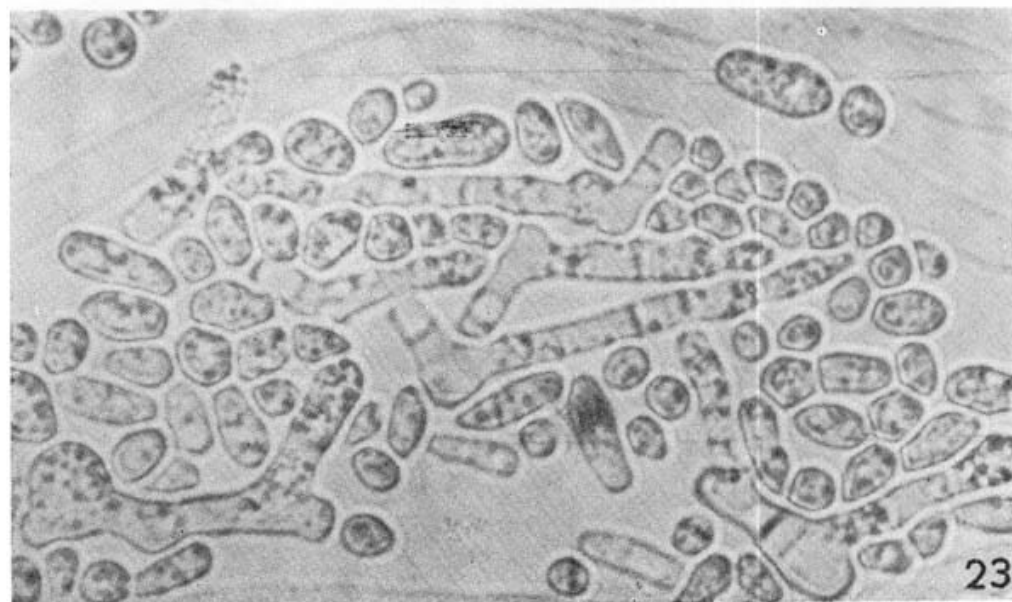
18



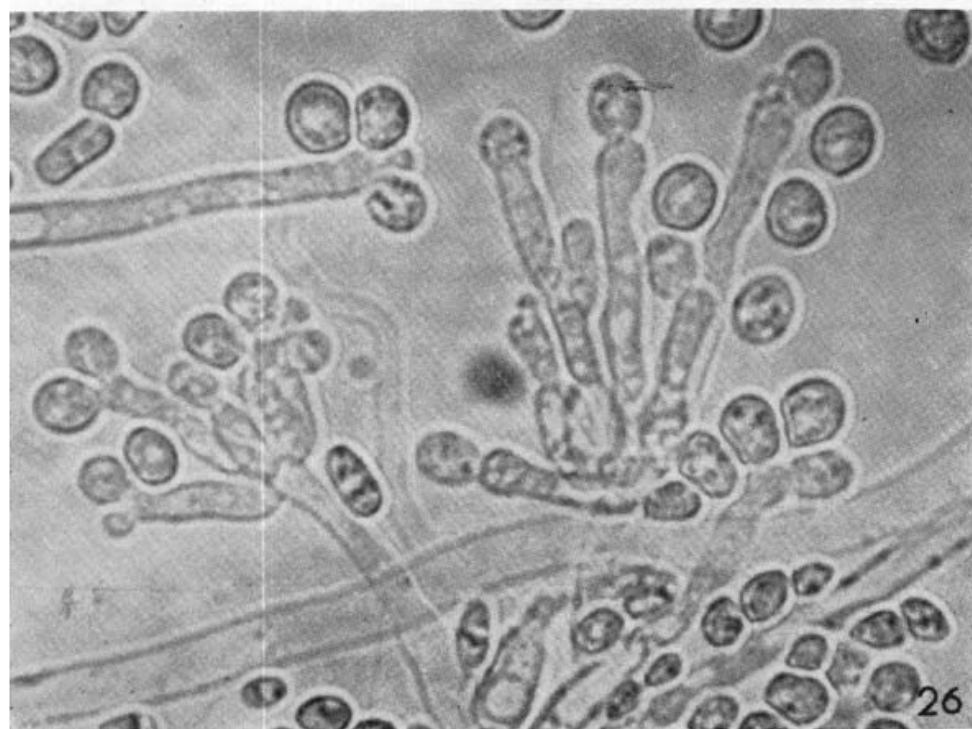
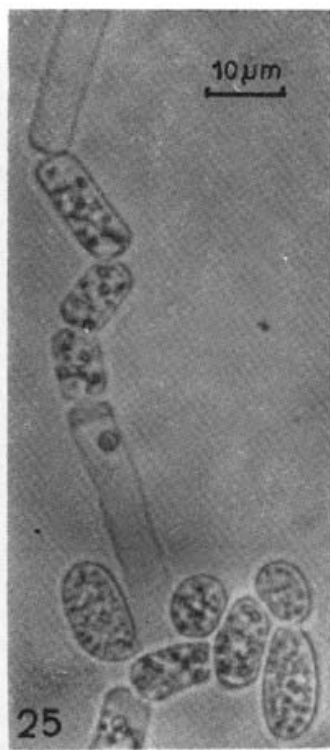
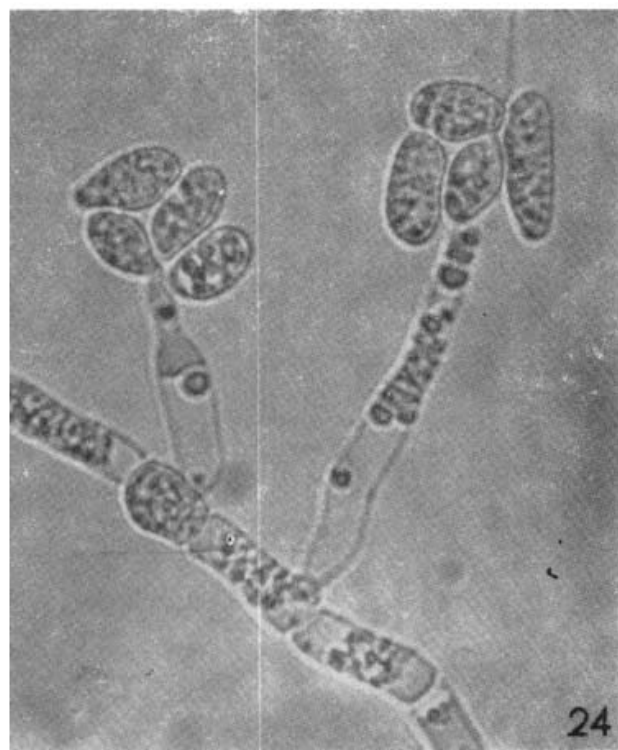
19

10 μm
20

21

10 μm
22

23



Tablica I — Plate I

Trichosporon beigelii (Küch. et Rabenh.) Vuillemin

Szczep nr 536 R: 1 — fragment 3-dniowej kultury na agarze ziemniaczanym z glukozą reprezentujący powstawanie artrospor, wykazujących zdolność pączkowania; 2-4, 7 — fragmenty kultur na agarze ziemniaczanym z glukozą po 5 i 7 dniach; 5 — fragment kultury na agarze kukurydzianym po 3 dniach; 6 — element morfologiczny przypominający kleikującą balistosporę w 7-dniowej kulturze na agarze ziemniaczanym z glukozą

Strain No. 536 R: 1 — fragment of 3-day-old culture on PDA representing the formation of arthrospores exhibiting the ability of budding; 2-4, 7 — fragments of cultures on PDA after 5 and 7 days; 5 — fragment of a culture on cornmeal agar after 3 days; 6 — a morphological element resembling germinating balistosporae in 7-day-old culture on PDA

Tablica II — Plate II

Trichosporon beigelii (Küch. et Rabenh.) Vuill.

Szczep nr 536 R: 8, 9 — fragment 3-dniowych kolonii na agarze kukurydzianym; 10 — fragment 3-dniowej kolonii na agarze ziemniaczanym z glukozą

Strain No. 536 R: 8, 9 — fragments of 3-day-old colonies on cornmeal agar; 10 — fragment of 3-day-old on PDA

Tablica III — Plate III

Trichosporon beigelii (Küch. et Rabenh.) Vuill.

Szczep nr 536 R: 11, 16 — fragment kultur na agarze kukurydzianym po 3 dniach; 12 — po 5 dniach; 7 — fragment kultury na agarze ziemniaczanym z glukozą po 5 dniach; 13 — powstawanie blastospor na szczycie komórki kolankowatej; 14 — przy przegrodach komórkowych; 15 — na artrosporze

Strain No. 536 R: 11, 16 — fragments of cultures on cornmeal agar after 3 days; 12 — after 5 days; 17 — fragment of a culture on PDA after 5 days; 13 — formation of blastospores on a tip of a knee-shaped cell; 14: at a hyphal septum; 15 — on an arthrospore

Tablica IV — Plate IV

Trichosporon beigelii (Küch. et Rabenh.) Vuill.

Szczep nr 536 R: 18-20, 22 — trzonki konidialne z zarodnikami powstające w 3-dniowych kulturach na agarze kukurydzianym; 21 — powstawanie blastospor przy przegrodach komórkowych w 3-dniowej kulturze na agarze kukurydzianym; 23 — fragment 3-dniowej kultury w płynnej pożywce z dodatkiem peptonu i ekstraktu drożdżowego

Strain No. 536 R: 18-20, 22 — conidial stalks with conidia formed in 3-day-old cultures on cornmeal agar; 21 — formation of blastospores at hyphal septa; 23 — fragment of 3-day-old culture in yeast-extract peptone water

Tablica V — Plate V

Trichosporon beigelii (Küch. et Rabenh.) Vuill.

Szczep nr 536 R: 24 — trzonki konidialne przypominające falldy z zarodnikami w 3-dniowej kulturze na agarze ziemniaczanym z glukozą; 25 — fragment 3-dniowej kultury na agarze kukurydzianym; 26 — trzonki konidialne typu *Penicillium* w płynnej pożywce z dodatkiem peptonu i ekstraktu drożdżowego po 3 dniach

Strain No. 536 R: 24 — phialide-resembling conidial stalks with conidia in 3-day-old culture on PDA; 25 — fragment of 3-day-old culture on cornmeal agar; 26 — *Penicillium*-like conidial stalks in yeast-extract peptone water after 3 days

Tabela 1 — Table 1

Charakterystyka fizjologiczna szczepu *Trichosporon beigelii* z gleby
 Physiological characteristics of a strain of *Trichosporon beigelii* from the soil

Właściwości fizjologiczne — Physiological characteristics			
Fermentacja — Fermentation		Asymilacja — Assimilation	
Glukoza		Glicerol	
Glucose	+	Glycerol	+
Galaktoza		Erytryt	
Galactose	+	Erythritol	+
L-Sorboza		Ribitol	
L-Sorbose	—	Ribitol	+
Sacharoza		Dulcyt	
Saccharose	+	Galactitol	—
Maltoza		Mannit	
Maltose	+	Mannitol	+
Celobioza		Glucitol	
Cellobiose	±	Glucitol	+
Trehaloza		α -Metyl- β -glukozyd	
Trehalose	+	α -Methyl- β -glucoside	+
Laktoza		Salicyna	
Lactose	+	Salicin	+
Melibioza		DL-Kwas mlekowy	
Melibiose	—	DL-Lactic acid	—
Rafinoza		Kwas burzysztynowy	
Raffinose	+	Succinic acid	+
Melezytoza		Kwas cytrynowy	
Melezitose	+	Citric acid	—
Inulina		Inozyt	
Inulin	±	Inositol	—
Skrobia rozpuszczalna		Wzrost na pożywce bez witamin	
Soluble starch	+	Growth in vitamin-free medium	—
D-Ksyloza		Azotan potasu	
D-Xylose	+	Potassium nitrate	—
L-Arabinoza		Azotyn potasu	
L-Arabinose	+	Potassium nitrite	±
D-Arabinoza		Wytwarzanie związków	
D-Arabinose	+	skrobiopodobnych	
D-Riboza		Formation of starch-like	
D-Ribose	+	compounds	+
L-Ramnoza		Hydroлиза mocznika	
L-Rhamnose	+	Hydrolysis of urea	+
Etanol		Maksymalna temperatura wzrostu	
Ethanol	+	Maximum temperature of growth	39°C

stwierdzenia, że badany szczep pobierał azot cząstkowy z powietrza. Asymilacja wolnego azotu atmosferycznego przez glebowe grzyby drożdżoidalne jest zjawiskiem znanym, lecz mało zbadanym (Dommergues, Mangelot 1970; Metcalfe, Chayen 1954; Maciejowska 1964). Było ono już opisane przez Maciejowską (1964) na przykładzie szczepu nr 27 *T. cutaneum* wyosobnionego z gleby torfowej, a obecnie zostało potwierdzone na przykładzie szczepu nr 536 R będącego przedmiotem niniejszej pracy.

Kultury grzyba na pożywkach agarowych były lekko pofałdowane, zwłaszcza w środkowej części. Barwa kultur była kremowobiaława z szarawym odcieniem. Pomimo pastowatego charakteru kultur na ich powierzchni był widoczny mączysty nalot. Na brzegach kultur było widać strzępki grzybni rozwijające się zarówno na powierzchni pożywki, jak i pod jej powierzchnią. W kulturach na pożywkach płynnych obserwowano bardzo dobry rozwój grzybni powietrznej. Na dnie kultur w pożywkach płynnych powstawał obfity osad.

Morfologię grzyba przedstawiono na ryc. 1 — 26. Z rycin wynika, że szczep wyróżniał się dużym zróżnicowaniem wielkości i kształtu zarodników. Porównując wymiary organów wegetatywnych szczepu z danymi z literatury zaliczono go do grupy „wielkozarodnikowych” szczepów *Trichosporon beigelii*. Szczepy takie były kilkakrotnie opisywane przez niektórych autorów (Carmo-Sousa 1970).

Prowadząc badania mikroskopowe wykryto wszystkie opisane dotychczas cechy morfologiczne gatunku *T. beigelii* oraz kilka cech nie opisanych, a wynikających z pleomorficznego charakteru grzyba. Do pierwszej grupy cech można zaliczyć: 1 — wytwarzanie artrospor w zygakowatych łańcuszkach, z młodych, oraz z starszych strzępek (ryc. 1, 5, 16, 17, 25; wymiary artrospor na pożywce agarowo-kukurydzianej wahały się w granicach $2,9-0,8 \times 3,3-48,7 \mu\text{m}$; 2 — dobry rozwój grzybni typowej i nibygrzybni (ryc. 3-5, 8-14, 16, 17, 20, 23, 26). Średnia szerokość strzępek na pożywce agarowo-kukurydzianej wynosiła $5,1 \mu\text{m}$; 3 — wytwarzanie blastospor pojedynczo (ryc. 20), w krótkich łańcuszkach (ryc. 3, 4, 22), w okółkach (ryc. 14), w mniej lub bardziej główkowatych skupieniach (ryc. 5, 21, 25) występujących przeważnie przy przegrodach komórkowych, na końcach strzępek, na trzonkach konidialnych, lub na artrosporach (ryc. 15). Blastospory miały przeważnie lekko wydłużony, owalny lub jajowaty kształt, a niekiedy były prawie kuliste. Średnie wymiary blastospor wynosiły $2,1-6,8 \times 3,0-15,1 \mu\text{m}$; 4 — wytwarzanie komórek kolankowatych o różnych wymiarach (ryc. 7, 12, 23), powstających jako rezultat rozpadu rozgałęziającej się jednostronnie grzybni; 5 — obecność chlamydospor formujących się najczęściej na końcach strzępek; 6 — wytwarzanie na standardowej pożywce

endospor o kształcie zbliżonym do kulistego. Endospory powstawały wewnątrz strzępek grzybni. Średnie wymiary endospor wynosiły $4,8 \times 5,1 \mu\text{m}$; (Carmo-Sousa 1970; Cole 1975; King, Jong 1976 i 1977; Lodder, Kreger-van Rij 1952).

Do cech dotychczas nie opisywanych w literaturze należą: 1 — występowanie kilku typów trzoneków konidialnych (ryc. 13, 18-20, 22, 24, 26), i 2 — obecność w kulturach elementów morfologicznych przypominających kielkujące balistospory (ryc. 6). Krótkie rozgłębienia grzybni lub nibygrzybni, przypominające prymitywne trzonki konidialne były obserwowane przez niektórych badaczy u *T. beigelii*, co wynika z rycin umieszczonych w literaturze. Jednak stwierdzenie występowania określonych typów trzoneków i uznanie ich za cechę diagnostyczną miało miejsce jedynie w przypadku niektórych innych gatunków, w tym u *T. fermentans* Diddens et Lodder, *T. capitatum* Diddens et Lodder, *T. inkin* (Oho) Do Carmo-Sousa et Van Uden, *T. penicillatum* Do Carmo-Sousa. Najprostszym trzonkiem występującym u szczepu nr 536 R jest trzonek będący częścią komórki kolankowatej (ryc. 13). Na ryc. 19 jest widoczny trzonek boczny o jajowatym kształcie, na ryc. 22 kulisty trzonek o krótkim, wąskim zakończeniu. Na ryc. 20 przedstawiono pośredni typ trzonka o buteleczkowato rozdętej podstawie i o wąskim krótkim zakończeniu. Na szczytach trzoneków (ryc. 19, 20 i 22) powstawało zwykle obok siebie kilka, a najczęściej cztery blastospory; jak widać powstawały one w drodze pączkowania typu „broad base”, pozostawiając oddzielne blizny. W innych przypadkach występowało również pączkowanie typu „narrow base” i wtedy liczba blastospor mogła być znacznie większa. Innym jeszcze typem trzoneków były trzonki o wydłużonym kształcie, przypominające strzępkę grzybni (ryc. 24). Trzonki te różniły się od siebie stopniem rozwoju. Na ryc. 18 przedstawiono prymitywny trzonek, będący w istocie fragmentem nibygrzybni, na szczycie którego powstawały jajowate blastospory, wykazujące natychmiastową zdolność pączkowania. W wyniku pączkowania powstawały u szczytu tych trzoneków główkowate skupienia zarodników. Trzonki przedstawione na ryc. 24 są podobne do fialid. Powstające na nich zarodniki nie były jednak fialosporami, lecz powstawały w drodze pączkowania. Na ryc. 26 przedstawiono trzonki typu „Penicillium” znane dotychczas jedynie u gatunku *T. penicillatum*. Zarodniki o kształcie zbliżonym do kulistego, powstające na tych trzonkach były rezultatem pączkowania typu „broad base”. Zarodniki powstające na trzonkach różnego typu różniły się wymiarami, kształtem i niekiedy optycznymi cechami protoplazmy (ryc. 13, 18-20, 22, 24, 26). Jak wynika z wyżej opisanych cech szczepu nr 536 R, *T. beigelii* jest przykładem reprezentującym kilkustopniowy etap filogenezy trzoneków konidialnych. Pleo-

morfizm będący cechą charakterystyczną tego gatunku dotyczy więc nie tylko zarodników, ale również trzonek konidialnych.

Badając rozwój kultury grzyba na szkiełkach mikroskopowych stwierdzano często zjawisko dymorfizmu, polegające na przechodzeniu fazy strzępkowej w fazę drożdżoidalną. Artrospory powstające w wyniku rozpadu grzybni lub nibygrzybni pączkują (ryc. 1). W wyniku pączkowania powstawały nowe kolonie fazy drożdżoidalnej.

Na ryc. 6 przedstawiono boczne kiełkowanie zarodnika o kształcie zbliżonym do gruszkowatego. Strzępka kiełkowa jest zakończona utworem podobnym do niewykształconego zarodnika potomnego. Położenie strzępki kiełkowej jest takie samo, jak położenie sterygm na kiełkujących ballistoporach, występujących u niektórych podstawczaków (*Tremellales*, *Auriculariales*) i u *Sporobolomycetales*. Strzępka ta może być uważana za odpowiednik sterygmy, a powstający na niej zarodnik za odpowiednik niewykształconej ballistospor. Takie same elementy morfologiczne były stwierdzone przez autorkę u niektórych szczepów *Sporobolomyces roseus* Kluyver et van Niel, które utraciły zdolność tworzenia balistospor (Maciejowska-Pokacka 1977). Współczesne badania taksonomiczne wskazują na przynależność *T. beigelii* do podstawczaków. Na przykład zawartość guaniny i cytozyny w kwasach dezoksyrybonukleinowych w szczepach tego grzyba wynosi ponad 50 mol % GC (Gueho 1979), a pory przegrodowe są doliporami (Kreger-van Rij, Veenhuis 1971). Obecność w kulturach elementów podobnych do kiełkujących balistospor może być dodatkową cechą taksonomiczną, sugerującą pokrewieństwo z podstawczakami.

W aktualnych kluczach do określania gatunków grzybów drożdżoidalnych wykorzystuje się głównie cechy fizjologiczne kultur. Obecność lub brak pewnych cech fizjologicznych występujących pojedynczo lub zespołowo warunkuje zaliczenie szczepu do gatunku. Natomiast kryteria morfologiczne były uwzględniane głównie przy określaniu rodzaju, co dotyczy również rodzaju *Trichosporon*. Wyniki niniejszej pracy wskazują na możliwość szerszego, niż dotychczas, wykorzystania kryteriów morfologicznych do określania gatunków. Stosowanie pozytywnych i negatywnych kryteriów morfologicznych mogłoby również ułatwić odróżnianie podobnych do siebie szczepów *Trichosporon* i *Geotrichum*.

WNIOSKI

1. Badany szczep *Trichosporon beigelii* wytwarzał kilka rodzajów zarodników i trzonek konidialnych. Jest to dowodem pleomorficznego charakteru tego gatunku.

2. Obecność w kulturach elementów morfologicznych podobnych do kielkujących ballistospor sugeruje pokrewieństwo z podstawczakami.
3. Szczep rozwijał się na pożywkach bez źródła azotu, co wskazuje na zdolność pobierania wolnego azotu z powietrza.
4. Stosowanie na szerszą skalę pozytywnych i negatywnych kryteriów morfologicznych przy określaniu gatunków *Trichosporon* może ułatwić identyfikację oraz odróżnienie ich od podobnych szczepów *Geotrichum*.

LITERATURA

- Behrend G., 1890, Über trichomycosis nodosa. Berliner Klinische Wochenschr. 27: 464-467.
- Carmo-Sousa L. 1970, *Trichosporon* Behrend. [In:] Lodder J., ed., The yeasts, 1309-1352, Amsterdam-London.
- Cole G. T., 1975, The thallic mode of conidiogenesis in the fungi imperfecti. Canad. J. Bot. 53: 2983-3001.
- Dommergues Y., Mangenot F., 1970, Ecologie microbienne du sol. Paris.
- Gueho E., 1979, Desoxyribonucleic acid base composition and taxonomy in the genus *Geotrichum* Link. Ant. van Leeuw. J. Serol. 45: 199-210.
- King D. S., Jong S. C., 1976, Induction of arthroconidia of *Trichosporon*. Mycopathologia 59: 61-63.
- King D. S., Jong S. C., 1977, A contribution to the genus *Trichosporon*. Mycotaxon 6: 391-417.
- Kreger-van Rij N. J. W., Veenhuis M., 1971, Septal pores in *Trichosporon cutaneum*. Sabouraudia 9: 36-38.
- Lodder J., Kreger-van Rij N. J. W., 1952, The yeasts. Amsterdam-London.
- Maciejowska Z., 1964, Grzyby z rodzaju *Trichosporon* wyizolowane z gleby torfowej. Pr. nauk. IOR. 6: 61-91.
- Maciejowska-Pokacka Z., 1976(1977), Grzyby drożdżoidalne występujące na ziarniakach pszenicy. III. Acta Mycol. 12: 203-219.
- Metcalfe G., Chayen S., 1954, Nitrogen fixation by soil yeasts. Nature 174: 841-842.
- Walt P. J., van der, 1970, Criteria and methods used in classification. [In:] Lodder J., ed. The yeasts. 34-113. Amsterdam-London.

SUMMARY

The physiology and morphology of a strain of *Trichosporon beigelii* isolated from the soil was studied. Morphological characteristics of the fungus are described in detail, with a special emphasis on the forms of spores and conidial stalks. Several kinds of conidial stalks were found. It is suggested that morphological characteristics should be included in the taxonomic keys, as positive and negative criteria for identification of species of *Trichosporon*. Physiological studies indicated that the fungus can assimilate atmospheric nitrogen. Morphological studies indicated that the fungus may be related to *Basidiomycotina*.