

Aktywność enzymatyczna drożdżaków i alg wyizolowanych z wydzieliny zapalnej gruczołu mlekowego krów

HENRYKA LASSA, EDWARD MALINOWSKI

Zakład Fizjopatologii Rozrodu i Gruczołu Mlekowego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego, ul. Powstańców Wlkp. 10, 85-090 Bydgoszcz

Lassa H., Malinowski E.

Enzymatic activity of yeast and algae isolated from the inflamed udder secretion of cows

Summary

The increasing number of yeast and algae isolated from bovine mastitis indicates the need for a detailed evaluation of these microorganisms. The aim of this study was to evaluate the activity of 19 hydrolytic enzymes of yeast and algae. 244 strains of yeast and 106 strains of algae isolated from clinical and subclinical mastitis were examined. The activity of enzymes was evaluated using API Zym test (BioMerieux). The highest activity was noted in leucine arylamidase, acid phosphatase, esterase, esterase lipase and alkaline phosphatase independently of the systematic classification of yeast strains. Algae strains indicated the activity of 6 enzymes and the highest were noted in acid phosphatase and naphthal-AS-BI-phosphohydrolase. There were no significant differences in enzymatic activity between the strains isolated from clinical and subclinical mastitis.

Keywords: mastitis, yeast, algae

W ostatnich latach w Polsce, a także w innych krajach zauważyć można postępujący wzrost zapaleń wymienia spowodowany przez grzyby i algi (12, 15-17, 23, 26). Związany jest on z szerokim stosowaniem antybiotyków, często z pominięciem badań bakteriologicznych. Drożdżaki, grzyby i glony wprowadzane są do wymieniowo podczas niehigienicznych infuzji leków przeciwbakteryjnych, które nierzadko ulegają zakażeniu podczas przygotowywania *ex tempore*. Do czynników predysponujących należą: złe warunki zoohigieniczne w oborach, nieprawidłowa technika i niedostatki higieny doju oraz niedobory witaminowo-mineralne (4, 5, 11).

Jednym z czynników determinujących chorobotwórczość grzybów i alg jest ich zdolność do wytwarzania enzymów. Według wielu autorów aktywność i charakter uwalnianych enzymów może być istotnym czynnikiem przystosowawczym i objawem zjadliwości wymienionych mikroorganizmów (1, 3, 20, 21, 24, 25). Drobnoustroje te mają bogaty układ enzymatyczny, który umożliwia im zarówno trawienie i wykorzystywanie substancji występujących w otoczeniu, jak również syntetyzowanie toksyn lub antybiotyków. Wydzielają do środowiska np. enzymy hydrolityczne, które rozkładają związki wielkocząsteczkowe – wielocukry, białka, lipidy i węglowodory. Enzymy te biorą udział w katalizowaniu hydrolizy wiązań C–O, C–N, C–C, a poprzez chemiczne i fizyczne oddziaływanie na środowisko zapewniają przetrwanie w tkankach, uczestniczą też bezpośrednio w trawieniu protein gospodarza (7, 8). Pro-

dukowane przez grzyby i algi enzymy mają istotny wpływ na rozwój zakażenia. Fosfataza alkaliczna, N-acetyl- β -glukozaminidaza oraz α -mannozydaza hamują migrację leukocytów do ognisk infekcji. Aktywność enzymatyczna zależna jest od gatunku badanego drobnoustroju (2, 7, 8, 13). Stwierdzono również znaczną zmienność aktywności uwalnianych enzymów w zależności od rodzaju podłoża, co stanowi ważny czynnik przystosowawczy mikroorganizmu (3, 20, 22).

Material i metody

Badanie przeprowadzono na 244 szczepach grzybów drożdżopodobnych i 106 szczepach bezchlorofilowych glonów wyizolowanych z wydzieliny gruczołu mlekowego krów chorych na kliniczną i podkliniczną postać *mastitis*.

Badanie aktywności hydrolitycznej grzybów i glonów przeprowadzono stosując test API ZYM zawierający substraty do oceny 19 enzymów hydrolitycznych: fosfatazy zasadowej esterazy, lipazy esterazowej, lipazy, arylamidazy leucynowej, arylamidazy walinowej, arylamidazy cystynowej, trypsyny, chymotrypsyny, fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy naftolu-AS-BI, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy, β -glukuronidazy, α -glukozydazy, β -glukozydazy, N-acetylo- β -glukozaminidazy, α -mannozydazy, α -fukozydazy. Z 24-godzinnej hodowli na podłożu Sabouraud przygotowywano zawiesinę komórek grzybów i glonów o gęstości 6° w skali McFarlanda i napełniano nią mikroprobówki na pasku API ZYM. Po dodaniu odczynników barwiących określano aktywność enzymów w nanomolach hydrolizowanego substratu według intensywności reakcji barwnej, w 5-punktowej skali (od 0 do 5), gdzie 0 oznacza ujemny wynik reakcji, 1 odpowiada uwolnieniu

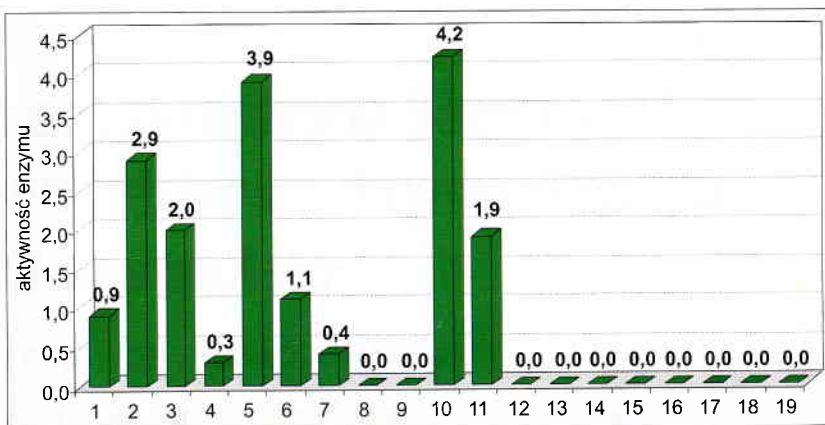
5 nanomoli, 2 – do 10 nmol, 3 – do 20 nmol, 4 – do 30 nmol, 5 – 40 nmol i więcej enzymu.

Wyniki i omówienie

Z klinicznej postaci *mastitis* pochodziło 41,4% grzybów drożdżopodobnych i 59,4% alg, a z podklinicznych przypadków odpowiednio 58,6% i 40,6%. Drożdżaki należały do gatunków: *Candida krusei*, *C. kefir*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. catenulata*, *C. lipolytica*, *Trichosporon cutaneum*, *Rhodotorula rubra*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, oraz *Geotrichum sp.* Najczęściej izolowano 4 gatunki wymienione w pierwszej kolejności. Wszystkie wyizolowane algi należały do gatunku *Prototheca zopfii*.

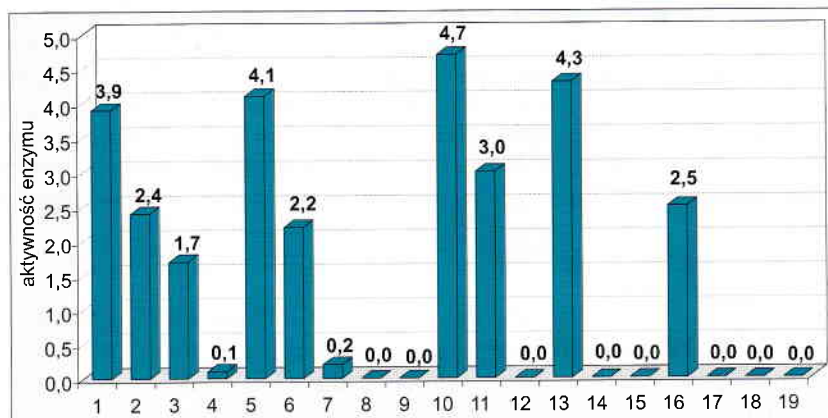
Aktywność enzymatyczną badanych drobnoustrojów przedstawiono na ryc. 1-4. Wśród grzybów drożdżopodobnych nie stwierdzono aktywności trypsyny, chymotrypsyny, α -galaktozydazy, β -glukuronidazy, α -mannozydazy i α -fukozydazy. Poszczególne gatunki wykazywały znaczne zróżnicowanie pod względem liczby i aktywności uwalnianych hydrolaz. U *C. krusei* (ryc. 1) najwyższą aktywność miała fosfataza kwaśna i arylamidaza leucynowa. Izolaty *C. kefir* (ryc. 2) charakteryzowała bardzo wysoka aktywność fosfatazy kwaśnej, arylamidazy leucynowej i fosfatazy zasadowej. Gatunek ten jako jedyny wydzielal β -galaktozydazę. Podobny wzór aktywności jak *C. krusei* wykazała *C. rugosa*. Różnica dotyczyła tylko wyższej u tego gatunku aktywności fosfatazy zasadowej. U szczepów *C. famata* (ryc. 3) obserwowano wysoką aktywność arylamidazy leucynowej, fosfatazy kwaśnej i α -glukozydazy. *C. parapsilosis* cechowała się wysoką aktywnością fosfatazy kwaśnej, arylamidazy leucynowej i fosfatazy zasadowej. Wśród izolatów *C. glabrata* najwyższą aktywność miały fosfataza kwaśna i arylamidaza leucynowa. Gatunek ten, jako jedyny, nie wykazał aktywności fosfatazy zasadowej. *Geotrichum sp.* cechowała niska aktywność badanych enzymów, najwyższa dotyczyła arylamidazy leucynowej, esterazy, a najniższa lipazy. Najwyższa aktywność hydrolityczna wszystkich szczepów grzybów dotyczyła arylamidazy leucynowej, fosfatazy kwaśnej, esterazy, lipazy esterazowej i fosfatazy zasadowej. Odnotowano niską aktywność lipazy, arylamidazy cystynowej, β -galaktozydazy i N-acetylo- β -glukozylamidazy.

Głony z rodzaju *Prototheca* (ryc. 4) wykazały aktywność 6 spośród 19 enzymów hydrolitycznych. Najwyższą aktywnością cechowała się fosfataza kwaśna i fosfohydrolaza naftolowa. Aktywność enzymatyczna grzybów i alg wyizolowanych z klinicznych i podklinicz-



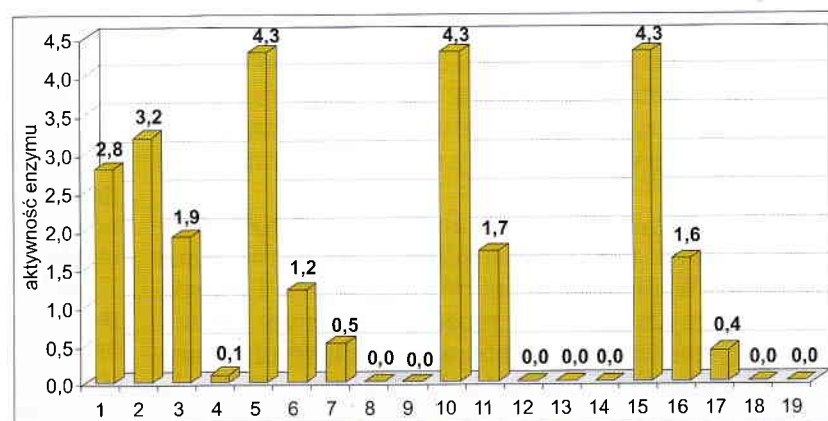
Ryc. 1. Aktywność enzymatyczna *C. krusei*

Objaśnienia: 1 – fosfasada zasadowa, 2 – esteraza, 3 – esteraza lipazowa, 4 – lipaza, 5 – arylamidaza leucynowa, 6 – arylamidaza walinowa, 7 – arylamidaza cystynowa, 8 – trypsyna, 9 – chymotrypsyna, 10 – fosfataza kwaśna, 11 – fosfohydrolaza, 12 – α -galaktozydaza, 13 – β -galaktozydaza, 14 – β -glukuronidaza, 15 – α -glukozydaza, 16 – β -glukozydaza, 17 – N-acetyl- β -glukozaminidaza, 18 – α -mannozydaza, 19 – α -fukozydaza



Ryc. 2. Aktywność enzymatyczna *C. kefir*

Objaśnienia: jak w ryc. 1.

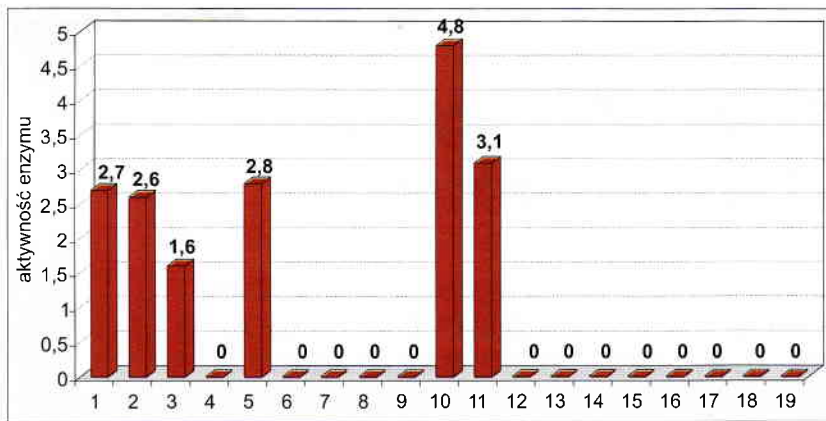


Ryc. 3. Aktywność enzymatyczna *C. famata*

Objaśnienia: jak w ryc. 1.

nych postaci *mastitis* nie różniła się statystycznie ($p > 0,05$).

Niewiele jest doniesień dotyczących aktywności enzymatycznej grzybów drożdżopodobnych, izolowanych z przypadków chorób zwierząt. Istniejące badania obejmują swym zakresem drożdżaki (głównie *C. albicans*) wyhodowane od ludzi z różnymi schorzeniami. Wyniki



Ryc. 4. Aktywność enzymatyczna *Prototheca zopfii*

Objaśnienia: jak w ryc. 1.

Białasiewicz i wsp. (2) wskazują, że liczba hydrolaz i ich aktywność zależna jest od gatunku grzybów drożdżopodobnych. Różnice w aktywności enzymatycznej wykazały grzyby pleśniowe i dermatofity (3, 20-22, 24) *Cryptococcus* (6) oraz drożdżaki z rodzaju *Candida* (2, 8, 9). Duży wpływ na liczbę produkowanych enzymów i ich aktywność ma skład zastosowanego podłoża, a także rodzaj grzyba i jego pochodzenie. Najwyższą aktywność enzymatyczną obserwowano na podłożu Sabouraud i keratynowym. Stwierdzono także zależność liczby i aktywności uwalnianych enzymów od miejsca izolacji i typu schorzenia (7, 14, 20). Aktywność enzymatyczna szczepu wzorcowego *C. albicans* była niższa niż szczepów wyizolowanych od chorych (2). Izolaty kliniczne charakteryzowały się aktywnością 16 spośród 19 badanych hydrolaz, a ich aktywność skorelowana była z liczbą miejsc występowania *C. albicans* w organizmie chorego (1). Enzymy wytwarzane przez grzyby *Malassezia pachydermatis* izolowane od zdrowych psów cechowały się niższą aktywnością niż szczepy od psów chorych na zapalenie przewodu słuchowego (10). Statystycznie istotne różnice stwierdzono tylko w przypadku lipazy esterazowej, arylamidazy cystynowej i esterazy. Fosfataza zasadowa i β -glukozydaza wykazały natomiast niższą aktywność wśród szczepów pochodzących z przypadków chorobowych. Podobne rezultaty badań aktywności enzymatycznej izolatów *Malassezia ssp.* pochodzących od psów i kotów uzyskali inni autorzy (19). Obserwacje własne nie potwierdziły wyższej aktywności enzymatycznej grzybów drożdżopodobnych izolowanych z przypadków *mastitis clinica* w stosunku do drobnoustrojów stanowiących przyczynę zapaleń podklinicznych. Różnice stwierdzone w aktywności fosfatazy kwaśnej, esterazy i arylamidazy leucynowej nie były bowiem istotne statystycznie.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji na temat aktywności enzymatycznej glonów z rodzaju *Prototheca*, z wyjątkiem wcześniej opublikowanych badań własnych (18).

Z przeprowadzonych badań wynika, że grzyby i algi różnią się liczbą i aktywnością uwalnianych enzymów hydrolitycznych. Daje to podstawę do sugestii, że badanie aktywności enzymatycznej może być przydatne do

różnicowania gatunkowego grzybów drożdżopodobnych i alg.

Piśmiennictwo

1. Batura-Gabryel H.: Wieloogniskowe występowanie grzybów z rodzaju *Candida* u chorych na POChP a ich aktywność hydrolityczna. *Mikol. Lek.* 2002, 9, 13-16.
2. Białasiewicz D., Głowacka A., Kurnatowska A.: Aktywność wybranych enzymów hydrolitycznych u grzybów z różnych rodzajów. *Mikol. Lek.* 1995, 2, 83-88.
3. Brasch J., Zaldua M.: Enzyme patterns of dermatophytes. *Mycoses* 1994, 37, 11-16.
4. Corbellini L. G., Dreimeier D., Cruz C., Dias M. M., Ferreira L.: Bovine mastitis due to *P. zopfii*. Clinical, epidemiological and pathological aspects in a Brazilian dairy herds. *Trop. Anim. Health Prod.* 2001, 33, 463-470.
5. Costa E. O., Ribeiro A. R., Watanabe E. T., Pardo R. B., Silva J. B., Sanchez R. B.: An increased of mastitis caused by *Prototheca* species and *Nocardia* species on farm in Sao Paulo, Brasil. *Vet. Res. Commun.* 1996, 20, 237-241.
6. Garcia-Martos P., Marin P., Hernandez-Molina J. M., Garcia-Agudo L., Mira A., Mira J.: Extracellular enzymatic activity in 11 *Cryptococcus* species. *Mycopathologia* 2000, 150, 1-4.
7. Krajewska-Kulak E., Łukaszuk C., Niczyporuk W., Trybuła J., Szczurzewski M.: Enzymatic biotypes of yeast-like fungi strains and their susceptibilities to antimycotics isolated from ontocenosis of the urogenital system. *Mikol. Lek.* 2002, 9, 67-74.
8. Krajewska-Kulak E., Łukaszuk C., Niczyporuk W., Trybuła J.: Ocena aktywności wybranych enzymów hydrolitycznych grzybów drożdżopodobnych z gatunku *Candida* izolowanych z ontocenozy cewki moczowej. *Mikol. Lek.* 1998, 5, 165-170.
9. Krajewska-Kulak E., Niczyporuk W., Karczewski J., Zlotkowski W.: Ocena aktywności wybranych enzymów hydrolitycznych u grzybów drożdżopodobnych z gatunku *Candida* przy użyciu testu API ZYM. *Mikol. Lek.* 1997, 4, 147-152.
10. Król J., Staroniewicz Z.: Ocena aktywności enzymatycznej grzybów drożdżopodobnych *Malassezia pachydermatis* izolowanych od psów. *Mikol. Lek.* 2000, 7, 7-12.
11. Krukowski H., Tietze M., Majewski T., Różański P.: Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farms in the Lublin region, Poland. *Mycopathologia* 2000, 150, 5-7.
12. Krukowski H.: Zapalenia wymienia na tle grzybiczym u krów. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 18-20.
13. Kurnatowska A. J., Kurnatowski P.: Biotypes of fungi isolated from patients with oral cavity diseases. *Mikol. Lek.* 1998, 5, 213-217.
14. Kurnatowska A. J.: Activity of hydrolytic enzymes of *Candida albicans* strains isolated from patients with periodontal and membrane mucosae of oral cavity diseases. *Mycopathologia* 1998, 141, 105-109.
15. Lagneau P. E., Lebtahi K., Swinne D.: Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia* 1996, 135, 99-102.
16. Malinowski E., Kłossowska A., Kaczmarowski M., Kotowski K., Nadobny M., Kuźma K.: Stan zdrowotny gruczołu mlekowego krów i czynniki etiologiczne mastitis w przypadkach wysokiej liczby komórek somatycznych w mleku zbiorczym. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 128-132.
17. Malinowski E., Kłossowska A., Krukowski H., Lesiak M., Janiak K.: Zdrowotność wymion i czynniki etiologiczne mastitis w gospodarstwach położonych w różnych regionach kraju. *Medycyna Wet.* 1992, 48, 216-218.
18. Malinowski E., Lassa H., Kłossowska A.: Isolation of *Prototheca zopfii* from inflamed secretion of udder. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2002, 46, 295-299.
19. Mancianti F., Rum A., Nardoni S., Corazza M.: Extracellular enzymatic activity of *Malassezia ssp.* isolates. *Mycopathologia* 2000, 149, 131-135.
20. Nowicki R., Korting H. Ch.: Różnice w aktywności enzymatycznej dermatofitów. *Mikol. Lek.* 1995, 2, 209-213.
21. Nowicki R.: Aktywność enzymatyczna dermatofitów. *Przegl. Dermatol.* 1995, 82, 32-37.
22. Nowicki R.: Enzymy uwalniane przez dermatofity dominujące w rejonie Gdańska. *Przegl. Dermatol.* 1995, 82, 38-48.
23. Pengov A.: Significance of bovine mycotic mastitis. Reports of the III Middle-European Congress for Buiatrics, Health problems in ruminants. Milovy, Czech Republic 2001, s. 105-107.
24. Plomber-Niezgoda E., Baran E.: Ocena aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych wybranych grzybów pleśniowych. *Mikol. Lek.* 1997, 4, 141-145.
25. Sysło J., Macura A. B.: Badania nad niektórymi determinantami patogenności u grzybów z rodzaju *Candida*. *Mikol. Lek.* 1998, 5, 149-155.
26. Wawron W.: Grzybicze zapalenia wymienia u krów – problem terapii wciąż aktualny. *Mat. Międzynarodowej Sesji Naukowej: Zaburzenia w rozrodzie zwierząt wysokoprodukcyjnych. Polanica Zdrój* 2003, s. 152-161.