

Porównanie aktywności enzymów hydrolitycznych grzybów drożdżopodobnych izolowanych z przypadków mastitis u krów

HENRYK KRUKOWSKI, ANDRZEJ LISOWSKI, MAGDALENA DOBROWOLSKA

Katedra Higieny Zwierząt i Środowiska, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt,
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Krukowski H., Lisowski A., Dobrowolska M.

Comparison of hydrolytic enzymes activity in the yeast-like fungi isolated from mastitis in cows

Summary

The aim of this study was to compare the activity of hydrolytic enzymes in yeast-like fungi isolated from cows with clinical and subclinical forms of mastitis. The study included 91 strains of fungi of the genera *Candida*, *Trichosporon* and *Geotrichum* isolated from cows with fungal inflammations of the udder. Fungal colonies were identified by the API 20 C AUX test (bioMerieux) and the APIWEB computer program (bioMerieux). The yeast enzyme profile was determined by the API ZYM test (bioMerieux, Poland). API ZYM is a semiquantitative micromethod capable of quickly identifying 19 enzymatic reactions. Leucine arylamidase showed the highest enzyme activity. High enzymatic activity was also shown by acid phosphatase XI, and the average activity was shown by esterase, esterase lipase, and α -glucosidase. Minimal activity (or none) was shown by α -fukosidase, α -mannosidase, β -glucuronidase, both galactosidases (α and β), α -chymotrypsin and trypsin. Our study demonstrated statistically significant differences in esterase activity between the *Candida* and the *Trichosporon* and between the *Candida* and the *Geotrichum* genera, in lipase esterase activity between the *Trichosporon* and fungi of the *Candida* and the *Geotrichum* genera, in β -galactosidase activity between the *Candida* and fungi of the *Trichosporon* and the *Geotrichum* genera, and in valine arylamidase activity between the *Geotrichum* and the *Candida* types. Yeast-like fungi produce a large number of enzymes that affect the course of a fungal infection. Enzyme activity can therefore disrupt the fungus-udder balance in favor of the fungus.

Keywords: mastitis, yeast, API ZYM, milk, cow

Zarówno grzyby żyjące w środowisku zewnętrznym, jak i zasiedlające organizm produkują pozakomórkowe enzymy, których zadaniem jest rozkład makrocząsteczek (węglowodanów, białek, lipidów) do prostych związków, łatwo transportowanych do wnętrza komórki. W organizmie żywiciela aktywność wydzielanych enzymów zwraca się przeciwko komórkom i tkankom gospodarza, służąc pozyskiwaniu substancji odżywczych, inwazji i rozprzestrzenianiu się grzybów w tkankach. Enzymami, które odgrywają największą rolę w chorobotwórczości grzybów *Candida* są proteazy i fosfolipazy (16). Drożdżaki wydzielają też enzymy hydrolityczne, które rozkładają związki wielocząsteczkowe – wielocukry, białka, lipidy i węglowodory (1, 2, 15, 19).

Infekcje gruczołu mlekowego krów wywoływane przez grzyby są coraz częściej opisywane ze względu na ich nasilające się występowanie. Czynnikiem etiologicznym *mastitis mycotica* są głównie grzyby drożdżopodobne, stąd choroba ta jest często określana jako drożdżycowe zapalenie wymienia (yeast mastitis). Do najczęściej izolowanych należą drożdżaki z rodzaju: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* i *Trichosporon*, jednakże grzyby z rodzaju *Cryptococcus* zdają się wymagać łagodniejszych warunków klimatycznych (20). W krajach tropikalnych przyczyną grzybiczych stanów zapalnych tamtejszego bydła są także grzyby pleśniowe z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoccum* i *Phoma*. Jest to szczególnie niebezpieczne, ponieważ produkują one mikotoksyny, które są odporne na pasteryzację (3-5, 13, 14, 18). W naszym klimacie za grzybicze zapalenia wymion odpowiedzialne są głównie drożdżaki z rodzaju *Candida*. Jako przyczynę zapalenia stwierdzono je w 95,5% przypadków (20).

Celem badań było porównanie aktywności enzymów hydrolitycznych grzybów drożdżopodobnych izolowanych od krów z kliniczną i podkliniczną postacią *mastitis*.

Materiał i metody

Badaniami objęto 91 szczepów grzybów z rodzaju *Candida*, *Trichosporon* i *Geotrichum* wyizolowanych od krów z grzybiczym zapaleniem wymienia. Rozpoznanie *mastitis mycotica* przeprowadzono na podstawie badań klinicznych wymienia, makroskopowych mleka, liczby komórek somatycznych w mleku oraz badań mikrobiologicznych próbek mleka ćwiartkowego. Grzyby identyfikowano na podstawie jednolitego wzrostu na podłożu Sabourauda i czystego jednolitego wzrostu na podłożu agarowym z 5% krwią baranią (przy jednoczesnym braku wzrostu na podłożach McConkeya i Edwards-Chodkowskiego). Wyrosłe kolonie grzybów z podłoża agarowego z krwią i podłoża Sabourauda barwiono metodą Grama i oceniano pod mikroskopem. Następnie kolonie identyfikowano do poziomu gatunku testem API 20 C AUX (bioMérieux) i programem komputerowym APIWEB (bioMérieux). Aktywność enzymatyczną określano za pomocą testów API ZYM (bioMérieux), zawierających substraty do wykrycia 19 hydrolaz: II fosfatazy zasadowej, III esterazy, IV lipazy esterazowej, V lipazy C14, VI arylamidazy leucynowej, VII arylamidazy walinowej, VIII arylamidazy cystynowej, IX tripsyny, X α -chymotrypsyny, XI fosfatazy kwaśnej, XII Naftolu-AS-BI-fosfohydrolazy, XIII α -galaktozydazy, XIV β -galaktozydazy, XV β -glukuronidazy, XVI α -glukozydazy, XVII β -glukozydazy, XVIII N-acetylo- β -glukozyloamidazy, XIX α -mannozydazy oraz XX α -fukozydazy. Przy ich oznaczaniu postępowano ściśle z zaleceniami producenta. Z 24-godzinnych

hodowli szczepów *Candida* przy użyciu densytometru przygotowywano w wodzie destylowanej zawiesinę o gęstości 5 stopni w skali McFarlanda. Odpowiednią ilość tej zawiesiny (65 mikrolitrów) przenoszono do kapsułek pasków API ZYM, które inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°C. Po inokulacji dodawano po 1 kropli ZYM A oraz ZYM B i pozostawiano na kilka minut w temperaturze pokojowej. Aktywność enzymów określano w nanomolach hydrolizowanego substratu według intensywności reakcji barwnej. Zgodnie z zaleceniem producenta stosowano skalę 5-stopniową (od 0 do 5 stopni): 0 – 0 nanomoli, 1 – 5 nanomoli, 2 – 10 nanomoli, 3 – 20 nanomoli, 4 – 30 nanomoli i 5 – powyżej 40 nanomoli.

Wyniki poddano analizie statystycznej, obliczając średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. Istotność różnic sprawdzono testem Tukeya (program SAS v. 9.1.3, 2003 r.). Wyniki zestawiono w tabelach.

Wyniki i omówienie

Powszechnie uważa się, że zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne wydzielane zarówno przez dermatofity, drożdżaki, jak i grzyby pleśniowe są ważnym elementem w patomechanizmie infekcji. Enzymy te katalizują między innymi reakcje hydrolizy wiązań C-O, C-N, C-C, ułatwiając inwazję grzyba do tkanek, a z drugiej strony mogą stymulować na drodze immunologicznej procesy zapalne ograniczające infekcje (17). Niewiele jest opublikowanych wyników

Tab. 1. Aktywność enzymatyczna (punkty) grzybów wyizolowanych z gruczołu mlekowego krów ($\bar{x} \pm SD$)

Enzym	Rodzaj grzybów					
	<i>Candida</i> (n = 80)		<i>Trichosporon</i> (n = 6)		<i>Geotrichum</i> (n = 5)	
I kontrola	-	-	-	-	-	-
II fosfataza zasadowa	1,09	0,86	0,83	0,75	0,60	0,55
III esteraza	3,74	0,76	2,83	0,75	2,80	0,45
IV lipaza esterazowa	2,94	0,58	2,17	0,41	3,00	0,71
V lipaza C14	0,75	0,62	0,67	0,52	1,40	1,14
VI arylamidaza leucynowa	4,88	0,33	5,00	0,00	5,00	0,00
VII arylamidaza walinowa	2,49	0,76	3,00	0,63	3,40	1,14
VIII arylamidaza cystynowa	2,11	0,95	2,83	0,41	3,00	1,22
IX tripsyna	0,00	-	0,00	-	0,00	-
X α -chymotrypsyna	0,00	-	0,00	-	0,00	-
XI fosfataza kwaśna	4,10	0,79	4,50	0,84	3,80	1,10
XII Naftolu-AS-BI-fosfohydrolaza	2,21	0,96	1,83	1,17	2,40	1,67
XIII α -galaktozydaza	0,00	-	0,00	-	0,00	-
XIV β -galaktozydaza	0,89	1,49	0,00	-	0,00	-
XV β -glukuronidaza	0,00	-	0,00	-	0,00	-
XVI α -glukozydaza	2,85	2,38	3,17	2,14	0,80	1,10
XVII β -glukozydaza	1,83	1,57	2,17	1,17	0,20	0,45
XVIII N-acetylo- β -glukozyloamidaza	1,01	1,27	0,33	0,82	1,40	1,67
XIX α -mannozydaza	0,21	0,44	0,00	-	0,00	-
XX α -fukozydaza	0,24	0,48	0,00	-	0,00	-

badania dotyczących aktywności enzymatycznej grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych od zwierząt (8, 12, 21). Większość opracowań dotyczy bowiem aktywności enzymatycznej hydrolaz grzybów z rodzaju *Candida* (głównie *Candida albicans*) wyizolowanych od ludzi (1, 7, 9-11, 17). W niniejszych badaniach aktywność enzymatyczną drożdżaków oceniono przy użyciu testu API ZYM firmy bioMérieux, ponieważ – zdaniem Plomer-Niezgody i wsp. (17) – wielu autorów potwierdziło przydatność tego testu do oznaczeń zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych uwalnianych przez rozmaite patogenne grzyby. Z przeprowadzonych badań własnych wynika, że największą aktywność wykazywała arylamidaza leucynowa. Wysoką aktywnością charakteryzował się też enzym XI fosfataza kwaśna, średnią aktywność wykazywały: esteraza, lipaza esterazowa i α -glukozydaza. Brak aktywności (lub minimalną) stwierdzono w przypadku: α -fukozydazy,

Tab. 2. Różnice statystyczne dla czterech enzymów w testach API ZYM wyliczone testem RIR Tukeya

Rodzaj grzybów	Enzym/rodzaj grzybów		
	<i>Candida</i> M = 3,73	<i>Trichosporon</i> M = 2,83	<i>Geotrichum</i> M = 2,80
<i>Candida</i>	X	0,014*	0,021*
<i>Trichosporon</i>	0,014*	X	0,99
<i>Geotrichum</i>	0,021*	0,99	X
IV lipaza esterazowa			
<i>Candida</i> M = 2,93	<i>Trichosporon</i> M = 2,16	<i>Geotrichum</i> M = 3,0	
<i>Candida</i>	X	0,006*	0,97
<i>Trichosporon</i>	0,006*	X	0,05*
<i>Geotrichum</i>	0,97	0,05*	X
VII arylamidaza walinowa			
<i>Candida</i> M = 2,48	<i>Trichosporon</i> M = 3,0	<i>Geotrichum</i> M = 3,4	
<i>Candida</i>	X	0,269	0,033*
<i>Trichosporon</i>	0,269	X	0,67
<i>Geotrichum</i>	0,033*	0,67	X
XIV β-galaktozydaza			
<i>Candida</i> M = 0,89	<i>Trichosporon</i> M = 0,00	<i>Geotrichum</i> M = 0,00	
<i>Candida</i>	X	0,03*	0,03*
<i>Trichosporon</i>	0,03*	X	0,99
<i>Geotrichum</i>	0,03*	0,99	X

Objaśnienie: * istotność przy $p < 0,05$

α-mannozydazy, β-glukuronidazy, obu galaktozydaz (α oraz β), α-chymotrypsyny i trypsyny. Uzyskane wyniki są zgodne z wynikami wymienionych wcześniej autorów (12, 21), a także z wynikami badań grzybów izolowanych od ludzi, u których także wykazano najwyższą aktywność lipazy esterazowej, arylamidaz, esterazy i fosfatazy kwasnej (7, 11). Jednakże uzyskane w niniejszych badaniach aktywności enzymatyczne mierzone w skali 0-5 były wyższe niż u ludzi (7, 11), ale zbliżone do wyników aktywności enzymatycznej grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych od krów z mastitis (8, 12, 21). W badaniach własnych wykazano ponadto istotne statystycznie różnice w aktywności esterazy między grzybami z rodzaju *Candida* a *Trichosporon* i *Geotrichum*, lipazy esterazowej między grzybami z rodzaju *Trichosporon* a grzybami z rodzaju *Candida* i *Geotrichum*, β-galaktozydazy między *Candida* a grzybami z rodzaju *Trichosporon* i *Geotrichum* oraz arylamidazy walinowej między rodzajami *Geotrichum* i *Candida*.

W piśmiennictwie niewiele jest informacji dotyczących aktywności hydrolitycznej grzybów patogennych. Prowadzenie dalszych badań związanych z oceną ak-

tywności hydrolitycznej drożdżaków izolowanych z mastitis u krów wydaje się bardzo istotne, ponieważ spośród różnych determinant patogeniczności tych drobnoustrojów do najważniejszych należy aktywność enzymatyczna, grzyby drożdżopodobne wytwarzają bowiem dużą liczbę enzymów mających wpływ na przebieg infekcji grzybiczej. Aktywność enzymatyczna może zatem decydować o zachwianiu równowagi układu grzyb-gruczoł mlekowy na korzyść grzyba.

Piśmiennictwo

1. Anees M. M., Reich A., Hirschberg L., Watorek E., El-Shinnawi U. M., Ibrahim T. M., El-Shaarawy S., Szepietowski J. C.: Comparison of enzymatic activity between *Candida albicans* and *Candida krusei*. Mikol. Lek. 2010, 17, 7-10.
2. Anees M. M., Reich A., Hirschberg L., Watorek E., El-Shinnawi U. M., Ibrahim T. M., El-Shaarawy S., Szepietowski J.: Enhanced enzymatic activity of *Candida* species responsible for oral candidiasis in renal transplant recipients. Mycoses 2011, 54, 337-344.
3. Costa E. O., Gandra C. R., Pires M. F., Coutinho S. D., Castilho W., Teixeira C. M.: Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. Mycopathologia 1993, 124, 13-17.
4. Costa E. O., Ribeiro A. R., Watanabe E. T., Melville P. A.: Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. J. Vet. Med. B1998, 45, 65-71.
5. Ferreira L., Bangel J. J. Jr., Fernandes R. E., Costa M.: Mamite bovina fungica causada por *Aspergillus fumigatus* (Sortoya fumigata). Arq. Fac. Vet. UFRGS 1989, 17, 81-85.
6. Kadry R. M., Malak A. A., Koleaf Z. M., El-Danaf N. A.: The effect of using antimycotic drugs upon the viability of mycotoxic molds and pathogenic yeasts. Assiut Vet. Med. J. 1997, 36, 297-305.
7. 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.
8. Krukowski H., Lisowski A.: Porównanie aktywności enzymatycznej grzybów *Trichosporon* i *Geotrichum* wyizolowanych z mastitis u krów. Mikol. Lek. 2010, 17, 233-235.
9. Krutkiewicz A.: Czynniki chorobotwórczości *Candida albicans*. Mikol. Lek. 2010, 17, 134-137.
10. Krzyściak P.: Ocena aktywności enzymatycznej izolowanych od ludzi grzybów z rodzaju *Rhodotorula* wykonana testem API ZYM. Mikol. Lek. 2011, 18, 65-70.
11. Łukaszuk C., Krajewska-Kulak E., Niczyporuk W., Trybula J.: Aktywność hydrolityczna i wrażliwość na antymikotyki szczepów grzybów drożdżopodobnych izolowanych z ontocenozy cewki moczowej. Mikol. Lek. 1999, 6, 27-32.
12. Malinowski E., Lassa H., Kłosowska A., Kuźma K.: Enzymatic activity of yeast species isolated from bovine mastitis. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2001, 45, 297-305.
13. Mdegela R. H., Kusiluka L. J., Kapaga A. M., Karimuribo E. D., Turuka F. M., Bundala A.: Prevalence and determinants of mastitis and milk-borne zoonoses in smallholder dairy farming sector in Kibaha and Morogoro Districts in Eastern Tanzania. J. Vet. Med. B 2004, 51, 123-128.
14. Mehrotra P. K., Rawat M.: Mycotic agents associated with normal and mastitic udder of cows in Bikaner. Indian J. Comp. Microbiol. Immun. Infect. Dis. 1989, 10, 151-152.
15. Moqbil S., Kurnatowski P.: Secretion of hydrolytic enzymes by fungal strains, isolated from patients with malignant tumors of head and neck, before, during and after radiotherapy. Ann. Parasitol. 2012, 58, 27-35.
16. Nawrot U., Karpiewska A.: Patogeneza zakażeń wywołanych przez *Candida albicans*. Mikol. Lek. 2002, 9, 137-143.
17. Plomer-Niezgoda E., Baran E., Cisło M., Hryncewicz-Gwóźdź A., Walów B.: Badanie aktywności enzymów hydrolitycznych wybranych grzybów pleśniowych i drożdżaków przy użyciu testu API ZYM. Mikol. Lek. 1998, 5, 157-164.
18. Santos R. C., Marin J. M.: Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. Mycopathologia 2005, 159, 251-253.
19. Staniszewska M., Rabczenko D., Kurzątkowski W.: Discrimination between the enzymatic activities of *Candida albicans* pleomorphic forms determined using the api® ZYM test. Mycoses 2011, 54, 744-750.
20. Staroniewicz Z., Włodarczyk A., Florek M., Król J.: Flora grzybicza w mastitis u krów i jej wrażliwość na antymikotyki. Mikol. Lek. 2007, 14, 257-259.
21. Wawron W., Bochniarz M., Szczubiał M.: Enzymatic activity of yeasts isolated from the inflamed mammary secretion in dairy cows. Pol. J. Vet. Sci. 2011, 14, 65-68.

Adres autora: dr hab. Henryk Krukowski, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin; e-mail: henryk.krukowski@up.lublin.pl