MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2011, 63: 263 - 266

Emilia Ciok-Pater, Joanna Wróblewska, Agata Białucha, Eugenia Gospodarek

Ocena przydatności testu API ZYM i podłoża RPMI wzbogaconego w Tween 40 do wykrywania lipolitycznych enzymów *Candida sp*.

Katedra i Zakład Mikrobiologii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: dr hab. n. med. *E. Gospodarek*, prof. UMK

Ocenę przydatności testów API ZYM i podłoża RPMI wzbogaconego w Tween 40 do wykrywania enzymów lipolitycznych przeprowadzono u 40 szczepów *Candida sp*. izolowanych z krwi i moczu. Stosując podłoże RPMI wzbogacone w Tween 40 częściej wykrywano wytwarzanie lipazy u badanych drożdży niż za pomocą testów API ZYM.

W patogenności grzybów *Candida sp*. ważną rolę odgrywa aktywność enzymatyczna. Enzymy hydrolityczne wydzielane przez drożdże ułatwiają kolonizację tkanek gospodarza (7) oraz wpływają na przebieg zakażenia grzybiczego (1). Lipazy to enzymy, odgrywające ważną rolę w początkowych etapach zakażenia drożdżami rodzaju *Candida* sp. Rozkładają lipidy - niezbędne dla grzybów źródło węgla w procesie prawidłowego wzrostu i przebiegu zakażenia (1). Wykrywanie aktywności wydzielanych enzymów przez *Candida sp.* zależy od rodzaju podłoża i warunków inkubacji (7).

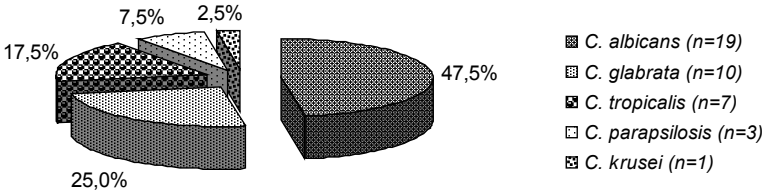
Celem pracy była ocena przydatności testu API ZYM i podłoża RPMI wzbogaconego w Tween 40 do wykrywania lipolitycznych enzymów drożdży *Candida sp*.

MATERIAŁ I METODY

Badaniem objęto 40 szczepów *Candida sp.* izolowanych z krwi (50,0%) i moczu (50,0%) od chorych Kliniki Anestezjologii i Intensywnej Terapii Szpitala Uniwersyteckiego nr 1 im. dr. A. Jurasza w Bydgoszczy.

W celu określenia przynależności izolowanych drożdży wysiewano je na agar Sabouraud (bioMérieux) i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C. Identyfikację szczepów *Candida sp*. przeprowadzono na podstawie wyników reakcji biochemicznych ujętych w testach API 20C AUX (bioMérieux), które wykonywano i odczytywano zgodnie z zaleceniami producenta. Przynależność gatunkową badanych izolatów przedstawiono na rycinie 1.

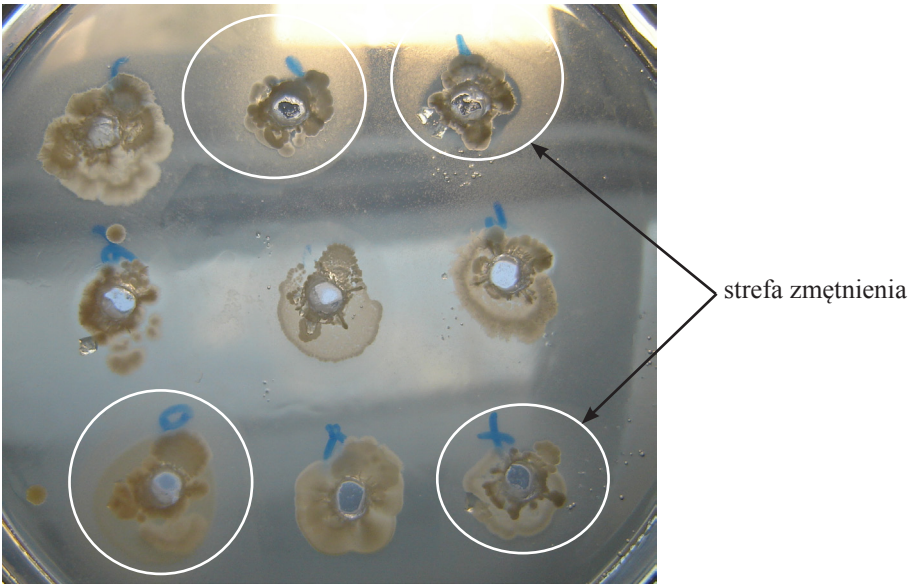
Zdolność do wytwarzania enzymów lipolitycznych oceniano testem API ZYM (bioMérieux) oraz według metody *Burbianka* i wsp. (6) polegającej na ocenie stref zmętnienia wokół kolonii drożdży na podłożu RPMI (Sigma Aldrich) wzbogaconym w 1% roztwór Tweenu 40 (ester kwasu palmitynowego) (Sigma Aldrich) (fot.1). Z 24 - godzinnej hodowli



Rycina 1. Przynależność gatunkowa badanych szczepów *Candida sp*. (n=40)

grzybów na podłożu Sabourauda, przygotowywano zawiesinę o gęstości 1,5 według skali McFarlanda. Po 10 µl zawiesiny badanych szczepów grzybów przenoszono do studzienek ze wzbogaconym podłożem RPMI i inkubowano w temperaturze 37°C przez 7 dni. Kontrolę stanowiły te same szczepy posiane na RPMI bez dodatku Tweenu 40.

WYNIKI



Rycina 2. Przykład wytwarzania lipazy na podłożu RPMI wzbogaconym w Tween 40

Lipolityczne właściwości badanych szczepów przedstawiono w tabeli I. Aktywność lipolityczną na podłożu RPMI wzbogaconym w Tween 40 wykazało 16 (78,9%) szczepów *C. albicans* i 17 (80,7%) szczepów gatunków innych niż *C. albicans*. Stosując testy API ZYM wytwarzanie lipazy stwierdzono u czterech (21,1%) szczepów *C. albicans* oraz u dwóch szczepów *C. tropicalis* i jednego szczepu *C. glabrata*.

Tabela I. Lipolityczne właściwości szczepów *Candida sp*. (n=40)

Gatunek	Wytwarzanie lipazy			
	Test API ZYM		Podłoże RPMI wzbogacone w Tween 40	
	n	%	n	%
C. albicans (n=19)	4	21,1	16	78,9
Gatunki inne niż *C. albicans*				
C. glabrata (n=10)	1	4,7	9	42,8
C. tropicalis (n=7)	2	9,4	5	23,8
C. parapsilosis (n=3)	0	0,0	2	9,4
C. krusei (n=1)	0	0,0	1	4,7
Ogółem (n=21)	3	14,1	17	80,7

DYSKUSJA

Aktywność enzymatyczna odgrywa ważną rolę w patogenności grzybów rodzaju *Candida* (2). W pierwszym etapie zakażenia enzymy hydrolityczne (np. lipaza) sprzyjają dostarczaniu grzybom niezbędnego węgla (4, 5).

Wielu autorów potwierdziło przydatność testu API ZYM do oznaczania enzymów zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez grzyby (3, 8, 9).

Na podstawie przeprowadzonej oceny aktywności enzymatycznej z zastosowaniem testów API ZYM, stwierdzono 35,2% szczepów wydzielających lipazę. Zdolność ta była wyrażona częściej wśród szczepów *C. albicans* (21,1%) w porównaniu do szczepów gatunków innych niż *C. albicans* (14,1%).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono publikacji, których autorzy stosowali podłoże RPMI wzbogacone w Tween 40 do oceny zdolności wydzielania enzymów hydrolitycznych przez *Candida sp*. Podłoże RPMI jest bogatym w substancje odżywcze podłożem wzrostowym.

W niniejszej pracy stwierdzono zróżnicowaną zdolność wytwarzania lipazy przez poszczególne gatunki *Candida sp.* Za pomocą testu API ZYM badany enzym częściej wytwarzały szczepy *C. albicans*. W przypadku zastosowania podłoża RPMI wzbogaconego w Tween 40 zdolność ta wyrażona była w porównywalnych odsetkach odpowiednio; 78,9% szczepy *C. albicans* i 80,7% gatunki inne niż *C. albicans*. Z badań własnych wynika, że podłoże RPMI wykazywało wyższą przydatność w ocenie wytwarzania lipazy w porównaniu z testami API ZYM.

Prawdopodobnie na uzyskane wyniki mógł mieć wpływ rodzaj podłoża oraz pochodzenie badanych szczepów. Wszystkie badane szczepy pochodziły od chorych hospitalizowanych. Zastosowanie innych pożywek wzbogaconych w szereg substancji odżywczych i wzbogaconych w lipidy, pozwoliłoby na ujawnienie wyższego odsetka szczepów wydzielających enzymy hydrolityczne. W przyszłości należałoby podjąć próbę oceny wytwarzania lipazy i innych enzymów zewnątrzkomórkowych z rozszerzeniem o podłoża wzbogacone na tej samej grupie badanych szczepów *Candida sp*.

WNIOSKI

1. Zastosowanie podłoża RPMI wzbogaconego w Tween 40 pozwoliło na częstsze wykrycie wytwarzania lipazy przez badane szczepy drożdży *Candida sp*. niż za pomocą testów API ZYM.

2. Uzyskane wyniki potwierdzają większą przydatność podłoża RPMI wzbogaconego w Tween 40 do wykrywania enzymów lipolitycznych drożdży *Candida sp*. niż testów API ZYM.

Ciok-Pater E, Wróblewska J, Białucha A, Gospodarek E

Evaluation of the API ZYM system and RPMI agar plates supplemented with Tween 40 for detection of lipolytic enzymes of *Candida* spp.

SUMMARY

Lipolytic activity of 40 strains of *Candida* spp. was tested on API ZYM system and on RPMI agar plates supplemented with 1% Tween 40. Lipolytic activity was indicated by opaque zones around the inoculum cylindrical holes were punched in the medium. Clearing of the medium around the bacterial colonies indicated that an isolate produce lipase. Only 4 (21.1%) strains of *C. albicans*, and 3 (14.1%) strains of non-*C. albicans* which hydrolyzed 2-naftylomirystylan by use of the API ZYM system was observed. In contrast, 16 (78.9%) strains of *C. albicans* and 17 (80.7%) strains of non-*C. albicans* produced lipases on the agar plate using RPMI agar plates supplemented with 1.0% Tween 40. Determination of lipase activities with the API ZYM system were in no agreement with lipase tests in RPMI supplemented with Tween 40. Our study verify greater usefulness of RPMI supplemented with Tween 40 for detection of lipolytic enzymes of *Candida* species in comparison to the API ZYM.

PIŚMIENNICTWO

1. *Batura-Gabryel H.* Niektóre aspekty patogenezy kandydozy. Mikol Lek 1999, 6, 113-8
2. *Batura-Gabryel H, Brajer B, Kuźnia-Kamińska B.* Biotypy enzymatyczne grzybów z rodzaju *Candida albicans* wyizolowanych od chorych na przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (Poch.). Mikol Lek, 2003, 10, 243-8
3. *Bernhardt H, Zimmermann K, Knoke M, Schwesinger G.* Enzymatic activities of *Candida albicans* strains from different locations. Mycose 1991, 34 69-71
4. *Białasiewicz D, Głowacka A, Kurnatowska AQ.* Aktywność wybranych enzymów hydrolitycznych u grzybów z różnych rodzin. Mikol Lek 1996, 2 83-8
5. *Brasch J, Zaldua M.* Enzyme patterns of dermatophytes. Mycoses 1994, 37 11-16
6. *Burbianka M*, *Pliszka A*, *Burzyńska S*. Mikrobiologia żywności. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 1983
7. *Krajewska-Kułak E, Łukaszuk C, Niczyporuk W, Trybuła J*. Ocena aktywności enzymów hydrolitycznych szczepów grzybów drożdzopodobnych izolowanych z ontocrentozy narządów moczowopłciowych. Mikol Lek 1998, 5 227-34
8. *Kurnatowska A, Kurnatowski P.* Metody diagnostyki laboratoryjnej stosowane w mikologii. Wiadomości Parazytologiczne 2008, 54 177-85
9. *Plomer-Niezgoda E, Baran E, Cisło M, Hryncewicz-Gwóźdź A, Walów B.* Badanie aktywności enzymów hydrolitycznych wybranych grzybów pleśniowych i drożdzy przy użyciu testu API ZYM. Mikol Lek 1999, 6 27-32

Otrzymano: 27 VII 2011 r.

Adres Autora: 85-094 Bydgoszcz, ul. M. Curie-Skłodowskiej 9, Katedra i Zakład Mikrobiologii,
Collegium Medicum im. Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu