

## PŘEVÁŽÍ VÝHODY RODU *CANDIDA* SILNOU PATOGENITU NĚKTERÝCH DRUHŮ?

PETRA KAŠPAROVÁ, OLGA MAŽÁTKOVÁ  
a ALENA ČEJKOVÁ

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-  
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6  
kasperop@vscht.cz

Došlo 1.2.19, přijato 22.2.19.

Klíčová slova: *Candida*, patogenita, virulence,  
biotechnologie, průmysl, odpad

### Obsah

1. Úvod
  - 1.1. Charakteristika rodu
  - 1.2. Morfologie a fyziologie
  - 1.3. Metabolismus
2. Využití v průmyslu
  - 2.1. Tradiční biotechnologie
    - 2.1.1. Vinařství
    - 2.1.2. Pivovarství
    - 2.1.3. Zpracování odpadů a produkce organických látek
  - 2.2. Rekombinantní technologie
3. Patogenita
  - 3.1. Tvorba biofilmu
  - 3.2. Virulenční faktory
  - 3.3. Rezistence vůči antibiotikům
4. Závěr

### 1. Úvod

Když se řekne slovo *Candida*, většina mikrobiologů a biotechnologů si okamžitě vybaví patogenní rod kvasinek známý pro své invazivní i chronické infekce lidského organismu. Není překvapující, že tento rod v čele s nejznámějším druhem *C. albicans* budí ve většině lidí značný respekt. Schopnost velkého množství zástupců rodu *Candida* růst při fyziologické teplotě 37 °C skutečně předpovídá jejich značný virulentní potenciál. Obavy však v mnoha případech nejsou na místě, jelikož kromě patogenních druhů existuje mnoho zástupců rodu *Candida*, které díky svým unikátním metabolickým vlastnostem získaly významné uplatnění v různých oblastech průmyslu, ať už se jedná o tradiční biotechnologie nebo využití pro produkci léčiv či kosmetických přípravků. Široké spek-

trum substrátů, které jsou tyto druhy schopné využít, z nich činí atraktivní mikroorganismy pro zpracování odpadů či degradaci přírodního znečištění. Jejich schopnost růst na různých nestandardních sacharidech a v mnoha případech i schopnost je zkvašovat za vzniku ethanolu vedla k hypotézám, zda by se tyto druhy nedaly využít i v pivovarství nebo ve vinařství. Tato práce se proto bude podrobně zabývat využitím rodu *Candida* v průmyslu a zhodnocením patogenity tohoto rodu a různých rizik při jeho použití.

#### 1.1. Charakteristika rodu

Rod *Candida* taxonomicky vznikl v roce 1923. Prvních devět zástupců tohoto rodu bylo původně řazeno pod rod *Monilia*, ze kterého byly později na základě fenotypové odlišnosti přesunuty do zcela nové skupiny mikroorganismů<sup>1</sup>. Rod *Candida* patří mezi askomycety a jeho taxonomické zařazení je znázorněno v tabulce I. Název tohoto rodu byl odvozen z latinského *candidus*, což znamená bílý. Toto jméno bylo pravděpodobně zvoleno na základě absence pigmentů v buňkách těchto mikroorganismů<sup>2</sup>. Od vzniku rodu *Candida* bylo do této skupiny zařazeno již kolem 200 druhů rozličných vlastností, z nichž mnohé našly využití v průmyslu, anebo je jejich druhové jméno silně spojeno s patogenezi<sup>1</sup>.

#### 1.2. Morfologie a fyziologie

Kvasinky rodu *Candida* mají převážně jednobuněčné eukaryotické buňky oválného, elipsoidního až silně protáhleho tvaru o velikosti přibližně 1–8 × 1–6 μm (cit.<sup>1</sup>). Některé druhy mohou tvořit pseudomycelium či pravé mycelium a pro některé je charakteristický dimorfní charakter, kdy mají jejich buňky buď oválný tvar a vyskytují se jednotlivě anebo tvoří (pseudo)mycelium<sup>3</sup>. *Candida* je anamorfní rod, který se rozmnožuje pouze vegetativně pomocí

Tabulka I  
Taxonomické zařazení rodu *Candida*

Taxonomická jednotka	Název
Říše	<i>Fungi</i>
Čeleď	<i>Saccharomycetaceae</i>
Řád	<i>Saccharomycetales</i>
Třída	<i>Hemiascomycetes</i>
Oddělení	<i>Ascomycotina</i>
Rod	<i>Candida</i>

pučení. Jeho zástupci optimálně rostou při teplotách 25 až 30 °C, ale více než 60 % druhů je schopno růst i při 37 °C, což z nich činí potenciální patogeny pro většinu savců<sup>2</sup>. Kvasinky tohoto rodu preferují růst v rozmezí pH 4–6 (cit.<sup>1</sup>). Kolonie těchto mikroorganismů jsou většinou bílé, krémové až žluté, hladké, suché nebo zvrásněné<sup>2</sup>.

Buněčná stěna těchto mikroorganismů je složena z více než 20–30 % ze sacharidových komplexů, jako jsou např. komplexy  $\beta$ -1,3-glukanu,  $\beta$ -1,6-glukanu a  $\alpha$ -mannanu. Nejvíce zastoupenými sacharidy jsou glukany (30–60 %), z nichž nejčastější je  $\beta$ -1,3-glukan (65–95 % glukanu v buněčné stěně). Menší složku buněčné stěny tvoří mannoпротеiny (20–50 % sušiny). Objevuje se zde i malé množství chitinu (1–2 % sušiny). Bylo prokázáno, že glukomannanový komplex absorbuje reaktivní formy kyslíku a tím chrání buňky před oxidačním stresem<sup>1</sup>.  $\beta$ -1,3-Glukan také hraje důležitou roli v rezistenci patogenních druhů vůči polyenovým antibiotikům. Jeho nadprodukce vede k sekreci do okolí buňky, kde je  $\beta$ -1,3-glukan schopen interagovat např. s amfotericinem B a bránit tak jeho průniku do nitra buněk<sup>3</sup>.

### 1.3. Metabolismus

Zástupci rodu *Candida* jsou aerobní heterotrofní mikroorganismy, které jsou schopné růst na širokém spektru substrátů. Až na výjimky nejsou schopni asimilovat dusičnany, rostou ale velmi dobře na alifatických uhlovodících a neobvyklých sacharidech (např. xylosa, arabinosa, laktosa), což z nich činí výhodné organismy pro nejrůznější biotechnologické produkce, zpracování odpadů a pro bioremediace<sup>1</sup>. Patří mezi methylotrófní organismy, které využívají ribulosomonofosátovou dráhu (např. *C. boidinii*). Některé jsou schopny vytvářet i menší množství ethanolu z netradičních cukrů, díky čemuž se uvažuje o jejich využití v tradičních biotechnologiích<sup>4</sup>.

Tyto kvasinky se také pyšní rozmanitým množstvím lipolytických enzymů, které jsou využívány ve farmacii, potravinářství, kosmetice i v bioremediacích<sup>5,6</sup>. Kvůli patogennímu charakteru některých producentů je snaha izolovat přímo gen pro danou lipasu a ten pak vložit do biotechnologicky vhodnějších druhů, jako je např. *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Pichia pastoris*<sup>5,7</sup>. Zajímavá je také produkce rhamnolipidů a soforolipidů, charakteristických skupin lipidů rodu *Candida*, které mají povahu biosurfaktantů a podobně jako lipasy našly široké uplatnění v analogických oblastech průmyslu<sup>6,8,9</sup>.

Nelze však opomenout metabolické změny těchto mikroorganismů spojené s tvorbou biofilmu. Většina patogenních druhů rodu *Candida* je schopna vytvářet ve větší či menší míře biofilm<sup>10</sup>. Schopnost adherovat k povrchu či hostitelské tkáni z nich činí významné patogeny, kvůli kterým se často upouští od jejich průmyslového využití<sup>11</sup>. Změna fenotypu spojená s tvorbou biofilmu vede k nadměrné produkci některých virulenních faktorů, mezi které patří např. i v průmyslu využívané lipasy, které mohou značně narušit hostitelskou tkáň a komplikovat infekce způsobené těmito mikroorganismy<sup>2,11</sup>.

## 2. Využití v průmyslu

### 2.1. Tradiční biotechnologie

Pro biotechnologii je pravděpodobně nejdůležitější vlastností zástupců rodu *Candida* jejich schopnost produkovat organická rozpouštědla, mezi nimiž nejvíce vyčnívá ethanol<sup>12,13</sup>. Různé druhy *Candida* často přetvářejí nearomatické prekurzory v senzoricke výhodné látky, které mohou ozvláštňovat nejrůznější kvašené alkoholické a nealkoholické nápoje i pokrmy<sup>1</sup>. Není proto překvapující, že je stále větší zájem o využití některých zástupců rodu *Candida* např. ve vinařství, pivovarnictví, potravinářství nebo pro produkci rozpouštědel z průmyslových biologických odpadů<sup>1,14,15</sup>.

#### 2.1.1. Vinařství

Výroba vína je značně komplexní proces, ve kterém samozřejmě nejvýznamnější roli hraje *Saccharomyces cerevisiae*. V posledních letech bylo nicméně zjištěno, že v prvních fázích fermentace vinných hroznů se uplatňují také tzv. non-*Saccharomyces cerevisiae* druhy mikroorganismů, mezi nimiž byly identifikovány např. zástupci rodu *Kloeckera*, *Pichia*, *Kluyveromyces* nebo právě *Candida*<sup>4</sup>. Tyto rody se uplatňují hlavně ze začátku fermentace, kdy koncentrace ethanolu ještě nepřekročí hranici 3–4 %. V pozdních fázích, kdy je koncentrace ethanolu vyšší, tyto druhy zcela přeroste osmotolerantní *S. cerevisiae*, která kvasný proces dokončí. Přestože role *S. cerevisiae* je v tomto ohledu jednoznačná, stále více pozornosti se přisuzuje právě non-*S. cerevisiae* druhům, které patrně pozitivně ovlivňují senzorický charakter produkovaného vína<sup>4</sup>. Schopnost některých zástupců rodu *Candida* přetvářet neaktivní aromagenní prekurzory na senzoricke významné látky je ve vinařství velmi žádaná. Vzniklé aromatické látky pozitivně ovlivňují vinný buket, čímž dodávají takovým vínům jejich charakteristickou chuť a vůni<sup>15</sup>. Ze zástupců rodu *Candida* jsou pro tento účel významné např. *C. pulcherrina*, *C. stellata*, *C. zemplinina*, *C. lambica*, *C. pelliculosa*, *C. cantarelli* a *C. molischiana*<sup>15–18</sup>. *C. pulcherrina* produkuje aromatické estery a vyzdvihuje tak chuť např. patagonských muškátů<sup>4,15</sup>. *C. stellata* se ve vinařství využívá hlavně pro svou schopnost produkovat zvýšený obsah glycerolu, který přidává vínu na sladkosti<sup>16,17</sup>. *C. zemplinina* je významným endofytem *Vitis vinifera* a zároveň se podílí i na počátečních fázích kvašení hroznů<sup>17</sup>. Podobně jako *C. stellata* produkuje zvýšený obsah glycerolu a to i při kyselejších pH (cit.<sup>15</sup>). *C. lambica* (*Pichia fermentans*) se využívá ve smíšených kulturách pro fermentaci makabských vín<sup>15</sup>. *C. pelliculosa* (*P. anomala*) se vyznačuje zvýšenou produkcí vyšších alkoholů, acétátu a ethylesterů, které pozitivně přispívají k rozvoji ovocné vůně a chuti vína<sup>15</sup>. Smíšené kultury *S. cerevisiae* s *C. pelliculosa* tak dávají vzniknout vínu s intenzivnějším aroma než v případě čisté kultury *S. cerevisiae*. *C. cantarelli* se využívá pro výrobu červených vín z odrůdy Syrah<sup>15</sup>.

Zástupci rodu *Candida* jsou tedy významnými mikroorganismy, které ovlivňují chuť bílých i červených vín a ve smíšených kulturách s *S. cerevisiae* dosahují vína lepší aromatické kvality než v případě použití pouze čisté kultury *S. cerevisiae*.

### 2.1.2. Pivovarství

Pivovarství je jednou z dalších oblastí, ve které se stále více uplatňují některé druhy *Candida* i přesto, že standardní technologie využívající *S. cerevisiae* podobně jako v případě vinařství stále převládají. Vysoká poptávka a alternativní životní styl však vedly ke značnému experimentování v oblasti tzv. kraftových piv (z angl. craft = řemeslo). Kraftová nebo také řemeslná piva se vyznačují rozmanitým aroma, které mnohdy pivo z velkých pivovarů chybí. Jsou připravovány v menším množství často v malých pivovarech, což ale nemusí být nutně pravidlo. Právě variabilita chutí a vůní těchto piv vedla k hypotéze, zda by za účelem získání nových neobvyklých chutí nebylo vhodné *S. cerevisiae* doplnit či zcela nahradit jiným mikroorganismem produkujícím ethanol. Mezi takové mikroorganismy lze zařadit např. zástupce rodů *Brettanomyces*, *Torulasporea*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia* a nebo právě *Candida*<sup>19</sup>.

Není překvapující, že jedním z nejstudovanějších druhů, který je za tímto účelem sledován, je *C. zemplinina*, přirozený endofyt *Vitis vinifera*<sup>17</sup>. Tento druh je fruktofilní, osmotolerantní a psychrofilní a roste mnohem lépe než *S. cerevisiae*<sup>14</sup>. Spotřebuje méně volného aminodusiku, takže je schopen růst i na chudších substrátech.

Dalším druhem, který by mohl být využíván pro výrobu piva, je *C. shehatae*. *C. shehatae* je pro biotechnologii zajímavá především pro svou schopnost zkvašovat xylosu za vzniku ethanolu<sup>19</sup>. Xylosa je častým sacharidem v lignocelulosevé biomase vznikající při zpracování dřeva<sup>1</sup>. Čistou xylosu získanou právě z tohoto odpadu lze využít pro fortifikaci růstového média pro *C. shehatae*, která tak může účinně produkovat ethanol a zároveň se snižuje cena surovin pro kultivaci<sup>20</sup>. Je velmi výhodné použít mikroorganismus, který je schopen růst na xylose vzhledem k nízké ceně tohoto materiálu. I když existují rekombinantní kmeny, nemodifikovaná *S. cerevisiae* není schopná xylosu kvasit. Využití této vlastnosti v pivovarství je ještě potřeba podrobit důkladnému výzkumu<sup>21</sup>.

Existují studie, kde se hovoří o využití patogenního druhu *C. tropicalis* za účelem přípravy fermentovaných nápojů<sup>19,22</sup>. Přestože je tato kvasinka značně odolná vůči působení antibiotik a běžně je izolována z vysokého procenta kandidóz (viz dále), v Západní Africe a na Pobřeží slonoviny se běžně využívá v rámci smíšených kultur pro výrobu tradičních fermentovaných nápojů, jako je např. pivo sorghum nebo tchapalo. Je však důležité si za účelem přípravy piva vybrat pouze mírně patogenní či zcela nepatogenní kmeny této kvasinky, což ovšem značně limituje využití tohoto druhu<sup>22</sup>. Zástupci rodu *Candida* se nicméně neuplatňují pouze v přípravě piva. Z jablečného cideru a dalších ovocných moštů se podařilo izolovat tři druhy

*Candida*. Jednalo se o *C. anglica*, *C. cidri* a *C. pomicola*. Zda tyto druhy hrají roli v kvašení moštů, je zatím předmětem výzkumu<sup>23</sup>.

### 2.1.3. Zpracování odpadů a produkce organických látek

Zástupci rodu *Candida* našli taktéž využití především ve zpracování odpadů z jiných odvětví průmyslu, navíc za vzniku technologicky významných látek. Za tímto účelem se využívají především odpady z potravinářského průmyslu jako např. odpad po zpracování cukrové třtiny, rýže, kukuřice anebo lignocelulosa biomasa vznikající při zpracování dřeva a výrobě papíru<sup>1,12,13,24</sup>. Většina těchto odpadů je bohatá na špatně zkvasitelné cukry a alkoholy – xylosu, maltosu, pentosu nebo surový glycerol a mannitol<sup>12,13,25</sup>. *S. cerevisiae* není schopná bez genetické modifikace tyto látky využít. Většina druhů *Candida* však obsahuje vhodné enzymové vybavení pro zpracování látek z průmyslových odpadů, a to bez nutnosti značného obohacení vhodnějšími substráty<sup>1</sup>.

Často jsou tímto způsobem produkovány nejrůznější alkoholy, především ethanol. *C. shehatae* se využívá pro produkci ethanolu z odpadu po zpracování cukrové třtiny<sup>12</sup>. Bylo zjištěno, že při růstu na biologickém odpadu je tato kvasinka schopná využít 46 % sacharidů na tvorbu ethanolu<sup>21</sup>. Na podobných typech substrátů jsou schopny růst za stejným účelem také *C. lipolytica*, *C. utilis* nebo *C. langeronii*. *C. shehatae* je dále schopná růst také na hydrolyzátu lignocelulosa biomasy. Na zpracování lignocelulosa biomasy se také podílí *C. pseudotropicalis*, *C. arabinofementans* a *C. kefir*<sup>1</sup>.

Často využívaným druhem v průmyslu je i patogenní *C. tropicalis*. Tato kvasinka je schopna produkovat ethanol z hydrolyzátu odpadu po zpracování rýže<sup>13</sup>. Takto vzniklý ethanol je pak přidáván např. do benzínu. *C. tropicalis* se však dále podílí také na produkci umělých sladidel a kyseliny citronové<sup>1</sup>. Pro produkci umělých sladidel xylytolu, erythritolu nebo mannitolu se kromě *C. tropicalis* využívají také *C. athansensis*, *C. lipolytica*, *C. azyma* a *C. magnolie*<sup>25</sup>. Pro výrobu kyseliny citronové se využívají např. kvasinky *C. oleophila*, *C. hitachinica*, *C. guilliermondii* a *C. lipolytica*<sup>1</sup>.

Pro výrobu bioethanolu se využívá i další patogenní kvasinka *C. glabrata*<sup>26</sup>. V jedné studii se však s patogenitou daného druhu vypořádali použitím flokulačního mutantu, jehož virulence tak byla značně potlačena<sup>27</sup>. Bioethanol lze produkovat i pomocí *C. melibiosica* z odpadu po zpracování fytátu<sup>28</sup>.

Značný význam mají kvasinky rodu *Candida* také ve využití znečištěných látek vznikajících jako produkty jiných technologií. *C. azyma* se např. využívá pro produkci mannitolu ze surového glycerolu, který vzniká jako vedlejší produkt při produkci benzínu fortifikovaného přírodními oleji<sup>25,29</sup>. *C. glabrata* je využívána pro tvorbu biosurfaktantu z odpadního oleje<sup>30</sup>.

Produkce biosurfaktantů těmito druhy mikroorganismů za využití odpadu je také velmi důležitá. Biosurfaktanty jako soforolipidy, rhamnolipidy a ceramidy jsou produkovány řadou zástupců rodu *Candida* a nacházejí široké

využití jak v potravinářství (výroba zmrzlin, emulgace tuků), tak ve farmacii či kosmetice<sup>6,31</sup>.

## 2.2. Rekombinantní technologie

Rekombinantní technologie představuje moderní odvětví biotechnologie zaměřené na produkci biofarmaceutik s využitím vhodných mikroorganismů, do nichž byla vložena cizí genetická informace. Přestože zástupci rodu *Candida* mají zajímavé metabolické schopnosti, jejich sklon k rozvoji patogenity z nich činí mikroorganismy nevhodné pro účely produkce léčiv<sup>5</sup>. Zástupci rodu *Candida* v oblasti rekombinantních technologií fungují jako zdroje vhodné genetické informace, které jsou vkládány do přívětivějších expresních systémů, především do bakterie *Escherichia coli* nebo do kvasinek *S. cerevisiae* a *P. pastoris*<sup>32</sup>. Nejčastěji jsou využívány geny pro tvorbu lipas, kterými jsou některé druhy *Candida* charakteristické. Lipasy produkované zástupci rodu *Candida* patří mezi nejčastěji využívané enzymy této skupiny díky své značné stereospecifitě, vysoké produkci a stabilitě<sup>33</sup>. Jedná se hlavně o produkci lipas druhu *C. antarctica* a *C. rugosa* (cit.<sup>5,7,34,35</sup>). Nejčastěji je rekombinace genů pro lipasy *lip* prováděna v *P. pastoris*. Sekvence genů z těchto druhů *Candida* však musí být pozměněny, jelikož CUG triplet pro aminokyselinu leucin kóduje v těchto mikroorganismech serin<sup>5,36</sup>. V *P. pastoris* je však tímto tripletem kódován leucin a prostou rekombinací surového genu pro lipasy by došlo k produkci nefunkčního enzymu. Dále se využívá jejich rozmanitého enzymatického aparátu pro růst na různých netradičních substrátech, např. na xylose. V *E. coli* byl úspěšně exprimován gen pro xylozareduktasu z *C. shehatae*<sup>32</sup>. *C. utilis* s vloženým genem laktátdehydrogenasy z mléčných bakterií je schopna vytvářet polymléčnou kyselinu z xylosy<sup>37,38</sup>.

Rekombinace tak představuje účinnou alternativu pro produkci rozličných látek pomocí enzymového vybavení zástupců rodu *Candida* bez nutnosti vypořádat se s jejich patogenitou.

## 3. Patogenita

Každý mikroorganismus schopný růst při 37 °C je za vhodných okolností potenciální patogen. Při zavlečení do lidského organismu, který je již určitým způsobem oslaben (jiná infekce, snížená imunita, rakovina) je velká pravděpodobnost, že tyto jindy neškodné mikroorganismy mohou vyvolat invazivní onemocnění, které může přejít v chronické. Rod *Candida* obsahuje více než 100 druhů, které jsou při této teplotě schopny růst. Přes 40 druhů *Candida* bylo poprvé izolováno právě z lidských infekcí<sup>39</sup>. Tyto patogenní druhy představují čtvrtou nejčastější příčinu lidských infekcí krevního řečiště<sup>40</sup>. K jejich patogenitě výrazně přispívá schopnost vytvářet biofilm stejně tak jako tvorba virulenních faktorů, jako je např. produkce extracelulárních hydrolytických enzymů<sup>11</sup>. Onemocnění způsobené těmito mikroorganismy se nazývají kandidémie

a kandidózy<sup>40</sup>. Dříve byla naprostá většina druhů (92 až 95 %) způsobujících tato onemocnění identifikována jako *C. albicans*<sup>41</sup>. Epidemiologie těchto infekcí se však v posledním desetiletí výrazně změnila, čemuž i značně přispěla velká rozmanitost nových přesnějších identifikačních metod, které umožnily rozlišení některých fenotypově velmi podobných druhů *Candida*<sup>39</sup>. Kromě *C. albicans*, která se i tak stále významně podílí na infekcích tohoto rodu (50 % veškerých kandidózních infekcí), se tak na infekci lidského organismu podílejí i tzv. NCAC (non-*C. albicans Candida*) druhy<sup>39,42</sup>. Nejvýznamnějšími druhy NCAC jsou *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* nebo *C. parapsilosis*. V poslední době však byly izolovány z kandidóz také méně obvyklé druhy a největší problém představuje výskyt rezistentních druhů *Candida*, které se běžně využívají v biotechnologii<sup>42</sup>. Porozumění mechanismu vzniku rezistence této skupiny mikroorganismů a studium tvorby biofilmu a virulenních faktorů tak představují důležitou terapeutickou výzvu.

### 3.1. Tvorba biofilmu

Adheze buněk k abiotickým i biotickým povrchům výrazně přispívá k rozvoji infekce mikroorganismů v lidském těle. Kolonizace intravenózních i urinárních katetrů nebo kontaminace kloubních implantátů vede ke vzniku těžkých chronických infekcí, které jsou bezprostředně spjaté s tvorbou biofilmu<sup>43,44</sup>. Tvorba mukózní extracelulární matrix a velmi pevné uchycení a zakotvení buněk do tkáně hostitele výrazně zvyšuje perzistenci mikroorganismů v lidském těle a neschopnost imunitního systému biofilm eradikovat<sup>45</sup>. Pro většinu patogenů je tak velmi výhodné biofilm tvořit. Není překvapující, že oportunní patogeny rodu *Candida* vynikají svou schopností tvořit biofilm<sup>10,46,47</sup>.

Biofilm těchto mikroorganismů je obecně složen z bazální vrstvy kulatých buněk, které vytváří další kompaktní vrstvy, ve kterých se mohou vyskytovat i vláknité buňky hyf nebo pseudohyf<sup>10</sup>. Biofilm *C. albicans* a dalších patogenních druhů *Candida* se obvykle tvoří na sliznicích, vaginálním epitelu nebo na výše zmíněných katetrech<sup>3</sup>.

*C. albicans* produkuje biofilm v největší míře v porovnání s dalšími známými patogenními druhy rodu *Candida*<sup>10</sup>. Její biofilm obsahuje mohutnou extracelulární matrix, ve které se vyskytují buňky v podobě blastospor, vláknitých pseudohyf i pravých hyf<sup>3</sup>. Biofilm *C. glabrata* obsahuje pouze kulaté buňky, které vytváří kompaktní mnohovrstevné konsorcium nebo sloupcovité klastry s menším množstvím extracelulární matrix<sup>2</sup>. *C. tropicalis* oproti tomu vytváří biofilm bohatý na extracelulární matrix, který obsahuje jak kulaté buňky, tak pseudohyfy a hyfy rozmístěné v celém prostoru. *C. parapsilosis* vytváří klastry kulatých buněk s malým množstvím pseudohyf v biofilmu chudém na extracelulární matrix<sup>10</sup>.

Tvorba biofilmu *C. albicans* výrazně zvyšuje odolnost buněk v něm obsažených. Odolnost buněk v biofilmu *C. albicans* se zvýší oproti buňkám rostoucím v suspenzi asi 5–8× (cit.<sup>10</sup>). Je známo, že extracelulární matrix

v biofilmu může působit jako účinná bariéra proti průniku některých antimikrobiálních látek<sup>45,51</sup>. Častá komponenta extracelulární matrix  $\beta$ -1,3-glukan interaguje s amfotericinem B a zvyšuje tak přímo rezistenci buněk v biofilmu<sup>3</sup>. Mannany i  $\beta$ -1,6-glukany se zase výrazně podílejí na zpomalení penetrace antibiotik do nitra biofilmu<sup>10</sup>. Během dozrávání biofilmu se navíc mění obsah ergosterolu v cytoplazmatické membráně buněk, což také může ovlivnit účinek některých antimikrobiálních látek, především polyenů. *C. albicans* je mnohem více patogenní než ostatní druhy právě pro svou výrazně vyšší schopnost růst v biofilmu<sup>11</sup>.

### 3.2. Virulenční faktory

Virulence je vlastnost mikroorganismu, která charakterizuje míru patogenity v porovnání s ostatními kmeny nebo druhy. Virulentní mikroorganismy jsou schopny vyvolat infekci a tím imunitní reakci hostitele na jejich přítomnost<sup>48</sup>. Významnými činiteli virulence a tím i patogenity jsou tzv. virulenční faktory, které se podílejí na specifickém působení daného patogenu v organismu<sup>11,50</sup>. Jedná se například o schopnost adherence k hostitelské tkáni a tedy tvorbu biofilmu. Lze mezi ně zařadit též produkci extracelulárních enzymů, které mohou určitým způsobem ovlivňovat prostředí v okolí buněk a umožňovat tak jejich přežití<sup>2</sup>. Mezi virulenční faktory patří i součásti buněčných stěn mikroorganismů, které mohou napomáhat adherenci nebo přímo specifikuji vazbu buněk na specifické komponenty hostitele. Dále se na virulenci podílí produkované toxiny nebo specifické metabolické produkty mikroorganismů, které mohou být pro hostitele toxické.

Jak již bylo zmíněno výše, mezi asi nejvýznamnější virulenční faktory rodu *Candida* patří schopnost adherovat k povrchu a tvořit biofilm (viz kap. 3.1.). Tvorba biofilmu jednak umožňuje pevné zakotvení v prostředí s vyššími střížnými silami, významně přispívá k perzistenci v organismu (zabraňuje eradikaci buněk v biofilmu, které by byly např. jinak pohlceny fagocytózou leukocyty) a napomáhá také změnit pH v okolí buněk ve prospěch patogenu<sup>2</sup>. S tvorbou biofilmu souvisí také produkce extracelulárních hydrolytických enzymů, jako jsou např. fosfolipasy nebo proteasy. Hydrolasy ovlivňují okolí biofilmu, narušují hostitelskou tkáň (především membrány a jiné bariéry v organismu hostitele), umožňují buňkám získat potřebné nutrienty a šířit se v organismu. Do narušené tkáně mohou buňky navíc hlouběji pronikat a tvořit ve skulinách další biofilm<sup>11</sup>.

*C. albicans* produkuje velkou skupinu serinových proteinas, které jsou významnými virulenčními faktory. Tyto proteasy jsou kódovány geny skupiny SAP. Homologické sekvence genů byly identifikovány také v *C. tropicalis*, která má tyto geny čtyři (SAPT1-4), v *C. parapsilosis* s dvěma geny této skupiny. *C. dubliniensis*, nedávno objevený patogen této skupiny mikroorganismů produkuje minimálně sedm serinových proteinas<sup>49</sup>. Fosfolipasy jsou produkovány jak *C. albicans*, tak ostatními zmíněnými NCAC. *C. albicans* dále produ-

kuje i lipasy skupiny LIP, jejich homology jsou hojně využívány z výše zmíněných druhů *C. antarctica* a *C. rugosa*<sup>42</sup>. V případě *C. albicans* však mohou výrazně přispívat rozvoji infekce v organismu<sup>11</sup>.

### 3.3. Rezistence vůči antibiotikům

Invazivní i chronické kandidózy jsou tradičně léčeny antifungálními látkami typu polyenových antibiotik (př. amfotericin B), antifungálních azolů (př. flukonazol), nukleosidových analog (př. 5-fluorouracil) nebo echinokandinů (př. kaspofungin)<sup>3</sup>. Použití těchto léčiv je však značně limitováno častými vedlejšími účinky, které mají na lidský organismus, a rozvojem rezistence patogenních druhů *Candida* vůči jejich působení<sup>40</sup>.

Buňky rodu *Candida* se vůči působení různých antifungálních látek brání několika způsoby. Nejzákladnější vliv mají efluxní pumpy. V případě *C. albicans* se jedná o dvě velké skupiny ATP vázajících kazet (ABC, z angl. ATP binding cassette), transportérů (Crd1 a Cdr2) a hlavních usnadňujících (MF, z angl. major facilitator) transportérů (Mdr1)<sup>3</sup>. Tyto efluxní pumpy jsou v případě suspenzních buněk *C. albicans* většinou exprimovány až po kontaktu s antifungální látkou. Buňky biofilmu začnou exprimovat tyto efluxní pumpy již při prvotním kontaktu s danou antimikrobiální látkou, po odeznění vlivu této látky jsou však nadále exprimovány<sup>10</sup>.

Další účinnou strategií pro přežití buněk *Candida* v přítomnosti antifungálních látek je nadměrná produkce některých komponent extracelulární matrix. Specificky se jedná především o  $\beta$ -1,3-glukany, které zabraňují účinku flukonazolu na buňky v biofilmu. Dále přímo interagují s amfotericinem B, čímž mu zabraňují proniknout do nitra biofilmu<sup>41</sup>.

V biofilmu se navíc vyskytují tzv. perzistery, velmi odolné buňky s výrazně sníženou metabolickou aktivitou, které jsou schopny odolat i vysokým koncentracím antifungálních látek i limitaci živinami nebo kyslíkem. Tyto dormantní buňky dokážou znovu vytvořit biofilm, přestože většina metabolicky aktivnějších buněk již odumřela. Právě kvůli této minoritní skupině buněk je tak složitější biofilmy rodu *Candida* i mnoha jiných mikroorganismů zcela eradikovat<sup>10</sup>.

## 4. Závěr

*Candida albicans* je spolu s dalšími druhy jedním z nejvýznamnějších oportunních patogenů současnosti. Rezistence těchto patogenů vůči antifungálním látkám z nich činí častou příčinu lidských infekcí. Kvůli značné patogenitě se však často zapomíná na výhodné metabolické vlastnosti a růstovou nenáročnost těchto mikroorganismů, které jsou v mnoha případech běžně využívány v průmyslu. Díky značnému pokroku v atenuaci některých virulentních faktorů a celkově potlačení patogenity však tyto kvasinky stále častěji nachází uplatnění i v tradičních i moderních biotechnologiích.

Asi je ještě brzy na to, abychom si mohli v obchodě koupit např. pivo zcela připravené některými zástupci rodu *Candida* nebo víno, na jehož kvašení se podílely pouze tyto pozoruhodné kvasinky, či léčivo připravené pouze pomocí těchto mikroorganismů. Lze však očekávat, že v budoucnu budou stále častěji využívány hlavně pro svou schopnost růst na biologických odpadech především na hydrolyzátech dřeva pocházejících z papírenského průmyslu, produkce enzymů a surfaktantů nebo pro svou schopnost odbourávat i značně toxické látky z životního prostředí.

*Tato práce byla realizována v rámci „Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost“ (CZ.2.16/3.1.00/24503) za podpory „Národního programu udržitelnosti I“ – NPU I LO1601.*

#### LITERATURA

- Kieliszek M., Kot A. M., Bzducha-Wrobel A., Blazejak S., Gientka I., Kurcz A.: *Fungal Biol. Rev.* 31, 185 (2017).
- Silva S., Negri M., Henriques M., Oliveira R., Williams D. W., Azeredo J.: *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 288 (2012).
- Gulati M., Nobile C. J.: *Microbes Infect.* 18, 310 (2016).
- Rodriguez M. E., Lopes C. A., Barbagelata R. J., Barda N. B., Caballero A. C.: *Int. J. Food Microbiol.* 138, 19 (2010).
- Ferrer P., Alarcon M., Ramon R., Benaiges M. D., Valero F.: *Biochem. Eng. J.* 46, 271 (2009).
- Varvaresou A., Iakovou K.: *Lett. Appl. Microbiol.* 61, 214 (2015).
- Tang S. J., Shaw J. F., Sun K. H., Sun G. H., Chang T. Y., Lin C. K., Lo Y. C., Lee G. C.: *Arch. Biochem. Biophys.* 387, 93 (2001).
- Mouad A. M., Taupin D., Lehr L., Yvergnaux F., Porto A. L. M.: *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 126, 64 (2016).
- Kolouchova I., Mat'atkova O., Sigler K., Masak J., Rezanka T.: *Int. J. Anal. Chem.* 2016, 1 (2016).
- Cavalheiro M., Teixeira M. C.: *Front. Med.* 5, 1 (2018).
- Haynes K.: *Trends Microbiol.* 9, 591 (2001).
- Chandel A. K., Kapoor R. K., Singh A., Kuhad R. C.: *Bioresour. Technol.* 98, 1947 (2007).
- Oberoi H. S., Vadlani P. V., Brijwani K., Bhargav V. K., Patil R. T.: *Process Biochem.* 45, 1299 (2010).
- Estela-Escalante W. D., Rosales-Mendoza S., Moscosa-Santillan M., Gonzalez-Ramirez J. E.: *J. I. Brewing* 122, 530 (2016).
- Jolly N. P., Varela C., Pretorius I. S.: *FEMS Yeast Res.* 14, 215 (2014).
- Fleet G. H.: *FEMS Yeast Res.* 8, 979 (2008).
- Rao R. S., Bhadra B., Kumar N. N., Shivaji S.: *FEMS Yeast Res.* 7, 489 (2007).
- Genoves S., Gil J. V., Manzanares P., Alexandre J. L., Valles S.: *J. Food Sci.* 68, 2096 (2003).
- Michel M., Meier-Dornberg T., Jacob F., Methner F. J., Wagner R. S., Hutzler M.: *J. I. Brewing* 122, 569 (2016).
- Lebeau T., Jouenne T., Junter G. A.: *Microbiol. Res.* 162, 211 (2007).
- Estela-Escalante W. D., Moscosa-Santillan M., Gonzalez-Ramirez J. E., Rosales-Mendoza S.: *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 75, 130 (2017).
- N'Guessan F. K., N'Dri D. Y., Camara F., Dje M. K.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 693 (2010).
- Kurtzman C. P., Robnett C. J., Yarrow D.: *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 80, 237 (2001).
- Kordowska-Wiater M.: *J. Appl. Microbiol.* 119, 303 (2015).
- Yoshikawa J., Habe H., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Iwabuchi H., Uemura S., Tamura T., Kitamoto D.: *J. Biosci. Bioeng.* 117, 725 (2014).
- Watanabe I., Nakamura T., Shima J.: *J. Biosci. Bioeng.* 110, 176 (2010).
- Watanabe I., Nakamura T., Shima J.: *J. Biosci. Bioeng.* 107, 379 (2009).
- Hubenova Y., Georgiev D., Mitov M.: *Biotechnol. Lett.* 36, 1993 (2014).
- Kolouchova I., Schreiberova O., Sigler K., Masak J., Rezanka T.: *FEMS Yeast Res.* 15, 1 (2015).
- de Gusmao C. A. B., Rufino R. D., Sarubbo L. A.: *World J. Microb. Biot.* 26, 1683 (2010).
- Price N. P. J., Ray K. J., Vermillion K. E., Dunlap C. A., Kurtzman C. P.: *Carbohydr. Res.* 348, 33 (2012).
- Wang X. X., Fang B. S., Luo J. X., Li W. J., Zhang L. Y.: *Biotechnol. Lett.* 29, 1409 (2007).
- Vakhlu J., Kour A.: *Electron. J. Biotechnol.* 9, 69 (2006).
- Liu Z. Q., Zheng X. B., Zhang S. P., Zheng Y. G.: *Microbiol. Res.* 167, 452 (2012).
- Eom G. T., Lee S. H., Song B. K., Chung K. W., Kim Y. W., Song J. K.: *J. Biosci. Bioeng.* 116, 165 (2013).
- Xu L., Liu Z. M., Wang G. L., Pan D. J., Jiao L. C., Yan Y. J.: *Enzyme Microb. Technol.* 82, 115 (2016).
- Tamakawa H., Ikushima S., Yoshida S.: *J. Biosci. Bioeng.* 113, 73 (2012).
- Tamakawa H., Ikushima S., Yoshida S.: *J. Biosci. Bioeng.* 115, 532 (2013).
- Douglas L. J.: *Trends Microbiol.* 11, 30 (2003).
- Antinori S., Milazzo L., Sollima S., Galli M., Corbellino M.: *Eur. J. Intern. Med.* 34, 21 (2016).
- Berkow E. L., Lockhart S. R.: *Infect. Drug Resist.* 10, 237 (2017).
- Sanguinetti M., Posteraro B., Lass-Flörl C.: *Mycoses* 58, 2 (2015).
- Cobrado L., Silva-Dias A., Azevedo M. M., Pina-Vaz C., Rodrigues A. G.: *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 126 (2013).
- Kvasničková E., Paldrychová M., Mat'átková O., Masák J.: *Chem. Listy* 110, 485 (2016).
- Flemming H., Wingender J.: *Nature* 8, 623 (2010).
- Bonhomme J., d'Enfert C.: *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 398 (2013).

47. Seneviratne C. J., Jin L., Samaranyake L. P.: Oral Dis. 14, 582 (2008).
48. Beceiro A., Tomas M., Bou G.: Clin. Microbiol. Rev. 26, 185 (2013).
49. Jiang C., Li Z., Zhang L. H., Tian Y., Dong D. F., Peng Y. B.: Microbiol. Res. 192, 65 (2016).
50. Paldrychová M., Kvasničková E., Mařátková O., Mařák J.: Chem. Listy 111, 637 (2017).
51. Boháčová M., Pazlarová J.: Chem. Listy 112, 215 (2018).

**P. Kašparová, O. Mařátková, and A. Čejková**  
(Department of Biotechnology, University of Chemistry and Technology, Prague): **Can the Advantages of the Genus *Candida* Exceed the Strong Pathogenesis of Some of its Species?**

The genus *Candida* is well known for its significant pathogenesis with which it radically affects the medical practice nowadays. *C. albicans*, above all, belongs to severe pathogens and it developed high resistance to a variety of antimicrobials. Undesirable effects of this species cast a shadow upon the entire group of these microorganisms, favourable metabolic qualities of which are thus often omitted. These properties find their usage in various fields of biotechnology. The present contribution is specifically focused on the application of genus *Candida* in traditional or recombinant biotechnology. Its pathogenesis is presented in contrast to the potential use of these yeasts in the industry.

Keywords: genus *Candida*, pathogenesis, virulence, biotechnology, industry, waste