Horizon of Medical Sciences
Volume 24, Issue 1, Winter 2018
Pages: 1-6
Type: Original Research

Antifungal Effect of Lipopeptide Compounds Produced by *Bacillus amyloliquefaciens M13RW01*

Aghaali Marnani M.[1] *MSc*, Madani M.* *PhD*

*Microbiology Department, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[1]Microbiology Department, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Abstract

Aims: *Bacillus amyloliquefaciens* lipopeptide are made of amino acids and fatty acid chain, and have many antifungal activities against several important pathogenic yeasts. The present research was carried out with the aim of extraction and evaluation of antifungal effect of lipopeptide compounds produced by Esfahan native *Bacillus amyloliquefaciens M13RW01* against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *and Candida tropicalis*.

Materials & Methods: In this experimental study, *Bacillus amyloliquefaciens M13RW01* was cultured in modified Peptone-Glucose-Yeast extract medium (PGY) for 72 hours**.** Then, the lipopeptide compounds produced in the medium by precipitation with HCl 6M were extracted and dissolved in methanol (50% water; 50% methanol). The antifungal activity of lipopeptide compounds against 5 species of *Candida* was investigated by well diffusion method, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and Minimum Fungal Concentration (MFC). Also, germ tube production by *Candida albicans* in tube containing lipopeptide was investigated.

Conclusion: The *Bacillus amyloliquefaciens* M13RW01 lipopeptide metabolites inhibited germ tube production in all *C. albicans* yeasts, but no inhibitory or fatal effect was observed on other species of *Candida***.** Inhibition zone was not observed around the wells; in all dilutions, *Candida* yeasts grew. Therefore, minimal inhibitory concentration and minimal fungicidal concentration were not determined**.**

Keywords

Bacillus amyloliquefaciens [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ mesh/ 2016189];
Lipopeptides [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ mesh/ 68055666];
Candida [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ mesh/ 68002175];
Germ Tube [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ mesh/ 11454197];
Minimal Inhibitory Concentration [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ mesh/ 11420333];
Minimal Fungicidal Concentration [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ mesh/ 10746223]

*Corresponding Author
Tel: +98 (31) 36273427
Fax: +98 (31) 2313260
Address: Islamic Azad University, University Boulevard, Basij Boulevard, Falavarjan city, Isfahan, Iran. Post box: 84515/155. Postal Code: 84517-31167
mmadani66@gmail.com
Received: March 6, 2017 Accepted: November 1, 2017 ePublished: January 11, 2018

اثر ضدقارچی ترکیبات لیپوپپتیدی تولیدشده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01

مهسا آقاعلی مارنانی MSc
گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
محبوبه مدنی* PhD
گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

چکیده

اهداف: ترکیبات لیپوپپتیدی *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* از یک سری آمینواسید و زنجیره اسید چرب ساخته شده‌اند و فعالیت ضدقارچی قوی در برابر طیف گسترده‌ای از مخمرهای بیماری‌زا دارند. این تحقیق با هدف استخراج و ارزیابی اثر ضدقارچی ترکیبات لیپوپپتیدی تولیدشده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01 بومی اصفهان، علیه مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزئی*، *کاندیدا پاراپسیلوسیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس M13RW01* در محیط تخمیری PGY (پپتون- گلوکز- عصاره مخمر) اصلاح‌شده برای ۷۲ ساعت کشت داده شد. سپس ترکیبات لیپوپپتیدی تولیدشده در محیط توسط رسوب‌دهی با اسیدکلریدریک ٦مولار استخراج و در محلول متانولی (۵۰% آب؛ ۵۰% متانول) حل شد. فعالیت ضدقارچی ترکیبات لیپوپپتیدی علیه پنج گونه قارچ کاندیدا توسط روش انتشار چاهک، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین توانایی ایجاد لوله زایا توسط *کاندیدا آلبیکنس* در لوله حاوی لیپوپپتید بررسی شد.

یافته‌ها: متابولیت‌های لیپوپپتیدی *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01، ایجاد لوله زایا را در همه مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس* مهار نمود، ولی هیچ گونه اثر مهاری یا کشندگی بر گونه‌های دیگر قارچ کاندیدا مشاهده نشد. هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها مشاهده نشد. در همه رقت‌های تهیه‌شده، مخمرهای کاندیدا رشد کرد. لذا حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی قارچ‌ها تعیین نشد.

نتیجه‌گیری: متابولیت‌های لیپوپپتیدی تولیدشده از *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* سویه M13RW01، هیچ گونه اثر مهاری یا کشندگی بر انواع مورد مطالعه قارچ مخمری کاندیدا ندارند، ولی ایجاد لوله زایا توسط مخمر *کاندیدا آلبیکنس* را مهار می‌کنند.

کلیدواژه‌ها: *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس*، لیپوپپتید، کاندیدا، لوله زایا، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد، حداقل غلظت کشندگی قارچ

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۲
*نویسنده مسئول: mmadani66@gmail.com

مقدمه

عفونت‌های قارچی یکی از عوامل مرگ‌ومیر، به‌خصوص در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی است. یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین عفونت‌های فرصت‌طلب در پوست، دهان، دستگاه گوارش، سیستم عروق خونی و واژن انسان کاندیدیازیس است که توسط گونه‌های متعلق به جنس کاندیدا نظیر *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا کروزئی* ایجاد می‌شود[1, 2]. در این میان *کاندیدا آلبیکنس* عامل اکثر عفونت‌های ایجادشده است[3].

با توجه به نگرانی عمومی در رابطه با مقاوم‌شدن عوامل قارچی کاندیدا، جست‌وجو برای یافتن داروهای ضدقارچی جدید با داشتن کمترین عوارض افزایش یافته است. از طرفی پیشرفت در زمینه شناخت ترکیبات ضدقارچی کندتر از ترکیبات آنتی‌باکتریال است. لذا نیاز به نوآوری و پیشرفت بیشتر در شناخت داروهای ضدقارچی موثر، وجود دارد[2, 4-6]. در میان تنوع زیستی موجود، باکتری‌ها به‌دلیل تنوع جمعیتی، همچنین توانایی تولید متابولیت‌های فعال زیستی با خواص ضدمیکروبی مورد توجه هستند و ارزش بسزایی در کنترل بیولوژیک دارند[7]. از جمله مهم‌ترین باکتری‌هایی که این قابلیت را دارند می‌توان به باسیلوس‌ها اشاره کرد که می‌توانند از طریق تولید متابولیت‌های ضدقارچی از رشد و تکثیر قارچ‌ها ممانعت نمایند[8].

باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس، ساپروفیت خاک و غیربیماری‌زا است[9]. این باکتری در سال ۱۹۴۳ به‌وسیله فردی ژاپنی به‌نام *فوکوموتو* کشف شد و به‌دلیل تولید یک آلفا- آمیلاز مایع که باعث هیدرولیز نشاسته می‌شود، *آمیلولیکوئی فاسینس* نامیده شد[10]. بیشترین مارکرهای زیستی تولیدشده توسط باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس*، شامل پپتیدهای حلقوی و لیپوپپتیدهای حلقوی هستند که در محدوده ۸۰۰ تا ۵۰۰۰دالتون جرم داشته و چندین خواص ضدمیکروبی برای آنها تشخیص داده شده است. در این میان برجسته‌ترین آنها شامل سورفاکتین‌ها، ایتورین‌ها، پلی‌میکسین‌ها، فنجیسین‌ها، کورستاکیناز، باسیتراسین، آلبولوتین، بوتریسیدین و کلروتین هستند[8, 11]. لیپوپپتیدهای حلقوی دارای ساختار آمفی‌فیلیک هستند و از تعدادی آمینواسید و زنجیره اسید چرب تشکیل شده‌اند. سمیت پایین، سازگاری با محیط زیست و توانایی زیست تخریب‌پذیری بالا نسبت به سایر آفت‌کش‌ها از ویژگی‌های این متابولیت‌ها است[12, 13]. طبق مطالعات انجام‌شده در سازمان بهداشت و درمان کانادا و ایالات متحده در سال ۲۰۱۲، باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* و متابولیت‌های آن به‌غیر از یک پاسخ التهابی گذرا هیچ‌گونه عوارض جانبی یا اثر سوئی بر انسان، مهره‌داران، بی‌مهرگان، گیاهان و حیوانات آبزی ندارند[14]. بنابراین اخیراً به استفاده از این ترکیبات به‌عنوان عوامل بیوکنترلی توجه شایانی شده است[15].

ایتورین‌ها گروهی از ترکیبات لیپوپپتیدی با فعالیت ضدقارچی قوی در برابر طیف گسترده‌ای از کپک‌ها و مخمرهای بیماری‌زا هستند، در حالی که سمیت کمی برای پستانداران دارند. این ترکیبات به‌عنوان ادجوانت غیرسمی هستند، از دستگاه گوارش محافظت می‌نمایند و اثرات ضدسرطانی دارند[16]. براساس مطالعات انجام‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتی، تولید داخلی برای ایتورین در ایران وجود ندارد و از این لحاظ وابسته است. این تحقیق با هدف استخراج و ارزیابی اثر ضدقارچی ترکیبات لیپوپپتیدی تولیدشده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01 بومی اصفهان، علیه مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزئی*، *کاندیدا پاراپسیلوسیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، فعالیت ضدقارچی *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13-RW01 که توسط *نقدی‌فر* و همکاران در سال ۱۳۹۴ از خاک اصفهان جداسازی شده بود، مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت[17]. این جدایه از باکتری در محیط نوترینت‌آگار (scharlau؛ اسپانیا) و محیط تخمیری PGY (پپتون- گلوکز- عصاره مخمر) اصلاح‌شده (دارای ۱۰گرم بر لیتر پپتون، ۱۰گرم بر لیتر گلوکز، ۱۰گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۵گرم بر لیتر کلریدسدیم، ۱/۵گرم بر لیتر دی‌پتاسیم‌فسفات (K2HPO4)، منیزیم‌سولفات هپتا هیدرات (MgSo4.7H2O)، آب مقطر با pH=۷) کشت داده شد و برای مدت ۷۲ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد[9].

نمونه‌های استاندارد کاندیدای مورد استفاده شامل؛ مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس* CBS 2747، *کاندیدا گلابراتا* ATCC9003،

کاندیدا کروزئی CBS573، *کاندیدا تروپیکالیس* CBS94 و *کاندیدا پاراپسیلوسیس* ATCC90018 از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند. استرین‌های قارچی در پلیت‌های حاوی پوتیتو دکستروز آگار (PDA) (Scharlau؛ اسپانیا) کشت و به‌مدت ۴۸ساعت در دمای ۲۵°C گرماگذاری شدند.

به‌منظور استخراج ایتورین A از باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13-RW01، به ۲۰میلی‌لیتر از محیط کشت PGY که در یک فلاسک ۱۰۰میلی‌لیتری تهیه شده بود، ۲میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس*، معادل ۰/۵ مک‌فارلند تلقیح شد. این محیط در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰°C و ۱۵۰rpm انکوبه شد. بعد از ۱۸ساعت، ۱۲میلی‌لیتر از این محیط با پیپت استریل و زیر هود لامینار به ۱۰۰میلی‌لیتر از محیط کشت PGY اضافه شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰°C و ۱۵۰rpm برای ۷۲ساعت انکوبه شد. سپس محیط در شرایط استریل در لوله‌های فالکن تقسیم شد و برای ۴۰دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۶۰۰۰×g و دمای ۵°C سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دور ریخته شد و مایع رویی توسط فیلتر سرنگی ۰/۲۲میکرومتر فیلتر شد. pH فیلتره حاصل با اضافه‌کردن اسیدکلریدریک (HCL) ۶مولار به ۲ رسانده شد. برای این منظور هر بار به‌کمک سمپلر مقداری اسید به فیلتره اضافه و پس از تکان‌دادن ظرف به‌منظور یکنواخت‌نمودن فیلتره، pH آن اندازه‌گیری شد. فیلتره به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۵°C در یخچال نگه‌داری شد. سپس فیلتره حاوی رسوب در لوله‌های فالکن تقسیم و برای ۳۰دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۵°C و دور ۱۶۰۰۰× g سانتریفیوژ شد. این بار مایع رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل دوبار با آب مقطر دیونیزه استریل به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای ۵°C و دور ۱۶۰۰۰×g سانتریفیوژ و شست‌وشو داده شد. تمامی مراحل فوق در شرایط استریل در زیر هود لامینار در مجاورت یخ خشک و کنار شعله انجام شد [4, 18-20]. مقدار ۰/۵میلی‌گرم رسوب استخراج‌شده که حاوی متابولیت‌های ضدقارچی بود، در یک‌میلی‌لیتر محلول متانولی ۵۰% حل شد و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار برای ۱۰دقیقه با دور ۱۶۰۰۰×g و در دمای ۵°C سانتریفیوژ و سپس مایع رویی توسط فیلتر سرنگی ۰/۲۲میکرومتر فیلتر شد. مایع فیلتره نهایی به‌صورت یک‌میلی‌لیتر عصاره متانولی حاوی خانواده ایتورین بود[18].

برای بررسی اثر آنتاگونیسم لیپوپپتید استخراج‌شده بر پنج گونه کاندیدا به‌روش ژل دیفیوژن، سوسپانسیونی از قارچ مخمری معادل با ۰/۵مک‌فارلند تهیه شد و با کمک سمپلر مقدار ۲۰میکرولیتر از این سوسپانسیون روی سطح محیط کشت PDA اضافه شد و با کمک سوآپ استریل از هر یک از قارچ‌های مخمری در تمام سطح پلیت PDA کشت متراکم داده شد. سپس توسط پیپت‌پاستور استریل در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کشت PDA، یک چاهک به‌قطر ۶میلی‌متر ایجاد شد و داخل چاهک‌ها با ۵۰میکرولیتر عصاره متانولی حاوی لیپوپپتید پر شد. سپس این پلیت‌ها در دمای ۳۰°C به‌مدت ۲۴ساعت انکوبه شدند. این آزمون برای مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا کروزئی*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوسیس* انجام شد. به‌عنوان شاهد مثبت در یک چاهک ۵۰میکرولیتر ایتورین A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO؛ ایالات متحده) و به‌عنوان شاهد منفی در یک چاهک میزان ۵۰میکرولیتر متانول ۵۰% ریخته شد. آزمایشات سه‌بار تکرار شدند[21].

به‌منظور بررسی اثر متابولیت استخراج‌شده بر تشکیل لوله زایا در مخمر *کاندیدا آلبیکنس*، میزان ۵میلی‌لیتر خون انسان تهیه و داخل لوله آزمایش ریخته شد. سپس ۵ تا ۱۰دقیقه زمان داده شد تا خون درون لوله لخته شود. به‌منظور جداسازی سرم، لوله حاوی خون به‌مدت ۱۰دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. به‌طور جداگانه مقدار ۰/۵میلی‌لیتر از سرم به سه لوله استریل وارد شد؛ لوله اول حاوی سرم و ۵۰میکرولیتر محلول متانولی ۵۰% به‌عنوان شاهد منفی، لوله دوم حاوی سرم و ۵۰میکرولیتر ایتورین A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO؛ ایالات متحده) به‌عنوان شاهد مثبت و لوله سوم حاوی ۵۰میکرولیتر متابولیت لیپوپپتیدی استخراج‌شده و سرم بود. محتویات هر لوله توسط شیکر به‌خوبی با هم مخلوط شد. سپس به‌اندازه یک آنس از کشت خالص ۲۴ساعته *کاندیدا آلبیکنس* در سه لوله وارد و لوله‌ها به‌مدت ۲/۵ساعت در دمای ۳۷°C و ۱۸۰دور در دقیقه انکوبه شدند. در نهایت به‌کمک سمپلر یک قطره از محتویات یکنواخت‌شده لوله‌ها روی لام استریل قرار داده شد و بعد از لامل‌گذاری تشکیل لوله زایا در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش سه‌بار تکرار شد[19].

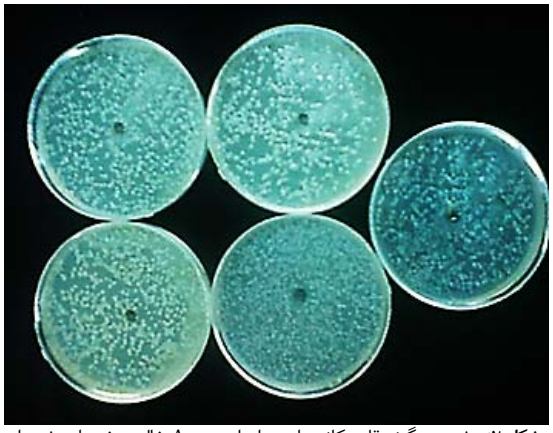
به‌منظور تعیین MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی رشد) و MFC (حداقل غلظت کشندگی قارچ) قارچ‌های مخمری به‌روش ماکرودایلوشن، ۹ لوله استریل تهیه و به هر لوله یک‌میلی‌لیتر محیط سابورو دکستروز براث اضافه شد. درب لوله‌ها مسدود شد و در اتوکلاو، به‌مدت ۲۰دقیقه در ۱۲۱°C و فشار ۱۵اتمسفر استریل شدند. برای تهیه استوک دارویی پس از پایین‌آمدن دمای لوله‌ها مقدار یک‌میلی‌لیتر از عصاره متانولی حاوی لیپوپپتید استخراج‌شده به لوله شماره یک افزوده شد، سپس لوله محتوی محیط کشت و متابولیت توسط ورتکس مخلوط شد. توسط سمپلر، یک‌میلی‌لیتر از محتویات لوله شماره یک به لوله شماره ۲ انتقال داده شد و این روند تا لوله شماره ۸ ادامه پیدا کرد. سپس یک‌میلی‌لیتر از محتویات لوله شماره ۸ دور ریخته شد. به این ترتیب غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۱۵۶۲۵، ۰/۰۰۷۸۱۲۵، ۰/۰۰۳۹۰۶۲ و ۰/۰۰۱۹۵۳۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از متابولیت تهیه شد. لوله شماره ۹ به‌عنوان کنترل منفی بود، یعنی هیچ ماده آنتی‌سپتیکی به آن اضافه نشد. در ادامه به هر یک از لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف دارویی ۲۰میکرولیتر سوسپانسیون قارچ مخمری معادل با ۰/۵مک‌فارلند اضافه شد. در این آزمون از دو لوله به‌عنوان کنترل استفاده شد. برای اطمینان از نداشتن اثر سوء حلال متانولی روی ارگانیزم، از بیشترین غلظت متانول بدون متابولیت به‌عنوان کنترل منفی و از ایتورین A خالص، غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۱۵۶۲۵، ۰/۰۰۷۸۱۲۵، ۰/۰۰۳۹۰۶۲ و ۰/۰۰۱۹۵۳۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. لوله‌ها به‌مدت ۲۴ساعت در ۳۰°C در داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰دور در دقیقه انکوبه شدند. پس از انکوباسیون ۲۴ساعته، کدورت لوله‌ها بررسی شد. لوله قبل از اولین لوله‌ای که دارای رسوب بود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. یک‌میلی‌لیتر از این لوله و دو لوله قبل و دو لوله بعد از آن به پلیت‌های حاوی محیط کشت پوتیتودکستروزآگار تلقیح و توسط سوآپ استریل پخش و کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۰°C نگه‌داری شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) تعیین شد. این کار با سه تکرار انجام شد[22].

یافته‌ها

لیپوپپتید استخراج‌شده مشابه ایتورین A خریداری‌شده از شرکت سیگما هیچ‌گونه اثر آنتاگونیسمی علیه مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزئی*،

کاندیدا پاراپسیلوزیس نداشت (شکل‌های ۱ و ۲).

شکل ۱) رشد پنج گونه قارچ کاندیدا در برابر متابولیت‌های استخراج‌شده در مقایسه با شاهد منفی (چاهک)

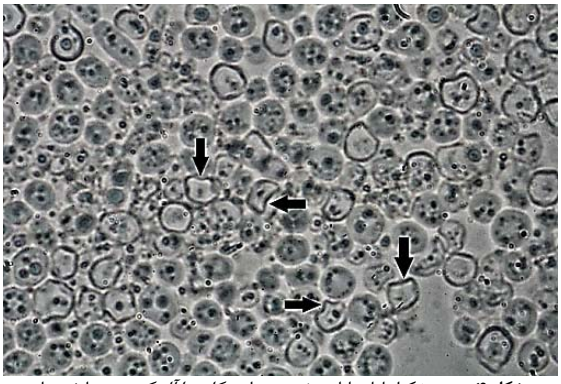


شکل ۲) رشد پنج گونه قارچ کاندیدا در برابر ایتورین A خالص خریداری‌شده از شرکت سیگما (چاهک)

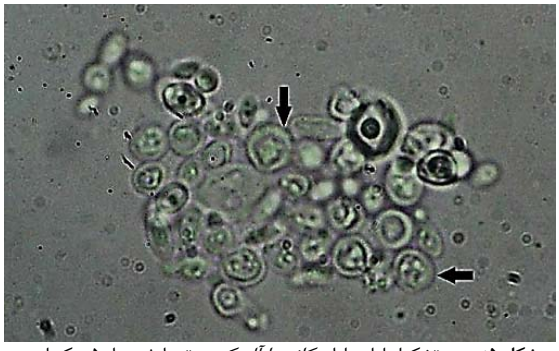
کاندیدا آلبیکنس قادر به تشکیل لوله زایا پس از ۲/۵ساعت انکوباسیون در سرم خون فاقد ایتورین A یا فاقد متابولیت استخراج‌شده از باکتری بود (شکل ۳)، اما ترکیب لیپوپپتیدی استخراج‌شده مشابه ایتورین A، تشکیل لوله زایا درقارچ *کاندیدا*

شکل ۳) تشکیل لوله زایای قارچ *کاندیدا آلبیکنس* پس از ۲/۵ساعت انکوباسیون در سرم خون (شاهد)

آلبیکنس را مهار کرد (شکل‌های ۴ و ۵). علاوه بر این، آثاری از تخریب سطحی سلول‌های مخمری کاندیدا توسط ترکیب استخراج‌شده دیده شد (شکل ۴).



شکل ۴) عدم تشکیل لوله زایا و تخریب سطحی *کاندیدا آلبیکنس* تیمارشده با ۵۰میکرولیتر لیپوپپتید استخراج‌شده پس از ۲/۵ساعت انکوباسیون در سرم خون



شکل ۵) عدم تشکیل لوله زایای *کاندیدا آلبیکنس* تیمارشده با ۵۰میکرولیتر ایتورین A پس از ۲/۵ساعت انکوباسیون در سرم خون

با وجود نتایج منفی چاهک‌گذاری برای قارچ‌های مخمری به‌منظور کنترل بیشتر، میزان MIC و MFC برای قارچ‌های مخمری کاندیدا انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده، رشد قارچ در تمامی لوله‌ها و رقت‌های لیپوپپتید را نشان داد، به‌طوری که در تمام لوله‌ها (مشابه لوله شاهد منفی فاقد ماده ایتورین A) رسوب مشاهده شد، که پس از تکان‌دادن لوله‌ها کدورت ایجاد شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده از تعیین مقدار MFC در هیچ‌یک از رقت‌های لیپوپپتید استخراجی مهار رشد گونه‌های مخمری کاندیدا مشاهده نشد.

بحث

هدف از انجام این تحقیق، استخراج و ارزیابی اثر ضدقارچی ترکیبات لیپوپپتیدی تولیدشده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01 بومی اصفهان علیه مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزئی*، *کاندیدا پاراپسیلوسیس* و *کاندیدا تروپیکالیس* بود.

مولکول ایتورین با تشکیل کمپلکس ایتورین- فسفولیپید- استرول نفوذپذیری لیپیدی غشای سلول‌های قارچ را توسط تشکیل منافذ یونی افزایش داده و ابتدا باعث نشت یون‌های پتاسیم و سپس ترکیبات ماکرومولکولی ضروری سلول می‌شود[23-25]. ایتورین، اسپورهای قارچ مخمری و کپکی را نیز نفوذپذیر کرده و لوله زایای قارچ هنگام جوانه‌زنی را مهار می‌کند[18 ، 19]. ترکیب لیپوپپتیدی مایکوسوبتیلین و ترکیب مشابه باسیلومایسین D (از خانواده ایتورین‌ها) جداشده از *باسیلوس سوبتیلیس*، توانایی مهار گونه‌های مختلف کاندیدا را نشان داده است[26 ، 27]. در مطالعه

حاضر ترکیبات لیپوپپتیدی استخراج‌شده از باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13-RW01، فاقد توانایی مهار رشد پنج گونه قارچ کاندیدا بود. *باسیلوس سوبتیلیس* با داشتن ترکیباتی نظیر مایکوسوبتیلین و باسیلومایسین قادر است بر استرول فسفولیپید غشای سلول قارچ‌ها اثر کند[28].

در این تحقیق برای اولین بار تاثیر لیپوپپتید استخراج‌شده بر تشکیل لوله زایای قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (پدیده رینولدز براد) بررسی شد. در سرم خالص انسان حاوی متابولیت‌های استخراج‌شده از *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01 و مخمر *کاندیدا آلبیکنس*، بعد از ۳ساعت انکوباسیون در ۳۷°C، تشکیل لوله زایا در این مخمر مهار شد. تلقیح مخمر *کاندیدا آلبیکنس* به سرم انسان باعث تشکیل لوله زایا شد. طول لوله ایجادشده ۲/۵برابر قطر سلول مادر، دیواره لوله موازی و در محل ایجاد لوله زایا فرورفتگی مشاهده نشد.

در هنگام تهاجم قارچ *کاندیدا آلبیکنس* به بافت‌های مخاطی ابتدا از مخمر لوله زایا ایجاد شده، به‌تدریج لوله طویل‌تر شده و ایجاد میسلیوم می‌کند. میسلیوم قارچ توانایی اتصال به جدار مخاط را داشته و به‌روش ترانسلوکاسیون می‌تواند از لابه‌لای سلول‌های مخاطی عبور و به بافت زیرین تهاجم کند. مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در مرحله میسلیال دارای مقدار بیشتری قند مانان است و این قند در چسبندگی قارچ به مخاط تاثیر دارد. ممانعت از ایجاد لوله زایا می‌تواند چسبندگی قارچ را به مخاط کمتر کند. همچنین اتصال مخمر به کاتتر خطر ایجاد بیماری در بیماران بستری در بیمارستان را افزایش می‌دهد. این امر امکان ایجاد بیوفیلم را برای قارچ فراهم می‌کند[1]. از طرفی هنگامی که سلول‌های دفاعی بدن یا ماکروفاژها سلول‌های مخمری را بلع می‌کنند، مخمر با ایجاد میسلیوم با انشعابات فراوان، ماکروفاژ را پاره کرده و از دست سیستم ایمنی می‌گریزد.

با توجه به نقش ایتورین در مهار ایجاد لوله زایا در این تحقیق، اهمیت آن برای پیشگیری از تهاجم قارچ مشخص می‌شود. براساس تحقیقات انجام‌شده توسط *ماگت‌دانا* و همکاران[23]، *ماگت‌دانا* و *پیپوکس*[24] و *تیمون* و همکاران[25]، نشان داده شده است که ترکیبات لیپوپپتیدی از خانواده ایتورین‌ها با تشکیل کمپلکس ایتورین- فسفولیپید- ارگوسترول نفوذپذیری لیپیدی غشای سلول‌های قارچ را توسط تشکیل منافذ یونی افزایش داده و باعث نشت یون‌ها و ترکیبات ماکرومولکولی ضروری سلول می‌شوند. احتمال دارد که با مکانیزم مشابهی، ایتورین A از ایجاد لوله زایا در *کاندیدا آلبیکنس* جلوگیری نماید، هر چند تحقیقات بیشتری برای اثبات این مورد ضروری است. هیچ مطالعه‌ای تاکنون در زمینه مهار لوله زایا در *کاندیدا آلبیکنس* توسط ایتورین انجام نشده است. تنها در یک مورد مطالعه، تاثیر مهاری ایتورین A استخراج‌شده از *باسیلوس سوبتیلیس* YM10-20 بر جوانه‌زنی اسپورهای قارچ *پنیسلیوم روکوفورتی* نشان داده شده است[19].

در مطالعه حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) بررسی شد. نتایج نشان داد هیچ یک از رقت‌های مختلف لیپوپپتید استخراجی *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* قادر به مهار پنج گونه قارچ کاندیدا نبودند. مطالعه‌ای تاثیر رقت‌های مختلف لیپوپپتید مایکوسوبتیلین (ترکیب لیپوپپتیدی از خانواده ایتورین‌ها) استخراج‌شده از *باسیلوس سوبتیلیس* را بررسی و میزان MIC برای *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* را به‌ترتیب ۳۲ و ۱۶میکروگرم بر میلی‌لیتر ذکر کرد[26]. مایکوسوبتیلین، فعال‌ترین فرم خانواده ایتورین بوده است و به‌شدت در برابر فسفولیپید و ارگوسترول گونه‌های مختلف مخمر فعال است[26, 29].

یکی از محدودیت‌های این مطالعه آن است که احتمالاً ایتورین تولیدشده توسط *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01 مورد استفاده در این مطالعه از نوع مایکوسوبتیلین نیست. لذا به‌منظور اطلاع از فعالیت ضدقارچی سایر ترکیبات لیپوپپتیدی خانواده ایتورین پیشنهاد می‌شود اثر ترکیبات استخراج‌شده از گونه‌ها و سویه‌های دیگر باسیلوس بر قارچ‌های مخمری مورد بررسی قرار گیرد. همچنین فعالیت ضدقارچی ترکیبات لیپوپپتیدی *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13RW01 بر سایر قارچ‌های مخمری و کپکی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

متابولیت‌های لیپوپپتیدی استخراج‌شده از *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* سویه M13RW01، هیچ‌گونه اثر مهاری یا کشندگی بر انواع مورد مطالعه قارچ مخمری کاندیدا ندارند، ولی ایجاد لوله زایا توسط مخمر *کاندیدا آلبیکنس* را مهار می‌کنند.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله بر خود لازم می‌دانیم که از سرکار خانم *فاطمه خسروانی‌پور*، به‌علت کمک برای تهیه و خریداری استاندارد ایتورین A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) از شرکت سیگما در آلمان تشکر و قدردانی نماییم.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

سهم نویسندگان: مهسا آقاعلی‌مارنانی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری (۵۰%)؛ محبوبه مدنی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۵۰%)

منابع مالی: این مطالعه استخراج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۳۱۰۳۹ مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان است.

منابع

1- Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011;3:1-11.

2- Baouiri M, Bouhdid S, Harki ELH, Sadiki M, Ouedrhiri W, Ibnsouda SK. Antifungal activity of Bacillus spp. Isolated from Calotropis procera AIT rhizosphere against Candida albicans. Asian J Tradit Med. 2015;8(2):213-7.

3- Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013;4(2):119-28.

4- Munimbazi C, Bullerman LB. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of Bacillus pumilus. J Appl Microbiol. 1998;84(6):959-68.

5- Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. Antifungal activity of Bacillus amyloliquefaciens NJN-6 volatile compounds against Fusarium oxysporum f. sp. cubense. Appl Environ Microbiol. 2012;78(16):5942-4.

6- Milner JL, SiloSuh L, Lee JC, He H, Clardy J, Handelsman J. Production of kanosamine by Bacillus cereus UW85. Appl Environ Microbiol. 1996; 62(8):3061-5.

7- Ranjbariyan A, Shams Ghahfarokhi M, Kalantari S, Razzaghi Abyaneh M. Molecular identification of antagonistic bacteria from Tehran soils and evaluation of their inhibitory activities toward pathogenic fungi. Iran J Biotechnol. 2011;3(3):140-6.
8- Stein T. Bacillus subtilis antibiotics: Structures syntheses and specific functions. Mol Microbiol. 2005;56(4):845-7.
9- Caldeira AT, Feio SS, Arteiro JM, Coelho AV, Roseiro JC. Environmental dynamics of Bacillus amyloquefaciens CCMI 1051 antifungal activity under different nitrogen patterns. J Appl Microbiol. 2007;104(3):806-16.
10- Prist FG, Goodfellow M, Shute LA, Berkeley RCW. Bacillus amyloliquefaciens sp. nov., nom. rev. Int J Syst Bacteriol. 1987;37(1):69-71.
11- Kerr JR. Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. Micro Ecol Health Dis. 1999;11:129-42.
12- Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, Hatakeda K, Shirata A. Antimicrobial activity of culture filtrate of Bacillus amyloliquefaciens RC-2 isolated from mulberry leaves. Phytopathology. 2001;91(2):181-7.
13- Cho SJ, Lee SK, Cha BJ, Kim YH, Shin KS. Detection and characterization of the gloeosporium gloeosporioides growth inhibitory compound iturin a from bacillus subtilis strain KS03. FEMS Microbiol Lett. 2003;223(1):47-51.
14- Environment Canada, Health Canada. Framework on the science-based risk assessment of micro-organisms under the Canadian environmental protection act, 1999 [Internet]. Canada: Environment and Climate Change Canada; 2011. [Update 2013 July 30; cited 2011 November 30]. Available from: http://www.ec.gc.ca/subsnouvelles-newsubs/default.asp?lang=En&n=120842D5-1.
15- Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of Bacillus subtilis against infection of Arabidopsis roots by Pseudomonas syringae is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol. 2004;134(1):307-19.
16- Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira RR. Biosurfactants: Potential applications in medicine. J Antimicrob Chemother. 2006;57(4):609-18.
17- Naghdifar SH, Madani M, Ahadi AM. Isolation and identification of inhibitory bacteria against pathogenic fungi from Isfahan using molecular method. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016;18(5):83-93. [Persian]
18- Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He WJ, et al. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A 2015;10(2):e0116871.
spikes against Fusarium graminearum. PLoS One.
19- Chitarra G, Breeuwer P, Nout MJR, Aelst AC, Rombouts FM, Abee T. Anantifungal compound produced by Bacillus subtilis YM 10-20 inhibits germination of Penicillium roqueforti conidiospores. J Appl Microbiol. 2003;94(2):159-66.
20- Cui TB, Chai HY, Jiang LX. Isolation and partial characterization of an antifungal protein produced by Bacillus licheniformis BS-3. Molecules. 2012;17(6):7336-47.
21- Athukorala SN, Fernando WG, Rashid KY. Identification of antifungal antibiotics of Bacillus species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. Can J Microbiol. 2009;55(9):1021-32.
22- Wang J, Zhao S, Qiu J, Zhou Q, Liu X, Xin X, et al. Purification and characterisation of a fungicidal peptide from Bacillus amyloliquefaciens NCPSJ7. J Food Sci. 2017;35(2):113-21.
23- Magetdana R, Ptak M, Peypoux F, Michel G. Pore-forming properties of iturin A a lipopeptide antibiotic. Biochim Biophys Acta Biomembr. 1985;815(3):405-9.
24- Maget Dana R, Peypoux F. Iturins a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. Toxicology. 1994;87(1-3):151-74.
25- Thimon L, Peypoux F, Wallach, J, Michel G. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiol Lett. 1995;128(2):101-6.
26- Fickers P, Guez JS, Damblon C, Leclere V, Bechet M, Jacques P, et al. High-level biosynthesis of the anteiso-C17 isoform of the antibiotic mycosubtilin in Bacillus subtilis and characterization of its candidacidal activity. J Appl Environ Microbiol. 2009;75(13):4636-40.
27- Tabbene O, Kalai L, Ben Slimene I, Karkouch I, Elkahoui S, Gharbi A, et al. Anti-candida effect of bacillomycin D-like lipopeptides from Bacillus subtilis B38. FEMS Microbiol Lett. 2011;316(2):108-14.
28- Price NP, Rooney AP, Swezey JL, Perry E, Cohan FM. Mass spectrometric analysis of lipopeptides from Bacillus strains isolated from diverse geographical locations. FEMS Microbiol Lett. 2007;271(1):83-9.
29- Nasir MN, Thawani A, Kouzayha A, Besson F. Interactions of the natural antimicrobial mycosubtilin with phospholipid membrane models. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010;78(1):17-23.