Archive of SID

Original Article

The Effect of Cyclic Lipopeptides of Bacillus atrophaeus (HNSQJYH170) on Candida Species

Seyedeh Solmaz Moghtadi Pisheh[1], Mahboobeh Madani[1*]

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

[*]Corresponding Author: **Mahboobeh Madani**, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email: mmadani66@gmail.com

Received: 7 Jan, 2017

Accepted: 13 May, 2017

Abstract

***Background and Objectives*:** Over the past years, several factors, such as broad spectrum of antibiotics, immunodeficiency, chemotherapy, and transplantation have increased the risk of fungal infections in human. Among the fungal pathogens, *Candida* species are the most common cause of invasive fungal infections. The aim of this study was to investigate the antifungal effect of *Bacillus atrophaeus* (HNSQJYH170) lipopeptides on *Candida* species.

Methods: In this experimental study, *Bacillus atrophaeus* (HNSQJYH170) isolated from Isfahan soil, was cultured in nutrient broth medium. Cell-free supernatant was collected by centrifugation and acidified by adding HCl. The obtained precipitate was collected by centrifugation and dissolved in the methanol solution 50%. Then, antifungal activity of lipopeptides against *Candida* species, was assessed by well diffusion method. Also, inhibitory effect of lipopeptide on germ tube production, was studied for *Candida albicans*.

Results: Results showed that *Bacillus atrophaeus* (HNSQJYH170) lipopeptides do not have inhibitory effect on germ tube production in %95 of *Candida albicans* cells.

Conclusion: According to the results of this research, probably *Bacillus atrophaeus* (HNSQJYH170) can inhibit *Candida albicans* invasion. Therefore, further researches are needed to confirm the results of this study.

Keywords: Bacillus atrophaeus; Lipopeptide; germ tube; Candida.

www.SID.ir

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوازدهم ، شماره سوم، خرداد ۹۷
صفحه ۱۹ الی ۲۷
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر لیپوپپتیدهای حلقوی *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) بر گونه‌های کاندیدا

سیده سولماز مقتدی‌پیشه[1]، محبوبه مدنی[1*]

چکیده

زمینه و هدف: طی سال‌های گذشته، فاکتورهای متعددی مانند طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، نقص ایمنی، شیمی‌درمانی و پیوند زدن؛ خطر ابتلا به عفونت‌های قارچی را در انسان افزایش داده است. در میان عوامل بیماریزای قارچی، گونه‌های *کاندیدا*، شایع‌ترین عامل عفونت‌های قارچی مهاجم هستند. هدف این مطالعه بررسی اثر ضد قارچی لیپوپپتیدهای *باسیلوس آتروفئوس*(سویه HNSQJYH170) برگونه‌های کاندیدا بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) جداشده از خاک اصفهان، در محیط نوترینت براث کشت داده شد. مایع رویی فاقد سلول به‌وسیله سانتریفوژ جمع‌آوری و با اضافه کردن HCl اسیدی شد. رسوب به‌دست‌آمده، جمع‌آوری و در محلول متانولی ۵۰٪ حل گردید، سپس فعالیت ضدقارچی لیپوپپتیدها با روش انتشار در چاهک، برعلیه گونه‌های *کاندیدا* ارزیابی شد. همچنین اثر مهاری لیپوپپتیدها در تشکیل لوله زایا برای *کاندیدا آلبیکنس* بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170)، اثر مهاری بر رشدگونه‌های کاندیدا ندارد، اما تشکیل لوله زایا را در ۹۵٪ از سلول‌های *کاندیدا آلبیکنس* مهار می‌کند.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این تحقیق، احتمالاً *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) می‌تواند از تهاجم *کاندیدا آلبیکنس* جلوگیری کند. بنابراین، انجام تحقیقات بیشتر در جهت تأیید نتایج این مطالعه ضروری است.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

**Moghtadi Pisheh SS, Madani M. The effect of cyclic lipopeptides of *Bacillus atrophaeus* (HNSQJYH170) on candida species.
Qom Univ Med Sci J 2018;12(3):19-27. [Full Text in Persian]**

[1]گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
محبوبه مدنی، گروه میکروب‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mmadani66@gmail.com

تاریخ دریافت:۹۵/۱۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۳

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کاندیدیازیس، طیفی از بیماری‌های ناشی از قارچ‌های فرصت‌طلب در افراد دچار نقص ایمنی است. گستره این بیماری‌ها از عفونت‌های سطحی و مخاطی ساده تا عفونت‌های سیستمیک، خطرناک و حتی عفونت‌های منتشره کشنده است. عوامل ایجادکننده این بیماری‌ها، قارچ‌های مخمری متعلق به جنس *کاندیدا* می‌باشند (۱). اگرچه *کاندیدا آلبیکنس*، شایع‌ترین عامل *کاندیدایی* مسئول عفونت در اشکال بالینی متفاوت کاندیدیازیس بوده و هست؛ ولی گونه‌های دیگر *متعلق به جنس کاندیدا*، ازجمله *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای* و *کاندیدا پارپسیلوزیس* نیز از بیماران جدا شده‌اند. در سال‌های اخیر، بر اهمیت بیماری‌های ناشی از گونه‌های *کاندیدا* به‌واسطه بروز مقاومت نسبی به برخی از داروهای ضدقارچی افزوده شده است (۲). امروزه، به سرعت سویه‌های مقاوم در حال ظهور هستند، درحالی‌که سرعت کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید کُند است، لذا همواره نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی به‌عنوان چالش عمده، مورد توجه بوده است؛ از این‌رو توجه محققین به برنامه‌های غربالگری میکروارگانیسم‌ها جهت تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی معطوف شده است (۳). در میان میکروارگانیسم‌های مفید مورد استفاده برای کنترل بیماری‌های قارچی، گونه‌های باسیلوس با توجه به دارا بودن فعالیت آنتاگونیستیک قوی، طیف گسترده فعالیت مهاری و قابلیت زیست‌پذیری بالا مورد توجه قرار گرفته‌اند (۴). گونه‌های باسیلوس به‌طور گسترده‌ای برای به انجام رساندن عملکرد کنترل زیستی خود قادر به تولید متابولیت‌هایی با فعالیت آنتاگونیستیک هستند که شامل آنتی‌بیوتیک‌هایی از جنس لیپوپپتید و پروتئین‌های ترشح‌شده با فعالیت ضدقارچی و ترکیبات فرّار با وزن مولکولی کم می‌باشند.

گونه‌های باسیلوس از گروه باکتری‌های هوازی، اسپوردار، گرم مثبت و باسیل‌های زنجیره‌ای هستند که در همه جا به‌صورت ساپروفیت وجود دارند (۵). *باسیلوس آتروفئوس* در سال ۱۹۸۹ به‌عنوان یک گونه جدید شناخته شد. این گونه در بیوتکنولوژی به‌عنوان یک منبع اندونوکلئازهای محدودالاثر ایفای نقش می‌کند (۶). پپتیدهای حلقوی ضدمیکروبی مشتق‌شده از گونه‌های مختلف باسیلوس‌ها برپایه توالی اسیدآمینه‌ها و انشعابات اسید چرب، در سه خانواده اصلی شامل: ایتورین‌ها - فنجیسین‌ها و سورفاکتین‌ها قرار می‌گیرند (۷). خانواده ایتورین‌ها، هپتاپپتیدهایی با اسید چرب بتاآمینو با فعالیت ضدقارچی بالا هستند. همچنین لیپوپپتیدهای حلقوی متشکل از ایتورین‌های E/D/C/A، باسیلومایسین‌های D/F/L/LC و مایکوسوبتیلین‌ها می‌باشند (۸). عامل NH_2 – زنجیره اسید چرب بتا آمینو، –COOH–۷– سرین و عامل در خانواده ایتورین‌ها در یک ساختار حلقوی قرار دارد. توانایی نفوذ در غشا، عامل عملکرد ضدقارچی ایتورین‌ها می‌باشد (۹). هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدقارچی لیپوپپتیدهای حلقوی *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) بر گونه‌های *کاندیدا* بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، باکتری *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) که در سال ۱۳۹۳، توسط نقدی‌فر و همکاران (۱۰) از خاک شهرستان اصفهان جداسازی شده بود، مورد بررسی قرار گرفت (۱۰). این باکتری در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد.

ابتدا نمونه‌های استاندارد قارچ‌های مخمری از کلکسیون میکروبی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه گردید (جدول)، سپس بعد از کشت بر روی محیط PDA، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جدول: لیست قارچ‌های مخمری استاندارد

نام قارچ	شماره استاندارد
کاندیدا آلبیکنس	CBS 2747
کاندیدا گلابراتا	ATCC 90030
کاندیدا تروپیکالیس	CBS 94
کاندیدا پارپسیلوزیس	ATCC 90018
کاندیدا کروزه‌ای	CBS 573

www.SID.ir

Archive of SID

در ادمه، دو کلنی منفرد از باکتری بومی *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) به محیط کشت نوترینت براث (گرم برلیتر)، شامل پپتون (۵ گرم)، عصاره مخمر (۲ گرم)، عصاره گوشت (۱ گرم) و کلرید سدیم (۵ گرم) منتقل و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار (۱۵۰ دور در دقیقه، دمای ۳۰ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، محیط کشت نوترینت براث به‌وسیله سانتریفوژ یخچال‌دار (در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه، مدت ۴۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد) سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری و به‌وسیله فیلتر سرنگی با قطر ۰/۲۲ نانومتر فیلتر گردید. pH به‌وسیله HCl ۶مولار، برابر ۲ تنظیم و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتیگراد (دمای مطلوب برای خانواده لیپوپپتیدهای حلقوی) نگهداری شد. پس از گذشت این زمان، سوپرناتانت در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۴۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. در ادامه، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب به‌دست‌آمده با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد، سپس در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ و رسوب در محلول متانولی ۵۰٪ حل گردید (۱۲،۱۱).

برای بررسی میزان مهار رشد قارچ‌های مخمری توسط متابولیت استخراج‌شده، از روش انتشار در چاهک استفاده گردید؛ بدین منظور ابتدا در ۱۵ محیط کشت PDA، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد، سپس داخل چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر متابولیت استخراجی (۵ پلیت)، ۵۰ میکرولیتر ایتورین استاندارد (خریداری‌شده از شرکت سیگما در آلمان) به‌عنوان شاهد مثبت (۵ پلیت) و ۵۰ میکرولیتر متانول ۵۰٪ به‌عنوان شاهد منفی (۵ پلیت) ریخته و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند تا متابولیت‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها، در محیط منتشر شوند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، میزان ۵۰ میکرولیتر از هریک از سوسپانسیون‌های قارچی (معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) به‌طور جداگانه روی سطح هریک از محیط‌های فوق به‌صورت چمنی و متراکم در سه جهت کشت داده شدند. بعد از انکوباسیون (دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، به‌مدت ۲۴ ساعت)، تشکیل هاله عدم رشد بررسی گردید.

این فرآیند برای تمام قارچ‌های مخمری شامل: *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* انجام گرفت. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند (۱۳). جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی متابولیت استخراجی، روش ماکرودایلوشن انجام شد. میزان ۲ میلی‌لیتر از لوله حاوی عصاره متانولی تولیدی (شامل: ۰/۵ میلی‌گرم رسوب در ۲ میلی‌لیتر متانول) به کمک سمپلر، به اولین لوله اضافه شد. بدین ترتیب برای تهیه استوک دارویی، غلظتی معادل ۰/۲۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به‌عنوان غلیظ‌ترین رقت و غلظت معادل ۰/۰۰۱۹۵۳ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر به‌عنوان رقیق‌ترین غلظت دارویی تهیه گردید. لوله شماره ۹ (فاقد ماده آنتی‌سپتیک) نیز به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. به تمامی لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف، ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی (معادل ۰/۵ مک‌فارلند) اضافه گردید، سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان، لوله‌ها از جهت کدورت بررسی شدند. تعیین MIC برای ۵ قارچ مخمری شامل: *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* انجام گرفت. آزمایش‌ها سه‌بار تکرار شدند (۱۴).

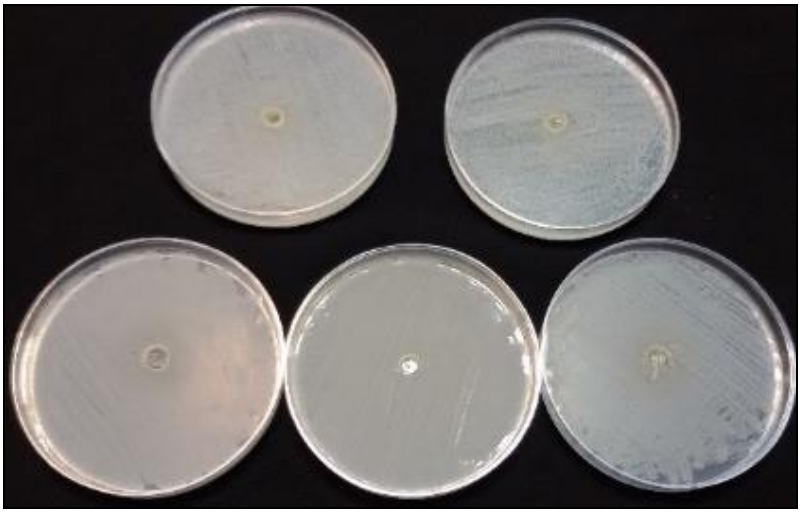
به‌منظور بررسی تأثیر متابولیت باکتریایی بر تشکیل لوله زایا در مخمر *کاندیدا آلبیکنس*، به ۰/۵ میلی‌لیتر از سرم انسان، ۵۰ میکرولیتر متابولیت استخراجی افزوده شد، سپس یک لوپ از کلنی *کاندیدا آلبیکنس* در آن وارد گردید. محتویات لوله با شیکر مخلوط و سوسپانسیون حاصل به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. یک لوله حاوی مخلوط سرم، *کاندیدا آلبیکنس* و ۵۰ میکرولیتر ایتورین خالص (خریداری‌شده از شرکت سیگما) به‌عنوان شاهد مثبت و یک لوله دیگر حاوی مخلوط سرم و *کاندیدا آلبیکنس* فاقد متابولیت به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. پس از گذشت این زمان، از هر لوله به‌طور جداگانه یک قطره بر روی یک لام گذاشته شد، سپس لام‌ها در زیر میکروسکوپ نوری، ازنظر ایجاد لوله زایا بررسی شدند (۱۵).

www.SID.ir

Archive of SID

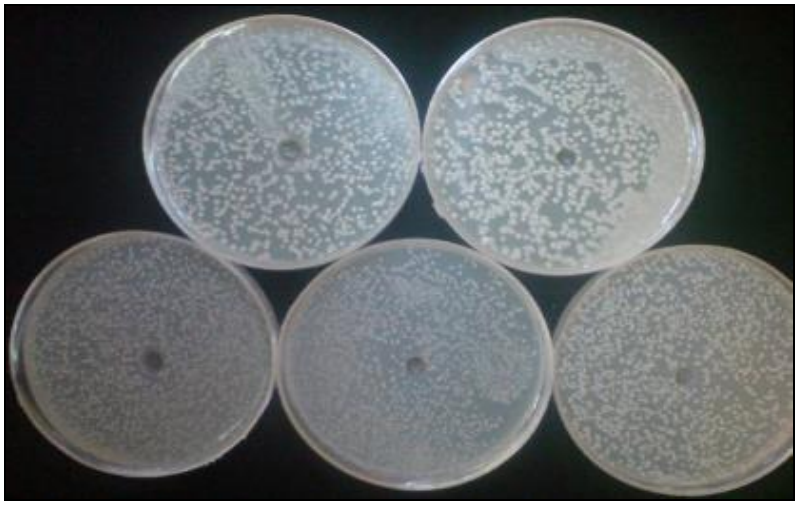
یافته‌ها

در پایان مرحله استخراج پس از سانتریفوژ، رسوب نرم به رنگ کرم تیره حاوی لیپوپپتیدهای حلقوی *باسیلوس آتروفئوس*، در دیواره فالکون‌ها ایجاد شد. میزان مهار رشد قارچ‌های مخمری به‌روش انتشار در چاهک توسط متابولیت استخراج‌شده در محیط تخمیری سنتتیک براث، پس از گذشت ۲۴ ساعت بررسی گردید. نتایج نشان داد متابولیت استخراجی حاوی لیپوپپتیدهای حلقوی *باسیلوس آتروفئوس*، اثر مهاری بر رشد هیچ‌یک از قارچ‌های مخمری (*کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس*) ندارد. همچنین ایتورین خالص شرکت سیگما بر روی هیچ‌یک از قارچ‌های مخمری مذکور، اثر بازدارندگی رشد را نشان نداد. نتایج بررسی مهار رشد قارچ‌های مخمری توسط متابولیت استخراجی و ایتورین خالص در شکل‌های شماره ۱ و ۲ نشان داده شده است.



شکل شماره ۱: بررسی مهار قارچ‌های مخمری توسط متابولیت.

(بالا از راست به چپ: *کاندیدا آلبیکنس* - *کاندیدا گلابراتا*، پایین از راست به چپ: *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*).



شکل شماره ۲: بررسی مهار قارچ‌های مخمری به‌وسیله ایتورین خالص .

(بالا از راست به چپ: *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، پایین از راست به چپ: *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس*).

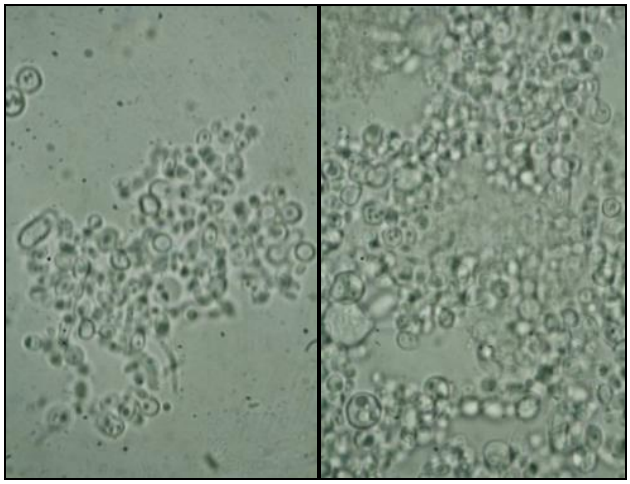
www.SID.ir

Archive of SID

برای اطمینان از نتایج به‌دست‌آمده مربوط به عدم بازدارندگی متابولیت استخراجی ناشی از *باسیلوس آتروفئوس* بر روی قارچ‌های مخمری، تعیین MIC برای هریک از قارچ‌های مخمری (*کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس*) انجام شد. در این بررسی، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در تمام لوله‌های رقت‌سازی‌شده در مورد گونه‌های مختلف *کاندیدا*، کدورت مشاهده گردید که نشان‌دهنده رشد *کاندیدا* در تمام لوله‌ها بود؛ به این ترتیب MIC برای هیچ‌کدام از گونه‌های *کاندیداها* تعیین نشد.

کاندیدا آلبیکنس در سرم فاقد متابولیت باکتریایی و ایتورین خالص، لوله زایایی با طول بیش از ۲/۵ برابر قطر سلول مادر ایجاد کرد. شکل شماره ۳، تشکیل لوله زایا توسط مخمر *کاندیدا آلبیکنس* را در حضور سرم انسان، در زیر میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد. لیپوپپتیدهای تولیدشده توسط *باسیلوس آتروفئوس*، تشکیل لوله زایا را در سلول‌های مخمری *کاندیدا آلبیکنس* تا ۹۵٪ مهار کردند. همچنین تخریب میسیلیوم و آسیب به دیواره سلول‌های مخمری مشاهده گردید. ایتورین خالص نیز به‌عنوان شاهد مثبت، تشکیل لوله زایا را در مخمر *کاندیدا آلبیکنس* مهار کرد (شکل شماره ۴).

شکل شماره ۳: تشکیل لوله زایا در *کاندیدا آلبیکنس* در حضور سرم انسان.



شکل شماره ٤: از راست به چپ: مشاهده میکروسکوپی *کاندیدا آلبیکنس* تحت تیمار با متابولیت استخراجی و *کاندیدا آلبیکنس* تحت تیمار با ایتورین خالص.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

سنتز متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها، از نقطه‌نظر تجاری و تحقیقات بسیار حایز اهمیت است. امروزه، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به بروز میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر دارو شده است، لذا تحقیق جهت یافتن منابع تولید ترکیباتی با اثرات ضدمیکروبی، ضروری به‌نظر می‌رسد (۱۶). لیپوپپتیدها آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط سویه‌های مختلف باسیلوس‌ها هستند. این ترکیبات شامل: ایتورین‌ها، فنجیسین‌ها و سورفاکتین‌ها می‌باشد. تاکنون، مطالعات زیادی مبنی بر استفاده از *باسیلوس*‌ها مانند *باسیلوس سوبتیلیس* و *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* به‌عنوان عوامل کنترل زیستی و نیز جداسازی لیپوپپتیدهای حلقوی از آن‌ها انجام شده است (۱۸،۱۷). تحقیقات در مورد ترکیبات ضدمیکروبی مشتق‌شده از *باسیلوس آتروفئوس* بسیار نادر است (۱۹)، و تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر جداسازی لیپوپپتیدهای حلقوی از باکتری *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) و بررسی اثر آن بر روی گونه‌های مختلف کاندیدا، همچنین بررسی تأثیر این متابولیت‌های استخراجی بر روی تشکیل لوله زایا در *کاندیدا آلبیکنس* گزارش نشده است. در تحقیق نقدی‌فر و همکاران، باکتری *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) از خاک اصفهان جداسازی شد و فعالیت مهاری این باکتری بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *موکور هیمالیس* برای اولین‌بار ثابت گردید و این سویه به‌عنوان یک سویه مناسب برای استفاده در تولید آنتی‌بیوتیک و مصارف کنترل بیولوژیک معرفی شد (۱۰). در مطالعه حاضر، لیپوپپتیدهای استخراج‌شده از *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) جداشده از خاک اصفهان، به روش انتشار در چاهک، اثر بازدارندگی مشخصی بر روی قارچ‌های مخمری *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* نشان نداد. در ضمن، ایتورین A استاندارد نیز بر روی هیچ‌یک از قارچ‌های مخمری ذکرشده، اثر بازدارندگی نداشت. با اضافه کردن متابولیت استخراج‌شده از *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170)، به لوله حاوی سرم انسان و مخمر *کاندیدا آلبیکنس*؛ تخریب دیواره سلول‌های مخمری و نیز عدم تشکیل لوله زایا مشاهده گردید.

لیپوپپتیدهای حلقوی، ازجمله ایتورین‌ها با ایجاد منافذ هدایت‌کننده یونی و اختلال در عملکرد غشاهای سیتوپلاسمی، باعث نشت یون‌های پتاسیم و دیگر ترکیبات حیاتی سلول شده که در نهایت، منجر به مرگ سلول‌ها می‌شوند (۴). در مطالعه‌ای، اثر مهاری مایکوسوبتیلین استخراجی از *باسیلوس سوبتیلیس* بر روی انواع گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوزیس* و *کاندیدا تروپیکالیس*، بررسی و اثر مهاری مشخصی مشاهده گردید (۱۴). مایکوسوبتیلین یک لیپوپپتید حلقوی از خانواده ایتورین است و بیشتر توسط *باسیلوس سوبتیلیس* تولید می‌شود. این ترکیب، به‌واسطه طول بیشتر زنجیره اسید چرب، تمایل بیشتری به ارگوسترول (استرول عمده قارچی) دارد و فعالیت ضدقارچی شدیدی برعلیه گونه‌های مخمری نشان می‌دهد (۸). باسیلومایسین D استخراج‌شده از *باسیلوس سوبتیلیس* B38 نیز دارای فعالیت ضدقارچی برعلیه *کاندیدا آلبیکنس* است (۲۰). در تحقیق حاضر، به احتمال زیاد متابولیت استخراج‌شده از *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170) دارای مایکوسوبتیلین و باسیلومایسین نبوده؛ زیرا اثر بازدارندگی بر روی گونه‌های *کاندیدا* مشاهده نشد. در تحقیقی مشابه، اثر ضدقارچی پپتید باکتریوسین ناشی از *باسیلوس سوبتیلیس* (سویه SK.DU.4) به‌واسطه روش انتشار در چاهک، بر روی *کاندیدا آلبیکنس* بررسی گردید، ولی فعالیت مهاری گزارش نشد (۱۳). بنابراین باتوجه به نتایج مطالعه حاضر، باکتریوسین نیز مانند ایتورین A قادر به مهار *کاندیدا آلبیکنس* نیست. باکتریوسین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های پروتئینی هستند که توسط گونه‌های مختلف باسیلوس تولید می‌شوند و دارای خواص ضدمیکروبی متنوعی نیز هستند. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره لیپوپپتیدهای *باسیلوس سوبتیلیس* سویه K_1 بر روی *کاندیدا آلبیکنس*، برابر ۰/۰۲±۲/۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر گزارش شده است (۲۱)، که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی ندارد. در تحقیق حاضر، نتایج MIC متابولیت استخراجی حاوی لیپوپپتیدها ناشی از سویه *باسیلوس آتروفئوس* جداشده از خاک اصفهان، هیچ فعالیت مهاری بر روی گونه‌های *کاندیدا* نشان نداد.

www.SID.ir

Archive of SID

هرچند متابولیت استخراجی رشد *کاندیدا آلبیکنس* را مهار نکرد، اما از تشکیل لوله زایا ممانعت کرد که این امر در جلوگیری از تهاجم *کاندیدا آلبیکس* به مخاط حایز اهمیت است. *کاندیدا آلبیکنس* یک قارچ مخمری است که توانایی ایجاد میسیلیوم را دارد. در واقع، مخمر *کاندیدا آلبیکنس* با ایجاد لوله زایا و میسیلیوم، توانایی چسبیدن به مخاط و تهاجم به بافت‌های مخاطی را کسب می‌کند. از طرفی، در مقابله با مکانیسم دفاعی میزبان، هنگامی‌که مخمر توسط ماکروفاژها بلع می‌شود، با ایجاد میسیلیوم و افزایش اندازه، بر ماکروفاژها فشار آورده و آن‌ها را پاره می‌کند. ایجاد میسیلیوم توسط *کاندیدا آلبیکس*، در تشکیل بیوفیلم بر روی کاتتر و سایر بسترها نقش دارد. با توجه به‌نحوه عملکرد این مخمر، تأثیر مهاری متابولیت استخراجی از *باسیلوس آتروفئوس* بر تشکیل لوله زایا، ارزش این لیپوپپتیدها را در کنترل کاندیدیاز نشان می‌دهد (۱۵).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، متابولیت‌های حاوی لیپوپپتیدهای حلقوی، استخراج‌شده از *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170)، قادر به مهار قارچ‌های مخمری *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کروزه‌ای*، *کاندیدا تروپیکالیس* و *کاندیدا پاراپسیلوزیس* نبودند. ایتورین A استاندارد نیز بر روی هیچ‌یک از قارچ‌های مخمری مذکور، اثر بازدارندگی نداشت. همچنین در بررسی میکروسکوپی، با اضافه کردن متابولیت استخراج‌شده ناشی از *باسیلوس آتروفئوس* (سویه HNSQJYH170)، به لوله حاوی سرم انسانی و مخمر *کاندیدا آلبیکنس*؛ تخریب دیواره سلول‌های مخمری و نیز عدم تشکیل لوله زایا مشاهده گردید که اهمیت این لیپوپپتیدها را در کنترل کاندیدیاز نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه (به شماره ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۳۱۰۴۰) مصوب دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان می‌باشد.
بدین وسیله از تمامی کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان که شرایط و امکانات لازم برای انجام این تحقیق را فراهم آوردند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1. Holland LM, Schroder MS, Turner SA, Taff H, Andes D, Grozer Z, et al. Comparative phenotypic analysis of the major fungal pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. Plos Pathogens 2014;10(9):1-18. PubMed

2. Mirhendi S H, Makimura K, Shidfar M R, Hossienpour L. Identification and frequency of *Candida* patient isolates by chromagar *Candida* Method. J Hamadan Univ Med Sci 2007;13(4):11-15. [Full Text in Persian] Link

3. Oskay M. Antifungal and antibacterial compounds from Streptomyces strains. Afr J Biotechnol 2009;8(13):3007-17. Link

4. Zhang X, Li B, Wang Y, Guo Q, Lu X, Li S, et al. Lipopeptides, a novel protein, and volatile compounds contribute to the antifungal activity of the biocontrol agent *Bacillus atrophaeus* CAB-1. Appl Microbiol Biotechnol 2013;97(21):9525–34. PubMed

5. Kerr JR. Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. Mehd J 1999;11:129-42. Link

6. Sun J, Zborowski M, Chalmers JJ. Quantification of both the presence, and oxidation state, of mn in *bacillus atrophaeus* spores and its imparting of magnetic susceptibility to the spores. Nih Public Access 2011;108(5):1119-29. PubMed

7. Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol 2007;16(3):115-25. PubMed

www.SID.ir

Archive of SID

8. Gong AD, Li HP, Yuan QS, Song XS, Yao W, He W, et al. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin a from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. Plos One 2015;10(2):1-18. PubMed

9. Yao D, Ji Z, Wang C, Qi G, Zhang L, Ma X, et al. Co-producing iturin A and poly-γ -glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. World J Microbiol Biotechnol 2012;28(3):985–91.

10. Naghdifar SH, Madani M, Ahadi AM. Isolation and identification of inhibitory bacteria against pathogenicfungi from Isfahan using molecular method. J Shahrekord Univ Med Sci 2016;18(5):83-93. [Full Text in Persian] Link

11. Chen H, Wang L, Su CX, Gong GH, Wang P, Yu ZL. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. Lett Appl Microbiol 2008;47(3):180-6. PubMed

12. Selselehzakeri S, Akhavansepahy A, Khanafari A, Saadatmand S. Investigation of *Bacillus* strains antifungal activity against some native species of *Fusarium fungi*. J Basic Sci 2010;20(1):59-69. [Full Text in Persian] Link

13. Baindara P, Mandal SM, Chawla N, Singh PK, Pinnaka AK. Characterization of two antimicrobial peptides produced by a halotolerant *Bacillus subtilis* strain SK.DU.4 isolated from a rhizosphere soil sample. Amb Express 2013;3(2):1-11. PubMed

14. Fickers P, Guez JS, Damblon C, Leclere V, Bechet M, Jacques P, et al. High-Level biosynthesis of the Anteiso-C_{17} isoform of the antibiotic mycosubtilin in *Bacillus subtilis* and characterization of its candidacidal activity. Appl Environ Microbiol 2009;75(13):4636-40. PubMed

15. Rippon JW. Medical mycology the pathogenic *Fungi* and the pathogenic *Actinomycetees*. 2nd ed. London: W B Sunders Company; 1988. p. 797.

16. Zhao Y, Selvara JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song H, et al. Antagonistic action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. Plos One 2012;9(3):1-11. Link

17. Zhang SM, Wang YX, Meng LQ, Li J, Zhao XY, Cao X, et al. Isolation and characterization of antifungal lipopeptides produced by endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* TF28. Afr J Microbiol Res 2012;6(8):1747-55. Link

18. Chitarra GS, Breeuwer P, Nout MJ, Aelst AC, Rombouts FM, Abee T. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10–20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. J Appl Microbiol 2003;49(2):159-66. PubMed

19. Ebrahimipour GH, Khosravibabadi Z, Sadeghi H, Aliahmadi A. Isolation, partial purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Bacillus atrophaeus*. Jundishapur J Microbiol 2014;7(9):1-7. PubMed

20. Tabbene O, Kalai L, Ben SI, 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. PubMed

21. Pathak KV, Keharia H. Identification of surfactins and iturins produced by potent fungal antagonist *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (Ficus benghalensis) tree using mass spectrometry. 3 Biotech 2014;4(3):283–95. PubMed

www.SID.ir