

©2018 ASP Ins., Afarand Scholarly Publishing Institute, Iran

ISSN: 2252-0805 *Horizon of Medical Sciences* 2018;24(1):1-6. DOI: 10.18869/acadpub.hms.24.1.1

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

## ARTICLE INFO

### Article Type

Original Research

### Authors

Aghaali Marnani M.<sup>1</sup> MSc,  
Madani M.\* PhD

### How to cite this article

Aghaali Marnani M, Madani M. Antifungal Effect of Lipopeptide Compounds Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M13RW01. *Horizon of Medical Sciences*. 2018 ;24(1):1-6.

## 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.

**Findings** 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.

**Conclusion** The lipopeptide metabolites produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M13RW01 have no inhibitory or fungal effects on the studied species of *Candida*, but inhibit the germ tubes production by *Candida albicans* yeast.

**Keywords** *Bacillus amyloliquefaciens*; Lipopeptides; *Candida*; Germ Tube; Minimal Inhibitory Concentration; Minimal Fungicidal Concentration

## CITATION LINKS

[1] Pathogenesis and treatment of oral ... [2] Antifungal activity of *Bacillus* spp. Isolated from ... [3] *Candida albicans* pathogenicity... [4] Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of ... [5] Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds ... [6] Production of kanosamine by *Bacillus* ... [7] Molecular identification of antagonistic bacteria from ... [8] *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures syntheses and ... [9] Environmental dynamics of *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051 antifungal ... [10] *Bacillus amyloliquefaciens* ... [11] Bacterial inhibition of fungal growth and ... [12] Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus* ... [13] Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory ... [14] Framework on the science-based risk assessment of micro-organisms under ... [15] Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots ... [16] Biosurfactants: Potential applications in ... [17] Isolation and identification of inhibitory bacteria ... [18] Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus* ... [19] Antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* ... [20] Isolation and partial characterization of an antifungal protein ... [21] Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species ... [22] Purification and characterisation of a fungicidal peptide from *Bacillus* ... [23] Pore-forming properties of iturin A a lipopeptide ... [24] Iturins a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and ... [25] Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ... [26] High-level biosynthesis of the anteiso- C17 isoform of the antibiotic mycosubtilin ... [27] Anti-candida effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus* ... [28] Mass spectrometric analysis of lipopeptides from *Bacillus* ... [29] Interactions of the natural antimicrobial ...

\*Microbiology Department, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

<sup>1</sup>Microbiology Department, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

### Correspondence

Address: Islamic Azad University, University Boulevard, Basij Boulevard, Falavarjan city, Isfahan, Iran. Post box: 84515/155. Postal Code: 84517-31167  
Phone: +98 (31) 36273427  
Fax: +98 (31) 2313260  
mmadani66@gmail.com

### Article History

Received: March 6, 2017

Accepted: November 1, 2017

ePublished: January 11, 2018

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

مهسا آقاعلی مارزانی 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 کروزی، کاندیدا پاراپسیلوسیسیس و کاندیدا ترئوپیکالیسیس انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق تجربی، باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس M13RW01 در محیط تخمیری PGY (پپتون-گلوکز-عصاره مخمر) اصلاح شده برای ۷۲ ساعت کشت داده شد. سپس ترکیبات لیپوپپتیدی تولیدشده در محیط توسط رسوب دهی با اسیدکلریدریک ۶مولار 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 تهیه شده، 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 ترئوپیکالیسیس و کاندیدا کروزی ایجاد می‌شود [1, 2]. در این میان کاندیدا آلبیکنس عامل اکثر عفونت‌های ایجادشده است [3].

با توجه به نگرانی عمومی در رابطه با مقاومت‌شدن 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 [4-6]. در میان تنوع زیستی موجود، باکتری‌ها به‌دلیل تنوع جمعیتی، همچنین توانایی تولید متابولیت‌های فعال

فصل‌نامه علمی-پژوهشی افق دانش

زیستی با خواص ضد میکروبی 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 ۵۰۰۰۰ دالتون جرم داشته و چندین خواص ضد میکروبی برای آنها تشخیص داده شده است. در این میان برجسته‌ترین آنها شامل سورفاکتین‌ها، ایتورین‌ها، پلی‌میکسین‌ها، فنجیسین‌ها، کورساکیناز، باسیتراسین، آلبولوتین، بوتریسیدین و کلروتین هستند [11, 12]. 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 [13, 12]. 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 آبی ندارند [14]. بنابراین اخیراً به استفاده از این ترکیبات به‌عنوان عوامل بیوکنترولی 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 کروزی، کاندیدا پاراپسیلوسیسیس و کاندیدا ترئوپیکالیسیس 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 [7]. این جدایه از باکتری در محیط نوترینت آگار (scharlau؛ اسپانیا) و محیط تخمیری PGY (پپتون-گلوکز-عصاره مخمر) اصلاح‌شده (دارای ۱۰ گرم بر لیتر پپتون، ۱۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۵ گرم بر لیتر کلرید سدیم، ۱/۵ گرم بر لیتر دی‌پتاسیم فسفات (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>))، منیزیم سولفات هپتا هیدرات (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)، آب مقطر با pH=۷ کشت داده شد و برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد [9].

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

مخمر *کاندیدا آلبیکنس*، میزان ۵ میلی‌لیتر خون انسان تهیه و داخل لوله آزمایش ریخته شد. سپس ۵ تا ۱۰ دقیقه زمان داده شد تا خون درون لوله لخته شود. به‌منظور جداسازی سرم، لوله حاوی خون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. به‌طور جداگانه مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سرم به سه لوله استریل وارد شد؛ لوله اول حاوی سرم و ۵۰ میکرولیتر محلول متانولی ۵۰٪ به‌عنوان شاهد منفی، لوله دوم حاوی سرم و ۵۰ میکرولیتر ایتورین A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO؛ ایالات متحده) به‌عنوان شاهد مثبت و لوله سوم حاوی ۵۰ میکرولیتر متابولیت لیپوپپتیدی استخراج‌شده و سرم بود. محتویات هر لوله توسط شیکر به‌خوبی با هم مخلوط شد. سپس به‌اندازه یک آنس از کشت خالص ۲۴ ساعته *کاندیدا آلبیکنس* در سه لوله وارد و لوله‌ها به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷°C و ۱۸۰ دور 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 یک میلی‌لیتر محیط سابورو دکستروز برات اضافه شد. درب لوله‌ها مسدود شد و در اتوکلاو، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱°C و فشار ۱۵ اتمسفر استریل شدند. برای تهیه استوک دارویی پس از پایین‌آمدن دمای لوله‌ها مقدار یک میلی‌لیتر 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، یک میلی‌لیتر از محتویات لوله شماره یک به لوله شماره ۲ انتقال داده شد و این روند تا لوله شماره ۸ ادامه پیدا کرد. سپس یک میلی‌لیتر از محتویات لوله شماره ۸ دور ریخته شد. به این ترتیب غلظت‌های ۰/۰۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵، ۰/۰۳۱۲۵، ۰/۰۱۵۶۲۵، ۰/۰۰۷۸۱۲۵، ۰/۰۰۳۹۰۶۲ و ۰/۰۱۹۵۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از متابولیت تهیه شد. لوله شماره ۹ به‌عنوان کنترل منفی بود، یعنی هیچ ماده آنتی‌سپتیک به آن اضافه نشد. در ادامه به هر یک از لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف دارویی ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ مخمری معادل ۰/۵ مک‌فارلند 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 و ۰/۰۰۳۹۰۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰°C در داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، کدورت لوله‌ها بررسی شد. لوله قبل از اولین لوله‌ای که دارای رسوب بود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. یک میلی‌لیتر از این لوله و دو لوله قبل و دو لوله بعد از آن به پلیت‌های حاوی محیط کشت پوتیتودکستروز آگار تلقیح و توسط سوآپ استریل پخش و کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C نگاه‌داری شدند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) تعیین شد. این کار با سه تکرار انجام شد [22].

### یافته‌ها

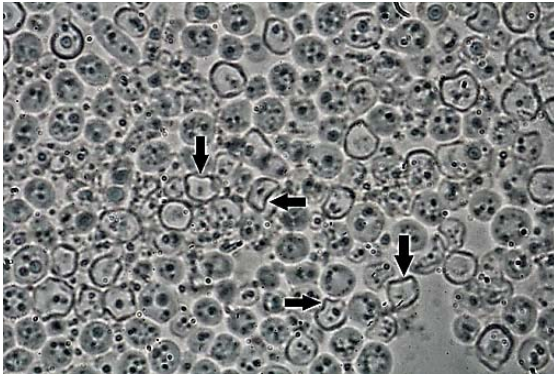
لیپوپپتید استخراج‌شده مشابه ایتورین A خریداری‌شده از شرکت سیگما هیچ‌گونه اثر آنتاگونیسمی علیه مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا کالیس*، *کاندیدا کروژنی*،

*کاندیدا کروژنی* CBS573، *کاندیدا تروپیکالیس* CBS94 و *کاندیدا پاراپسیلوسیسی* ATCC90018 از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند. استرین‌های قارچی در پلیت‌های حاوی پوتیتودکستروز آگار (PDA) (Scharlau؛ اسپانیا) کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵°C گرماگذاری شدند.

به‌منظور استخراج ایتورین A از باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس* M13-RW01، به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت PGY که در یک فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتری تهیه شده بود، ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری *باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس*، معادل ۰/۵ مک‌فارلند تلقیح شد. این محیط در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰°C و ۱۵۰ rpm انکوبه شد. بعد از ۱۸ ساعت، ۱۲ میلی‌لیتر از این محیط با پلیت استریل و زیر هود لامینار به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت PGY اضافه شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰°C و ۱۵۰ rpm برای ۷۲ ساعت انکوبه شد. سپس محیط در شرایط استریل در لوله‌های فالکن تقسیم شد و برای ۴۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۱۶۰۰۰x و دمای ۵°C سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دور ریخته شد و مایع رویی توسط فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. pH فیلتره حاصل با اضافه‌کردن اسیدکلریدریک (HCL) ۶ مولار به ۲ رسانده شد. برای این منظور هر بار به‌کمک سمپلر مقداری اسید به فیلتره اضافه و پس از تکان دادن ظرف به‌منظور یکنواخت‌نمودن فیلتره، pH آن اندازه‌گیری شد. فیلتره به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۵°C در یخچال نگاه‌داری شد. سپس فیلتره حاوی رسوب در لوله‌های فالکن تقسیم و برای ۳۰ دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۵°C و دور ۱۶۰۰۰x سانتریفیوژ شد. این بار مایع رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل دوبار با آب مقطر دیونیزه استریل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵°C و دور ۱۶۰۰۰x سانتریفیوژ و شست‌وشو داده شد. تمامی مراحل فوق در شرایط استریل در زیر هود لامینار در مجاورت یخ خشک و کنار شعله انجام شد [14, 18-20]. مقدار ۰/۵ میلی‌گرم رسوب استخراج‌شده که حاوی متابولیت‌های ضدقارچی بود، در یک میلی‌لیتر محلول متانولی ۵۰٪ حل شد و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار برای ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰x و در دمای ۵°C سانتریفیوژ و سپس مایع رویی توسط فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. مایع فیلتره نهایی به‌صورت یک میلی‌لیتر 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 ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد و با کمک سمپلر مقدار ۲۰ میکرولیتر 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 مترام داده شد. سپس توسط پیپت‌پاستور استریل در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کشت PDA، یک چاهک به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد و داخل چاهک‌ها با ۵۰ میکرولیتر عصاره متانولی حاوی لیپوپپتید پر شد. سپس این پلیت‌ها در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. این آزمون برای مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا کروژنی*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *کاندیدا گلابراتا*، *کاندیدا پاراپسیلوسیسی* انجام شد. به‌عنوان شاهد مثبت در یک چاهک ۵۰ میکرولیتر ایتورین A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO؛ ایالات متحده) و به‌عنوان شاهد منفی در یک چاهک میزان ۵۰ میکرولیتر متانول ۵۰٪ ریخته شد. آزمایشات سه‌بار تکرار شدند [21].

به‌منظور بررسی اثر متابولیت استخراج‌شده بر تشکیل لوله زایا در



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



شکل ۵) عدم تشکیل لوله زایای کاندیدا/آلبیکنس تیمارشده با ۵۰ میکرولیتر ایتورین A پس از ۲/۵ ساعت 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 به‌دست آمده، 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 تکان دادن لوله‌ها کدورت ایجاد شد. براساس نتایج به‌دست آمده از تعیین مقدار MFC در هیچ‌یک از رقت‌های لیپوپپتید استخراجی مهار رشد گونه‌های مخمری کاندیدا مشاهده نشد.

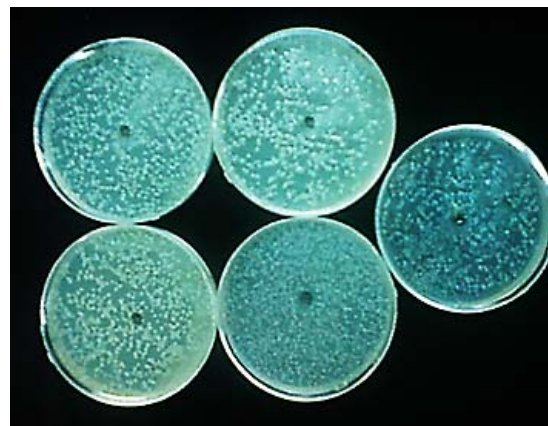
### بحث

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 کروزی، 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، اسپوره‌های 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 باسیلوماپسین D (از خانواده ایتورین‌ها) جداسازی شده از باسیلوس سوبتیلیس، توانایی مهار گونه‌های مختلف کاندیدا را نشان داده است [26، 27]. در مطالعه



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



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

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



شکل ۳) تشکیل لوله زایای قارچ کاندیدا/آلبیکنس پس از ۲/۵ ساعت 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 استخراج شده دیده شد (شکل ۴).

تأثیر 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 به ترتیب ۳۲ و ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر ذکر کرد<sup>[26]</sup>. مایکوسوبتیلین، فعال‌ترین فرم خانواده ایتورین بوده است و به شدت در برابر فسفولیپید و ارگوسترول گونه‌های مختلف مخمر فعال است<sup>[26, 29]</sup>.

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 به منظور 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*، به علت 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 آقاعلی‌مارزانی (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

- Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol.* 2011;3:1-11.
- Baouiri M, Bouhdid S, Harki ELH, Sadiki M, Ouedrhiri W, Ibensouda SK. Antifungal activity of *Bacillus* spp. Isolated from *Calotropis procera* AIT rhizosphere against *Candida albicans*. *Asian J Tradit Med.* 2015;8(2):213-7.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119-28.
- Munimbazi C, Bullerman LB. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J Appl Microbiol.* 1998;84(6):959-68.
- 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.
- 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.

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<sup>[28]</sup>.

در این تحقیق برای اولین بار تأثیر 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 ۳ ساعت 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 ۲/۵ برابر 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، به تدریج لوله طویل‌تر شده و ایجاد میسلیم می‌کند. میسلیم قارچ توانایی اتصال به جدار مخاط را داشته و به روش ترانسولوکاسیون می‌تواند از لابه‌لای سلول‌های مخاطی عبور و به بافت زیرین تهاجم کند. مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در مرحله میسلیم دارای مقدار بیشتری قند مانان است و این قند در چسبندگی قارچ به مخاط تأثیر 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<sup>[1]</sup>. از طرفی هنگامی که سلول‌های دفاعی بدن یا ماکروفاژها سلول‌های مخمری را بلع می‌کنند، مخمر با ایجاد میسلیم 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<sup>[23]</sup>، *ماگت‌دانا* و *پیپوکس*<sup>[24]</sup> و *تیمون* و همکاران<sup>[25]</sup>، 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، تأثیر مهاری ایتورین A استخراج‌شده از *باسیلوس سوبتیلیس* YM10-20 بر جوانه‌زنی اسپوره‌های قارچ *پنیسیلیوم روکوفورتی* نشان داده شده است<sup>[19]</sup>.

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

- 2015;10(2):e0116871.  
spikes against *Fusarium graminearum*. PLoS One.
- 19- Chitarra G, Breeuwer P, Nout MJR, Aelst AC, Rombouts FM, Abee T. Antifungal 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.
- 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* CCM1 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-news/subs/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