

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

Seyedeh Solmaz Moghtadi Pishah<sup>1</sup>, Mahboobeh Madani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>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.

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

سیده سولماز مقتدی پیشه<sup>۱\*</sup>، محبوبه مدنی<sup>۱\*</sup>

### 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) بر گونه‌های کاندیدا بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی باسیلوس آتروفئوس (سویه HNSQJYH170) جدا شده از خاک اصفهان، در محیط نوترینت براث کشت داده شد. مایع رویی فاقد سلول به وسیله سانتریفوژ جمع‌آوری و با اضافه کردن HCl اسیدی شد. رسوب به دست آمده، جمع‌آوری و در محلول متانولی ۵۰٪ حل گردید، سپس فعالیت ضدقارچی لیپوپپتیدها با روش انتشار در چاهک، بر علیه گونه‌های کاندیدا ارزیابی شد. همچنین اثر مهار لیپوپپتیدها در تشکیل لوله زایا برای کاندیدا آلیکینس بررسی گردید.

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

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

<sup>۱</sup>گروه میکروبی‌شناسی، واحد فلورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

\*نویسنده مسئول مکاتبات:

محبوبه مدنی، گروه میکروبی‌شناسی، واحد فلورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:  
mmadani66@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۲۳

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Moghtadi Pishesh 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]

## مقدمه

کاندیدایزیس، 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 *کاندیدا*یی مسئول عفونت در اشکال بالینی متفاوت کاندیدایزیس بوده و هست؛ ولی گونه‌های دیگر متعلق به جنس *کاندیدا*، از جمله *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 کند است، لذا همواره نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات ضد میکروبی 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 مهارتی 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 لیوپیتید و پروتئین‌های ترشح‌شده با فعالیت ضدقارچی و ترکیبات فرار 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 محدودالثر ایفای نقش می‌کند (۶). پپتیدهای حلقوی ضد میکروبی مشتق‌شده از گونه‌های مختلف باسیلوس‌ها برپایه توالی اسید آمینه‌ها و انشعابات اسید چرب، در سه خانواده اصلی شامل: ایتورین‌ها - فنجیسین‌ها و سورفاکتین‌ها قرار می‌گیرند (۷). خانواده ایتورین‌ها، هپتاپپتیدهایی با اسید چرب بتا آمینو با فعالیت ضدقارچی بالا هستند. همچنین لیوپیتیدهای حلقوی متشکل از ایتورین‌های E/D/C/A، باسیلوماپسین‌های D/F/L/LC و مایکوسوبتیلین‌ها می‌باشند (۸). عامل  $\gamma$ -COOH - سرین و عامل  $\text{NH}_2$  - زنجیره اسید چرب بتا آمینو، 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 لیوپیتیدهای 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
<i>کاندیدا آلبیکنس</i>	CBS 2747
<i>کاندیدا گلابراتا</i>	ATCC 90030
<i>کاندیدا تروپیکالیس</i>	CBS 94
<i>کاندیدا پارپسیلوزیس</i>	ATCC 90018
<i>کاندیدا کروزه‌ای</i>	CBS 573

این فرآیند برای تمام قارچ‌های مخمری شامل: کاندیدا آلیکنس، 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 ماکرودایلوژن 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 بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلیظ‌ترین رقت و غلظت معادل ۰/۰۱۹۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر 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 آلیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس انجام گرفت. آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند (۱۴).

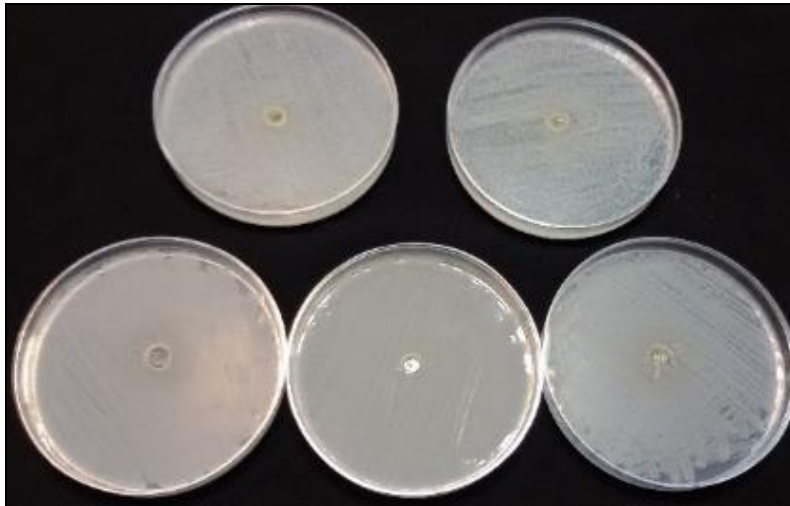
به‌منظور بررسی تأثیر متابولیت باکتریایی بر تشکیل لوله زایا در مخمر کاندیدا آلیکنس، به ۰/۵ میلی‌لیتر از سرم انسان، ۵۰ میکرولیتر متابولیت استخراجی افزوده شد، سپس یک لوپ از کلنی کاندیدا آلیکنس در آن وارد گردید. محتویات لوله با شیکر مخلوط و سوسپانسیون حاصل به مدت ۲/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. یک لوله حاوی مخلوط سرم، کاندیدا آلیکنس و ۵۰ میکرولیتر ایتورین خالص (خریداری شده از شرکت سیگما) به‌عنوان شاهد مثبت و یک لوله دیگر حاوی مخلوط سرم و کاندیدا آلیکنس 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، از نظر ایجاد لوله زایا بررسی شدند (۱۵).

در ادامه، 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 لیوپیتیدهای حلقوی) نگهداری شد. پس از گذشت این زمان، سوپرناتانت در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۴۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. در ادامه، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب به‌دست آمده با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد، سپس در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ و رسوب در محلول متانولی ۵۰٪ حل گردید (۱۱، ۱۲). برای بررسی میزان مهار رشد قارچ‌های مخمری توسط متابولیت استخراج شده، 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 (خریداری شده 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 هر یک از سوسپانسیون‌های قارچی (معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) به‌طور جداگانه روی سطح هر یک از محیط‌های فوق به‌صورت چمنی و متراکم در سه جهت کشت داده شدند. بعد از انکوباسیون (دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۴ ساعت)، تشکیل هاله عدم رشد بررسی گردید.

## یافته‌ها

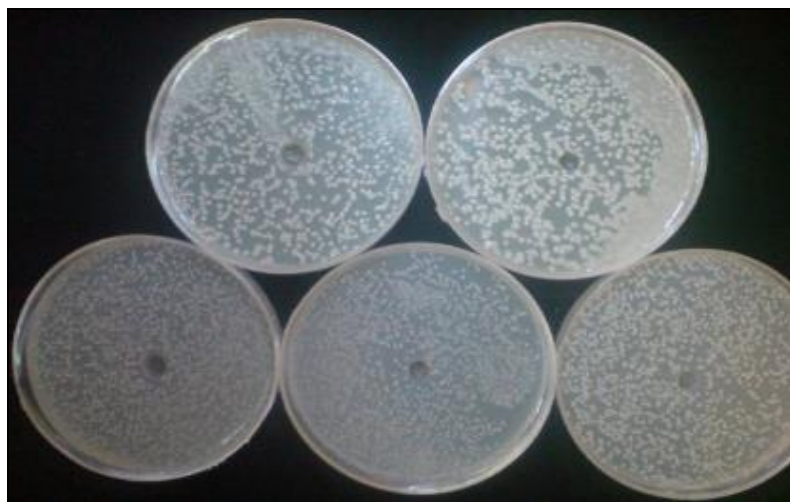
در پایان مرحله استخراج پس از سانتریفوژ، رسوب نرم به رنگ کرم تیره حاوی لیوپیتیدهای حلقوی باسیلوس آتروفئوس، در دیواره فالكونها ایجاد شد. میزان مهار رشد قارچ‌های مخمری به روش انتشار در چاهک توسط متابولیت استخراج شده در محیط تخمیری سنتتیک براث، پس از گذشت ۲۴ ساعت بررسی گردید. نتایج نشان داد متابولیت استخراجی حاوی لیوپیتیدهای حلقوی

باسیلوس آتروفئوس، اثر مهاری بر رشد هیچ‌یک از قارچ‌های مخمری (کاندیدا آلیکنس، 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 آلیکنس - کاندیدا گلابراتا، پایین از راست به چپ: کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس).

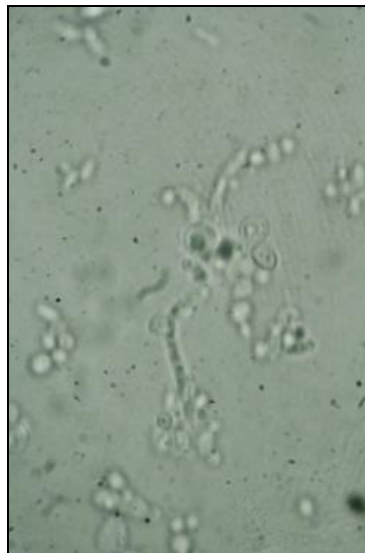


شکل شماره ۲: بررسی مهار قارچ‌های مخمری به وسیله ایتورین خالص.

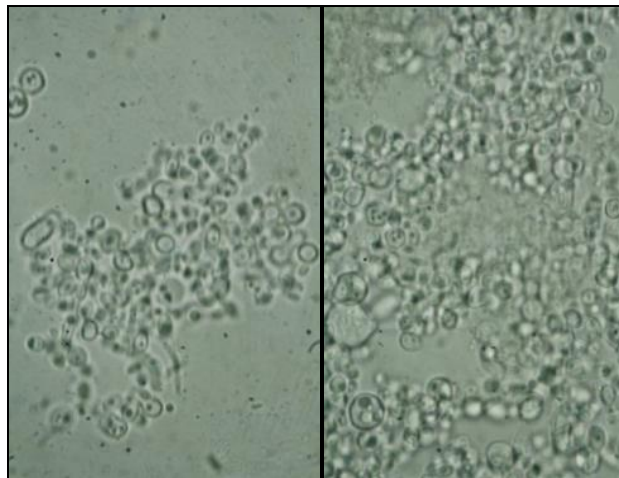
(بالا از راست به چپ: کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا، پایین از راست به چپ: کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا پاراپسیلوزیس).

کاندیدا آلیکنس 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 آلیکنس را در حضور سرم انسان، در زیر میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد. لیوپیتیدهای تولیدشده توسط باسیلوس آتروفئوس، تشکیل لوله زایا را در سلول‌های مخمری کاندیدا آلیکنس 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 آلیکنس مهار کرد (شکل شماره ۴).

برای اطمینان از نتایج به‌دست‌آمده مربوط به عدم بازدارندگی متابولیت استخراجی ناشی از باسیلوس آتروفئوس بر روی قارچ‌های مخمری، تعیین MIC برای هر یک از قارچ‌های مخمری (کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزه‌ای، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس) انجام شد. در این بررسی، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در تمام لوله‌های رقت‌سازی شده در مورد گونه‌های مختلف کاندیدا، کدورت مشاهده گردید که نشان‌دهنده رشد کاندیدا در تمام لوله‌ها بود؛ به این ترتیب MIC برای هیچ کدام از گونه‌های کاندیدا/ها تعیین نشد.



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



شکل شماره ۴: از راست به چپ: مشاهده میکروسکوپی کاندیدا آلیکنس تحت تیمار با متابولیت استخراجی و کاندیدا آلیکنس تحت تیمار با ایتورین خالص.

## بحث

سنتر متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط میکروارگانسیم‌ها، از نقطه‌نظر تجاری و تحقیقات بسیار حایز اهمیت است. امروزه، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به بروز میکروارگانسیم‌های مقاوم در برابر دارو شده است، لذا تحقیق جهت یافتن منابع تولید ترکیباتی با اثرات ضد میکروبی، ضروری به نظر می‌رسد (۱۶). لیپوپیتیدها آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط سویه‌های مختلف باسیلوس‌ها هستند. این ترکیبات شامل: ایتورین‌ها، فنجیسین‌ها و سورفاکتین‌ها می‌باشد. تاکنون، مطالعات زیادی مبنی بر استفاده از باسیلوس‌ها مانند باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس آمیلولیکوئی فاسینس به‌عنوان عوامل کنترل زیستی و نیز جداسازی لیپوپیتیدهای حلقوی از آن‌ها انجام شده است (۱۷، ۱۸). تحقیقات در مورد ترکیبات ضد میکروبی مشتق‌شده از باسیلوس آتروفئوس بسیار نادر است (۱۹)، و تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر جداسازی لیپوپیتیدهای 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 آلیکنس گزارش نشده است. در تحقیق نقدی‌فر و همکاران، باکتری باسیلوس آتروفئوس (سویه HNSQJYH170) از خاک اصفهان جداسازی شد و فعالیت مهارتی این باکتری بر روی قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس و موکور هیمالیس برای اولین بار ثابت گردید و این سویه به‌عنوان یک سویه مناسب برای استفاده در تولید آنتی‌بیوتیک و مصارف کنترل بیولوژیک معرفی شد (۱۰). در مطالعه حاضر، لیپوپیتیدهای استخراج‌شده از باسیلوس آتروفئوس (سویه HNSQJYH170) جداشده از خاک اصفهان، به روش انتشار در چاهک، اثر بازدارندگی مشخصی بر روی قارچ‌های مخمری کاندیدا آلیکنس، 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 آلیکنس؛ تخریب

دیواره سلول‌های مخمری و نیز عدم تشکیل لوله زایا مشاهده گردید.

لیپوپیتیدهای حلقوی، از جمله 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 مهارتی مایکوسوبتیلین استخراجی از باسیلوس سوبتیلیس بر روی انواع گونه‌های کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا پاراپسیلوزیس و کاندیدا تروپیکالیس، بررسی و اثر مهارتی مشخصی مشاهده گردید (۱۴). مایکوسوبتیلین یک لیپوپیتید 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 بر علیه گونه‌های مخمری نشان می‌دهد (۸). باسیلومایسین D استخراج‌شده از باسیلوس سوبتیلیس B38 نیز دارای فعالیت ضدقارچی بر علیه کاندیدا آلیکنس 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 پیتید باکتریوسین ناشی از باسیلوس سوبتیلیس (سویه SK.DU.4) به‌واسطه روش انتشار در چاهک، بر روی کاندیدا آلیکنس بررسی گردید، ولی فعالیت مهارتی گزارش نشد (۱۳). بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر، باکتریوسین نیز مانند ایتورین A قادر به مهار کاندیدا آلیکنس نیست. باکتریوسین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های پروتئینی هستند که توسط گونه‌های مختلف باسیلوس تولید می‌شوند و دارای خواص ضد میکروبی متنوعی نیز هستند. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره لیپوپیتیدهای باسیلوس سوبتیلیس سویه K<sub>1</sub> بر روی کاندیدا آلیکنس، برابر ۰/۰۲±۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شده است (۲۱)، که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی ندارد. در تحقیق حاضر، نتایج MIC متابولیت استخراجی حاوی لیپوپیتیدها ناشی از سویه باسیلوس آتروفئوس جداشده از خاک اصفهان، هیچ فعالیت مهارتی بر روی گونه‌های کاندیدا نشان نداد.

## نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، متابولیت‌های حاوی لیپوپپتیدهای حلقوی، استخراج‌شده از باسیلوس آتروفنوس (سویه HNSQJYH170)، قادر به مهار قارچ‌های مخمری کاندیدا آلیکنس، 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 آتروفنوس (سویه HNSQJYH170)، به لوله حاوی سرم انسانی و مخمر کاندیدا آلیکنس؛ 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.

هرچند متابولیت استخراجی رشد کاندیدا آلیکنس را مهار نکرد، اما از تشکیل لوله زایا ممانعت کرد که این امر در جلوگیری از تهاجم کاندیدا آلیکنس به مخاط حایز اهمیت است. کاندیدا آلیکنس یک قارچ مخمری است که توانایی ایجاد میسیلیوم را دارد. در واقع، مخمر کاندیدا آلیکنس 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، هنگامی که مخمر توسط ماکروفاژها بلع می‌شود، با ایجاد میسیلیوم و افزایش اندازه، بر ماکروفاژها فشار آورده و آن‌ها را پاره می‌کند. ایجاد میسیلیوم توسط کاندیدا آلیکنس، در تشکیل بیوفیلم بر روی کاتتر و سایر بسترها نقش دارد. با توجه به نحوه عملکرد این مخمر، تأثیر مهار متابولیت استخراجی از باسیلوس آتروفنوس بر تشکیل لوله زایا، ارزش این لیپوپپتیدها را در کنترل کاندیدیاز نشان می‌دهد (۱۵).

## References:

- 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
- Mirhendi S H, Makimura K, Shidfar M R, Hossienpour L. Identification and frequency of *Candida* patient isolates by chromagat *Candida* Method. J Hamadan Univ Med Sci 2007;13(4):11-15. [Full Text in Persian] Link
- Oskay M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. Afr J Biotechnol 2009;8(13):3007-17. Link
- 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
- Kerr JR. Bacterial inhibition of fungal growth and pathogenicity. Mehd J 1999;11:129-42. Link
- 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
- Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol 2007;16(3):115-25. PubMed



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- $\gamma$ -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. Baidara 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<sub>17</sub> 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*. 2<sup>nd</sup> ed. London: W B Saunders 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 atropheaus*. 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