



Synergistic Antifungal Effects of *Lactobacillus* Strains and Nano Selenium on Growth Inhibition of *Candida albicans*

Sadegh Cheraghi Saray¹, Ali Hosseinkhani^{1*}, Akbar Taghizadeh¹
Hamid Mohammadzadeh¹, Hamed Hamishehkar²

1. Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran
2. Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2018/11/08
Accepted: 2019/01/17
Available online: 2019/03/06

Article Subject:

Medical Mycology

IJMM 2019; 12(6): 432-441

Corresponding author:

Ali Hosseinkhani
Department of Animal
Science, University of Tabriz,
Tabriz, Iran

Email:

hosseinkhani2000@yahoo.com

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: Candidiasis is a fungal infection caused by *Candida albicans*. Uncontrolled use of antibiotics has resulted in drug resistance. This study has been conducted to find a suitable alternative for these drugs.

Materials and Methods: Primarily, standard and clinical isolates of *C. albicans* were collected. In order to identify clinical isolates from lambs, the conventional mycological methods CHROM candida agar and germ tube production were used. The antifungal effects of experimental treatments were evaluated against *C. albicans* by disk diffusion and measuring the growth inhibition zone in well diffusion method. Moreover, the MIC and MFC of experimental treatments were determined by microdilution method.

Results: The results of the well and disk diffusion methods showed that in both tests, the highest growth inhibition zone of the "Nano selenium-loaded lactobacillus" treatment was 29/41 and 27.64 mm, respectively on the standard strain of *C. albicans*. The results of MIC and MFC determination showed that in all experimental periods, "Nano selenium-loaded lactobacillus" and "Nano selenium+Lactobacillus" treatments with 473.80 and 511.91 µg/ml for MIC and 807.66 and 845.28 µg/ml for MFC had the lowest amounts compared to other treatments ($P < 0.05$).

Conclusions: The results of microbial tests on *C. albicans* confirm the antifungal ability of "Nano selenium-loaded lactobacillus" treatment. Therefore, provided that this test is repeated in future studies and the accuracy of these results is ensured, manufacturing of this product or industrial supplements with this formulation may be advised for prevention or treatment of fungal infections.

Keywords: *Candida albicans*, Nano selenium, *Lactobacillus*, Lamb, Resistance, Antifungal

Copyrights © 2019, Iran J Med Microbiol This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.

How to cite this article:

Cheraghi Saray S, Hosseinkhani A, Taghizadeh A, Mohammadzadeh H, Hamishekar H. Synergistic Antifungal Effects of *Lactobacillus* Strains and Nano Selenium on Growth Inhibition of *Candida albicans*. Iran J Med Microbiol. 2019; 12 (6) :432-441



اثرات ضدقارچی و هم‌افزایی برخی گونه‌های لاکتوباسیل و نانوذرات سلنیوم بر مهار رشد کاندیدا آلبیکنس

صادق چراغی‌سرای^۱، علی حسین‌خانی^{۱*}، اکبر تقی‌زاده^۱، حمید محمدزاده^۱، حامد همیشه‌کار^۲

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. فرماسیوتیکس، مرکز تحقیقات کاربردی علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: کاندیدیازیس عفونت قارچی است که عامل اصلی آن کاندیدا آلبیکنس است. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان آن، باعث افزایش مقاومت دارویی شده است. تحقیق حاضر با امید یافتن جایگزین مناسب دارویی برای این عفونت انجام گرفت.

مواد و روش کار: در وهله اول، گونه‌های استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس جمع‌آوری شده و به‌منظور تشخیص جدایه‌های بالینی از به‌ها، از روش‌های معمول قارچ‌شناسی شامل پدیده ایجاد لوله زایا و کروم کاندیدا آگار استفاده شد. اثرات ضدقارچی تیمارهای آزمایشی روی مهار رشد کاندیدا آلبیکنس به روش انتشار دیسک و انتشار چاهک به‌صورت اندازه‌گیری هاله رشدنیافتگی ارزیابی شد. همچنین مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) نمونه‌های آزمایشی به روش رقت‌سازی تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که بیشترین هاله رشدنیافتگی برای روش چاهک و دیسک به‌ترتیب با ۲۹/۴۱ و ۲۷/۶۴ میلی‌متر متعلق به تیمار «نانوسلنیوم بارگذاری‌شده در لاکتوباسیل‌ها» روی گونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس بود. بررسی MIC و MFC در تحقیق حاضر، حاکی از آن بود که تیمارهای «نانوسلنیوم بارگذاری‌شده در لاکتوباسیل‌ها» و «نانوسلنیوم + لاکتوباسیل» به‌ترتیب با مقادیر ۴۷۳/۸۰ و ۵۱۱/۹۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MIC و با ۸۰۷/۶۶ و ۸۴۵/۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MFC پایین‌ترین میانگین‌ها را برای هر دو آزمون فوق داشتند ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از آزمون‌های میکروبی توان ضدقارچی بالای تیمار «نانوسلنیوم بارگذاری‌شده در لاکتوباسیل‌ها» را تأیید کرد، لذا به شرط تکرار آزمایش و تأیید نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان ساخت دارو یا مکمل با این فرمولاسیون را برای استفاده درمانی توصیه کرد.

کلمات کلیدی: کاندیدا آلبیکنس، نانوسلنیوم، لاکتوباسیلوس، بره، مقاومت، ضدقارچی

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۷
پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۷
انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵
موضوع:
قارچ‌شناسی پزشکی
IJMM1397;12(6): 432-441

نویسنده مسئول:
علی حسین‌خانی
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،
دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

پست الکترونیک:
hosseinkhani2000@yahoo.com

مقدمه

کاندیدیازیس از جمله شایع‌ترین بیماری‌های قارچی است که در سال‌های اخیر گسترش چشمگیری داشته است. عامل بیماری، قارچی فرصت‌طلب از جنس کاندیدا است که به‌صورت هم‌زیست در دستگاه گوارش، مخاطات و سطح پوست وجود دارد (۵). مهم‌ترین گونه‌ای که موجب بیماری می‌شود کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) نام دارد. سایر گونه‌های جنس کاندیدا به‌ویژه تروپیکالیس (*Candida tropicalis*) و دابلینینسیس

کاندیدیازیس از جمله شایع‌ترین بیماری‌های قارچی است که در سال‌های اخیر گسترش چشمگیری داشته است. عامل بیماری، قارچی فرصت‌طلب از جنس کاندیدا است که به‌صورت هم‌زیست در دستگاه گوارش، مخاطات و سطح پوست وجود دارد (۵). مهم‌ترین گونه‌ای که موجب بیماری می‌شود کاندیدا آلبیکنس (*Candida albicans*) نام دارد. سایر گونه‌های جنس کاندیدا به‌ویژه تروپیکالیس (*Candida tropicalis*) و دابلینینسیس

تراکم لاکتوباسیلی 10^8 Cfu/g و میانگین غلظت نانوسلنیوم استفاده‌شده در تیمارهای آزمایشی $0.3 \mu\text{g/g}$ با درصد خلوص $99/95$ بود.

تهیه منبع سلنیومی و گونه‌های لاکتوباسیلی

نانوسلنیوم سنتز شده در شرکت نانو مواد ایرانیان (مشهد، ایران) به روش احیای شیمیایی نمک سدیم سلنیت با اسید آمینه آل-سیستئین با اندازه $40-15 \text{ nm}$ استفاده شد. سوش‌های لاکتوباسیلی به صورت آمپول‌های لیوفیلیزه از مرکز باکتری‌های صنعتی ایران فراهم آمد. هنگام آماده‌سازی تیمار ترکیبی گونه‌های لاکتوباسیلی از کشت تازه ۲۴ ساعته در محیط کشت MRS برات و آگار به نسبت مساوی از هر گونه با تراکم باکتری 10^8 cfu/ml استفاده شد. مشخصات و کد اختصاصی چهار سوپه منتخب لاکتوباسیلی به شرح ذیل است:

Lactobacillus casei subsp 1608 (39392) ATCC,
Lactobacillus plantarum 1058 (8014) ATCC, *Lactobacillus acidophilus 1643 (20079) DSM*, *Lactobacillus reuteri 1655 (20016) DSM*.

تهیه گونه استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس

نمونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس (*ATCC10231*) به صورت آمپول لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران تهیه شد. به منظور فعال‌سازی روی محیط SDA حاوی کلرامفنیکل کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C درجه قرار گرفت. سپس سوسپانسیون سلولی با تراکم 10^8 cfu/ml از آن تهیه شد. به منظور جمع‌آوری گونه‌های بالینی نیز در مجموع ۱۹۲ نمونه از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز در دوره‌ای تقریباً ۱۰۰ روزه، از واژن حیوانات آزمایشی (بره‌های شناسنامه‌دار) به وسیله سوپ استریل جمع‌آوری شد. پس از اخذ نمونه‌ها در لوله فالکون‌های حاوی 1 cc سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه انتقال داده، بر محیط کشت SDA قرار گرفته و سپس ۲۴ ساعت درون انکوباتور 37°C درجه گرماگذاری شدند. پس از رشد، از هر نمونه لام تهیه کرده و نمونه‌های کاندیدایی طبق جدول‌های استاندارد، شناسایی و دوباره کشت داده شدند (۱۲).

بارگذاری نانوسلنیوم در توده باکتری‌های لاکتوباسیلی

طبق روش پیشنهادی Stabnikova و همکاران (۱۶) گونه‌های منتخب لاکتوباسیلی، به منظور تولید توده سلولی غنی‌شده با نانوسلنیوم استفاده شدند. بدین صورت که سطوح مختلف گونه‌های

نظیر فلوکونازول و ایتراکونازول است؛ اما بررسی‌های مختلف مقاومت گونه‌های کاندیدا را نسبت به داروهای ضدقارچی نشان می‌دهد (۱۴). از این رو استفاده از مواد بیولوژیکی می‌تواند یکی از راه‌حل‌های مناسب برای جایگزینی داروهای ضدقارچی باشد. برخی گونه‌های لاکتوباسیلی با داشتن سابقه طولانی ضد میکروبی (۴) و همچنین نانوذره سلنیوم علاوه بر نقش آنتی‌اکسیدانی، با درجه تأثیرپذیری بیشتری نسبت به شکل معمول عنصر سلنیوم، به وسیله مکانیسم تولید فوتوکاتالیتیکی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تخریب غشا و دیواره سلول میکروبی، قطع انتقال انرژی، مهار فعالیت آنزیمی و مهار سنتز DNA میکروب مهاجم (۸) می‌توانند گزینه مناسبی برای جایگزینی داروهای آنتی‌بیوتیکی باشند (۱۹). طبق اندک آزمایش‌های صورت گرفته، سلنیوم اولین عنصر کم‌یابی است که اثرات ضد میکروبی آن در تلفیق با لاکتوباسیل‌ها مطالعه شده است (۲۱). استفاده ترکیبی از نانوذرات و گونه‌های لاکتوباسیلی این امکان را می‌دهد که سمیت و عوارض احتمالی هر دو کاهش داده شود؛ چراکه دو ماده در ترکیب با هم اثرات ضد میکروبی یکدیگر را افزایش داده و نیاز به استفاده از دوزهای بالای هر کدام را کاهش می‌دهند (۹). از آنجایی که به‌طور عمده، اتصال به سلول‌های مخاطی واژن اولین گام در ایجاد عفونت از طریق گونه‌های کاندیدا بوده (۱۷) و با توجه به توان بالقوه عنصر سلنیوم و لاکتوباسیل‌ها در تأثیر بر ایزوله‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس (۱۹)، امکان استفاده از آنها در پیشگیری و درمان می‌تواند در کانون توجه قرار گیرد. در صورتی می‌توان استفاده گسترده‌ای از این دو مکمل برای از بین بردن میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیکی کرد که ابتدا در سطح آزمایشگاهی یا روی مدل‌های حیوانی که جمعیت قارچی مشابهی دارند، مطالعات اولیه صورت گرفته و اثرات این ترکیبات به‌طور کامل بررسی شود. از این رو تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات هم‌افزایی و ترکیبی گونه‌های لاکتوباسیلی و نانوذرات سلنیوم روی مهار گونه‌های استاندارد کاندیدا آلبیکنس و بالینی جدا شده از بره‌ها در سطح آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

گروه‌های آزمایشی

تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی بود که اجرای تمامی مراحل آن به تأیید کمیته ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز رسید. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از: شاهد، لاکتوباسیل، نانوسلنیوم، نانوسلنیوم + لاکتوباسیل، نانوسلنیوم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها. لازم به ذکر است که

تعیین اثر ضد قارچی تیمارهای آزمایشی به روش دیسک و چاهک

در این پژوهش از محیط کشت SDA محتوی کلرامفنیکل برای کاندیدا/آلبیکنس استفاده شد. سوسپانسیون قارچی معادل نیم مک فارلند تهیه و به وسیله سواب استریل روی لایه سطحی محیط کشت مالیده شد. سپس به وسیله پیت پاستور استریل در مرکز پلیت گوده ایجاد شده و میزان ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه‌های آزمایشی با سمپلر در این گوده‌ها ریخته شد. در روش دیگر بررسی، دیسک بلانک به کار رفت که غلظت‌های مختلف نمونه‌ها روی این دیسک‌ها ریخته و پس از خشک شدن، در مرکز پلیت‌های کشت داده شده قرار گرفت. در نهایت پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس منتقل شده و هاله‌های رشدنیافتگی، پس از طی شدن زمان رشد قارچ بررسی شدند.

تعیین حداقل غلظت مهار رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC)

در این روش ابتدا ۱۰۰ μl از محیط SDA به هریک از ۹۶ چاهک میکروپلیت استریل اضافه شد. سپس ۱۰۰ μl از رقت ppm ۱۰۰ تیمارهای آزمایشی به خانه اول میکروپلیت اضافه شد و رقت ۵۰ ppm در خانه اول به دست آمد. سپس با سمپلر ۱۰۰ μl از خانه اول به خانه دوم اضافه شد و این عمل تا خانه آخر، یعنی ۹ خانه تکرار شد تا رقت‌های دلخواه (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰) به دست آید. در نهایت به همه چاهک‌ها ۱۰ μl از سوسپانسیون قارچی مربوط به هر ایزوله اضافه شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس رشد کلنی قارچ‌ها بررسی و MIC و MFC نمونه‌های آزمایشی تعیین شد. غلظتی که ۹۹/۹۹ درصد قارچ‌ها در آن کشته شده بودند، به عنوان MFC و چاهک شفاف به عنوان MIC انتخاب شد.

بررسی آماری

آنالیز آماری با نرم افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها

تصویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات سلنیوم و توزیع اندازه ذرات در شکل ۲ و نمودار ۱ نشان داده شده است.

لاکتوباسیلی به عنوان مایه تلقیح به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت با دو غلظت نانوسلنیوم در دستگاه انکوباتور شیکردار کشت داده شدند. محیط کشت پایه، ملاس نیشکر استریل با بریکس ۴۰ درصد بود. نانوسلنیوم در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان‌های مشخص به محیط کشت اضافه شد و میزان رشد باکتری‌های لاکتوباسیلی در محیط کشت غنی از نانوسلنیوم به وسیله اندازه گیری دانسیته توده گونه‌های لاکتوباسیلی از طریق دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد. در نهایت به منظور تعیین میزان جذب نانو سلنیوم بارگذاری شده در ساختار گونه‌های لاکتوباسیلی، روش جذب اتمی کوره‌ای به کار رفت (۷).

تشخیص گونه‌های آلبیکنس: پدیده ایجاد لوله زایا و کشت در محیط کروم کاندیدا آگار

برای تشخیص گونه‌های کاندیدا/آلبیکنس، پدیده ایجاد لوله زایا بررسی شد. بدین صورت که یک کلونی از قارچ با ۱cc سرم انسانی مخلوط و ۵ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت زمان تعیین شده، مقداری از سوسپانسیون را بین لام و لامل قرار داده و زیر میکروسکوپ، ایجاد لوله زایا بررسی شد. کاندیدا/آلبیکنس در این محیط لوله زایا ایجاد می کند که طول آن ۲ الی ۳ برابر قطر سلول مادر است. در حالی که سایر گونه‌های کاندیدا، لوله زایای بسیار کوتاهی داشته یا اصلا لوله زایا ایجاد نمی کنند. در روشی دیگر، کشت در محیط کروم آگار کاندیدا انجام شد. بدین ترتیب که یک کلونی از کشت تازه کاندیدا، روی محیط کروم کاندیدا آگار به صورت خطی کشت داده و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. بعد از گذشت ۲ روز، رنگ ایجاد شده کلونی روی محیط کشت بررسی شد؛ بدین صورت که کلنی سبز رنگ (شکل ۱) مشخصه بارز کاندیدا/آلبیکنس بود (۱۳).

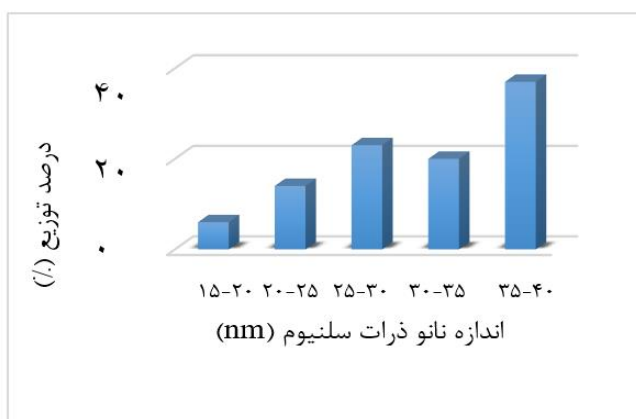


شکل ۱. کلنی‌های سبز رنگ کاندیدا/آلبیکنس در محیط کروم کاندیدا آگار

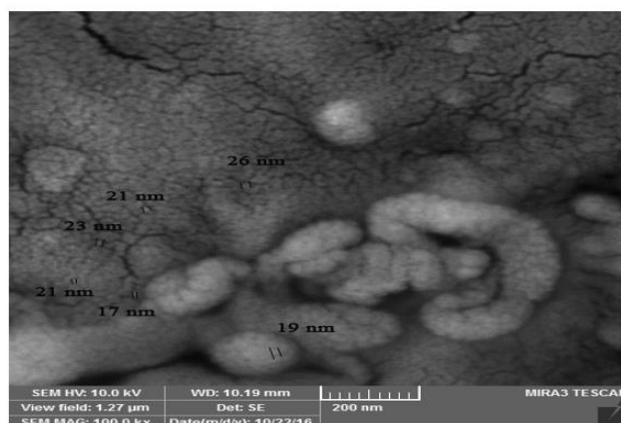
بازدارندگی را به‌ترتیب برای انتشار از چاهک و دیسک داشت. کمترین میانگین برای اثر بازدارندگی در هر دو روش مربوط به تیمار «لاکتوباسیل» بود. همچنین علی‌رغم تأثیر مثبت بازدارندگی تیمار «نانوسلنیوم» و «نانوسلنیوم + لاکتوباسیل» تفاوت آماری معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد ($P > 0.05$). نمونه‌ای از توان ضدقارچی تیمارهای آزمایشی به‌صورت مشاهده‌هاله رشدنیافتگی در شکل ۳ نشان داده شده است.

اثر ضدقارچی تیمارهای آزمایشی به روش انتشار چاهک و دیسک

نتایج به‌دست‌آمده از روش چاهک و دیسک در جدول‌های ۱ و ۲ گزارش شده است. یافته‌های حاصل در هر دو روش نشان داد، بین تیمارهای آزمایشی «نانوسلنیوم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها» با ۲۹/۴۱ و ۲۷/۶۴ میلی‌متر، بیشترین اثر



نمودار ۱. درصد توزیع اندازه ذرات



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات سلنیوم



(ب)



(الف)

شکل ۳. نمونه‌ای از ناحیه مهار رشد مخمر کاندیدا/آلبیکنس از طریق تیمارهای آزمایشی: الف (روش دیسک) ب (روش چاهک)

جدول ۱. خاصیت ضدقارچی تیمارهای آزمایشی به روش انتشار از چاهک (برحسب میلی متر)

میانگین		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	لاکتوباسیل ها
۱۳/۴۲±۱/۰۵ ^c	۱۶/۳۶±۱/۰۳ ^c	۱۰/۷۲	۱۵/۳۱	۱۲/۳۵	۱۸/۰۹	۱۷/۲۱	۱۵/۷۰	نانوسلنیوم
۲۰/۴۸±۱/۳۸ ^b	۲۲/۶۰±۱/۲۳ ^b	۱۷/۶۴	۲۲/۰۷	۲۱/۷۲	۲۳/۱۶	۲۲/۱۰	۲۱/۹۴	لاکتوباسیل + نانوسلنیوم
۲۲/۳۸±۱/۵۲ ^b	۲۳/۵۰±۱/۴۴ ^b	۲۰/۱۹	۲۲/۱۰	۲۳/۲۰	۲۰/۹۱	۲۳/۷۶	۲۷/۴۹	نانوسلنیوم
۲۷/۲۵±۱/۵۵ ^a	۲۹/۴۱±۱/۵۸ ^a	۲۶/۱۶	۲۸/۲۵	۲۶/۵۴	۲۸/۸۳	۲۹/۰۷	۳۱/۱۶	بارگذاری شده در لاکتوباسیل ها

۱. حروف غیرمشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها است ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار است.

۲. هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۲. خاصیت ضد قارچی تیمارهای آزمایشی به روش انتشار از دیسک (برحسب میلی متر)

میانگین		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	لاکتوباسیل ها
۱۱/۳۸±۱/۱۰ ^c	۱۵/۵۶±۱/۱۴ ^c	۹/۷۵	۱۳/۶۵	۱۰/۳۷	۱۷/۳۰	۱۴/۰۳	۱۵/۷۴	نانوسلنیوم
۱۸/۲۴±۱/۲۴ ^b	۲۰/۶۸±۱/۳۳ ^b	۱۴/۲۷	۲۱/۲۰	۱۹/۰۶	۲۱/۹۵	۲۱/۴۰	۱۸/۹۰	لاکتوباسیل + نانوسلنیوم
۱۸/۵۴±۱/۳۰ ^b	۲۲/۵۰±۱/۵۱ ^b	۱۵/۸۰	۲۰/۸۸	۱۷/۶۶	۲۱/۳۴	۲۲/۱۷	۲۵/۲۶	نانوسلنیوم
۲۴/۷۲±۱/۳۴ ^a	۲۷/۶۴±۱/۶۰ ^a	۲۲/۹۳	۲۵/۶۸	۲۵/۳۸	۲۸/۳۰	۲۵/۸۵	۲۸/۹۲	بارگذاری شده در لاکتوباسیل ها

۱. حروف غیرمشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها است ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار است.

۲. هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

به دست آمده، کمترین میانگین های MFC با ۸۰۷/۶۶ و ۸۴۵/۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر، به ترتیب مربوط به تیمارهای «نانوسلنیوم بارگذاری شده در لاکتوباسیل ها» و «نانوسلنیوم + لاکتوباسیل» بود. بین دو تیمار یادشده، تفاوت آماری معنی داری وجود نداشت ($P > 0.05$). همچنین بیشترین غلظت کشندگی قارچی و یا به نوعی ضعیف ترین تیمار استفاده شده برای کشتن مخمر، تیمار مربوط به «لاکتوباسیل» بود (جدول ۴). بررسی نتایج مربوط به میانگین کل MIC و MFC مشخص کرد که از لحاظ حساسیت بین گونه های کاندیدا آلبیکنس آزمایش شده در مقایسه با تیمارها، اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.05$). بدین صورت که بیشترین حساسیت مربوط به گونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس و کمترین حساسیت متعلق به گونه بالینی آن بود.

اثر ضدقارچی تیمارهای آزمایشی به روش MIC و MFC

تعیین MIC نمونه ها نشان داد مکمل های آزمایش شده، هم در حالت جداگانه و هم در صورت استفاده توأم، دارای فعالیت ضدقارچی هستند. بدین نحو که تیمارهای «نانوسلنیوم بارگذاری شده در لاکتوباسیل ها» و «نانوسلنیوم + لاکتوباسیل» به ترتیب با مقادیر ۴۷۳/۸۰ و ۵۱۱/۹۱ میکروگرم بر میلی لیتر از میانگین MIC پایین تری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند که نشان دهنده قدرت زیاد این مکمل ها در جلوگیری از رشد پاتوژن های کاندیدا آلبیکنس بود و تفاوت معنی داری از این لحاظ با سایر تیمارها داشتند ($P < 0.05$). همچنین بیشترین میانگین MIC مربوط به تیمار «لاکتوباسیل» بود (جدول ۳). طبق نتایج

جدول ۳. میزان حداقل غلظت مهار (MIC) تیمارهای آزمایشی بر علیه گونه‌های کاندیدا/آلبیکنس (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

میانگین		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	لاکتوباسیل‌ها
۸۶۲/۶۲±۳۸/۶ ^a	۷۵۴/۳۷±۳۳/۴۹ ^a	۹۹۳/۷۴	۷۷۴/۳۸	۸۵۸/۶۲	۶۹۹/۱۶	۷۳۸/۵۰	۷۸۹/۵۷	نانوسلنیوم
۷۲۸/۳۰±۳۴/۱۵ ^b	۶۴۲/۴۷±۳۰/۱۱ ^b	۸۶۴/۵۱	۶۸۷/۴۰	۷۱۸/۲۰	۵۹۱/۶۱	۶۰۲/۱۷	۶۴۸/۴۲	لاکتوباسیل+ نانوسلنیوم
۶۳۱/۲۶±۳۱/۶۷ ^c	۵۱۱/۹۰±۲۷/۷۸ ^c	۷۰۶/۱۹	۵۴۶/۱۳	۶۲۳/۲۹	۵۲۰/۴۷	۵۶۴/۳	۴۶۹/۱۱	نانوسلنیوم
۵۸۸/۴۸±۲۷/۹۴ ^c	۴۷۳/۸۰±۲۶/۲۵ ^c	۶۷۳/۲۵	۵۲۴/۹۶	۵۹۵/۸۱	۴۶۹/۸۲	۴۹۶/۴	۴۲۶/۶۱	بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها

۱. حروف غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار است.

۲. هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۴. میزان حداقل غلظت کشندگی (MFC) تیمارهای آزمایشی بر علیه گونه‌های کاندیدا/آلبیکنس (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

میانگین		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	لاکتوباسیل‌ها
۱۲۲۶/۵۴±۴۹/۸۱ ^a	۱۱۰۸/۴۹±۴۶/۶۰ ^a	۱۳۴۸/۵۱	۱۱۴۴/۸۰	۱۱۰۹/۷۰	۱۰۶۳/۴۲	۱۲۲۱/۴۲	۱۱۱۷/۲۵	نانوسلنیوم
۱۱۱۴/۵۲±۴۵/۲۳ ^b	۹۹۲/۳۸±۴۴/۳۵ ^b	۱۲۴۲/۵۴	۱۰۲۱/۳۲	۱۱۲۸/۱۳	۹۳۷/۵۲	۹۷۲/۹۱	۱۰۰۸/۳۲	لاکتوباسیل+ نانوسلنیوم
۹۷۸/۷۵±۴۴/۴ ^c	۸۴۵/۲۸±۴۱/۴۹ ^c	۱۰۶۲/۶۵	۸۸۷/۲۹	۹۷۴/۹۲	۸۴۳/۴۵	۸۹۸/۷۰	۸۰۵/۱۲	نانوسلنیوم
۹۴۶/۶۰±۴۲/۵۳ ^c	۸۰۷/۶۶±۴۰/۱۸ ^c	۱۰۲۹/۳۵	۸۴۸/۶۶	۹۶۰/۸۷	۸۱۱/۹۲	۸۴۹/۵۷	۷۶۲/۴۰	بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها

۱. حروف غیرمشترک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار است.

۲. هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

بحث و نتیجه‌گیری

لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس از طریق ایجاد هاله رشدنیافتگی مهار می‌شوند. ناحیه بازدارندگی از رشد غلظت‌های مختلف لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در مطالعه آنها در محدوده ۱ تا ۱۲ میلی‌متر نوسان داشت. به‌طور کلی اثرات ضدقارچی لاکتوباسیل‌ها علاوه بر تولید اسیدهای آلی (اسید استیک و اسید لاکتیک)، می‌تواند مربوط به دی‌پپتیدهای حلقوی و ترکیبات فعال نظیر هیدروکسی فنیل پروپانوئیک اسید، فنیل پروپانوئیک اسید و فنیل لاکتیک اسید باشد که در اعمال اثرات ضد میکروبی نقش زیادی دارند (۱۰). همچنین تفاوت‌های جزئی در نتایج تحقیق حاضر با برخی مطالعات دیگر، احتمالاً مربوط به تفاوت در زمان گرمخانه‌گذاری، مقدار pH و نوع متابولیت‌های تولیدی است که در تأثیرگذاری ترکیبات ضدقارچی تولیدشده از طریق باکتری‌های لاکتوباسیلی دخیل هستند. بررسی MIC و MFC در تحقیق حاضر نشان داد که تیمار «نانوسلنیوم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها» و

بررسی آزمون‌های مختلف ضدقارچی در این تحقیق حاکی از آن بود که تمامی نمونه‌های آزمایشی توانایی مهار رشد مخمر کاندیدا/آلبیکنس را داشتند. در پژوهشی مشابه، Mishra و Zamre (۱۹) نمک سلنیوم را در توده گونه‌های لاکتوباسیلی غنی‌سازی کرده و پس از بررسی اثرات ضدقارچی آن روی کاندیدا/آلبیکنس، میانگین هاله رشدنیافتگی گونه‌های لاکتوباسیلوس هلویتیکاس، اسیدوفیلوس، گاستریسترینس و فرمنتوم غنی‌سازی شده را به ترتیب ۴۸، ۴۹، ۴۷ و ۴۵ میلی‌متر گزارش کردند. علت قطر زیاد هاله رشدنیافتگی در تحقیق آنها نسبت به مطالعه حاضر، احتمالاً مربوط به غلظت بالای سلنیوم استفاده شده (۸۰ میلی‌گرم) در آزمایش آنها است. Braide و Anyanwu (۲) حساسیت ۲۵۰ ایزوله کاندیدا/آلبیکنس را در پنج هفته نسبت به لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بررسی کرده و اظهار داشتند ۹۶ درصد آنها (۲۴۰ ایزوله) به‌وسیله

(۲۰). با توجه به موارد بیان شده، می‌توان نقش هریک از مکمل‌های نانوسلنیوم و لاکتوباسیلی را در پیشگیری و درمان بیماری ناشی از کاندیدا/آلبیکس به خوبی درک کرد. با این حال بیان تأثیرات هم‌افزایی این دو مکمل، زمانی که باهم استفاده می‌شوند، تأمل‌برانگیز است. بارگذاری نانوسلنیوم در توده لاکتوباسیلی‌ها می‌تواند سمیت منبع سلنیومی را به وسیله تغییر دادن شکل آنها و تبدیل به متابولیت‌های سلنیوم متیله‌شده و عنصر سلنیوم کاهش دهد؛ چراکه ثابت شده میکروارگانیسم‌های لاکتوباسیلی در محیط کشت توانسته‌اند ترکیبات سلنیوم را متابولیزه کرده و متابولیت‌های سلنیوم را از طریق متیلاسیون و دی‌متیلاسیون تولید کنند (۹). بررسی پژوهش‌های صورت‌گرفته، حاکی از بهبود وضعیت سلنیوم در حضور لاکتوباسیلی‌ها بود؛ اما علت این بهبود فعلاً ناشناخته است. تنها مکانیسم احتمالی درک‌شده به این صورت است که باکتری‌های لاکتوباسیلی به روش داخل‌سلولی، سلنیوم را درون خود انباشته کرده و برای بهبود وضعیت سلنیوم، به‌عنوان یک سیستم آزادکننده سلنیوم عمل می‌کنند. این سلنیوم بعداً می‌تواند به سلنوآنزیم‌های حاوی SeCys و L-SeMet منتقل شده و در نهایت مقدار سلنیوم پروتئین‌های باکتریایی را افزایش دهد (۳). با وجود این، تحقیقات علمی اندکی در ارتباط با درک اثرات هم‌افزایی نانوسلنیوم و لاکتوباسیلوس‌ها روی پیشگیری و درمان بیماری‌های قارچی از جمله کاندیدیازیس وجود دارد. از این رو برای اطمینان از صحت نتایج به‌دست‌آمده، تفسیر علمی و شرح مکانیسم‌های ناشناخته، انجام مطالعات بعدی در این زمینه توصیه می‌شود.

بررسی اثرات ضد میکروبی نمونه‌های آزمایشی نشان داد تمامی آنها پتانسیل لازم برای ممانعت کامل از رشد کاندیدا/آلبیکس و یا حداقل توانایی مهار ویروانس فاکتورهای مهم این مخمر را داشتند. تیمار «نانوسلنیوم بارگذاری شده در لاکتوباسیلی‌ها» بیشترین توان ضدقارچی را روی تمامی گونه‌های کاندیدا/آلبیکس داشت. با نگاهی به نتایج مطالعات سال‌های اخیر، مبنی بر افزایش مقادیر MIC و MFC داروهای صنعتی روی قارچ‌های خانواده کاندیدا، می‌توان به خوبی درک کرد که این افزایش میانگین MIC و MFC زنگ خطر جدی برای کاهش حساسیت داروهای متداول است. لذا به شرط تأیید توان ضدقارچی ترکیب «نانوسلنیوم بارگذاری شده در لاکتوباسیلی‌ها» می‌توان ساخت دارو یا مکمل صنعتی با این فرمولاسیون را برای کنترل بیماری کاندیدیازیس توصیه کرد.

«نانوسلنیوم + لاکتوباسیلی‌ها» پایین‌ترین میانگین‌ها را برای هر دو آزمون فوق داشتند. این امر نشان‌دهنده توان بالای این تیمارها در جلوگیری از رشد مخمر کاندیدا/آلبیکس بود. Anyanwu و Braide (۲) در مطالعه‌ای مشابه MIC و MFC لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس را به روش میکروداپلوشن روی کاندیدا/آلبیکس ارزیابی و گزارش کردند که غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس تأثیر کمی روی مهار رشد کاندیدا/آلبیکس داشتند. در حالی که غلظت‌های ۱۵/۶۲۵ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس باعث مهار شدید رشد گونه‌های کاندیدا/آلبیکس شد. همچنین غلظت mg/ml ۱۵/۶۲۵ لاکتوباسیل/اسیدوفیلوس را به‌عنوان کمترین غلظتی که باعث از بین رفتن کامل قارچ کاندیدا/آلبیکس می‌شود (MFC) گزارش کردند. Nyanzi و همکاران (۱۱) کمترین غلظت ممانعت‌کننده رشد کاندیدا/آلبیکس را در حضور گونه‌های لاکتوباسیلی بررسی و گزارش کردند که مقدار MIC به غیر از یک ایزوله لاکتوباسیلوس کازئی (۵ mg/ml) برای تمامی ایزوله‌های لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، هلوتیکوس، رامنوسوس و ایزوله‌های دیگر لاکتوباسیلوس کازئی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، mg/ml ۱/۲۵ به دست آمد. همچنین آنها اظهار کردند که با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از ۲۴ ساعت به ۴۸ و ۶۰ ساعت، میانگین MIC برای تمامی ایزوله‌ها افزایش داشت. این امر نشان‌دهنده آن است که کمترین غلظت مهار رشد در ۲۴ ساعت پس از گرمخانه‌گذاری حاصل می‌شود. در ارتباط با مکمل نانوسلنیومی نیز Eswarapriya و Jegatheesan (۶) توان ضدقارچی بالای نانوذرات سلنیوم را تأیید کرده و مقدار MIC نانوذرات سلنیوم را روی کاندیدا/آلبیکس ۶/۵ μg/ml گزارش کردند. همچنین Bahri و همکاران (۱) مقدار MIC نانو ذرات سلنیوم را روی کاندیدا/آلبیکس ۲۰۰۰ μg/ml بیان کردند. میانگین MIC در تحقیق حاضر به غیر از مطالعه Eswarapriya و Jegatheesan (۶) با سایر پژوهش‌های مشابه هم‌خوانی نسبی داشت. با توجه به تفاوت‌های زیاد برای مقادیر MIC و MFC در گزارش‌های مختلف، احتمالاً احراز پایین‌ترین دوز برای حداقل غلظت مهار رشد کاندیدا/آلبیکس توسط نانوذرات، در درجه اول مربوط به توان آنها در مهار فعالیت ATPase در کاندیدا/آلبیکس است که به این صورت فعالیت ضدقارچی خود را علیه آن انجام می‌دهند (۱۸). در ادامه، نانوذرات با آسیب به ساختار سلولی، تغییر در عملکردهای سلول نظیر قابلیت نفوذپذیری و همچنین تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های زنجیره تنفسی، باعث ایجاد شکاف و حفره‌هایی می‌شوند که مهار یا مرگ سلول مخمر را به دنبال دارد

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از جناب آقای دکتر پیمان زارع، آقای دکتر امیرمحمد گوگانیان و خانم مهندس اردوخانی که در انجام این تحقیق زحمات زیادی متقبل شدند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- Kazempour ZB, Yazdi MH, Rafii F, Shahverdi AR. Sub-inhibitory concentration of biogenic selenium nanoparticles lacks post antifungal effect for *Aspergillus niger* and *Candida albicans* and stimulates the growth of *Aspergillus niger*. *Iranian Journal of Microbiology*. 2013; 5(1): 81-5. PMID:23466957 PMID:PMC3577562
- Braide W, Anyanwu GO. The effects of *Lactobacillus acidophilus* (Probiotics) and other fungicidal agents against vagina *Candida albicans*. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 2018; 5(4): 37-63.
- Calomme MR, Vanden-Branden K, Vanden-Berghe DA. Selenium and *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*. 1995; 79(3): 331-40.
- Cheraghi Saray S, Hosseinkhani A, Janmohammadi H, Zare P, Daghighkia H. Thermal and probiotic treatment effects on restaurant waste for incorporation into poultry diet. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 2014; 3(3): 1-7. <https://doi.org/10.1007/s40093-014-0071-1>
- Clarke M, Davies DP, Odds F, Mitchell C. Neonatal systemic candidiasis treated with Miconazole. *Br Med J*. 1980; 281(6236): 354-64. <https://doi.org/10.1136/bmj.281.6236.354>
- Eswarapriya B, Jegatheesan KS. Antifungal Activity of Biogenic Selenium Nanoparticles Synthesized from Electronic Waste. *International Journal of PharmTech Research*. 2015; 8(3): 383-6.
- Hongfei Y, Gongjian F, Zhenxin G. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). *LWT-Food Sci Technol*. 2010; 43(4): 666-9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.11.010>
- Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 2011; 156(2): 128-45. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>
- Krittaphol W, Wescombe PA, Thomson CD, McDowell A, Tagg JR, Fawcett JP. Metabolism of L-Selenomethionine and Selenite by Probiotic Bacteria: In Vitro and In Vivo Studies. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 144(1-3): 1358-69. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9057-2>
- Magnusson J, Strom K, Roos S, Sjogren J, Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2003; 219(1): 129-35. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01207-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01207-7)
- Nyanzi R, Awouafack MD, Steenkamp P, Jooste PJ, Eloff JN. Anticandidal activity of cell extracts from 13 probiotic *Lactobacillus* strains and characterisation of lactic acid and a novel fatty acid derivative from one strain. *Food Chemistry*. 2014; 164(1): 470-5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.067>
- Otang WM, Grierson DS, Ndip RN. Antifungal activity of *Arctotis arctotoides* (L.f.) O. Hoffm and *Gasteria bicolor* Haw against opportunistic fungi associated with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacogn Mag*. 2012; 8(30): 135-40. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.96564>
- Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(1): 58-61.
- Prentice AG, Warnock DW, Johnson SA, Phillips MJ, Oliver DA. Multiple dose pharmacokinetics of an oral solution of Itraconazole in autologous bone marrow transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 1994; 34(2): 247-52. <https://doi.org/10.1093/jac/34.2.247>
- Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT. Rapid Identification and Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by Capillary-Based Amplification and Fluorescent Probe Hybridization. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(11): 4308-12. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4308-4312.2002>
- Stabnikova O, Ivanov V, Larionova I, Stabnikov V, Bryszewska MA, Lewis J. Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast. *LWT- Food Science and Technology*. 2008; 41(5): 890-5. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.05.021>

17. Strus M, Kucharska A, Kukla G, Wloch M, Marsez K, Heczko PB. The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005; 13(2): 69-75. <https://doi.org/10.1080/10647440400028136>
18. Wani IA, Ahmad T, Manzoor N. Size and shape dependant antifungal activity of gold nanoparticles: a case study of Candida. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013; 101(1): 162-70. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.005>
19. Zamre DK, Mishra B. Enhanced antimicrobial activity of probiotics through selenium nanoparticles enrichment against gastrointestinal pathogens. *Int J Pharm Sci Res.* 2018; 9(2): 738-42. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(2\).738-42](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(2).738-42)
20. Zawrah MF, Abd El-moez S. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. *Life Science Journal.* 2011; 8(4): 37-44.
21. Zhang B, Zhou K, Zhang J, Chen Q, Liu G, Shang N, et al. Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the *Bifidobacterium animalis* 01. *Food Chemistry.* 2009; 115(2): 727-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.006>