

Mucor circinelloides'in Maya ve Küf Dönüşümünün Gösterilmesi ve İki Formun *Galleria mellonella* Enfeksiyon Modelinde Virülansının Değerlendirilmesi

*Transformation of Yeast and Mould Forms *Mucor circinelloides* and the Assessment of its Virulence on *Galleria mellonella* Larvae Model in Vivo*

Funda Karakurt[✉], Ayşe Kalkancı[✉]

Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Atf/Cite as: Karakurt F, Kalkancı A. *Mucor circinelloides*'in maya ve küf dönüşümünün gösterilmesi ve iki formun *Galleria mellonella* enfeksiyon modelinde virülansının değerlendirilmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(1):21-27.

ÖZ

Amaç: *Mucoromycotina* alt şubesinin *Mucorales* takımında sınıflandırılan *Mucor circinelloides* esasen endüstriyel, biyoteknolojik ve tarımsal öneme sahip, nadiren de tıbben önemi olan, oksijene bağlı dimorfizm gösteren saprofit bir mantardır. Bu çalışmanın amacı, *M. circinelloides*'in maya ve küf dönüşümünün gösterilmesi ve bu iki formun *in vivo* virülansının larva modelinde gösterilmesidir.

Yöntem: *Mucor circinelloides*'in anaerobik ve aerobik koşulda üreyen kolonilerinin maya ve küf dönüşümü gerçekleştirilmiş, küften mayaya ve mayadan küfe dönüşümleri gözlenmiştir. Koloniler boyasız olarak veya laktofenol pamuk mavisi ve metilen mavisi ile boyanarak mikroskop altında incelenmiştir. Rastgele seçilmiş 70 adet *Galleria mellonella* larvası *in vivo* model olarak kullanılmıştır. Enfeksiyon oluşturulan larvalar 30°C'de bekletilmiş ve her gün canlı kalan larva sayıları hesaplanarak virülans özellikleri karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Sabouraud dekstroza agarda (SDA) 37°C etüvde 96 saatlik inkübasyonun ardından küf kolonisi elde edilmiştir. Küf kolonisinden yapılan ekim, hava sızdırmaz kap içerisinde 25°C'de, 96 saat inkübasyonun ardından maya formuna dönüşmüştür. Küf ve maya formu ile enfekte edilen larvaların hayatta kalım oranları benzer bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda, *M. circinelloides*'in dimorfik maya ve küf formları ile oluşturulan *Galleria mellonella* enfeksiyon modelleri arasında belirgin bir virülans farkının olmadığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Mucor circinelloides*, virülans, dimorfizm, *Galleria mellonella*

ABSTRACT

Objective: *Mucor circinelloides* is a saprophytic fungus classified under *Mucorales* order of subphylum *Mucoromycotina* and showing dimorphism-dependence on oxygen, with medical, industrial, biotechnological and agricultural significance. The aim of this study is to show the transformation of *M. circinelloides* yeast and mould forms and to reveal the virulence characteristics of these two forms in an *in vivo* *Galleria mellonella* larvae model.

Methods: *M. circinelloides* was incubated under anaerobic and aerobic conditions to show its mould to yeast and yeast to mould transformation. Yeast and mould forms were examined under the microscope with direct uncoloured, lactophenol cotton blue and methylene blue preparations. Randomly selected 70 larvae were used as *in vivo* larvae model. Infected larvae were incubated under 30°C and the number of survived larvae was documented; thus the virulence of the yeast and mould forms were compared.

Results: Mould colony was isolated after 96 hours of incubation at 37°C on Sabouraud dextrose agar plates. Subcultured mould colony transformed into the yeast form after 96 hours of incubation at 25°C in a desiccator box. Survival rates of larvae infected by yeast and mould forms were found to be similar.

Conclusion: We concluded that there was no significant difference between virulence of *M. circinelloides* yeast and mould forms in *G. mellonella* larvae model.

Keywords: *Mucor circinelloides*, virulence, dimorphism, *Galleria mellonella*

Alındığı tarih / Received:
25.03.2022 / 25.March.2022

Kabul tarihi / Accepted:
25.11.2022 / 25.November.2022

Yayın tarihi / Publication date:
24.03.2023 / 24.March.2023

ORCID Kayıtları

F. Karakurt 0000-0002-1380-0379
A. Kalkancı 0000-0003-0961-7325

✉ fnddmr@gmail.com

GİRİŞ

Mucor circinelloides, taksonomik olarak yeni tanımlanan Mucoromycotina alt şubesi içindeki Mucorales takımında yer alır. Oksijene bağımlı olarak dimorfizm gösterir. Tüm dünyada yaygın olarak toprakta ve gübre içeriğinde bulunur. Bilinen bir mikotoksin ürettiği gösterilememiştir. Sığır, domuz gibi çiftlik hayvanları ile kümes hayvanlarında ve insanlarda enfeksiyon etkeni olduğu bilinmektedir^(1,2). İnsanlarda en çok beş türün enfeksiyon etkeni olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, tanımlanmış en az elli tür bulunmaktadır. İnsanlarda enfeksiyon etkeni türler; *Mucor circinelloides*, *Mucor indicus*, *Mucor ramosissimus*, *Mucor hiemali* ve *Mucor racemosus*'tur⁽³⁾.

Fırsatçı patojen olan *M. circinelloides*'in enfeksiyon oluşturabilmesi için konak faktörleri kadar, mantarın sahip olduğu virülans faktörlerinin de önemi vardır. Diyabeti olan, AIDS gelişmiş, hematolojik kanser nedeniyle kök hücre nakli yapılmış hasta grubunda bağışıklık sistemi baskılanması nedeniyle mukormikoz gelişmektedir⁽⁴⁾. Bağışık sistemin bozulduğu her durumda, doğada bulunan saprofit mantarlar insanlarda mantar enfeksiyonu etkeni olabilir. Mantarların hastalık yapabilmelerindeki temel virülans faktörü insan vücudundaki sıcaklığa uyum sağlayabilmeleri ve bağışık sisteme direnç gösterme mekanizmalarıdır⁽⁵⁾.

Mantarlarda dimorfizmin uyarılması genel olarak virülans ile ilişkilidir. Ancak, dimorfik bir mantar olan *M. circinelloides*'in maya ve küf formunun virülans farkları tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. *Mucor circinelloides* anaerobik inkübasyon ile maya formunda, aerobik inkübasyon ile küf formunda üremektedir. Oksijen bağımlı bu dönüşüm, dimorfik mantarların patogenezi, virülansı ve yaşam döngüsü için kritik öneme sahiptir⁽⁶⁻⁸⁾.

Bu çalışmada, *M. circinelloides*'in maya ve küf koloni dönüşümünün besiyerinde gösterilmesi ve her iki formun larva modelinde virülans özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın hipotezi, küf ve maya formları arasında *in vivo* virülans özelliklerinin farklı olduğudur. Bu hipotezi doğrulamak

amacıyla, *M. circinelloides*'in anaerobik ve aerobik koşullarda oluşan maya ve küf formları ile mum güvesi olarak bilinen *Galleria melonella* larvasında deneysel enfeksiyon oluşturulmuş ve larvaların sağ kalım oranları karşılaştırılmıştır.

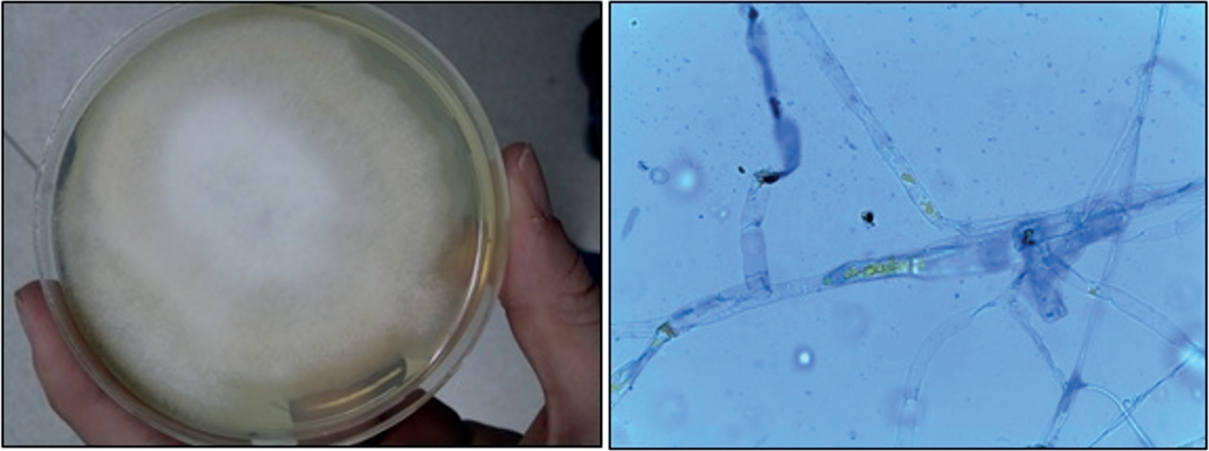
GEREÇ ve YÖNTEM

Maya ve küf dönüşümü: Arşivimizde -80°C de saklanan *M. circinelloides* kökenleri (NBRC 4554 ve NBRC 5774 kökenleri) canlandırılarak kullanılmıştır. Canlandırılan *M. circinelloides* kolonileri 24°C, 30°C, 37°C'lik etüvde 24-96 saatlik aerobik ve anaerobik inkübasyonla takip edilmiştir. Üreyen küf ve maya kolonileri laktofenol pamuk mavisini, metilen mavisini ve boyasız direk inceleme ile mikroskop altında değerlendirilmiştir^(9,10).

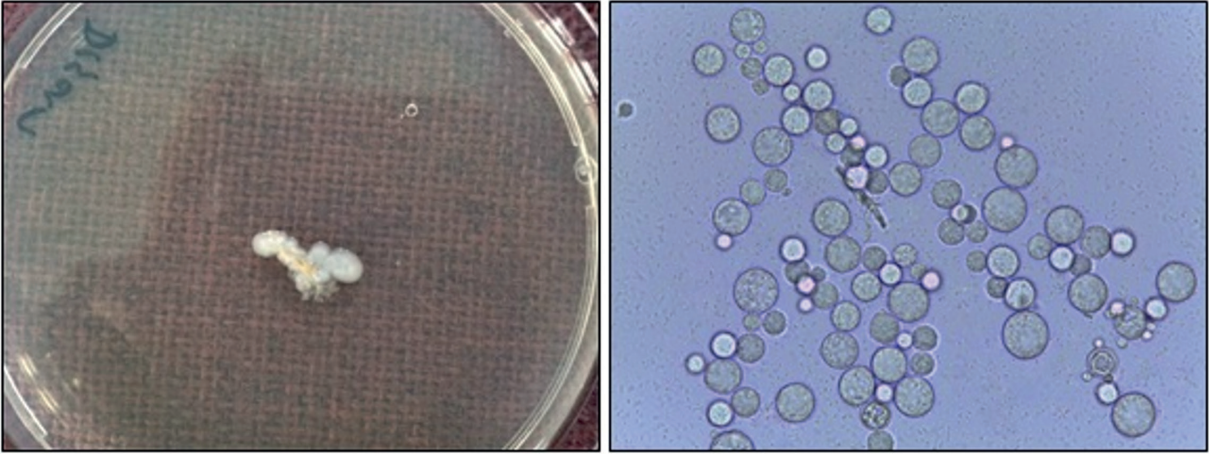
Galleria mellonella enfeksiyon modeli: *M. circinelloides*'in küf ve maya formu ile *G. mellonella* enfeksiyon modeli oluşturulmuştur^(11,12). Toplam 70 adet larva ayrılmıştır. Her larvanın sol arka bacak içine Hamilton iğnesi kullanılarak 10 µl mikroorganizma içeren serum fizyolojik doğrudan uygulanmıştır. İnokülasyon yapılan larvalar 30°C etüvde her gün takip edilmiştir. Larvalar 22 g buğday unu, 22 g buğday kepeği, 11 g süt tozu, 5.5 g kuru maya, 11 ml gliserin, 11 ml bal, 17.5 g balmumu içeren bir besi ortamında bekletilmiştir. Larva modelinin tasarımı kontrol gruplarını içerecek şekilde yapılmıştır. Şekil 1'de larva modelinin deneysel tasarımı ve grup isimleri gösterilmektedir.

BULGULAR

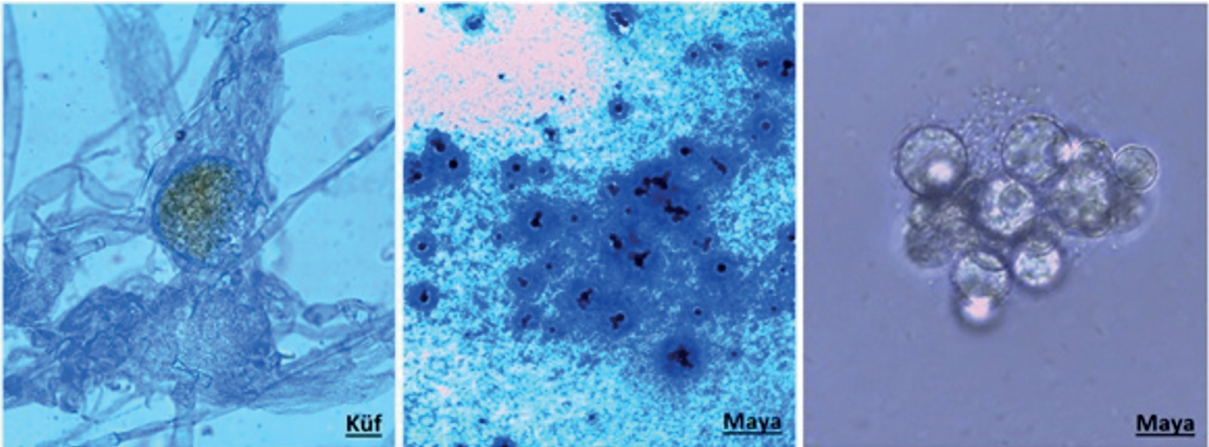
Maya ve küf dönüşümünün sonuçları: *M. circinelloides* 37°C'lik etüvde 96 saatlik aerobik inkübasyon ile küf formunda üretilmiştir. Maya dönüşümü için anaerobik kavanoz içinde 37°C'de 96 saatlik inkübasyona rağmen, üreme olmamıştır. Küf kolonisinden yapılan ekim 25°C'de 96 saat inkübe edildiğinde maya dönüşümü gösterilmiştir. (Resim 1 ve 2). Küf kolonisi laktofenol pamuk mavisini ile incelendiğinde, *M. circinelloides*'in küf formunun sporangiospor içeren sporangiyumlar, bölmesiz düzensiz hifler, Mucoromycotina'ya özgü kurdele benzeri katlanma yapıları oluşturduğu gözlenmiştir.



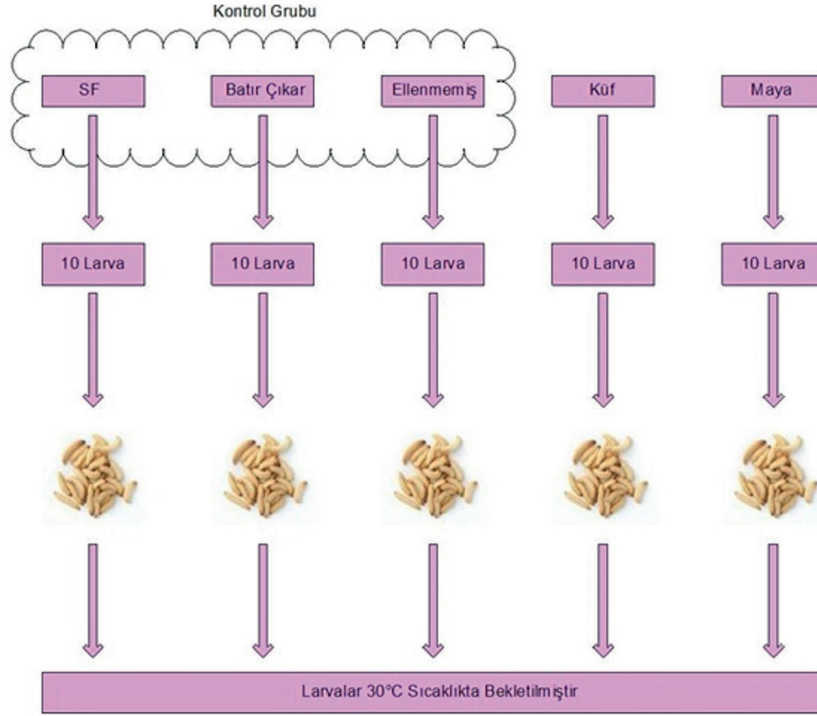
Resim 1. SDA'da *M. circinelloides* küf kolonisi (soldaki), laktofenol pamuk mavisi ile *Mucoromycotina*'ya özgü kurdele benzeri katlanmalar/bölmesiz, düzensiz hif görünümü x40 (sağdaki).



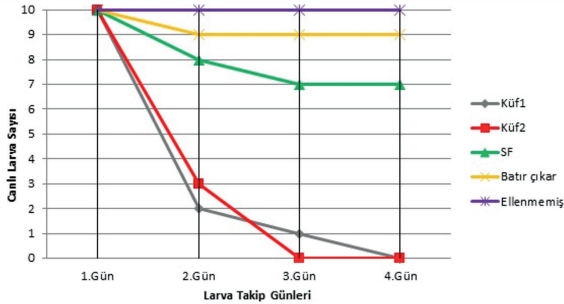
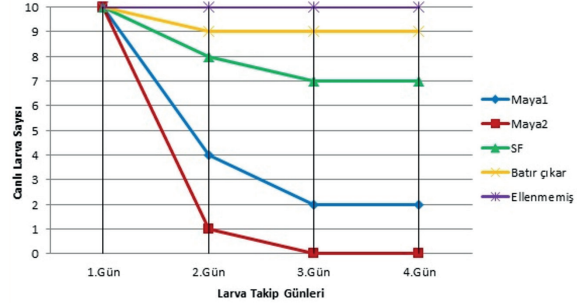
Resim 2. SDA'da *M. circinelloides* maya kolonisi (soldaki), boyasız direkt mikroskobik incelemede maya kolonisi x40 (sağdaki).



Resim 3. *Mucor circinelloides*'in küf formunun laktofenol pamuk mavisi ile (solda), maya formunun metilen mavisi ile (ortada) ve direkt boyasız preparatta (sağda) mikroskobik incelenmesi.

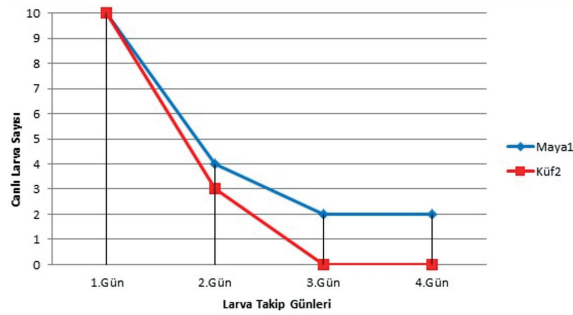


Şekil 1. Larva modelinin deneysel tasarımı ve grup isimleri

Şekil 2. *Mucor circinelloides*'in küf formunun enjekte edildiği larvaların Kaplan-Meier grafiğiŞekil 3. *Mucor circinelloides*'in maya formunun enjekte edildiği larvaların Kaplan-Meier grafiği

Maya kolonisinin boyasız direk incelemesi ve metilen mavisi ile incelenmesi sonucunda tam yuvarlak, kalın cidarlı, 50-100 µm çapında maya hücreleri gözlenmiştir. Hem maya, hem de küf morfolojisinin literatürdeki *M. circinelloides* türü ile tam uyumlu olduğu görülmüştür^(9,10). Resim 1'de küf formu ve mikroskobisi, Resim 2'de maya formu ve mikroskobisi, Resim 3'te boyalı ve boyasız preparatların mikroskobisi görülmektedir.

Larva modelinin sonuçları: Çalışmamızda *M. circinelloides*'in küf ve maya formlarının virülans karşılaştırması *G. mellonella* larvalarını öldürme güçleri üzerinden saptanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız ellenmemiş kontrol grubu, enjektör batırıp çıkardığımız kontrol grubu ve SF enjeksiyonu yaptığımız kontrol grubu larvalarının sayımı ile küf ve maya enjekte ettiğimiz deney gruplarının sayımı her gün düzenli olarak yapılmıştır⁽¹³⁾. Küf ve maya ile her birinde 10 larva olan ikişer grup enfekte edilmiş ve bu



Şekil 4. Maya ve küf gruplarının karşılaştırması

gruplar “Küf 1” / “Küf 2” / “Maya 1” / “Maya 2” olarak kayıt edilmiştir. Dördüncü günün sonunda kontrol grupları sağ kalırken, “Küf 1” ve “Küf 2” ile enjekte ettiğimiz larvaların tamamı canlılığını yitirmiştir (Şekil 2). “Maya 1” grubundaki 2 canlı larva dışında “Maya 1” ve “Maya 2” de enfekte ettiğimiz larvaların tamamı canlılığını yitirmiştir (Şekil 3). Şekil 4’te maya ve küf gruplarının karşılaştırması gösterilmektedir.

TARTIŞMA

Maya formundaki mantarların yalancı hif oluşturarak yaptıkları filamentöz dönüşümünün dokuya invazyona yardım ettiği ve virülansın ilk basamağı olduğu bilinmektedir⁽¹¹⁾. *Mucorales* için dimorfizmin virülansa etkisi tam olarak açıklanmamıştır⁽¹²⁾. *M. circinelloides*’in virülans faktörleri ile ilgili çalışma sayısı da kısıtlıdır^(14,15). Çalışmamızda *M. circinelloides*’in küf ve maya formlarının ayrı ayrı *G. mellonella* larvalarına inoküle edilmesi ile bir enfeksiyon modeli oluşturulmuştur. Larvaların sağ kalım sayısı takip edilerek virülansın karşılaştırılması amaçlanmıştır. Virülans özelliği olarak *G. mellonella* larvalarını öldürme güçleri ölçülmüştür. Dimorfik etkenler ile oluşturulan omurgasız hayvan modelleri bulunmaktadır⁽¹⁶⁾. Bu modellerde maya formu ile enfekte edilen larvalar 37°C’de bekletilmiştir. Bizim çalışmamızda hem maya hem de küf formu ile enfekte edilen larvalar 30°C’de bekletilerek, küf ve maya için benzer koşul oluşturulması amaçlanmıştır. Larva aerop veya anerobik olarak tanımlanamayacağından, etüve konan kavanoz mikroaerofilik ortam olarak kabul edilmiştir. Yaptığımız araştırma sonuçlarına göre, *M. circinelloides*’in küften mayaya veya mayadan küfe dönüşümü 96 saatten önce gerçekleşmemektedir.

Bu nedenle tüm larvaların kaybedildiği dört günlük takip süresi larva vücudunda maya-küf dönüşümüne etkili olacak atmosferik koşul olarak değerlendirilmemiştir.

Mantarlarda dimorfizmin virülansa etkisi iyi bilinmekte^(17,18), *Mucorales* için dimorfizm ve virülans arasındaki ilişki de açıklanmaktadır⁽¹⁹⁾. *M. circinelloides*’in küf ve maya dönüşümünü belirleyen faktörler bilinmektedir. Karbon kaynağı olarak fermente edilebilir heksoz şeker var ise, maya formu gelişirken, karmaşık karbon kaynakları varlığında küf formu gelişmiştir⁽¹⁹⁾. Oksijene bağlı dimorfizm gösteren bu mantarın maya formunun elde edilmesi için anaerobik ortam koşulları oda sıcaklığı hazırlanmıştır ve 96 saat sonunda istenilen küf-maya dönüşümü gerçekleştirilmiştir. Bunun için, anaerobik ortam sağlayan hava kısıtlı bir ortamda küf formunun maya formuna dönüşümü gerçekleştirilmiştir.

Omurgasız bir canlı olan *Caenorhabditis elegans*’in model olarak kullanıldığı bir çalışmada, dimorfik patojenlerin küf formu ile enfeksiyon oluşturulduğunda solucanların hızla kaybedildiği görülmüştür⁽²⁰⁾. Bizim çalışmamızda da küf formu ile enfekte edilen larvalar ilk iki günde hızla kaybedilmiştir. Dördüncü günde küf grubunda canlı larva kalmamıştır. Oysa maya grubunda ölümler daha yavaş seyretmiş, dördüncü günde iki larva canlı kalmıştır. Buna rağmen, maya ve küf karşılaştırması ise farklı bulunmamıştır.

Galleria mellonella gibi omurgasız canlılar, enfeksiyon modeli olarak etik kurul onayı gerektirmeden kullanılabilmeleri nedeniyle hem ekonomik hem de etik açıdan avantajlıdır^(13,16). Fakat bu çalışmaların bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. En önemlisi, “Koch postülatı”nın omurgasız modellerde tamamlanamıyor olmasıdır. Omurgasız canlılarda organ sistemleri memelilerden çok farklı olduğu için, enfeksiyon oluşturulan mikroorganizmanın larvadan izole edilmesi standart bir yöntem olamamaktadır. Bunun yerine larvalarda renk değişikliği, hareketsizlik ve hayatta kalmayı içeren bir “yaşam indeksi” enfeksiyon varlığını gösteren kanıtlar olarak kabul edilmiştir⁽²¹⁾.

Oksijene bağımlı dimorfizm *M. circinelloides* için tanımlanmış bir virülans faktörüdür. Kalsinörin bu mantarın dimorfik dönüşümünü kontrol eden bir faktör olarak, küf formuna dönüşüm ile ilişkili bulunmuştur. Demir alım sistemleri ve antifungal direnci ile birlikte hastalık patogeneğinde etkilidir⁽²²⁾. Termal dimorfizm mantarlar için daha iyi bilinen bir mekanizmadır. Termal dimorfik mantarlar aynı zamanda endemik enfeksiyonlara yol açan sistemik patojenlerdir. Termal dimorfizm, oksijen ile ilişkili dimorfizmden daha çok çalışılmış bir konudur⁽²³⁾. Dimorfizm esasen konağa adaptasyon ile ilişkili olup, enfeksiyon etkenlerinin yayılmasında, bulaşmasında ve yeni konaklar oluşturulmasında etkilidir.

Larva modelinde küf ve maya arasındaki virülans farkının gösterilmesi için tasarladığımız çalışmada, larvaların hayatta kalım sayıları karşılaştırılarak bakıldığında, *M. circinelloides*'in küf ve maya formunun *in vivo* virülans özelliklerinin benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Yoktur/bildirilmemiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: None/not declared.

KAYNAKLAR

- Fazili ABA, Shah AM, Zan X, et al. *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microb Cell Fact.* 2022;21(1):29. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01758-9>
- Vellanki S, Navarro-Mendoza MI, Garcia A, et al. *Mucor circinelloides*: Growth, maintenance, and genetic manipulation. *Curr Protoc Microbiol.* 2018;49(1):e53. <https://doi.org/10.1002/cpmc.53>
- Iwen PC, Sigler L, Noel RK, Freifeld AG. *Mucor circinelloides* was identified by molecular methods as a cause of primary cutaneous zygomycosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):636-40. <https://doi.org/10.1128/JCM.01907-06>
- Li CH, Cervantes M, Springer DJ, et al. Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 2011;7(6):e1002086. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002086>
- Nicolás FE, Murcia L, Navarro E, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Garre V. Mucorales species and macrophages. *J Fungi (Basel).* 2020;6(2):94. <https://doi.org/10.3390/jof6020094>
- Wagner L, Stielow JB, de Hoog GS, et al. A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia.* 2020;44:67-97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
- Lübbehüsen TL, Nielsen J, McIntyre M. Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth. *Mycol Res.* 2003;107(Pt 2):223-30. <https://doi.org/10.1017/s0953756203007299>
- Orlowski M. *Mucor* dimorphism. *Microbiol Rev.* 1991;55(2):234-58. <https://doi.org/10.1128/mr.55.2.234-258.1991>
- Dizbay M, Adisen E, Kustimur S, et al. Fungemia and cutaneous zygomycosis due to *Mucor circinelloides* in an intensive care unit patient: case report and review of literature. *Jpn J Infect Dis.* 2009;62(2):146-8.
- Valle-Maldonado MI, Jácome-Galarza IE, Gutiérrez-Corona F, Ramírez-Díaz MI, Campos-García J, Meza-Carmen V. Selection of reference genes for quantitative real time RT-PCR during dimorphism in the zygomycete *Mucor circinelloides*. *Mol Biol Rep.* 2015;42(3):705-11. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3818-x>
- Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):5895. <https://doi.org/10.3390/ijms23115895>
- Muszevska A, Pawłowska J, Krzyściak P. Biology, systematics, and clinical manifestations of Zygomycota infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(8):1273-87. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2076-0>
- Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, et al. Bazı bakteriyel ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın *in vivo* model olarak kullanılması. *Mikrobiyol Bul.* 2015;49(3):366-76. <https://doi.org/10.5578/mb.9701>
- Lee SC, Li A, Calo S, Heitman J. Calcineurin plays key roles in the dimorphic transition and virulence of the human pathogenic zygomycete *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003625. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003625>

15. López-Fernández L, Sanchis M, Navarro-Rodríguez P, et al. Understanding *Mucor circinelloides* pathogenesis by comparative genomics and phenotypical studies. *Virulence*. 2018;9(1):707-20.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1435249>
16. Singulani JL, Scorzoni L, de Oliveira HC, et al. Applications of invertebrate animal models to dimorphic fungal infections. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(4):118.
<https://doi.org/10.3390/jof4040118>
17. Gauthier GM. Dimorphism in fungal pathogens of mammals, plants, and insects. *PLoS Pathog*. 2015;11(2):e1004608.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>
18. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect*. 2010;12(6):488-96.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.001>
19. Lübbehüsen TL, Nielsen J, McIntyre M. Characterization of the *Mucor circinelloides* life cycle by on-line image analysis. *J Appl Microbiol*. 2003; 95(5):1152-60.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02098.x>
20. Ahamefule CS, Ezeuduji BC, Ogbonna JC, et al. *Caenorhabditis elegans* as an infection model for pathogenic mold and dimorphic fungi: Applications and challenges. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:751947.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.751947>
21. Ménard G, Rouillon A, Cattoir V, Donnio PY. *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: Past, present and future. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:782733.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.782733>
22. Lax C, Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, et al. Genes, pathways, and mechanisms involved in the virulence of Mucorales. *Genes (Basel)*. 2020;11(3):317.
<https://doi.org/10.3390/genes11030317>
23. Gauthier GM. Fungal Dimorphism and virulence: Molecular mechanisms for temperature adaptation, immune evasion, and *in vivo* survival. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:8491383.
<https://doi.org/10.1155/2017/8491383>