



Evaluation of The Effects of *Allium Jesdianum* Bacterial Endophytes on Some Bacterial and Fungal Pathogens

Maryam Esmaeili¹, Azizollah Ebrahimi Kahrizsangi¹, Somayeh Shahrokh Shahraki^{1,2*}, Azam Mokhtari^{1,2}

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

doi [10.30699/ijmm.15.3.281](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.3.281)



ABSTRACT

Background and Aim: The endophytes are the fungi or bacteria that live within a plant in a symbiotic relationship. This study aimed to investigate the effect of isolated bacterial endophytes from *Allium jesdianum* on some bacterial pathogens such as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* as well as pathogenic fungi, including *Trichophyton mentagrophytes* and *Candida albicans*.

Materials and Methods: Various parts of *A. jesdianum* including leaves, stems, onions and flowers were randomly collected, cleaned from any contamination and then cultured in a suitable culture medium. The endophyte colonies were purified using chloroform to analyze the anti-pathogenic properties of the structural agents of the bacterial endophyte. To evaluate the anti-pathogenicity of endophyte metabolites, the broth media of the endophyte bacteria was centrifuged and the supernatants were filtered through sterilization. Antibigram test was performed by disk diffusion method (Kirby Bauer) and the sensitivity was compared. Data were statistically analyzed by t-test and ANOVA.

Results: Eleven bacterial endophytes were obtained from various sections of *A. jesdianum*. The endophyte bacterium has an improved antimicrobial effect on *T. mentagrophytes*. Unlike *E. coli*, secretory metabolites of endophytic bacteria had an antimicrobial effect on *S. aureus* and *C. albicans*.

Conclusion: It can be concluded that the bacterial endophytes of *A. jesdianum* can be considered to be potential and beneficial agents against human pathogens. *A. jesdianum* with anti-pathogenic activity could be a source to produce important anti-pathogenic compounds from an agricultural and pharmaceutical point of view.

Keywords: *Allium jesdianum*, Anti-pathogenic activity, Endophyte, Medicinal plants, Microbial Sensitivity Tests

Received: 2020/09/18;

Accepted: 2020/12/21;

Published Online: 2021/06/28

Corresponding Information:

Somayeh Shahrokh Shahraki, , Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Rahbar Boulevard, Shahrekord, Iran. Email: Shahrokh@sku.ac.ir



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Esmaeili M, Ebrahimi Kahrizsangi A, Shahrokh Shahraki S, Mokhtari A,. Evaluation of The Effects of *Allium Jesdianum* Bacterial Endophytes on Some Bacterial and Fungal Pathogens. Iran J Med Microbiol, 2021; 15 (3): 281-301.

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Herbal medicines are a group of herbs that contain a number of important compounds for medicine and pharmacy (1). Effective herbal remedies have attracted global attention because of their easy access and low side effects (2). Endophytes have been found to reside in the host tissues without apparent damage or signs of disease promoting plant growth and health (Symbiotic effect). Also, they provide a high resistance

to a variety of diseases. Endophytes are powerful producer of secondary metabolites (3). Antimicrobial metabolites extracted from endophytes belong to variety structural classifications, including peptides, alkaloids, phenols, steroids, flavonoids, terpenoids, etc. (4). Common endophytes including a variety of bacteria (actinomycetes) and fungi are generally isolated from plants (5). These microorganisms have

antifungal and anti-bacterial properties and prevent pathogens from entering the plant (6). New antibiotics (antimycotics), and anticancer compounds are just few examples of endophytes isolates (7).

Due to the increasing of the antibiotic resistance of pathogenic microbes, some of antibiotics can be substituted by endophytes and they may provide the alternative sources of bioactive compounds and probiotics for treatment of some bacterial and fungal diseases (8).

Escherichia coli is the leading cause of death worldwide with a wide range of diseases. Each year, it causes widespread infant mortality due to diarrhea and septicemia (9). *E. coli* strains are generally resistant to a number of medications (10).

Various *Staphylococcus aureus* isolates have different responses in terms of antibiotic sensitivity or resistance. Scientific reports have suggested that methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA) indicating changes in the epidemiology of this bacterium.

The ability of some *Allium* species has been shown to reduce risk factors such as elevated serum cholesterol, elevated LDL, increased platelets, hypertension, and other factors by in vitro studies (14,15). *Allium jesdianum* belongs to the *Alliaceae* family which grows in the west and southwest of Iran and is traditionally effective in treating and alleviating rheumatic and gastrointestinal pain, renal stone excretion as well as colds and abdominal pain. It has analgesic and pain relieving properties (16,17).

In this study, the bacterial endophytes were firstly isolated from *A. jesdianum* and then their antifungal and anti-bacterial properties against some pathogenic bacteria and fungi were investigated.

Materials and Methods

Isolation of Endophytic Bacteria

Fresh samples of *A. jesdianum* (various parts of the herb including stem, leaf, onion and flower) were collected randomly from Chaharmahal and Bakhtiari province, Iran, in the spring 2019. In this clinical trial study, a minimum of 30 and a maximum of 50 fresh samples of *A. jesdianum* were used to isolate a maximum of 10 bacterial endophytes to evaluate their antibacterial and antifungal properties. Samples of *A. jesdianum* were transferred to the microbiology laboratory at Shahrekord University, Chaharmahal and Bakhtiari, Iran. The genus and species of this plant were confirmed taxonomically by the Department of Botany.

The plant was cleaned, sterilized and dried. The stems, leaves, onions and flowers of *A. jesdianum* were separately placed in 70% ethanol for 2 minutes. They were then immersed in 5.3% sodium hypo-

chlorite solution and 75% ethanol for 5 minutes and 30 seconds, respectively (18). Subsequently, the ingredients of the plant were washed with sterile distilled water and then dried. The final distilled water was then cultured on a nutrient agar as a control. For the isolation of endophytic bacteria, stems, leaves, flowers and onions were cut by a sterile scalpel and transferred into agar media containing yeast extract (Merck, 64271, Germany) or YEA (Yeast Extract Agar: Yeast Extract 5g/L, Glucose 10g/L, Agar 16g/L) and the pepton agar medium (Pepton Agar: Pepton Water 15g (Difco, 1807-17-4)/L, Agar 16g/L (Quelab, 420223). All culture media and the control plates were directly incubated at 35°C for 4-7 day. After the incubation period, the endophytes were developed in the plates and labeled at random for better identification. Each colony was examined macroscopically on an individual basis (19). The morphology of the purified colony of the endophytic bacteria was recorded in terms of shape, color and size. Bacterial identification were done by catalase and oxidase tests, gram staining and biochemical assays (20,21).

Bacterial and Fungal Strains

Respectively, *S. aureus* (ATCC: 25923) and *E. coli* (ATCC: 25922) as standard strains were collected from Shahrekord University of Medical Sciences, Iran. Biochemical and morphological identification were carried out to confirm the prepared strains (21). *C. albicans* and *T. mentagrophytes*, as fungi, were obtained from Department of Mycology, University of Tehran, Iran and were re-cultured in the sabouraud dextrose agar medium (Merck, Germany).

Investigation of Antibacterial and Antifungal Properties of Agents Within the Endophytic Bacteria Through the Drip Method by Chloroform (DMC)

Three to four entirely similar colonies of endophyte bacteria were separately cultured in a Pepton water medium (Difco, 1807-17-4) and incubated at 37°C for 18 to 24 hours. A total of 50 µL of the prepared suspension of each endophyte was placed on Pepton Agar and Yeast Extract Agar medium (YEA, Merck-, 64271, Germany) and incubated (37°C for 18-24 hours). In the next step, the surface of the endophytic colonies were coated by chloroform for 20 to 30 minutes until chloroform completely evaporated (19).

Three to four completely identical colonies of each pathogens (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 and *C. albicans*) were cultured separately in a Tryptic Soy Broth (TSB) medium and incubated for 24 hours at 37°C. After the incubation period, 200 µL was collected from the TSB medium (at a concentration of 0.5 McFarland) and transferred into tubes containing 10 mL of semisolid BHI culture medium (Himedia, 400-086) in 37 to 40°C.

The contents of each tube were added to the surface of the YEA and PA medium containing endophytic bacterial colonies, so that the surface of the plate was completely covered with BHI medium and incubated at 37°C for 18 to 24 hours.

A total of 1-2 pure cultured colonies of *T. mentagrophytes* were also removed by a needle and cultured 1 cm away from the endophyte bacterial colony at four corners of the plate. Following this period, the diameter of the growth inhibition zone of the pathogens formed around each endophytic colony was measured and recorded in millimeters. Each endophytic isolate was tested separately. Also, before performing the aforementioned steps, to find the antibacterial and antifungal properties of the endophytes, the antibiogram of pathogens was examined and confirmed in the standard tables. The experiments were repeated in triplicate and the standard deviation of the mean (SD) as well as standard error of the mean (SEM) was calculated and documented (19).

Investigation of Antibacterial and Antifungal Properties of Endophytic Bacteria by Secretory Metabolite Test (SMeT)

Three to four colonies of each endophytic bacterium were cultured separately in a LB broth (Luria Bertani Broth, Merck, 110285, Germany) and incubated at 37°C for 18-24 hours.

The standard pathogens including *S. aureus*, *E. coli*, and *C. albicans* were cultured in LB medium and incubated. A total of 200 µL of LB medium, at the appropriate concentration of 0.5 McFarland, was added to 15 mL of YEA medium, mixed and poured into sterile plates. Without wasting time and before the solidification of the culture medium, the sterile aluminum cylinders (0.5 cm in diameter and 1 cm in height) were inserted into the plates with appropriate spacing. The YEA culture medium was prepared and autoclaved and poured in the plates. Before solidification of the culture medium, the sterile aluminum cylinders were inserted into the plates. A total of 1-2 pure colonies of *T. mentagrophytes* were removed by a straight needle and cultured in 4 corners of the plate, containing YEA medium. A total of 1 mL of LB broth (Merck, 110285, Germany) containing cultured endophyte bacteria at the appropriate concentration (standard 0.5 McFarland) was transferred to a sterile microtube. The microtube contents were centrifuged (Sigma, serial no. 103286) at 10,000 rpm for 15 minutes. After filtration of the centrifugal supernatant, 100 µL was removed and carefully poured into each cylinder. Sterile water was also considered as a control group. The plates were incubated at 37°C for 24 h. These steps were performed separately for each endophytic strain as well

as pathogens. After incubation, the created diameter of the pathogens growthless zone (*S. aureus* ATCC: 25923, *E. coli* ATCC: 25922 and *C. albicans*) around each cylinder was measured and recorded in millimeters. Growth in *T. mentagrophytes* was also evaluated and compared to the controls. The experiments were repeated and the standard deviation of the mean (SD) as well as standard error of the mean (SEM) were calculated and documented (22).

Statistical Analysis

Data was statistically analyzed by SPSS 22 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA). The Antimicrobial effect of *A. jesdianum* endophytes on the pathogens (*S. aureus*, *E. coli* & *C. albicans*) was calculated in both methods. Also, the inhibitory effect of all endophyte samples in DMC and SMeT were reported by T-test and ANOVA statistical tests.

Results

Isolated Bacterial Endophytes

A total of 11 bacterial endophytes were collected from various parts of the herb including stem, leaf, onion and flower. The results have demonstrated the different effects of the bacterial endophytes isolated from the *A. jesdianum* on some examined pathogens. Out of 11 endophytes isolated from this plant, 4 bacterial endophytes were gram-positive and 7 gram-negative. Amongst these endophytes, 6 were Cocci, 3 Bacilli and 2 Cocco bacillus. The endophytes with both antimicrobial and antifungal properties belonged to both gram-positive and gram-negative groups with different forms. Most of the bacterial endophytes obtained from the plant were cocci and bacilli. All 11 endophytes isolated from *A. jesdianum* were grown in different culture media such as Yeast Extract Agar, Peptone Agar, Blood Agar, TSB, LB (Luria Bertani Broth) and also Manitol salt Agar. Colonies of bacterial endophytes in the Peptone Agar medium showed the better growth. Furthermore, the colonies in the YEA medium were weaker than that of the PA medium.

The secretory metabolites of the isolated bacterial endophyte from all parts of the plant (stem, leaf, onion and flower) showed remarkable and favorable antibacterial and antifungal effect on the examined pathogens (Table 1-2). In general secretory metabolites of *A. jesdianum*'s bacterial endophytes demonstrated the better inhibitory growth effects than endophytes.

Antibacterial Effect of *A. jesdianum* Against *S. aureus* (ATCC: 25923)

In this study, through the drip method by chloroform (DMC), endophytes of *A. jesdianum* showed a favorable effect on *S. aureus* (ATCC: 25923) (Figure 1).



Figure 1. Growth inhibiting effect of *A. jesdianum* endophyte called "M" on *S. aureus* (ATCC:25923) by chloroform drip method.

In general the best antibacterial effect of endophytes was on *S. aureus* (ATCC: 25923). However, the secretory metabolites of most isolated bacterial endophytes showed favorable inhibitory effects on *S. aureus* (ATCC: 25923) (Figure 2).

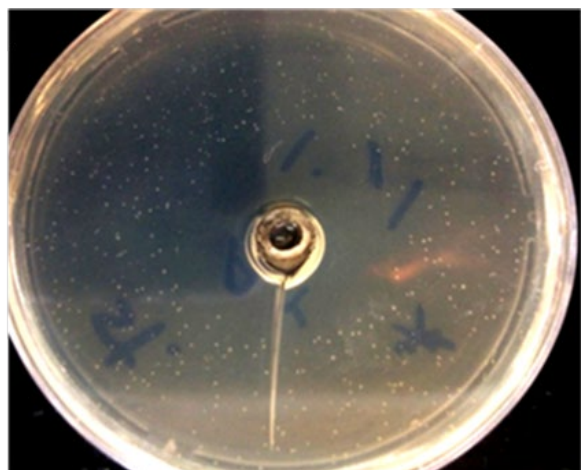


Figure 2. Antibacterial effect of *A. jesdianum* endophyte "S" metabolite on *S. aureus*

Antibacterial Effect of *A. jesdianum* Against *E. coli* (ATCC: 25922)

None of the 11 bacterial endophytes isolated from *A. jesdianum* were effective in the two methods, per chloroform drip, and evaluating the effect of secreting metabolites on *E. coli* (ATCC: 25922) (Table 1).

A very weak growth inhibitor zone against *E. coli* was created by the secretory metabolites of 2 isolated endophytic bacteria (C1 and C2) (Table 2).

Antifungal Effect of *A. jesdianum* Against *C. albicans*

Using the chloroform drip method, only the endophytes named "K", "H" and "Z", which have been isolated from the flowers and bulbs of *A. jesdianum*, created a very weak growth inhibition against *C. albicans*. In other bacterial endophytes, no growth inhibitory zone was observed against *C. albicans*, however three endophytes created a very small zone (Table 1).

The secretory metabolites of the isolated endophytic bacteria from *A. jesdianum* showed relatively positive inhibitory effects on *C. albicans* and only one bacterial endophyte "W" showed no growthless halo (Table 2).

Table 1. Mean diameter (SD) of growth inhibition zone of bacteria (*S. aureus* & *E. coli*) and fungus (*C. albicans*) in millimeters based on bacterial endophytic structure factors in *A. jesdianum* by bacterial colony drip method using chloroform

Endophytes	Morphology	Plant section	<i>S. aureus</i> (SD)	<i>E. coli</i> (SD)	<i>C. albicans</i> (SD)
K	Bacilli G ⁻	Onion	34.5(1.5)*	0(0)	4(2)
M	Cocci G ⁻	Leaf	36.5(3.5)	0(0)	0(0)
F	Cocco Bacillus G ⁺	Leaf	18.5(3.5)	0(0)	0(0)
C ₁	Cocci G ⁺	Leaf	5(1)	0(0)	0(0)
C ₂	Cocci G ⁺	Leaf	1.5(1.5)	0(0)	0(0)
S	Cocci G ⁺	Leaf	0(0)	0(0)	0(0)
W	Cocco Bacillus G ⁻	Leaf	0(0)	0(0)	0(0)
B ₁	Cocci G ⁺	Stem	0(0)	0(0)	0(0)
B ₂	Cocci G ⁺	Stem	12.5(2.5)	0(0)	0(0)
H	Bacilli G ⁻	Onion	15(1)	0(0)	2(2)
Z	Bacilli G ⁻	Flower	2(2)	0(0)	6(1)

* The number in parentheses indicates the standard error of mean (SEM).

Table 2. Mean diameter (SD) of growth inhibition zone of bacteria (*S. aureus* & *E. coli*) and fungus (*C. albicans*) influenced by endophytic bacterial secretory metabolites of *A. jesdianum*

Endophytes	Morphology	Plant section	<i>S. aureus</i> (SD)	<i>E. coli</i> (SD)	<i>C. albicans</i> (SD)
K	Bacilli G ⁻	Onion	27(3)*	0(0)	10.5(2.5)
M	Cocci G ⁻	Leaf	21.5(3.5)	0(0)	8.5(1.5)
F	Cocco Bacillus G ⁺	Leaf	0(0)	0(0)	13(2)
C ₁	Cocci G ⁺	Leaf	18.5(5.5)	2(0)	9(1)
C ₂	Cocci G ⁺	Leaf	21(1)	3(0)	12.5(1.5)
S	Cocci G ⁺	Leaf	27(3)	0(0)	11.5(1.5)
W	Cocco Bacillus G ⁻	Leaf	14.5(0.5)	0(0)	0(0)
B ₁	Cocci G ⁺	Stem	26.5(3.5)	0(0)	11(1)
B ₂	Cocci G ⁺	Stem	0(0)	0(0)	14(1)
H	Bacilli G ⁻	Onion	24(2)	0(0)	12.5(1.5)
Z	Bacilli G ⁻	Flower	35.5(4.5)	0(0)	15(2)

* The number in parentheses indicates the standard error of mean (SEM).

Antifungal Effect of *A. jesdianum* Against *T. mentagrophytes*

Using the chloroform drip method, out of 11 isolated bacterial endophytes, only 4 endophytes named "S", "Z", "W", and "K", which were isolated from the flowers, onions, and leaves of *A. jesdianum*, showed antifungal activity against the *T. mentagrophytes*. The secretory metabolites of the 11 bacterial endophytes isolated from *A. jesdianum* showed no effect on the *T. mentagrophytes* growth (Table 3).

Antibiogram Test

The results of antibiogram test was using the disc diffusion method are presented in the diameter of the growth inhibition zone (Table 4).

Statistical Analysis

There was a significance difference between all endophytes' antimicrobial effect in using drip method by chloroform (DMC) compared to secretory metabolite test (SMeT) in term of inhibitory effect on *S. aureus*.

Table 3. Antifungal properties of endophyte bacteria against *Trichophyton mentagrophytes* growth based on chloroform drip method and endophytic bacterial secretory metabolites of *Allium jesdianum*

Endophytes	Morphology	Plant section	Effects of endophytic secretory metabolites	Effect of endophytic structural factors
B ₁	Cocci G ⁺	Stem	Negative	Negative
B ₂	Cocci G ⁺	Stem	Negative	Negative
C ₁	Cocci G ⁺	Leaf	Negative	Negative
C ₂	Cocci G ⁺	Leaf	Negative	Negative
S	Cocci G ⁺	Leaf	Negative	Positive
W	Cocco Bacillus G ⁻	Leaf	Negative	Positive
M	Cocci G ⁻	Leaf	Negative	Negative
F	Cocco Bacillus G ⁺	Leaf	Negative	Negative
H	Bacilli G ⁻	Onion	Negative	Negative
K	Bacilli G ⁻	Onion	Negative	Positive
Z	Bacilli G ⁻	Flower	Negative	Positive

Table 4. Diameter of growthless aura created in antibiogram test against *S. aureus* & *E. coli*.

Antibiotics	<i>S. aureus</i> (ATCC: 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC:25922)
Doxycycline	13	—
Chloramphenicol	14	24
Cefteraxone	0	20
Nalidixic acid	0	—
Furazolidone	19	19
Ampiciline	0	0
Lyncomycin	20	—
Streptomycin	18	14

Except for endophytes “S”, a significance difference was reported between all endophytes using the drip method by chloroform compared to secretory metabolite test in term of inhibitory effect on *C. albicans*.

Amongst all endophytes, “C1” and “C2” showed a significant difference inhibitory effect on *E. coli* in both methods. The obtained data from the effect of various endophytes on growing of three pathogens in both methods are presented in [Table 5](#).

Table 5. Comparison between the inhibitory effects of *Allium jesdianum* endophytes on growing of three pathogens in both methods.

Bacterial Endophyte	<i>S. aureus</i> DMC	<i>S. aureus</i> SMeT	P-value	<i>E. coli</i> DMC	<i>E. coli</i> SMeT	P-value	<i>C. albicans</i> DMC	<i>C. albicans</i> SMeT	P-value
B1	0.00±0.00	26.00±3.60	0.006	0.00±0.00	0.00±0.00	1	0.00±0.00	12.00±2.00	<0.001
B2	12.33±2.51	0.00±0.00	0.001	0.00±0.00	0.00±0.00	1	0.00±0.00	12.66±2.08	0.009
F	18.00±3.6	0.00±0.00	0.013	0.00±0.00	0.00±0.00	1	0.00±0.00	13.33±2.09	0.008
M	36.00±3.67	21.33±3.51	0.007	0.00±0.00	0.00±0.00	1	0.00±0.00	8.66±1.52	0.010
H	15.00±1.00	23.66±2.51	0.005	0.00±0.00	0.00±0.00	1	2.07±1.67	11.66±1.08	0.004
C1	4.66±1.54	18.33±5.50	0.014	0.00±0.00	1.00±0.93	<0.001	0.00±0.00	8.33±1.50	0.001
C2	1.33±1.52	19.66±2.50	<0.001	0.00±0.00	1.57±1.37	<0.001	0.00±0.00	13.33±2.05	0.008
K	34.00±1.73	27.00±3.00	0.025	0.00±0.00	0.00±0.00	1	3.66±2.08	10.66±2.51	0.021
S	0.00±0.00	26.66±3.05	<0.001	0.00±0.00	0.00±0.00	1	0.00±0.00	11.66±1.49	<0.001
W	0.00±0.00	15.33±1.52	<0.001	0.00±0.00	0.00±0.00	1	0.00±0.00	0.00±0.00	1
Z	2.00±1.82	34.66±4.72	<0.001	0.00±0.00	0.00±0.00	1	6.00±1.41	15.00±2.00	0.010

DMC: Drip method by chloroform

SMeT: Secretory metabolite test

Intra-group Analysis

A significance difference between the “B1”, “S” and “W” with other endophytes in terms of inhibitory effects on *S. aureus* was reported in DMC method ($P<0.05$). There was also, significant difference amongst other endophytes including M, K, F, H, B2, C1, Z, and C2 in terms of inhibitory effects on *S. aureus* by DMC method ([Figure 3](#)).

S. aureus significantly showed a difference growing pattern using SMeT ($P<0.05$). Specifically, a significant difference between the “B2” and “F” endophytes with other endophytes in terms of inhibitory effects on *S. aureus* was observed ($P<0.05$).

The inhibitory effect of all endophytes in DMC and SMeT on each of the *S. aureus* was showed in [Figure 3](#).

The obtained data from inhibitory effect of various endophytes on *C. albicans* by both groups are expressed in [Figure 4](#). A significant difference between the “W” endophyte with other endophytes was observed in terms of inhibitory effect on *C. albicans* in DMC method ($P<0.05$). While, the “W”, “C1”, “M”, “S”, “B1”, “C2” and “F” endophytes showed significant difference respected to inhibitory effect compared to “H”, “Z” and “K” endophytes on *C. albicans* by SMeT ($P<0.05$) ([Figure 4](#)).

There was no significant difference amongst various endophytes in terms of inhibitory effect on *E. coli* using SMeT and DMC.

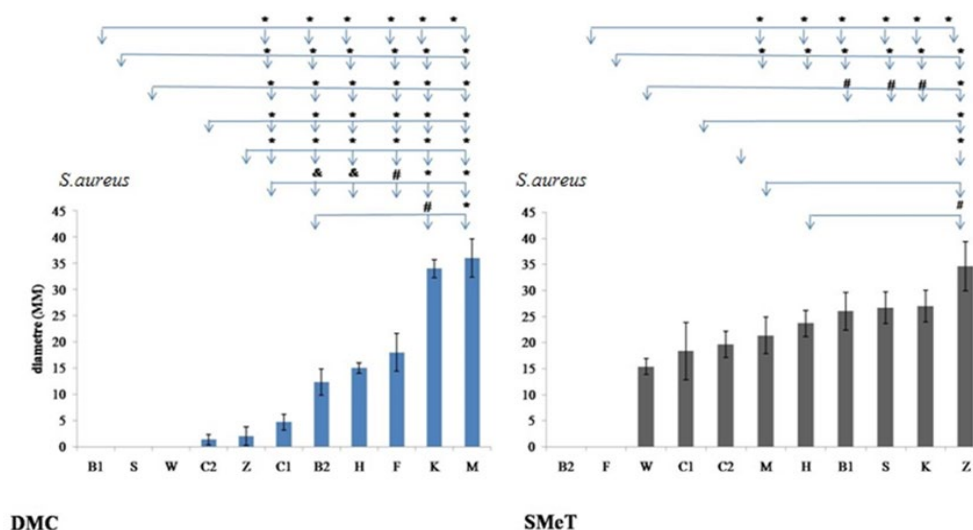


Figure 3. The inhibitory effect of *A. jesdianum* endophytes on *S. aureus* in both methods, DMC: drip method by chloroform SMeT: secretory metabolite test; *, #, & characters show the significant difference, $P<0.001$, $P<0.01$, and $P<0.05$, respectively.

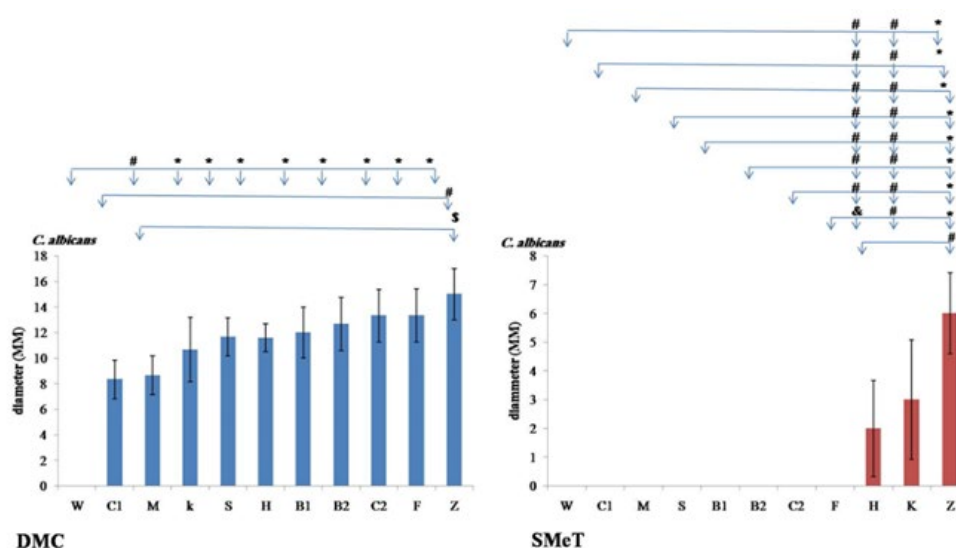


Figure 4. The inhibitory effect of *A. jesdianum* endophytes on *C. albicans* in both methods, DMC: drip method by chloroform SMeT: secretory metabolite test; *, #, & characters show the significant difference $P<0.001$, $P<0.01$, and $P<0.05$, respectively.

Discussion

Since this study was designed to investigate the effect of *Allium jesdianum*'s bacterial endophytes on the certain fungal and bacterial pathogens, the main findings of the present study was the potency and effectiveness of the bacterial endophytes in inhibiting of the aforementioned human pathogens' growth. Eleven bacterial endophytes were obtained from various sections of *A. Jesdianum*. In general, endophytes have an improved inhibitory effect on *T. mentagrophytes*. Secretory metabolites of endophytic bacteria had a positive effect on *S. aureus* and *C. albicans*.

Endophytic bacteria have been widely obtained from a variety of plants that sustain one or more

endophytes in 300,000 species on the earth (23). Until now, several studies have been attempted to identify and isolate microbial endophytes from a variety of medicinal plants in which the antifungal and antibacterial properties of endophytes have been demonstrated (24).

The method proposed by the present study for the superficial sterilization of the plant is an effective method for the isolation of endophytes. The process of removing epiphytic microorganisms and rhizospheres from the soil, which are brought to the laboratory with plant samples, has been used in several ways over the last few years. Washing the samples by alcohol and sodium hypochlorite is one of

the main and constant steps (25,26). To ensure sterilization of the samples surface, the last distilled water solution (used for washing) was cultured and the presence of bacteria was detected. The lack of bacterial growth indicates that the surface sterilization steps were performed correctly. It can be ensured that the bacteria isolated from the plant samples were endophytes. In addition to the high growth of *A. jesdianum* endophytic bacteria, this paper provides a simple and powerful method of surface sterilization of plant tissues for better separation of endophytes in the plant.

The anti-diabetic and anti-tumor properties of endophytes have been recently demonstrated (27). Sebola *et al.* (2019) showed the antibacterial activity of extract of bacterial endophytes (28). The existence of endophytes in various parts of plants has also been reported previously (29,30). Vu *et al.*, (2019) have isolated 111 endophytic actinomycetes from roots, stems and leaves of the *Cinnamomum cassia Presl*, with different antimicrobial activity (30).

In the present study, the endophytes were mainly isolated from the leaves compared to other parts. "M" endophyte (36 ± 3.67) in the chloroform drip method and "Z" endophyte (34.66 ± 4.7) in endophytic secretory metabolite test showed significant effects on inhibition of *S. aureus*.

There was a significant difference amongst all endophytes against *S. aureus* indicated by the mean diameter of the growth inhibition zone using both methods ($P < 0.05$).

All 11 endophytes isolated from *A. jesdianum* were grown in Manitol salt Agar, after 24-48 hours, which indicates they have a high tolerance to sodium chloride salt. Microorganisms' growth inhibitory effect of the plant extracts is caused by some of the phytochemical compounds such as tannins, saponins, terpenoids, alkaloids, flavonoids, phenols and steroids, etc. that is extracted by chloroform (31). *Allium* species contain vital compounds such as carbohydrates, flavonoids and saponins. These species possess important biological and pharmacological activities such as antifungal, antibacterial, anti-tumor, anti-inflammatory, anti-thrombotic and hypocholesterolemia properties (32, 33). The antimicrobial and antifungal properties of endophytes compounds are possible to be extracted by chloroform (34, 35). The antioxidant properties of *Allium* are related to the flavonoids and phenolic compounds (36).

Amiri (2007) demonstrated that ethanolic extract has stronger antimicrobial effects than those of the essential oil and other extracts of *A. jesdianum*. The antimicrobial properties of oil and ethanolic extracts are related to their sulfide and terpenoid compounds (37). Studies demonstrated that *Allium bakhtiaricum*

chloroform fraction has a suppressive effect on breast cancer (38). The antioxidative properties of *allium* species possibly function with organosulfur compounds (39). El-Gendy *et al.* (2018) have carried out studies on the bioactive metabolites from various marine endophysical *Streptomyces* species against MRSA (40).

The antifungal activity and immunomodulatory effect of *A. jesdianum* Boiss extracts against *C. albicans* has been shown (41). According to statistical analyses, "K", "Z" and "H" endophytes have significant inhibitory effects on *C. albicans*'s growth by both methods ($P < 0.05$). In the present study, the secretory metabolites of endophytic bacteria isolated from *A. jesdianum* demonstrated relatively favorable inhibitory effects on *C. albicans*.

Of the eleven isolated endophytes, only one endophyte, which was named "W", showed no effect on the growth of *C. albicans*. Furthermore, endophytic bacteria had the better antifungal properties against *C. albicans* compared to *T. mentagrophytes*. The secretory metabolites of all the isolated bacterial endophytes from *A. jesdianum* showed no effect on the growth of *T. mentagrophytes*, however the bacteria's body had more favorable inhibitory effect on this fungus compared to secretory metabolites. Secondary compounds such as pigments, plant growth regulator factors and mycotoxins, are among the metabolites produced by these endophytes (42).

The secretory metabolites of *A. jesdianum* may contain antibacterial, antifungal and other pharmaceutical compounds. In general, the secretory metabolites of bacterial endophytes of *A. jesdianum* showed the stronger inhibitory effect than those of bacteria's body against *C. albicans*.

In disc diffusion antibiogram (Kirby Bauer) tests against *S. aureus* (ATCC: 25923), the largest diameter of the no-growth zone was 20 mm which belonged to the Lincomycin antibiotic. Whereas, in the metabolite study, the mean diameter (SD) of the growthless zone created was 35.5 mm which belonged to an endophytic bacterium called "Z", in the DMC, the standard mean diameters of the growth inhibition zone created by bacterial endophytes known as "M" and "K" were 36.5 mm and 34.5 mm, respectively. Because of the widespread and increasing bacterial and fungal infections resistance to antibiotics, isolation and identification of bacterial endophytes can be a good approach to overcome the resistance of human pathogens against antibiotics (43). The obtained data from the present study indicate that the resulting bacterial endophytes have a better inhibitory effect on gram-positive bacteria. The achievement of this important objective is the use of these endophytic bacteria in the production of medication with less side

effects and the better effect against Gram-positive bacteria and pathogenic fungi.

Jiang *et al.* (2018) investigated the 101 actinobacteria as endophytes in which 31 strains showed positive inhibitory effect on at least one bacterium and 21 strains showed inhibitory activity against at least one "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species) resistant pathogens (44). Numerous bioactive compounds derived from endophytes are used as a major resource in various pharmaceutical formulations (45). Endophytic bacteria play an important role in both medicine and pharmacy. The bacterial endophytes of *A. jesdianum* and their properties can be used to produce antimicrobial agents, particularly for pathogens that are resistant to

common antibiotics. In addition, they can be applied in agriculture and food industries.

Acknowledgment

Acknowledgements: This work was supported by Shahrekord University (grant numbers: 96GRD1M1-801 and 96PRM2M50457).

Funding

The financial resources of this research were provided by Ms. Habibi Nava

Conflict of Interest

The author declared no conflict of interest.

بررسی تأثیر اندوفیت‌های باکتریایی *Allium jesdianum* بر برخی از پاتوژن‌های باکتریایی و قارچیمریم اسمعیلی^۱، عزیزالله ابراهیمی کهریزسنگی^۱، سمیه شاهرخ شهرکی^{۱،۲*}، اعظم مختاری^{۱،۲}

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲. پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۸

پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۱

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۰۴/۰۷

موضوع: باکتری شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

سمیه شاهرخ شهرکی، گروه پاتوبیولوژی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد،

شهرکرد، ایران

ایمیل:

Shahrokh@sku.ac.ir

زمینه و اهداف: در بافت‌های گیاهان دارویی، برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها دارای زندگی هم‌زیستی هستند که "اندوفیت" نام دارند. مطالعه حاضر با هدف بررسی وجود اندوفیت‌های باکتریایی در گیاهان دارویی *Allium jesdianum* و شناسایی و ارزیابی اثر اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده روی برخی از پاتوژن‌های باکتریایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* و پاتوژن‌های قارچی مانند *ترایکوفایتون متاگروفایتوس* و *کاندیدا آلبیکنس* انجام شد.

مواد و روش کار: برگ، ساقه، پیاز و گل‌های *A. jesdianum* به‌طور تصادفی جمع‌آوری و ضدعفونی شده و با کشت روی محیط‌های PA و YEA اندوفیت‌های باکتریایی جدا گشتند. کلنی‌های اندوفیت‌ها خالص شدند و با استفاده از کلروفرم خاصیت آنتی‌پاتوژنی عوامل ساختاری اندوفیت‌های باکتریایی بررسی گردید. برای ارزیابی اثر ضد پاتوژنی متابولیت‌ها، محیط کشت براث باکتری‌های اندوفیتی سانتریفیوژ گردید و مایع رویی فیلتر و ضدعفونی شد. تست آنتی‌بیوگرام با روش انتشار دیسک (کربی بایر) برای بررسی اندوفیت‌های جدا شده استفاده شد. داده‌ها به‌وسیله تی تست و ANOVA تجزیه و تحلیل آماری شدند (با استفاده از نسخه ۲۲ نرم‌افزار SPSS).

یافته‌ها: یازده اندوفیت باکتریایی از قسمت‌های مختلف گیاه *A. jesdianum* جدا شدند. اندوفیت‌های باکتریایی *A. jesdianum* تأثیر معنی‌داری روی پاتوژن‌های مورد بررسی چون *S. aureus* و *C. albicans* داشتند. عوامل ساختاری باکتری‌های اندوفیت تأثیر بهتری بر قارچ *ترایکوفایتون متاگروفایتوس* از خود بروز دادند.

نتیجه‌گیری: از نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که اندوفیت‌های باکتریایی *A. jesdianum* می‌توانند به‌عنوان عوامل بالقوه و مفید در برابر پاتوژن‌های انسانی در نظر گرفته شوند.

کلیدواژه‌ها: *Allium jesdianum* Endophyte، فعالیت ضد پاتوژن

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

مقدمه

گیاهان دارویی، گروهی از گیاهان هستند که دارای ترکیبات مهمی برای صنعت داروسازی می‌باشند (۱). گیاهان دارویی مؤثر به دلیل دسترسی آسان و عوارض جانبی کم، توجه جهانی را به خود معطوف کرده‌اند (۲). اندوفیت‌ها درون بافت میزبان، بدون ایجاد علائم بیماری یا آسیب آشکار ساکن بوده و موجب رشد و سلامت گیاه و مقاومت در برابر انواع بیماری‌ها می‌شوند. اندوفیت‌ها همچنین تولیدکننده قدرتمند متابولیت‌های ثانویه محسوب می‌شوند (۳). متابولیت‌های ترشحی ضد میکروبی استخراج شده از اندوفیت‌ها به طبقه‌بندی‌های مختلف ساختاری از جمله پپتیدها، آلکالوئیدها، فنول‌ها، استروئیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و غیره تعلق دارند (۴). اندوفیت‌ها شامل انواع باکتری‌ها (اکتینومایست‌ها) و قارچ‌ها هستند

که به‌طور کلی از گیاهان جدا می‌شوند (۵). این میکروارگانیسم‌ها دارای خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی هستند و همچنین می‌توانند از ورود عوامل بیماری‌زا به گیاه جلوگیری کنند (۶). آنتی‌بیوتیک‌های جدید، آنتی‌میکوتیک‌ها و ترکیبات ضدسرطان فقط چند نمونه از جداسازی اندوفیت‌ها هستند (۷). با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی میکروب‌های بیماری‌زا، اندوفیت‌ها می‌توانند جایگزین مناسبی برای برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها باشند و همچنین ممکن است منابعی جایگزین برای ترکیبات بیواکتیو و پروبیوتیک‌ها برای درمان برخی بیماری‌های باکتریایی و قارچی را فراهم کنند (۸). *اشریشیا کلی* با ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها علت اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. این باکتری هر ساله

دقیقه قرار داده شدند. سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۳ درصد به مدت ۵ دقیقه و در اتانول ۷۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفتند (۱۸). بعد از طی این مراحل اجزای گیاه بن‌سرخ با آب مقطر استریل شستشو داده و خشک شدند. برای کنترل، آب مقطر استریل نهایی روی محیط کشت نوترینت آگار به‌عنوان شاهد کشت داده شد. برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت، ساقه‌ها، برگ‌ها، گل و پیاز به‌وسیله وسایل استریل قطعه‌قطعه شده و غشای سطحی اجزای گیاه جدا و برش‌هایی در سطح داخلی آنها ایجاد شد. سپس توسط وسایل استریل، قطعات روی سطح محیط کشت‌هایی چون آگار حاوی عصاره مخمر یا YEA (Yeast Extract Agar: Yeast Extract 5g/l, Glucose 10g/l, Agar 16g/l) (Merck, 64271, Germany) و نیز محیط کشت پپتون آگار (Pepton Agar: Pepton water 15g (Difco, 1807-17-4)/L, Agar 16g/L (Quelab, 420223) کشت داده شدند. محیط‌های کشت داده شده و پلیت‌های کنترل در دمای ۳۵ درجه سلسیوس طی مدت زمان ۴ الی ۷ روز به‌صورت مستقیم انکوبه شدند. بعد از طی مدت زمان انکوباسیون اندوفیت‌ها درون پلیت‌ها رشد یافته و به‌صورت تصادفی نامگذاری شدند. هر کلنی به تفکیک محل جداسازی (ساقه، برگ، پیاز و یا گل) مورد مطالعه و بررسی ماکروسکوپی قرار گرفت (۱۹). مورفولوژی کلنی خالص‌شده باکتری‌های اندوفیت از نظر شکل، رنگ و اندازه مشاهده و ثبت شدند. جدایه‌های باکتریایی برای آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز، رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی تجزیه و تحلیل شدند (۲۰، ۲۱).

سویه‌های باکتریایی و قارچی

پاتوژن‌های *S. aureus* (ATCC: 25923) و *E. coli* (ATCC: 25922) به‌عنوان سویه استاندارد از دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد دریافت شدند. آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی برای تأیید سویه‌های تهیه‌شده انجام شد (۲۱).

قارچ‌های *C. albicans* و *T. mentagrophytes* از آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه تهران به‌دست آمده و در محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Merck, Germany) کشت مجدد شدند.

بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی عوامل موجود در ساختار باکتری‌های اندوفیت: روش قطره‌گذاری با کلروفرم (DMC)

سه تا چهار کلنی کاملاً مشابه از باکتری‌های اندوفیت به‌طور جداگانه در محیط پپتون واتر (Difco, 1807-17-4) کشت داده و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس

باعث مرگ گسترده نوزادان به دلیل اسهال و سپتی‌سمی می‌شود (۹). سویه‌های *E. coli* به‌طور کلی در برابر تعدادی از داروها مقاوم هستند (۱۰). جدایه‌های مختلف *S. aureus* از نظر حساسیت یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک پاسخ‌های متفاوتی دارند. گزارش‌های علمی حاکی از تغییراتی در اپیدمیولوژی سویه‌های *S. aureus* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده در برخی از سویه‌های باکتری و قارچ‌ها، درمان آنها را پیچیده می‌کند (۱۱). می‌توان متصور شد که مرگ و میر ناشی از عفونت‌های کاندیدیایی علی‌رغم درمان با آمفوتریسین B یا فلوکونازول همچنان ادامه دارد (۱۲). همچنین افزایش استفاده و تجویز داروهای ضدقارچی منجر به افزایش مقاومت به داروهای موجود می‌شود (۱۳). مطالعات *in vitro* صورت گرفته نشان داده‌اند که برخی از گونه‌های *Allium* می‌توانند باعث کاهش ریسک فاکتورهایی مانند فشار خون بالا، افزایش کلسترول سرم، افزایش LDL، افزایش پلاکت‌ها شوند (۱۴، ۱۵). گیاه بن‌سرخ با نام علمی *Allium jesdianum* از خانواده *Alliaceae* است که در غرب و جنوب غربی ایران رشد کرده و به‌صورت سنتی در درمان و تسکین دردهای روماتیسمی و گوارشی، دفع سنگ کلیه و همچنین سرماخوردگی و دردهای شکمی موثر است. این گیاه خاصیت ضد درد و تسکین‌دهنده دارد (۱۶، ۱۷). در مطالعه حاضر، ابتدا اندوفیت‌های باکتریایی از *A. jesdianum* جدا شدند و سپس خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی آنها در برابر برخی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های اندوفیت گیاه بن‌سرخ

نمونه‌های تازه از گیاه بن‌سرخ (*A. jesdianum*) (قسمت‌های مختلف گیاه شامل ساقه، برگ، پیاز و گل) در بهار سال ۲۰۱۹، به‌طور تصادفی از استان چهارمحال و بختیاری واقع در ایران جمع‌آوری شد. در این مطالعه کارآزمایی بالینی، حداقل ۳۰ و حداکثر ۵۰ نمونه تازه *A. jesdianum* برای جداسازی حداکثر ۱۰ اندوفیت باکتریایی برای ارزیابی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی استفاده شد. نمونه‌های *A. jesdianum* به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهرکرد منتقل شدند. جنس و گونه این گیاه به‌وسیله بخش گیاه‌شناسی تأیید شد. برای زدودن آلودگی‌های سطحی، گیاه شستشو و بعد از خشک شدن، ضد عفونی و استریل شد. بدین جهت ساقه، برگ، پیاز و گل گیاه بن‌سرخ هر کدام به‌صورت جداگانه ابتدا در اتانول ۷۰ درصد طی مدت زمان ۲

۰/۵ مک فارلند، را برداشته و به صورت جداگانه به ۱۵ میلی لیتر محیط YEA (از قبل تهیه و اتوکلاو شده و در دمای مناسب ۳۷ درجه سلسیوس تا ۴۰ درجه سلسیوس) اضافه، مخلوط و در پلیت های استریل ریخته شدند. سپس بدون اتلاف وقت و قبل از جامد شدن محیط کشت، سیلندرهای آلومینیومی استریل (با قطر ۰/۵ سانتی متر و ارتفاع ۱ سانتی متر) با رعایت فاصله مناسب، درون پلیت ها جاگذاری شدند.

در جای دیگر محیط کشت YEA تهیه و اتوکلاو شده و در پلیت ها ریخته شد. قبل از جامد شدن محیط کشت، سیلندرهای استریل آلومینیومی درون پلیت ها با فاصله مناسب جاگذاری شد. در مجموع ۱-۲ کلنی خالص *T. mentagrophytes* با یک آنس سوزنی برداشته و در ۴ گوشه پلیت حاوی محیط YEA با فاصله مناسب کشت داده شد. در مرحله بعد، در حدود ۱ میلی لیتر از محیط LB (Merck, 110285, Germany) حاوی باکتری های اندوفیت کشت داده شده با غلظت مناسب (استاندارد ۰/۵ مک فارلند) به یک میکروتیوب استریل منتقل شد. محتویات میکروتیوب به مدت زمان ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ (Sigma, serialno. 103286) گردید. بعد از فیلتراسیون مایع رویی سانتریفیوژ شده، ۱۰۰ میکرولیتر از آن را برداشته و درون هر یک از سیلندرهای که قبل از آن درون پلیت ها جاگذاری شده بودند با دقت ریخته شد. آب مقطر استریل نیز به عنوان یک گروه کنترل در نظر گرفته شد. در نهایت پلیت ها به صورت مستقیم در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. این مراحل برای هر سویه باکتری اندوفیت و همچنین عوامل پاتوژن به طور جداگانه انجام پذیرفت. پس از طی دوره انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد پاتوژن های (*S. aureus* (ATCC: 25923) و *E. coli* (ATCC: 25922) که در اطراف هر سیلندر ایجاد شد اندازه گیری و بر حسب میلی متر ثبت شدند. میزان رشد در *T. mentagrophytes* نیز بررسی و با گروه شاهد مورد مقایسه قرار گرفت. آزمایشات تکرار و میانگین انحراف معیار داده ها (SD) و میانگین خطای استاندارد (SEM) محاسبه و ثبت شدند (۲۲).

تحلیل و آنالیز آماری داده ها

داده ها با نسخه ۲۲ نرم افزار SPSS Inc., Chicago, Ill., USA تجزیه و تحلیل شدند. داده های به دست آمده از تأثیر اندوفیت های *A. jesdianum* بر رشد پاتوژن های *S. aureus* و *E. coli* در هر دو روش و همچنین اثر مهارتی تمام اندوفیت ها در روش قطره گذاری با کلروفرم (DMC) و همچنین روش بررسی متابولیت ترششی (SMET) روی هر یک از پاتوژن ها، توسط T-test و آزمون آماری ANOVA تجزیه و تحلیل شدند.

۱ قطره (۵۰ میکرولیتر) از سوسپانسیون تهیه شده از هر اندوفیت برداشته، روی محیط پپتون آگار (Peptone Agar) و محیط YEA (Yeast Extract Agar) (Merck, 64271, Germany) قرار داده و بدون اینکه پخش شوند درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در مرحله بعد، سطح کلنی های اندوفیت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه با کلروفرم پوشانده و اجازه داده شد تا کلروفرم به طور کامل تبخیر شود (۱۹). سه تا چهار کلنی کاملاً یکسان از هر پاتوژن (*C. albicans* و *E. coli* ATCC 25922، *S. aureus* ATCC 25923) به طور جداگانه در محیط TSB (Tryptic Soy Broth) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از طی دوره انکوباسیون، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط TSB (با غلظت ۰/۵ مک فارلند) برداشته و به لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت BHI نیمه جامد (Himedia, 400-086) منتقل و در نهایت مخلوط شدند. محتویات هر لوله بلافاصله به سطح محیط های YEA و PA حاوی کلنی باکتری های اندوفیت اضافه شد، به طوری که سطح پلیت ها را کاملاً با محیط BHI پوشانده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. در حدود ۱ الی ۲ کلنی خالص از قارچ *ترایکوفایتون منتاگروفایتس* (*T. mentagrophytes*) توسط آنس سوزنی در شرایط استریل برداشته و با فاصله ۱ cm از کلنی باکتری اندوفیت در چهار گوشه پلیت کشت داده شد. به دنبال آن، قطر ناحیه مهار رشد میکروارگانیسم های بیماری زا که در اطراف هر کلنی اندوفیت ایجاد شدند، اندازه گیری و بر حسب میلی متر ثبت شد. همچنین میزان رشد قارچ *ترایکوفایتون منتاگروفایتس* نیز بررسی شد. در مورد هر سویه اندوفیت به صورت جداگانه این مراحل انجام پذیرفت. قبل از انجام مراحل فوق، برای یافتن خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی اندوفیت ها، تست آنتی بیوگرام پاتوژن ها بررسی و در جداول استاندارد تأیید شد. آزمایش ها در سه نوبت تکرار شد و میانگین انحراف معیار (SD) داده ها و همچنین میانگین خطای استاندارد (SEM) محاسبه و ثبت شدند (۱۹).

بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی متابولیت های

ترششی باکتری های اندوفیت (SMET)

سه الی چهار کلنی از هر باکتری اندوفیت به طور جداگانه در محیط کشت LB (Luria Bertani Broth) (Merck, 110285, Germany) کشت داده و به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سویه های استاندارد از جمله *S. aureus* و *E. coli* در محیط LB کشت داده و انکوبه شدند. در حدود ۲۰۰ میکرولیتر از محیط LB، حاوی پاتوژن های مذکور با غلظت مناسب

یافته‌ها

اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده

در مجموع ۱۱ اندوفیت باکتریایی از قسمت‌های مختلف گیاه بن‌سرخ، از جمله ساقه، برگ، پیاز و گل جمع‌آوری شدند. نتایج این مطالعه، اثرات متفاوتی از اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده از *A. jesdianum* را علیه پاتوژن‌ها مورد بررسی نشان دادند. از ۱۱ اندوفیت باکتریایی جدا شده از این گیاه، ۴ اندوفیت باکتریایی گرم مثبت و ۷ اندوفیت گرم منفی بودند. از بین این اندوفیت‌ها، ۶ مورد کوکسی، ۳ مورد باسیل و ۲ اندوفیت کوکوباسیل بودند. اندوفیت‌ها با خواص ضد میکروبی و ضد قارچی به هر دو گروه گرم مثبت و گرم منفی با اشکال مختلف تعلق داشتند. اکثر اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده از گیاه بن‌سرخ، کوکسی و باسیل بودند. تمام ۱۱ اندوفیت جدا شده از *A. jesdianum* در محیط‌های مختلف کشت مانند عصاره مخمر، پپتون آگار، آگار خوندار، LB، TSB، (Luria Bertani Broth) و همچنین مانیتول سالت آگار رشد کردند. کلنی‌های اندوفیت باکتری در محیط پپتون آگار رشد بهتری از خود نشان دادند. علاوه بر این، کلنی‌ها در محیط YEA ضعیف‌تر از محیط PA بودند.

متابولیت‌های ترش‌ی اندوفیت باکتریایی جدا شده از تمام قسمت‌های گیاه بن‌سرخ (ساقه، برگ، پیاز و گل) اثر ضد باکتریایی قابل توجه و مطلوبی بر باکتری گرم مثبت داشته و همچنین در بررسی عوامل ساختاری اثر ضد قارچی مطلوبی نسبت به قارچ‌های مورد بررسی (جدول ۱ و ۲) از خود نشان دادند. به‌طور کلی متابولیت‌های ترش‌ی اندوفیت‌های باکتریایی *A. jesdianum* نسبت به عوامل ساختاری، دارای اثرات مهاری مطلوب‌تری هستند.

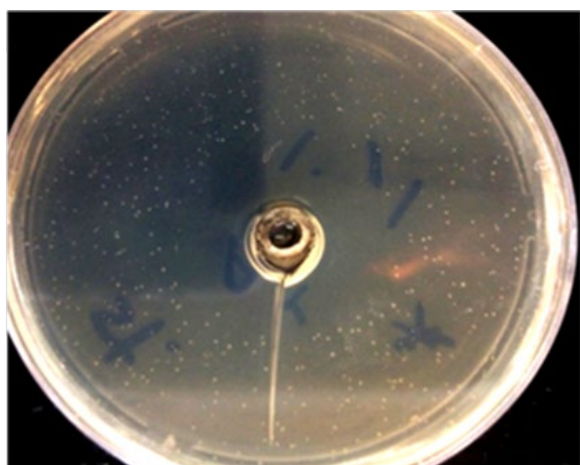
اثر ضد باکتریایی گیاه بن‌سرخ علیه پاتوژن *S. aureus* (ATCC: 25923)

در مطالعه عوامل ساختاری، از طریق روش قطره‌گذاری با کلروفرم (DMC)، اندوفیت‌های *A. jesdianum* اثر مطلوبی بر *S. aureus* (ATCC: 25923) داشتند (شکل ۱).

به طور کلی بهترین اثر ضد باکتریایی اندوفیت‌ها بر روی *S. aureus* (ATCC: 25923) بود. با این حال، متابولیت‌های ترش‌ی اکثر اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده، اثرات مهاری مطلوبی را بر *S. aureus* (ATCC: 25923) از خود نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۱. ایجاد هاله عدم رشد باکتری *S. aureus* (ATCC: 25923) توسط عوامل ساختاری باکتری اندوفیت موسوم به "M" در روش قطره گذاری کلروفرم در گیاه بن‌سرخ



شکل ۲. تأثیر متابولیت‌های ترش‌ی اندوفیت "S" بر باکتری‌های *S. aureus* و خواص ضد باکتریایی *A. jesdianum*

اثر ضد باکتریایی *A. jesdianum* علیه *E. coli* (ATCC: 25922)

هیچ یک از ۱۱ اندوفیت باکتریایی جدا شده از *A. jesdianum* در هر دو روش مورد مطالعه عوامل ساختاری با کلروفرم و ارزیابی اثر ترش‌ی متابولیت‌ها بر باکتری *E. coli* (ATCC: 25922) مؤثر نبودند. در مطالعه عوامل ساختاری، با استفاده از روش قطره‌گذاری کلروفرم، اندوفیت‌های *A. jesdianum* علیه *E. coli* بی‌اثر بودند (جدول ۱).

هاله عدم رشد بسیار ضعیفی در برابر باکتری *E. coli* به‌وسیله متابولیت‌های ترش‌ی ۲ سویه از باکتری اندوفیت جدا شده (C1 و C2) ایجاد شد (جدول ۲).

اثر ضد قارچی گیاه بن سرخ علیه پاتوژن *C. albicans*

در مطالعه عوامل ساختاری از طریق روش قطره گذاری کلروفرم، تنها اندوفیت‌هایی به نام "K"، "H" و "Z"، که از گل و پیازهای *A. jesdianum* جدا شدند، هاله عدم رشد بسیار ضعیفی

علیه *C. albicans* ایجاد کردند. در سایر اندوفیت‌های باکتریایی، هیچ هاله عدم رشدی در برابر قارچ *C. albicans* مشاهده نشد، با این حال این سه اندوفیت، هاله بسیار کوچکی ایجاد کردند (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین قطر (SD) هاله عدم رشد باکتری‌های *E. coli* & *S. aureus* و قارچ *C. albicans* بر حسب میلی‌متر بر اساس عوامل ساختاری اندوفیت باکتریایی در *A. jesdianum* با استفاده از روش قطره گذاری کلنی باکتری با استفاده از کلروفرم

اندوفیت‌ها	مورفولوژی	اجزای گیاه	<i>E. coli</i> (SD)	<i>S. aureus</i> (SD)	<i>C. albicans</i> (SD)
K	Bacilli G -	پیاز	۰ (۰)	۳۴/۵ (۱/۵)*	۴ (۲)
M	Cocci G -	برگ	۰ (۰)	۳۶/۵ (۳/۵)	۰ (۰)
F	Cocco Bacillus G+	برگ	۰ (۰)	۱۸/۵ (۳/۵)	۰ (۰)
C ₁	Cocci G+	برگ	۰ (۰)	۵ (۱)	۰ (۰)
C ₂	Cocci G+	برگ	۰ (۰)	۱/۵ (۱/۵)	۰ (۰)
S	Cocci G+	برگ	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
W	Cocco Bacillus G -	برگ	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
B ₁	Cocci G+	ساقه	۰ (۰)	۰ (۰)	۰ (۰)
B ₂	Cocci G+	ساقه	۰ (۰)	۱۲/۵ (۲/۵)	۰ (۰)
H	Bacilli G -	پیاز	۰ (۰)	۱۵ (۱)	۲ (۲)
Z	Bacilli G -	گل	۰ (۰)	۲ (۲)	۶ (۱)

* عدد داخل پرانتز نشان دهنده خطای استاندارد میانگین (SEM) است.

متابولیت‌های ترشحی باکتری‌های اندوفیت جدا شده از *A. jesdianum* اثرات مهاری نسبتاً مثبتی بر روی قارچ *C. albicans*

از خود نشان دادند و تنها یک اندوفیت باکتریایی به نام "W" هیچ هاله عدم رشدی را ایجاد نکرد (جدول ۲).

جدول ۲. میانگین قطر (SD) هاله عدم رشد باکتری‌های *E. coli* & *S. aureus* و قارچ *C. albicans* ایجاد شده تحت تأثیر متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌های باکتریایی *A. jesdianum*

اندوفیت‌ها	مورفولوژی	اجزای گیاه	<i>E. coli</i> (SD)	<i>S. aureus</i> (SD)	<i>C. albicans</i> (SD)
K	Bacilli G -	پیاز	۰ (۰)	۲۷ (۳)*	۱۰/۵ (۲/۵)
M	Cocci G -	برگ	۰ (۰)	۲۱/۵ (۳/۵)	۸/۵ (۱/۵)
F	Cocco Bacillus G+	برگ	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۳ (۲)
C ₁	Cocci G+	برگ	۲ (۰)	۱۸/۵ (۵/۵)	۹ (۱)
C ₂	Cocci G+	برگ	۳ (۰)	۲۱ (۱)	۱۲/۵ (۱/۵)
S	Cocci G+	برگ	۰ (۰)	۲۷ (۳)	۱۱/۵ (۱/۵)
W	Cocco Bacillus G -	برگ	۰ (۰)	۱۴/۵ (۰/۵)	۰ (۰)
B ₁	Cocci G+	ساقه	۰ (۰)	۲۶/۵ (۳/۵)	۱۱ (۱)
B ₂	Cocci G+	ساقه	۰ (۰)	۰ (۰)	۱۴ (۱)
H	Bacilli G -	پیاز	۰ (۰)	۲۴ (۲)	۱۲/۵ (۱/۵)
Z	Bacilli G -	گل	۰ (۰)	۳۵/۵ (۴/۵)	۱۵ (۲)

* عدد داخل پرانتز نشان دهنده خطای استاندارد میانگین (SEM) است.

برگ‌های *A. jesdianum* جدا شدند، فعالیت ضدقارچی علیه *T. mentagrophytes* از خود نشان دادند. متابولیت‌های ترش‌ی ۱۱ اندوفیت باکتریایی جدا شده از *A. jesdianum* هیچ تاثیری در رشد *T. mentagrophytes* از خود نشان ندادند (جدول ۳).

اثر ضد قارچی گیاه بن‌سرخ بر قارچ *Trichophyton mentagrophytes*

در مطالعه عوامل ساختاری از طریق روش قطره‌گذاری کلروفرم، از ۱۱ اندوفیت باکتریایی جدا شده، فقط ۴ اندوفیت به نام‌های "S"، "Z"، "W" و "K"، که از قسمت‌های گل، پیاز و

جدول ۳. خواص ضد قارچی باکتری‌های اندوفیت در برابر رشد *Trichophyton mentagrophytes* بر اساس فاکتورهای ساختاری در روش قطره‌گذاری توسط کلروفرم و متابولیت‌های ترش‌ی باکتری‌های اندوفیت *Allium jesdianum*

اندوفیت‌ها	مورفولوژی	اجزای گیاه	تأثیر متابولیت‌های ترش‌ی اندوفیت‌ها	تأثیر عوامل ساختاری اندوفیت‌های باکتریایی
B ₁	Cocci G ⁺	ساقه	منفی	منفی
B ₂	Cocci G ⁺	ساقه	منفی	منفی
C ₁	Cocci G ⁺	برگ	منفی	منفی
C ₂	Cocci G ⁺	برگ	منفی	منفی
S	Cocci G ⁺	برگ	منفی	مثبت
W	Cocco Bacillus G ⁻	برگ	منفی	مثبت
M	Cocci G ⁻	برگ	منفی	منفی
F	Cocco Bacillus G ⁺	برگ	منفی	منفی
H	Bacilli G ⁻	پیاز	منفی	منفی
K	Bacilli G ⁻	پیاز	منفی	مثبت
Z	Bacilli G ⁻	گل	منفی	مثبت

جدول ۴. قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در آزمایش آنتی‌بیوگرام در برابر *S. aureus* و *E. coli*

آنتی‌بیوتیک‌ها	<i>S. aureus</i> (ATCC: 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC:25922)
Doxycycline	۱۳	—
Chloramphenicol	۱۴	۲۴
Cefterixone	۰	۲۰
Nalidixic acid	۰	—
Furazolidone	۱۹	۱۹
Ampiciline	۰	۰
Lyncomycin	۲۰	—
Streptomycin	۱۸	۱۴

روش آزمون متابولیت ترش‌ی (SMET) وجود دارد. در بررسی اثر مهاری اندوفیت‌های گیاه بن‌سرخ روی *C. albicans*، اختلاف معنی‌داری بین همه اندوفیت‌ها به جز اندوفیت "S"، در مطالعه عوامل ساختاری از طریق روش قطره‌گذاری با کلروفرم در مقایسه با آزمون متابولیت ترش‌ی اندوفیت‌ها مشاهده شد. در بررسی میان داده‌های تمام اندوفیت‌ها، اثر مهاری "C1" و "C2" روی *E. coli* در هر دو روش، اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. داده‌های به‌دست‌آمده از تأثیر اندوفیت‌های مختلف در رشد سه سویه بیماری‌زا در هر دو روش در جدول ۵ ارائه شده است.

آزمایش آنتی‌بیوگرام

نتایج آزمایش آنتی‌بیوگرام با استفاده از روش انتشار دیسک و بررسی قطر هاله عدم رشد ایجاد شده، ارائه شده است (جدول ۴).

تجزیه و تحلیل آماری

در بررسی اثر مهاری اندوفیت‌ها روی باکتری *S. aureus* اختلاف معنی‌داری بین همه اندوفیت‌ها در روش مطالعه عوامل ساختاری به‌وسیله قطره‌گذاری کلروفرم (DMC) در مقایسه با

جدول ۵. مقایسه اثر اندوفیت‌های *Allium jesdianum* در رشد سه سویه بیماری‌زا در هر دو روش مورد مطالعه

Bacterial Endophyte	<i>S. aureus</i> DMC	<i>S. aureus</i> SMeT	P-value	<i>E. coli</i> DMC	<i>E. coli</i> SMeT	P-value	<i>C. albicans</i> DMC	<i>C. albicans</i> SMeT	P-value
B1	۰/۰±۰/۰۰	۲۶/۰۰±۲/۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۰/۰±۰/۰۰	۱۲/۰۰±۲/۰۰	<۰/۰۰۱
B2	۱۲/۳۳±۲/۵۱	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۰/۰±۰/۰۰	۱۲/۶۶±۲/۰۸	۰/۰۰۹
F	۱۸/۰۰±۳/۶	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰۱۳	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۰/۰±۰/۰۰	۱۲/۳۳±۲/۰۹	۰/۰۰۸
M	۳۶/۰۰±۳/۶۷	۲۱/۳۳±۳/۵۱	۰/۰۰۷	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۰/۰±۰/۰۰	۸/۶۶±۱/۵۲	۰/۰۱۰
H	۱۵/۰۰±۱/۰۰	۲۳/۶۶±۲/۵۱	۰/۰۰۵	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۲/۰۷±۱/۶۷	۱۱/۶۶±۱/۰۸	۰/۰۰۴
C1	۴/۶۶±۱/۵۴	۱۸/۳۳±۵/۵۰	۰/۰۱۴	۰/۰±۰/۰۰	۱/۰۰±۰/۹۳	<۰/۰۰۱	۰/۰±۰/۰۰	۸/۳۳±۱/۵۰	۰/۰۰۱
C2	۱/۳۳±۱/۵۲	۱۹/۶۶±۲/۵۰	<۰/۰۰۱	۰/۰±۰/۰۰	۱/۵۷±۱/۳۷	<۰/۰۰۱	۰/۰±۰/۰۰	۱۲/۳۳±۲/۰۵	۰/۰۰۸
K	۳۴/۰۰±۱/۷۳	۲۷/۰۰±۳/۰۰	۰/۰۲۵	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۳/۶۶±۲/۰۸	۱۰/۶۶±۲/۵۱	۰/۰۲۱
S	۰/۰±۰/۰۰	۲۶/۶۶±۳/۰۵	<۰/۰۰۱	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۰/۰±۰/۰۰	۱۱/۶۶±۱/۴۹	<۰/۰۰۱
W	۰/۰±۰/۰۰	۱۵/۳۳±۱/۵۲	<۰/۰۰۱	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱
Z	۲/۰۰±۱/۸۲	۳۴/۶۶±۴/۷۲	<۰/۰۰۱	۰/۰±۰/۰۰	۰/۰±۰/۰۰	۱	۶/۰۰±۱/۴۱	۱۵/۰۰±۲/۰۰	۰/۰۱۰

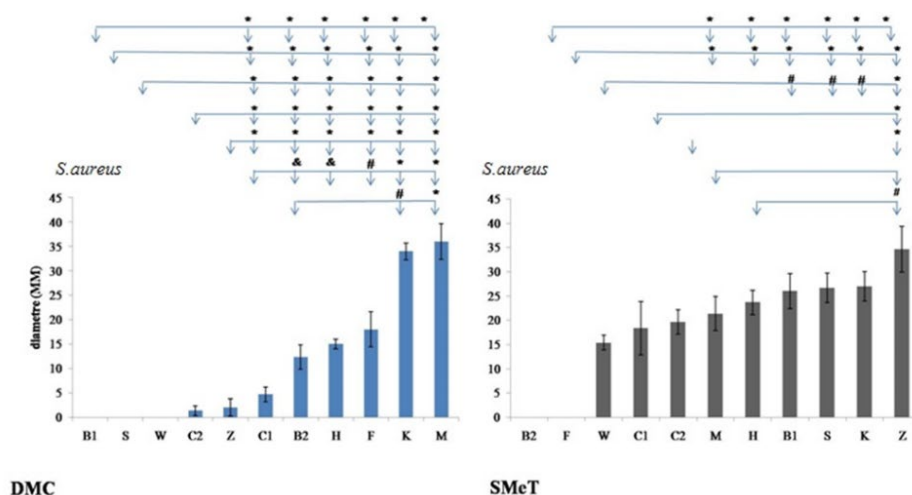
SMeT: آزمون متابولیت‌های ترش‌چی

DMC: روش قطره‌گذاری توسط کلروفرم

تجزیه و تحلیل درون گروهی

بر (SMeT) باکتری‌های اندوفیت از خود نشان داد ($P < 0.05$). بر همین اساس اختلاف معنی‌داری بین اندوفیت‌های "B2" و "F" با سایر اندوفیت‌ها از نظر اثرات مهاری بر روی باکتری *S. aureus* مشاهده شد ($P < 0.05$). اثر مهاری تمام اندوفیت‌ها در روش قطره‌گذاری با کلروفرم و همچنین بررسی متابولیت‌های ترش‌چی اندوفیت‌ها بر روی *S. aureus* تجزیه و تحلیل شد (شکل ۳).

در مطالعه عوامل ساختاری از طریق روش قطره‌گذاری توسط کلروفرم (DMC)، اختلاف معنی‌داری بین اندوفیت‌های "B1"، "S" و "W" با سایر اندوفیت‌ها از نظر اثرات مهاری بر *S. aureus* مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین با توجه به اثرات مهاری اندوفیت‌ها روی باکتری *S. aureus* در بین اندوفیت‌های دیگر با این روش تفاوت معنی‌داری وجود داشت. باکتری *S. aureus* به‌طور قابل توجهی تفاوت در الگوی رشد را در آزمون متابولیت ترش‌چی



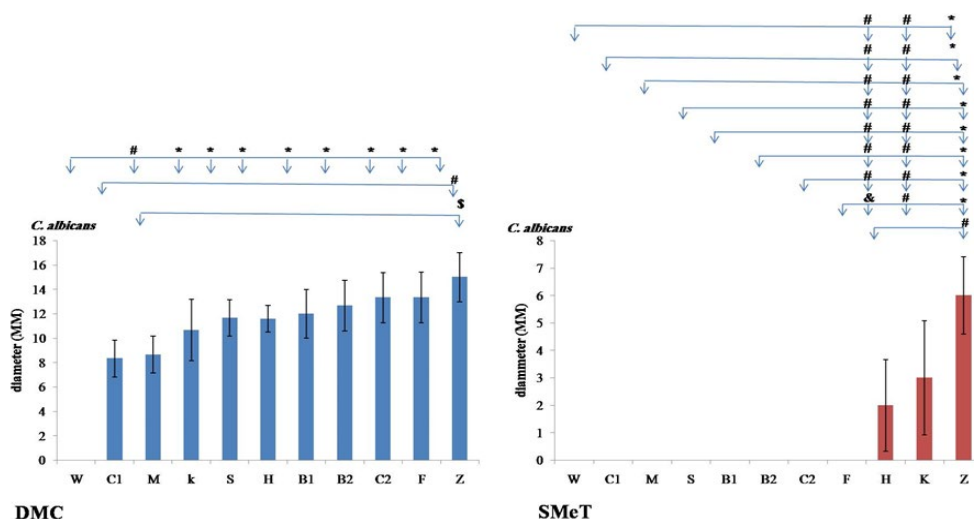
شکل ۳. اثر مهاری اندوفیت‌های *A. jesdianum* بر باکتری *S. aureus* در هر دو روش، DMC: روش قطره‌گذاری توسط کلروفرم، SMeT: آزمون متابولیت ترش‌چی، *، # و & تفاوت معنی‌داری را در سطح $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.05$ نشان می‌دهد.

آزمایش در شکل ۴ نشان داده شده است. در مطالعه عوامل ساختاری از طریق روش قطره‌گذاری توسط کلروفرم، اختلاف

داده‌های به‌دست آمده از اثرات مهاری اندوفیت‌های مختلف گیاه بن‌سرخ روی قارچ *C. albicans* توسط هر دو روش مورد

در بین اندوفیت‌های باکتریایی مختلف از نظر اثر مهاری در باکتری *E. coli* در هر دو آزمون بررسی متابولیت ترش‌گی و روش بررسی عوامل ساختاری با قطره‌گذاری توسط کلروفرم، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

معنی‌داری بین اندوفیت "W" با سایر اندوفیت‌ها از نظر اثر مهاری بر قارچ *C. albicans* وجود دارد ($P < 0.05$). در حالی که در بررسی متابولیت‌های ترش‌گی، اندوفیت‌های "W"، "C1"، "M"، "S"، "B1"، "C2" و "F" تفاوت معنی‌داری از لحاظ اثر مهاری در مقایسه با اندوفیت‌های "H"، "Z" و "K" نسبت به قارچ *C. albicans* از خود نشان دادند ($P < 0.05$) (شکل ۴).



شکل ۴. اثر مهاری اندوفیت‌های *A. jesdianum* بر قارچ *C. albicans* در هر دو روش، DMC: روش قطره ای با استفاده از کلروفرم SMcT: آزمون متابولیت ترش‌گی، # و * & تفاوت معنی‌داری را در سطح $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ و $P < 0.05$ نشان می‌دهد.

بحث

باکتریایی نشان داده شده است (۲۴). روش ارائه‌شده در مطالعه حاضر برای استرلیزاسیون سطحی گیاه روش موثری برای جداسازی اندوفیت‌ها است. در چند سال اخیر، از روش‌های مختلفی برای حذف میکروارگانیسم‌های اپی‌فیتیک و ریزوسفرها از خاک، که با نمونه‌های گیاهی به آزمایشگاه آورده می‌شوند، استفاده شده است. شستن نمونه با الکل و هیپوکلریت سدیم یکی از مراحل اصلی و ثابت است (۲۵، ۲۶). برای اطمینان از استرلیزاسیون سطح نمونه، آخرین محلول آب مقطر (که برای شستشو استفاده می‌شود) کشت داده و احتمال وجود باکتری‌های دیگر بررسی شد. عدم رشد باکتری‌ها درستی مراحل استرلیزاسیون سطحی نمونه است. می‌توان اطمینان حاصل کرد که باکتری‌های جدا شده از نمونه گیاه بن‌سرخ، اندوفیت بودند. در مقاله کنونی علاوه بر رشد قابل توجه باکتری‌های اندوفیت *A. jesdianum*، روشی ساده و قدرتمند نیز برای استرلیزاسیون سطحی بافت‌های گیاه جهت جداسازی بهتر اندوفیت‌ها از گیاه ارائه شده است.

از آنجا که مطالعه حاضر برای بررسی تأثیر اندوفیت‌های باکتریایی *Allium jesdianum* بر برخی عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی طراحی شده است، یافته‌های اصلی مطالعه کنونی نشان‌دهنده قدرت و اثربخشی اندوفیت‌های باکتریایی گیاه دارویی بن‌سرخ در مهار رشد پاتوژن‌های انسانی فوق‌الذکر است. یازده اندوفیت باکتریایی از بخش‌های مختلف گیاه *A. jesdianum* به‌دست آمد. عوامل ساختاری باکتری اندوفیت تأثیر بهتری بر قارچ *T. mentagraphytes* از خود نشان دادند. درحالی‌که متابولیت‌های ترش‌گی باکتری‌های اندوفیت تأثیر مثبتی بر پاتوژن‌های *S. aureus* و *C. albicans* داشتند. باکتری‌های اندوفیت به‌طور گسترده از گیاهان مختلفی به‌دست آمده‌اند؛ به‌طور کلی یک یا چند اندوفیت در بین ۳۰۰۰۰۰ گونه گیاهی موجود در کره زمین، ساکن هستند (۲۳). تاکنون، مطالعات متعددی برای شناسایی و جداسازی اندوفیت‌های میکروبی از انواع گیاهان دارویی انجام شده است که در این مطالعات خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی اندوفیت‌های

El-Gendy و همکاران (۲۰۱۸) مطالعاتی را در زمینه تولید متابولیت‌های بیواکتیو از انواع مختلف اندوفیت‌های استرپتومایسس دریایی علیه MRSA انجام داده‌اند (۴۰). فعالیت ضد قارچی و اثر ایمن‌سازی عصاره *A. jesdianum* Boiss علیه قارچ *C. albicans* نشان داده شده است (۴۱). مطابق تجزیه و تحلیل‌های آماری صورت گرفته، اندوفیت‌های "K"، "Z" و "H" اثرات مثبت و امیدوارکننده‌ای در رشد *C. albicans* در هر دو روش از خود بروز دادند ($P < 0.05$). در پژوهش حاضر، به‌طور کلی متابولیت‌های ترش‌خی باکتری‌های اندوفیت جدا شده از *A. jesdianum* اثرات مهاری نسبتاً مطلوبی بر *C. albicans* از خود نشان دادند. از میان یازده اندوفیت جدا شده، فقط یک اندوفیت باکتریایی با نام "W"، هیچ تأثیری بر رشد *C. albicans* از خود نشان نداد. به‌علاوه، باکتری‌های اندوفیت دارای خاصیت ضد قارچی بهتری نسبت به *C. albicans* در مقایسه با *T. mentagrophytes* بودند. متابولیت‌های ترش‌خی تمام اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده از *A. jesdianum* هیچ تأثیری در رشد *T. mentagrophytes* از خود نشان ندادند، با این حال عوامل ساختاری این باکتری‌ها اثر مهاری مطلوب‌تری در مقایسه با متابولیت‌های ترش‌خی روی این قارچ داشتند.

ترکیبات ثانویه‌ای همچون رنگدانه‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه و مایکوتوکسین‌ها و همچنین ترکیبات دارویی و آنتی‌پاتوژنیک، از جمله متابولیت‌های تولید شده توسط این اندوفیت‌ها هستند (۴۲). متابولیت‌های ترش‌خی *A. jesdianum* ممکن است حاوی ترکیبات ضدباکتریایی، ضدقارچ و سایر ترکیبات دارویی باشند. به‌طور کلی، متابولیت‌های ترش‌خی اندوفیت‌های باکتریایی *A. jesdianum* اثر مهاری قوی‌تری نسبت به عوامل ساختاری آنها در برابر قارچ *C. albicans* از خود نشان دادند. در آزمایش دیسک دیفیوژن آنتی‌بیوگرام (کربی بائر) علیه باکتری *S. aureus* (ATCC: 25923) بیشترین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده ۲۰ میلی‌متر و متعلق به آنتی‌بیوتیک لینکومایسین بود. درحالی‌که، در مطالعه متابولیت‌های ترش‌خی اندوفیت‌ها، میانگین (SD) قطر هاله عدم رشد ایجاد شده ۳۵/۵ میلی‌متر و متعلق به باکتری اندوفیت به نام "Z" بود، در مطالعه عوامل ساختاری، میانگین استاندارد قطر هاله عدم رشد ایجاد شده به‌وسیله باکتری‌های اندوفیت به نام‌های "M" و "K" به ترتیب ۳۶/۵ میلی‌متر و ۳۴/۵ میلی‌متر بودند به دلیل افزایش مقاومت گسترده و فزاینده عفونت‌های باکتریایی و قارچی در برابر داروها، جداسازی و شناسایی اندوفیت‌های باکتریایی می‌تواند راهکار مناسبی برای

در سال‌های اخیر خواص ضد دیابتی و ضد توموری اندوفیت‌ها اثبات شده است (۲۷). Sebola و همکاران (۲۰۱۹) فعالیت ضد باکتریایی عصاره خام اندوفیت‌های باکتریایی را نشان دادند (۲۸). پیش از این نیز وجود اندوفیت‌ها در قسمت‌های مختلف گیاهان گزارش شده بود (۲۹،۳۰). Vu و همکاران (۲۰۱۹) ۱۱۱ اکتینومایست‌های اندوفیت را از ریشه، ساقه و برگ‌های گیاه *Cinnamomum cassia Presl*، با فعالیت ضد میکروبی متفاوت جدا کردند (۳۰).

در این مطالعه، اندوفیت‌ها به‌طور عمده از برگ‌ها در مقایسه با سایر قسمت‌های گیاه بن‌سرخ جدا شدند. اندوفیت "M" ($3 \pm 36/67$) در روش قطره‌گذاری توسط کلروفرم و اندوفیت "Z" ($34/4 \pm 66/7$) در آزمون متابولیت ترش‌خی اثرات مطلوب و قابل توجهی در مهار *S. aureus* از خود نشان دادند. میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در برابر *S. aureus* به‌وسیله همه اندوفیت‌ها در دو روش، به‌طور قابل توجهی متفاوت است ($P < 0.05$). هر ۱۱ اندوفیت جدا شده از *A. jesdianum* پس از ۲۴-۴۸ ساعت در محیط کشت مانیتول سالت آگار رشد کردند، که نشان‌دهنده تحمل زیاد نمک کلرید سدیم در آنها است. اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی به دلیل وجود برخی از ترکیبات فیتوشیمیایی مانند تانن، ساپونین، ترپنئوئید، آلکالوئید، فلاونوئید، فنول، استروئیدها و سایر ترکیباتی که توسط کلروفرم استخراج می‌شوند، ایجاد می‌شود (۳۱). گونه‌های *Allium* حاوی ترکیبات حیاتی همچون کربوهیدرات‌ها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها هستند. این گونه‌ها دارای فعالیت‌های بیولوژیکی و ترکیبات دارویی مهمی مانند ترکیبات ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد تومور، ضد التهاب، ضد ترومبوز و هیپوکلسترولمیک هستند (۳۲،۳۳). خواص ضد میکروبی و ضد قارچی اندوفیت‌ها با استخراج این ترکیبات به‌وسیله کلروفرم امکان‌پذیر است (۳۴،۳۵). خواص آنتی‌اکسیدانی *Allium* به فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی وابسته است (۳۶).

Amiri (۲۰۰۷) نشان داد که عصاره اتانولی اثرات ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به اسانس روغنی و سایر عصاره‌های *A. jesdianum* دارد. خواص ضد میکروبی روغن و عصاره‌های اتانولی به ترکیبات سولفید و ترپنئوئید آنها وابسته است (۳۷).

مطالعات نشان دادند که فراکسیون کلروفرم *Allium bakhtiaricum* دارای اثر مهارکننده بر سرطان پستان است (۳۸). تصور بر این است که خواص آنتی‌اکسیداتیوی گونه‌های *Allium* وابسته به ترکیبات ارگانوسولفور می‌باشد (۳۹).

باکتری‌های اندوفیتیک در علوم پزشکی و داروسازی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. از اندوفیت‌های باکتریایی *A. jesdianum* و خواص آنها می‌توان برای تولید عوامل ضد میکروبی، به ویژه عوامل پاتوژن مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌های معمول استفاده کرد. علاوه بر این، این ترکیبات می‌توانند در علوم داروسازی، کشاورزی و صنایع غذایی استفاده شوند.

سپاسگزاری

این پژوهش توسط دانشگاه شهرکرد پشتیبانی شده است. بدینوسیله از حمایت دانشگاه شهرکرد در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم (grant numbers: 96GRD1M1801 and 96PRM2M50457).

تعارض در منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی در منافع گزارش نکردند.

منابع مالی

ندارد.

غلبه بر مقاومت دارویی ایجادشده از سوی عوامل بیماری‌زای انسانی باشد (۴۳). داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان می‌دهند که اندوفیت‌های باکتریایی به‌دست‌آمده از گیاه بن‌سرخ اثر مهاری ضد باکتریایی مناسب‌تری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت دارند. دستیابی به اهداف مهمی چون استفاده از باکتری‌های اندوفیت برای تولید داروهایی با عوارض جانبی کمتر و اثربخشی بهتر در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت و قارچ‌های بیماری‌زا ملزم به انجام تحقیقات جامع و گسترده‌تری می‌باشد.

Jiang و همکاران (۲۰۱۸) در حدود ۱۰۱ اکتینوباکتری را به‌عنوان اندوفیت بررسی کردند که در آن مطالعه حداقل ۳۱ سویه نسبت به یک باکتری و ۲۱ سویه فعالیت مهاری علیه حداقل یک پاتوژن مقاوم به "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter species*) را از خود نشان دادند (۴۴). بسیاری از ترکیبات فعال بیواکتیو حاصل از اندوفیت‌ها به‌عنوان منبع اصلی در فرمولاسیون‌های مختلف دارویی استفاده می‌شوند (۴۵).

Reference

- Wink M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*. 2015;2(3):251-86. [DOI:10.3390/medicines2030251] [PMID] [PMCID]
- Zhang W, Huai Y, Miao Z, Qian A, Wang Y. Systems pharmacology for investigation of the mechanisms of action of traditional Chinese medicine in drug discovery. *Front Pharmacol*. 2019;10:743. [DOI:10.3389/fphar.2019.00743] [PMID] [PMCID]
- Mishra VK, Passari AK, Chandra P, Leo VV, Kumar B, Uthandi S, Thankappan S, Gupta VK, Singh BP. Determination and production of antimicrobial compounds by *Aspergillus clavatus* strain MJ31, an endophytic fungus from *Mirabilis jalapa* L. using UPLC-ESI-MS/MS and TD-GC-MS analysis. *PloS One*. 2017; 19; 12(10): 0186234. [DOI:10.1371/journal.pone.0186234] [PMID] [PMCID]
- Photolo MM, Mavumengwana V, Sitole L, Tlou MG. Antimicrobial and antioxidant properties of a bacterial endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, isolated from *Combretum erythrophyllum* seeds. *Inter J Microbiol*. 2020; 18; 2020. [DOI:10.1155/2020/9483670] [PMID] [PMCID]
- Nalini MS, Prakash HS. Diversity and bioprospecting of actinomycete endophytes from the medicinal plants. *Lett Appl Microbiol*. 2017; 64(4):261-70. [DOI:10.1111/lam.12718] [PMID]
- Kandel SL, Joubert PM, Doty SL. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*. 2017;5(4):77. [DOI:10.3390/microorganisms5040077] [PMID] [PMCID]
- Anisha C, Radhakrishnan EK. Metabolite analysis of endophytic fungi from cultivars of *Zingiber officinale* Rosc. identifies myriad of bioactive compounds including tyrosol. *3Biotech*. 2017; 7(2):146. [DOI:10.1007/s13205-017-0768-8] [PMID] [PMCID]
- Akinsanya MA, Goh JK, Lim SP, Ting AS. Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in *Aloe vera*. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;1;362(23). [DOI:10.1093/femsle/fnv184] [PMID]
- Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, Rao PC, Brown A, Atherly DE, et. al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990-2016. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(11):1229-40. [DOI:10.1016/S1473-3099(18)30475-4]

10. Stephens CM, Adams-Sapper S, Sekhon M, Johnson JR, Riley LW. Genomic analysis of factors associated with low prevalence of antibiotic resistance in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* sequence type 95 strains. *Msphere*. 2017;26;2(2). [DOI:10.1128/mSphere.00390-16] [PMID] [PMCID]
11. Ma Y, Lan G, Li C, Cambaza EM, Liu D, Ye X, Chen S, Ding T. Stress tolerance of *Staphylococcus aureus* with different antibiotic resistance profiles. *Microb Pathog*. 2019 Aug 1;133:103549. [DOI:10.1016/j.micpath.2019.103549] [PMID]
12. Nishimoto, A. T., Sharma, C., & Rogers, P. D. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2020; 75(2): 257-70.
13. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*. 2018; 18;360 (6390):739-42. [DOI:10.1126/science.aap7999] [PMID]
14. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr*. 2001;131(3):1010S-5S. [DOI:10.1093/jn/131.3.1010S] [PMID]
15. Choudhary PR, Jani RD, Sharma MS. Effect of raw crushed garlic (*Allium sativum* L.) on components of metabolic syndrome. *J Diet Suppl*. 2018;4;15(4):499-506. [DOI:10.1080/19390211.2017.1358233] [PMID]
16. Lorigooini Z, Ayatollahi SA, Amidi S, Kobarfard F. Evaluation of anti-platelet aggregation effect of some *Allium* species. *Iran J Pharm Res*. 2015;14(4):1225.
17. Pirbalouti AG. Phytochemical and bioactivity diversity in the extracts from bulbs and leaves of different populations of *Allium jesdianum*, a valuable underutilized vegetable. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*. 2019;18(2):115-22. [DOI:10.24326/asphc.2019.2.11]
18. Krishnapura PR, Belur PD. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants for L-asparaginase production. *Prep Biochem Biotechnol*. 2016; 2; 46(3): 281-7. [DOI:10.1080/10826068.2015.1031385] [PMID]
19. Ratti RP, Serrano NF, Hokka CO, Sousa CP. Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian tropical savannah plants against *Staphylococcus coagulase-positive* strain. *J Venomous Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2008; 14(2):294-302. [DOI:10.1590/S1678-91992008000200007]
20. Cruickshank R, Duguid JP, Marmion BP, Swain RH. Tests for identification of bacteria. *Med Microbiol*. 1975; 2:170-89.
21. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Enterobacteriaceae*. London: Wolfe Publishing; 1994.
22. 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. [DOI:10.1094/PHYTO.2001.91.2.181] [PMID]
23. Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett*. 2008; 1;278(1):1-9. [DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x] [PMID]
24. Hassan SE. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *J Adv Res*. 2017;1;8(6):687-95. [DOI:10.1016/j.jare.2017.09.001] [PMID] [PMCID]
25. Waheeda K, Shyam KV. Formulation of novel surface sterilization method and culture media for the isolation of endophytic actinomycetes from medicinal plants and its antibacterial activity. *J Plant Pathol Microbiol*. 2017;1;8(399):2.
26. Zhao H, Yang A, Zhang N, Li S, Yuan T, Ding N, Zhang S, Bao S, Wang C, Zhang Y, Wang X. Insecticidal Endostemonines A-J Produced by Endophytic *Streptomyces* from *Stemonasessilifolia*. *J Agric Food Chem*. 2020; 29; 68(6): 1588-95. [DOI:10.1021/acs.jafc.9b06755] [PMID]
27. Rahman L, Shinwari ZK, Iqar I, Rahman L, Tanveer F. An assessment on the role of endophytic microbes in the therapeutic potential of *Fagonia indica*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;1;16(1):53. [DOI:10.1186/s12941-017-0228-7] [PMID] [PMCID]
28. Sebola TE, Uche Okereafor NC, Tapfuma KI, Mekuto L, Green E, Mavumengwana V. Evaluating antibacterial and anticancer activity of crude extracts of bacterial endophytes from *Crinum macowanii* Baker bulbs. *MicrobiologyOpen*. 2019; 8(12):914. [DOI:10.1002/mbo3.914] [PMID] [PMCID]
29. Taufiq MM, Darah I. Antibacterial activity of an endophytic fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64 residing in leaves of a medicinal herb, *Ocimum sanctum* Linn. *J Appl Biol Biotechnol*. 2019; 7(02):35-41. [DOI:10.7324/JABB.2019.70207]
30. Vu, T.H.N., Nguyen, Q.H., Dinh, T.M.L., Quach, N.T., Khieu, T.N., Hoang, H., Son, C.K., Vu, T.T., Chu, H.H., Lee, J. and Kang, H. Endophytic actinomycetes associated with *Cinnamomum cassia* Presl in Hoa Binh province, Vietnam: Distribution, antimicrobial activity and, genetic features. *J Gen Appl Microbiol*. 2019;13;66(1):24-31. [DOI:10.2323/jgam.2019.04.004] [PMID]

31. Umaru IJ, Badruddin FA, Assim ZB, Umaru HA. Antibacterial and cytotoxic actions of chloroform crude extract of *Leptadenia hastata* (pers) Decnee. *Clin Med Biochem*. 2018;4:1-4. [DOI:10.4172/2471-2663.1000139]
32. Asemani Y, Zamani N, Bayat M, Amirghofran Z. Allium vegetables for possible future of cancer treatment. *Phytother Res*. 2019;33(12):3019-39. [DOI:10.1002/ptr.6490] [PMID]
33. Matsuura H. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *J Nutr*. 2001; 131(3): 1000S-5S. [DOI:10.1093/jn/131.3.1000S] [PMID]
34. Lotfalian S, Ebrahimi A, Mahzoonieh MR. Antimicrobial Activity of Isolated Bacterial Endophytes from *Cichorium intybus* L, *Pelargonium hortorum*, and *Portulaca oleracea* Against Human Nosocomial Bacterial Pathogens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2016;12(1). [DOI:10.17795/jjnpp-32852]
35. Rabbee MF, Ali M, Baek KH. Endophyte *Bacillus velezensis* isolated from *Citrus* spp. Controls streptomycin-resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker. *Agronomy*. 2019 Aug;9(8):470. [DOI:10.3390/agronomy9080470]
36. Singh BN, Singh BR, Singh RL, Prakash D, Singh DP, Sarma BK, Upadhyay G, Singh HB. Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chem Toxicol*. 2009;1;47(6):1161-7. [DOI:10.1016/j.fct.2009.02.004] [PMID]
37. Amiri H. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse from Iran. *J Med Plants*. 2007; 6(1): 39-44.
38. Vafaei K, Dehghani S, Tahmasvand R, Abadi FS, Irian S, Salimi M. Potent antitumor property of *Allium bakhtiari* extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2019;19(1):116. [DOI:10.1186/s12906-019-2522-8] [PMID] [PMCID]
39. Chiu CK, Chen TY, Lin JH, Wang CY, Wang BS. Protective effects of five allium derived organosulfur compounds against mutation and oxidation. *Food chem*. 2016;15;197:829-35. [DOI:10.1016/j.foodchem.2015.11.064] [PMID]
40. El-Gendy MM, Mohamed ZK, Hekal NZ, Ali FM, Yousef AE. Production of bioactive metabolites from different marine endophytic *Streptomyces* species and testing them against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and cancer cell lines. *BioTechnologia. J Biotechnol Comput Biol Bionanotechnol*. 2018;99(1). [DOI:10.5114/bta.2018.73559]
41. Naeini A, Yaraee R, Shokri H. Antifungal and immunomodulatory activity of *Allium jesdianum* Boiss extracts. *J Herbmed Pharmacol*. 2019;9(1);75-80. [DOI:10.15171/jhp.2020.11]
42. Leylaie S, Zafari D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants. *Front Microbiol*. 2018;11;9:1484. [DOI:10.3389/fmicb.2018.01484] [PMID] [PMCID]
43. Sharma D, Pramanik A, Agrawal PK. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. *3 Biotech*. 2016 Dec;6(2):1-4. [DOI:10.1007/s13205-016-0518-3] [PMID] [PMCID]
44. Jiang ZK, Tuo L, Huang DL, Osterman IA, Tyurin AP, Liu SW, Lukyanov DA, Sergiev PV, Dontsova OA, Korshun VA, Li FN. Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Front Microbiol*. 2018;4;9:868. [DOI:10.3389/fmicb.2018.00868] [PMID] [PMCID]
45. Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015; 108(2): 267-89. [DOI:10.1007/s10482-015-0502-7] [PMID] [PMCID]