Food Hygiene, Vol. 11, No. 43, Autumn 2021

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2022.1954146.1347**

Effects of *Echinophora platyloba* bacterial endophytes on *Streptococcus agalactiae* and *Cryptococcus neoformans*

Mirabbasi najaf abadi, A.[1], Shahrokh shahraki, S.[2*], Mokhtari, A.[3]

1. M.Sc Graduate of bacteriology, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

[*]Corresponding author: somaye.shahrokh@yahoo.com
(Received: 2022/3/3 Accepted: 2022/7/26)

Abstract

Endophytes are fungi, bacteria, or yeast symbionts that live in the intercellular spaces or vascular tissues of host plants. The *Echinophora platyloba* endophytes with production of seondray metabolites and compunend has antifungal and antibacterial properties and prolnages the shelf-time food. The present study was designed to isolate and evaluate the effects of *Echinophora platyloba* bacterial endophytes and their antifungal and antibacterial properties on *Streptococcus agalactiae* and *Cryptococcus neoformans*. Plant components were randomly collected from Chaharmahal and Bakhtiari province, Iran, and then cleaned and sterilized. Bacterial endophytes were isolated after culturing plant components in YEA and PA media and the antimicrobial properties of endophytes were investigated by studying structural factors (by chloroform) as well as endophyte metabolites. A total of 12 bacterial endophytes were isolated from different parts of leaves, stems and roots of *Echinophora platyloba* and showed favorable inhibitory effects on *Streptococcus agalactiae* and *Cryptococcus neoformans*. In general, secretory metabolites derived from bacterial endophytes showed stronger inhibitory effects than structural factors against these pathogens. The results of this study indicate the efficacy and potential of *Echinophora platyloba* bacterial endophytes in inhibiting human pathogens.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Medicinal Plants, Endophyte, *Echinophora platyloba*, Antifungal properties, Antibacterial properties

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2022.1954146.1347

اثر مهاری اندوفیت‌های گیاه خوشاریزه (*Echinophora platyloba*) بر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*

علی میرعباسی نجف‌آبادی[۱]، سمیه شاهرخ شهرکی[۲*]، اعظم مختاری[۳]

۱. دانش‌آموخته ارشد باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: somaye.shahrokh@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۱۲ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۵/۴)

چکیده

اندوفیت‌ها اغلب به‌صورت قارچ یا باکتری هستند که در فضاهای بین سلولی یا بافت‌های آوندی گیاهان میزبان زندگی می‌کنند. اندوفیت‌های گیاهان دارویی مانند خوشاریزه با تولید ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه و ایجاد اثرات ضد میکروبی به‌عنوان یک نگهدارنده ضد قارچ و ضد میکروبی در مواد غذایی استفاده می‌شوند. مطالعه حاضر به‌منظور جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی و تعیین خواص اثر مهاری آن ها بر روی باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* طراحی و انجام شد. اجزای گیاه بعد از جمع‌آوری از استان چهارمحال و بختیاری واقع در ایران، ضدعفونی شدند. اندوفیت‌های باکتریایی بعد از کشت اجزای گیاه بر روی محیط‌های YEA و PA جدا شدند. خواص ضدباکتریایی و ضد قارچی آن‌ها در بررسی عوامل ساختاری (توسط کلروفرم) و همچنین بررسی متابولیت‌های ترشحی مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش آنتی‌بیوگرام با روش انتشار دیسک انجام گرفت. از قسمت‌های مختلف برگ، ساقه و ریشه گیاه خوشاریزه در مجموع ۱۲ اندوفیت باکتریایی جدا گردید. اندوفیت‌های گیاه دارویی خوشاریزه بر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* اثرات مهاری مطلوبی را از خود بروز دادند. به‌طور کلی متابولیت‌های ترشحی حاصل از اندوفیت‌های جدا شده از این گیاه تا اثرات مهاری قدرتمندتری را نسبت به عوامل ساختاری بر علیه پاتوژن‌های مذکور از خود بروز دادند. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از اثر بخشی و توانمندی بالقوه اندوفیت‌های باکتریایی گیاه خوشاریزه در مهار پاتوژن‌های انسانی است.

واژگان کلیدی: گیاهان دارویی، اندوفیت، گیاه خوشاریزه ، خواص ضد قارچی، خواص ضد باکتریایی

مقدمه

از دیرباز گیاهان دارویی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای داروها در درمان بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Rana *et al.*, 2020). در مطالعات مختلف، گزارشاتی مبنی بر جدا شدن سویه‌های اندوفیت (Endophyte) از قسمت‌های مختلف این گیاهان دارویی ارائه شده است (Rana *et al.*, 2020). اندوفیت‌ها اغلب به‌صورت قارچ یا باکتری هستند که در فضاهای بین سلولی یا بافت‌های آوندی گیاهان میزبان زندگی می‌کنند. متابولیت های ضدباکتریایی استخراج شده از اندوفیت‌های تقسیم‌بندی ساختاری متنوعی دارند که شامل پپتیدها، آلکالوئیدها، فنل‌ها، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها هستند (Photolo *et al.*, 2020).

خوشاریزه گیاه علفی و بومی ایران است که یک منبع غنی از ساپونین و آلکالوئید است و مطالعات پیشین وجود ترکیباتی همچون فنل‌ها، فلاونول‌ها و فلاونوئیدها را در این گیاه تعیین کرده‌اند (Sharafati-chaleshtori *et al.*, 2012). لازم به ذکر است که کلروفرم با استخراج ترکیبات ذکرشده، اثر بازدارندگی و خاصیت آنتی‌پاتوژنی گیاهان دارویی را اعمال می‌کنند (Umaru *et al.*, 2018). اندوفیت‌های گیاهان دارویی مانند داروی خوشاریزه (*E. platyloba*) با تولید ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه و ایجاد اثرات ضد میکروبی به‌عنوان یک نگهدارنده ضد قارچ و ضد میکروبی در مواد غذایی استفاده می‌شوند. مطالعات گوناگونی که تا کنون بر روی خوشاریزه صورت گرفته، فعالیت‌های ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی این گیاه را نشان داده‌اند (Pilevar *et al.*, 2017). مطالعات مختلف انجام شده تاکنون، خواص ضد قارچی (Khajeh *et al.*, 2016 ؛ Sepehri *et al.*, 2016)، ضد باکتریایی (Ranjbar and Babaie, 2016)، ضد سلول‌های سرطانی و همچنین خواص آنتی‌موتاژنی (Entezari *et al.*, 2014) و آنتی‌اکسیدانی (Saei-Dehkordi *et al.*, 2012) خوشاریزه را نشان داده‌اند. این گیاه دارای مواد نگهدارنده طبیعی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی فراوانی را بدین جهت از خود بروز می‌دهند (Fathimoghaddam *et al.*, 2020).

گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌ها به یک نگرانی جهان تبدیل شده است و این پدیده تهدیدی جدی برای سلامت عمومی جهانی به شمار می‌رود (Osman *et al.*, 2012). *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (*Streptococcus agalactiae*) (گروه B استرپتوکوک، GBS) یکی از عوامل مهم مرگ و میر نوزادان (Furfaro *et al.*, 2018 ؛ Shabayek and Spellerberg, 2018)، عفونت‌های مختلف در افراد پیر و مبتلا به نقص ایمنی بوده و حتی در مواردی منجر به مرگ و میر در این افراد شده است (Baker *et al.*, 1988). این پاتوژن همچنین در نوزادان باعث ایجاد مننژیت، ذات‌الریه، آرتریت یا گندخونی یا sepsis شود (Ali *et al.*, 2020). *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* قادر به تولید بیوفیلم بوده که این مسئله از عوامل ماندگاری پاتوژن درمیزبان، ناکارآمدی درمان و عود عفونت است (Rosini and Margarit, 2015). رشد باکتری‌ها و تولید بیوفیلم، به این اجرام اجازه داده که از سیستم ایمنی پنهان شده و ماندگاری آن‌ها را در شرایط نامساعد محیطی افزایش دهد (Genovese *et al.*, 2020 ؛ Pieranski *et al.*, 2021). *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* یکی از عوامل

شناخته‌شده عفونت‌های تهاجمی در نوزادان، زنان باردار و بیماران با شرایط زمینه‌ای است و تاکنون مقاومت این باکتری به ۱۰ دارو از ۱۵ داروی ضد میکروبی آزمایش شده نشان داده شده است (Abd El-Aziz *et al.*, 2021).

عفونت‌های قارچی نیز به‌عنوان یک نگرانی فراگیر، می‌تواند هشداری در جهت تکامل مقاومت ذاتی به ضد قارچ‌های کنونی باشد (Bermas and Geddes-McAlister, 2020). عدم وجود عوامل ضد قارچی مؤثر و مقاومت دارویی در عفونت‌های قارچی از جمله مشکلات قابل توجه می‌باشد که کشف عوامل ضد قارچی را ضروری می‌کند (Zhu *et al.*, 2021). *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* (*Cryptococcus neoformans*) یک پاتوژن قارچی فرصت‌طلب و از معدود قارچ‌های محیطی است که می‌تواند در پستانداران زنده مانده و باعث ایجاد بیماری شود (Altamirano *et al.*, 2020). تعداد موارد مبتلا به *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در ۳۰ سال گذشته به دلیل ظهور بیماری ایدز، درمان‌های سرکوب‌کننده سیستم ایمنی در بیماران پیوندی و استفاده از عوامل شیمی درمانی افزایش چشمگیری داشته است (Kong *et al.*, 2020). این مخمر باعث ایجاد مننژیت در افراد دارای نقص ایمنی، افراد مبتلا به HIV/AIDS، بیمارانی که از کورتیکواستروئیدها استفاده می‌کنند، بیماران تحت شیمی درمانی و همچنین گیرندگان پیوند اعضاء می‌شود (Altamirano *et al.*, 2020). همچنین این مخمر سالانه حدود ۲۰۰۰۰۰ نفر در سراسر جهان را با ایجاد عفونت مغزی کشنده درگیر می‌کند (Chang and Doering, 2018). مطالعه حاضر به منظور تعیین اثرات اندوفیت‌های خوشاریزه بر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* طراحی شد و با جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی از این گیاه خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری گیاه خوشاریزه

در این مطالعه برای جداسازی اندوفیت باکتریایی، ۵۰ مورد از نمونه‌های تازه از خوشاریزه در بهار سال ۲۰۲۱ به‌صورت تصادفی از استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شدند. جنس و گونهٔ این گیاه به‌وسیلهٔ بخش گیاه‌شناسی تأیید و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شهرکرد منتقل شدند.

- سترون کردن سطحی نمونه‌های خوشاریزه و جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی

سطح نمونه‌های خوشاریزه توسط آب مقطر استریل شستشو داده شد. اجزای خوشاریزه (برگ، ساقه و ریشه) ابتدا در اتانول ۷۰ درصد (طی مدت زمان ۲ دقیقه)، در محلول هیپوکلریت سدیم ۵/۳ درصد (۵ دقیقه) و سپس در اتانول ۷۵ درصد (۳۰ ثانیه) قرار گرفتند (Krishnapura and Belur, 2016). نمونه‌ها توسط آب مقطر استریل شسته و خشک شدند. اجزای گیاه بوسیله وسایل استریل به قطعات کوچکی بریده و توسط هاون استریل له شدند. نمونه‌ها جهت جداسازی اندوفیت، بر روی سطح محیط کشت Yeast Extract Agar (Merck,64271,Germany) و محیط کشت Pepton Agar (Quelab, 420223) کشت داده شدند. محیط‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس طی مدت زمان ٤

الـی ۷ روز درون انکوبـاتور قـرار گرفتنـد. کلنـی اندوفیت‌های رشد یافته در این محیط‌هـا مجـدداً جهـت تهیه کشت خالص و ایزوله در محیط YEA کشـت داده شـد. مورفولـوژی کلنـی‌هـای خـالص انـدوفیت‌های باکتریایی از لحاظ شکل، انـدازه و رنـگ مـورد بررسـی قرار گرفتند و نتایج ثبـت شـد. انـدوفیت‌ها بـا حـروف الفبـای لـاتین به‌صـورت قـراردادی نام‌گـذاری شـدند. رنگ‌آمیزی گرم، تست‌های کاتالاز و اکسیداز و انجـام و نتایج بررسی شد (Cruickshank *et al.*, 1975 ؛ Quinn *et al.*, 1994).

- بررسی خاصیت ضد باکتریایی و ضد قـارچی موجـود در ساختار باکتری‌های اندوفیت

- پاتوژن‌های مورد آزمایش

بـاکتری *اسـترپتوکوکوس آگالاکتیـه* بـا شناسـه ATCC27956 و قـارچ *کریپتوکوکـوس نئوفـورمنس* بـا شناسه ATCC66031 از دانشکده دامپزشکی شهرکرد و تهران تهیه شد و سپس باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* بر *روی بلاد اگار* و *کریپتوکوکوس نئوفـورمنس* بـر روی YEA و سـابرو دکسـتروزآگار (Germany, Merck) کشت داده شدند و کلنی‌های خالص جدا گردید.

- بررسـی خاصـیت ضـدباکتریایی موجـود در سـاختار باکتری‌های اندوفیت به‌وسیله کلروفرم

سه الی چهـار کلنـی کاملـاً یکسـان از انـدوفیت‌های باکتریایی را در محیط پپتون واتر (Difco, 1807-17-4) کشت داده و به‌مـدت ۱۸ الـی ۲٤ سـاعت در دمـای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از طـی مـدت زمـان انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از محـیط پپتـون واتـر حـاوی انـدوفیت رشـد یافتـه را برداشـته، بـر روی محـیط YEA(Merck,64271,Germany) قـرار داده و انکوبـه شد (۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجـه سلسـیوس) پس از طـی مـدت زمـان انکوباسـیون و مشـاهده رشـد مناسب کلنی‌های اندوفیت در محیط YEA، ابتـدا سـطح کلنی رشد یافته اندوفیت‌ها به مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه بـا کلروفرم آغشته گشـت و پـس از آن بـا برداشـتن درب پلیت‌ها، اجازه داده شد تا کلروفرم کاملا تبخیر شود. این مراحل برای هر اندوفیت درپلیت‌هـای مجـزا، منحصـراً انجام شد (Ratti *et al.*, 2008). از سـوی دیگـر، بـرای بررسی خاصیت ضد باکتریایی اندوفیت‌ها، دو الـی سـه کلنـی یکسـان از بـاکتری *اسـترپتوکوکوس آگالاکتیـه* در محیط *Tryptic Soy Broth* کشـت داده و بـه مـدت ۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شـد. پس از طی مدت زمان مذکور، ۲۰۰ میکرولیتـراز محـیط TSB حاوی باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* رشـدیافته را برداشته و به ۱۲ لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت Himedia,400-)(BHI)Brain Heart Infusion 086)اضافه و مخلوط شد. باید دقـت شـود کـه محـیط BHI استریل و به‌صورت نیمه‌جامـد و در دمـای ۳۷ تـا ٤۰ درجه سلسیوس باشد. بدون اتلاف زمـان محتویـات ۱۲ لولـه، بـر روی ۱۲ پلیـت YEA مذکور(شـامل باکتری‌های اندوفیت رشد یافته) ریخته و سطح پلیت‌هـا توسط محیط BHI پوشانده شد. در انتها پلیت‌ها انکوبـه شدند (۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای۳۷ درجه سلسیوس). پس از طی مدت زمان انکوباسیون، میزان قطر هاله عـدم رشد باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در اطـراف کلنـی هر باکتری انـدوفیت به‌صـورت جداگانـه بررسـی و بـر حسب میلی‌متر نگاشته شد. چهـار تکـرار از آزمایش‌هـا انجام و میـانگین داده‌هـا و همچنـین میـانگین انحـراف معیار (SD) محاسبه و ثبت شدند (Ratti *et al.*, 2008).

- بررسی خاصیت ضد قارچی موجود در ساختار باکتری‌های اندوفیت توسط کلروفرم

در محیط کشت پپتون واتر سه الی چهار کلنی کاملاً یکسان از اندوفیت‌های باکتریایی را کشت داده و محیط‌ها انکوبه شدند (به مدت ۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس). پس از طی مدت زمان انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر از محیط پپتون واتر حاوی اندوفیت رشد یافته را برداشته، بر روی محیط YEA قرار داده و محیط کشت به‌صورت مستقیم به مدت ۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از مشاهده رشد مناسب کلنی اندوفیت در محیطYEA، ابتدا سطح کلنی رشد یافته اندوفیت‌ها با کلروفرم آغشته و پس از گذشت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه با برداشتن درب پلیت، اجازه داده شد تا کلروفرم کاملاً تبخیر شود. این مراحل برای هر اندوفیت در پلیت‌های مجزا انجام شد (Ratti *et al*., 2008).سپس دو الی سه کلنی یکسان از قارچ*کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در محیط TSB کشت داده و به مدت ۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از طی مدت زمان مذکور، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط TSB حاوی قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* رشد یافته را برداشته و به ۱۲ لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHI (Himedia,400-086) استریل نیمه‌جامد (در دمای ۳۷ تا ٤۰ درجه سلسیوس) اضافه و مخلوط شد. سپس فوراً محتویات ۱۲ لوله، بر روی ۱۲پلیت YEA حاوی باکتری‌های اندوفیت رشد یافته، ریخته و سطح پلیت‌ها توسط محیط BHI پوشانده شد. در انتها پلیت‌ها انکوبه شدند (۱۸ الی ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C). پس از طی مدت زمان انکوباسیون، میزان قطر هاله عدم رشدقارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در اطراف کلنی هر باکتری اندوفیت به‌صورت جداگانه بررسی و بر حسب میلی‌متر نگاشته شد. چهار تکرار از آزمایش‌ها انجام و میانگین داده‌ها و انحراف معیار (SD) محاسبه و ثبت شدند (Ratti *et al*., 2008).

- بررسی خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی متابولیت‌های ترشحی باکتری‌های اندوفیت

از هر باکتری اندوفیت و همچنین باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، درمحیط کشت Luria Bertani Broth (LB) (Merck, 110285, Germany) کشت داده و لوله‌ها درون انکوباتور قرار گرفتند (۱۸-۲٤ ساعت/ دمای ۳۷° C). سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محیط LB، حاوی باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* رشدیافته را جداگانه برداشته و به ۱۵ میلی‌لیتر محیط YEA استریل و نیمه‌جامد (دمای محیط YEA در حدود ۳۷ تا ٤۰ درجه سلسیوس) اضافه، مخلوط و در پلیت‌های استریل ریخته شدند. در حالی‌که محیط کشت درون پلیت‌ها هنوز به‌صورت مذاب بودند، سیلندرهای آلومینیومی استریل با قطر ۰/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۱ سانتی‌متر، در پلیت قرار داده شد. از باکتری‌های اندوفیت رشدیافته در LB، ۱ میلی‌لیتر به یک میکروتوب استریل منتقل و ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Sigma, serialno. 103286) گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به درون سیلندرها منتقل و همه پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف هر سیلندر، میزان اثرگذاری متابولیت‌های هر اندوفیت

بررسی و نتایج ثبت گردید. برای هر ٤ نوبت تکرار آزمایش، آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل آزمایش در نظر گرفته شد.

- تست آنتی‌بیوگرام

تست آنتی بیوگرام به‌روش انتشار دیسک (Kirby Bayer) به جهت مقایسه قدرت مهاری اندوفیت‌های خوشاریزه و آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی انجام شد. در محیط کشت حاوی باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* دیسک‌های کاغذی آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، کرج)، با رعایت فاصله مناسب جاگذاری و پس از طی ٢٤ ساعت انکوباسیون قطر هاله عدم رشد ایجاد شده اطراف دیسک اندازه‌گیری و ثبت شد.

- آنالیز آماری

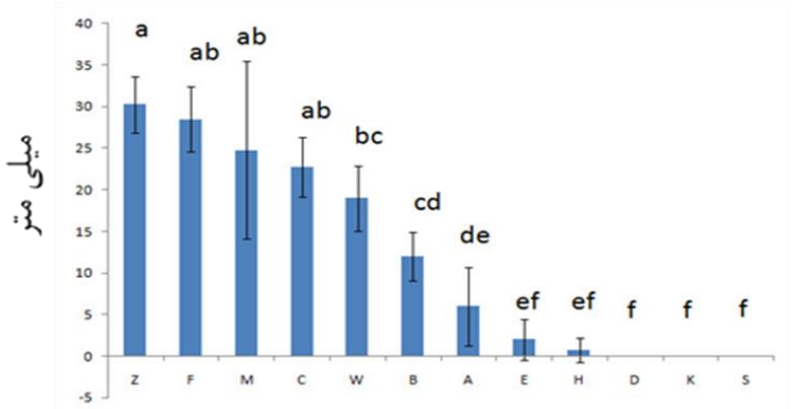
با استفاده از نرم افزار SPSS (Ill, Chicago., Inc SPSS USA) نسخه ٢٢ داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه (One way ANOVA) مورد تحلیل قرار گرفتند. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف معیار داده‌ها (SD) بیان شد.

یافته‌ها

از قسمت‌های مختلف برگ، ساقه و ریشه گیاه خوشاریزه در مجموع ١٢ اندوفیت باکتریایی جدا گردید. در حدود ٣ اندوفیت گرم منفی و ٩ اندوفیت گرم مثبت بودند. اندوفیت‌ها در اشکال متفاوتی بوده و از بین این تعداد، ٦ اندوفیت Cocco Bacillus، ٣ اندوفیت Cocci و ٣ اندوفیت دیگر Bacilli بودند که از قسمت‌های مختلف برگ و ساقه و ریشه گیاه جدا شدند.

- اثرات ضدباکتریایی اندوفیت‌ها در روش بررسی عوامل ساختاری بر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*

در بخش مطالعه عوامل ساختاری اندوفیت‌ها و تأثیر آن‌ها بر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* اندوفیت Z با سایر اندوفیت‌ها اختلاف معنی‌داری دارند ($P<0/05$). در حالی‌که اندوفیت‌های F، M و C با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند (نمودار ١).

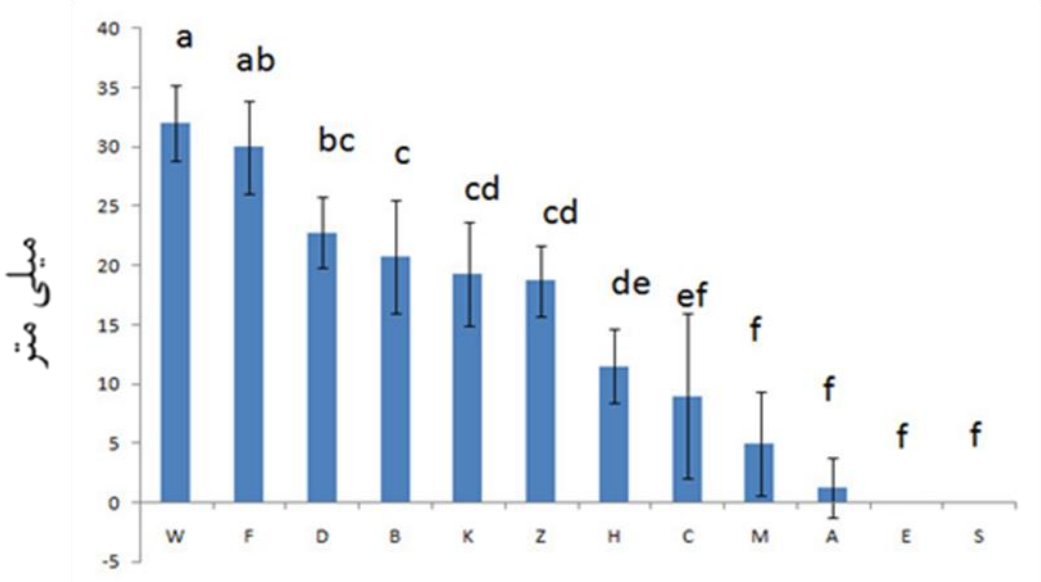


نمودار ١)- مقایسه اثر اندوفیت‌ها و میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر علیه باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه در روش ساختاری*

a-f: وجود حروف مشترک بر روی اندوفیت‌های مختلف حاکی از نبود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

- اثرات ضدقارچی اندوفیت ها در روش بررسی عوامل ساختاری بر قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*

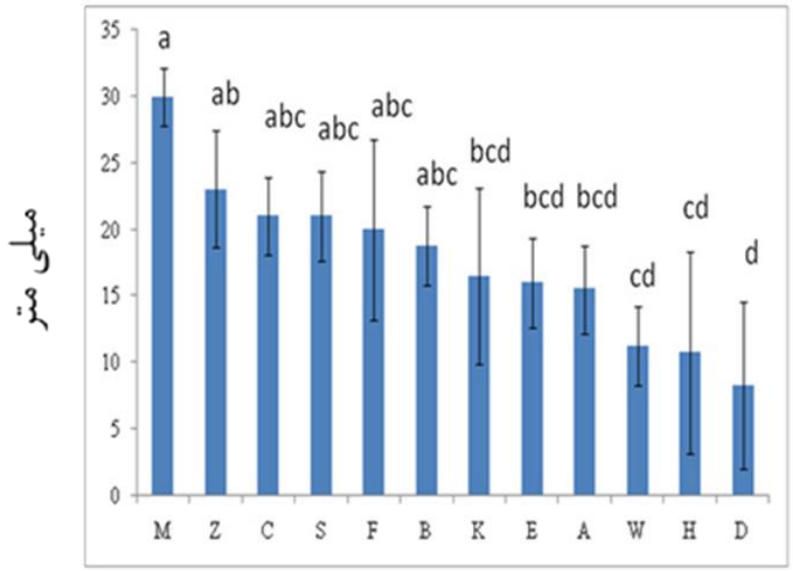
وجود حروف مشترک (a-f) بر روی اندوفیت‌های مختلف حاکی از نبود اختلاف معنی‌دار می‌باشد. داده ها به صورت میانگین± میانگین انحراف قدرت اثر اندوفیت‌ها و میزان قطر هاله عدم رشد ایجاد شده بر حسب میلی‌متر در بخش بررسی عوامل ساختاری اندوفیت‌ها و تأثیر آن‌ها بر قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در نمودار (۲) نشان داده شده است.



نمودار ۲)- مقایسه اثر اندوفیت‌ها و میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر علیه قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* در روش ساختاری
a-f: وجود حروف مشترک بر روی اندوفیت‌های مختلف حاکی از نبود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

- اثرات ضدباکتریایی اندوفیت‌ها در روش بررسی متابولیت‌های ترشحی بر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*

در مطالعه متابولیت‌های ترشح شده از اندوفیت‌ها نتایج به مراتب بهتری حاصل شد و به‌طورکلی متابولیت‌های ترشحی اثرات مهاری قدرتمندتری را نسبت به پاتوژن‌های مذکور از خود بروز دادند. در مطالعه اثر مهاری متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌ها بر روی باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، اندوفیت‌های C، S، F و B اختلاف معنی‌داری ندارند. این در حالی است که اندوفیت‌های M و D اختلاف معنی داری را از خود نشان دادند ($P<۰/۰۵$). (نمودار ۳).

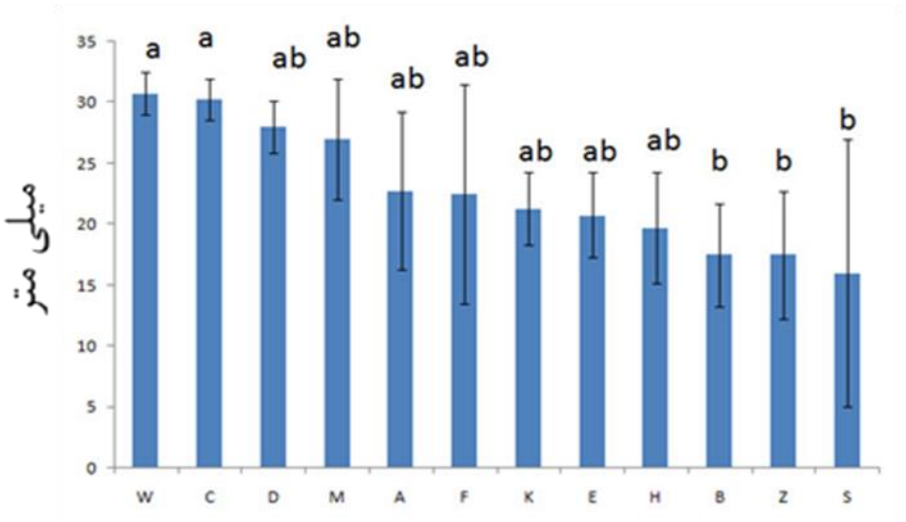


نمودار۳)- مقایسه اثر اندوفیت‌ها و میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر علیه باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در بررسی متابولیت‌های ترشحی

a-d: وجود حروف مشترک بر روی اندوفیت‌های مختلف حاکی از نبود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

- اثرات ضدقارچی اندوفیت‌ها در روش بررسی متابولیت‌های ترشحی بر *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*

در بررسی متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌ها و تأثیر آن‌ها بر روی قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* اندوفیت‌های W و C با یکدیگر از یک سو، اندوفیت‌های D، M، A، F، K، E و H از سوی دیگر و همچنین اندوفیت‌های B، Z و S نیز با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند (نمودار ٤). اندوفیت‌های W و C با اندوفیت‌های B، Z و S دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P<0/05$). وجود حروف مشترک (a-f) بر روی اندوفیت‌های مختلف حاکی از نبود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



نمودار ٤)- مقایسه اثر اندوفیت‌ها و میزان قطر هاله عدم رشد ایجاد شده برحسب میلی‌متر در بررسی متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌ها و تاثیر آنها بر روی قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمن*

a-b: وجود حروف مشترک بر روی اندوفیت‌های مختلف حاکی از نبود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

- اثرات ضد باکتریایی اندوفیت‌های جدا شده از گیاه خوشاریزه بر روی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*

هر ۱۲ اندوفیت جدا شده از گیاه خوشاریزه در هر دو روش اثرات ضدباکتریایی نیرومندی را از خود بروز دادند. بهترین اثر ضدباکتریایی متعلق به اندوفیت W بوده (جدا شده از ریشه) و با ایجاد قطر هاله عدم رشد ۳۲ میلی‌متر قدرتمندترین اندوفیت در بررسی عوامل ساختاری بود. ضعیف‌ترین اثرات متعلق به اندوفیت‌های باکتریایی E و S در بخش مطالعه عوامل ساختاری بودند که هیچ‌کدام از آن‌ها تأثیری بر رشد باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* نداشتند. اندوفیت‌ها در بخش بررسی متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌ها اثرات مطلوب‌تری نسبت به مطالعه بخش ساختاری از خود نشان دادند.

- اثرات ضدقارچی اندوفیت‌های جدا شده از گیاه خوشاریزه بر روی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*

در هر دو روش اندوفیت‌های خوشاریزه خاصیت ضد قارچی بسیار مناسبی را از خود بروز دادند. اندوفیت‌های W (قطر هاله عدم رشد ۳۲ میلی‌متر) و اندوفیت F (قطر هاله عدم رشد ۳۰ میلی‌متر) در بخش بررسی عوامل ساختاری دارای قویترین اثر و اندوفیت‌های A (۱/۲۵ mm)، M (۵ mm) و C (۹ mm) دارای کمترین اثر و اندوفیت‌های E و S بی‌اثر بودند. در بخش بررسی متابولیت‌های ترشحی، اندوفیت‌های W (۳۰/۷۵ mm) و C (۳۰/۲۵ mm) دارای بیشترین اثر و اندوفیت S (۱٦ mm) دارای کمترین اثر ضد قارچی بودند. به‌طورکلی اثرات مهاری اندوفیت‌ها بر روی *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* (در بررسی متابولیت‌های ترشحی) بسیار قدرتمند بود.

- تست آنتی‌بیوگرام به‌روش انتشار دیسک (Kirby Bayer)

به جهت مقایسه قدرت مهاری اندوفیت‌های خوشاریزه و آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی، قدرت مهاری و قطرهاله عدم رشد ایجاد شده توسط دیسک‌های کاغذی آنتی‌بیوتیک با قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط اندوفیت‌ها مقایسه و مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱)- قطرهاله عدم رشد ایجاد شده توسط آنتی‌بیوتیک های مورد مطالعه در محیط کشت حاوی *استرپتوکوکوس*

آنتی بیوتیک	نام اختصاری	مقدار	قطر هاله مهاری (میلی متر)
استرپتومایسین	S	۱۰ میکروگرم	۱۳
تتراسایکلین	TE	۳۰ میکروگرم	۱۶
آمپی سیلین	AM	۱۰ میکروگرم	۲۰
انروفلوکساسین	NFX	۵ میکروگرم	۱۹
کوتریماکسازول	SXT	۱۰ میکروگرم	۲۰
اریترومایسین	E	۱۵ میکروگرم	۲۰
جنتامایسین	GM	۱۰ میکروگرم	۱۲

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر جهت بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی اندوفیت‌های خوشاریزه بر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* طراحی و انجام پذیرفت. یافته‌ها حاکی از قدرتمندی اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی اندوفیت‌های خوشاریزه است. هر ۱۲ اندوفیت جدا شده بر روی هر دو پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی مورد آزمایش مؤثر واقع شدند. اندوفیت‌های باکتریایی را می‌توان به‌عنوان مخزن متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات زیست فعال جدید جهت مصارف درمانی به‌حساب آورد (El-Deeb *et al.*, 2013). با توجه به افزایش گسترده مقاومت‌های دارویی، جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی می‌تواند راه‌کار مناسبی جهت مقابله با مقاومت‌های دارویی علیه پاتوژن‌های انسانی باشد (Liu *et al.*, 2008). تاکنون مطالعاتی به‌منظور شناسایی و جداسازی اندوفیت‌های میکروبی برروی گیاهان دارویی متنوعی انجام پذیرفته که حاکی از وجود اندوفیت‌های باکتریایی با خواص ضد قارچی، ضد باکتریایی و نیز ضد انگلی در این گیاهان دارویی بوده است (Radu and Kqueen, 2002 ؛ Liu *et al.*, 2008).

هر ۱۲ اندوفیت جدا شده از خوشاریزه قادر به رشد در محیط کشت Mannitol salt agar بودند که نشان از تحمل بالای نمک در آن‌ها می‌باشد. در پژوهش پیش رو اندوفیت‌ها از تمام قسمت‌های گیاه (برگ، ساقه و ریشه) جدا شده و اثرات قدرتمندی را از خود بروز دادند. در بررسی خاصیت ضدباکتریایی عوامل ساختاری اندوفیت‌ها و تأثیر آن‌ها بر روی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده متعلق به اندوفیت (۳۰/۲۵ mm)

Z که یک کوکوباسیل است، می‌باشد. این میزان مهار رشد بسیار قدرتمندتر از میزان قطر هاله عدم رشد ایجادشده توسط آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در تست آنتی‌بیوگرام بود. این مهم نشان‌دهنده قدرت اثر و ارزشمندی گیاه خوشاریزه می‌باشد. در بررسی متابولیت‌های ترشحی نیز اندوفیت‌ها اثرات ضدباکتریایی قدرتمندی را از خود بروز دادند و بیشترین اثر متعلق به اندوفیت M (۳۰ mm) که یک کوکوباسیل بوده و از برگ گیاه جدا گردید، می‌باشد.

در این پژوهش، ۱۲ اندوفیت باکتریایی در هر دو روش بررسی عوامل ساختاری با قطره‌گذاری توسط کلروفرم و نیز روش بررسی اثر متابولیت‌های ترشحی، تأثیرات مهاری مطلوبی را بر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از خود نشان دادند. در مطالعات مختلف، مقاومت دارویی *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین، کلیندامایسین، وانکومایسین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین مشاهده شده است (Gizachew *et al*., 2019). در طی عفونت، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* می‌تواند با ایجاد بیوفیلم باعث افزایش مقاومت در برابر انواع مختلف تنش‌های فیزیکوشیمیایی و همچنین ترکیبات آنتی‌میکروبیال و آنتی‌بیوتیک‌های رایج شود (Ammar *et al*., 2018). میزان مقاومت به اریترومایسین و کلیندامایسین در بین سویه‌های *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در حال افزایش است و این نکته می‌تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد (Betriu *et al*., 2003). این روند فزاینده در میزان مقاومت‌های دارویی ایجاد شده در برابر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* باعث ایجاد نگرانی‌هایی در جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌های با عوارض جانبی کمتر برای درمان شده است (Simoni *et al*., 2018).

هر ۱۲ اندوفیت جدا شده از این گیاه در بخش ساختاری بر باکتری نشانگر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* اثرگذار بودند. به‌طورکلی متابولیت‌های ترشحی اکثر اندوفیت‌ها اثرات مهاری قدرتمندتری بر علیه باکتری نشانگر *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از خود نشان دادند. در راستای این پژوهش، مطالعات سابق نیز فعالیت‌های ضد میکروبی قابل توجه اندوفیت‌های باکتریایی گیاه دارویی پنستمون (*P.tenuiflorus*) علیه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را گزارش کردند (El-Deeb *et al*., 2013). به‌طورکلی گزارشات محدودی پیرامون فعالیت‌های اندوفیت‌های باکتریایی در برابر باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* در دسترس می‌باشد. در بررسی‌هایی که بر روی ۱۰۵۱ اندوفیت‌های قارچی جدا شده از *Cephalotaxus hainanensis* Li صورت پذیرفت، اثرات ضد باکتریایی قدرتمند علیه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (قطر هاله عدم رشد ۲۸ mm) گزارش گردید (Yang *et al*., 2015). فعالیت‌های ضدمیکروبی قابل‌توجهی نیز علیه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* توسط جدایه‌های اندوفیتی جدا شده از گیاه پنستمون مشاهده و ثبت شده است (El-Deeb *et al*., 2013).

روند فزاینده عفونت‌های قارچی و تکامل مقاومت ذاتی به ضدقارچ‌های موجود نیز به‌عنوان یک مشکل نگران‌کننده بهداشت جهانی تلقی شده که منجر به مرگ ۱/۶ میلیون نفر در سال می‌شود (Bermas and Geddes-McAlister, 2020). *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* عمدتاً در بیماران مبتلا به سرکوب سیستم ایمنی با مرگ و میر فراوان همراه بوده است. افزایش

مقاومت این ارگانیسم به داروهای موجود، مشکلاتی را در درمان ایجاد کرده است (Pereira *et al.*, 2015). یافتن ترکیبات طبیعی و ثانویه متعلق به اندوفیت‌ها، برای مقابله با میکروارگانیسم‌های مقاوم به داروهای موجود، موجب افزایش شانس کشف و تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌شود (Asghari *et al.*, 2010). با روند فزاینده عفونت‌های کریپتوکوکوزیس در دهه‌های اخیر، مقاومت *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* به ضد قارچ‌های رایج از جمله فلوکونازول در بیماران مبتلا، در حال افزایش است (Selb *et al.*, 2019 ؛ Kong *et al.*, 2020).

در مطالعه عوامل ساختاری اندوفیت‌ها، شاهد اثرات ضدقارچی قدرتمندی در برابر قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* بوده به‌گونه‌ای که اندوفیت‌های (۳۲ mm) W و (۳۰ mm) F که به ترتیب از ریشه و برگ گیاه جدا شدند بیشترین اثر را داشته و این مهم مؤید قدرتمندی اندوفیت‌های خوشاریزه است. با توجه به استفاده گسترده از فلوکونازول در عفونت‌های قارچی مهاجم و ظهور سریع ایزوله های مقاوم به دارو (Kong *et al.*, 2020)، و همچنین عملکرد مطلوب اندوفیت‌های خوشاریزه در مهار *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، می‌توان اذعان داشت که این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک منبع بلاقوه برای جایگزینی داروهای موجود به شمار آید. مطالعات پیشین صورت گرفته نیز مؤید این نکته هستند که ترکیبات حاصل از اندوفیت‌ها می‌توانند در برابر *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* اثرات مهاری مطلوبی را از خود بروز دهند (Pereira *et al.*, 2015). در پژوهشی، ۹۲ جدایه (٦١,٣٪) از ۱۵۰ جدایه اندوفیت گیاهان حرا با تولید ترکیبات بازدارنده، توانستند بر روی قارچ *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* و پاتوژن‌های دیگر مورد آزمایش اثر مهاری قدرتمندی را از خود بروز دهند (Buatong *et al.*, 2011).

تا کنون جنس اکینوفورا موضوع تحقیقات اندک فیتوشیمیایی و بیولوژیکی بوده و به‌طورکلی مطالعات چشم‌گیری در ارتباط با جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی گیاه خوشاریزه و بررسی خواص آنتی‌پاتوژنی آن‌ها صورت نگرفته است. عمده پژوهش‌ها حول محور عصاره این گیاه و خواص ضد میکروبی آن به گردش درآمده است (Sharafati-chaleshtori *et al.*, 2012 ؛ Sepehri *et al.*, 2016)، به گونه‌ای که می‌توان ادعا کرد که مطالعه حاضر، در زمره اولین مطالعات صورت گرفته پیرامون بررسی خواص آنتی‌پاتوژنی اندوفیت‌های باکتریایی خوشاریزه قرار می‌گیرد..

در حال حاضر دانش ناچیزی در مورد تنوع گونه‌ای و فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های اندوفیت گیاه *خوشاریزه* در دسترس است. مطالعاتی که تاکنون بر روی خوشاریزه صورت گرفته بیشتر بر روی اسانس روغنی این گیاه بوده که حاکی از خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد (*Avijgan et al.*, 2006).

با مقایسه قدرت اثر آنتی‌بیوتیک‌ها و اندوفیت‌های حاصل از خوشاریزه در تست آنتی‌بیوگرام، بیشترین میزان قطر هاله عدم رشدی که ایجاد شد متعلق به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول در حدود ۲۰mm بود. این درحالیست که قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط اندوفیت‌ها در هر دو روش بررسی بسیار بزرگتر از این میزان (۳۰ mm) بود. این مسئله حاکی از اثر بخشی فراوان اندوفیت‌های خوشاریزه

است. با مقایسه قدرت اثر اندوفیت‌ها با یکدیگر و مشاهده میزان مهار آن‌ها در بررسی عوامل ساختاری و بررسی متابولیت‌های ترشحی، اندوفیت W دارای بیشترین اثر مهاری بر *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* می‌باشد. اندوفیت‌های Z و M که در هر دو روش، بیشترین اثر مهاری را بر علیه *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* از خود نشان دادند، دارای اختلاف معنی‌داری با سایر اندوفیت‌ها (از نظر ایجاد منطقه مهار رشد) هستند ($P<۰/۰۵$).

از جمله اهداف اصلی مطالعات صورت گرفته پیرامون گیاهان دارویی در حوزه داروسازی، معرفی عوامل جایگزین داروهای ضد میکروبی فعلی در درمان سویه‌های مقاوم به داروها است (Sepehri *et al.*, 2016). اندوفیت‌های باکتریایی با ترشح متابولیت‌های ثانویه علاوه بر محافظت از گیاه میزبان و عمل کردن به‌عنوان عوامل کنترل زیست‌محیطی، اثرات مؤثری نیز بر عوامل پاتوژن خارجی دارند (Ryan *et al.*, 2008). اکثر اندوفیت‌های باکتریایی انواع مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌ها را تولید می‌کنند. Ecomycins، Pseudomycins، Munumbicins، Kakadumycins نمونه‌هایی از آنتی‌بیوتیک‌های جدید تولید شده توسط اندوفیت‌های باکتریایی هستند (Christina *et al.*, 2013).

با مشاهده خواص آنتی‌پاتوژنی که اندوفیت‌های خوشاریزه در این پژوهش از خود بروز دادند می‌توان امید این را داشت که از آن‌ها در جهت تولید مواد آنتی‌میکروبیال طبیعی با عوارض جانبی کمتر، خصوصاً بر علیه پاتوژن‌هایی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم هستند، استفاده کرد. همچنین می‌توان از اندوفیت‌ها در صنعت داروسازی، کشاورزی و صنایع غذایی بهره لازم را برد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارضی در منافع گزارش نکردند.

منابع

- Ali, M.M., Woldeamanuel, Y., Asrat, D., Fenta, D.A., Beall, B., Schrag, S. *et al.*, (2020). Features of *Streptococcus agalactiae* strains recovered from pregnant women and newborns attending different hospitals in Ethiopia. BMC Infectious Diseases, 20(1):1-9.
- Altamirano, S., Jackson, K.M. and Nielsen, K., (2020). The interplay of phenotype and genotype in *Cryptococcus neoformans* disease. Bioscience Reports, 40(10):SR20190337
- Ammar, A.M., El-Naenaeey, E.Y.M., El-Aziz, A. and Elazazy, A.A., (2018). Alternative Approaches for Mitigation of Drug Resistance in Streptococcus Species. Benha Veterinary Medical Journal, 35(2): 393-412.
- Asghari, G.R., Sajjadi, S.E., Sadraei, H. and Yaghobi, K.H., (2010). Essential oil constituents of *Echinophora platyloba* DC. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, (3):.185-186.
- Avijgan, M., Saadat, M., Nilfrooshzadeh, M.A. and Hafizi, M., (2006). Anti fungal effect of *Echinophora platyloba* extract on some common dermathophytes. Journal of Medicinal Plants, 5(18):10-16.

- Baker, C.J., Rench, M.A., Edwards, M.S., Carpenter, R.J., Hays, B.M. and Kasper, D.L., (1988). Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. New England Journal of Medicine, 319(18):1180-1185.
- Bermas, A. and Geddes-McAlister, J., (2020). Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. Molecular Microbiology, 114(5): pp.721-734.
- Betriu, C., Culebras, E., Gómez, M., Rodríguez-Avial, I., Sánchez, B.A., Agreda, M.C., *et al.*, (2003). Erythromycin and clindamycin resistance and telithromycin susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(3): 1112-1114.
- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V. and Sakayaroj, J., (2011). Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(12): 3005-3008.
- Chang, A.L. and Doering, T.L., (2018). Maintenance of mitochondrial morphology in *Cryptococcus neoformans* is critical for stress resistance and virulence. MBio, 9(6):e01375-18.
- Christina, A., Christapher, V. and Bhore, S.J., (2013). Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. Pharmacognosy Reviews, 7(13):11.
- Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marmion, B.P. and Swain, R.H., (1975). Tests for identification of bacteria. Medical Microbiology, 2:170-189.
- El-Deeb, B., Fayez, K. and Gherbawy, Y., (2013). Isolation and characterization of endophytic bacteria from Plectranthus tenuiflorus medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. Journal of Plant Interactions, 8(1): 56-64.
- Entezari, M., Dabaghian, F.H. and Hashemi, M., (2014). The comparison of antimutagenicity and anticancer activities of *Echinophora platyloba* DC on acute promyelocytic leukemia cancer cells. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 10(4):1004.
- Fathimoghaddam, E., Shakerian, A., Sharafati Chaleshtori, R. and Rahimi, E., (2020). Chemical Composition and Antioxidant Properties and Antimicrobial Effects of Satureja bachtiarica Bunge and *Echinophora platyloba* DC. Essential Oils Against *Listeria monocytogenes*. Journal of Medicinal Plants and By-product, 9(Special): 47-58.
- Furfaro, L.L., Chang, B.J. and Payne, M.S., (2018). Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets. Clinical Microbiology Reviews, 31(4):e00049-18.
- Genovese, C., D'Angeli, F., Di Salvatore, V., Tempera, G. and Nicolosi, D., (2020). *Streptococcus agalactiae* in pregnant women: serotype and antimicrobial susceptibility patterns over five years in Eastern Sicily (Italy). European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 39(12):2387-2396.
- Gizachew, M., Tiruneh, M., Moges, F. and Tessema, B., (2019). *Streptococcus agalactiae* maternal colonization, antibiotic resistance and serotype profiles in Africa: a meta-analysis. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 18(1):1-14.
- Khajeh, E., Hosseini Shokouh, S.J., Rajabibazl, M., Roudbary, M., Rafiei, S., Aslani, P. and Farahnejad, Z., (2016). Antifungal effect of *Echinophora platyloba* on expression of CDR1 and CDR2 genes in fluconazole-resistant *Candida albicans*. British Journal of Biomedical Science, 73(1):44-48.
- Kong, Q., Cao, Z., Lv, N., Zhang, H., Liu, Y., Hu, L. and Li, J., (2020). Minocycline and fluconazole have a synergistic effect against *Cryptococcus neoformans* both in vitro and in vivo. Frontiers in Microbiology, 11:836.
- Krishnapura, P.R. and Belur, P.D., (2016). Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants for L-asparaginase production. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 46(3):281-287.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X. and Zhou, J., (2008). Antimicrobial activity of an endophytic Xylaria sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. Applied Microbiology and Biotechnology, 78(2):241-247.

- Osman, K.M., Marouf, S.H., Samir, A. and AlAtfeehy, N., (2012). The prevalence of multidrug resistance of various numbers of antimicrobial classes, multiple resistance patterns, and distribution of Salmonella isolates from human and avian clinical cases of diarrheoa. Journal of Chemotherapy, 24(5):300-304.
- Pereira, C.B., De Oliveira, D.M., Hughes, A.F., Kohlhoff, M., La Vieira, M., Martins Vaz, A.B., *et al*., (2015). Endophytic fungal compounds active against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. The Journal of Antibiotics, 68(7):436-444.
- Photolo, M.M., Mavumengwana, V., Sitole, L., and Tlou MG. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of a bacterial endophyte, methylobacteriumradiotolerans MAMP 4754, isolated from combretum erythrophyllum seeds. International Journal of Microbiology, 18:2020.
- Pieranski, M.K., Rychlowski, M. and Grinholc, M., (2021). Optimization of *Streptococcus agalactiae* biofilm culture in a continuous flow system for photoinactivation studies. Pathogens, 10(9):1212.
- Pilevar, Z., Hosseini, H., Hajimehdipoor, H., Shahraz, F., Alizadeh, L., Khaneghah, A.M. *et al.*, (2017). The anti-*Staphylococcus aureus* effect of combined *Echinophora platyloba* essential oil and liquid smoke in beef. Food Technology and Biotechnology, 55(1):117.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R., (1994). Enterobacteriaceae. Clinical veterinary Microbiology, 12:109-135.
- Radu, S. and Kqueen, C.Y., (2002). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. The Malaysian Journal of Medical Sciences, 9(2):23.
- Rana, K.L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Negi, C., Yadav, A.N., *et al.*, (2020). Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications. In Microbial endophytes (pp. 273-305). Woodhead Publishing.
- Ranjbar, R. and Babaie, S., (2016). Evaluation the antibacterial effects of *Echinophora platyloba* extracts against some Salmonella species. Electronic Physician, 8(2):1943.
- Ratti, R.P., Serrano, N.F.G., Hokka, C.O. and Sousa, C.P., (2008). Antagonistic properties of some microorganisms isolated from Brazilian tropical savannah plants against *Staphylococcus coagulase*-positive strain. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 14:294-302.
- Rosini, R. and Margarit, I., (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5: p.6.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. and Dowling, D.N., (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters, 278(1):1-9.
- Saei-Dehkordi, S.S., Fallah, A.A., Saei-Dehkordi, S.S. and Kousha, S., (2012). Chemical Composition and Antioxidative Activity of *Echinophora platyloba* DC. Essential oil, and its interaction with natural antimicrobials against food-borne pathogens and spoilage organisms. Journal of Food Science, 77(11): 631-637.
- Selb, R., Fuchs, V., Graf, B., Hamprecht, A., Hogardt, M., Sedlacek, L., *et al.*, (2019). Molecular typing and in vitro resistance of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates obtained in Germany between 2011 and 2017. International Journal of Medical Microbiology, 309(6):151336.
- Sepehri, Z., Javadian, F., Khammari, D. and Hassanshahian, M., (2016). Antifungal effects of the aqueous and ethanolic leaf extracts of *Echinophora platyloba* and Rosmarinus officinalis. Current Medical Mycology, 2(1):30.
- Sharafati-chaleshtori, R., Rafieian-kopaei, M., Mortezaei, S., Sharafati-chaleshtori, A. and Amini, E., (2012). Antioxidant and antibacterial activity of the extracts of *Echinophora platyloba* DC. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 6(37):2692-2695.

- Shabayek, S. and Spellerberg, B., (2018). Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. Frontiers in Microbiology, 9: 437.
- Simoni, S., Vincenzi, C., Brenciani, A., Morroni, G., Bagnarelli, P., Giovanetti, E., *et al*., (2018). Molecular characterization of Italian isolates of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus agalactiae* and relationships with chloramphenicol resistance. Microbial Drug Resistance, 24(3):225-231.
- Yang, H.R., Hu, X.P., Jiang, C.J., Qi, J., Wu, Y.C., Li, W., *et al.*, (2015). Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from Cephalotaxus hainanensis Li, a well-known medicinal plant in China. Letters in Applied Microbiology, 61(5):484-490.
- Umaru, I.J., Badruddin, F.A., Assim, Z.B. and Umaru, H.A., (2018). Antibacterial and cytotoxic actions of chloroform crude extract of Leptadenia hastata (pers) Decnee. Clinical Medical Biochemistry, 4:1-4.
- Zhu, T., Chen, X., Li, C., Tu, J., Liu, N., Xu, D. and Sheng, C., (2021). Lanosterol 14α-demethylase (CYP51)/histone deacetylase (HDAC) dual inhibitors for treatment of *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans* infections. European Journal of Medicinal Chemistry, 221:113524.