Food Hygiene, Vol. 12, No. 48, Winter 2023

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2023.1978116.1389**

Effects of Lordegan Thyme endophytes on *Shigella sonnei* and *Candida albicans*

Khodadadi, M.[1], Shahrokh Shahraki, S.[1]*, Mokhtari, A.[1]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
*Corresponding author: somaye.shahrokh@yahoo.com
(Received: 2023/1/25 Accepted: 2023/5/19)

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of thyme endophytes belonging to the Lordegan region on *Shigella sonnei* and *Candida albicans*. Thyme components were immersed in 70% ethanol (2 minutes), 3.5% sodium hypochlorite (5 minutes), and 75% ethanol (30 seconds), respectively, and lastly washed with sterile distilled water. Subsequently, they were cultured on YEA and PA medium, and the endophytes were isolated. A total of 8 bacterial endophytes were taken from different parts of the Lordegan thyme plant (stem, leaves, and roots) and examined. The endophytes isolated from thyme were bacilli, coccobacilli, and cocci. Antimicrobial and inhibitory properties of endophytes isolated from Lordegan thyme were studied in two methods: structural factors and secretory metabolites of endophytes.

The results of this study showed the beneficial effects of thyme endophytes on *Shigella sonnei* and *Candida albicans*. Bacterial endophytes isolated from thyme (roots stems and leaves) showed stronger inhibitory effects than the study of secretory metabolites against *S. sonnei* and *C. albicans*. In general, thyme could be a good alternative to chemical drugs in the treatment of Candida infections, especially cutaneous mucosal candidiasis, and shigellosis, and can be used in therapeutic cases, food, health, and pharmaceutical industries.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Endophyte, Lordegan Thyme, *Shigella sonnei*, *Candida albicans*

«مقاله پژوهشی»
DOI: 10.30495/JFH.2023.1978116.1389

اثرات اندوفیت‌های آویشن (Thyme) لردگان روی باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس*

خواص ضدباکتریایی و قارچی اندوفیت‌های آویشن لردگان

محمد خدادادی[۱]، سمیه شاهرخ‌شهرکی[۱*]، اعظم مختاری[۱]

گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: somaye.shahrokh@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۲/۲۹)

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثرات اندوفیت‌های گیاه دارویی آویشن لردگان بر باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* طراحی و انجام گردید. اجزای گیاه آویشن بعد از جمع‌آوری و انتقال به آزمایشگاه به ترتیب در اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد (۵دقیقه) و اتانول ۷۵ درصد (۳۰ ثانیه) غوطه‌ور و توسط آب مقطر استریل شستشو داده شد. سپس آنها را بر روی محیط YEA و PA کشت داده و اندوفیت‌ها جدا گشتند. از قسمت‌های مختلف گیاه آویشن لردگان (ساقه، برگ و ریشه) در مجموع ۸ اندوفیت باکتریایی جدا شده و مورد بررسی قرار گرفت. اندوفیت‌های جدا شده از گیاه آویشن از نوع باسیل، کوکوباسیل و کوکسی بودند. خواص ضدمیکروبی و مهاری اندوفیت‌های جدا شده از گیاه آویشن لردگان در دو روش بررسی عوامل ساختاری و روش بررسی متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایجی که از این پژوهش حاصل گردید نشان‌دهنده تأثیرات مطلوب اندوفیت‌های گیاه آویشن لردگان بر باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بوده است. در بررسی عوامل ساختاری، اندوفیت‌های جدا شده از ریشه، ساقه و برگ آویشن لردگان، اثرات مهاری قوی‌تری نسبت به متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌های باکتریایی آویشن برعلیه باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ نشانگر *کاندیدا آلبیکنس* از خود نشان دادند. بطور کلی گیاه دارویی آویشن جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی در درمان عفونت‌های کاندیدایی به ویژه کاندیدیازیس جلدی مخاطی و شیگلوزیس بوده و می‌تواند در موارد کلینیکی و درمانی، صنایع غذایی، بهداشتی و داروسازی به کار گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، آویشن لردگان، *شیگلا سونئی*، *کاندیدا آلبیکنس*

مقدمه

درسال‌های اخیر با توجه به افزایش مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها و شناخت بیشتر عوارض جانبی ترکیبات سنتیک شیمیایی علاقه زیادی در مردم به استفاده از محصولات گیاهی با خواص ضدمیکروبی ایجاد شده است (Alajbeg *et al*., 2021; Almirante *et al*., 2005). گیاهان دارویی شامل ۲۰۰۰ گونه گیاهی می‌شوند که منابع با ارزشی برای تهیه داروهای سالم در جهان هستند (Alajbeg *et al*., 2021).

جمعیت انسانی با افزایش شیوع عفونت‌های باکتریایی و قارچی روبرو است. داروهای شیمیایی تولید شده با روش‌های صنعتی مختلفی برای مقابله با این عفونت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که اثرات جانبی زیادی دارند (Aly *et al*., 2011). از طرفی عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی با سرعت دچار مقاومت آنتی‌بیوتیکی شده و اساساً تأثیر و کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها در مقابل این عوامل بیماری‌زا رو به کاهش می‌باشد (Anderson *et al*., 2016; Qadri *et al*., 2022). گیاهان دارویی از منابع غنی ژنتیکی و ارزشمندترین سرمایه‌های ملی هر کشور به حساب می‌آیند (Arendrup *et al*., 2005). بسیاری از ترکیبات دارویی تولید شده در گیاهان دارویی به وسیله اندوفیت‌های موجود در آن‌ها تولید می‌شود. بنابراین بهتر است ابتدا جمعیت اندوفیتی این گیاهان بررسی شوند و سپس خواص دارویی آنها تعیین گردد (Arnold and Herre, 2003; Sharma *et al*., 2020). نیاز است ترکیباتی به عنوان مواد ضدمیکروبی استفاده گردد که تجدید شدنی و طبیعی باشند و از طرفی ایمن بوده و اثرات جانبی کمتری داشته باشند (Arnold *et al*., 2001).

اندوفیت‌ها در همه گونه‌های گیاهی موجود در جهان یافت می‌شوند و به کمک تولید موادی از میزبان گیاهی خود محافظت می‌کنند. بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اندوفیت‌ها منبع جدید و بالقوه مواد طبیعی جدید می‌باشند که می‌توان آن‌ها را برای بهره برداری در صنعت، پزشکی مدرن و کشاورزی مورد استفاده قرار داد. موارد زیادی از مواد طبیعی جدا شده از اندوفیت‌ها که خاصیت ضدمیکروبی دارند، گزارش شده است (Anderson *et al*., 2016; Kandasamy and Kathirvel, 2022). ترکیبات ضدمیکروبی جدا شده از اندوفیت‌ها می‌توانند نویددهنده غلبه بر تهدید روزافزون مقاومت‌های دارویی علیه عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی باشند (Arora *et al*., 1982). آویشن (Thyme) یک گیاه دارویی سنتی از خانواده نعناع با نام *Lamiaceae* است و در آفریقا، اروپا و آسیا پراکنش وسیعی دارد (Zhao *et al*., 2021). آویشن از جمله گیاهانی است که نه تنها کاربردهای فراوانی در طب سنتی دارد بلکه به دلیل داشتن ترکیبات فنلی، تیمول و کارواکرول فعالیت ضد میکروبی آنها بر روی برخی از ایزوله‌های قارچی تا حدودی به اثبات رسیده است (Borgers *et al*., 2005; Boucher *et al*., 1996). از این گیاه، در طول تاریخ طب سنتی و مدرن، به عنوان یک ضدعفونی کننده که دارای خواص ضد میکروبی فراوانی است یاد می‌شود (Mirzaei and Masumi, 2022).

بیماری‌های عفونی از مهمترین بیماری‌های شایع در جهان هستند که بار مالی فراوانی را به جوامع بشری تحمیل می‌نمایند. آنتی‌بیوتیک‌های ساختگی (Synthetic) در دهه‌های گذشته هر چند توانسته‌اند نقش مهمی را در درمان بیماری‌های عفونی ایفا نمایند، اما با بروز مشکلاتی در ایجاد مقاومت‌های میکروبی آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش گرایش به مصرف داروهای گیاهی شده‌اند (Atesh and Turgay, 2003; Azevedo *et al.*, 2000; Azimpour and Pourtaghi, 2016).

کاندیدا جزء فلور طبیعی دهان است و در ۲۰ الی ۵۰ درصد از جمعیت سالم وجود دارد (Venugopal *et al.*, 2021). این میکروارگانیسم از بسیاری از انواع قارچ‌های موجود در حفره دهان شایع‌تر است و از گونه‌های کاندیدای جدا شده در حفره دهان می‌توان به *کاندیدا آلبیکنس* اشاره کرد (Shoukat *et al.*, 2023). دهان به واسطه وجود موادغذایی، دبری‌های اپی‌تلیالی و مواد ترشحی، محیطی مطلوب برای زندگی گروه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌آورد (Blanchard, 2012). عفونت کاندیدایی درصورت وجود عوامل مستعد کننده موضعی یا سیستمیک برای رشد قارچ، به صورت یک عفونت فرصت طلب تظاهر می‌یابد (Blocker *et al.*, 1991). حدود ۹۶ درصد از قارچ‌های فرصت‌طلب، ناشی از گونه‌های کاندیدا هستند (Kong *et al.*, 2020). درسال‌های اخیر گزارش‌های متعددی مبنی بر شکست درمانی مبتلایان به عفونت‌های ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* ارائه شده است (Bandara *et al.*, 2006; Bentley *et al.*, 1991). با افزایش شیوع کاندیدیازیس، استفاده از داروهای گیاهی در درمان قارچ *کاندیدا آلبیکنس* مورد توجه قرار گرفته و از جمله گیاهان مورد توجه، آویشن می باشد.

باکتری شیگلا، از خانواده انتروباکتریاسه بوده عامل عفونت‌زای قوی است (Shad and Shad, 2021). شیگلا باکتری پاتوژن داخل سلولی گرم منفی‌ای است که عامل اسهال باسیلی و بیماری شیگلوز در انسان می‌باشد (Buchrieser *et al.*, 2000; sabour *et al.*, 2022). عفونت‌های ناشی از این باکتری مشکلات جدی را در کشورهای پیشرفته و در حال توسعه ایجاد کرده است. گونه‌های شیگلا به چهار گروه *دیسانتری* (*S. dysenteriae*)، *فلکستری* (*flexneri*) و *بوییدی* (*S. baydii*) *سونئی* (*S. Sonnei*) تقسیم می‌شوند (Feng *et al.*, 2022). باکتری شیگلا به همراه برخی دیگر از عوامل منتقله از طریق آب و مواد غذایی در گروه دوم عوامل بیوتروریستی قرار می‌گیرند. این بیماری نسبت به سایر اشکال گاستروانتریت از شدت بالاتری برخوردار است (Buchrieser *et al.*, 2000). باکتری شیگلا قادر است از راه‌های متعددی میزبان خود را آلوده نماید. همین امر باعث می‌شود تا پتانسیل بالایی را از نظر ایجاد آلودگی و انتشار داشته باشد (Calderone and Braun, 1991; Calderone and Fonzi, 2001).

کنترل همه‌گیری‌ها در مکان‌های شلوغ با سطح بهداشتی پایین، بنا بر دلایلی همچون دوز عفونی‌کننده پایین باکتری، آسانی انتشار از فرد به فرد از طریق دهانی مدفوعی، توانایی انتشار غیرمستقیم از طریق آلودگی غذا و آب یا مدفوع آلوده، مشکل می‌باشد (Carroll, 1986). در مطالعات نشان داده شده است که شیگلا سومین عامل باکتریایی جدا شده از کودکان مبتلا به اسهال است. این عفونت در تمام نقاط دنیا بومی است. اپیدمی

معمولا در مناطق با جمعیت زیاد و وضعیت بهداشتی ضعیف اتفاق می‌افتد (Farsiani and Sasan, 2020; Cassone, 2015; Castillo *et al*., 2006). در پروسه درمان عفونت شیگلا، مشکل مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون آمپی‌سیلین، تری‌متوپریم و تتراسایکلین وجود دارد (Chiou *et al*., 2001; *Zachariah et al*., 2021). درمان آنتی‌بیوتیکی مناسب دوره درمان بیماری شیگلوز را کوتاه کرده و به طور قابل ملاحظه‌ای خطر انتقال عفونت را کاهش می‌دهد. اما سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های متداول در درمان این بیماری در طی چند سال اخیر ظهور و افزایش پیدا کرده‌اند. حتی مقاومت با فرکانس بالا در چند سال گذشته نسبت به بسیاری از داروهای خط اول درمان این بیماری گزارش گردیده است که همین امر درمان را با مشکلاتی مواجه کرده است (Christopher *et al*., 1997). لذا با توجه به خاصیت ضدباکتریایی و ضدقارچی گیاه آویشن و اهمیت باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، هدف این مطالعه بررسی اثرات اندوفیت‌های آویشن لردگان بر باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* می‌باشد.

مواد و روش کار

۱- آماده‌سازی نمونه، جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی

گیاه آویشن در بهار ۱۴۰۰ از استان چهارمحال و بختیاری، ایران جمع‌آوری شد و پس از تأیید جنس و گونه گیاه، با انتقال به آزمایشگاه شستشو داده و خشک شد. این مطالعه کارآزمایی بالینی با هدف ارزیابی خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی و برای جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی، از ۵۰ نمونه تازه گیاه آویشن انجام شد.

اجزای گیاه به جهت استریل سطحی، بصورت جداگانه به ترتیب در اتانول ۷۰ درصد (۲ دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۳/۵ درصد (۵دقیقه) و اتانول ۷۵ درصد (۳۰ثانیه) غوطه‌ور گردید و نهایتا با آب مقطر استریل شستشو داده شد. اجزای گیاه با وسایل استریل قطعه قطعه شده و روی محیط کشت آگار حاوی مخمر یا YEA (Yeast Extract Agar) و محیط کشت پپتون آگار یا PA (Pepton Agar) کشت داده شده و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز انکوبه گردیدند. بعد از طی این زمان، رشد باکتری‌های اندوفیت بر روی محیط کشت‌های مذکور بررسی شد. کلنی‌های ایجاد شده بر روی محیط‌های کشت، ابتدا از نظر مورفولوژی مورد مطالعه ماکروسکوپی قرار گرفتند. از قسمت‌های مختلف گیاه آویشن (ریشه، ساقه و برگ)، تعداد ۸ اندوفیت باکتریایی جدا گردید. مورفولوژی کلنی خالص شدهٔ باکتری‌های اندوفیت از نظر شکل، رنگ، قوام و اندازه مشاهده و ثبت شدند. جدایه‌های باکتریایی برای آزمایش‌های بیوشیمیایی، کاتالاز، اکسیداز و رنگ‌آمیزی گرم تجزیه و تحلیل شدند (Krishnapura and Belur, 2016).

۲- بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی عوامل ساختاری باکتری‌های اندوفیت

پاتوژن‌های مورد آزمایش: باکتری *شیگلا سونئی* (*Shigella sonnei*, ATCC: 9290) و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*, ATCC: 10231) از دانشکده دامپزشکی شهرکرد و همچنین دانشکده دامپزشکی تهران تهیه شدند و سپس به جهت تهیه

کشت خالص، باکتری *شیگلا سونئی* بر روی محیط کشت بلاد اگار و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* بر روی سابرو دکستروزآگار (Germany, Merck) کشت داده شدند. در حدود ۳ الی ۴ کلنی یکسان اندوفیت باکتریایی در محیط پپتون واتر(Difco, 1807-17-4) کشت داده و درون انکوباتور قرار گرفتند. کلنی‌هایی یکسان (۲ الی ۳ کلنی) از باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* مورد آزمایش، به طور جداگانه در محیط Tryptic Soy Broth کشت داده و به مدت ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از مشاهده رشد مطلوب اندوفیت‌ها در پپتون واتر، به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی اندوفیت را برداشته و بر روی محیط YEA (Merck,64271,Germany) گذاشته و بصورت مستقیم در مدت زمان ۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از گذشت مدت زمان ذکر شده، سطح کلنی رشد یافته اندوفیت‌ها در حدود ۲۰ الی ۳۰ دقیقه به کلروفرم آغشته شد. در نهایت با برداشتن درب پلیت‌ها، اجازه داده شد تا کلروفرم کاملا تبخیر شود. این مراحل برای هر اندوفیت منحصراً انجام شد (Ratti *et al.*, 2008).

برای بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی عوامل ساختاری باکتری‌های اندوفیت، از محیط TSB حاوی باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* رشد یافته، ۲۰۰ میکرولیتر برداشته و به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت BHI (Himedia,400-086) اضافه کرده و مخلوط شد. محیط BHI مورد استفاده باید استریل و به صورت نیمه‌جامد و در دمای ۳۷ تا ۴۰ درجه سلسیوس باشد. سپس به سرعت محتویات لوله‌ها را جداگانه بر روی پلیت‌های YEA که شامل باکتری‌های اندوفیت رشد یافته (بعد از تماس با کلروفرم) بودند ریخته و سطح پلیت‌ها بصورت کامل توسط محیط BHI پوشانده شد. در انتها پلیت‌ها انکوبه شدند (۱۸ الی ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس). بعد از طی مدت زمان انکوباسیون میزان قطر هاله عدم رشد باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در اطراف کلنی هر باکتری اندوفیت بصورت جداگانه بررسی و بر حسب میلی‌متر نگاشته شد.

چهار تکرار از آزمایش‌ها انجام و نتایج نگاشته شد. همچنین میانگین انحراف معیار (SD) محاسبه و ثبت شدند (Ratti *et al.*, 2008).

۳- بررسی اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی متابولیت‌های ترشحی باکتری‌های اندوفیت

از هر باکتری اندوفیت و همچنین باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس*، درمحیط کشت LB (Luria Bertani Broth), Merck, 110285, Germany کشت داده و لوله‌ها به مدت ۱۸-۲۴ ساعت و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، درون انکوباتور قرار گرفتند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محیط LB حاوی باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* رشد یافته را جداگانه برداشته و به ۱۵ میلی‌لیتر محیط YEA استریل و نیمه جامد (دمای محیط YEA در حدود ۳۷ تا ۴۰ درجه سلسیوس) اضافه، مخلوط و در پلیت‌های استریل ریخته شدند. سیلندرهای آلمینیومی استریل (با قطر ۰/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۱ سانتی‌متر)، در حالی درون پلیت قرار داده شد که محیط کشت درون پلیت‌ها هنوز بصورت مذاب بودند. در حدود یک میلی‌لیتر از باکتری‌های اندوفیت رشد یافته در LB را به یک میکروتیوب استریل منتقل و

سانتریفیوژ (Sigma, serialno. 103286) گردید (۱۵ دقیقه با دور 10000 rpm). سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی فیلتر شده به درون سیلندرها منتقل و همه پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف هر سیلندر بررسی و نتایج ثبت گردید.

به تعداد ۴ نوبت، آزمایش تکرار و آب مقطر استریل به عنوان کنترل آزمایش در نظر گرفته شد و میانگین انحراف معیار (SD) محاسبه و ثبت شدند.

۴- آزمون آنتی‌بیوگرام

این آزمون، به روش انتشار دیسک (Kirby Bayer) با هدف مقایسه اثر مهاری اندوفیت‌های آویشن لردگان و آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی و همچنین مطالعه میزان قطرهاله عدم رشد ایجاد شده بوسیله دیسک‌های کاغذی آنتی‌بیوتیک و مقایسه آن با قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط اندوفیت‌های باکتریایی گیاه آویشن لردگان، صورت پذیرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی عوامل ساختاری اندوفیت‌های جدا شده از ریشه، ساقه و برگ گیاه آویشن لردگان، به نسبت نتایج حاصل از روش بررسی متابولیت‌های این باکتری‌ها بر قارچ *کاندیدا آلبیکنس* و باکتری *شیگلا سونئی* بیانگر اثرات مهاری قدرتمندتری بودند. بطور کلی در مطالعه عوامل ساختاری، هر کدام از ۸ اندوفیت باکتریایی بر علیه هر دو پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی مورد آزمایش، اثرات مهاری مطلوبی را از خود بروز دادند. بیشترین قدرت اثر بر روی باکتری *شیگلا سونئی* متعلق به اندوفیت E_6 با ایجاد میانگین قطر هاله عدم رشد ۴۰mm و کمترین میزان نیز متعلق به اندوفیت E_7 با ایجاد میانگین قطر هاله عدم رشد ۲۳/۵ mm بود که هر دو آنها از برگ گیاه آویشن لردگان جدا گردیدند. به همین ترتیب اندوفیت E_6 (۴۰/۵mm) بیشترین و اندوفیت E_4 (۱۷ mm) کمترین میزان قطر هاله عدم رشد را در بررسی عوامل ساختاری این میکروارگانیسم‌ها بر علیه پاتوژن *C. albicans* ایجاد کردند (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین ± انحراف معیار قطر هاله عدم رشد *شیگلا سونئی* و *کاندیدا آلبیکنس* به میلی‌متر در بررسی عوامل ساختاری اندوفیت‌های جدا شده از آویشن لردگان

اندوفیت	مورفولوژی	اجزای گیاه	تست گرم	تست کاتالاز	*شیگلا سونئی*	*کاندیدا آلبیکنس*
E_1	باسیل	ریشه	+	+++	۳۷/۵ ± ۵/۲۵*	۳۹ ± ۱/۸۲
E_2	باسیل	ریشه	+	++	۳۰/۵ ± ۴/۷۹	۲۷/۵ ± ۴/۲
E_3	کوکو باسیل	ریشه	-	++	۲۴ ± ۳/۳۶	۳۲/۲۵ ± ۲/۵
E_4	باسیل	ساقه	+	+	۳۵/۷۵ ± ۳/۳	۱۷ ± ۴/۹۶
E_5	کوکسی	ساقه	-	-	۲۸/۷۵ ± ۲/۹۸	۳۱/۲۵ ± ۲/۶۲
E_6	کوکسی	ساقه	+	++	۴۰ ± ۴/۱۶	۴۰/۵ ± ۳/۶۹
E_7	باسیل	برگ	-	+	۲۳/۵ ± ۴/۶۵	۲۹ ± ۳/۷۴
E_8	کوکسی	برگ	-	-	۲۹/۷۵ ± ۳/۴	۳۷/۷۵ ± ۳/۳

*ا میانگین ± خطای انحراف معیار داده‌ها

در بررسی متابولیت‌های ترشحی، اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده از آویشن لردگان اثرات مهاری نسبتاً مطلوبی را بر علیه هر دو پاتوژن قارچی و باکتریایی مورد آزمایش از خود بروز دادند. بیشترین قدرت اثر مهاری بر علیه باکتری *S.soenni* متعلق به اندوفیت E_7 (۱۹/۵ mm) وکمترین میانگین قطر هاله عدم رشد متعلق به اندوفیت‌های E_4 و E_6 (۶/۵ mm) بود. به همین ترتیب بیشترین قدرت اثر مهاری بر علیه قارچ *C. albicans* متعلق به اندوفیت E_1 (۲۵ mm) و کمترین میزان متعلق به اندوفیت E_5 (۲mm) گزارش شد. در مجموع می توان گفت اندوفیت‌های گیاه آویشن تأثیر مطلوبی بر باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین ± انحراف معیار قطر هاله عدم رشد *شیگلا سونئی* و *کاندیدا آلبیکنس* به میلی‌متر در بررسی متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌های جدا شده از آویشن لردگان

اندوفیت	مورفولوژی	اجزای گیاه	تست گرم	تست کاتالاز	*شیگلا سونئی*	*کاندیدا آلبیکنس*
E_1	باسیل	ریشه	+	+++	۱۷/۲۵ ± ۴/۹۹*	۲۵ ± ۲/۹۴
E_2	باسیل	ریشه	+	++	۱۳ ± ۲/۹۴	۱۷/۵ ± ۲/۰۸
E_3	کوکو باسیل	ریشه	-	++	۱۱/۷۵ ± ۳/۸۶	۱۴/۵ ± ۳/۳۱
E_4	باسیل	ساقه	+	+	۶/۵ ± ۵/۰۶	۱۴ ± ۱/۸۲
E_5	کوکسی	ساقه	-	-	۱۳/۲۵ ± ۳/۳	۲ ± ۲/۴۴
E_6	کوکسی	ساقه	+	++	۶/۵ ± ۳/۱	۱۲/۲۵ ± ۲/۲۱
E_7	باسیل	برگ	-	+	۱۹/۵ ± ۴/۲	۱۱/۲۵ ± ۱/۵
E_8	کوکسی	برگ	-	-	۱۱/۲۵ ± ۲/۶۲	۱/۲۵ ± ۲/۵

* میانگین ± خطای انحراف معیار داده‌ها

همچنین در مجموع عوامل ساختاری اندوفیت‌های جدا شده از ریشه، ساقه و برگ آویشن لردگان اثر مهاری قوی‌تری نسبت به متابولیت‌های ترشحی آنها برعلیه باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ نشانگر *کاندیدا آلبیکنس* مورد آزمایش از خود بروز دادند.

آزمون آنتی‌بیوگرام به‌روش انتشار دیسک (Kirby Bayer) نیز جهت بررسی میزان مهار باکتری *S. Sonnei* توسط اندوفیت‌های باکتریایی طراحی و نتایج با میزان مهار این پاتوژن توسط آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی، مقایسه و ثبت شد (جدول ۳).

جدول ۳- میزان قطر هاله عدم رشد در تست آنتی‌بیوگرام

آنتی‌بیوتیک‌ها	نام اختصاری	مقدار	*Shigella sonnei*
سیپروفلوکساسین	CIP	۵ میکروگرم	۲۳
آمپی‌سیلین	AM	۱۰ میکروگرم	۲۰
جنتامایسین	GM	۱۰ میکروگرم	۱۷
سفوتاکسیم	CTX	۳۰ میکروگرم	۱۵
افلاکساسین	OFX	۵ میکروگرم	۱۸

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر جهت بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی اندوفیت‌های آویشن لردگان روی باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* طراحی و انجام پذیرفت. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر فعالیت ضدمیکروبی مطلوب گیاه دارویی آویشن لردگان بر علیه پاتوژن‌های انسانی مورد آزمایش است. می‌توان اندوفیت‌های باکتریایی موجود در گیاهان دارویی را بدلیل تولید متابولیت‌های ثانویه با خواص آنتی‌میکروبیال، یک عامل کنترل زیستی عنوان کرد (Musa *et al.*, 2020). طبق بررسی‌های انجام شده در پژوهش حاضر، اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده از گیاه آویشن لردگان، که در محیط‌های کشت YEA و PA رشد مناسبی را از خود بروز دادند، دارای خواص ضدباکتریایی علیه باکتری نشانگر *شیگلاسونئی* و خواص ضد قارچی علیه قارچ نشانگر *کاندیدا آلبیکنس* به کار رفته در این بررسی بودند. آویشن دارای خواص دارویی متعددی مانند فعالیت‌های ضدالتهابی، ضدباکتریایی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانی است (Prasanth *et al.*, 2014, Mandal, DebMandal, 2016).

در بررسی‌هایی که بر روی عوامل ساختاری اندوفیت‌ها با روش قطره‌گذاری کلروفرم صورت پذیرفت، اثرات مهاری قدرتمند این میکروارگانیسم‌ها بر روی باکتری *شیگلا سوئنی* بسیار قابل توجه می‌باشد. بگونه‌ای بیشترین میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده متعلق به اندوفیت E_6 (۴۰mm) کوکسی شکل بوده که از ساقه گیاه آویشن جدا شد. این در حالی است که کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده متعلق به اندوفیت E_7 (۲۳/۵mm) باسیلی شکل بود که از برگ جدا شد.

مطالعات صورت گرفته بر روی جمعیت‌های آویشن وحشی نشان می‌دهد که اندوفیت‌های متنوعی می‌توانند در این گیاه دارویی رشد کرده و برخی از آنها توان مهار پاتوژنزهای متعددی را دارند که این مهم آنها را به گزینه‌های امیدوار کننده‌ای برای عوامل کنترل زیستی تبدیل می‌کند (Abdelshafy Mohamad *et al.*, 2020).

با توجه به آزمون آنتی‌بیوگرامی که طراحی شد و مقایسه قدرت اثر آنتی‌بیوتیک‌ها و اندوفیت‌های حاصل از گیاه آویشن در مهار رشد باکتری *شیگلا سوئنی*، می‌توان به گستردگی قدرتمندی اندوفیت‌های باکتریایی این گیاه پی برد. با توجه به نتایج تست آنتی‌بیوگرام بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد ایجاد شده متعلق به آنتی‌بیوتیک Ciprofloxacin (۲۳ mm) بوده که با اندوفیت E_7 که دارای کمترین قدرت اثر بود برابری می‌کند. این مسئله حاکی از قدرتمندی و اثر بخشی فراوان اندوفیت‌های حاصل از این گیاه دارویی است.

در مطالعات متعدد صورت پذیرفته، فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی اندوفیت جدا شده از گونه‌های آویشن بر علیه پاتوژن‌های متفاوتی، مشاهده و ثبت شده است (Anžlovar *et al*., 2017, Mirzaei, Masumi, 2022).

در بررسی متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌های جدا شده از آویشن لردگان نتایج حاکی از آن است که به طور میانگین اندوفیت‌های گیاه آویشن اثر مهاری قوی‌تری بر علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به باکتری *شیگلا سونئی* از خود بروز داده‌اند. همچنین در مجموع عوامل ساختاری اندوفیت‌های جدا شده از ریشه، ساقه و برگ آویشن لردگان اثرمهاری قوی‌تری نسبت به متابولیت‌های ترشحی اندوفیت‌های باکتریایی برعلیه باکتری *شیگلا سوئنی* و قارچ نشانگر *کاندیدا آلبیکنس* دارند. در مجموع می‌توان گفت اندوفیت‌های گیاه آویشن دارای اثرات ضد میکروبی و مهار کنندگی مطلوبی بر علیه باکتری *شیگلا سونئی* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* هستند.

در بررسی‌هایی که بر روی عوامل ساختاری اندوفیت‌های باکتریایی آویشن لردگان و اثرات مهاری آنها بر علیه قارچ *کاندیدا آلبیکنس* صورت پذیرفت نیز اثر بخشی مطلوب این میکروارگانیسم‌ها به‌وضوح قابل مشاهده است. اندوفیت‌های E6 (۴۰/۵ mm) و E1 (۳۹ mm) بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد و اندوفیت E4 (۱۷ mm) کمترین میزان هاله عدم رشد را ایجاد کردند که این مهم بیانگر اثر بخشی مناسب اندوفیت‌های باکتریایی گیاه آویشن در مهار پاتوژن قارچی *کاندیدا آلبیکنس* است.

عصاره گیاهان دارویی حاوی انواع ترکیبات فنلی است که از رشد برخی میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند (Kebede *et al*., 2021). ترکیبات فیتوشیمیایی این گیاهان شامل آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و گلیکوزیدها به عنوان مکانیسم‌های دفاعی در برابر میکروب های مختلف عمل کرده و دارای فعالیت‌های ضدباکتری، ضدقارچی و ضدسرطانی هستند (Jabborova *et al*., 2019). تیمول و کارواکرول، دو جزء اصلی عصاره آویشن، در برابر برخی از پاتوژن‌ها همانند *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سوبتلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثرات مهاری مطلوبی را از خود بروز داده‌اند (Kachur, Suntres, 2020, Chaichi, 2021). در مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته، اثرات مهاری گیاه آویشن بر روی گستره متنوعی از باکتری‌های گرم مثبت تا گرم منفی گزارش شده است (Mollea *et al*., 2022).

بطور کلی مطالعات بسیار محدودی نسبت به اندوفیت‌های گیاه آویشن و خاصیت مهاری و آنتی‌میکروبی آنها صورت گرفته است. باکتری‌های اندوفیت به عنوان تولید کنندگان قدرتمند ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه با خاصیت ضد میکروبی شناخته

می‌شوند (Hardoim, 2019). در مطالعات پیشین، عموماً باکتری های گرم مثبت حساس‌تر از گرم منفی‌ها گزارش شده‌اند (Jalil *et al*., 2020). این در حالی است که پژوهش حاضر اثبات حساسیت باکتری شیگلا (که یک باکتری گرم منفی است) به اندوفیت‌های باکتریایی گیاه آویشن را آشکار می‌سازد. با توجه به این مهم، در موارد کلینیکی و درمانی، صنایع غذایی، بهداشتی و داروسازی با تکیه بر ساخت داروهای مناسب با منشاء گیاهی و عوارض کمتر دارویی می‌توان به درمان عفونت های ناشی از باکتری‌ها امیدوار بود.

به طور کلی گیاه آویشن علاوه بر مصارف و کاربردهای صنعتی، صنایع غذایی و بهداشتی می‌تواند به عنوان منابع ممکن برای موارد کلینیکی و درمانی، داروسازی و کنترل بیماری‌هایی همچون سرطان و بیماری‌هایی با منشاء باکتریایی یا قارچی به کار گرفته شود (Kowalczyk *et al*., 2020). با استناد به نتایج پژوهش‌های پیشین و مطالعه حاضر می‌توان گفت، گیاه دارویی آویشن می‌تواند به عنوان جایگزین مناسب داروهای شیمیایی به جهت درمان عفونت‌های کاندیدایی به ویژه کاندیدیازیس جلدی_مخاطی و همچنین در درمان شیگلوزیس مورد استفاده قرار گیرد.

در نهایت پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی، اندوفیت‌ها از لحاظ خواص بیوشیمیایی در صنعت داروسازی به جهت تولید داروهای جدید با عوارض جانبی کمتر و دسترسی بهتر مورد بررسی قرار گیرند و شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت و جداسازی آنان با روش‌های نوین طراحی و انجام گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش توسط دانشگاه شهرکرد پشتیبانی شده است. بدینوسیله از حمایت دانشگاه شهرکرد در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارضی در منافع گزارش نکردند.

منابع

- Abdelshafy Mohamad OA, Ma JB, Liu YH, Zhang D, Hua S, Bhute S, *et al*. (2020). Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum*. Frontiers In Plant Science, 11:47.
- Alajbeg I, Challacombe SJ, Holmstrup P, Jontell M. (2021). Red and white lesions of the oral mucosa. Burket's Oral Medicine, 30:85-138.
- Almirante B, Rodríguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, *et al*. (2005). Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. Journal of Clinical Microbiology, 43(4):1829-35.
- Aly AH, Debbab A, Proksch P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Applied Microbiology And Biotechnology, 90(6):1829-45.

- Anderson M, Sansonetti PJ, Marteyn BS. (2016). *Shigella* diversity and changing landscape: insights for the twenty-first century. Frontiers In Cellular And Infection Microbiology, 6:45.
- Anžlovar S, Likar M, Dolenc Koce J. (2017). Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. Acta Botanica Croatica, 76(1): 64-71.
- Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, *et al.* (2005). Seminational surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. Journal Of Clinical Microbiology, 43(9):4434-40.
- Arnold AE and Herre EA. (2003). Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in Theobroma cacao (Malvaceae). Mycologia, 95(3):388-98.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. Mycological Research, 105(12):1502.
- Arora D, Midha N, Ichhpujani R. (1982). Drug resistant shigellosis in north India. The Indian Journal Of Medical Research, 76:74-9.
- Atesh DA and Turgay O. (2003). Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. Turkish Journal of Biology, 27(3):157-62.
- Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, De Araújo WL. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal Of Biotechnology, 3(1):15-6.
- Azimpour S, Pourtaghi H. (2016). A case report of fungal diarrhea in a preweaned calf in Iran. International Journal Of Enteric Pathogens, 4(2):11-34199.
- Bandara W, Seneviratne G, Kulasooriya SA. (2006). Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. Journal Of Biosciences, 31(5):645-50.
- Bentley J, Romana LJ, Horton LL, McHargue CJ. (1991). Distribution and characterization of iron in implanted silicon carbide. MRS Online Proceedings Library, 235(1):363-8.
- Blanchard PC. (2012). Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea. Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 28(3):443-64.
- Blocker A, Gounon P, Larquet E, Niebuhr K, Cabiaux V, Parsot C, *et al*. (1999). The tripartite type III secreton of *Shigella flexneri* inserts IpaB and IpaC into host membranes. The Journal Of Cell Biology, 147(3):683-93.
- Borgers M, Degreef H, Cauwenbergh G. (2005). Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. Current Drug Targets, 6(8):849-62.
- Boucher H, Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. (1996). A novel group I intron in *Candida* dubliniensis is homologous to a *Candida albicans* intron. Gene, 180(1-2):189-96.
- Buchrieser C, Glaser P, Rusniok C, Nedjari H, d'Hauteville H, Kunst F, *et al*. (2000). The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. Molecular Microbiology, 38(4):760-71.
- Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal Of Food Microbiology, 94(3):223-53.
- Calderone RA, Braun PC. (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiological Reviews, 55(1):1-20.
- Calderone RA, Fonzi WA. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. Trends In Microbiology, 9(7):327-35.
- Carroll G. (1986). The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. Microbiology Of The Phyllosphere, 203 – 22.

- Cassone A. (2015). Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. BJOG: An International Journal Of Obstetrics And Gynaecology, 122(6):785-94.
- Castillo UF, Strobel GA, Mullenberg K, Condron MM, Teplow DB, Folgiano V, *et al*. (2006). Munumbicins E-4 and E-5: novel broad-spectrum antibiotics from Streptomyces NRRL 3052. FEMS Microbiology Letters, 255(2):296-300.
- Chaichi M, Mohammadi A, Badii F, Hashemi M. (2021). Triple synergistic essential oils prevent pathogenic and spoilage bacteria growth in the refrigerated chicken breast meat. Biocatalysis And Agricultural Biotechnology, 1;32:101926.
- Chen C, Bauske EM, Musson G, Rodriguezkabana R, Kloepper JW. (1995). Biological control of fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biological Control, 5(1):83-91.
- Chiou CS, Hsu WB, Wei HL, Chen JH. (2001). Molecular epidemiology of a *Shigella flexneri* outbreak in a mountainous township in Taiwan, Republic of China. Journal Of Clinical Microbiology, 39(3):1048-56.
- Christopher LG, Cieslak LT, Pavlin JA, Eitzen EM. (1997). Biological warfare: a historical perspective. Jama Network, 278(5):412-7.
- Farsiani H, Sasan MS. (2020). High rate of resistance to ceftriaxone and azithromycin among Shigella spp. isolates at three children's referral hospitals in Northeast Iran. Journal Of Infection And Chemotherapy, 26(9):955-8.
- Feng B, Shen H, Yang F, Yan J, Yang S, Gan N, *et al*. (2022). Efficient classification of *Escherichia coli* and *Shigella* using FT-IR spectroscopy and multivariate analysis. Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy, 279:121369.
- Hardoim PR. (2019). Biologically active compounds from bacterial endophytes. InEndophytes and secondary Metabolites. Springer, Cham, 3-31.
- Jabborova D, Davranov K, Egamberdieva D. (2019). Antibacterial, antifungal, and antiviral properties of medical plants. Medically Important Plant Biomes: Source of Secondary Metabolites, 51-65.
- Jalil MT, Hairudin NH, Ibrahim D. (2020). Muscodor sp. IBRL OS-94, A promising endophytic fungus of ocimum sanctum with antimicrobial activity. Pharmaceutical Sciences, 27(2):268-80.
- Kachur K, Suntres Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. Critical Reviews In Food Science And Nutrition, 60(18):3042-53.
- Kandasamy GD, Kathirvel P. (2022). Insights into bacterial endophytic diversity and isolation with a focus on their potential applications–A review. Microbiological Research, 13:127256.
- Kebede T, Gadisa E, Tufa A. (2021). Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. PLoS One, 16(3):0249253.
- Kong F, Wang J, Han R, Ji S, Yue J, Wang Y, *et al.* (2020). Antifungal activity of magnesium oxide nanoparticles: effect on the growth and key virulence factors of *Candida albicans*. Mycopathologia, 185(3):485-94.
- Kowalczyk A, Przychodna M, Sopata S, Bodalska A, Fecka I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. Molecules, 25(18):4125.
- 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.
- Mandal S, DebMandal M. (2016). Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In Essential oils in food preservation, flavor and safety . Academic Press, 1: 825-834.

- Mirzaei S, Masumi S. (2022). The antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Thymus* spp. Journal Of Medicinal Plants And By-product, 27.
- Mollea C, Bosco F, Fissore D. (2022). Agar plate methods for assessing the antibacterial activity of Thyme and oregano essential oils against *S.epidermidis* and *E.coli.* Antibiotics, 11(12):1809.
- Musa Z, Ma J, Egamberdieva D, Abdelshafy Mohamad OA, Abaydulla G, Liu Y, *et al*. (2020). Diversity and antimicrobial potential of cultivable endophytic actinobacteria associated with the medicinal plant *Thymus roseus*. Frontiers In Microbiology, 12;11:191.
- Nüesch-Inderbinen M, Stevens MJ, Cernela N, Müller A, Biggel M, Stephan R. (2021). Distribution of virulence factors, antimicrobial resistance genes and phylogenetic relatedness among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroup O91 from human infections. International Journal Of Medical Microbiology, 311(8):151541.
- Prasanth Reddy V, Ravi Vital K, Varsha PV, Satyam S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. Med Aromat Plants, 3(164):2167-0412.
- Qadri H, Shah AH, Andrabi SM, Alshehri B, Almilaibary A, Mir MA. (2022). Natural products and their semi-synthetic derivatives against antimicrobial-resistant human pathogenic bacteria and fungi. Saudi Journal Of Biological Sciences, 18:103376.
- Ratti RP, Serrano NF, Hokka CO, Sousa CP. (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(2):294-302.
- Sabour S, Azimi T, Nasser A, Hadi N, Mohsenzadeh A, Shariati A. (2022). A global overview of the most important zoonotic bacteria pathogens transmitted from Rattus norvegicus to humans in urban environments: Running title: Bacterial pathogens transmitted from wild rats to human. Infectious Medicine, 1(3):192-207.
- Shad AA, Shad WA. (2021). *Shigella sonnei*: virulence and antibiotic resistance. Archives Of Microbiology, 203(1):45-58.
- Sharma A, Malhotra B, Kharkwal H, Kulkarni GT, Kaushik N. (2020). Therapeutic agents from endophytes harbored in Asian medicinal plants. Phytochemistry Reviews, 19(3):691-720.
- Shoukat M, Ullah F, Tariq MN, Din G, Khadija B, Faryal R. (2023). Profiling of potential pathogenic *candida* species in obesity. Microbial Pathogenesis, 174:105894.
- Venugopal D, Husain K, Mustafa SA, Sabeen S. (2021). Epidemiology, risk factors and antimicrobial profile of vulvovaginal candidiasis (VVC): a study among women in the central region of Saudi Arabia. Journal Of Medical Mycology, 31(2):101049.
- Zachariah OH, Lizzy MA, Rose K, Angela MM. (2021). Multiple drug resistance of Campylobacter jejuni and *Shigella* isolated from diarrhoeic children at Kapsabet County referral hospital, Kenya. BMC Infectious Diseases, 21(1):1-8.
- Zhao F, Chen YP, Salmaki Y, Drew BT, Wilson TC, Scheen AC, *et al*. (2021). An updated tribal classification of *Lamiaceae* based on plastome phylogenomics. BMC Biology,19(1):1-27.