Applied Biology
Online ISSN: 2538-3434
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

Research article

# Isolation and identification of endophytic bacteria from alfalfa roots and their antimicrobial effects on human pathogens[1]

**Fatemeh Mangalian Shahrbabki** | Bachelor Student, Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran. ftima.man@yahoo.com
**Zahra Masoumalinejad** | Ph.D., Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran **(Corresponding author).** Zahra.masoumy6623@gmail.com

## Abstract

**Objectives:** alfalfa with the scientific name Medicago sativa is the most important fodder plant in Iran and many parts of the world. This plant is known as the queen of fodder plants due to its high nutritional value and the possibility of planting in different climates. The aim of the current research is to isolate and identify endophytic bacteria from alfalfa roots and investigate their antagonistic effects on human pathogenic bacteria.

**Materials and methods**: The sterilized alfalfa root pieces, after being crushed, were cultured in Tyoglycollate Broth and Muller Hinton Broth liquid culture media for enrichment. After liquid cultures, culture was done on Muller Hinton agar, eosin methylene blue and McConkey agar. Endophytic bacteria were identified by gram staining method and biochemical tests. The antagonistic activity of isolated bacteria was investigated by steric crossing and bilayer methods. From the bacteria with antagonistic effects, DNA extraction was performed and with the use of universal primer, 16SrRNA gene was amplified. The PCR product was sequenced and a phylogeny tree was drawn.

**Findings**: The results showed that alfalfa endophyte bacteria had antagonistic activity and finally, two endophytes were investigated in terms of molecular identity, which belonged to Enterobacter and Pseudomonas genera.

**Conclusions:** Based on the results, endophytic bacteria have a great diversity and significant antibacterial effects.

**Keywords:** Endophyte, Antibacterial properties, Endophytic bacteria, Alfalfa plant, Human pathogens.

1. **Received:** 2022/04/03 ; **Received in revised form:** 2022/05/08 ; **Accepted:** 2022/06/14 ; **Published online:** 2022/09/23
© the authors **Publisher:** Qom Islamic Azad University

پیولوژی کاربردی
شاپا الکترونیکی: ۳۴۳۴-۲۵۳۸
Homepage: http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir

مقاله پژوهشی

# جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت از ریشه گیاه یونجه و بررسی اثرات ضد میکروبی آنها بر پاتوژن‌های انسانی[1]

**فاطمه منگلیان شهربابکی** دانشجوی کارشناسی، گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران. ftima.man@yahoo.com
**زهرا معصومعلی‌نژاد** دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران (نویسنده مسئول). Zahra.masoumy6623@gmail.com

## چکیده

**هدف:** یونجه با نام علمی Medicago sativa مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای در ایران و بسیاری از نقاط جهان است. این گیاه به دلیل داشتن ارزش غذایی بالا و امکان کاشت در اقلیم‌های مختلف، به ملکه گیاهان علوفه‌ای مشهور است. هدف پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت از ریشه گیاه یونجه و بررسی اثرات آنتاگونیستی آنها بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است.

**مواد و روش‌ها:** قطعه‌های ریشه ضدعفونی شده گیاه یونجه پس از له شدن در محیط‌های کشت مایع تایوگلی کولات براث و مولر هینتون براث، جهت غنی‌سازی، کشت داده شدند. پس از کشت‌های مایع، بر روی محیط‌های کشت مولر هینتون آگار، ائوزین متیلن بلو و مک کانکی آگار کشت انجام شد. باکتری‌های اندوفیت با روش رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی، مورد شناسایی قرار گرفتند. فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های جدا شده به روش‌های استریک متقاطع و دولایه‌ای بررسی گردید. از باکتری‌های دارای اثرات آنتاگونیستی، استخراج DNA انجام شد و با کاربرد پرایمر یونیورسال، تکثیر ژن ۱۶SrRNA صورت پذیرفت. محصول PCR تعیین توالی شده و درخت فیلوژنی رسم گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد باکتری‌های اندوفیت یونجه دارای فعالیت آنتاگونیستی بودند و در نهایت دو اندوفیت از لحاظ هویت مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند که متعلق به جنس‌های انتروباکتر و سودوموناس بودند.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج حاصل، باکتری‌های اندوفیت دارای تنوع زیاد و اثرات قابل توجه ضد باکتریایی می‌باشند.

**کلیدواژه‌ها:** اندوفیت، خواص ضد باکتریایی، باکتری‌های اندوفیت، گیاه یونجه، پاتوژن‌های انسانی.

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۱/۱۴؛ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۲/۱۸؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۳/۲۴؛ **تاریخ انتشار:** ۱۴۰۱/۰۷/۰۱
© نویسندگان **ناشر:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

## ۱. مقدمه

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌هایی (شامل: باکتری‌ها، قارچ‌ها یا اکتینومیست‌ها) هستند که با داشتن تعاملات پیچیده‌ای شامل ارتباط همزیستی متقابل و آنتاگونیسمی، به صورت بین سلولی و/یا درون سلولی در بافت‌های گیاهی زندگی می‌کنند و به عنوان اجزای ضروری شبکه میکروبی گیاهی هستند (۱). به نظر می‌رسد باکتری‌های اندوفیت در اکثر گونه‌های گیاهی پراکنده شده و از ریشه‌ها، برگ‌ها و ساقه‌ها و تعداد کمی از گل‌ها، میوه‌ها و دانه‌ها جدا شده‌اند (۲). برخی از اندوفیت‌های معمول یافت شده متعلق به جنس‌های *Enterobacter sp.*، *Colletotrichum sp.*، *Phomopsis sp.*، *Phyllosticta sp.*، *Cladosporium sp.* و غیره هستند. جمعیت اندوفیت به شدت تحت تأثیر شرایط آب و هوایی و محل رشد گیاه میزبان قرار می‌گیرد (۳). فعل و انفعالات نزدیک بین گیاه و اندوفیت‌های باکتریایی منجر به سنتز طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه بالقوه توسط اندوفیت‌های باکتریایی می‌شود. این متابولیت‌های ثانویه، از گیاهان در برابر آفات حشرات، موجودات بیماری‌زا و همچنین گیاه‌خواران محافظت می‌کنند. مقدار زیادی از این متابولیت‌ها نه‌تنها برای گیاهان مفید هستند، بلکه برای انسان نیز اهمیت اقتصادی دارند (۴). اخیراً بسیاری از متابولیت‌های اندوفیتی شناخته شده‌اند که دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند آنتی‌بیوتیک، ضد ویروس، ضد سرطان، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان و غیره هستند (۵). علاوه بر این، آنتی بیوتیک‌های ساخته شده توسط اندوفیت‌ها ممکن است سمیّت سلولی را نسبت به ارگانیسم‌های بالاتر کاهش دهند؛ زیرا خود گیاه به عنوان یک سیستم انتخاب طبیعی عمل می‌کند. بنابراین، این یک پتانسیل بزرگ برای غربال کردن مواد ضد میکروبی جدید، بسیار فعال و با سمّیت کم از اندوفیت‌ها است (۶). آنها همچنین نقش مهمی در صنایع غذایی، تجزیه زیستی و زیست پالایی دارند (۷). بسیاری از مواد فعال بیولوژیکی که اندوفیت‌ها ترشح می‌کنند، برای ما نسبتاً جدید هستند. اثر مهارکنندگی محصولات طبیعی جدا شده از اندوفیت‌ها روی بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و تک یاخته‌ها مشاهده شده است که این مسئله امروزه یک حوزه تحقیقاتی گسترده است (۸). جستجوی نیچ‌های جدید برای میکروارگانیسم‌های اندوفیت مفید با فعالیت آنتاگونیستی در برابر پاتوژن‌های بیماری‌های عفونی انسانی و پاتوژن‌های گیاهی می‌تواند یک حوزه فعال برای تحقیقات آینده باشد (۵). اخیراً بسیاری از محققان و شرکت‌های داروسازی از رویکرد اتنوبوتانیکی برای دستیابی به

داروهای جدید از اندوفیت‌ها استفاده می‌کنند (۹). محققان مختلف جداسازی باکتری‌های اندوفیت را از گیاهان مختلف موجود در اکوسیستم‌های مختلف گزارش کرده‌اند (۱۰). یکی از گیاهان دارویی که دارای ارزش غذایی و دارویی بالایی است، یونجه می‌باشد.

یونجه با نام علمی Medicago sativa مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای در ایران و بسیاری از نقاط جهان است (۱۱). این گیاه به دلیل ویژگی‌های برتر متعدد مانند مقاومت به سرما، تحمل نمک، سازگاری گسترده، عملکرد بالا، کیفیت علف‌های خوب، مقاومت در برابر برش مکرر، ماندگاری خوب، بهبود خاک و سود اقتصادی، در حال حاضر بزرگ‌ترین سطح زیرکشت در جهان را دارد. بنابراین، به ملکه نباتات علوفه‌ای مشهور است (۱۲). این گیاه از دیرباز به طور سنّتی در اختلالات گوارشی و سیستم عصبی مرکزی و برای درمان سایر بیماری‌ها مانند دیابت، التهاب، عفونت میکروبی، آسم، سنگ‌های صفراوی و اختلالات کلیوی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). علی‌رغم اینکه ارزش غذایی یونجه به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است، اطلاعات محدودی در مورد اندوفیت‌های یونجه وجود دارد. تاکنون تحقیقاتی در مورد اثر بازدارندگی اندوفیت‌های یونجه و گیاهان مختلف بر عوامل بیماری‌زای (باکتریایی و قارچی) گیاهی انجام شده است، اما در ایران تحقیق و گزارشی مبنی بر اثر آنتاگونیستی اندوفیت‌های یونجه بر پاتوژن‌های انسانی یافت نشد است. هدف پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت از ریشه گیاه یونجه و بررسی اثرات آنتاگونیستی آنها بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است.

## ۲. مواد و روش کار

نمونه‌های تازه از گیاه یونجه[1] در بهار سال ۱۴۰۱ به‌طور تصادفی از مزارع واقع در جاده سیرجان-بافت جمع‌آوری شد و بلافاصله نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان منتقل شدند. جنس و گونه این گیاه به وسیلهٔ بخش گیاه‌شناسی تأیید شد. ابتدا ریشه‌های جدا شده گیاه کاملاً با آب مقطر شستشو شدند، سپس تحت شرایط استریل به ترتیب در نرمال سالین به مدت ۵ دقیقه، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه و مجدداً در نرمال سالین به مدت ۵ دقیقه جهت ضد عفونی کردن قرار داده شدند. برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت، ریشه‌ها به وسیلهٔ تیغ اسکالپل در پلیت استریل خرد شدند.

1. Medicago sativa

محیط کشت‌هایی که به منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت ریشه یونجه مورد استفاده قرار گرفتند، عبارتند از محیط تایوگلی کولات براث، محیط مولر هینتون براث، محیط مولر هینتون آگار، محیط ائوزین متیلن بلو و محیط مک کانکی آگار. محیط کشت‌های تایوگلی کولات براث حاوی ریشه گیاه یونجه درون انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از یک روز، رشد کلنی‌های باکتری‌ها درون لوله مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده نتیجه مثبت از کشت مایع، کشت خالص به روش استریک (سه شعله) بر روی محیط‌های مولر هینتون براث، مولر هینتون آگار، ائوزین متیلن بلو و مک کانکی آگار انجام شد. مورفولوژی کلنی خالص شدهٔ 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.

باسیلوس سرئوس ATCC11778، سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 و اشریشیا کلی ATCC 25922 به عنوان سویه استاندارد از مرکز پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان دریافت شدند. آزمایشات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی برای تأیید سویه‌های تهیه شده انجام شد.

## ۳. بررسی خواص آنتاگونیستی جدایه‌های اندوفیت

### ۳-۱. روش دو لایه‌ای

از هر پاتوژن، غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. از هر یک از باکتری‌های اندوفیت جدا شده، یک کلنی بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت نقطه‌ای با نیدل استریل کشت داده شد و درون انکوباتور۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت، رشد کلنی‌های باکتریایی بر روی محیط‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مرحله بعد ۰/۱ سی سی از پاتوژن‌ها که به غلظت ۰/۵ مک فارلند رسیده بودند، با سمپلر استریل برداشته شد و به محیط نوترینت براث نیمه جامد ۰/۷ درصد اضافه شدند. محیط‌ها توسط ورتکس مخلوط شدند تا نمونه باکتری با محیط کاملاً ممزوج گردیده و بعد از مخلوط شدن، با آرامی در سطح محیط، بر روی پلیت‌های حاوی باکتری‌های اندوفیت ریخته شدند. در نهایت پس از پخش یکنواخت محیط حاوی باکتری و انعقاد، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از مدت زمان طی شده، فعالیت ضد میکروبی هر باکتری با اندازه‌گیری هاله شفاف و عدم رشد اطراف هر کلنی باکتری مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

### ۳-۲. روش چمنی

از پاتوژن‌ها، غلظت ۰/۵ مک فارلند تهیه شد. سپس به کمک سوآپ استریل از پاتوژن‌های رشد یافته بر روی محیط مولر هینتون آگار به صورت خطوط رفت و برگشت کشت یکنواخت انجام شد و محیط را تقریباً با زاویه ۶۰ درجه چرخانده و ۲ بار دیگر عمل کشت انجام گردید، به طوری که کل سطح پلیت آغشته به پاتوژن گردید. سپس با سوآپ استریل از کلنی باکتری‌های اندوفیت برداشته شد و به صورت نقطه‌ای مستقیماً بر روی کشت یکنواخت قرار داده شد. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از مدت زمان طی شده، فعالیت ضد میکروبی هر باکتری با اندازه‌گیری هاله شفاف و عدم رشد اطراف هر کلنی باکتری مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

### ۳-۳. روش تست متقاطع

برای ارزیابی این تست، ابتدا کلنی باکتری‌های اندوفیت بر روی محیط مولر هینتون آگار در امتداد قطر پلیت کشت قطور داده شدند. سپس در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. سپس باکتری‌های پاتوژن درون محیط مولر هینتون براث کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از رشد ۲۴ ساعته، غلظت ۰/۵ مک فارلند از پاتوژن‌ها تهیه شد. بعد از زمان طی شده، پاتوژن‌ها به صورت عمود بر رشد اندوفیت‌ها بر روی پلیت، کشت نازک داده شدند و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از مدت زمان طی شده، فعالیت ضد میکروبی هر باکتری اندوفیت مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی سویه برتر با خاصیت آنتاگونیستی، جدایه‌های باکتریایی برای آزمایش‌های کاتالاز و اکسیداز، رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

## ٤. انجام آزمایشات مولکولی

استخراج ژنوم باکتری‌های اندوفیت ریشه یونجه که دارای خواص آنتاگونیستی بر پاتوژن‌های انسانی داشتند، با استفاده از کیت سینا ژن با شماره DN 8115C در آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان انجام شد.

برای انجام واکنش PCR ابتدا مخلوط اصلی طبق جدول (۱) آماده گردید. پس از افزودن اجزای PCR و آماده شدن نمونه‌ها، تیوپ‌ها در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی و زمانی زیر قرار داده شد: واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به

مدت ۳ ثانیه، اتصال پرایمر دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش اولیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه. مرحله نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در این تحقیق برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای اختصاصی ساخته شده توسط شرکت سیناژن استفاده شد. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول (۲) ارائه شده است.

**جدول ۱- مقادیر مواد به‌کار رفته در واکنش PCR**

| مخلوط pcr | حجم (ml) |
|---|---|
| PCR buffer | ۲/۵ |
| dNTP | ۰/۵ |
| Forward primer | ۱ |
| Reverse primer | ۱ |
| Taq polymerase | ۰/۲ |
| $Mgcl_2$ solution | ۰/۷۵ |
| DNA | ۲ |
| $dH_2o$ | ۱۷ |
| Total | ۲۵ |

**جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن۱۶ S rRNA و شناسایی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از یونجه (۱۱)**

| | |
|---|---|
| MO f (10f)[u] | 5'AGTTTGATCATGGCTCAGATTG3' |
| MO r (1507r) | 5'TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG3' |

برای بررسی محصول PCR تکثیر شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد که با بافر TBE ساخته و با سایبر رنگ‌آمیزی شده بود، استفاده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز، ژل در دستگاه UVITEC – Documentation GEL تصویربرداری شده و مورد بررسی قرار گرفت.

## ۵. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

نتایج تعیین ترادف اندوفیت‌ها، با فرمت الکتروگرام کروماس، با استفاده از نرم‌افزار کروماس ورژن ۱/۴۱ مورد بررسی قرار گرفت. سپس توالی نهایی با سایر توالی‌های باکتریایی موجود در بانک جهانی ژن[1] مقایسه شد. برای ترسیم درخت فیلوژنیکی، برنامه MEGA 5.1 مورد استفاده

1. NCBI Gen bank

قرار گرفت.

## ٦. نتایج

به منظور یافتن جدایه‌های اندوفیت باکتریایی ریشه یونجه، در مجموع تعداد ۶۱ باکتری مختلف اندوفیت ایزوله و به نام En نام‌گذاری شدند (شکل ۱).

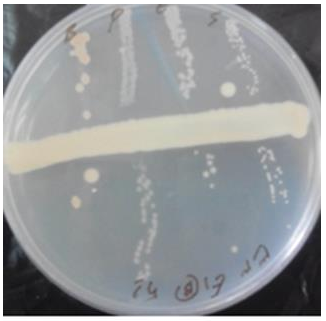
**شکل ۱- رشد باکتری‌های اندوفیت به روش کشت سه شعله**

۹ نماینده از بین ۶۱ جدایه اندوفیت که کلنی‌های متفاوتی روی محیط ائوزین متیلن بلو و مک کانکی داشتند، انتخاب و برای آزمون‌های بیوشیمیایی، فنوتیپی و مولکولی استفاده شدند. براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی، اغلب جنس‌های اندوفیت*Pseudomonas sp* و *Enterobacter sp*. تشخیص داده شد.

باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی نسبت به مواد ترشحی باکتری‌های اندوفیت جدا شده، حساسیت نشان دادند و از بین ۹ باکتری،۲ باکتری دارای اثر ضد میکروبی بودند که در اطراف اندوفیت، هاله عدم رشد دیده شد.

**جدول ۳- نتایج حاصل از اثر آنتاگونیستی اندوفیت‌ها**
**(اعداد جدول قطر هاله ممانعت از رشد را برحسب میلی متر نشان می‌دهد)**

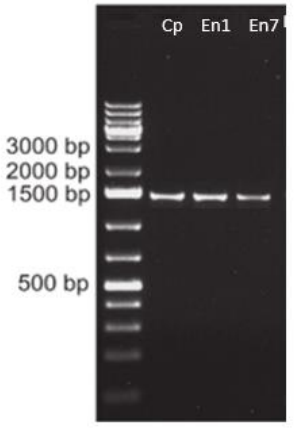
| پاتوژن / اندوفیت | اشرشیا کلی | سودوموناس آئروژینوزا | استرپتوکوکوس پیوژنتز |
|---|---|---|---|
| **En1** | ۱۵ | ۳۲ | ۱۷ |
| **En7** | ۲۰ | ۲۰ | **۵** |



**شکل ۲- خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های اندوفیت گیاه یونجه به روش تست متقاطع**

### ٦-١. نتیجه PCR

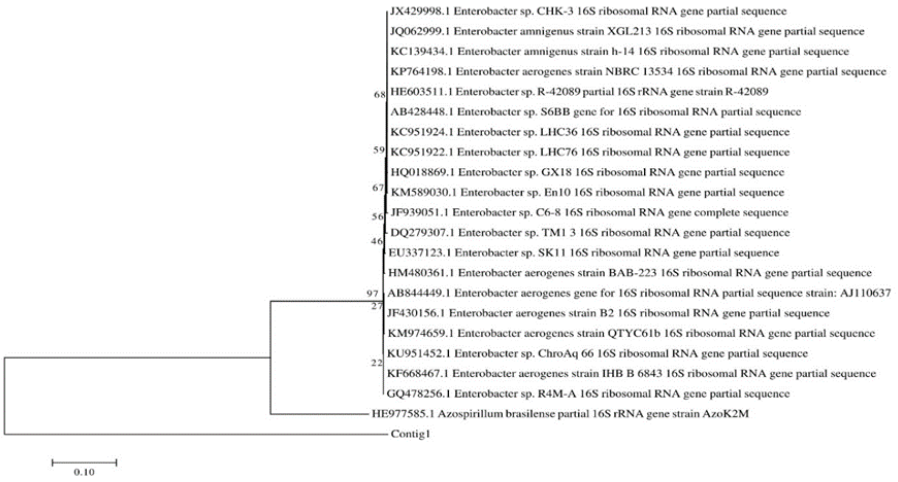
انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با آغازگر یونیورسال تکثیر ژن ۱۶SrRNA موجب تشکیل باندهایی تقریباً به اندازه ۱۵۰۰جفت باز از جدایه‌های En1 و En7 روی ژل آگارز شد.



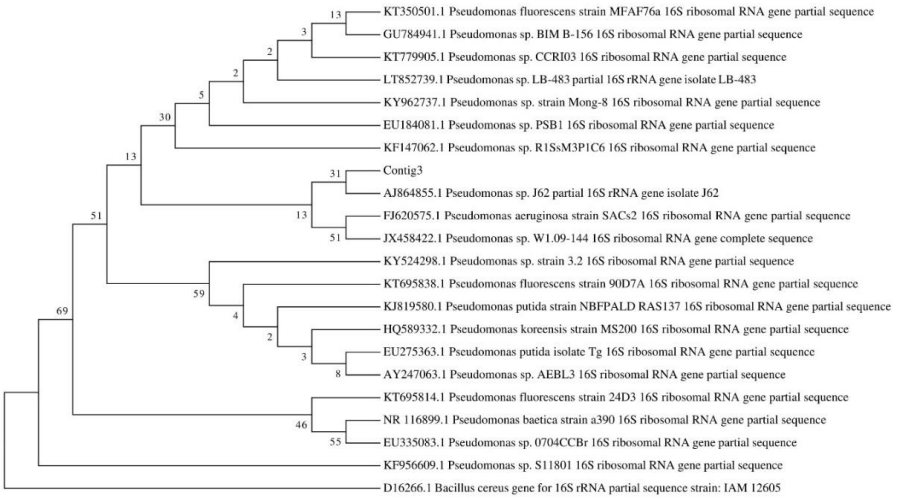

**شکل ۳- نتیجه PCR با آغازگر عمومی. از سمت چپ به راست:**
**مارکر، کنترل مثبت، نمونه En1، نمونه En7**

### ٦-٢. رسم درخت فیلوژنیک

بعد از تکثیر و توالی‌یابی برای بررسی ساختار فیلوژنیک، دو جدایه En1 و En7 از نرم‌افزار MEGA 5.1 استفاده شد. پس از مقایسه توالی نهایی با سایر توالی‌های باکتریایی موجود در بانک جهانی ژن (NCBI Gen bank) مشخص گردید که جدایه En1 مربوط به Enterobacter sp.LHC76 و جدایه En7 مربوط به Pseudomonas sp. B10 بود.




**شکل ٤- درخت فیلوژنتیکی مربوط به باکتری اندوفیت شماره یک**




**شکل ٥- درخت فیلوژنتیکی مربوط به باکتری اندوفیت شماره هفت**

## ۷. بحث

در سال‌های اخیر توجه زیادی به اندوفیت‌ها به عنوان عوامل کنترل زیستی شده است. به طور کلی، اندوفیت‌های جدا شده از گیاهان عمدتاً برای اهداف درمانی استفاده می‌شوند؛ زیرا ممکن است حاوی بسیاری از ترکیبات شیمیایی فعال زیستی باشند و با خاصیت آنتی باکتریال، نقش عمده‌ای در فعالیت‌های درمانی ایفا می‌کنند (۵). چندین مطالعه نشان داده است که طیف

گسترده‌ای از باکتری‌های اندوفیت را می‌توان از قسمت‌های گیاهی مانند برگ، ساقه و ریشه جدا کرد (۲). در این تحقیق باکتری‌های اندوفیت از ریشه گیاه یونجه جداسازی شد که در مجموع تعداد ۶۱ باکتری مختلف اندوفیت ایزوله شدند. براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی اغلب آنها به عنوان جنس‌های Pseudomonas sp و .Enterobacter sp تشخیص داده شدند. تاکنون مطالعات گوناگونی جهت بررسی اندوفیت‌های قارچی گیاهان مختلف انجام شده است (۱۳). اما برای این آزمایش قارچ‌های اندوفیت مورد بررسی قرار نگرفتند؛ زیرا این تحقیق با هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اندوفیت انجام شد.

گزارش‌های متعددی در گذشته، تنوع باکتری‌های اندوفیت را در گیاهان دارویی مورد مطالعه قرار دادند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که جامعه باکتریایی اندوفیت جدا شده از گیاه Plectranthus tenuiflorus شامل .Paenibacillus sp، Bacillus megaterium و .Pseudomonas sp بودند (۱۴). همچنین در گذشته باکتری‌های اسینتوباکتر، باسیلوس و سودوموناس به عنوان اندوفیت در گیاه دارویی اکیناسه شناسایی شده‌اند، در حالی که Bacillus pumilus، Bacillus subtilis، Bacillus megaterium، Pseudomonas mendocina به عنوان اندوفیت از ریشه گیاه دارویی Chlorophytum borivilianum جدا شدند (۱۵). Bacillus licheniformis در گیاه Jacaranda decurrens شناسایی شده است (۱۶).

تحقیقات مختلف نشان داده است که جمعیت اندوفیت از گیاهی به گیاه دیگر و از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است. در یک گونه نه‌تنها از منطقه‌ای به منطقه دیگر متفاوت است، بلکه با تغییر شرایط آب و هوایی همان منطقه نیز متفاوت است (۱۳). گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد که جمعیت باکتری‌های اندوفیت در گیاهان وحشی که در بیابان رشد می‌کنند، کمتر از سطح متوسط اندوفیت‌ها در گیاهان زراعی است (۱۷). تفاوت اصلی نتایج این تحقیق با تحقیقات قبلی در نوع گیاه و محل جمع‌آوری آن می‌باشد. همچنین کلید اصلی موفقیت در جداسازی و مطالعه اندوفیت‌ها، اطمینان از استریل بودن سطح گیاه است. تنوع باکتری‌های اندوفیت جدا شده نیز تا حد زیادی به روش‌های جداسازی وابسته بود. گزارش شده است که میزان استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده و روش استریلیزاسیون بر تنوع اندوفیت‌های جدا شده تأثیر می‌گذارد (۱۸). باکتری‌های اندوفیت یکی از منابع بالقوه واجد ترکیبات ضد باکتریایی می‌باشند (۸). در تحقیق حاضر از بین ۶۱ جدایه اندوفیت، ۹ جدایه که کلنی‌های متفاوتی روی محیط انوزین متیلن بلو و مک کانکی داشتند، انتخاب و برای بررسی اثر آنتاگونیستی علیه چهار باکتری پاتوژن اشرشیا کلی،

سودوموناس آنروژینوزا و استرپتوکوکوس پیوژنز در سطح آزمایشگاه بررسی شدند که توانایی آنتاگونیستی این جدایه‌ها با استفاده از روش کشت دولایه و متقاطع و چمنی به اثبات رسید.

فعالیت آنتاگونیستی گزارش شده در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی موجود در اندوفیت‌ها باشد. توانایی ایجاد هاله بازدارندگی به علت مکانیسم آنتی بیوز این اندوفیت‌ها بوده و از مهم‌ترین ترکیبات دخیل در آنتی بیوز آنزیم‌ها و آنتی بیوتیک‌ها هستند که با اثر بر روی دیواره باکتری‌های پاتوژن از رشد آنها جلوگیری می‌کنند (۶). قابل ذکر است که تاکنون هیچ‌کدام از باکتری‌های اندوفیت مورد استفاده در این آزمایش توسط محققین دیگر برای کنترل پاتوژن‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار نگرفته و نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج حاصل از بکارگیری گونه‌های متفاوت مقایسه شد.

Ashitha و همکاران (۲۰۱۹)، با مطالعه اندوفیت‌ها از یک گیاه دارویی سنتی در نیلاگیریکا نشان دادند که دو اندوفیت باکتریایی کروموباکتریوم ویولاسئوم سویه WVAT6 و Burkholderia sp. سویه WYAT دارای خاصیت ضد باکتریایی در برابر پاتوژن‌های انسانی هستند (۱۹).

Ei Mon Myo و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت آنتاگونیستی اندوفیت‌های باکتریایی گیاهان دارویی میانمار را مورد بررسی قرار دادند. آنها عنوان کردند که یک اندوفیت از Catharanthus roseus و دو جدایه باکتری ایزوله شده از Boscia variabilis Collett & Hemsl. (Capparaceae) نه‌تنها دارای فعالیت ضد باکتریایی نسبت به باکتری‌های بیماری‌زای انسانی بودند، بلکه فعالیت ضد قارچی در برابر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نیز داشتند (۲۰).

El-Deeb و همکاران در مطالعه‌ای تنوع و ویژگی‌های مفید میکروارگانیسم‌های اندوفیت در گیاه دارویی Plectranthus tenuiflorus را بررسی کردند. نتایج تحقیق نشان داد که از بین اندوفیت‌های جدا شده، بیشترین جدایه‌هایی که فعالیت آنزیمی خارج سلولی از خود نشان دادند، متعلق به جنس باسیلوس بود. این اندوفیت‌ها فعالیت‌های ضد میکروبی قابل‌توجهی علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، پروتئوس میرابیلیس و کاندیدا آلبیکنس) نشان دادند (۱۴).

Arora و Kaur اثرات ضد میکروبی اندوفیت‌های Moringa oleifera را بر روی چندین میکروارگانیسم بررسی کردند و استافیلوکوکوس اورئوس به اکثر آنها حساسیت نشان داد (۲۱).

مقایسه نتایج گزارش شده در مورد خواص ضد میکربی اندوفیت‌ها بسیار مشکل است. از

دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های بررسی خاصیت ضد میکربی و تفاوت سویه‌های میکروبی کار شده اشاره کرد. قبلاً گزارش شده بود که باکتری‌های اندوفیت آنتی‌بیوتیک‌هایی تولید می‌کنند که می‌توانند علیه باکتری‌های بیماری‌زای انسانی عمل کنند. بنابراین، اندوفیت‌ها می‌توانند منبع خوبی برای تولید صنعتی آنتی بیوتیک‌ها باشند (۹). با پیشرفت‌های اخیر در بیوتکنولوژی، مطالعات بیشتری در سطح مولکولی با اندوفیت‌ها انجام می‌شود که شامل مطالعات متاژنومیک، استفاده از نشانگرهای مولکولی، شبیه‌سازی مولکولی و مطالعات بیان ژنتیکی است. با توسعه زیست‌شناسی مولکولی، تجزیه و تحلیل توالی DNA برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود (۱۳) که در این تحقیق از آغازگر یونیورسال برای تکثیر ژن ۱۶ SrRNA استفاده شد. ثابت شده است که بررسی‌های مولکولی منبع ارزشمندی از شواهد برای حل و فصل روابط فیلوژنتیکی در سطوح پایین‌تر، مانند جنس‌ها یا گونه‌ها است (۱۴). در مطالعه حاضر بعد از تکثیر و توالی‌یابی برای بررسی ساختار فیلوژنیک دو جدایه En1 و En7 از نرم‌افزار MEGA 5.1 استفاده شد. پس از مقایسه توالی نهایی با سایر توالی‌های باکتریایی موجود در بانک جهانی ژن مشخص گردید که جدایه En1 مربوط به Enterobacter sp.LHC76 و جدایه En7 مربوط به Pseudomonas sp. B10 بود. با توجه به مصرف گسترده گیاهان دارویی و رویکرد جدید علم پزشکی به طب سنّتی و نظر به اثرات مضر و جانبی داروها و ترکیبات شیمیایی و پیدایش مقاومت‌های دارویی، امروز شاهد تحقیقات گسترده‌ای در داخل و خارج از کشور با اهداف مختلف بر گیاهان دارویی می‌باشیم (۸). تمام مشاهدات در این مطالعه نشان داد که گیاه یونجه منبع اندوفیت‌های باکتریایی متعددی است که می‌تواند ترکیبات فعال زیستی با خواص ضد باکتریایی تولید کند. در نتیجه، باکتری‌های اندوفیت جدا شده، فعالیت ضد میکروبی قوی نسبت به میکروب‌های بیماری‌زا نشان دادند و می‌توان از آنها در پزشکی و کشاورزی نیز استفاده کرد. در سال‌های اخیر به لطف روش‌های ساده‌تر جداسازی و شناسایی و ابزارهای فعلی زیست‌شناسی مولکولی، علاقه زیادی در میان محققان در مطالعات پیرامون میکروارگانیسم‌های اندوفیت دیده شده است. بسیاری از ترکیبات زیست فعال مفید برای داروسازی، محیط زیست، کشاورزی و صنایع، توسط اندوفیت‌ها تولید می‌شوند. به دلیل اهمیت زیاد آنها برای گیاهان/انسان/محیط زیست، در حال حاضر دانشمندان شروع به بهره‌برداری بسیار از آنها برای ترکیبات جدیدتر و نقش‌های جدیدتر برای محیط زیست و انسان کرده‌اند.

## ۸. نتیجه‌گیری

کنترل بیولوژیکی یا استفاده از میکروارگانیسم‌ها و ترشحات آنها برای پیشگیری از بیماری‌ها به طور فزاینده‌ای به روش بدون اثرات مضرّ جایگزین کنترل‌های شیمیایی تبدیل شده است. استفاده از ابزارهای نوآورانه بیوتکنولوژیکی، به تقویت درک فعل و انفعالات گیاه و اندوفیت، تولید ترکیبات زیست فعال جدید، افزایش رشد در گیاهان و بهبود فعالیت کنترل زیستی کمک می‌کند. با در نظر گرفتن همه این موارد، قطعاً اندوفیت‌ها یک موهبت بوده و به چندین روش ممکن تأثیر خوبی بر گیاهان، محیط زیست و همچنین انسان گذاشته‌اند.

## ۹. تشکر و قدردانی

محققان پژوهش حاضر از همکاری‌های معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان و همکاران بخش آزمایشگاه میکروب‌شناسی، کمال تشکر را دارند.

## References


1. Tiwari P, Kang S & Bae H. Plant-endophyte associations: Rich yet under-explored sources of novel bioactive molecules and applications. *Microbiological Research*. 2022; Oct 17: 127241.
2. Strobel G. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. *Journal of Fungi*. 2018; 4(2): 57.
3. Yadav G & Meena M. Bioprospecting of endophytes in medicinal plants of Thar Desert: An attractive resource for biopharmaceuticals. *Biotechnology Reports.* 2021; 30: e00629.
4. Del Carmen Orozco-Mosqueda M & Santoyo G. Plant-microbial endophytes interactions: scrutinizing their beneficial mechanisms from genomic explorations. *Current Plant Biology*. 2021; 25: 100189.
5. Harshitha K, Nair AR & Pillai PP. Overview of bioactive metabolite (s) produced by endophytes and future perspectives on epigenetic modification/regulation of cryptic biosynthetic pathways. *Phytochemistry Letters.* 2023; 53: 116-31.
6. Gao H, Li G & Lou HX. Structural diversity and biological activities of novel secondary metabolites from endophytes. *Molecules*. 2018; 23(3): 646.
7. Sharma P & Kumar S. Bioremediation of heavy metals from industrial effluents by endophytes and their metabolic activity: Recent advances. *Bioresource Technology*. 2021; 339: 125589.
8. Tanvir R, Javeed A & Bajwa AG. Endophyte bioprospecting in South Asian medicinal plants: an attractive resource for biopharmaceuticals. *Applied microbiology and biotechnology.* 2017; 101(5): 1831-44.
9. Pasrija P, Girdhar M, Kumar M, Arora S & Katyal A. Endophytes: an unexplored treasure to combat Multidrug resistance. *Phytomedicine Plus*. 2022: 100249.
10. Toghueo RM & Boyom FF. Endophytes from ethno-pharmacological plants: Sources of novel antioxidants-A systematic review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.* 2019; 22: 101430.
11. Omidi Nasab M & Khodakaramian G. Inhibitation of alfalfa endophytic bacteria against Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus causal agent of wilt disease in in vitro and greenhouse conditions. *BioControl in Plant Protection*. 2017; 5(1): 1-3.
12. Hawkins C & Yu LX. Recent progress in alfalfa (Medicago sativa L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal*. 2018; 6(6): 565-75.
13. Attia EZ, Farouk HM, Abdelmohsen UR & Mo'men H. Antimicrobial and extracellular oxidative enzyme activities of endophytic fungi isolated from alfalfa (Medicago sativa) assisted by metabolic profiling. *South African Journal of Botany*. 2020; 134: 156-62.
14. El-Deeb B, Fayez K & Gherbawy Y. Isolation and characterization of endophytic bacteria from Plectranthus tenuiflorus medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal of plant interactions.* 2013; 8(1): 56-64.
15. Chowdhary K & Kaushik N. Biodiversity and In vitro inhibition study of fungal endophytes

of Chlorophytum borivilianum against selected phytopathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 2019; 89(1): 113-21.

16. Carrim A, Ribeiro ID, Araújo MV, Oliveira B & Vieira JD. Atividade antimicrobiana de bactérias endofíticas isoladas de Jacaranda decurrens Cham (carobinha-do-campo). *Enciclopédia Biosfera*. 2016; 13(23).
17. López JL, Alvarez F, Príncipe A, Salas ME, Lozano MJ, Draghi WO, Jofré E & Lagares A. Isolation, taxonomic analysis, and phenotypic characterization of bacterial endophytes present in alfalfa (Medicago sativa) seeds. *Journal of biotechnology*. 2018; 267: 55-62.
18. Hawkins C & Yu LX. Recent progress in alfalfa (Medicago sativa L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal*. 2018; 6(6): 565-75.
19. Ashitha A, Midhun SJ, Sunil MA, Nithin TU, Radhakrishnan EK & Mathew J. Bacterial endophytes from Artemisia nilagirica (Clarke) Pamp., with antibacterial efficacy against human pathogens. *Microbial pathogenesis.* 2019; 135: 103624.
20. Myo EM, Maung CE, Mya KM & Khai AA. Characterization of bacterial endophytes from Myanmar medicinal plants for antimicrobial activity against human and plant pathogens. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020; 56.
21. Kaur N & Arora DS. Prospecting the antimicrobial and antibiofilm potential of Chaetomium globosum an endophytic fungus from Moringa oleifera. *AMB Express.* 2020; 10(1): 1-3.