Journal of Food Hygiene, Vol. 9, No. 35, Autumn 2019

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2019.669288**

Biochemical and antimicrobial properties of bacterial endophytes isolated from yarrow (*Achillea millefolium*) and tragacanth (*Astragalus gossypinus*) in Fars geographical regions

Erjaee, Z.[1], Shekarforoush, S.S.[2], Hosseinzadeh, S.[2*]

1. Ph.D. student of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Professor of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
[*]Corresponding Author: hosseinzadeh@shirazu.ac.ir
(Received: 2018/7/1 Accepted: 2019/9/8)

Abstract

Yarrow (*Achillea millefolium*) and tragacanth (*Astragalus gossypinus*) are medicinal plants in the Middle East that have been used for medical purposes. The presence of endophytic bacteria in the medicinal plants has been recently focused by many researchers. Endophytes are bacteria and fungi in the inner parts of the plant tissues which in addition to their benefits for the plants, contain effective bioactive compounds. In this research, endophytic bacteria were isolated from yarrow and tragacanth. Their antifungal and antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATTC 35218), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (PTCC 1163) and *Aspergillus niger* (PTCC 5154) were assessed using disk diffusion method. Bacteria having antimicrobial activity were further identified by 16S rDNA, biochemical characteristics and enzyme activities. The bacteria isolated from yarrow and tragacanth were found as *Bacillus safensis* and *Bacillus pumilus*, respectively. These isolates showed inhibitory effects against the tested fungi. *B. safensis* could ferment D- glucose, sucrose, mannitol, and lactose. The activities of oxidase, catalase, gelatinase, protease, and amylase enzymes were also investigated. *B. pumilus* could only ferment D-glucose and represented the activities of oxidase, catalase, and amylase.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Endophytic bacteria, Yarrow, Tragacanth, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*

«مقاله پژوهشی» DOI:10.30495/JFH.2019.669288

خصوصیات بیوشیمیایی و ضدمیکروبی باکتری‌های اندوفیتی جدا شده از بومادران (*Achillea millefolium*) و کتیرا (*Astraglus gossypinus*) مناطق جغرافیایی استان فارس

زهرا ارجائی[۱]، سید شهرام شکرفروش[۲]، سعید حسین‌زاده[۲*]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲. استاد بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: hosseinzadeh@shirazu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۷/٤/۱۰ پذیرش نهایی: ۹۸/٦/۱۷)

چکیده

گیاهان دارویی بومادران (*Achillea millefolium*) و کتیرا (*Astraglus gossypinus*) به‌علت خواص درمانی متعدد در منطقه خاورمیانه مورد استفاده قرار می‌گیرد. حضور میکروب‌های اندوفیت در گیاهان دارویی در سال‌های اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. اندوفیت‌ها باکتری‌ها و کپک‌هایی هستند که درون بافت گیاهان حضور دارند و علاوه بر فوایدی که برای گیاه دارند حاوی ترکیبات زیست‌فعال مؤثری می‌باشند. در این تحقیق باکتری‌های اندوفیت از گیاهان دارویی بومادران و کتیرا جداسازی شدند. اثر ضدباکتریایی و ضدکپکی آن‌ها با روش انتشار دیسکی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538)، *اشریشیا کولای* (ATTC 35218)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028)، *لیستریا مونوسیتوجنز* (PTCC 1163) و *آسپرژیلوس نایجر* (PTCC 5154) مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌هایی که اثر ضدمیکروبی داشتند از طریق تعیین توالی ژن 16S rDNA، خصوصیات بیوشیمیایی و آنزیمی مورد شناسایی دقیق‌تر قرار گرفت. باکتری‌های جداسازی شده از گیاه بومادران و کتیرا به‌ترتیب *باسیلوس سافینیس* و *باسیلوس پومیلوس* بودند که اثر مهاری روی کپک مورد آزمایش را داشتند. *باسیلوس سافینیس* توانایی تخمیر قندهای گلوکز، ساکاروز، لاکتوز و مانیتول را داشت. در حالی‌که *باسیلوس پومیلوس* جداسازی شده از گیاه کتیرا تنها گلوکز را تخمیر کرد و دارای آنزیم‌های اکسیداز، کاتالاز و آمیلاز بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری اندوفیت، کتیرا، بومادران، *باسیلوس سافینس*، *باسیلوس پومیلوس*

مقدمه

در طب سنتی برای درمـان بسـیاری از عفونـت‌هـا و بیمـاری‌هـا از گیاهـان دارویـی اسـتفاده مـی‌شـود. اثـر ضدباکتریایی و ضدقارچی عصاره و اسانس این گیاهـان در بسیاری از تحقیقات به اثبـات رسـیده اسـت. وجـود ترکیبات فنلـی، فلاونوئیـدها، آلکالوئیـدها، تـانن و فنـل کربونیک اسید موجود در آن‌ها تـأثیر مهمـی در از بـین بردن باکتری‌های بیماری‌زا و قارچ‌های مولد فساد دارنـد (Issabeagloo and Abri, 2012; Delgado *et al*., 2004). از طرفـی مصـرف بـی‌رویـه مـواد نگـه‌دارنـده شیمیایی برای از بین بردن قارچ‌ها و بـاکتری‌هـا، باعـث بروز مشـکلاتی از جملـه افـزایش وقـوع مقاومـت‌هـای باکتریایی و قارچی شده است. ضمن ایـن‌کـه باقیمانـده این مواد سنتزی در مواد غـذایی باعـث ایجـاد عـوارض جانبی مانند حساسیت‌ها و یا بروز سرطان‌های مختلفـی در انسان شده است. لذا در سال‌های اخیر جستجو برای ترکیبات سالم و طبیعی با قابلیت افزایش دوره نگه‌داری مواد غذایی مورد توجـه قـرار گرفتـه اسـت. اسـتفاده از ترکیبات زیست‌فعال و نگه‌دارنده‌های بیولـوژیکی گـامی در جهت حل این معضل می‌باشد (Liu *et al*., 2001).

گیاه بومـادارن (*Achillea milleforlium*) یـک گیـاه دارویی از خانواده آستراسه است. عصاره ایـن گیـاه اثـر ضـدمیکروبی بـر روی *سـالمونلا تیفـی‌موریـوم* (*Salmonella* Typhimurium) و *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* (*Staphylococcus aureus*) داشـته اسـت (Lakshmi *et al*., 2011). اسانس بومادران اثـر مهـاری بـر روی بـاکتری‌هـای *اشریشـیا کولـای* (*Escherichia coli*)، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس لیچینـی‌فـورمیس* و *سودوموناس آیروجینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) نشان داده است (Ghaderi *et al*., 2012). هم‌چنـین اثـر مهاری چشم‌گیری بر قارچ‌های *رایزوپوس اسـتولونیفایر* (*Rizophus stolonifer*)، *بـوترتیس سـینریا* (*Botrytis cinerea*) و *آسـپرژیلوس نـایجر* (*Aspergillus niger*) داشته است (El-Kalamouni *et al*., 2017).

جنس *آستراگالوس* (*Astragalus*) دارای ۱۵۰۰ گونه بوده و یک گیاه بوته‌ای کوتاه می‌باشد (Frodin, 2004). عصـاره اتـانولی و متـانولی ایـن گیـاه حـاوی ترکیبـات فلاونوئیدی، آلکالوئیدها، سوپانین و ترپنوئیدی است کـه اثـر مهـاری بـر *اشریشـیا کولـای*، *سـالمونلا*، *شـیگلا* و *کمپیلوباکتر* دارد (Balachandar *et al*., 2012). اسـانس استخراج شده از گـل، سـاقه و بـرگ *آسـتراگالوس* اثـر ضدمیکروبی و ضدقارچی قابل ملاحظه‌ای را نشـان داده است (Iskender *et al*., 2013).

در سال‌های اخیر علاوه بر این‌که اثر ترکیبات گیاهـان دارویی مورد مطالعـه قـرار گرفتـه اسـت، بـاکتری‌هـای اندوفیت موجود در گیاهان دارویی هم مورد توجه واقع شده‌اند. اندوفیت‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌هایی هستند که در داخل لایه‌های سلول‌های اپیدرمال ریشه، سـاقه و بـرگ اغلب گیاهـان حضـور داشـته و در فیزیولـوژی گیاهـان نقـش بـه‌سـزایی دارنـد (Stone *et al*., 2000). ایـن میکروارگانیسم‌ها متابولیت‌های متنوع با خواص مختلفی را ترشح می‌کنند که از آن جمله مـی‌تـوان بـه خاصـیت ضدمیکروبی و ضـدقارچی برخـی از آن‌هـا اشـاره کـرد (Storbel and Daisy, 2003).

تحقیقات نشان می‌دهد که ۳۰۰ هزار گونه گیاهی بـر روی کره زمین وجود دارد که هرکـدام میزبـان یـک یـا چنـد انـدوفیت مـی‌باشـند. رابطـه فیزیکـی دقیـق بـین اندوفیت‌ها و گیاهان هنوز کاملاً شناخته شده نیست ولی

احتمال انتقال مواد ژنتیکی از گیاه به میکروب‌های اندوفیتی مطرح می‌باشد (Stierle *et al*., 1993). حتی برخی میکرواورگانیسم‌های اندوفیت، متابولیت‌های ثانویه مشابه گیاهی که از آن منشأ می‌گیرند را تولید می‌کنند. از جمله این ترکیبات ضدمیکروبی شناخته شده می‌توان به آلیفاتیک‌ها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، پپتیدها، فنل‌ها، کینون، استروئیدها و تروپنوئیدها، اشاره نمود (Yu *et al*., 2010).

حضور باکتری‌ها و کپک‌های اندوفیت در گیاه بومادران در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است. برای مثال چهار گونه مختلف کپک از گونه گیاه کتیرا جداسازی شد (Ma *et al*., 2014). در مناطق غرب کشمیر، ۹ کپک اندوفیتی از قسمت‌های مختلف گیاه بومادران جداسازی شدند. این کپک‌ها اثر ضدباکتریایی قوی بر *باسیلوس سابتیلیس*، *سودوموناس آیروجینوزا*، *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *پروتئوس ولگاریس* (*Proteus vulgaris*) و *کلبسیلا نمونیا* (*Klebsiella pneumonia*) داشتند. در عصاره اتیل استات متابولیت این قارچ‌ها حضور ترکیبات آلکالوئید، فلاوونوئید، ساپونین، فنل، ترپنوئید و استروئید را نشان داده‌اند (Satari *et al*., 2016). این ترکیبات شیمیایی در عصاره گیاه بومادران هم یافت شده است (Lakshmi *et al*., 2011). در تحقیقی از برگ گیاه بومادارن باکتری استافیلوکوکوس جداسازی شد. عصاره این باکتری هیچ اثر ضدقارچی و ضدمیکروبی نشان نداد (Beiranvand *et al*., 2017). در مطالعه دیگری ۸ گونه کپک و ۵ گونه باسیلوس اندوفیتی از چندین گیاه دارویی مناطق مختلف چهارمحال بختیاری جداسازی شد. این اندوفیت‌ها دارای اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی و کپک‌های بیماری‌زای گیاهی بودند (Ebrahimi *et al*., 2010).

با توجه به اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی باکتری‌های اندوفیت و گیاهان مرتبط با آن‌ها می‌توان از این ترکیبات در صنایع دارویی و غذایی استفاده بهینه نمود. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی دقیق‌تر باکتری‌های دارای اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی موجود در گیاه بومادران و کتیرا در مناطق استان فارس بود.

مواد و روش‌ها

- جمع‌آوری نمونه‌های گیاهان و جداسازی باکتری‌های اندوفیت

از فروردین تا شهریور ۱۳۹۵، گیاه بومادران از مناطق سپیدان، کوه بمو، بیضا و اطراف دریاچه مهارلو در استان فارس جمع‌آوری گردید. برای جلوگیری از آلودگی‌های محیطی حاصل از گردوخاک، ابتدا نمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد و محلول سدیم هیدرو کلرید ۲ درصد ضدعفونی شدند. بدین منظور، ابتدا قسمت‌های مختلف گیاه (شامل گل، ساقه و برگ) با آب مقطر دوبار تقطیر شستشو و سپس به‌مدت ۳۰ تا ٦٠ ثانیه در محلول اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور گردید، در مرحله بعد، گل، ساقه و برگ به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۲ درصد قرار گرفت و پس از آبکشی، مجدداً به‌مدت ۳۰ ثانیه در محلول اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور گردید و در پایان با آب مقطر دوبار تقطیر آبکشی شدند. برای کشت گل، برگ و ساقه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در دستگاه همگن‌ساز (IKA homogenizer, D1 18B, Germany)، یکنواخت شد و مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه به‌صورت سطحی در

محیط تریپتیک سوی آگار (Triptose Soy Agar) (Merk, Germany) حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آکریفلاوین (Sigma, USA) و ۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر آمفوتریسین B (CIPLA LTD, India) کشت داده شدند. محیط‌ها به‌مدت ۲ هفته در گرمخانه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. کلنی‌های ظاهر شده بر روی سطح محیط کشت خالص‌سازی گردید و جهت آزمون‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Costa *et al*., 2012). برای اطمینان از نحوه استریل کردن نمونه‌های گیاهی، از آب حاصل از آخرین شست و شوی نمونه‌های گیاه سالم نیز کشت تهیه شد.

- بررسی اثر ضدمیکروبی باکتری‌های جداسازی شده

در این مطالعه از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 6538)، *اشریشیا کولای* (ATTC 35218)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028)، *لیستریا آیروجینوزا* (PTCC 1163) و *آسپرژیلوس نایجر* (PTCC 5154) استفاده شد. باکتری‌ها و کپک مورد نظر از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. جهت بررسی خواص ضدباکتریایی متابولیت‌های ترشحی باکتری‌های اندوفیت از روش سنجش زیستی اندود کردن با آگار (Overlay bioassay) استفاده شد. در این روش ابتدا ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه باکتری در محیط تریپتیک سوی براث در وسط پلیت حاوی محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار (Brain Heart Infusion Agar) نقطه‌گذاری شد. پس از گرمخانه‌گذاری به‌مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، به‌منظور از بین بردن باکتری، کاغذ صافی آغشته به کلروفرم را داخل پلیت قرار داده و به‌حالت وارونه و با درب بسته به‌مدت ۲۰ دقیقه در زیر هود آزمایشگاهی قرار داده شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون با غلظت 10^8 cfu/ml از باکتری مورد چالش را به ۹۹ میلی‌لیتر محیط نیمه جامد تریپتیک سوی براث استریل حاوی ۰/۷ درصد آگار اضافه و همگن شد و مقدار ۵ میلی‌لیتر آن به‌صورت یک‌لایه نازک به‌آرامی بر روی کلونی باکتری اندوفیت کشته شده، ریخته شد. محیط‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. میزان ممانعت از رشد باکتری با اندازه‌گیری قطر هاله تولید شده اطراف کلنی کشته شده باکتری اندوفیت بررسی شد. برای بررسی اثر ضدقارچی، سوسپانسیونی از اسپور کپک مورد نظر به‌میزان 10^4 spore/ml تهیه و ۱ میلی‌لیتر از آن به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت نیمه جامد مذاب استریل سابورود دکستروز براث (Sabouraude Dextrose Broth) (با دمای ٤٥ درجه سیلسیوس) اضافه شد و به‌آرامی روی باکتری ریخته شد. پس از سرد شدن، پلیت به‌مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. میزان ممانعت باکتری از رشد کپک با اندازه‌گیری قطر هاله تولید شده، محاسبه گردید (Kivanc *et al*., 2014).

- شناسایی باکتری‌های اندوفیتی با روش PCR

در این مطالعه از روش PCR و شناسایی ژن‌های 16S rDNA، به‌عنوان توالی هدف برای ردیابی و شناسایی دقیق‌تر باکتری‌های اندوفیت که محتویات آن‌ها اثر ضدمیکروبی داشتند، استفاده شد. پرایمرهای یونیورسال با توالی پرایمر پیشرو 5'GAGAGTTTGATCCTGGCTAG-3' و پرایمر پس‌رو 'CGGTGTGTACSSGGCCCGGGAACG-3–'

استفاده گردید. این پرایمرها برای شناسایی جنس‌های مختلف باکتری‌های اندوفیت شامل گرم مثبت (با G+C بالا و پایین)، پروتئوباکتریا و باکتروئیدها به‌کار می‌روند (Costa *et al*., 2012).

استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت (Bioneer, Korea) انجام شد و درنهایت با استفاده از اسپکتروفتومتر (Nanodrop Technologies, USA) ANG100، غلظت DNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس PCR طبق برنامه‌ریزی انجام شد.

برای انجام PCR از ۲۵ میکرولیتر محلول که حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲۵ میلی‌مولار)، ۱ واحد Taq DNA پلیمراز، ۱ میکرولیتر (۲۵ Pmol) از هرکدام از پرایمرهای G_1 و G_2 و ۵۰ نانوگرم ازDNA الگو بود، استفاده شد. دناتوره کردن اولیه به‌مدت ٤ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس، ۳۰ چرخه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه دناتوره شدن (Denaturation)، دمای ٦۳ درجه سلسیوس برای یک دقیقه واسرشت (Annealing) و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه جهت گسترش اولیه (Extention) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ دقیقه انجام گردید. محصولات روش PCR بر اساس اندازه باند در ژل آگارز ۱/۵ درصد به‌همراه اتیدیوم بروماید الکتروفورز شدند و پس از رنگ‌آمیزی، زیر نورUV بررسی شدند. جدایه‌های تأیید شده در انتها سکانس شده و با مقایسه با داده‌های موجود در بانک اطلاعات ژنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (Costa *et al*., 2012).

- بررسی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌های شناسایی شده

جهت بررسی بیشتر خصوصیات باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده، علاوه بر رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های تخمیر قند (گلوکز، مالتوز، ساکاروز و لاکتوز)، آزمون کاتالاز و آزمون اکسیداز نیز صورت گرفت.

- بررسی توانایی تولید آنزیم‌های مختلف توسط باکتری‌های اندوفیت شناسایی شده

توانایی تولید آنزیم‌های پروتئاز، ژلاتیناز، پکتیناز و آمیلاز توسط باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آمیلازی این باکتری‌ها با استفاده از محیط استارچ آگار (Starch Agar) (Merk, Germany) صورت گرفت. پس از رشد باکتری در این محیط، با استفاده از محلول ۱ درصد ید، هاله شفاف اطراف کلنی‌ها حاکی از وجود آنزیم آمیلاز بود (Hankin and Anagnostakis, 1975). جهت بررسی آزمون پروتئازی، از محیط کشت میلک آگار (Milk Agar) (Merk, Germany) استفاده شد، حضور هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری، وجود آنزیم‌های پروتئازی را تأیید می‌کرد (Castro *et al*., 2014). از محیط آگار ژلاتین برای بررسی وجود آنزیم ژلاتیناز استفاده شد. پس از ٤۸ ساعت مایع شدن ژلاتین موجود در محیط کشت نشانه حضور آنزیم مذکور بود (Balan *et al*., 2012). آزمون آنزیم پکتیناز با استفاده از محیط کشت حاوی ۷ گرم بر لیتر K_2HPO_4، ۲ گرم بر لیتر KH_2PO_4، ۱ گرم بر لیتر $(NH_4)_2SO_4$، ۱ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۱/۵ گرم بر لیتر آگار، ۰/٦ گرم بر لیتر عصاره مخمر (Yeast extract)، ۳ گرم بر لیتر پکتین که

pH آن روی ۷ تنظیم شده بود، صورت گرفت (Sakiyama *et al.*, 2001). وجود هاله روشن اطراف کلنی باکتری نشان دهنده حضور آنزیم پکتیناز بود.

یافته‌ها

- جداسازی باکتری اندوفیت و بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها

تعداد ٤ باکتری از گیاه بومادران و ۷ باکتری از گیاه کتیرا جداسازی شدند. هیچ‌کدام از باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده اثر ضدباکتریایی نداشتند ولی ٤ جدایه اندوفیت بومادران و ٤ جدایه اندوفیت کتیرا اثر مهاری بر روی کپک مورد آزمایش را داشتند. جدول (۱) اندازه قطر هاله شفاف تولید شده را در این باکتری‌ها نشان می‌دهد.

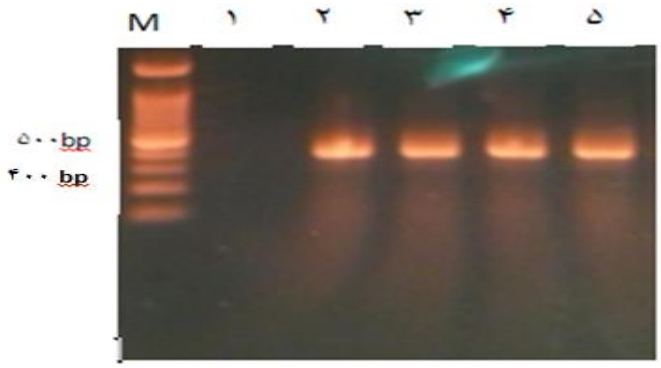
جدول (۱)- میانگین (± انحراف معیار) اندازه قطر هاله شفاف برحسب میلی‌متر به‌وسیله اندوفیت‌های جداسازی شده از گیاه بومادران و کتیرا بر روی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در کپک‌های مورد آزمایش

کد جدایه	نوع میکروارگانیسم				
	سالمونلا تیفی‌موریوم	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*اشریشیا کولای*	*لیستریا مونوسیتوجنز*	*آسپرژیلوس نایجر*
Bo1	-	–	-	-	۰/۰±۵/۰
Bo2	–	–	–	–	۵/۰±۰/۵
Bo3	–	–	–	–	۵/۰±۰/۵
Bo4	–	–	–	–	٤/۰±۰/۵
Kt1	–	–	–	–	۵/۰±۰/۵
Kt2	–	–	–	–	۵/۰±۰/۰
Kt3	–	–	–	–	٤/۵±۰/۵
Kt4	–	–	–	–	۵/۰±۰/۵
Kt5	–	–	–	–	–
Kt6	–	–	–	–	–
Kt7	–	–	–	–	–

(–) فاقد اثر مهاری می‌باشد.

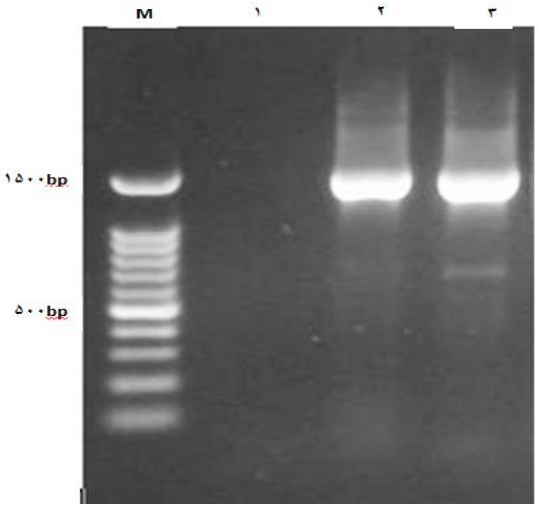
- شناسایی باکتری‌های اندوفیت ضد قارچی

آنالیز توالی ژن 16S rDNA نتایج حاصل از PCR نشان دهنده اندازه ٤۰۰ جفت بازی در ٤ باکتری جداسازی شده اندوفیت گیاه بومادران بود (شکل ۱). با بررسی سکانس ژنی جدایه‌ها و مقایسه با بانک اطلاعات ژنی (NCBI) دارای ۱۰۰ درصد مشابهت با *باسیلوس سافینوس* (*B. safensis*) بودند.



شکل (۱)- محصول PCR نمونه باکتری‌های انـدوفیت در ژل الکترفـورز آگـارز ۱/۷ درصـد؛ M: مـارکر ۱۰۰ جفـت بـاز؛ ۱: نمونـه کنتـرل منفـی؛ ۲: نمونـه اندوفیت1Bo؛ ۳: نمونه اندوفیت Bo2؛ ٤: نمونه3Bo؛ ٥: نمونه اندوفیت Bo4.

در شکل (۲) اندازه ۱۵۰۰ جفت بـازی آنـالیز تـوالی ژن 16S rDNA نتـایج حاصـل از PCR در ٤ جدایـه باکتری اندوفیت کتیرا که دارای اثـر ضـدقارچی بودنـد، نشان داده شده است که با بررسی سکانس ژنی آن‌هـا و مقایسـه بـا بانـک اطلاعـات ژنـی دارای ۱۰۰ درصـد مشابهت بـا *باسـیلوس پومیلـوس* (*B. pumilus*) بودنـد (جدول ۲).



شکل (۲)- محصول PCR باکتری‌های اندوفیت در ژل الکترفورز آگارز ۱/۷ درصد؛ M: مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ ۱: نمونه کنترل منفی؛ ۲: نمونه اندوفیت1Kt؛ ۳: نمونه اندوفیت Kt2.

جدول (۲)- اطلاعات ژنتیکی مربوط به اندوفیت‌های مورد مطالعه

گونه اندوفیت	کد دسترسی در بانک اطلاعات ژنی	درصد مشابهت
باسیلوس سافینوس	KY820897.1	۱۰۰
باسیلوس پومیلوس	KY820898.1	۱۰۰

- خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده

خصوصیات بیوشیمیایی دو باکتری جداسازی شده از گیاه بومادران و کتیرا در جدول (۳) آورده شده است.

این دو باکتری ازلحاظ شکل، وجود آنزیم کاتالاز و اکسیداز باهم شباهت داشتند اما در تخمیر قندها متفاوت عمل کردند.

جدول (۳)- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های اندوفیت

ویژگی	***باسیلوس سافینوس***	*باسیلوس* ***پومیلوس***
رنگ‌آمیزی گرم	+	+
شکل	میله‌ای	میله‌ای
متحرک بودن	-	-
کاتلاز	+	+
اکسیداز	+	+
تخمیر گلوکز	+	+
تخمیر ساکاروز	+	-
تخمیر مانیتول	+	-
تخمیر لاکتوز	+	-

(+) مثبت؛ (-) منفی

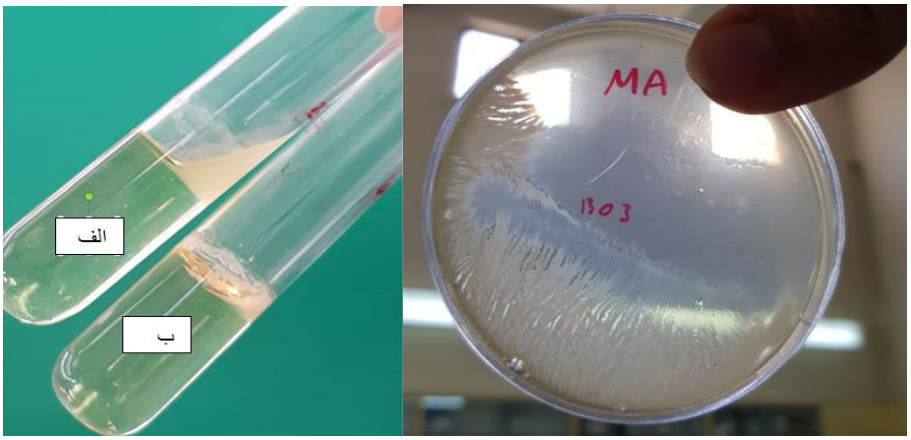
- آنزیم‌های موجود در باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده

چنانچه در جدول (۳) ملاحظه می‌شود هر چهار جدایه اندوفیت *باسیلوس سافینوس* موجب هیدرولیز ژلاتین شدند. در حالی‌که جدایه *باسیلوس پومیلوس* نتوانست ژلاتین را هیدرولیز کند. در ضمن هر دو باکتری فوق توانایی هیدرولیز نشاسته و *باسیلوس سافینوس* توانایی پروتئازی داشت (شکل ٤). از میان چهار آنزیم مورد آزمایش، *باسیلوس سافینوس* تنها از نظر آنزیم پکتیناز منفی بود (جدول ٤).

جدول (٤)- آنزیم‌های موجود در دو باکتری اندوفیت *باسیلوس سافینوس* و *باسیلوس پومیلوس*

کد جدایه	آنزیم‌ها			
	ژلاتیناز	آمیلاز	پروتئاز	پکتیناز
Bo1	+	+	+	−
Bo2	+	+	+	−
Bo3	+	+	+	−
Bo4	+	+	+	−
Kt1	−	+	−	−
Kt2	−	+	−	−
Kt3	−	+	−	−
Kt4	−	+	−	−

+، مثبت؛ − منفی



شکل (٤)- شکل راست محیط میلک آگار که توسط باکتری اندوفیت *باسیلوس سافینوس* هیدرولیز شده است؛ شکل چپ محیط استارچ آگار پس از اضافه شدن ید که توسط هر دو باکتری *باسیلوس* هیدرولیز شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات مختلف در ایران وجود اندوفیت‌های مختلف را در گیاهان نشان دادند. در استان همدان وجود ۹۵ جدایه کپک و مخمر در چندگونه گیاه بابونه گزارش شده است (Masumi *et al.*, 2015). در یک مطالعه دیگر، ۲۳ گونه باکتری اندوفیت از گیاهان گوناگون در مناطق مختلف ایران جمع آوری شد (Beiranvand *et al.*, 2017).

جداسازی گونه *باسیلوس سافینوس* و *باسیلوس پومیلوس* از گیاه بومادران و کتیرا منطقه فارس برای اولین بار در گزارش حاضر قطعی شده است. با توجه به منطقه نیمه‌خشک محل رویش گیاه در این استان، احتمال حضور باکتری‌های اسپوردار باسیلوس بیشتر

می‌باشد. گونه انـدوفیتی باسـیلوس در مطالعـات منطقـه خاورمیانه بیش‌ترین گزارش‌ها را به خود اختصاص داده اسـت (Masumi *et al*., 2015). بـا توجـه بـه ایـن‌کـه نمونه‌های غیراندوفیتی از خاک منشأ گرفته‌اند (Reza *et al*., 2014) می‌توان چنـین نتیجـه‌گیـری نمـود کـه ایـن باکتری از طریق خاک و ریشـه بـه گیـاه راه پیـدا کـرده است.

باکتری‌های جداشده مانند اکثر باسیلوس‌ها کاتالـاز و اکسیداز مثبت می‌باشند. هر دو این بـاکتری قنـد گلـوکز مثبت هستند ولی در تخمیر سایر قنـدها متفـاوت عمـل می‌کنند. خصوصیات بیوشیمیایی این دو باکتری مشابه با باکتری‌های غیراندوفیتی هم گونه خود بودنـد (Satomi *et al*., 2006; Parvathi *et al*., 2009). گونه *باسـیلوس سافینوس* از میوه تـاژین (*Nephelium lappaceum L.*) اسـتخراج شـده اسـت (Suhandono *et al*., 2016). *باسـیلوس سـافینوس* جـدا شـده از گیـاه کادامبـا (*Anthocephalus kadamba*) دارای اثـر ضـدمیکروبی روی باکتری *سـودوموناس* بـوده اسـت (Kakade and Chaphalkar, 2017). درحالی‌که *باسـیلوس سـافینوس* حاصـل از گیـاه هفت‌بنـد (*Polyganum caspidatum*) هیچ اثـر مهـاری بـر *کلبسـیلا نومونیـا*، *اسـتافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای* و *باسـیلوس سـابتیلوس* نشـان نـداد ولـی علیـه کپـک‌هـای *آسـپرژیلوس نـایجر* و *آسپرژیلوس فومیگیتوس* مؤثر بـود (Sun *et al*., 2013). اثر مهاری *باسیلوس سافینوس* استخراج شـده از نیشـکر (*Saccharum aooicinarum*) روی *فوزاریـوم سـاکاری* (*F. Sacchari*)، مشـهود بـود. حضـور ژن‌هـای ضدمیکروبی دو باکتریوسـین باسیلیسـین (bacilysin) و فنجیسین (fengycin) در اندوفیت *باسـیلوس سـافینوس* نیز به اثبـات رسـیده اسـت (Castro *et al*., 2014). اثـر ضدقارچی *باسیلوس پومیلـوس* بـه‌عنـوان انـدوفیت در گزارش‌ها آمده است. این باکتری نسبت بـه کپـک‌هـای *آلترناریـا آلترناتـا* (*Alternaria alternata*) و *فوزاریـوم سولانی* (*F. solani*) دارای مقاومت بیش‌تری بـوده و در محیط ۸ درصد نمک قادر به رشد بوده است. *باسـیلوس پومیلـوس* اسـتخراج شـده از کـاهوی چینـی اثـر ضدمیکروبی روی *سالمونلا*، *لیستریا* و *اسـتافیلوکوکوس اوروس* و اثـر ضـدقارچی بـر *ریزوکتونیـا سـولانی* (*Rhizoctonia solani*) و *فوزاریـوم اکسیسـپوریوم* (*F. oxysporum*) داشـت (Haque *et al*., 2015). ترکیـب ضـدقارچی Pumilacidin نیـز از انـدوفیت *باسـیلوس پومیلوس* اسـتخراج شـده اسـت (Melo *et al*., 2009). تنوع تحقیقات ثابت می‌کنـد کـه گیـاه مـورد بررسـی و منطقه جغرافیایی به دلیل شرایط اقلیمی متفاوت می‌تواند بر خصوصیات ضدباکتریایی و ضدقارچی بـاکتری‌هـای انـدوفیتی مـؤثر باشـد. چنانچـه در ایـن تحقیـق اثـر ضدقارچی *باسیلوس سـافینوس* و *باسـیلوس پومیلـوس* مشـخص بـود ولـی هـیچ اثـر ضـدباکتریایی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مشاهده نگردید.

در تحقیق حاضر تولید آنزیم‌هـای پروتئـاز، آمیلـاز و ژلاتیناز توسط برخی اندوفیت‌های جدا شـده نیـز تأییـد گردید. *باسیلوس سافینوس* جدا شده از گیاهـان منـاطق استوایی برزیل حاوی آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، استراز و لیپاز بوده است (Castro *et al*., 2014). وجود آنزیم‌های پروتئـاز، لیپـاز، آمیلـاز، سـلولاز، اسـتراز و پکتینـاز در *باسیلوس پومیلوس* اندوفیتی جـدا شـده از *پلکترانتـوس آمبنیکاس* (*Plectranthus amboinicus*) تأیید شد (El-Deeb *et al*., 2013). در حالی‌که عدم وجود پروتئـاز و

استراز در گونه دیگر اندوفیت *باسیلوس پومیلوس* در جنگل‌های استوایی برزیل نشانه تنوع خصوصیات آنزیمی در باکتری‌های اندوفیت می‌باشد (Castro *et al.*, 2014). در هیچ‌یک از تحقیقات انجام شده وجود آنزیم پکتیناز در *باسیلوس سافینوس* تأیید نگردیده است و از این حیث با یافته‌های مطالعه اخیر هم‌خوانی دارد.

نتایج بررسی حاضر نشان داد که اندوفیت‌های مورد مطالعه دارای پتانسیل تولید آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و ژلاتیناز را دارند. در ضمن اثر ضدقارچی آن‌ها نیز قابل‌ملاحظه بود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کارکنان بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز به‌خصوص سرکار خانم یونسیان کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی، صمیمانه قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Balachandar, S., Jagadeeswari, M., Dhanabalan, R. and Meenachi, M. (2012). Antimicrobial activity of *Astragalus membranaceus* against diarrheal bacterial pathogens. International Journal of Pharmacy. 2(2): 416-418.
- Balan, S.S., Nethaji, R., Sankar, S. and Jayalakshmi, S. (2012). Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2(3): S1811-S1816.
- Beiranvand, M., Amin, M., Hashemi-Shahraki, A., Romani, B., Yaghoubi, S. and Sadeghi, P. (2017). Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran. Iranian Journal of Microbiology. 9(1): 11-18.
- Castro, R.A., Quecine, M.C., Lacava, P.T., Batista, B.D., Luvizotto, D.M., Marcon, J. *et al*., (2014). Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. Springer Plus. 3(1): 382-391.
- Costa, L., Queiroz, M., Borges, A., Moraes, C. and Araújo, E. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Brazilian Journal of Microbiology. 43(4): 1562-1575.
- Delgado, B., Palop, A., Fernandez, P.S. and Periago, P.M. (2004). Combined effect of thymol and cymene to control the growth of *Bacillus cereus* vegetative cells. European Food Research Technology. 218(2): 188-193.
- Ebrahimi, A., Asgharian, S. and Habibian, S. (2010). Antimicrobial activities of isolated endophytes from some Iranian native medicinal plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 6(3): 217-22.
- 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.
- El-Kalamouni, C., Venskutonis, P.R., Zebib, B., Merah, O., Raynaud, C. and Talou, T. (2017). Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil of *Achillea millefolium* L. grown in France. Medicines. 4(2): 30-39.
- Frodin, D.G. (2004). History and concepts of big plant genera. Taxon. 53(3): 753-776.

- Ghaderi, S., Flahati, H.A., Serayolo, M. and Ghanbari, V. (2012). Investigating compounds and antibacterial effect of essential oil of three plants of coriander, yarrow and dill under laboratory conditions. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 14(5): 72-74. [In Persian]
- Hankin, L. and Anagnostakis, S.L. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, 67(3): 597–607.
- Haque, M.A., Lee, J.H. and Cho, K.M. (2015). Endophytic bacterial diversity in Korean kimchi made of Chinese cabbage leaves and their antimicrobial activity against pathogens. Food Control, 56: 24-33.
- Iskender, N.Y., Kahriman, N., Tosun, G., Terzioglu, S., Karaoglu, S.A. and Yayli, N. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the aerial parts of *Astragalus hamzaoglui* extracted by hydrodistillation and microwave distillation. Records of Natural Products. 7(3): 177-187.
- Issabeagloo, E. and Abri, B. (2012). Antimicrobial effects of yarrow (*Achillea millefolium*) essential oils against *Staphylococcus* species. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 6(41): 2895-2899.
- Kakade, P.D. and Chaphalkar, S.R. (2017). Isolation and purification of antibacterial peptide from *Bacillus safensis*, endophytica bacteria from *Anthocephalus kadamba*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 6(1): 504-511.
- Kivanc, M., Kivanc, S.A. and Pektas, S. (2014). Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against fungi. Journal of Food Processing Technology. 5(310): 2-4.
- Lakshmi, T., Geetha, R.V., Roy, A. and Kumar, S.A. (2011). Yarrow (*Achillea millefolium linn*). A herbal medicinal plant with broad therapeutic use-A review. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 9(2): 136-141.
- Liu, Ch., Lou, X.W., Lu, H. and Tan, R.H. (2001). Antifungal activity of *Artemisia anna* endophyte cultures against phytopathogenic Fungi. Journal of Biotechnology. 88: 277-282.
- Ma, W., Liu, X., Jiao, J., Zhang, L., Ren, W., Ma, L. *et al*. (2014). Purification of four strains of endophytic fungi from *Astragalus* and their optimized liquid fermentations. Journal of Forestry Research. 25(3): 701-706.
- Masumi, S., Mirzaei, S., Zafari, D. and Kalvandi, R. (2015). Isolation, identification and biodiversity of endophytic fungi of *Thymus*. Progress in Biological Sciences. 5(1): 43-50.
- Melo, F.M.P.D., Fiore, M.F., Moraes, L.A.B.D., Silva-Stenico, M.E., Scramin, S., Teixeira, M.D.A. *et al*. (2009). Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIIM4A. Scientia Agricola. 66(5): 583-592.
- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N. and Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. Brazilian Journal of Microbiology. 40(2): 269-275.
- Reza, K.M., Ashrafalsadat, N., Reza, R.M., Taher, N. and Ali, N. (2014). Isolation and molecular identification of extracellular lipase-producing *Bacillus* species from soil. Annals of Biological Research. 5: 132–139.
- Sakiyama, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Borges, A.C. and Silva, D.O. (2001). Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. Letters in Applied Microbiology. 33(2): 117-121.
- Satari, A.H., Zargar, M.I., Dharne, M. and Bansal, R. (2016). Isolation and screening of endophytic fungi from *Achillea millefolium L*-A medicinal pant of Western Himalayas. Imperial Journal of Interdisciplinary Research. 2(9): 498-502.
- Satomi, M., Myron, T., Duc, L. and Venkateswaran K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 56(8): 1735–1740.

- Storbel, G. and Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67(4): 491-502.
- Stierle, A., Strobel, G. and Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. Science, 260(5105): 214-216.
- Stone, J.K., Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. Microbial Endophytes. 3: 29-33.
- Suhandono, S., Kusumawardhani, M.K. and Aditiawati, P. (2016). Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (*Nephelium lappaceum L.*) cultivar Binjai. HAYATI Journal of Biosciences. 23(1): 39-44.
- Sun, H., He, Y., Xiao, Q., Ye, R. and Tian, Y. (2013). Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. African Journal of Microbiological Research. 7(16): 1496-1504.
- Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheny, C., Guo, L., Li, W., *et al*. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiological Research. 165(6): 437-449.