



جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت گیاه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) و ارزیابی متابولیت‌های ثانویه آن‌ها در فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی

میترا امیدى نسب<sup>۱</sup> و غلام خدا کرمانی<sup>۲\*</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران  
۲- \* نویسنده مسوول: استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران  
(khodakaramian@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۰۳

چکیده

مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) گیاه معطری است که به دلیل محتوای متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی که در طب سنتی قابل استفاده هستند، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. با این حال، اطلاعات در مورد اندوفیت‌های باکتریایی مرتبط با مرزه خوزستانی (*S. khuzestanica*) محدود است. در مطالعه حاضر، ۱۷ اندوفیت باکتریایی از گیاه دارویی *S. khuzestanica* جداسازی شد. مطالعات آنتاگونیستی این جدایه‌ها برابر سه باکتری بیماری‌زای گیاه، *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovora*، *Ralstonia solanacearum* و *Clavibacter insidiosus* در شرایط آزمایشگاهی روی محیط کشت Tryptic Soy Broth به روش کشت سه نقطه‌ای بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام و نماینده‌ها انتخاب شدند. اندوفیت‌های باکتریایی با تعیین توالی ژن *16S rRNA* شناسایی شدند و به سه جنس *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Streptomyces* تعلق داشتند. متابولیت‌های این باکتری‌ها به وسیله اتیل استات استخراج و آنالیز گاز کروماتوگرافی-طیف‌سنجی جرمی عصاره (GC-MS) با روش‌های استاندارد انجام شد. نتایج آزمون حداقل غلظت مهار (MIC) با استفاده از روش میکرودايلوشن، نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی با غلظت مهار قابل توجهی از ۲/۵-۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بودند. یافته‌های ما بینش جدیدی را در مورد فعالیت‌های ضد میکروبی اندوفیت‌های باکتریایی از *S. khuzestanica* ارائه می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: آنتی‌اکسیدان، عصاره خام، فعالیت بیولوژیکی، عوامل بیماری‌زا

دبیر تخصصی: دکتر محمد مهدی فقیهی

**Citation:** Omidi Nasab, M. & Khodakaramian, G. (2022). Isolation and identification of endophytic bacteria from *Satureja Khuzestanica* and evaluation of its secondary metabolites for antimicrobial activity against plant pathogenic bacteria. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(3), 43-62. <https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17738>.

### مقدمه

گیاهان دارویی منبعی از ترکیبات فعال بیولوژیکی برای تولید داروهای جدید هستند. از نظر تاریخی، انواع مختلف گیاهان دارویی به‌طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف مانند آسم، ناراحتی‌های پوستی، مشکلات تنفسی، گوارشی و ادراری و غیره استفاده می‌شوند (Akerle et al., 1991; Bajguz, 2007). استفاده از گیاهان دارویی برای کشف داروی جدید یک عامل محدودکننده است، زیرا در موارد زیادی قبل از ورود محصولات به بازار، مقادیر زیادی از مواد گیاهی برای مطالعات بالینی مورد نیاز است. علاوه بر این، برخی از گونه‌های گیاهی در معرض انقراض قرار دارند و یا بومی شده‌اند. یکی از پیشرفت‌های انجام شده در رفع این نگرانی‌ها کشف ریزموجوداتی به نام اندوفیت‌های ساکن گیاهان است که ترکیبات یکسان یا مشابه میزبان‌های گیاهی خود را تولید می‌کنند. اندوفیت‌ها قارچ‌ها یا باکتری‌هایی هستند که داخل بافت‌های گیاه بدون ایجاد هیچ‌گونه آسیب، ساکن هستند (Nair & Padmavathy, 2014). باکتری‌های اندوفیت متعلق به جنس‌ها و گونه‌های مختلف و دارای بسیاری از مواد فعال بیولوژیکی گزارش شده با فعالیت‌های زیستی متنوع و جدید هستند. این ریزموجودات به دلیل سهولت در جداسازی، رشد سریع و عدم تأثیر منفی بر گیاه میزبان، منبع خوبی برای استخراج ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند. بنابراین، ریزموجودات مرتبط با گیاهان دارویی فرصتی برای جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیکی جدید با بهره‌مندی از حفاظت گیاهان دارویی فراهم می‌کنند، زیرا میزان کم از مواد گیاهی برای جداسازی اندوفیت مورد نیاز است. اندوفیت‌ها با تعدادی از سازوکارها از جمله افزایش جذب مواد مغذی ضروری مانند فسفات، آمونیاک و نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول-۳-استیک اسید و جیبرلین و جلوگیری از تکثیر بیمارگر از طریق تولید متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ضد میکروبی، رشد گیاه را به طور قابل توجهی بهبود می‌بخشند (Qin et al., 2015; Borah et al., 2019). بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی

تولید شده توسط اندوفیت‌های باکتریایی به چندین گروه ساختاری مانند پپتیدها، آلکالوئیدها، استروئیدها، کینین‌ها، ترپنوئیدها، فنل‌ها و فلاونوئیدها با کاربردهای مختلف تعلق دارند. بنابراین یک تلاش علمی جدید در سراسر جهان برای جداسازی اندوفیت‌ها و مطالعه محصولات طبیعی آن‌ها وجود دارد که نقش مهمی به عنوان ضد باکتری، ضد ویروس، آنتی‌اکسیدان، ضد آرتروز<sup>۱</sup> و ضد دیابت و به عنوان یک ترکیب سرکوب‌کننده سیستم ایمنی دارند. با توجه به اهمیت روز افزون گیاهان دارویی و از طرفی با شناخت اندوفیت‌ها به عنوان منابع جدید سنتزکننده متابولیت‌ها که نقش‌ها و فواید بسیاری را در گیاهان ایفا می‌کنند، بررسی و مطالعه اندوفیت‌های این گیاهان اهمیت زیادی پیدا کرده است و امید می‌رود در آینده بتوان از اندوفیت‌ها به عنوان منابع با ارزش مواد متابولیت، منابع آنزیمی و مکمل‌های بیولوژیک در کشاورزی و صنعت استفاده نمود (Mozaffarian, 2005). گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja Khuzestanica*) از خانواده نعنائیان (Labiatae) است و به عنوان یک گیاه دارویی مورد توجه قرار گرفته است. مرزه خوزستانی بالغ بر ۳۰ گونه را شامل می‌شود که برخی گونه‌ها یکساله و اغلب آن‌ها چندساله می‌باشند. این گونه‌ها عمدتاً بومی مناطق مدیترانه شرقی و غرب آسیا هستند و در مناطق با اقلیم مرطوب و خاک‌های عمیق تا مناطق با اقلیم خشک، آفتابی و خاک‌های سنگلاخی رشد می‌کنند (Silic, 1979; Cantino et al., 1992). ایران یکی از مهم‌ترین مخازن ژرم پلاسما مرزه در دنیاست. چهارده گونه از این گیاه در ایران شناسایی شده‌اند که هشت گونه از آن‌ها بومی می‌باشند (Rechinger, 1982; Jamzad, 1996). کارواکرول<sup>۲</sup> مهم‌ترین ترکیب فعال بیولوژیکی موجود در اسانس دو گونه کشت شده مرزه یعنی مرزه تابستانه و مرزه زمستانه و برخی گونه‌های وحشی مرزه می‌باشد. اسانس‌های محتوی کارواکرول دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قابل توجه می‌باشند. همچنین، کارواکرول بازدارنده بیوسنتز پروستاگلاندین‌ها

1- Arthritis

2- Carvacrol

نانوذرات نقره سنتز می کنند (Pissuwan et al., 2006; Kitov et al., 2008; Sunkar & Nachiyar, 2012). حدود ۲۳۰۰۰ هزار نوع متابولیت ثانویه فعال توسط ریزموجودات تولید می شود و این ترکیبات به عنوان منابع جدید فعال، شناخته شده اند. گونه های *Streptomyces* به عنوان باکتری های تولیدکننده متابولیت های از بین برنده بیوفیلیم باکتری ها معرفی شدند (Rosa et al., 2016). با توجه به نوترکیبی ژنتیکی با میزان در طی تکامل همبستگی خطی مثبت بین اندوفیت ها و گیاهان دارویی، در تولید متابولیت وجود دارد (Cai et al., 2004). اندوفیت ها به عنوان منابع منحصر بفرد متابولیت های طبیعی ساختاری، زیست فعال و طبیعی مانند آلکالوئیدها، بنزوپیرانونها، بنزوئینون ها، فلاونوئیدها، فنل ها، استروئیدها، ترپنوئیدها، تترالون ها و زانتون ها عمل می کنند و دارای پتانسیل بالایی برای کاوش درمانی جدید هستند (Tan & Zou, 2001). آن ها به عنوان تولیدکننده های بسیار قوی متابولیت های ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد باکتری، سیتوتوکسیک<sup>۱</sup> (سمیت سلولی) و تحریک کننده سیستم ایمنی عمل می کنند. گیاه مرزه خوزستانی ارزش دارویی بالایی دارد، ولی تاکنون باکتری های اندوفیت آن و همچنین متابولیت های مهم ضد میکروبی باکتری های اندوفیت این گیاه بررسی نشده اند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی اندوفیت های باکتریایی از *S. khuzestanica*، گیاه دارویی بومی استان لرستان و خوزستان، انجام شد. علاوه بر این، متابولیت ثانویه اندوفیت های انتخاب شده برای فعالیت ضد باکتریایی و شناسایی بیشتر، با استفاده از کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی (GC - MS) مورد سنجش قرار گرفتند.

## مواد و روش

### نمونه برداری گیاه

گیاه مرزه خوزستانی در بهار و تابستان ۲۰۱۹ از زیستگاه طبیعی آن ها، در استان لرستان جمع آوری شد. گیاهان کامل از جمله ریشه ها در کیسه های کاغذی سترون قرار داده شدند

است که این بازدارندگی، سازوکار مهمی در تسکین درد و فرآیندهای ضد التهابی است. در بسیاری موارد، ترکیبات فنلی موجود در اسانس و عصاره این گیاه آثار تعیین کننده و تاثیرگذار بروز داده اند (Labbe & Shetty, 1998). در مواردی دیده شده است که بسیاری از ترکیبات دارویی تولید شده در گیاهان دارویی به وسیله اندوفیت های موجود در آن ها نیز تولید می شود. بنابراین بررسی این اندوفیت ها و خواص دارویی آن ها شایان توجه می باشد. با توجه به اهمیت روز افزون گیاهان دارویی و از طرفی با شناخت اندوفیت ها به عنوان منابع جدید سنتز کننده متابولیت ها که نقش ها و فواید بسیاری را در گیاهان ایفا می کنند، بررسی و مطالعه اندوفیت های این گیاهان اهمیت زیادی پیدا کرده است و امید می رود در آینده بتوان از اندوفیت ها به عنوان منابع با ارزش مواد متابولیت، منابع آنزیمی و مکمل های بیولوژیک در کشاورزی و صنعت استفاده نمود (Mozaffarian, 2005).

ترکیبات زیستی مانند متابولیت های ثانویه و آنزیم های تولید شده توسط ریزموجودات به طور گسترده ای به عنوان غذا و مکمل های غذایی (Subbulakshmi et al., 2012; Mitsuhashi, 2014; Wendisch, 2014) دارویی (Elander, 2003; Endo, 2010)، سوخت های زیستی (Geddes, Nieves & Ingram, 2011)، آفت کش های زیستی (Waldron et al., 2001; Yoon et al., 2004) و مواد شوینده (Shaligram & Singhal, 2010)، و نیز در فرآیند تولید این محصولات صنعتی مورد استفاده قرار گرفته اند (Kirk et al., 2002; Merino & Cherry, 2007). اکتینومیسست ها دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت های ثانویه مثل آنتی بیوتیک ها، آنزیم ها، علف کش ها، مواد ضد سرطان و دیگر ترکیبات مفید می باشند (Petrova & Shishkov, 2006; Valli et al., 2012). گونه های اندوفیت *Bacillus* sp. جدا شده از گیاهان دارویی *Adhatoda beddomei* و *Garcinia xanthochymus*، با احیای نیترات نقره (AgNO<sub>3</sub>)،

شدند. نمونه‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از سه روز، با استفاده از پنبه آغشته به الکل ۹۶٪ باکتری‌ها از سطح محیط کشت پاک شدند و پتری‌های مزبور به همراه پتری‌های شاهد به مدت ۲۰ دقیقه در معرض بخار کلروفرم قرار گرفتند. سپس سوسپانسیون باکتری‌های بیمارگر با OD=۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شده و به میزان ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌های بیمارگر روی محیط کشت‌ها ریخته و سپس به صورت یکنواخت پخش و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت درون انکوباتور نگهداری شدند. سپس بازدارندگی جدایه‌های اندوفیت با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشد بررسی شد. در نمونه شاهد به جای باکتری آنتاگونیست از آب مقطر سترون یا اینکه به جای سوسپانسیون باکتری بیمارگر از آب مقطر سترون استفاده شد. برای انتخاب جدایه‌های مناسب، تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت و جدایه‌های با ویژگی آنتاگونیستی مطلوب انتخاب و شناسایی شدند. جهت انجام تجزیه آماری داده‌های حاصل، از نرم افزار SAS استفاده شد.

#### شناسایی گونه‌های باکتریایی منتخب

#### آزمون‌های فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی منتخب، تعدادی از آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی بر روی استرین‌های جدا شده، به روش<sup>۱</sup> Schaad انجام شد.

#### شناسایی مولکولی براساس توالی ژن 16S rRNA

از هیدرولیز آنزیمی برای استخراج DNA ژنومی باکتری‌های اندوفیت استفاده شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از کشت تازه باکتری در یک ریزلوله ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۴۸۰ میکرولیتر بافر TE و ۲۰ میکرولیتر محلول لیزوزیم (۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد. سوسپانسیون باکتریایی کاملاً مخلوط شده و به مدت ۱ ساعت در دستگاه شیکر قرار گرفت. این مخلوط با محلول ۵۰ میکرولیتر 20 SDS٪ و ۵ میکرولیتر

و به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله در آزمایشگاه برای جداسازی اندوفیت‌ها آماده شدند.

#### جداسازی باکتری‌های اندوفیت

قسمت‌های مختلف گیاه با آب شرب کاملاً شسته و سطح آن‌ها به مدت ۵ دقیقه با ۷۰٪ اتانول سترون شده و سپس با آب مقطر سترون شستشو داده، به مدت ۳ دقیقه در سدیم هیپوکلریت ۲٪ خیسانده و سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. آب شستشوی نهایی در محیط غذایی آگار به عنوان شاهد کشت داده شد. قطعات گیاه ضد عفونی شده با استفاده از هاون چینی سترون خرد شده و در بافر فسفات به مدت دو دقیقه (۸ گرم NaCl، ۰/۲ گرم KCl، ۱/۴۴ گرم Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> و KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> در pH 7.4) انداخته شدند. سپس روی محیط کشت (Tryptic Soy Agar (TSA) به صورت خطی کشت داده شد و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت دو تا هفت روز نگهداری شد. پرگنه‌های رشد یافته خالص‌سازی شدند و در مجموع ۱۷ جدایه برای این مطالعه انتخاب و در محلول ۳۰٪ گلیسرول (۷ / ۷) و برای طولانی مدت در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد (Muzzamal, 2012).

#### بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اندوفیت روی باکتری بیمارگر گیاهی

مطالعات آنتاگونیستی توانایی جدایه‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک و مواد بازدارنده بین باکتری‌های اندوفیت و باکتری‌های عامل بیماری برابر سه باکتری بیماری‌زای گیاه شامل *Ralstonia solanacearum* (عامل پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی، سیب زمینی و برخی از گیاهان دیگر)، *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (عامل پوسیدگی نرم باکتریایی در بسیاری از گیاهان)، *Clavibacter insidiosus* (عامل پژمردگی باکتریایی یونجه)، در شرایط آزمایشگاهی روی محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) به روش کشت سه نقطه‌ای و بخار کلروفرم انجام شد (Ryan et al., 2008). برای بررسی اثر متقابل، از کشت ۴۸-۲۴ ساعته باکتری‌ها استفاده شد؛ به طوری که باکتری‌های اندوفیت به صورت لکه‌ای روی محیط TSA کشت داده

متابولیت‌های ثانویه به ظروف ۲۰ میلی‌لیتری منتقل و با فویل پوشانده و در دمای اتاق خشک شدند (Sathiyarayanan et al., 2014; Bhardwaj et al., 2015).

### حداقل غلظت مهاري (MIC)

مطالعات حداقل غلظت مهاري عصاره‌های خام اندوفیت باکتریایی با توجه به روش اندره (Andrews, 2001) با برخی تغییرات انجام شد. به‌طور خلاصه، محلول‌های استحصالی عصاره‌ها با حل شدن ۰/۰۲ گرم در میلی لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) تهیه شدند (غلظت نهایی ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر). سپس، به صورت سری غلظت‌های ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر، ۵ میلی گرم در میلی لیتر، ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر، ۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر، ۰/۶۲۵ میلی گرم در میلی لیتر و ۰/۳۱۲ میلی گرم در میلی لیتر با استفاده از محیط نوترینت برات<sup>۲</sup> رقیق شدند. با استفاده از استاندارد کدورت محلول نیم مک‌فارلند (CFU/ml)  $10^8 \times 1/5$ ، ۵۰ میکرولیتر از هر بیمارگر در ۱۵ میلی لیتر نوترینت برات تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در صفحات میکروتیتر ۹۶ چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر سویه آزمایش بیماری‌زا به صورت افقی و ۱۰۰ میکرولیتر غلظت عصاره خام رقیق به صورت عمودی از غلظت از بالا به پایین اضافه شد. شاهد‌های منفی (۱۰۰ میکرولیتر DMSO و ۱۰۰ میکرولیتر محیط نوترینت برات، به نسبت ۱:۱ (v/v)) و کنترل مثبت ۱ میلی گرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک استرپتومایسین (سیگما-آلد ریچ سوئیس) به صورت عمودی در چاهک‌های بعدی با غلظت کم اضافه شدند. صفحات به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سنجش MIC در سه تکرار انجام شد. مقادیر MIC (کمترین غلظت هر عصاره بدون رشد قابل مشاهده) به صورت چشمی تعیین شد.

### تجزیه و تحلیل اثر انگشت متابولیت با استفاده از GC-MS

توسط دستگاه Shimadzu Quadruple-) GC-MS (MS model QP2010 SE شناسایی شدند. از ستون موئینه از جنس Fusedsilica به اسم تجاری HP-5MS با

محلول پروتیناز K تحت تیمار قرار گرفت و به مدت ۱ ساعت در بن‌ماری ۵۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس DNA دو بار با فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) استخراج شد و به دنبال آن با ۸۰ میکرولیتر استات سدیم (۳ مول در لیتر، pH=5) و ۸۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق رسوب داده شد. رسوب DNA در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، با ۷۰٪ اتانول شسته و سپس در هوا خشک شد. DNA استخراج شده در ۴۰ میکرولیتر آب سترون مجدداً سوسپانسیون شد و برای استفاده بیشتر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره شد. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، DNA هر جدایه باکتری با استفاده از آغازگرهای عمومی ژن *16S rRNA* (27F/1492R) شامل آغازگر 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'F و آغازگر معکوس 5'-AAGGAGGTGATCCAAGCCGCA-3'R (Yeates et al., 1997) تکثیر شد.

تکثیر ژن *16S rRNA* در یک ریزلوله واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۲ میکرولیتر مخلوط (Ampliqon) Master mix PCR با بفر استاندارد و رساندن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با آب مقطر سترون انجام شد. کنترل منفی (مخلوط PCR بدون DNA) در تمام آزمایش‌های PCR گنجانده شد. محصولات PCR به‌طور مستقیم برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

### سنجش ضد میکروبی حداقل غلظت مهاري (MIC)

#### تهیه عصاره باکتریایی

اندوفیت‌های باکتریایی در Tryptic Soy Broth (TSB) به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس روی دستگاه انکوباتور شیکردار در ۱۸۰ دور در دقیقه کشت داده شدند. پس از کشت، با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند. مایع باقیمانده حاوی عصاره‌های خام سه بار با اتیل استات در نسبت ۱:۱ (v/v) استخراج شد و اتیل استات تبخیر و با روتاری تحت خلاء تغلیظ شد. عصاره‌های خام حاوی

روش کشت سه نقطه‌ای روی محیط کشت TSA مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین جدایه‌های آنتاگونیست در میزان بازدارندگی از رشد باکتری بیمارگر، اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تجزیه واریانس اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست از رشد باکتری بیمارگر در جدول ۱ و مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری‌های اندوفیت و باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۲ ارائه شده است. همچنین تصاویر هاله بازدارنده جدایه‌های اندوفیت منتخب که دارای بیشترین میزان بازدارندگی بر روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی آزمایش شده در شرایط آزمایشگاهی بودند در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده و با توجه جدول مقایسه میانگین (جدول ۲)، جدایه‌های E7، E11 بیش‌ترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد باکتری عامل پژمردگی یونجه نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند. همچنین بر اساس نتایج حاصل در این تحقیق و با توجه به جدول مقایسه میانگین به ترتیب مشخص شد که جدایه E17 با میانگین قطر هاله بازدارنده ۲۰/۸ میلی متر، بیشترین میزان بازدارندگی را روی رشد باکتری *Ralstonia solanacearum* و جدایه E16 بیشترین بازدارندگی را روی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* از خود نشان دادند.

طول ۳۰ cm، قطر داخلی ۲۵/۰ mm و ضخامت فیلم ۲۵/۰ μm متصل با فاز ساکن فنیل متیل سیلوکسان ۵٪ استفاده گردید. کل سیستم توسط نرم افزار کنترل Hewlett-Packard، version A.01.01 می‌گردد. به منظور تبخیر نمونه در شرایط خلاء از روش الکترون یونیزاسیون با انرژی حدود ۷۰ ولت و گاز هلیوم با خلوص بالا (۹۹/۹۹۹) با سرعت ۱ میلی‌متر در دقیقه استفاده شد. حجم نمونه تزریق شده به سیستم ۱ میکرولیتر بود که از روش تزریق بدون تقسیم<sup>۱</sup> استفاده شد. دمای تزریق‌کننده و آشکارساز به ترتیب ۲۵۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بودند. پس از استارت، دمای آون به مدت ۵ دقیقه در ۳۵°C بود تا حلال خارج گردید. سپس با نرخ ۴°C به دمای ۳۰۰°C رسید و پس از ۲۰ دقیقه برنامه خاتمه یافت. طیف‌های جرمی به دست آمده با داده‌های کتابخانه Wiley، NIST05 و یا کتابخانه ساخته شده در همان آزمایشگاه انطباق داده شد. سپس، ترکیبات از طریق مقایسه‌ی درصد احتمال صحت کاندیداها (فاکتور P) با داده‌های موجود در کتابخانه بررسی گردیدند. فاکتور P بالاتر از ۷۰٪ مورد قبول واقع شدند.

## نتایج و بحث

در مجموع ۱۷ جدایه از باکتری‌های اندوفیت برای بررسی اثر بازدارندگی علیه سه باکتری بیمارگر گیاهی، با

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت جدا شده از مرزه خوزستانی علیه باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی

Table 1. Analysis of variance, inhibitory effect of the endophytic bacteria isolated from *Satureja khuzestanica* against plant pathogenic bacteria in vitro

Source of variation	DF	Mean squares	F value	Pr>F
Pathogenic bacteria (a)	2	43.14	5.03	0.0082**
Endophytic bacteria (b)	16	103.65	12.09	<0.0001**
Interaction of pathogenic bacteria × endophytes (a*b)	32	28.77	3.36	<0.0001**
Error	102	8.57		
Coefficient of variation			20.92	

\*\*significant at 1 % probability level

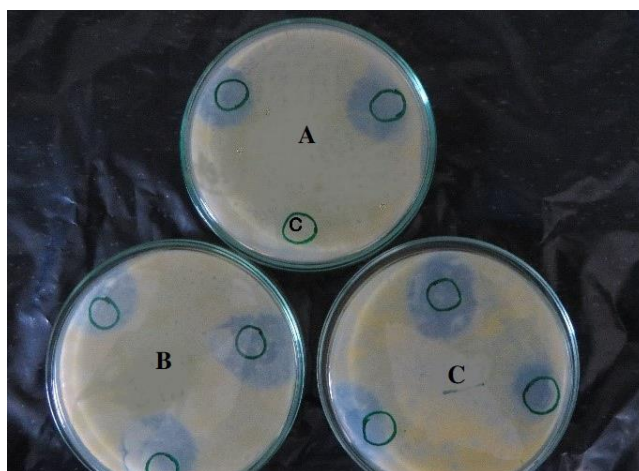
جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری‌های اندوفیت جدا شده از مرزه خوزستانی و باکتری‌های بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی

Table 2. The mean comparison interaction effect of the endophytic bacteria isolated from *Satureja khuzestanica* and plant pathogenic bacteria in vitro

Treatments (Interaction of pathogenic bacteria × Inhibitory zone endophytes)		Treatments (Interaction of pathogenic bacteria × Inhibitory zone endophytes)	
E1B1	11.167 <sup>h-q</sup>	E10B2	13.833 <sup>d-n</sup>
E2B1	19 <sup>a-e</sup>	E11B2	19.167 <sup>abcd</sup>
E3B1	19.333 <sup>abcd</sup>	E12B2	7.167 <sup>qr</sup>
E4B1	15.5 <sup>b-k</sup>	E13B2	11 <sup>i-q</sup>
E5B1	10.5 <sup>j-q</sup>	E14B2	7.833 <sup>p-r</sup>
E6B1	7.667 <sup>p-r</sup>	E15B2	14.5 <sup>d-m</sup>
E7B1	21.667 <sup>a</sup>	E16B2	14.5 <sup>d-m</sup>
E8B1	16.5 <sup>a-i</sup>	E17B2	20.833 <sup>abc</sup>
E9B1	15 <sup>c</sup>	E1B3	14.167 <sup>d-n</sup>
E10B1	11.5 <sup>h-q</sup>	E2B3	116.5 <sup>a-i</sup>
E11B1	21.333 <sup>ab</sup>	E3B3	16.833 <sup>a-i</sup>
E12B1	11.667 <sup>g-q</sup>	E4B3	12.833 <sup>f-p</sup>
E13B1	15 <sup>c-l</sup>	E5B3	16.5 <sup>a-i</sup>
E14B1	11.167 <sup>h-q</sup>	E6B3	8.833 <sup>m-r</sup>
E15B1	4.333 <sup>r</sup>	E7B3	15.833 <sup>a-j</sup>
E16B1	19.667 <sup>abcd</sup>	E8B3	13.167 <sup>e-o</sup>
E17B1	15.833 <sup>a-j</sup>	E9B3	17 <sup>a-h</sup>
E1B2	16 <sup>a-j</sup>	E10B3	9.167 <sup>l-r</sup>
E2B2	8.667 <sup>m-r</sup>	E11B3	19.5 <sup>abcd</sup>
E3B2	12.5 <sup>f-q</sup>	E12B3	12 <sup>f-q</sup>
E4B2	8.5 <sup>n-r</sup>	E13B3	16.833 <sup>a-i</sup>
E5B2	14.5 <sup>d-m</sup>	E14B3	6.833 <sup>qr</sup>
E6B2	9.667 <sup>k-r</sup>	E15B3	13.833 <sup>d-n</sup>
E7B2	17.833 <sup>a-f</sup>	E16B3	19.667 <sup>abcd</sup>
E8B2	10.5 <sup>j-q</sup>	E17B3	17.5 <sup>a-g</sup>
E9B2	12.833 <sup>f-p</sup>		

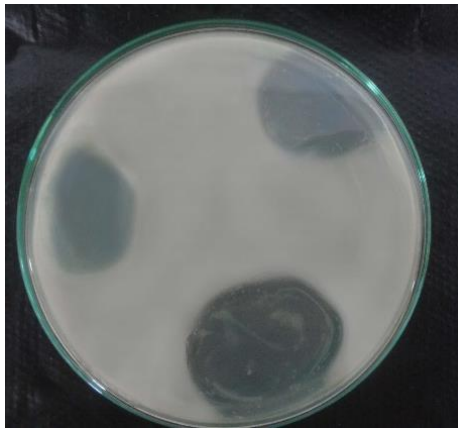
Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at  $P>0.05$

B1: *Clavibacter insidiosus* B2: *Ralstonia solanacearum* B3: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

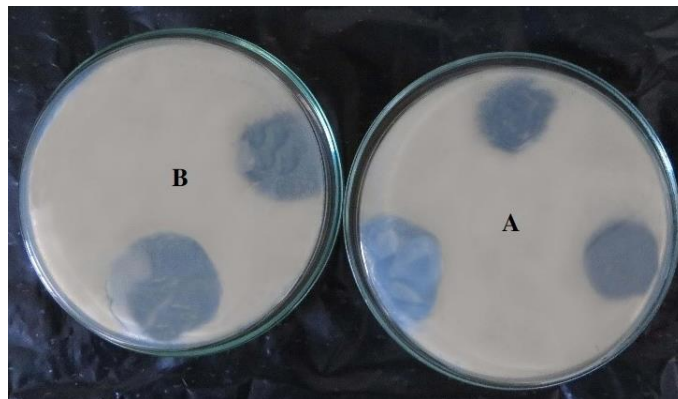


شکل ۱- تاثیر باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas psychrotolerans* (A) ، *Priestia aryabhatai* (B) ، *Bacillus megaterium* (C) جدا شده از مرزه خوزستانی بر بازدارندگی از رشد باکتری عامل پژمردگی یونجه *Clavibacter insidiosus*

Figure 1. The effect of endophytic bacteria including *Bacillus megaterium*, *Priestia aryabhatai*, *Pseudomonas psychrotolerans* isolated from *Satureja khuzestanica* on inhibiting the growth of *Clavibacter insidiosus*



شکل ۲- تاثیر باکتری اندوفیت *Bacillus megaterium* جدا شده از مرزه خوزستانی بر بازدارندگی از رشد باکتری *Ralstonia solanacearum*  
**Figure 2. The effect of *Bacillus megaterium* isolated from *Satureja khuzestanica* on growth inhibition of *Ralstonia solanacearum***



شکل ۳- تاثیر باکتری‌های *Bacillus megaterium* (A) , *Streptomyces cavourensis* (B) اندوفیت جدا شده از مرزه خوزستانی بر بازدارندگی از رشد باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*  
**Figure 3. The effect of endophytic *Streptomyces cavourensis*, *Bacillus megaterium* isolated from *Satureja khuzestanica* on growth inhibition of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum***

#### شناسایی گونه‌های باکتریایی منتخب

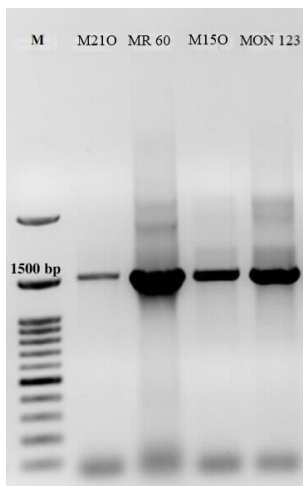
از نمونه‌های گیاهی گیاه دارویی *S. khuzestanica*، در مجموع ۱۷ جدایه باکتری اندوفیت به دست آمد. براساس غربال‌گری اولیه، از بین جدایه‌های به دست آمده چهار جدایه که بیشترین بازدارندگی را علیه باکتری‌های بیماری‌زا داشتند برای شناسایی متابولیت و توالی یابی انتخاب شدند (جدول ۳). برای شناسایی گونه‌های باکتری‌های منتخب، علاوه بر آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی، از تعیین توالی ژن *16S rRNA* نیز استفاده شد. انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگر عمومی موجب تشکیل تک باند به اندازه حدود ۱۵۰۰ جفت باز در

استرین‌های منتخب M150، MR60، M210 و MON123 روی ژل آگارز شد (شکل ۴). جستجوی بلاست در NCBI با توالی‌های به دست آمده از استرین‌های M150، MR60، M210 و MON123 در ژن بانک، شباهت بالای ۹۹ درصد به ترتیب با گونه‌های *Bacillus megaterium*، *Priestia aryabhatai* و *Pseudomonas psychrotolerans* و *Streptomyces cavourensis* مشاهده شد و سپس در ادامه آزمون‌های تکمیلی فنوتیپی و بیوشیمیایی گونه‌های فوق را تایید نمود. بر اساس آزمون‌های تکمیلی فنوتیپی و بیوشیمیایی، جدایه‌های باکتریایی در چهار جنس و گونه



شده در جداول ۴، ۵ و ۶ آمده است. گونه‌های اندوفیت شناسایی شده از گیاه *S. khuzestanica* برای اولین بار به عنوان اندوفیت روی میزبان خود گزارش می‌شوند (شکل ۵).

طبقه‌بندی شدند. نام گونه‌ها همراه با شماره دسترسی ژن‌بانک مربوطه از هر کدام در جدول ۳ آمده است. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی گونه‌های اندوفیت منتخب شناسایی



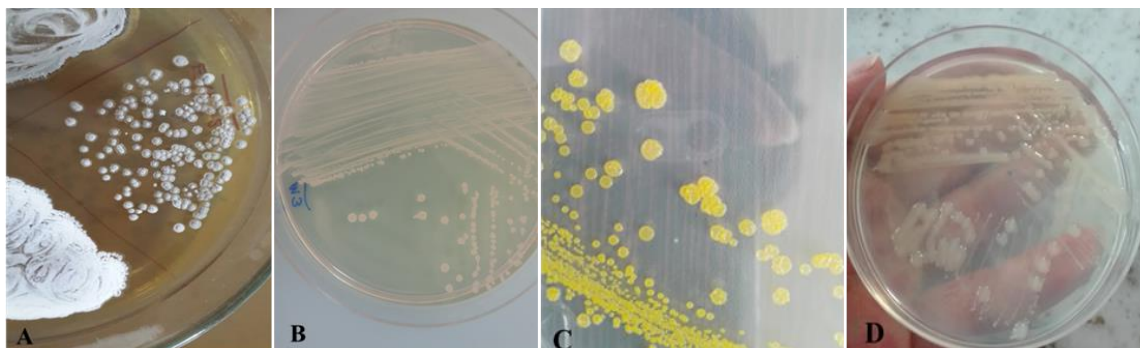
شکل ۴- قطعات قابل انتظار حدود ۱/۵ کیلوگفت‌باز از ژن *16S rRNA* که در سویه‌های نماینده باکتری‌های اندوفیت در آزمون PCR با آغازگرهای 27F / 1492R تکثیر شدند. راهک‌های ۱ تا ۴: جدایه‌های نماینده؛ M: مارکر ۱۰۰ جفت‌باز (SMOBiO DM2300).

Figure 4. 1.5 kb fragments of the *16S rRNA* gene amplified by PCR using 27F / 1492R primer pair in the representative endophytic strains (Lane 1 to 4) M: 100 bp marker (SMOBiO DM2300).

جدول ۳- گونه‌های باکتریایی اندوفیت جداسازی شده از گیاه مرزه خوزستانی و شماره‌های دسترسی توالی ژن *16S rRNA* آن‌ها در ژن‌بانک

Table 3. Endophytic bacteria isolated from *Satureja khuzestanica* plant and GenBank accession numbers of *16S rRNA* gene

Bacterial species	GenBank accession numbers	Strain name
<i>Priestia aryabhatai</i>	MZ958841	M21O (E7)
<i>Bacillus megaterium</i>	MZ958840	MR60 (E11)
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	MZ958842	M15O (E16)
<i>Streptomyces cavourensis</i>	OK064160	MON123 (E17)



شکل ۵- تصاویر باکتری‌های منتخب، کشت شده بر روی محیط کشت TSA. A: *Streptomyces cavourensis*، B: *Priestia aryabhatai*، C: *Pseudomonas psychrotolerans* و D: *Bacillus megaterium*

Figure 5. The selected bacteria cultured on TSA medium. A: *Streptomyces cavourensis*, B: *Priestia aryabhatai*, C: *Pseudomonas psychrotolerans* and D: *Bacillus megaterium*

جدول ۴- نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی تکمیلی باکتری اندوفیت *Pseudomonas psychrotoleran* (استرین M150) جدا شده از مرزه خوزستانی

**Table 4. Results of phenotypic and biochemical tests used for identification of endophytic bacterium *Pseudomonas psychrotoleran* (M150 strain) isolated from *Satureja khuzestanica***

Test	Results
Gram	Gram-negative
O/F	Aerobe
Colonies	Yelloow, irregular, leathery, dry
Acid production from:	
Glucose	+
L-arabinose	+
D-xylose	+
D-mannose	+
Sorbitol	+
Rhamnose	-
Inositol	+
Trehalose	+
Fluorescent pigment	-
Growth at:	
4°C	+
42°C	-

جدول ۵- تست‌های بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی تکمیلی باکتری‌های اندوفیت *Priestia aryabhatai* و *Bacillus megaterium*

**Table 5. Biochemical tests performed for additional identification of endophytic bacteria *Priestia aryabhatai* and *Bacillus megaterium***

Test	<i>Priestia aryabhatai</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Gram	Gram-Positive	Gram-Positive
Anaerobic growth	+	+
D-galactose	+	+
D-mannose	-	+
Inositol	-	+
b-galactosidase	+	-
D-trehalose	+	+
Glucopyranoside	-	-
Voges Proskauer	-	+
Fermentation of inositol	-	-
Arginine dihydrolase	-	-
Catalase production	+	+
Indole production	+	-
Citrate utilization	+	+

جدول ۶- ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری اندوفیت *Streptomyces cavourensis*Table 6. Phenotypic and biochemical characteristics of endophytic bacterium *Streptomyces cavourensis*

Test	Results
Gram	Gram-Positive
Spore chain	Rectiflexible
Colonies	Light brown
Acid production from:	
D-Glucose	+
Fructose	+
Galactose	+
L-arabinose	+
Sorbitol	-
Trehalose	-
Rhamnose	-
Inositol	-
Catalase test	+
Starch hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Nitrate reduction	+
Gelatin liquefaction	-

شده از *S. khuzestanica*، براساس ترادف قسمتی از ژن *16S rRNA* جدایه‌هایی از بانک ژن با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار رسم شده است. استرین‌های شناسایی شده در این بررسی، با دایره‌های سیاه در کنار آن در درخت تبارزایی مشخص شده اند و شماره‌های دسترسی مربوطه در کنار آن‌ها نوشته شده است.

#### بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های خارج سلولی با استفاده از حداقل غلظت مهاری

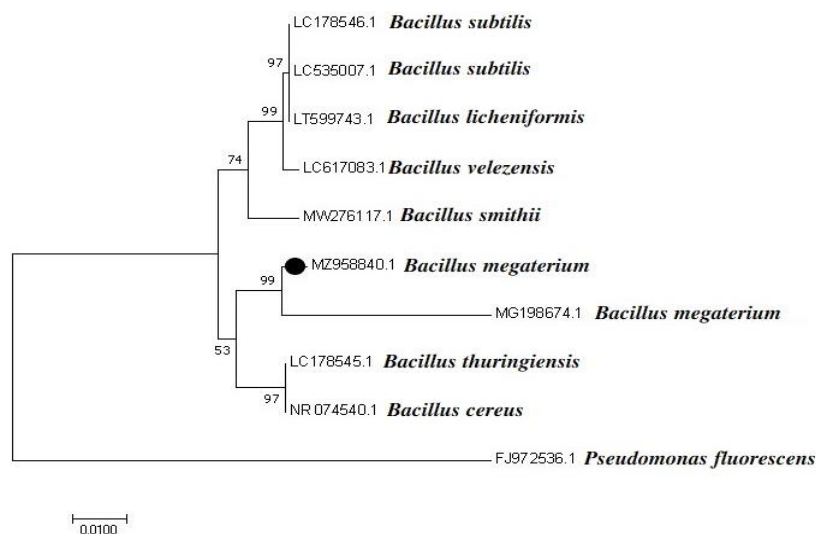
عصاره اتیل استاتی و خارج سلولی جدایه‌های اندوفیت برای بررسی فعالیت ضد باکتری با استفاده از روش حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی در برابر سه باکتری پاتوژن گیاهی *R. solanacearum* و *C. insidiosus* subsp. و *P. carotovorum carotovora* مورد آزمایش قرار گرفتند. حداقل غلظت مهار عصاره‌های خام استخراج شده از اندوفیت باکتریایی از ۰/۳۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. کمترین MIC مقدار ۰/۳۱۲ میلی

برای توالی‌یابی ژن *16S rRNA* از استرین‌های منتخب، محصول PCR به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. توالی ژن *16S rRNA* به دست آمده پس از ویرایش در بانک اطلاعات NCBI ثبت شد. درخت فیلوژنی با روش اتصال همسایه‌ای (Neighbour-joining) و عدد bootstrap محاسبه شده با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از نرم افزار MEGA7 ترسیم گردید.

درخت تبارزایی جدایه *Bacillus* (MZ958840) در شکل (۶) ارائه شده است. جدایه شناسایی شده در این مطالعه با دایره‌ی سیاه در کنار آن در درخت تبارزایی مشخص شده است و شماره دسترسی مربوطه در کنار آن نوشته شده است.

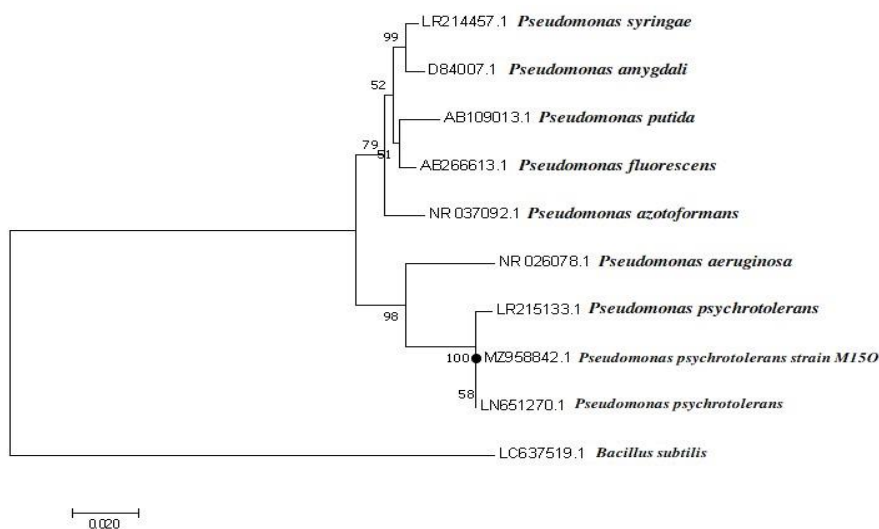
درخت تبارزایی جدایه‌های *Pseudomonas psychrotolerans* (شکل ۷)، *Priestia aryabhatai* (شکل ۸) و *Streptomyces cavourensis* (شکل ۹) جدا

گرم در میلی لیتر بود (جدول ۷)، که نشان می‌دهد پتانسیل تبدیل به ترکیباتی با فعالیت زیستی امیدوارکننده در برابر ریزموجودات بیماری‌زا را دارند و سایر عصاره‌های خام مقادیر MIC بالاتر را نشان دادند.



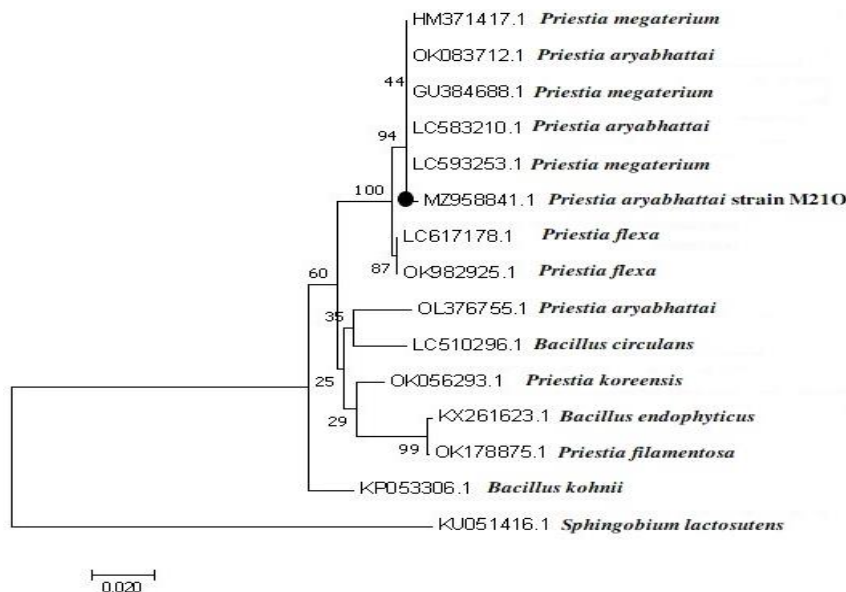
شکل ۶- درخت تبارزایی که با نرم‌افزار MEGA 7 با روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor-joining) براساس ترادف قسمتی از ژن *16S rRNA* در جدایه‌ی *Bacillus megaterium* MR60 جدا شده از *S. khuzestanica* و جدایه‌هایی از بانک ژن با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار رسم شده است. استرین جدا شده در این مطالعه با دایره‌ی سیاه در کنار آن در درخت تبارزایی مشخص شده است و شماره‌های دسترسی مربوط به آن‌ها نوشته شده‌اند. گونه‌ی *Pseudomonas fluorescens* به عنوان گروه خارجی انتخاب شد.

Figure 6. Phylogenetic tree constructed with MEGA7 software by neighbor-joining method based on sequences of *16S rRNA* gene of *Bacillus megaterium* strain MR60 (marked with a black circle) isolated from *Satureja khuzestanica* and isolates from GenBank with 1000 bootstrap replications. *Pseudomonas fluorescens* was selected as an outgroup.



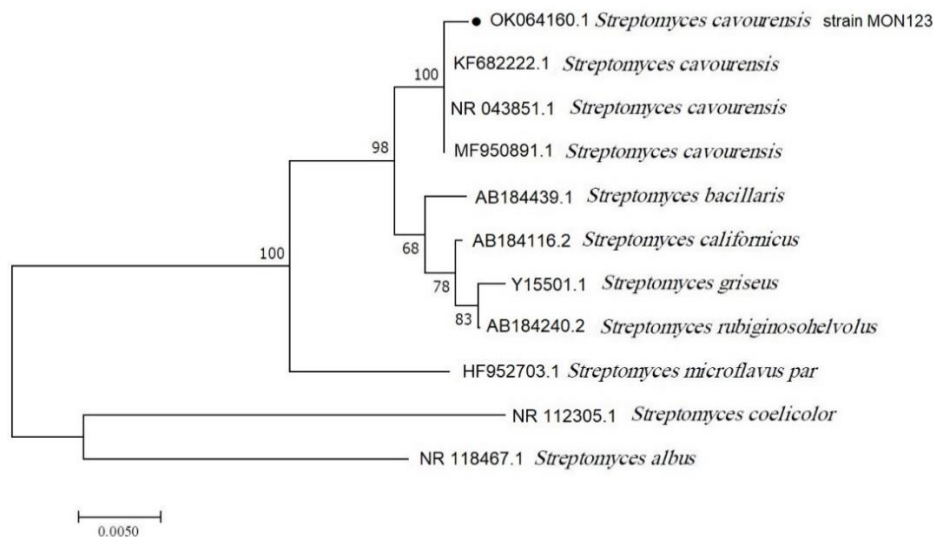
شکل ۷- درخت تبارزایی که با نرم‌افزار MEGA 7 با روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor-joining) براساس ترادف قسمتی از ژن *16S rRNA* در جدایه‌ی (M150) جدا شده از *Satureja khuzestanica* و جدایه‌هایی از بانک ژن با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار رسم شده است. استرین جدا شده در این مطالعه با دایره‌ی سیاه در کنار آن در درخت تبارزایی مشخص شده است و شماره‌های دسترسی مربوط به آن‌ها نوشته شده‌اند. گونه‌ی *Bacillus subtilis* به عنوان گروه خارجی انتخاب شد.

Figure 7. Phylogenetic tree constructed with MEGA7 software by neighbor-joining method based on sequences of *16S rRNA* gene of *Pseudomonas psychrotolerans* strain M150 (marked with a black circle) isolated from *Satureja khuzestanica* and isolates from GenBank with 1000 bootstrap replications. *Bacillus subtilis* was selected as an outgroup.



شکل ۸- درخت تبارزایی که با نرم‌افزار MEGA 7 با روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor-joining) براساس تبادف قسمتی از ژن *16S rRNA* در جدایی (M210) جدا شده از *Satureja khuzestanica* و جدایی‌هایی از ژن بانک با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار رسم شده است. استرین جدا شده در این مطالعه با دایره سیاه در کنار آن در درخت تبارزایی مشخص شده است و شماره‌های دسترسی مربوط به آن‌ها نوشته شده‌اند. گونه‌ی *Sphingobium lactosutens* به عنوان گروه خارجی انتخاب شد

Figure 8. Phylogenetic tree constructed with MEGA7 software by neighbor-joining method based on sequences of *16S rRNA* gene of *Priestia aryabhatai* strain M210 (marked with a black circle) isolated from *Satureja khuzestanica* and isolates from GenBank with 1000 bootstrap replications *Sphingobium lactosutens* was selected as an outgroup.



شکل ۹- درخت تبارزایی که با نرم‌افزار MEGA 7 با روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor-joining) براساس تبادف قسمتی از ژن *16S rRNA* در جدایی (MON123) جدا شده از *Satureja khuzestanica* و جدایی‌هایی از ژن بانک با بوت‌استرپ ۱۰۰۰ تکرار رسم شده است. استرین جدا شده در این مطالعه با دایره سیاه در کنار آن در درخت تبارزایی مشخص شده است و شماره‌های دسترسی مربوط به آن‌ها نوشته شده‌اند. گونه‌ی *Streptomyces albus* به عنوان گروه خارجی انتخاب شد

Figutr 9. Phylogenetic tree constructed with MEGA7 software by neighbor-joining method based on sequences of *16S rRNA* gene of strain *Streptomyces cavourensis* MON123 (marked with a black circle) isolated from *Satureja khuzestanica* and isolates from GenBank with 1000 bootstrap replications *Streptomyces albus* was selected as an outgroup.

جدول ۷- حداقل مقادیر غلظت بازدارنده (MIC) آزمایش فعالیت ضد باکتریایی انجام شده بر روی متابولیت‌های ثانویه اندوفیت‌های شناسایی شده از *Satureja khuzestanica*

**Table 7. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of antibacterial activity test performed on endophytic secondary metabolites identified from *Satureja khuzestanica***

Test Organism	<i>P. aryabhatai</i> MIC (mg/mL)	<i>B. megaterium</i> MIC (mg/mL)	<i>S. cavourensis</i> MIC (mg/mL)	<i>P. psychrotolerans</i> MIC (mg/mL)	Streptomycin MIC (g/mL)
<i>R. solanacearum</i>	1.25	1.25	0.625	1.25	0.312
<i>C. insidiosus</i>	0.625	2.5	0.625	1.25	0.625
<i>P. carotovorum</i>	0.625	1.25	0.312	0.625	0.312

*Streptomyces cavourensis* (جدول ۱۱) خلاصه شده است. طی آنالیز GC-MS انواع مختلفی از ترکیبات از جمله الکل‌ها، استرها، اسیدها، آلکان‌ها و چربی‌ها از عصاره اتیل استاتی اندوفیت‌های مورد مطالعه شناسایی شدند. از بین ترکیبات شناسایی شده، چندین اسید چرب از جمله (Kavita Methyl Hexadecanoic acid, Stearic acid) (Ahsan, 2017) و هیدروکربن‌هایی آلکانی مانند Hexadecane و Heptadecane و ترکیبات Dibutyle Eicosane، phtalat (Ahsan, 2017) وجود داشتند که خاصیت ضد میکروبی و سیتوتوکسیکی آن‌ها قبلاً گزارش شده است.

GC-MS فناوری جدیدی برای جداسازی ترکیبات موجود در متابولیت‌های ثانویه است. اخیراً ترکیبات ضد باکتری (Khattab et al., 2016)، ترکیب ضد قارچی علیه *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Jalaluldeen et al., 2015)، ترکیبات ضد قارچی علیه *Pyricularia oryzae* (Awla et al., 2016) و ترکیبات دارویی با طیف گسترده (Narasaiah et al., 2014) توسط GC-MS استخراج شده است. در این تحقیق اثر ضدباکتریایی و شناسایی ترکیبات متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه دارویی مرزه خوزستانی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، *S. khuzestanica*، انواع متنوعی از باکتری‌های اندوفیت را در خود جای داده است که چهار اندوفیت دارای بیشترین بازدارندگی برای استخراج متابولیت انتخاب شدند همچنین، فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های خام این اندوفیت‌ها در برابر سویه‌های بیماری‌زا قابل توجه بود. بسیاری از اندوفیت‌های جدا شده مرتبط به جنس باسیلوس بودند.

فعالیت MIC بسته به سویه آزمایش مورد استفاده متفاوت بود، اکثر عصاره‌ها نتایج جالبی را نشان دادند و کنترل مثبت استریتومایسین در برابر تمام سویه‌های آزمایش موثر بود. این یافته‌ها با مطالعات متعددی مطابقت دارد که نشان می‌دهد باکتری‌های اندوفیت منابع قابل اطمینان بالقوه‌ای از ترکیبات زیست فعال جدید با فعالیت ضد میکروبی هستند (Maroyi, 2018).

### تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی

اندوفیت‌های باکتریایی ترکیبات فعال یکسان یا مشابه تولید شده توسط گیاه میزبان را تولید می‌کنند (Alvin, 2004). بنابراین آن‌ها را به یک منبع امیدوار کننده از مولکول‌های جدید با کاربردهای مختلف بیوتکنولوژی تبدیل می‌کند. مرزه خوزستانی دارای سابقه پزشکی در فعالیتهای ضدباکتریایی، ضدالتهابی و ضد درد است که می‌تواند هدف بالقوه‌ای برای مطالعات متابولیت‌های ثانویه زیست فعال باشد. در مطالعه حاضر، ترکیبات عصاره‌های خام اتیل استاتی اندوفیت‌های باکتریایی جدا شده از *S. khuzestanica* شناسایی شد. شناسایی و خصوصیات متابولیت‌های ثانویه می‌تواند منجر به کشف ترکیبات جدید برای تولید دارو شود و همچنین کشف ترکیباتی که مورد توجه صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی و صنایع دیگر از جمله کشاورزی است. بسیاری از ترکیبات شناسایی شده در این مطالعه دارای فعالیت‌های بیولوژیکی ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدان و ضد التهاب هستند. تجزیه و تحلیل GC-MS عصاره‌های خام جدایه‌های جدا شده از مرزه خوزستانی به ترتیب در جداول: *P. aryabhatai* (جدول ۸)، *P. psychrotolerans* (جدول ۹)، *B. megaterium* (جدول ۱۰) و

جدول ۸ - تجزیه و تحلیل GC-MS عصاره‌های خام *P. aryabhatai* جدا شده از *Satureja khuzestanica*Table 8. GC-MS analysis of *P. aryabhatai* crude extracts isolated from *Satureja khuzestanica*

RT (min)	Area %	Name of the Compound	Biological Activity
10.514	49.15	Hexadecanoic acid	Antioxidant, hypocholesterolemic, Antiandrogenic, hemolytic, Alpha reductase inhibitor
10.660	6.30	1,3 Dicyclohexylbutane	-
12.898	17.16	Eicosane	Biodegradation, antifungal
13.879	3.05	Diisobutyle ester	-
14.925	5.42	Dibutyle phtalat	Antifungal
15.047	13.47	Eicosane	Biodegradation, antifungal
17.001	5.45	Docosane	Antibacterial activity

جدول ۹ - تجزیه و تحلیل GC-MS عصاره‌های خام *P. psychrotolerans* مرتبط با *Satureja khuzestanica*Table 9. GC-MS analysis of crude extracts of *P. psychrotolerans* associated with *Satureja khuzestanica*

Peak	RT (min)	Area %	Name of the compound	Biological Activity
1	10.139	1.58	Pentadecane,3-methyl	-
2	10.528	45.85	Hexadecane	Antioxidant
3	10.656	7.11	1,4 Dicyclohexyl butane	-
4	12.232	1.44	Eicosane	Biodegradation, antifungal
5	12.310	2.12	Eicosane,2,4-dimethyl	Antifungal, antibacterial, antitumor and cytotoxic effects
6	12.561	1.61	Heptadecane,3-methyl	-
7	12.905	21.31	Heneicosane	-
8	13.099	3.32	Tridecane,4-cyclohexyle	-
9	14.427	0.57	Hexadecane,2,6,10,14-tetramethyle	-
10	14.506	1.06	Eicosane,2,4-dimethyl	Antifungal, antibacterial, antitumor and cytotoxic effects
11	14.741	0.90	3-methyl nonadecane	-
12	14.914	0.63	Dibutyle phtalat	Antifungal
13	15.041	7.51	n- Eicosane	-
14	15.283	1.66	Eicosane2-cyclohexyle	-
15	16.988	2.17	Eicosane	Biodegradation, antifungal
16	17.265	0.65	2-cyclohexyle Eicosane	-
17	18.773	0.52	Tetracosane	-

*Bacillus* را گسترش می‌دهد. عوامل محیطی بر متابولیسم ثانویه میکروبی تأثیر می‌گذارد. استرس، گرسنگی یا مواد مغذی مکمل مانند اسیدهای آمینه، فسفات، نیتروژن و غیره، تأثیرات زیادی بر تولید متابولیت‌های ثانویه دارد. رشد ارگانسیم‌های تولید کننده آنتی‌بیوتیک در حضور کم غلظت ترکیبات آلی منجر به تغییرات کمی و کیفی در تولید متابولیت ثانویه می‌شود. (Chen et al., 2000). اندوفیت جدا شده دیگر متعلق به جنس *Streptomyces* بوده که

گونه‌های باسیلوس (*Bacillus spp.*) منبع نسبتاً فراوانی از داروهای ضد میکروبی هستند زیرا بسیاری از گونه‌های این جنس پپتیدهای ضد میکروبی را سنتز می‌کنند. این باکتری‌ها به طور کلی منبع جدید و غنی متابولیت‌های ثانویه هستند که باید مورد بررسی قرار گیرند. این متابولیت‌های ثانویه فعالیت‌های ضد قارچی و ضد باکتریایی قوی از خود نشان می‌دهند و باکتری را قادر می‌سازد در محیط طبیعی خود زنده بماند (Stein, 2005). این یافته‌ها اهمیت صنعتی بالقوه

غنی متابولیت‌های ثانویه جدید با فعالیت‌های بیولوژیکی و سطح بالایی از تنوع شیمیایی هستند. در این مطالعه، گونه‌های اندوفیت جدا شده از گیاه دارویی مرزه خوزستانی، باعث مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی شد. تحقیقات بیشتری باید برای جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیکی از اندوفیت‌های باکتریایی با فعالیت ضد میکروبی برای تولید دارو و استفاده در صنایع دیگر مانند کشاورزی، مواد غذایی و آرایشی انجام شود.

دارای ترکیبات متعدد آنتی‌میکروبی می‌باشد. اکثر گونه‌های *Streptomyces* توانایی سنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه بیولوژیکی فعال مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها، مهارکننده‌های ضد انگلی و آنزیم‌ها را دارند. از بین این ترکیبات آنتی‌بیوتیک‌ها از نظر درمانی بسیار مهم‌تر هستند و تقریباً یک سوم آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده از گونه‌های *Streptomyces* جدا شده‌اند ( Mendaz & Salar, 2009). ثابت شده‌است که باکتری‌های اندوفیت منبع

جدول ۱۰- تجزیه و تحلیل GC-MS عصاره‌های خام *B. megaterium* مرتبط با *Satureja khuzestanica*

Table 10. GC-MS analysis of crude *B. megaterium* extracts related to *Satureja khuzestanica*

Peak	RT (min)	Area %	Name of the Compound	Biological Activity
1	12.905	5.67	Eicosane	-
2	14.367	51.32	Methyl Hexadecanoate	-
3	14.573	3.80	Methylox	-
4	14.920	1.67	Dibutyle phtalat	Antifungal, antibacterial, antiviral, antioxidant activities
5	15.044	2.33	Hexadecane	Antifungal, Antibacterial, antioxidant activity
6	15.085	1.67	Cyclododecasiloxane, tetracosamethyl	-
7	16.226	2.63	Methyl oleate	-
8	16.340	1.28	Octadecamethyl-cyclononasiloxane	-
9	16.395	29.63	Stearic acid, methyl ester	-

جدول ۱۱- تجزیه و تحلیل GC-MS عصاره‌های خام اندوفیت *Streptomyces cavourensis* مرتبط با *Satureja khuzestanica*

Table 11. GC-MS analysis of crude *Streptomyces cavourensis* extracts related to *Satureja khuzestanica*

Peak	RT (min)	Area %	Name of the Compound	Biological Activity
1	9.111	12.33	2-hydroxy ethyl acetate	-
2	9.292	33.53	O-xylene	Antifungal, Antioxidant and antimicrobial
3	9.873	12.38	M-xylene	-
4	10.495	24.28	Thiacyclopentan-3-ol	-
5	16.903	8.37	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl	Antifungal properties
6	19.247	9.21	Cyclopentasiloxane, tetradecamethyl	Antiperspirants and deodorants. Antibacterial, Antifungal



## REFERENCE

- Ahsan, T., Chen, J., Zhao, X., Irfan, M., & Wu, Y. (2017). Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. *AMB Express*, 7 (1):54. [https://doi: 10.1186/s13568-017-0351-z](https://doi.org/10.1186/s13568-017-0351-z).
- Akerele, O., Heywood, V., & Syngé, H. (1991). Conservation of Medicinal Plants. Cambridge University Press Ltd, Cambridge. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511753312>.
- Alvin, A., Miller, K. I., & Neilan, B. A. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*, 169(7-8), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.12.009>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5–16. <https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl1.5>
- Awla, H. K., Kadir, J., Othman, R., Rashid, T. S., & Wong, M.Y. (2016). Bioactive compounds produced by *Streptomyces* sp. isolate UPMRS4 and antifungal activity against *Pyricularia oryzae*. *American journal of plant sciences*, 7(7), 1077. <https://doi:10.4236/AJPS.2016.77103>
- Bajguz, A. (2007). Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(2), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.01.002>
- Bhardwaj, A., Sharma, D., Jadon, N. & Agrawal, P. K. (2015). Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Archive of Journal of Clinical Microbiology*, 53(6), 1-9. ISSN 1989-8436
- Cai, Y. Z., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157–2184. <https://doi: 10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Cantino, P. D., Harley, R. M., & Wagstaff, S. J. (1992). Genera of Labiateae: Status and classification. In Harley, R.M & Reynolds, T (Eds). *Advances in Labiateae science* (511-522). Kew Royal Botanical Gardens, Richmond.
- Chen, G., Wang, G. Y. S., Li, X., Waters, B., & Davies, J. (2000). Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *The Journal of Antibiotics* 53(10), 1145-1153, <https://doi: 10.7164/antibiotics.53.1145>.
- Elander, R. P. (2003). Industrial production of betalactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 385–392. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1274-y>
- Endo, A. (2010). A historical perspective on the discovery of statins. Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, *Physical and Biological Sciences*, 86(5), 484–493. <https://doi: 10.2183/pjab.86.484>
- Geddes, C. C., Nieves, I. U., & Ingram, L. O. (2011). Advances in ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.012>

Jalaluldeen, A. M., Sijam, K., Othman, R., & Ahmad, Z. A. M. (2015). Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected *Streptomyces* species isolated from the Rhizosphere of Chili Plant. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 4(1), 1–8. ISSN: 2319-7463.

Jamzad, Z. (1996). *Satureja rechingeri* (Labiatae). a new species from Iran. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien 98 B Supplement-90 Jahre K.H. Rechinger*. 75–77. [https://www.zobodat.at/pdf/ANNA\\_98BS\\_0075-0077.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/ANNA_98BS_0075-0077.pdf)

Kamber, T., Lansdell, T. A., Stockwell, V. O., Ishimaru, C. A., Smits, T. H. M., & Duffy, B. (2012). Characterization of the biosynthetic operon for the antibacterial peptide herbicolin in *Pantoea vagans* biocontrol strain C9-1 and incidence in *Pantoea* species. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 78(12), 4412–4419. <https://doi: 10.1128/AEM.07351-11>

Kavita, R., & Mohiden, A. U. (2017). Identification of Bioactive Components and Its Biological Activities of *Abelmoschas moschatus* Flower Extrtact-A Gc-Ms Study. Conference Proceedings. @inproceedings{Kavitha2017IdentificationOB.

Khattab, A. I., Babiker, E. H., & Saeed, H. A. (2016). *Streptomyces*: isolation, optimization of culture conditions and extraction of secondary metabolites. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 5, 27–32. <https://doi:10.3329/ICPJ.V5I3.26695>.

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology Journal*, 13(4), 345–351. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2).

Kitov, P. I., Mulvey, G. L., Griener, T. P., Lipinski, T., Solomon, D., & Paszkiewicz, E. (2008). In vivo supra molecular templating enhances the activity of multivalent ligands: a potential therapeutic against the *Escherichia coli* O157 AB5 toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105(44), 16837–16842. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804919105>.

Maroyi, A. (2018). *Dicoma anomala* sond.: a review of its botany, ethnomedicine, phytochemistry and pharmacology. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(6), 70–77. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i6.25538>.

Merino, S. T., & Cherry, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 95–120. [https://doi.org/10.1007/10\\_2007\\_066](https://doi.org/10.1007/10_2007_066).

Mitsubishi, S. (2014). Current topics in the biotechnological production of essential amino acids, functional amino acids, and dipeptides. *Current Opinion in Biotechnology Journal*, 26, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.020>.

Mozaffarian, V. (2005). Trees and shrubs of Iran. *Farhang Mosavar Publ., Tehran, Iran*. (in farsi) . ISBN-13 : 978-9648637038.

Muzzamal, H. (2012). Isolation, Identification and screening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm formers. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(1), 249–257. <https://www.researchgate.net/publication/286164875>.

- Narasaiah, B. C., Leelavathi, V., Sudhakar, G., Mariyadasu, P., Swapna, G. & Manne, A. K. (2014). Isolation and structural confirmation of bioactive compounds produced by the strain *Streptomyces albus* CN-4. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9, 49–54.
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 250-693. [https://doi: 10.1155/2014/250693](https://doi:10.1155/2014/250693).
- Olano, C., Mendaz, C., & Salar, J. A. (2009). Antitumour compounds from marine actinomycetes, marine drugs. *Marine Drugs*, 7(2), 210–248. [https://doi: 10.3390/md7020210](https://doi:10.3390/md7020210)
- Petrova, D. H. & Shishkov, S. A. (2006). Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: purification and some properties. *Journal Basic Microbiology*, 46(4), 275-85. [https://doi: 10.1002/jobm.200510063](https://doi:10.1002/jobm.200510063).
- Pissuwan, D., Valenzuela, S. M., & Cortie, M. B. (2006). Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 24(2), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.12.004>.
- Qin, S., Miao, Q., Feng, W., Wang, Y., Zhu, X., & Xing, K. (2015). Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Applied Soil Ecology*, 93, 47–55. [https://doi: 10.1016/j.apsoil.2015.04.004](https://doi:10.1016/j.apsoil.2015.04.004).
- Rechinger, K. H. (1982). *Satureja*. Flora Iranica: Flora Desiranischen Hochlandes and der Umrahmenden Gebirge. Akademische Druku Verlags Antalt Graz, Austria, 150, 495-504.
- Rosa, J. P., Tibúrcio, S. R., Marques, J. M., Seldin, L. & Coelho, R. R. (2016). *Streptomyces lunalinharesii* 235 prevents the formation of a sulfate-reducing bacterial biofilm. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 603-609. [https://doi: 10.1016/j.bjm.2016.04.013](https://doi:10.1016/j.bjm.2016.04.013).
- Ryan, R. P. K., Germaine, A., Franks, D. J., Ryan, & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1–9. <https://doi:10.1111/J.1574-6968.2007.00918.X>.
- Sathiyarayanan, G., Gandhmathi, R., Sabarathnan, B., SeghalKiran, G., & Selvin J. (2014). Optimization and production of pyrrolidon antimicrobial agent from marine sponge-associated *Streptomyces* sp. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(3), 561-573. [https://doi: 10.1007/s00449-013-1023-2](https://doi:10.1007/s00449-013-1023-2).
- Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (2001). Laboratory Guide For Identification Of Plant Pathogenic Bacteria. *American Phytopathological Society*. Paul, MN. pp. 398.
- Shaligram, N. S., & Singhal, R. S. (2010). Surfactin- a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 119–134. ISSN 1330-9862.
- Shetty, K., & Labbe, R. G. (1998). Food-borne pathogens, health and role of dietary phytochemicals. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 7 (3/4), 270-276. PMID: 24393682.

Silic, C. (1979). Monografija rodova *Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Benthams, *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. u flori Jugoslavije. Zemaljski muzej BiH, Sarajevo. (in Serbian).

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-57. <https://doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>

Subbulakshmi, G. K., Thalavaipandian, A., Bagyalakshmi, R. V., & Rajendran, A. (2012). Bioactive endophytic fungal isolates of *Biota orientalis* (L) Endl., *Pinus excelsa* Wall. and *Thuja occidentalis* L. *International Journal of Advanced Life Sciences*, 4,9–15. ISSN: 2277-758X

Sunkar, S., & Nachiyar, C. V. (2012). Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(12), 953–959. [https://doi: 10.1016/S2221-1691\(13\)60006-4](https://doi: 10.1016/S2221-1691(13)60006-4)

Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4), 448-459. <https://doi: 10.1039/B100918O>.

Valli, S., Suvathi, S. S., Aysha, O., Nirmala, P., Vinoth, K. P. & Reena, A. (2012). Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 469-73. [https://doi: 10.1016/S2221-1691\(12\)60078-1](https://doi: 10.1016/S2221-1691(12)60078-1).

Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck, P. R., Broughton, M. C., Turner J. & Madduri, K. (2001). Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. *Chemistry & Biology*, 8, 487–499. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00029-1)

Wendisch, V. F. (2014). Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.05.004>.

Yeates, C. Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N. & Veal, D. A. (1997). PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 303–307. <https://doi: 10.1046/j.1472-765X.1997.00232.x>.

Yoon, Y. J., Kim, E. S., Hwang, Y. S. & Choi, C. Y. (2004). Avermectin: biochemical and molecular basis of its biosynthesis and regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 626–634. <https://doi: 10.1007/s00253-003-1491-4>



© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



## Isolation and identification of endophytic bacteria from *Satureja Khuzestanica* and evaluation of its secondary metabolites for antimicrobial activity against plant pathogenic bacteria

M. Omidi Nasab<sup>1</sup>, G. Khodakaramian\*<sup>2</sup>

1. Ph.D. candidate Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran
2. \*Corresponding Author: Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran (khodakaramian@yahoo.com)

Received: 25 September 2021

Accepted: 4 September 2022

### Abstract

#### Background and Objectives

In many parts of the world, medicinal plants have been used as an alternative medicine to promote human health and longevity since ancient times. Microbes residing within plant tissues are known as endophytes. The compounds produced by these microbes have the potential to be employed in modern medicine, agriculture, and other industries. Endophytic bacteria isolated from medicinal plants are valuable sources of novel bioactive compounds with diverse activities, including antimicrobial, anticancer, and antiviral properties. This study aimed to isolate, identify, and screen endophyte bacteria with antimicrobial activity against plant pathogenic bacteria. Aromatic plants such as *Satureja khuzestanica* are utilized in traditional medicine due to their secondary metabolites, but data regarding its naturally occurring bacterial endophytes is limited.

#### Materials and Methods

In the current study, 17 strains of bacterial endophytes were isolated in a Tryptic Soy Agar medium from the medicinal plant *Satureja khuzestanica*. Based on sequencing the *16S rRNA* encoding gene, researchers isolated bacterial strains from the *Bacillus*, *Streptomyces*, and *Pseudomonas* genera with the highest activity against plant pathogenic bacteria. Under standard conditions, these endophytic bacteria's bioactive secondary metabolites were extracted with ethyl acetate and analyzed using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The mass spectra of the compounds were compared to the National Institute of Standards and Technology (NIST) library's database. Moreover, microbroth dilution techniques were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) values for five different bacteria species.

#### Results

The GC-MS analysis revealed the presence of a number of compounds, including dibutyl phthalate (DBP), eicosane, octadecanoic acid, hexadecanoic acid, and hexadecane 1,4-dicyclohexylbutane. Four of the selected bacterial endophytes exhibited antimicrobial activity against three plant pathogens: *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum subsp., carotovorum*, and *Clavibacter insidiosus*. Data analysis revealed significant differences in antimicrobial activity, with the minimum inhibitor concentration ranging from 0.312 mg/ml to 2.5 mg/ml. Furthermore, we identified bioactive secondary metabolites with reported

biological activities in antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant properties with biotechnological applications in medicine, agriculture, and other industries based on an endophytic crude extract data analysis.

### **Conclusion**

Our findings shed new light on the antimicrobial properties of naturally occurring bacterial endophytes in *S. khuzestanica*.

**Keyword:** *antioxidant, crude extract, biological activity, pathogenic agents*

---

Associate editor: M. M. Faghihi (Ph.D.)

**Citation:** Omid Nasab, M. & Khodakaramian, G. (2022). Isolation and identification of endophytic bacteria from *Satureja Khuzestanica* and evaluation of its secondary metabolites for antimicrobial activity against plant pathogenic bacteria. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(3), 43-62. <https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17738>.