کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورۀ ۸، شمارۀ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۸ (۹۹-۸۷)
DOI: 10.22059/jbioc.2019.263742.239

بررسی اثر سویه‌های باکتری *Enterococcus faecium* شیره بلوط ایرانی در کنترل‌زیستی بیمارگرهای گیاهی

ندا کلانتری[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲*]، مصطفی درویش‌نیا[۳]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲. استاد بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۳. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۲٤- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰٤/۱۲)

چکیده

قارچ‌های و باکتری‌های بیمارگر، گیاهان را آلوده می‌کنند و سبب بروز بیماری‌های مهم و ایجاد خسارت‌های اقتصادی می‌شوند. استفاده از باکتری‌های مفید اسید لاکتیک به دلیل تولید و ترشح ترکیبات ضدمیکروبی، برای کنترل انواع مختلف بیمارگرها گیاهی و انسانی مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضد قارچی و باکتریایی مواد مترشحه از باکتری‌های *Enterococcus faecium* سویه‌های Kx185055 و Kx185054 جداسازی شده از شیره درخت بلوط ایرانی، علیه قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* و باکتری‌های *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens و *Pseudomonas syringae* pv. tomato بود. مواد مترشحه از باکتری‌های Kx185055 و Kx185054، به محیط کشت قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر اضافه شد و هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف مواد مترشحه باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که هر دو سویه باکتری *Enterococcus faecium* دارای خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی معنی‌داری بودند. تصاویر میکروسکوپ الکترونی ریسه و اسپور قارچ‌ها و همچنین سلول‌های باکتریایی نشان داد که مواد مترشحه باکتری‌های *Enterococcus faecium* سبب تخریب ریسه و تغییر شکل اسپور قارچ‌ها و همچنین تخریب سلول‌های باکتریایی می‌گردند. به طورکلی نتایج این مطالعه توانایی این دو سویه باکتری را در کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی و باکتریایی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: باکتری اسید لاکتیک، ضد میکروبی، کنترل زیستی، میکروسکوپ الکترونی.

The potential of *Enterococcus faescium* strains isolated from Iranian Oak sap to control plant pathogens

Neda Kalantari[1], Farhad Nazarian-Firouzabadi[2*], Mostafa Darvishnia[3]
1. Ms.C Student in Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2. Professor in Plant Biotechnology, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3. Associate Professor in Plant Protection, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
(Received: November 15, 2018 - Accepted: July 3, 2019)

ABSTRACT

Pathogenic fungi and bacteria infect plants and inflict important diseases leading to major economic losses. The use of beneficial Lactic Acid Bacteria (LAB) in controlling different type of human and plant pathogens, has drawn worldwide attention. The aim of this study was to assess the antifungal activity of secreted substances from two newly isolated strains of *Enterococcus faecium* (Kx185054 and Kx185055) from Persian oak tree sap in controlling *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani* fungi and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens and *Pseudomonas syringae* pv. tomato bacteria. Secreted substances from *Enterococcus faecium* strains were added to the fungi and bacteria culture media at different concentrations and the inhibition zone was recorded in three replicates. Results of this experiments together with that of scanning electron microscopy imaging revealed that secreted substances had a significant antimicrobial activity. Fungal mycelia/spores and bacterial cells became deformed, shrunken, and distorted following treatment with secreted substances from *Enterococcus faecium* strains, suggesting that *Enterococcus faecium* secretes antimicrobial chemicals/peptides preventing fungal strictures from germination, growth and penetration. The results of this study may help in elucidating the potentials of newly isolated *Enterococcus faecium* strains from oak tree and identifying the genes coding for antifungal peptides.

Keywords: Antimicrobial, Biological Control, Electron Microscopy, Lactic Acid Bacteria.

* Corresponding author E-mail: nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

میکروارگانیسم‌های درون‌رست (Endophyte) متعددی با گیاهان زندگی می‌کنند که نقش مهمی در پایداری اکوسیستم از راه کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی دارند (Abdallah *et al.* 2016, Herrera *et al.* 2016, Terhonen *et al.* 2018). موجودات درون‌رست از جمله باکتری‌ها، برای کمک به میزبان گیاهی خود به روش‌های مختلفی مانند؛ (۱) مصرف سریع مواد غذایی در دسترس بیمارگرها، (۲) تولید متابولیت‌های ثانویه مفیدی مانند فیتوهورمون-های گیاهی، (۳) تولید مواد آنتاگونیستی کارآمد و (۴) تحریک سیستم ایمنی گیاه میزبان با بیمارگرهای گیاهی بیماریزا مقابله می‌کنند (Terhonen *et al.* 2018). باکتری‌ها و قارچ‌های از جمله دو گروه از درون‌رست‌های مهم گیاهان محسوب می‌شوند (Rosenblueth and Martínez-Romero 2006) که نه تنها آنها را از بین نمی‌برند، بلکه زمینه تکثیر آنها را با در اختیار قرار دادن مواد لازم فراهم می‌آورند (Zgadzaj *et al.* 2015). اگرچه تنها تعداد محدودی از میکروارگانیسم‌ها قادرند به صورت درون‌رست زندگی کنند (Bulgarelli *et al.* 2013, Sessitsch *et al.* 2012)، اما باکتری‌های اسید لاکتیک را باید از مهمترین باکتری‌های درون‌رست گیاهان به شمار آورد که تقریبا با تمام گیاهان زندگی می‌کنند (Reiter *et al.* 2002). باکتری‌های اسید لاکتیک میکروارگانیسم‌هایی گرم مثبت، تخم مرغی شکل، غیرهاگ‌زا، بی‌هوازی اختیاری با احتیاجات غذایی پیچیده‌ای هستند (Devriese *et al.* 1995, Gomes *et al.* 2008) که در صنعت، کشاورزی و صنایع دارویی و پزشکی بسیار حائز اهمیت می‌باشند. این باکتری‌ها به جنس‌های مختلف *Bifidobacterium*، *Enterococcus*، *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Leuconostoc*، *Pediococcus* و *Streptococcus* تعلّق دارند. باکتری‌های اسیدلاکتیک به دلیل توانایی بالای مقاومت به شرایط اسیدی، در محیط‌های متنوع، در محصولات و شرایط مختلفی گسترش یافته‌اند. این باکتری‌ها با تولید مواد میکروب کشی مانند H_2O_2، ترکیبات فنولی، اسیدهای آلی و اسیدهای چرب از خود خاصیت ضد میکروبی نشان می‌دهند (Gajbhiye and Kapadnis 2016). همچنین این باکتری‌ها قادر به تولید باکتریوسین‌های (Bacteriocin) اختصاصی هستند. باکتریوسین‌ها، پپتیدهای کوچکی هستند که با فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی خود قادرند بسیاری از پاتوژن‌های بیماری زا را نابود کنند. این پپتیدها عمدتاً توسط *Enterococcus faecium*، *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus mundtii* تولید و به بیرون از غشاء باکتری ترشح می‌شوند (Zacharof and Lovitt 2012). پپتیدهای ضدمیکروبی با غشاء سیتوپلاسمی قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا درگیر شده و سبب ایجاد منافذ هدایت کننده یون‌ها در غشاء و افزایش میزان نفوذپذیری غشاء سلول هدف و در نهایت مرگ سلول هدف می‌شوند (Nguyen *et al.* 2011). بررسی‌های متعدد نشان می‌دهند که مواد مترشحه از باکتری‌های اسیدلاکتیک به ویژه جنس *Enterococcus* قادرند از رشد قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر گیاهی جلوگیری کنند.

روش‌های گوناگونی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی وجود دارد که از این میان می‌توان به بهنژادی، تناوب زراعی، استفاده از سموم شیمیایی و کنترل زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های متعدد اشاره کرد (Hell and Mutegi 2011). استفاده از سموم شیمیایی و کشت ارقام مقاوم دو راهکار اصلی مبارزه با این عوامل بیماری‌زا هستند. با توجه به آنکه استفاده بیش از حد از مواد شیمیایی در کشاورزی، سبب آلودگی محیط زیست می‌گردد و همچنین بیمارگرهای گیاهی نیز به سرعت نسبت به آفت کش‌های شیمیایی مقاومت حاصل

می‌کنند(Paulitz and Bélanger 2001)، لذا به نظر می‌رسد که استفاده از کنترل زیستی و به نژادی مولکولی از طریق تولید ارقام مقاوم به بیماری، روش‌های جایگزین مناسبی برای جلوگیری از مصرف سموم شیمیایی باشند. برای مثال، تاکنون تاثیر باکتری‌های *Bacillus subtilis*، گونه‌های جنس‌های *Pseudomonas*، *Burkholderia*، *Lysobacter*، *Serratia*، *Pantoea*، *Curtobacterium* و *Sphingomonas* و همچنین قارچ *Trichoderma viride* و مخمر *Pichia guilliermondii* برای کنترل زیستی قارچ‌های *Alternaria solani* و *Fusarium oxysporum* مورد بررسی قرار گرفته و اثرات ضدمیکروبی انها به اثبات رسیده است (Babu *et al.* 2000, Franco *et al.* 2011, Gajbhiye and Kapadnis 2016, Hamed 2011, Zhao *et al.* 2008). گزارش‌های از خاصیت ضد قارچی باکتری *Enterococcus faecium* جداسازی شده از گندم (Djaaboub *et al.* 2018)، درخت موز (Sekhar and Thomas 2015)، انگور (Piccolo *et al.* 2016) و ... در دست است که نشان می‌دهند باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله کاندیداهای ارزشمندی برای کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها هستند. دو جنس از قارچ‌های بیمارگر گیاهی یعنی *Alternaria solani* و *Fusarium oxysporum* به ترتیب باعث ایجاد بیماری لکه‌موجی و پژمردگی در گیاهان متعددی مانند گوجه فرنگی، سیب زمینی، بقولات، خانواده گندمیان، میخک، بسیاری از سبزیجات و سایر گیاهان در تمام مراحل رشد می‌شوند. میزان خسارت وارده به محصولات کشاورزی توسط این دو قارچ بسیار زیاد است. اگرچه برخی از ارقام و واریته‌های گیاهان زراعی به این قارچ‌ها مقاومت نسبی نشان می‌دهند، اما تنوع گونه‌های قارچی و نوترکیبی‌های ژنتیکی سبب شکسته شدن مقاومت در میزبان‌های گیاهی می شود. گوجه فرنگی و لوبیا دو محصول زراعی هستند که نقش عمده‌ای در صنعت مواد غذایی ایفا می‌کنند، با این حال، این محصولات خسارات زیادی در حین مراحل مختلف کاشت، انبارداری تا عرضه به بازار متحمل می‌شوند (Solomon 2006). گیاه گوجه فرنگی توسط انواع متعددی از بیماری‌های گیاهی از جمله بیماری خالزدگی گوجه فرنگی مواجهه می‌شود که توسط باکتری (Pst) *Pseudomonas syringae* pv.tomato ایجاد می‌شود. با توجه به بذرزاد بودن این بیماری، احتمالاً در اکثر نقاط جهان پراکنده است. باکتری گرم مثبت *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens (Cff) پژمردگی باکتریای لوبیا را به وجود می‌آورد این بیماری باعث بروز مشکل جدی برای تولید محصول لوبیا می‌شود.

از انجایی که در مطالعه قبلی نشان دادیم که باکتری‌های اسید لاکتیک *Enterococcus faecium*، Kx185055 و Kx185054 غیر بیماریزا هستند و به خوبی می‌توانند به عنوان درون‌رست در بافت‌های گیاهی زندگی کنند (Mousavi *et al.* 2017)، لذا به نظر می‌رسید که بتوانند به عنوان یک مزیت با ترشح مواد میکروبکش از گیاهان در مقابل بیمارگرهای گیاهی دفاع نمایند. لذا هدف از این مطالعه بررسی خاصیت کنترل زیستی چنین باکتری‌های اسید لاکتیکی علیه تعدادی از بیمارگرهای گیاهی بود.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری‌ها و قارچ‌ها

در این مطالعه، از محیط کشت‌های MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) (De Man j 1960) و دکستروز سیب زمینی آگار به ترتیب برای کشت باکتری‌های و قارچ‌ها استفاده شد. این قارچ‌ها و باکتری‌ها از گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان دریافت شدند. برای تهیه محیط کشت دکستروز سیب زمینی آگار، ابتدا یک سیب زمینی به اندازه‌ی ۲۰۰ گرم پوست‌کنی شد و سپس در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب به

مدت ۲۰ دقیقه جوشانده و سپس آب سیب زمینی از یک صافی عبور داده شد. در نهایت حجم آب سیب زمینی به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در مرحله بعد، به ازای هر ۵۰۰ میلی‌لیتر آب سیب زمینی، مقدار ۱۰ گرم آگار به همراه ۱۰ گرم ساکارز به محلول اضافه گردید و محلول به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد.

کشت و جداسازی مواد مترشحه از باکتری *Enterococcus faecium*

در این آزمایش از دو سویه‌ی باکتری *Enterococcus faecium* به اسامی Kx185055 و Kx185054 استفاده گردید که قبلاً از شیره درخت بلوط ایرانی جداسازی شده بودند (Mousavi *et al.* 2017). ابتدا سویه‌های Kx185055و Kx185054 به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C کشت شدند. سپس کشت باکتری به مدت ۳۰ دقیقه با ۴۰۰۰rpm در دمای ۴°C سانتریفیوژ گردید. مایع رونشین از کشت باکتری‌ها جداسازی شد و یکبار دیگر برای حذف باکتری‌ها و ذرات دیگر، عمل سانتریفیوژ با ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سرانجام، جهت تخلیص مایع رونشین باکتری، مایع رونشین بعد از سانتریفیوژ، از فیلتر مخصوص ۰/۱µm عبور داده شد تا در نهایت مواد مترشحه خالص برای بررسی اثرات ضدمیکروبی به دست آید.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های باکتری *Enterococcus faecium* علیه قارچ‌های بیمارگر

در این آزمایش، از روش اختلاط با محیط کشت جهت ارزیابی اثر ضدقارچی استفاده شد. ابتدا غلظت‌های ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌مول از مواد مترشحه از باکتری‌ها در حجم ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت دکستروز سیب زمینی آگار تهیه و در پتری دیش‌ها ریخته شد. سپس پلاگ قارچ‌ها از کشت یک هفته‌ای آنها تهیه و روی محیط‌های کشت با غلظت‌های متفاوت ذکر شده از مواد مترشحه از باکتری‌ها قرار گرفت. سپس قطر میسلیوم قارچ‌ها پس از آنکه سطح محیط کشت در پتری شاهد اشغال شد، در حداقل سه پتری دیش به عنوان تکرار، پس از گذشت یک هفته کشت در دمای ۲۶±۲°C با استفاده از کولیس، در چند جهت اندازه گیری و میانگین آن‌ها محاسبه و ثبت گردید (Deans and Svoboda 1990). تیمار شاهد دارای تمام شرایط برای آزمایش بود بجز اینکه به جای اضافه کردن مواد مترشحه از باکتری‌ها، مقدار یک میلی‌لیتر آب استریل به محیط کشت اضافه گردید.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های باکتری *Enterococcus faecium* باکتری‌های بیمارگر

به دیسک‌های کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر میزان۱۰۰ میکرولیتر با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌مول از مایع رونشین باکتری‌های *Enterococcus faecium* اضافه شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا کاملاً خشک شوند. در این روش از سوسپانسیون باکتری‌های بیماریزای کشت داده شده در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار استفاده شد، سپس دیسک‌های آغشته به محلول رونشین باکتری‌ها با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شدند. در مرحله بعد، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵±۲°C انکوبه شدند. سپس، قطر هاله عدم رشد باکتری بیمارگر گیاهی در سه تکرار اندازه‌گیری شدند.

بررسی تاثیر مواد مترشحه برروی قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر با میکروسکوپ الکترونی

برای آماده‌سازی نمونه جهت عکس‌برداری میکروسکوپ الکترونی از روش موسوی و همکاران استفاده شد (Mousavi *et al.* 2017). به صورت خلاصه، ابتدا قارچ‌های مورد مطالعه در محیط دکستروز سیب زمینی آگار به مدت ۴ روز کشت داده شدند.

سپس از مواد مترشحه خالص شده از باکتری‌ها به میزان۱۰۰ میکرولیتر با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌مول بر روی پلاگ قارچی (۱ cm^2) تزریق شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ °C قرار داده

شد. برای تیمار شاهد از بافر فسفات به جای مواد مترشحه از باکتری‌ها استفاده شد. در مرحله بعد، پلاگ قارچی به مدت ۲۴ ساعت در فریز ۸۰°C – قرار داده شد. سپس عصاره‌های منجمد شده به مدت چند ساعت در دستگاه فریزدرایر قرار داده شدند تا کاملاً فیکس شوند. از عصاره‌های فیکس شده جهت تهیه عکس میکروسکوپی استفاده شد. در مورد باکتری‌ها، ابتدا باکتری‌ها در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و مایع رونشین آن دور ریخته شد. سپس رسوب ته نشین شده در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و بار دیگر در ۴۰۰۰ rpm مجددا سانتریفوژ شدند تا بقایای محیط کشت حذف شود.

به رسوب باکتری مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول گلوتارآلدهید و بافر فسفات اضافه شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق سپس به مدت یک شب در دمای ۴ °C نگهداری شدند. سپس این محلول مجددا در ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رونشین دور ریخته شد و شستشو رسوب باقی‌مانده با استفاده از اتانول ۵۰ و ۷۰ درصد و نگهداری هر کدام به مدت یک ساعت و نیم در دمای ۲۰- °C و اتانول ۸۵، ۹۵ و ۱۰۰ درصد و نگهداری هر کدام به مدت یک ساعت در دمای ۴ ° C انجام شد. پس از آخرین مرحله شستشو رسوب باکتری به مدت ۳-۲ ساعت در دمای ۳۷ ° C قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. در مرحله بعد، قارچ‌ها و باکتری‌های تثبیت شده با استفاده از دستگاه Desk sputter coater-DSR1 با نانو ساختارهای طلا پوشش داده شدند. در نهایت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مدل FE SEM/Mira3 Lmu و HV=20KV عکس-برداری از سطح قارچ‌ها و باکتری‌ها با بزرگنمایی‌های مختلف انجام شد.

آنالیزهای آماری

آنالیز آماری تیمارهای مربوط به آزمایش‌های قارچی در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار با استفاده از نرم افزار MSTATC و9.1 SAS انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطوح معنی‌دار مربوط برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تاثیر دو سویه باکتری *Enterococcus faecium* روی قارچ‌های بیمارگر

باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید ترکیبات شیمیایی و پپتیدهای ضد میکروبی از رشد و نمو سایر میکروارگانیسم‌ها به ویژه ریسه و اسپور قارچ‌های بیمارگر گیاهی جلوگیری می‌کنند (Gajbhiye and Kapadnis 2016). به عنوان مثال، باکتری‌های اسید لاکتیک لبنیات قادرند مانع رشد قارچ *Fusarium oxysporum* (Hamed *et al.* 2011)، گونه‌های مختلف *Fusarium* (Husain *et al.* 2017) و *Fusarium verticillium* (Kharazian *et al.* 2017) بشوند. نتایج تجزیه واریانس داده‌های قطر هاله بازدارنده از رشد قارچ‌ها در مطالعه حاضر نشان داد که مواد مترشحه از دو سویه جدید *Enterococcus faecium* تاثیر متفاوت و معنی‌داری ($P<0.01$) در بازدارندگی از رشد دو قارچ *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* داشتند (جدول ۱).

همچنین اثر غلظت‌های مختلف مواد مترشحه دو سویه باکتری بر قطر هاله بازدارنده از رشد قارچ‌ها معنی‌داری بود ($P<0.01$). این موضوع نشان داد که دو سویه از نظر پتانسیل تولید مواد ضد قارچی با هم متفاوت هستند و از زمینه ژنتیکی متفاوتی برخوردار می‌باشند. در تائید این موضوع، موسوی و همکاران (Mousavi *et al.* 2017) نشان دادند که سویه Kx185054 دارای توانایی تولید گاز CO_2 از گلوکز و سویه Kx185055 فاقد این توانایی است. این موضوع نشان می‌دهد که احتمالا این دو سویه از بسیاری از جنبه‌های دیگر مانند توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی نیز با هم تفاوت داشته باشند. با این حال، لازم است برای اثبات این موضوع آزمایش‌های بیشتری صورت بگیرد.

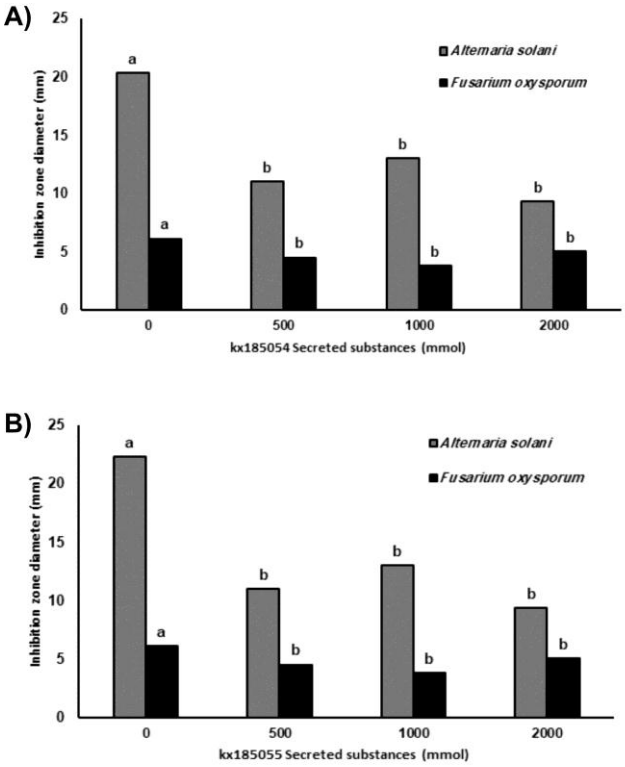
جدول ۱. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف مواد مترشحه از دو سویه باکتری *Enterococcus faecium* بر میزان بازدارندگی از رشد دو قارچ *Alternaria solani* و *Fusarium oxysporum*

different concentration of secreted substances from two strains of *Enterococcus faecium* on inhibition of *Alternaria solani* and *Fusarium oxysporum* fungi growth Table 1. Analysis of variance of

Source of variations	df	*Alternaria solani*	*Fusarium oxysporum*
CSS	3	62.5**	81.12**
TF	1	527.06**	374.69**
CSS×TF	3	45.18**	62.38
Error	16	0.58	0.5
CV(%)		8.49	8.46

CSS: Concentration of Secreted Substances; TF: Type of Fungus; ** Significant at P<0.01

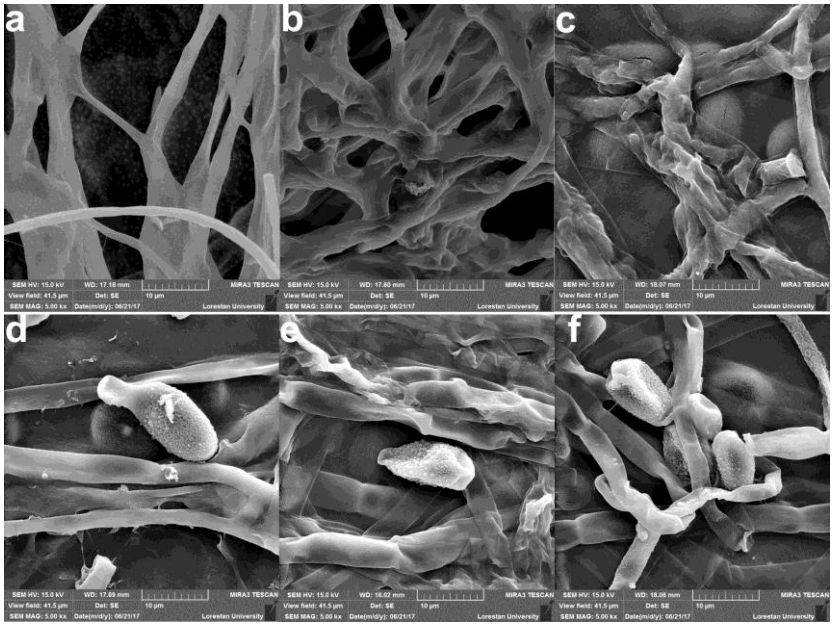
مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف سویه باکتری Kx185055 بر قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* نشان داد که قطر هاله بازدارنده از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* نسبت به *Alternaria solani* کمتر بود (شکل ۱). همچنین اثر غلظت‌های سویه دیگر باکتری (Kx185054) روند مشابهی را نشان داد. این نتایج نشان دهنده حساسیت بیشتر قارچ *Fusarium oxysporum* نسبت به قارچ *Alternaria solani* به سویه‌های باکتری مورد مطالعه می‌باشد. اگرچه دلیل واقعی این موضوع چندان مشخص نیست، اما گزارش‌های از حساسیت بیشتر گونه‌های *Fusarium* در مقایسه با گونه‌های جنس *Alternaria* وجود دارد (De Rodríguez *et al.* 2007).



شکل ۱. اثر ضد قارچی غلظت‌های مختلف مواد ضد قارچی مربوط به سویه‌های باکتری Kx185055 و Kx185055 بر رشد قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani*

Figure 1. The antifungal effect of secreted substances of Kx185055 and Kx185055 strains on the growth of *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani* fungi

مطالعات نشان می‌دهند که سویه‌های باکتری جنس *Strepomyces* از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* ممانعت می‌کنند (Mouloud *et al.* 2017, Yu *et al.* 2017). باکتری‌های این جنس با تولید مواد آنتی‌بیوتیکی و ترکیبات فرار قادرند از رشد میسیلیوم قارچ‌های بیمارگر جلوگیری کنند. توانایی باکتری اسید لاکتیک در ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی وگرم مثبت به خوبی شناخته شده است (Gajbhiye and Kapadnis 2016). این ممانعت احتمالاً به خاطر تولید اسیدهای آلی مانند؛ اسید استیک، پروکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها، سوبستراهای باکتریوسین شکل و بیوسورفکتانت در باکتری‌ها می‌باشد (Herrera *et al.* 2016). در یک تحقیق مشخص گردید که همانند نتایج این مطالعه، باکتری‌های اسید لاکتیک با باز دارندگی ۷۲ درصدی از رشد قارچ *Fusarium oxysporum* جلوگیری کردند. در شرایط آزمایشگاهی، قارچ *Fusarium oxysporum* در طی جوانه زنی بذر توسط باکتری‌های اسید لاکتیک مهار شد (Dhamale 2015). به نظر می‌رسد که سویه‌های مورد بررسی با تولید ترکیبات پپتیدی و شیمیایی مانع رشد قارچ‌های بیمارگر بشوند. به عنوان مثال، باکتری‌های اسید لاکتیک با توانایی لیپولیتیکی و پروتئولیتیکی خود و تولید اسید لاکتیک علیه باکتری‌ها و قارچ‌ها، مانع از فعالیت بیماری‌زایی آنها می‌شوند (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn 2010).



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی تیمار قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* با مواد مترشحه از دو سویه باکتری *Enterococcus faecium* جداسازی شده از شیره بلوط به همراه شاهدهای مربوطه. a و d شاهدهای *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* تیمار شده با بافر فسفات. b و e به ترتیب تیمار *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* با مواد مترشحه از باکتریKx185054. c و f به ترتیب تیمار *Fusarium oxysporum* و *Alternaria solani* با مواد مترشحه باکتریKx185055.

Figure 2. Scanning electron microscopy images of *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani* fungi treated with secreted substances from two strains of *Enterococcus faecium* isolated from oak tree sap and their corresponding controls. a and d, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani* controls treated with phosphate buffer. b and e, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani fungi* treated with secreted substances from Kx185054 strain, respectively. c and f, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria solani fungi* treated with secreted substances from Kx185055 strain, respectively.

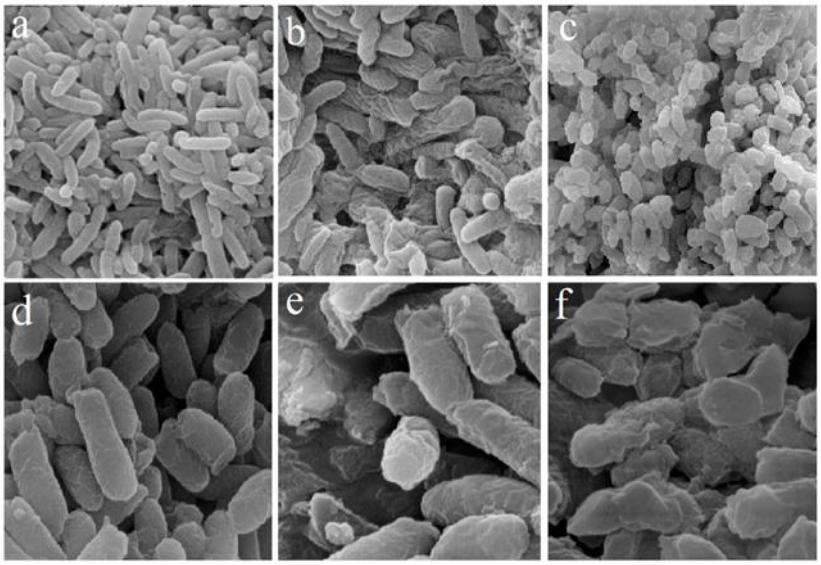
تصاویر میکروسکوپ الکترونی ریسه قارچ *Fusarium oxysporum* و ریسه و اسپور قارچ *Alternaria solani* نشان داد که مواد مترشحه از هر دو سویه باکتری *Enterococcus faecium* تاثیرات مهمی روی شکل ریسه‌ها و اسپورها به جای می‌گذارند (شکل۲). اگر چه در مواد مترشحه از باکتری‌ها پس از سانتریفیوژ و گذراندن از صافی ۰/۱ µm مواد و ترکیبات شیمیایی متعددی وجود دارند، اما به نظر می‌رسد که تخریب، قطعه قطعه شدن و در مجموع تغییر شکل ریسه و اسپور قارچ‌های بیمارگر ناشی از ترشح پپتیدهای ضد قارچی باشد (Wang *et al.* 2018). در تائید این موضوع، تیمار قارچ *Fusarium moniliforme* با برخی از پپتیدهای ضد میکروبی، نتایج مشابهی را در تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد (Han *et al.* 2017).

نتایج تاثیر دو سویه باکتری *Enterococcus faecium* روی دو باکتری بیمارگر *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens و *Pseudomonas syringae* pv. tomato

فعالیت ضد میکروبی مایع رونشین حاصل از کشت هر دو سویه‌ی باکتری‌های اسیدلاکتیک *Enterococcus faecium* علیه باکتری‌های بیمارگر با هر دو روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو سویه باکتری *Enterococcus faecium* همانند تاثیر بر روی قارچ-های بیمارگر، مانع رشد باکتری‌های بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. tomato و *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens شدند. هاله‌های تشکیل شده توسط این باکتری‌ها که بیانگر توانایی مهارکنندگی آن‌هاست، از ۸ تا ۱۱ میلی‌متر متغیر بود. باکتری KX185055 توانایی بیشتر و معنی‌داری ($P\leq0.01$) در مهار باکتری‌های بیمارگر نشان داد به طوری که هاله‌ای به قطر ۱۱ میلی‌متر بر روی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. tomato و هاله‌ای به قطر ۹ میلی‌متر بر روی باکتری *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens تشکیل شد. این درحالی بود که باکتری KX185054 هاله‌ای به قطر ۹ میلی‌متر بر روی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. tomato و هاله‌ای به قطر ۸ میلی‌متر بر روی باکتری *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens تشکیل دادند که از این نظر بین دو باکتری تفاوت معنی‌داری ($P\geq0.05$) وجود نداشت.

بطور کلی، نتایج مشاهدات میکروسکوپ الکترونی تأثیر مایع رونشین هر دو باکتری روی باکتری‌های بیمارگر نشان داد که جمعیت باکتری‌ها در غلظت‌های مورد مطالعه به شدت کاهش پیدا کرده‌اند. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، علائمی چون بهم چسبیدگی باکتری‌ها در اثر لیز شدن دیواره باکتری‌ها، کوچکتر شدن و غیر عادی شدن شکل باکتری‌ها رخ داد. تأثیر مایع رونشین باکتری‌ها به صورتی بود که شکل باکتری از حالت عادی (میله‌ای شکل) خارج شد و به شکل‌های بیضوی، گرد و نامنظم تغییر شکل پیدا کردند. همچنین دیواره باکتری چروکیده و پلاسیده شده بود. حالت‌های دیگری هم در بین باکتری‌های تیمار شده با مایع رونشین مثل حفظ شکل کلی باکتری، ولی چروکیدگی و پلاسیدگی دیواره در اشکال مشهود بود. این تغییرات در صورت استفاده از مایع رونشین سویه‌ی KX185055 محسوس‌تر بود، به نحوی که سلولهای باکتری کاملا تخریب و پلاسیده شدند و شکل میله‌ای باکتری‌ها و دیواره آنها از بین رفتند. در صورت استفاده از مایع رونشین سویه‌ی KX185054 شکل باکتری تا حدودی حفظ شده بود و بیشتر تغییرات بر روی دیواره سلولی باکتری مشاهده گردید (شکل ۳).در سال‌های اخیر توجه محققان به توانایی باکتری‌های *Enterococcus* به خاطر تولید باکتریوسین‌ها، طیف گسترده‌ی فعالیت مهارکنندگی رشد، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی باکتریوسین‌ها و کاربرد آن‌ها در پزشکی و مواد غذایی معطوف شده است (Strompfová *et al.* 2008). به عنوان مثال، عرضه محصولات حاوی باکتری‌های اسیدلاکتیک به بازار این امکان را به مصرف‌کنندگان داده است تا راه جدیدی برای بهره‌مندی از اثرات مفید این باکتری‌ها بیابند (Prasad *et al.* 1998). در این پژوهش مشخص

شد که هر دو سویه‌ی باکتری‌های اسیدلاکتیک *Enterococcus faecium* این مطالعه دارای خاصیت ضد باکتریایی روی باکتری‌های بیمارگر گیاهی *Pseudomonas syringae* pv. tomato و *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens بودند. استفاده از غلظت ۱۰۰۰ mM از مایع رونشین باکتری‌های *Enterococcus faecium* این مطالعه به خوبی توانست از رشد این دو باکتری بیمارگر جلوگیری به عمل آورد. مایع رونشین باکتری-های *Enterococcus faecium* باعث لیز شدن دیواره باکتری‌های بیمارگر و در نهایت بهم چسبیدگی سلول‌های باکتریایی، کوچکتر شدن و غیر عادی شدن شکل باکتری، چروکیدگی و پلاسیده شدن شکل عمومی باکتری‌های بیمارگر شد (شکل ۳). با توجه به اینکه از مایع رونشین این باکتری‌ها استفاده شد، بنابراین می‌توان گفت ممکن است متابولیت‌های تولیدی این باکتری‌ها یا پپتیدهای ضد باکتریایی سبب اثر بازدارندگی از رشد عوامل بیمارگر شده باشند (Murthy *et al*. 2014).



شکل ۳. تصاویر SEM مربوط به تأثیر مایع رونشین باکتری‌های *Enterococcus faecium* روی باکتری‌های *Pseudomonas syringae* و *Curtobacterium flaccumfaciens*: a) شکل طبیعی باکتری *Pseudomonas syringae* b و c) به ترتیب تاثیر رونشین باکتری‌های KX185054 و KX185055 d) شکل طبیعی باکتری *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciense. e و f) به ترتیب تاثیر رونشین باکتری‌های KX185054 و KX185055.

Figure 3. Scanning electron microscopy images of *Pseudomonas syringa* and *Curtobacterium flaccumfaciens* fungi treated with secreted substances from two strains of *Enterococcus faecium* isolated from oak tree sap and their corresponding controls. a) *Pseudomonas syringa control* treated with phosphate buffer. b and c) *Pseudomonas syringa* treated with secreted substances from Kx185054 and Kx185055 strains, respectively. d) *Curtobacterium flaccumfaciens* treated with phosphate buffer. e and f) *Curtobacterium flaccumfaciens* treated with secreted substances from Kx185054 and Kx185055 strains, respectively.

تحقیقات نشان داده‌اند که باکتری‌های بیمارگر گیاهی اغلب در محیط‌های با pH خنثی و متمایل به قلیایی رشد می‌کنند (Agrios 2005). یکی از خصوصیات باکتری‌های *Enterococcus* توانایی آن‌ها در اسیدی کردن محیط است. باکتری‌های *Enterococcus faecium* با تولید اسیدلاکتیک و اسیدهای آلی سبب کاهش pH محیط می‌شوند و از رشد بسیاری از باکتری‌ها ممانعت می‌کنند (Aroutcheva *et al*. 2001). همچنین بسیاری از این باکتری‌های اسیدلاکتیک گروه ناهمگن و متفاوتی از

پپتیدهای ضد میکروبی به نام انتروسین‌ها (نوعی باکتریوسین) را تولید می‌کنند. انتروسین‌ها دارای طیف متفاوتی از فعالیت بازدارندگی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا هستند (Tabatabaei *et al.* 2016). به غیر از از باکتریوسین‌ها، تولید ترکیبات دیگری مانند؛ ترکیبات شبه باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی استیل، ایزومرهای اسیدهای آمینه، استالدئید و آمونیاک توسط باکتری‌های *Enterococcus faecium* می‌توانند از رشد باکتری‌ها جلوگیری کنند (Alegría *et al.* 2009).

مایع رونشین هر دو باکتری اسیدلاکتیک *Enterococcus faecium* جدا شده از شیره‌ی بلوط تأثیر کمتری روی باکتری گرم مثبت *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. flaccumfaciens در مقایسه با باکتری گرم منفی *Pseudomonas syringae* pv. tomato داشتند. پپتیدوگلوکان از عناصر اصلی موجود در دیواره باکتری‌ها است. ضخامت این دیواره در باکتری‌های گرم مثبت خیلی بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. در مقابل، باکتری‌های گرم منفی دارای یک غشا خارجی از جنس فسفولیپید و پلی‌ساکارید هستند که در باکتری‌های گرم مثبت دیده نمی‌شود (Attarpour-yazdi *et al.* 2014). احتمالاً وجود این مولکول‌ها در دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی دلیلی بر کندتر شدن سرعت تخریب دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی است. از سویی دیگر باکتری‌های گرم مثبت گرچه فاقد غشا خارجی‌اند ولی با دیواره ضخیم پپتیدوگلوکانی خود نبود این غشا خارجی را جبران کرده‌اند و با داشتن این دیواره ضخیم سرعت تخریب دیواره سلولی خود در مقابل مایع رونشین *Enterococcus faecium* را کاهش داده‌اند. مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر باکتری‌های اسیدلاکتیک بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود که علت آن را می‌توان به وجود غشاء خارجی روی دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی مرتبط دانست (Khay *et al.* 2011, Patil *et al.* 2011). با این حال، به نظر می‌رسد که تأثیر باکتری‌های *Enterococcus* روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی باشد. به عنوان مثال، صالحی و همکاران (۲۰۱۴)، نشان دادند که انتروسین‌های حاصل از باکتری‌های *Enterococcus faecium* دارای طیف مهارکنندگی بالایی بر رشد باکتری‌های گرم مثبتی مانند؛ *Listeria monocytogenes* ، *Bacillus cereus* و *Bacillus subtilis* و باکتری‌های گرم منفی مانند؛ *Pseudomonas aeruginosa* ، *Salmonella enterica serovar Typhimurium* و *Erwinia amylovora* بودند (Salehi and Hatami 2014).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که سویه‌های *Enterococcus faecium* درون‌رست شیره بلوط، نقش مهمی در مهار بیمارگرهای گیاهی دارند. یک مطالعه اخیر نشان می‌دهد که پپتیدهای تولیدی باکتریایی سبب خروج مواد درون سلولی قارچ‌ها، خروج یون‌ها به ویژه یون پتاسیم از قارچ‌ها و در نهایت تخریب دیواره آنها می‌شود (Wang *et al.* 2018). بنابراین از آنجای که این باکتری‌ها مبادرت به تولید متابولیت-های ثانویه و پپتیدهای ضدمیکروبی برای کنترل بیمارگرها می‌کنند، می‌توان از پتانسیل این سویه‌ها برای کنترل زیستی استفاده کرد. به علاوه، با شناسایی ژن‌های کدکننده‌ی پپتیدهای ضدمیکروبی این سویه‌ها و انتقال آنها به گیاهان برای تولید ارقام و لاین‌های تراریخت، می‌توان گیاهان زراعی مقاوم به بیمارگرهای گیاهی تولید نمود.

REFERENCES

Abdallah, RAB, Mokni-Tlili, S, Nefzi, A, Jabnoun-Khiareddine, H, Daami-Remadi, M (2016) Biocontrol of *Fusarium* wilt and growth promotion of tomato plants using endophytic bacteria isolated from *Nicotiana glauca* organs. Biological Control 97: 80-88.

Agrios GN (2005) Plant pathology. 5th Edition: Elsevier Academic Press. Burlington, Ma USA.

Alegría, Á, Álvarez-Martín, P, Sacristán, N, Fernández, E, Delgado, S, Mayo, B (2009) Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional

Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology 136: 44-51.

Aroutcheva, AA, Simoes, JA, Faro, S (2001) Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits Gardnerella vaginalis. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology 9: 33-39.

Attarpour-yazdi, MM, Ghamarian, A, Mousaviehzadeh, M, Davoudi, N (2014) Identification of the serotypes of bacterial meningitis agents; implication for vaccine usage. Iranian Journal of Microbiology 6: 211.

Babu, S, Seetharaman, K, Nandakumar, R, Johnson, I (2000) Efficacy of fungal antagonists against leaf blight of tomato caused by *Alternaria solani* (Ell. and Mart.). Journal of Biological Control 14: 79-81.

Bulgarelli, D, Schlaeppi, K, Spaepen, S, van Themaat, EVL, Schulze-Lefert, P (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. Annual Review of Plant Biology 64: 807-838.

De Man j, Rd, sharpe Me. (1960) A medium for the cultivation of lactabacill. Jornal of Applied Bacteriology 1: 130-135.

De Rodríguez, DJ, Hernández-Castillo, D, Angulo-Sánchez, J, Rodríguez-García, R, Quintanilla, JV, Lira-Saldivar, R (2007) Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. Industrial Crops and Products 25: 111-116.

Deans, S , Svoboda, K (1990) Biotechnology and bioactivity of culinary and medicinal plants. AgBiotech News and Information 2: 211-216.

Devriese, LA, Pot, B, Van Damme, L, Kersters, K, Haesebrouck, F (1995) Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. International Journal of Food Microbiology 26: 187-197.

Dhamale, KS, P. Jaybhaye, A. S. and Akkiraju ,C. P (2015) Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial activity and in vitro, in vivo studies of LAB activity on *Fusarium oxysporum* infected tomato seeds. International Journal of Advanced Research 3(5): 954-963.

Djaaboub, S, Moussaoui, A, Meddah, B, Makhloufi ,S, Gouri, S, El Khatib, R (2018) Antifungal activity of some indigenous lactic acid bacteria isolated from soft wheat. Journal of Pure and Applied Microbiology 12: 111-118.

Franco, T, Garcia, S, Hirooka, E, Ono, Y, Dos Santos, J (2011) Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. Journal of Applied Microbiology 111: 739-748.

Gajbhiye, MH , Kapadnis, BP (2016) Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. Biocontrol Science and Technology 26: 1451-1470.

Gomes, BC, Esteves, CT, Palazzo, IC, Darini, ALC, Felis, GE, Sechi, LA, Franco, BD, De Martinis, EC (2008) Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiology 25:668-675.

Hamed, HA, Moustafa, YA, Abdel-Aziz, SM (2011) In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against Fusarium oxysporum for protection of tomato plant. Life Science Journal 8: 462-468.

Hamed, HA, Yomna A. M and Shadia M. Abdel-Aziz. (2011) In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. Life Science Journal 8: 12-36.

Han, J, Wang, F, Gao, P, Ma, Z, Zhao, S, Lu, Z, Lv, F, Bie, X (2017) Mechanism of action of AMP-jsa9, a LI-F-type antimicrobial peptide produced by *Paenibacillus polymyxa* JSa-9, against *Fusarium moniliforme*. Fungal Genetics and Biology 104: 45-55.

Hell, K , Mutegi, C (2011) Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa. African Journal of Microbiology Research 5: 459-466.

Herrera, SD, Grossi, C, Zawoznik, M, Groppa, MD (2016) Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. Microbiological Research 186: 37-43.

Husain, A, Hassan, Z, Huda-Faujan, N, Lani, MN (2017) Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from soil rhizosphere on *Fusarium* species infected chilli seeds. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS) 29: 182-202.

Kharazian, ZA, Jouzani, GS, Aghdasi, M, Khorvash, M, Zamani, M, Mohammadzadeh, H (2017) Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi. Biological Control 110: 33-43.

Khay, EO, Idaomar, M, Castro, L, Bernárdez, P, Senhaji, N, Abrini, J (2011) Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. African Journal of Biotechnology 10: 10447-10455.

Mouloud, G, Samir, M, Laid, B, Daoud, H (2017) Isolation and characterization of rhizospheric *Streptomyces* spp. for the biocontrol of *Fusarium* wilt (bayoud) disease of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Journal of Scientific Agriculture 1: 132-145.

Mousavi, E, Nazarian-Firouzabadi, F, Ismaili, A (2017) Antibiogram analysis and detection of pathogenicity genes in two strains of *Enterococcus faecium* isolates from Oak Sap (*Quercus brantii* var. Persica). Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 26: 31-46.

Murthy, PS, Rai, AK, Bhaskar, N (2014) Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. Journal of Food Science and Technology 51: 1884-1892.

Nguyen, LT, Haney, EF, Vogel, HJ (2011) The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. Trends in Biotechnology 29: 464-472.

Patil, M, Kumari, RY, Ramana, K (2011) Bacteriocin production by *Enterococcus* sp isolated from rat intestine. International Journal of Environmental Sciences 1: 1395.

Paulitz, TC , Bélanger, RR (2001) Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology 39: 103-133.

Piccolo, S, Alfonzo, A, Burruano, S, Moschetti, G (2016) Detection of bacterial endophytes in *Vitis vinifera* L. and antibiotic activity against grapevine fungal pathogens. Biocontrol of major grapevine diseases: leading research CABI, Boston: 182-190.

Prasad, J, Gill, H, Smart, J, Gopal, PK (1998) Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. International Dairy Journal 8: 993-1002.

Rattanachaikunsopon, P , Phumkhachorn, P (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. Annals of Biological Research 1: 218-228.

Reiter, B, Pfeifer, U, Schwab, H, Sessitsch, A (2002) Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica. Applied and Environmental Microbiology 68: 2261-2268.

Rosenblueth, M , Martínez-Romero, E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions 19: 827-837.

Salehi, M , Hatami, Z (2014) Molecular occurrence of enterocin a gene among *Enterococcus faecium* strains isolated from gastro-intestinal tract and antimicrobial effect of this bacteriocin against clinical pathogens. Iranian Journal of Medical Microbiology 8: 18-26.

Sekhar, AC , Thomas, P (2015) Isolation and identification of shoot-tip associated endophytic bacteria from banana cv. Grand Naine and testing for antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. American Journal of Plant Sciences 6: 943.

Sessitsch, A, Hardoim, P, Döring, J, Weilharter, A, Krause, A, Woyke, T, Mitter, B, Hauberg-Lotte, L, Friedrich, F, Rahalkar, M (2012) Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Molecular Plant-Microbe Interactions 25: 28-36.

Strompfová, V, Lauková, A, Simonová, M, Marciňáková, M (2008) Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. Veterinary Microbiology 132: 293-301.

Tabatabaei, YF, Vasiee, A, Alizadeh, BB, Mortazavi, S, Tabatabaei, YF (2016) Diversity of lactic acid bacteria communities in “Ash kardeh. Iranian Journal of Food Science and Technology 13: 1-14.

Terhonen, E, Kovalchuk, A, Zarsav, A, Asiegbu, FO (2018) Biocontrol potential of forest tree endophytes in endophytes of forest trees pp. 283-318, Springer.

Wang, W, Liu, S, Deng, L, Ming, J, Yao, S, Zeng, K (2018) Control of citrus post-harvest green molds, blue molds, and sour rot by the cecropin A-melittin hybrid peptide BP21. Frontiers in Microbiology 9.

Yu, J, Liu, Q, Chen, C, Qi, X (2017) Antifungal activity change of *Streptomyces rimosus* MY02 mediated by confront culture with other microorganism. Journal of Basic Microbiology 57: 276-282.

Zacharof, M , Lovitt, R (2012) Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. APCBEE Procedia 2: 50-56.

Zgadzaj, R, James, EK, Kelly, S, Kawaharada, Y, de Jonge, N, Jensen, DB, Madsen, LH, Radutoiu, S (2015) A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. PLoS Genetics 11: e1005280.

Zhao, Y, Tu, K, Shao, X, Jing, W, Yang, J, Su, Z (2008) Biological control of the post-harvest pathogens *Alternaria solani, Rhizopus stolonifer, and Botrytis cinerea* on tomato fruit *by Pichia guilliermondii*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 83: 132-136.