خواص ضد میکروبی عصاره خام قارچ *Trichoderma harzianum* - 1103 و نقش بیوکنترلی آن

سارا کاظم‌زاده[۱و۲]، ناصر فرّخی[۳*]، سعید امین‌زاده[۲]، سید مهدی علوی[۲]، ابوالفضل سرپله[۴]، مجتبی ممرآبادی[۱]

[۱] شاهرود، دانشگاه صنعتی شاهرود، دانشکده کشاورزی

[۲] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۳] تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نو، گروه مهندسی بیوتکنولوژی

[۴] تهران، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۴

چکیده

در این مطالعه، عصاره خام قارچ *Trichoderma harzianum* –1103 تهیه شد و اثر بازدارندگی آن بر طیفی از باکتریهای گرم مثبت، گرم منفی و تعدادی از گونه‌های قارچ مورد آزمایش قرار گرفت. عصاره سبب کنترل باکتریهای پاتوژن شامل *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus* و (NIGEB-88 , NIGEB-9322) *Xanthomonas citri* و قارچهای پاتوژن *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* شد اما اثری بر پکتوباکتر *Erwinia amylovora* نداشت. اثر بیوکنترلی ترکیب ضد میکروبی موجود در عصاره در تیمار با تریپسین از بین رفت و در حضور SDS کاهش یافت که نشان از پروتئینی بودن طبیعت آن دارد. این پروتئین ضد میکروبی توانست به مدت نیم ساعت دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد را تحمل کند و همچنین در طیفی از pHهای اسیدی و قلیایی (۹–۴) پایدار بماند. بدین ترتیب، دستاوردهای این تحقیق نشان از جداسازی یک پروتئین ضد میکروبی قارچی مقاوم در برابر حرارت را دارد که می تواند در آینده به عنوان عامل بیوکنترل مورد استفاده قرار بگیرد.

واژه های کلیدی: قارچ تریکودرما، پروتئین آنتی‌باکتریال، آنتاگونیست، پاتوژن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۴۴۰۵۸۴۰، پست الکترونیکی: nfarrokh@nigeb.ac.ir

مقدمه

کنترل بیولوژیک آفات و بیماریهای گیاهی شاخص مهمی در تولید محصولات کشاورزی سالم می‌باشد. با توجه به اهمیت بهداشت محیط زیست و سلامت انسان تحقیقات زیادی در جهت کاهش استفاده از سموم و افزایش مبارزه بیولوژیک انجام شده است، البته به علت محدودیتهای تحقیقاتی، اقتصادی و اجتماعی در جهان سوم و کشور ایران این روش توسعه زیادی نداشته است (۱، ۳ و ۴). گزارشها در خصوص کنترل بیولوژیک بیماریها توسط قارچهای آنتاگونیست به اوایل قرن ۲۰ میلادی باز می‌گردد (۸). هارتلی (۱۹۲۱) قارچ آنتاگونیست خاک‌زادی را برای کنترل بوته میری در گیاهچه‌های کاج معرفی کرد (۲۱). سنفورد (۱۹۲۶) و میلارد و تایلور (۱۹۲۷) اسکب سیب-زمینی را که به وسیله *Streptomyces scabies* ایجاد می شد، با استفاده از *Actinomyces praecox* کنترل کردند

(۳۱ و ۳۴). فلمینگ (۱۹۲۸) آنتی‌بیوتیکی خاص به نام پنی‌سیلین را کشف کرد (۲ و ۹). هنری (۱۹۳۱) بیماریهای ریشه غلات را به‌وسیله میکروارگانیزم‌های خاک کنترل کرد (۲۰). واکسمن در سال ۱۹۴۳ استرپتومایسین را از Streptomyces به دست آورد. با گذشت زمان به علّت پیدایش مقاومت در باکتریها تأثیر آنتی بیوتیکها روز به روز کمتر شد. در نتیجه دانشمندان تلاش کردند تا آنتی‌بیوتیکی جدید کشف کنند. در راستای تحقق این هدف از *Corylophilumdierckx penicillium* آنتی بیوتیکی جدا شد که علیه Staauveus و *Micrococcus leutaus* خاصیّت ضد میکروبی داشت (۳۳). ریشبت (۱۹۶۳) مقاله‌ای را درمورد کنترل *Fomes annosus* به وسیله *Peniophora gigantea* منتشر کرد (۳۳). البته بیشتر تولیدات تجاری در این زمان بر پایه سویه‌های مختلف قارچ تریکودرما که برای کنترل بیماریها متداول‌ترند به بازار عرضه شد. در سال ۱۹۶۷ آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین برای کنترل بیماریهای گیاهی ناشی از موجودات شبه باکتری (mollicutes) به کار رفت (۵). بردی و بندیکت (۱۹۷۲) فعالیّت متابولیتهای قارچهای خوراکی انتخابی را روی تعدادی از باکتریها امتحان کردند و گزارش دادند که بهترین پاسخ بازدارندگی آن علیه باکتریهای گرم مثبت و مخمرهاست (۱۰). این کشف اطّلاعاتی را در مورد فعالیّتهای ضدمیکروبی تعدادی از قارچهای خوراکی فراهم کرد. یک پپتید آنتی‌باکتریال به‌نام پلکتاسین از قارچ ساپروفیت *Pseudoplectania nigrella* علیه باکتری *Streptococcus pneumoniae* جدا شد (۲۹). فاگاد و همکارانش (۲۰۰۹) خاصیّت آنتی‌باکتریالی را در گونه‌های قارچ *Panus fulvus* و *Pleeurotus florida* علیه *Escherichia coli*، *Streptococcus pyogenes*، *Streptococcus* sp.، *Staphylococus aureus*، *Klebsiella pneumonia* و *Flavobacterium sp.* کشف کردند (۱۹). سویوژنگ و همکارانش (۲۰۱۰) به پروتئین آنتی‌باکتریال جدیدی از قارچ *Clitocybe sinopice* به وزن مولکولی ۴۴ کیلو دالتون دست یافتند (۴۲). در همین سال پپتید آنتی‌باکتریال دیگری از قارچ *Aspergillus clavatus* به وزن مولکولی ۶ کیلو دالتون به نام AcAMP که دارای اثرات ضد باکتریایی علیه چندین باکتری گرم مثبت و منفی بود جدا شد (۱۹). در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌باکتریالی پروتئینهای موجود در عصاره خام قارچ تریکودرماهرزیانوم مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت این پروتئینها بر علیه برخی از پاتوژنهای مهم عملکرد ضد میکروبی آنها را مشخص نمود. براساس یافته‌ها این چهارمین پروتئین ضد میکروبی قارچی است که دارای خاصیت ضد میکروبی علیه باکتریهاست (aps.unmc.edu-May 2011).

مواد و روشها

تهیه گونه‌های قارچی و باکتریایی: تمامی گونه‌های قارچی که در این مطالعه غربالگری شدند، از مؤسسه گیاهپزشکی کشور تهیه شدند. این گونه‌ها شامل *Trichoderma atraviridae*، *T. virens*، *T. harzianum*-p(T22)، *T. virens*-1101، *T. harzianum*-1482، *T. harzianum*-1103، *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* بودند که هر یک در محیط PDA (شامل پپتون و گلوکز) کشت شده (۳) و به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تمامی گونه‌های باکتریایی نیز از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد. این گونه‌ها شامل *Escherichia coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus*، *Erwinia amylovora* و دو سویه از باکتری زانتوموناس *Xanthomonas citri* (NIGEB-88) نماینده تیپ A^* و (NIGEB-9322) نماینده تیپ A بودند که در محیط YP (۳ گرم عصاره مخمر و ۵ گرم پپتون) کشت داده شدند.

تهیه عصاره خام از قارچ تریکودرما: بدین منظور، از حاشیه کشت هفت روزه هر یک از سویه‌های قارچ

تریکودرما، دو قطعه از محیط کشت قارچ حاوی ژلوز محیط کشت، به ابعاد تقریبی (۱cm ×۱cm) جدا و در فلاسک ارلن مایر شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط PDB (شامل ۴ گرم پپتون و ۲۰ گرم گلوکز) ریخته شد و به مدّت ۲۰ روز در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس محیط کشت حاوی میسلیوم‌های قارچی، با عبور از صافی فیلتر و مایع عبوری از صافی با حجم برابری از اتیل استات عصاره‌گیری شد. سپس عصاره به مدت نیم ساعت در g× ۱۱۶۲۷ سانتریفیوژ و در نهایت با استفاده از تبخیر چرخشی، غلیظ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۳۰، ۳۲ و ۳۵).

سنجش فعّالیت آنتی‌میکروبیال عصاره قارچی: عصاره قارچ تریکودرما برای سنجش فعّالیت ضدمیکروبی در مقابل دو سویه از باکتری *Xanthomonas citri ssp. citri* با استفاده از روش دیسک مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور مقدار ۱۵ میکرولیتر از عصاره قارچی روی سطح دیسک قرار گرفت و دیسکها روی سطح پلیت آغشته به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری ($۴ \times ۱۰^{۲۳} cfu.ml^{-۱}$)، قرار داده شد. سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. فعّالیت آنتی‌باکتریالی به صورت اندازه‌گیری قطر ناحیه بازدارنده بر حسب میلی‌متر مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷، ۳۰ و ۳۵).

طیف بازدارندگی ترکیب ضدمیکروبی بر علیه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی دیگر از جمله باکتری *Bacillus subtilis*، *Erwinia amylovora*، *Pseudomonas fluorescens*، *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhi* و *Escherichia coli* و همین‌طور سویه NIGEB-9322باکتری *Xanthomonas citri* نیز بررسی شد. همچنین برای بررسی اثر ضد قارچی عصاره قارچ تریکودرما فعالیت آن بر روی دو قارچ *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* مورد ارزیابی قرار گرفت.

تأثیر پروتئازها بر فعالیت عصاره قارچی: جهت تعیین ماهیت مولکولی ترکیب ضدمیکروبی قارچ تریکودرما، حساسیت عوامل بازدارنده عصاره قارچی بر رشد باکتری زانتوموناس، سویه NIGEB- 88 در حضور آنزیم پپسین، تریپسین و پروتئیناز k مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار عصاره قارچ با سه آنزیم تریپسین، پپسین و پروتئیناز k با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به نسبت ۱:۱ مجاور گردید و پس از گذشت یک ساعت فعالیت عصاره به روش دیسک اندازه‌گیری شد (۱۳ و ۳۶).

تأثیر pH، حرارت و دترژنتها بر فعالیت عصاره قارچی: جهت بررسی اثر pH با استفاده از بافر سدیم فسفات، سری pHهای ۹-۴ تهیه شد و عصاره قارچی با هر یک از pHهای ساخته شده با نسبت ۱:۱ به مدت ۳۰ دقیقه مجاور شد. جهت اندازه‌گیری مقاومت به گرما عصاره در حرارت ۱۰۰- ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت قرار گرفت. همچنین برای بررسی اثر دترژنتها، عصاره قارچی با EDTA و SDS یک درصد مجاور گردید و فعالیت آنتاگونیستی در تمامی موارد با استفاده از روش دیسک بررسی شد (۶، ۱۲ و ۱۳).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC): تعیین حداقل غلظت بازدارنده عصاره قارچ 1103- *Trichoderma harzianum* با استفاده از روش Broth microdilution صورت گرفت. این آزمایش در میکروپلیت الایزا انجام شد. برای این کار غلظتهای ۴ تا ۲۰۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره حاوی ترکیب آنتی‌میکروبیال تهیه شد. بدین ترتیب برای ساختن غلظتهای ذکر شده، ابتدا ۲/۰۴۸ میلی‌گرم از عصاره لیوفیلیزه شده، در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حل شد تا محلول استوک با غلظت ۲۰۴۸ µg/ml به دست آید. برای رسیدن به غلظتهای کمتر به نسبت ۱ به ۲ رقت سازی صورت گرفت. کدورت باکتری زانتوموناس (سویه 88 -NIGEB) نیز به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در[1] $۵ \times ۱۰^{۵} cfu.ml^{-}$ تنظیم شد. در زیر هود حجم ۱۰۰

میکرولیتر از هر کدام از غلظتهای آنتی‌میکروبیال ساخته شده به چاهکهای میکروپلیت اضافه شد. از نمونه باکتری نیز به میزان ۱ میکرولیتر به دامنه غلظتهای ترکیب ضد میکروبی اضافه گردید. در نهایت میکروپلیت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان کدورت هر یک از چاهکهای میکروپلیت به صورت چشمی ارزیابی شد (۱۵).

نتایج و بحث

پروتئینها و پپتیدهای آنتی‌باکتریال ارزش اقتصادی زیادی دارند به این علّت که این ترکیبات می‌توانند گیاهان و جانوران را از آلودگیهای باکتریایی، قارچی، ویروسی و ... محافظت کنند. امروزه پروتئینهای مختلفی با فعالیتهای آنتی باکتریال و ضدقارچی گزارش شده‌اند که بیشتر آنها از حیوانات (۱۴، ۲۳، ۲۴، ۲۶، ۲۸، ۳۴، ۳۷ و ۳۹)، گیاهان (۲۰ و ۳۸) و باکتریها (۷، ۲۲ و ۲۵) استخراج شده‌اند اما تعداد کمی از آنها از قارچها (۲۰ و ۲۷) جدا شده‌اند که این موضوع اهمیّت بررسی روی قارچها را برجسته‌تر می-نماید.

در این بررسی، اثر کنترل کنندگی قارچ 1103-*Trichoderma harzianum* بر باکتری زانتوموناس، سویه NIGEB-88 مشاهده شد که به صورت بروز هاله‌های عدم رشد باکتری کشت داده شده در اطراف دیسکها بود.

جهت تعیین ماهیت عصاره ضدمیکروبی قارچ *Trichoderma harzianum*، اثر پروتئازهای گوناگون بر فعالیت ضدمیکروبی این عصاره مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۱، اثر کنترل‌کنندگی عصاره قارچی در حضور آنزیم تریپسین به طور کامل از بین رفت و در حضور آنزیمهای پپسین و پروتئیناز k فعالیت آنتی‌باکتریالی کاهش یافت که می‌توان آن را به پروتئینی بودن ترکیب بازدارنده نسبت داد (۱۰، ۱۱، ۱۶ و ۳۶). این پروتئین آنتی‌میکروبیال تحت عنوان K91 نامگذاری شد.

K91 علاوه بر سویه NIGEB-88 باکتری زانتوموناس فعالیت بازدارندگی برعلیه باکتری *E.coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescense*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus* و *Xanthomonas citri* (NIGEB-9322) نشان داد اما فاقد اثر کنترل کنندگی بر باکتری *Erwinia amylovora* بود (جدول ۲). عصاره مذکور واجد فعالیت ضد قارچی نیز بود (شکل ۱).

حداقل غلظت بازدارنده برای پروتئین K91 ۲۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. ترکیب K91 با EDTA تغییری را در عملکرد آن ایجاد نکرد. این عدم بازدارندگی حاکی از این است که کاتیونهای فلزی نقشی در فعالیت این پروتئین ضد میکروبی ندارند. این در حالی است که در مجاورت با SDSعملکرد آن کاهش یافت که این مشاهده می‌تواند تأکیدی بر ماهیت پلی پپتیدی K91 بنماید (۴۱)، به این صورت که تقسیم زیر واحدهای بزرگ پلی پپتیدی توسط دترژنتها به زیر واحد کوچکتر می‌تواند منجر به کاهش فعالیت ضد میکروبی و یا توقف آن شود.

خاصیت مهم K91 پایداری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت نیم ساعت است که احتمالاً ناشی از ساختار سه بعدی ویژه آن و نقش نیروهای ضعیف الکتروستاتیک و هیدروژنی در شکل گیری این پروتئین است. گزارشات بسیاری پیرامون مقاومت پروتئینهای آنتی‌میکروبیال در دماهای بالا وجود دارد (۱۶ و ۴۰).

حساسیت پروتئینهای آنتی‌میکروبیال نسبت به pH نیز بسیار متفاوت بوده و تعداد زیادی از آنها در محدوده وسیعی از pHها فعال می‌باشند (۱۶ و ۴۰). K91 نیز همین خصوصیت را نشان داده و در تمامی pH های تهیه شده فعالیت خود را به خوبی حفظ کرد.

جدول ۱- تأثیر عوامل بازدارنده فیزیکی و شیمیایی بر عامل بازدارنده تولید شده توسط قارچ *Trichoderma harzianum*

عامل	تیمار	اثر آنتاگونیستی
	پپسین	-
پروتئاز	تریپسین	-
	پروتئیناز k	-
دترژنت	٪۱ SDS	-
شلات کننده	٪۱ EDTA	+
	۵۰	+
حرارت	۷۰	+
(درجه سانتی گراد)	۹۰	+
	۱۰۰	+
	۴	+
	۵	+
pH	۶	+
	۷	+
	۸	+
	۹	+

+ همچنان اثر آنتاگونیستی خود را حفظ کرده است. - اثر آنتاگونیستی به‌طور کامل از بین رفته و یا کم شده است.

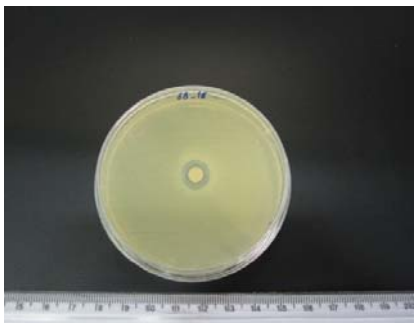
جدول ۲- طیف بازدارندگی K91 بر علیه باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها

ردیف	باکتری	فعالیت بازدارندگی
۱	*Bacillus subtilis*	+
۲	*Erwinia amylovora*	–
۳	*Pseudomonas fluorescens*	+
۴	*Escherichia coli*	+
۵	*Staphylococcus aureus*	+
۶	*Salmonella typhi*	+
۷	*Xanthomonas citri* 88	+
۸	*Xanthomonas citri* 9322	+
۹	*Rhizoctonia solani*	+
۱۰	*Macrophomina phaseolina*	+

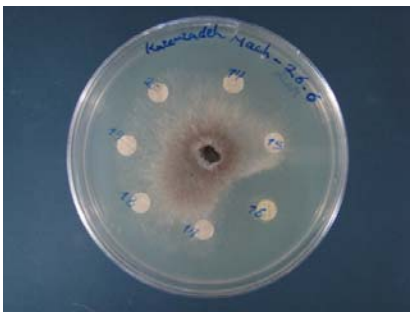
+ دارای اثر آنتاگونیستی

- فاقد اثر آنتاگونیستی

در این مطالعه، نتایج بررسیها در شرایط آزمایشگاهی ثابت کرد که می‌توان از پروتئینهای ضد میکروبی موجود در عصاره خام قارچ *T. harzianum* 1103 به عنوان عاملی برای بیوکنترل باکتریها و قارچهای پاتوژن استفاده نمود. براساس یافته‌ها این چهارمین پروتئین ضد میکروبی قارچی است که دارای خاصیت ضد میکروبی علیه باکتریهاست. از آنجا که این پپتیدها و پروتئینهای ضد میکروبی طیف اثر گسترده‌ای دارند و بر علیه آنها مقاومت ایجاد نمی‌شود، لذا سرمایه گذاری بر روی آنها ارزشمند خواهد بود.



الف



ب

شکل۱ – الف: اثر ضد باکتریایی K91 بر سویه NIGEB- 88 باکتری *Xanthomonas citri*، ب: اثر ضد قارچی K91 بر قارچ *Macrophomina phaseolina*

تشکر و قدردانی

هزینه اجرای این پژوهش از طریق طرح اولویت محور شانکر مرکبات با شماره (۴۰۶ م)، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تأمین شده است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. احمدزاده، م.، ۱۳۸۱، بررسی اثر ریزوباکتری‌های آنتاگونیست از جنس‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* علیه بیماری‌های پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه لوبیا و مطالعه مکانیزم‌های آنتاگونیستی آن‌ها. رساله دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ص ۱۴۶.

۲. بابایی، ن.، ملک‌زاده، ف.، امامی، م. و بابایی، م.، ۱۳۷۸، بررسی خواصّ ضد میکروبی استرپتومیسس‌ها و قارچ های جدا شده از خاک‌های جنگل آمل و مناطق بیابانی کهریزک و حسن آباد خالصه. پژوهش و سازندگی در زراعت وباغبانی. ص ۱۲۰-۱۲۴.

۳. حریقی، م.، مطلبی، م.، زمانی، م.، ۱۳۸۵، خالص سازی آنزیم کیتیناز ۴۲ از *Trichoderma atroviride* PTCC5220. مجله زیست شناسی ایران. ص ۲۱۴-۲۰۳.

۴. سید اصلی، ن.، زمانی، م.، مطلبی، م.، حریقی، م.، ۱۳۸۳، مطالعه تولید آنزیم کیتیناز در قارچ تریکودرما. مجله زیست شناسی ایران. ص ۲۳۳-۲۲۷.

۵. صارمی، ح.، ۱۳۸۰، اثرات منفی سموم مصرفی برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی در بهداشت محیطزیست و کاهش مصرف آن با افزایش روش‌های کنترل بیولوژیک، چهارمین همایش کشوری بهداشت محیط. ص ۱۰۶۹-۱۰۷.

۶. مژگانی، ن.، اسماعیل خانیان، س.، عاملی، م. ، یوسفی، ا.، ۱۳۸۵، شناسایی و تشخیص باکتریوسین تولید شده توسط *Lactobacillus acidophilus* (RN78) جدا شده از پنیر محلی. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. ص ۴۲-۳۶.

7. Agrios, G. (2005) Plant pathology, D. Dreibelbis, 922.

8. Baker, K.F. (1987) Evolving concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of phytopathology. **25**: 67-85.

9. Barja, J.L., Lemos, M.L., Toranzo, A. (1989) Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. Antimicrob Agents Chemother **33**: 1674–1679.

10. Benedict, R.G., Braddy, L.R. (1972) Antimicrobial activities of Mushroom metabolites. J. Pharm. Sci. **61**: 1820 – 1822.

11. Campbell, R. (1989) Biological control of microbial plant pathogens, 218.

12. Cheikhyoussef, A., Pogori, N., Zhang, H. (2007) Study of the inhibition effects of *Bi□dobacterium* supernatants towards growth of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. Int J Dairy Sc. **2**:116–125.

13. Cheikhyoussef, A., Pogor,i N., Chen, W., Zhang, H. (2008) Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from *Bi□dobacteria*: from production to their application. Int J Food Microbiol. **125**: 215–222.

14. Cook, R.J., Baker, K.F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens.St Paul, Minnesota American Phytopathological Society.

15. Devuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994) Bacteriocins of LAB, microbiology, Genetics and applications. Blackie Academic and Professional. London.

16. Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A.V., Rodriguez, J., Bachère, E. (1997) Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). J Biol Chem **272**: 398–406.

17. Elov, J.N. (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal Inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med **64**: 711–713.

18. Fagad, O.E., Oylade, A.A. (2009) A comparative of the antibacterial activites of some wood-decay fungi to synthetic antibiotic discs. EJEAFCHE 8: 184-188.

19. Hajji, M., Jellouli, K., Hmidet, N., Balti, R., Kamoun, A.S., Naseri, M. (2010) A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization, J Ind Microbial Biotechnol **37**: 805-813.

20. Henry, A.w. (1943) The natural microflora of soil in relation to the foot rot problem of wheat, Canadian of Research **4**: 69-77.

21. Hartly, C. (1921) Damping off in forest nurseries. USDA Bulletin **943**: 1-99.

22. Huynh, Q.K., Bergmeyer, J.R., Zobel, J.F. (1992) Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. Biochem Biophys Res Commun **182**: 1–5.

23. Hu, Z., Ye, M.Q., Xia, L.Q., Tu, W.J., Li, L., Zou, G.L. (2006) Purification and characterization of an antibacterial protein from the cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. Wuhan University Journal of Natural Sciences **3**: 709–714.

24. James, S.G., Holmstrom, C., Kjelleberg, S. (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. Appl Environ Microbiol **62**: 2783–2788.

25. Krishnakumari, V., Nagaraj, R. (1997) Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. J Pept Res **50**: 88–93.

26. Kato, T., Matsuda, T., Yoneyama, Y., Kato, H. and Nakamura, R., (1993) Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. Biosci Biotech Biochem, **57**:551-556.

27. Longeon, A., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Corre, S., Nicolas J.L., Guyot M. (2004) Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pesudoalteromonas* species strain X153. Mar Biotechnol **6**: 633–641.

28. Lemaître, C., Orange, N., Saglio, P., Saint, N., Gagnon, J., Molle, G. (1996) Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). Eur J Biochem. **240**: 143–149.

29. Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sonksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventos, D., Buskov, S., Christensen, B., Maria, L.D., Taboureau,O., Yaver, D., Gorgensen, S.G.E., Sorensen M.V., Christensen, B.E., Kjaerlff, S., Moller, N.F., Lehrer, R.L., Zasloff, M., Kristensen, H.H. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus.nature **437**: 975-980.

30. Mayr-Hartings, A. hedges, A.J, and Berkeley, R.C.W. (1972) Methods for studying bacteriocins. Methods Microbiol. **7**: 315-422.

31. Millard, W.A. and Taylor, C.B. (1927) Antagonism of microorganism as the controlling factor in the inhibition of Scab by green manuring. Annals of Applied Biology **14**: 202-16.

32. Radji, M., sumiati, A., rachmayani, R. and Elya, B. (2011) Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangoostana* and their antibacterial activity. African J Biotechnol **1**: 103-107.

33. Rishbeth, J. (1963) Stump protection against *Fomes annosus*.III Inoculation with *Peniophora gigantea*. Annals of Applied Biology. **52**: 63-77.

34. Sanford, G.B. (1926) Some factors affecting the pathogenicity of Actinomyces scabies. Phytopathology **16**: 525-47.

35. Silva, M.G., Dose, A. (2004) The best penicillin for resistant bacteria. J Antibiotics **48**: 562-569.

36. Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., Boman, H.G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. Nature **292**: 246–248.

37. Tong, W.Y., Darah, I. and Latiffeh, Z. (2011) Antimicrobial activities of endophytic fungul isolation from medicinal herb *Orthosiphon stamineus* benth. J Medicinal Plant Research. **5**: 831-836.

38. Tahara, T., Kanatani, K., Yoshida, K., Hirosumi, M., Sakamoto, M. and Oshimura, M. (1991) Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *L. acidophilus* TK 8912. Biosci Biotech Biochem. **56**:1212-1215.

39. Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L.D. (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. Eur J Biochem **267**: 5023–5031.

40. Talas, T. (2004) Screening antimicrobial activities of basic protein fractions from dry and germinated wheat seeds. Biologia Plantarum **48**: 583–588.

41. Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol Rev **40**:722-756.

42. Zheng, S., Liu,Q., Zhang, G., Wang, H., Ng, T.B. (2010) Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of antibacterial protein from dried fruiting bodies the wild mushroom *Clitocube sinopica*. ABPs **57**: 43-48.

Antimicrobial effects of *Trichoderma harzianum* crude extract and its efficacy in biocontrol

Kazemzadeh S.[1,2], Farrokhi N.[3], Aminzadeh S.[2], Alavi S.M.[2], Sarpele A.[4], Mamarabadi M.[1]

[1] Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, Shahrood University, Shahrood, I.R. of Iran

[2] National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

[3] Biotechnology Engineering Dept., Faculty of Energy Engineering and New Technologies, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

[4] Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Trichoderma harzianum crude extract was prepared and its controlling effects on a wide range of Gram positive and negative bacteria and a few fungal species were evaluated via disk assay techniques. The extract was able to control pathogenic bacteria including *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, two *Xanthomonas citri* pathovars (NIGEB-88 and NIGEB-9322), and also two fungal pathogens: *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. However, it failed to control a pectobacter, *Erwinia amylovora*. The biocontrol efficacy of crude extract was lost once treated with trypsin and reduced in the presence of SDS, indicating the protein nature of the effective materials in the fungal extract. The antimicrobial protein was resisted 100 °C for 30 min and was active in a wide range of pH (4-9). Our data is indicative of an efficient isolation of novel fungal thermostable antimicrobial proteins with the potential to be used as a biocontrol agent in the future.

Key words: Trichoderma, Antibacterail protein, Antagonist, Pathogen