شناسایی و بررسی برخی فعالیتهای آنتی میکروبی باکتری بومی *Enterobacter* sp. DGH3

داریوش غلامی[۱و۲] ، سعید امین زاده[۱*]، سیدمهدی علوی[۱]، نسرین کاظمی پور[۲] ، جعفر ولیزاده[۲] و طناز گودرزی[۱]

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

[۲]زاهدان، دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت:۹۱/۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۲۲

چکیده

مرکبات نقش بسیار مهمی را در اقتصاد هر کشور برعهده دارند و ایران نیز از این قاعده مستثنی نیست تا جایی که باعث خودکفایی اقتصادی در زمینه کشاورزی شده است. به‌همین دلیل لازم است که از بروز آفات تا حد امکان جلوگیری بعمل آید و در جهت کنترل آنها اقدامات اساسی انجام شود. بیماریهای باکتریایی و قارچی گوناگونی وجود دارند که اثرات مخربی در صنعت کشاورزی و به خصوص مرکبات وارد می نمایند. کنترل بیماریهای باکتریایی، تنها از طریق سموم و آنتی بیوتیکها و آن هم به طور مقطعی امکان پذیر می باشد. استفاده از ترکیبات آنتی باکتریال جهت کنترل این بیماریها می تواند بسیار مفید واقع شود. باکتری *Enterobacter* sp. DGH3، نوعی باکتری بومی می باشد که قادر است باکتری عامل بیماری شانکر در مرکبات را از بین ببرد. امید است که با بهینه سازی محیط کشت این باکتری و همچنین بهینه سازی تولید ترکیب آنتی باکتریال توسط باکتری مذکور بتوان گام مهمی در جهت کنترل این بیماری برداشت.

واژه‌های کلیدی: بیماری باکتریایی، ترکیب آنتی باکتریال، *Enterobacter* sp. DGH3

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱۴۴۵۸۰۴۱۲ ، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

بیماری شانکر باکتریایی یکی از مخرب ترین بیماریهای مرکبات می باشد (۲ و ۱۴). در مناطقی از جهان که کشت مرکبات به وفور یافت می شود، بیماری شانکر مرکبات وجود ندارد، باکتری زانتوموناس سیتری یک آفت قرنطینه ای محسوب می شود که، بیماری مذکور باعث افت شدیدی در بازار بین المللی مرکبات گردیده است (۱۳). بیماری شانکر مرکبات توسط باکتری *Xanthomonacin citri subsp.citri(xcici)* ایجاد می شود (۱۱). تلاشهای فراوان جهت ریشه کنی این بیماری تاکنون بی نتیجه مانده است و کشاورزان جهت کنترل این بیماری ناگزیر به استفاده از سموم شیمیایی و آنتی بیوتیکها می باشند. آنتی بیوتیکها موفق ترین خانواده دارویی جهت حفظ سلامتی انسان و گیاهان می باشند (۱۵). با این حال تأثیر آنتی بیوتیکهای مورد استفاده جهت درمان عفونتهای باکتریایی و اهداف کشاورزی در انتخاب میکروارگانیسمهای مقاوم به آنتی بیوتیک با اهمیت می باشد که این موضوع سلامتی انسان و گیاه را تحت تاثیر قرار می دهد (۵). نگرانیهای موجود پیرامون استفاده از آنتی بیوتیکها و مقاومتهای آنتی بیوتیکی از جنبه های زیادی به آلودگیهای فلزات سنگین شبیه می باشد. کسب مقاومت آنتی بیوتیکی به وسیله باکتری، تغییرات ویژه ای را در متابولیسم باکتری ایجاد می کند که می تواند برای رشد باکتری در مکانهای دیگر مفید واقع شود و باعث شیوع بیشتر باکتری با پایداری بالاتری نسبت به قبل گردد. ترکیبات مسی نیز همانند آنتی بیوتیکها، در اکوسیستمهای مختلف پراکنده می باشند. عناصر درگیر در مقاومت به فلزات سنگین و آنتی بیوتیکها

بر روی کروموزومهای ژنوم باکتریایی رمزدهی می شوند (۱۰). این مواد خود اثرات جانبی زیادی بر محیط زیست و سایر جانداران دارند؛ از طرفی، اثرات کنترلی این ترکیبات مقطعی می باشد و از نظر اقتصادی برای کشاورزان به صرفه نیست. به همین دلیل باید به دنبال ترکیباتی با منشاء بیولوژیک بود که بتوان این اثرات جانبی را به حداقل رساند. باکتریوسین ها به عنوان پپتید های آنتی باکتریال، کاندیداهای بسیار مناسبی برای این منظور می باشند (۸). باکتریوسین ها پروتئین و یا پپتیدهای باکتریایی هستند که توسط طیف وسیعی از باکتریها تولید می شوند و علیه باکتریهایی فعالیت می کنند که با باکتری تولیدکننده باکتریوسین مورد نظر قرابت خویشاوندی دارند (۹). باکتریوسین ها از چندین جنبه مختلف با آنتی بیوتیکها متفاوت می باشند که از مهم ترین آنها می توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱) باکتریوسین ها بر روی ریبوزومها در سلولهای میکروبی تولید می شوند، در حالیکه آنتی بیوتیکها متابولیتهای ثانویه سلولی می باشند.

۲) مولکولهای باکتریوسین ممکن است به دیواره سلول هدف در هر جایی از سطح سلول متصل شوند، حتی اگر هیچ گونه گیرنده مخصوصی در سطح سلول وجود نداشته باشد.

۳) باکتریوسین ها از مکانیسمهای مختلفی جهت کشتن سلولهای هدف استفاده می کنند و همین امر باعث می گردد که باکتری قادر به کسب مقاومت علیه باکتریوسین نباشد (۴). بنابراین شایسته است که تحقیقات پیرامون باکتریوسین ها جهت کنترل بیولوژیکی بیماریهای باکتریایی و به ویژه بیماری باکتریایی شانکر مرکبات، انجام گیرد. *Enterobacter sp. DGH3* نوعی مهارکننده باکتری زانتوموناس می باشد که قادر است اغلب سویه‌های بیماری زای زانتوموناس را در ایران و سایر نقاط جهان کنترل کند. اهدافی را که از این تحقیق متصور می شود شامل کنترل و ریشه کنی بیماری باکتریایی شانکر مرکبات و همچنین بهبود کیفیت بازار مرکبات در ایران می باشد از طرفی این تحقیق می تواند به پیشبرد اقتصاد کشاورزی و همچنین کاهش خسارت ناشی از بیماری شانکر مرکبات مفید واقع شود.

مواد و روشها

مواد و دستگاهها: موادی که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند شامل موارد زیر می باشند:

کیت استخراج DNA (خریداری شده از شرکت Qiagen، کشور آمریکا)، کیت خالص سازی محصول PCR (خریداری شده از شرکت Roche، کشور آلمان)، محیط کشت nutrient Broth (خریداری شده شرکت Merck، کشور آلمان)، محیط کشت Nutrient Agar (خریداری شده از شرکت Merck، کشور آلمان)، دستگاه ترموسایکلر (primus 25 advanced، با شماره کاتالوگ 95-4002-us، کشور آمریکا)، دستگاه سانتریفیوژ و میکرو سانتریفیوژ (خریداری شده از شرکت Kendro، کشور آلمان)، سیستم عکسبرداری ChemiDoc-It®^{TS2} Imager (خریداری شده از شرکت UVP، کشور انگلستان)

سویه‌های باکتریایی و محیط کشت: نمونه‌های خاک و آب و همچنین اندامهای گیاهی شامل میوه، برگ و ساقه اعم از آلوده به بیماری و سالم، از مناطق مختلف استانهای جنوبی کشور و به خصوص استان سیستان و بلوچستان جمع آوری گردید. نمونه‌های مورد نظرتحت شرایط مناسب (نمونه‌های خاک و آب در دمای ۴ درجه سانتی گراد و اندامهای گیاهی در پاکتهای کاغذی مخصوص) به آزمایشگاه منتقل گردیدند و بلافاصله عملیات غربالگری انجام گرفت. جداسازی سویه‌های مختلف باکتریایی بر طبق پروتوکولهای استاندارد در باکتری شناسی انجام گرفت (۱). غربالگری جدایه‌های باکتریایی مورد نظر جهت فعالیت آنتی باکتریال علیه سویه‌های مختلف زانتوموناس

(۱۵۰ سویه مختلف) انجام گرفت. تمامی سویه‌های بیماری زا و همچنین سویه‌های تولیدکننده عامل آنتی باکتریال در محیط کشت مایع (NB) و محیط کشت جامد (NA) کشت داده شدند. از همه سویه‌های بیماری زا (شاخص) و همچنین سویه‌های تولیدکننده، استوک با گلیسرول ۴۰ درصد تهیه گردید و در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جداسازی سویه تولیدکننده : بعد از اینکه ۵۰۰ جدایه باکتریایی مختلف از منبع باکتریایی مذکور جداسازی و در محیط کشت مایع پیش کشت داده شد و بعد از مدت ۲۴ ساعت که از پیش کشت آنها سپری شد هر کدام جداگانه بر روی دیسکهای آنتی بیوگرام منتقل و با روش DD-AWDA کشت دیسکی داده شدند.

جداسازی سویه تولیدکننده : بعد از اینکه ۵۰۰ سویه باکتریایی مختلف از منابع باکتریایی خاک، آب و اندامهای گیاهی جداسازی و در محیط کشت مایع NB پیش کشت داده شد و بعد از مدت ۲۴ ساعت که از کشت آنها سپری شد، هرکدام جداگانه بر روی دیسکهای مخصوص منتقل و با روش نوین DD-AWDA کشت دیسکی داده شدند. کلنی تولیدکننده هاله (سویه تولیدکننده باکتریوسین) از دیگر کلنیها جدا و جهت بررسیهای آتی از آنها استوک تهیه شد و تستهای مورفولوژیکی (میکروبیولوژیکی) و بیوشیمیایی آنها انجام انجام گردید.

تشخیص و شناسایی سویه جدا شده : سویه جداشده برای آزمونهای بیوشیمیایی از قبیل ژلاتین، سیترات، MR و سایر فاکتورها مورد ارزیابی قرار گرفت و تستهای میکروبی نیز طبق پروتوکولهای استاندارد انجام شد. شناسایی بیشتر با توالی یابی 16SrDNA و به دنبال آن آنالیز فیلوژنتیکی جهت شناسایی سویه تولید کننده انجام گرفت (۷).

تولید عامل آنتی باکتریال توسط باکتری تولیدکننده: بعد از اینکه مدت ۲۴ ساعت از پیش کشت باکتری تولید کننده سپری گردید آن را سانتریفیوژ نموده (در دور g× ۷۰۰۰ و به مدت ۱۵دقیقه) و مایع رویی از فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد، سپس برای غیرفعال نمودن سرین پروتئازهای موجود در محیط، به سوپرناتانت مذکور PMSF افزوده گردید. سپس جهت بررسیهای آتی در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

سنجش فعالیت و تعیین طیف آنتی میکروبیال: روشهای مختلفی جهت سنجش فعالیت آنتی میکروبیال باکتریوسین ها وجود دارد که در این تحقیق از دو روش انتشار در دیسک و انتشار در چاهک آگار و همچنین از روش نوین DD-AWDA استفاده گردید. در روش انتشار در دیسک، بعد از تهیه پلیتهای محتوی محیط کشت باکتریایی NA، سطح پلیت با ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری هدف تلقیح (قبلا از باکتری هدف، استاندارد ۰/۵مک فارلند آماده شد) و دیسکهای استریل بر روی محیط کشت جامد مورد نظر در پلیت قرار گرفتند و مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تولیدکننده بر روی دیسک گذارده شد. پلیتها به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند و بعد از ۲۴ساعت تشکیل هاله بررسی گردید (۹). در روش انتشار در چاهک آگار، بعد از تهیه آگار نیمه جامد (۰/۵ درصد)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از پیش کشت باکتریایی هدف در ۵ میلی لیتر از آگار نیمه جامد مخلوط شد و در یک پلیت جداگانه که قبلا دو سوم آن با محیط کشت جامد NA پر گردیده بود اضافه شد. سپس چاهکهایی به قطر ۵ میلی متر در آنها ایجاد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سویه تولیدکننده به هر چاهک اضافه شد و به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل و تشکیل هاله بعد از ۲۴ ساعت بررسی گردید (۳).

روش DD-AWDA : در این روش ابتدا یک سوم از پلیت با محیط کشت جامد NA پر می گردد. پس از خنک شدن،

محیط کشت نیمه جامد از NA با pH = ۷ آماده و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۰ دقیقه استریل شد. به ۵ میلی لیتر از محیط کشت نیمه جامد مذکور، مقدار ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر از پیش کشت باکتریایی هدف تلقیح گردید و به پلیت محتوی محیط کشت جامد NA افزوده شد. سوسپانسیونی از هر باکتری بیماری زا با کدورتی معادل نیم مک فارلند در محیط کشت مایع NB تهیه و با دقت، دیسکهای آنتی بیوگرام آغشته به ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی بر روی محیط کشت جامد NA مذکور قرار گرفت. سپس پلیتها به گرمخانه با دمای ۳۲ تا ۳۷ درجه سانتی گراد انتقال و بعد از ۲۴ ساعت تشکیل هاله بررسی گردید.

استخراج DNA باکتری تولیدکننده: برای استخراج DNA باکتری تولیدکننده، از کیت استخراج DNA ژنومیک استفاده شد و DNA خالص شده جهت نگه داری به یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید. در پایان برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، جذب نمونه های خالص شده در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر به وسیله دستگاه طیف سنج خوانده شد.

الکتروفورز DNA : پس از انجام مراحل فوق، برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده، ۵ میکرولیتر از آن را روی الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ درصد (تهیه شده در بافر TBE 1X) انتقال یافت و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید عکس برداری صورت گرفت.

انجام **واکنش PCR و 16srDNA** : برای تکثیر 16SrDNA مربوط به باکتری تولیدکننده از روش PCR استفاده شد (۱۲ و ۱۶). جداول ۱ و ۲ برنامه به کار گرفته شده در دستگاه ترموسیکلر و مخلوط واکنشها را نشان می دهد. ترادف آغازگر Forward و Reverse به کار گرفته جهت تکثیر 16SrDNA در جدول ۳ آمده است.

جدول۱- برنامه دمایی و زمانی PCR

شماره	مراحل	دما (°C)	زمان (ثانیه)
۱	Denaturation	۹۴	۳۰
۲	Annealing	۵۶	۹۰
۳	Extension	۷۴	۳۰
۴	Final-Extension	۷۴	۳۰۰
۵	Cycle Count	۳۵	-

جدول ۲- غلظتهای مخلوط PCR (این واکنش در حجم نهایی ۲۵ µl تهیه شد)

مواد	غلظت	حجم به µl
$Mgcl_2$	۱/۵ mM	۱/۵
Reaction buffer	۱۰ X	۲/۵
dNTP(mix)	۵ mM	۱
Reverse primer	۲۰ pmol	۱
Forward primer	۲۰ pmol	۱
DNA template	۷۰ng/ul	۲
ddH_2O	-	۱۵/۵
Taq polymerase	۱ unit	۰/۵

جدول ۳- آغازگرهای استفاده شده جهت تکثیر16SrDNA

نام آغازگر	توالی آغازگر
Forward	5´-GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTG-3´
Reverse	5´- CCAGTTTCGAATGCAGTTCCCAG-3´

خالص سازی محصول PCR : خالص سازی با استفاده از کیت تخلیص محصول PCR انجام گرفت.

الکتروفورز 16SrDNA : جهت اطمینان از درجه خلوص محصول استخراج PCR الکتروفورز ژل آگارز انجام گرفت. بدین ترتیب که ۵ میکرولیتر از آن را روی الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱ درصد (تهیه شده در بافر TBE 1X) برده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، عکس برداری صورت گرفت.

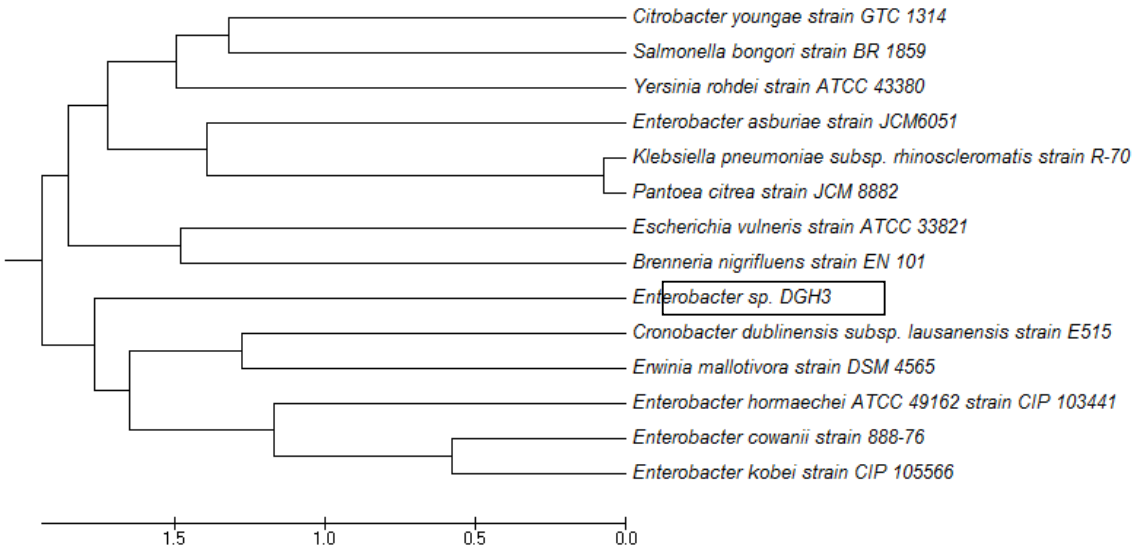
نتایج و بحث

جداسازی و تشخیص سویه تولیدکننده باکتریوسین : بعد از اینکه اثر مهاری باکتری تولیدکننده مشاهده شد تستهای بیوشیمیایی (جدول۴) سویه مورد نظر انجام گرفت و باکتری مورد نظر یک سویه جدید از کرونوباکتر تشخیص داده شد و در Genebank با شماره پذیرش JX308306 ثبت گردید. انجام 16SrDNA مربوط به این سویه و رسم درخت فیلوژنی آن نیز تأییدکننده این ادعا می باشد (شکل۱). این باکتری بومی با نام *Enterobacter* sp. DGH3 دومین باکتری مهارکننده باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات می باشد.

جدول ۴- نتایج تستهای بیوشیمیایی *Enterobacter* sp. DGH3

ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری	ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری	ماده بیوشیمیایی	واکنش باکتری
تولید اندول	-	اوره	-	تخمیرمانیتول	+
MR[a]	-	حرکت	+	تخمیرآرابینوز	+
VP[b]	+	هیدرولیز ژلاتین در ۲۲درجه سانتی گراد	+	تخمیرسوربیتول	+
H_2S	-	تخمیر گزیلوز	+	ONPG[c]	+
مصرف سیترات	+	تخمیر لاکتوز	+	اورنیتین دکربوکسیلاز	+

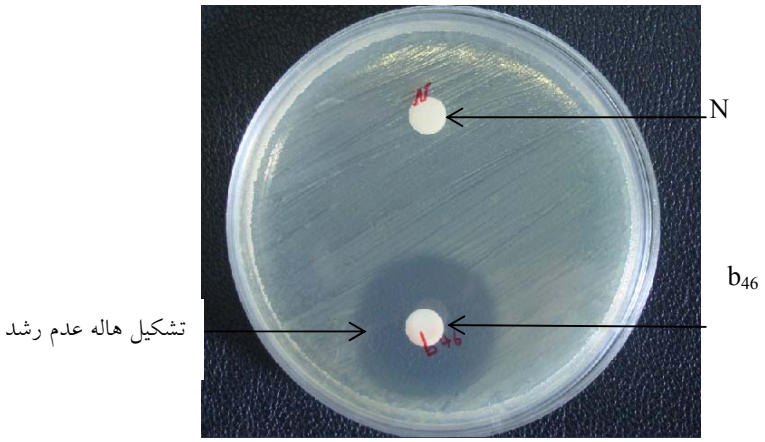
metyl red:a voges-Proskauer:b ortho-Nitrophenyl-β-galactoside :c



شکل ۱- رسم درخت فیلوژنی. باکتری مورد نظر از سایر باکتریها قابل تشخیص می باشد

تاکسونومی باکتری: تاکسونومی *Enterobacter* sp. DGH3 بدین صورت است که در قلمرو Bacteria، و در شاخه Proteobacteria، و در رده Gama proteobacteria، و در دسته Enterobacteriales، در خانواده Enterobacteriaceae و در جنس Enterobacter قرار دارد.

فعالیت آنتی باکتریال و محدوده آن: بعد از اینکه فعالیت آنتی باکتریال سویه *Enterobacter* sp. DGH3 با روش DD-AWDA بررسی گردید و سویه‌های مختلف باکتری پاتوژنیک تحت اثر مهاری باکتری تولیدکننده قرار گرفتند، به گرمخانه با دمای ۳۵ درجه سانتی گراد منتقل گردیدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت هاله ای به قطر ۲ cm مشاهده شد (شکل۲). از سویه‌های جهانی CFBP-3369 و LMG-2392 به عنوان سویه شاهد استفاده گردید که این سویه‌ها نیز توسط باکتری *Enterobacter* sp. DGH3 مهار گردید.

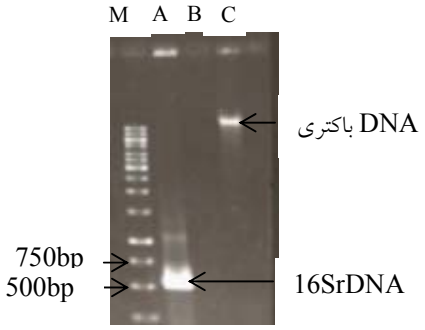


شکل ۲- شکیل هاله عدم رشد توسط ماده آنتی باکتریال ترشحی توسط *Enterobacter* sp. DGH3

N: کنترل منفی، b_{46}: ماده آنتی باکتریال ترشحی توسط باکتری. سطح پلیت آغشته به باکتری بیماری زای زانتوموناس سیتری می باشد.

استخراج DNA باکتری تولیدکننده: بعد از استخراج DNA از *Enterobacter sp. DGH3* برای محصول مورد نظر الکتروفورز ژل آگارز انجام شد و DNA ژنومیک این باکتری مشاهده گردید (شکل۳).

الکتروفورز 16srDNA : از محصول استخراج PCR الکتروفورز ژل آگارز انجام گرفت و اندازه ژن 16SrDNA باکتری مورد نظر ۵۰۵bp تخمین زده شد (شکل۳).



شکل۳- الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراج شده و 16SrDNA باکتری *Enterobacter* sp. DGH3 M: مارکر A: DNA 16SrDNA B: کنترل منفی C: DNA باکتری

نتیجه گیری نهایی

بیماری باکتریایی شانکر مرکبات یکی از مخرب ترین بیماریهای باکتریایی می باشد که علی رغم تلاشهای فراوان در ایران و سایر نقاط جهان تاکنون درمان قطعی برای این بیماری یافت نشده است. لذا پیدا کردن جایگزین مناسب، جهت مهار این بیماری بسیار ارزشمند می باشد.

ترکیبات مترشحه باکتریها کاندیدای مناسبی برای این مهم می باشد. ترکیب آنتی باکتریال ترشحی توسط

Enterobacter sp. DGH3 یکی از این ترکیبات مهم جهت مهار باکتری عامل بیماری مذکور می باشد. از آن جایی که باکتری مذکور یک باکتری بومی می باشد و میزبان بیولوژیک آن نیز درختان مرکبات می باشد و از بخش سالم گیاه آلوده به باکتری بیماری زا جداسازی شده است و با توجه به سازش پذیری بالای این باکتری با شرایط آب و هوایی که این بیماری در آن جا یافت می شود امید است که با تحقیقات بیشتر بر روی این باکتری بتوان گام مهمی جهت درمان بیماری باکتریایی شانکر مرکبات برداشت.

تقدیر و تشکر: از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که طی طرح ماموریت محور کنترل بیماری شانکر مرکبات به شماره م – ۴۰۶ از انجام این پروژه حمایت نموده است تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

1. Amrita Ro., 2010, "*Handbook of bacteriology".* Oxford Book Company, Jaipur, New Delhi.
2. Ana Carolina, A.M.d.A., Rafael, A. H., Marcos, A. M., 2010, "*Differential expression of pathogenicity- and virulence-related genes of Xanthomonas axonopodis pv. citri under copper stress".* Genetics and Molecular Biology, **32**: 348-353.
3. Collise, Nj., Anthony, J. A., Amidou, Sa., Roland, N. Nd.,2011, "Inhibitory and Bactericidal Potential of Crude Acetone Extracts of Combretum molle (Combretaceae) on Drug-resistant Strains ofHelicobacter pylori".j health popul NUTR, 29:438-445.
4. Edward, A. S., 2011, "*Isolation of Lactobacillus salivarius 1077 (NRRL B-50053) and Characterization of Its Bacteriocin, Including the Antimicrobial Activity Spectrum".Applied and environmental microbiology.* **77**: 2749-2754.
5. Ferber, D., 2003, *"Antibiotic resistance. WHO advises kicking the livestock antibiotic habit".* Science. **301**: 1027.
6. Hitoshi Y., H.T., Takako I.,Yasuyoshi I., 2011, "*Genetic Organization and Mode of Action of a Novel Bacteriocin, Bacteriocin 51: Determinant of VanA-TypeVancomycin-Resistant Enterococcus faecium"* . Antimicrobial agents and chemoterapy. **55**: 4352-4360.
7. Kozaki, U.T., Okada, S.,1992, *"Experimental manual of lactic acid bacteria".* Asakurasyoten, 1: 34-37.
8. Manu S. M., S.Z., James L., Michael M., 2010, "*Electrical detection of pathogenic bacteria via immobilized antimicrobial peptides*" . PNAS. **107**: 19207-19212.
9. Marisa, Al., Viviana, B., Laura, G., Angela, F., Carlos, V.,2010, *"In vitro susceptibility of Achromobacter spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods".* International Journal of Antimicrobial Agents, 35:68-71.
10. Martinez, J.L., 2009, "*Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants".* Environmental Pollution. **152**: 2893-2902.
11. Natalia, G., Betiana, S. G., Lucas D. D., Alex, V., Chris, G., Elena ,G. O., Jorgelina, O., 2008, "*Xanthomonas axonopodis pv. citri uses a plant natriuretic peptide-like protein to modify host homeostasis".* PNAS. 105**:** 18631–18636.
12. Ota-Tsuzuki, C., Brunheira, A.T.P., Mayer, M.P.A., 2008, "16S rRNA region based PCR protocol for identification and subtyping of parvimonas micra". Brazilian Journal of Microbiology. 39:605-607
13. Qing, Y., Nian ,W., 2011, "*The ColR/ColS Two-Component System Plays Multiple Roles in the Pathogenicity of the Citrus Canker Pathogen Xanthomonas citri subsp. Citri".* Journal of Bacteriology. 193:1590-1599.
14. Rubio, L., 2001, *"Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination".* J Viro,**75**: 8054-62.
15. Stepanauskas, R., Glenn, T.C., Jagoe, C.H., Tuckfield, R.C., Lindell, A.H., King, C.J., and J.V. McArthur,2006, "*Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms".* Environ. Microbiol. **8**: 1510-1514.
16. Svetoslav, D. T., Monica, Wa., Elisabetta, T., Xavier, D., Maria, T. D., Leon, M. T. D., Bernadette, D. G. de M. F., Manuella, Vaz-V., Djamel, D., 2010, "Characterisation of antiviral pediocin-like bacteriocin produced by Enterococcus faecium". Food Microbiology. 27: 869-879.

Identification and studying of *Enterobacter* sp. DGH3 antibacterial activity

Gholami D.[1,2], Aminzadeh S.[1] , Alavi S.M.[1] , Kazemipour N.[2], Valizadeh J.[2] and Goodarzi T.[1]

[1] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, I.R. of Iran

Abstract

Citrus take over important roles in economy for every country and Iran is no exception to this rule is where the economic self-sufficiency in agriculture is the reason that the incidence of pests as possible to prevent. We have to do drastic an actions in order to their control. There are a variety of bacterial and fungal diseases that can have devastating effects on agriculture, especially citrus. Control of bacterial infections, is only by pesticides and antibiotics and through the cross section is possible. Use of antimicrobial compounds for the control of these diseases can be very useful. *Enterobacter* sp. DGH3 is a native bacterium which isolate from south west of Iran, can destroy the cause bacterial canker disease in citrus. It is hope that, controlling this disease with optimization of its medium and production of antimicrobial component by foregoing bacteria.

Key words: Bacterial disease, antibacterial component, *Enterobacter* sp. DGH3