Archive of SID

حفاظت زیستی چوب‌های راش و نوئل در برابر قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید و قهوه‌ای با استفاده از باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس

میلاد رمضانپور[۱]
رضا اولادی[۲*]
مسعود احمدزاده[۳]
اصغر طارمیان[۴]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۲] نویسنده مسئول، دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۳] استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۴] دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

مسئول مکاتبات:
oladi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۰۳

چکیده

امروزه، شیوه‌های نوین و دوستدار محیط‌زیست برای حفاظت چوب موردتوجه قرارگرفته‌اند. یکی از این شیوه‌ها، حفاظت زیستی چوب در برابر عوامل مخرب است که در آن به‌جای مواد شیمیایی، از میکروارگانیسم‌های زنده استفاده می‌شود. هدف از این پژوهش، حفاظت زیستی چوب‌های راش و نوئل در برابر قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید (*Trametes versicolor*) و قهوه‌ای (*Coniophora puteana*) با استفاده از باکتریِ استخراج‌شده از راش (باسیلوس آمیلولیکوفاسینس) بود. به این منظور، قدرت بازدارندگی باکتری در برابر قارچ‌های مخرب چوب، ابتدا در محیط کشت دوگانه و سپس در بستر چوبی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این باکتری به‌طور چشم‌گیری رشد قارچ‌های عامل پوسیدگی را در هر دو محیط مهار می‌کند. این باکتری توانایی تولید آنزیم‌های کیتیناز، آمیلاز و سلولاز را داشته و بررسی‌های میکروسکوپی، نتایج آزمون کاهش جرم را تائید کرد. درمجموع، در این پژوهش، باکتری موردبررسی برای نخستین بار به‌عنوان عاملی کارآمد در کنترل زیستی در چوب آلات پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: پوسیدگی قارچی، الگوی تخریب، حفاظت زیستی چوب، آنتاگونیسم.

مقدمه

تجزیه زیستی چوب (پوسیدگی چوب) فرایندی پیچیده بوده که شامل مراحل پی‌درپی میکروبی است که هرکدام تحت تأثیر شرایط مختلف مثل دما، رطوبت و تعدادی از گونه‌های میکروبی قرار دارد [۱]. این فرایند دنباله‌دار به‌طورمعمول با آلوده شدن با مقدار کمی از اسپورهای قارچی آغاز می‌شود که به دنبال آن رنگ چوب تغییر کرده و مواد معدنی آن کاهش می‌یابد. در ادامه فرآیند پوسیدگی، تغییر قابل‌توجهی در رنگ بافت و استحکام چوب رخ می‌دهد [۱]. تخریب چوب به‌وسیله قارچ‌های عامل پوسیدگی چوب، جزئی از اکوسیستم طبیعی جنگل است که شرایط مناسب برای رشد درختان نورسته و جوان را فراهم می‌کند، اما این عوامل بر روی محصولات ساخته‌شده از چوب که مورداستفاده انسان‌ها قرارگرفته نیز تأثیر می‌گذارند و خسارات زیادی را به بار می‌آورند. خسارت ناشی از پوسیدگی قارچی در سراسر جهان زیاد است. قارچها باعث آلودگی و فساد درختانِ سرپا، گرده‌بینه‌های قطع‌شده در جنگل یا انبار کارخانه‌ها، چوب آلات استحصال‌شده و در طی عملیات خشک‌کنی آن‌ها و حتی چوب آلات به‌کاررفته در مصارف نهایی می‌شود. رشد قارچها و باکتری‌های تجزیه‌کننده چوب ازجمله

www.SID.ir

Archive of SID

مهم‌ترین مشکلات استفاده از چوب در صنعت هست. بیشتر قارچ‌های مخرب چوب گندروی (ساپروفیت) هستند و تعداد کمی از آن‌ها به بافت زنده حمله می‌کنند. بر اساس مرفولوژی تخریب چوب، پوسیدگی‌های ایجادشده بر روی چوب، به سه گروه پوسیدگی قهوه‌ای، سفید و نرم دسته‌بندی‌شده‌اند. در این میان، دو نوع پوسیدگی نخست بیشترین تخریب را ایجاد می‌کنند. قارچ‌های عامل پوسیدگی قهوه‌ای از رده بازیدیومیست‌ها بوده و سوزنی‌برگان را بیشتر تخریب می‌کنند. از شایع‌ترین قارچ‌های مولد پوسیدگی قهوه‌ای می‌توان به *Coniophora puteana* اشاره کرد. این قارچ‌ها، سلولز و همی‌سلولز چوب را تخریب کرده و لیگنین تحت تأثیر هوا اکسیدشده و تغییر رنگ می‌دهد و ازاین‌رو سطح چوب به شکل مکعب‌هایی قهوه‌ای‌رنگ و شکننده درمی‌آید. پوسیدگی سفید به مفهوم تخریب سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است که معمولاً به‌وسیله بازیدیومیست‌ها به‌عنوان‌مثال *Trametes versicolor* و به‌ندرت توسط آسکومیست‌ها ایجاد می‌گردد. در این نوع پوسیدگی‌ها دیواره سلولی به‌تدریج از سمت حفره سلولی تخریب می‌شود [۲].

دانشمندان همواره در فکر ابداع روش‌هایی برای جلوگیری از تخریب چوب به‌وسیله قارچ‌های مخرب بودند و تاکنون روش‌های متعددی برای حفاظت چوب در مقیاس صنعتی مورداستفاده قرارگرفته است. یکی از روش‌های قدیمی جلوگیری از آلودگی چوب، اشباع آن با مواد حفاظتی شیمیایی هست که تاریخچه آن به سال ۱۸۸۰ میلادی برمی‌گردد. مواد شیمیایی به دلیل هزینه نسبتاً پایین و کارایی بالای آن‌ها در شرایط محیطی مختلف به‌طور گسترده مورداستفاده قرارگرفته‌اند. بااین‌حال تعدادی از این مواد حفاظتی شیمیایی به‌ویژه ترکیبات کلر و آرسنیک موجب اختلالات زیست‌محیطی شده و آسیب جدی به محیط‌زیست وارد می‌کنند [۳]. نگرانی عمومی در استفاده از مواد شیمیایی همزمان با وضع مقررات سخت‌گیرانه در کاربرد آن‌ها در چوب به‌نحوی‌که به‌سلامت انسان و محیط‌زیست آسیب نرسانند، توجه به شیوه‌های نوین حفاظت چوب را افزایش داده تا جایگزینی برای روش‌های سنتی حفاظت چوب باشد [۲]. یکی از این شیوه‌ها، حفاظت زیستی چوب در برابر عوامل مخرب است. در این شیوه، به‌جای مواد شیمیایی از میکروارگانیسم‌های زنده برای حفاظت از چوب در برابر عوامل چوب‌خوار استفاده می‌شود. حفاظت زیستی بر پایه پدیده آنتاگونیسم[1] قرار دارد [۴]. بر اساس تعریف، مفهوم پدیده آنتاگونیسم عبارت است از برهم زدن یا ممانعت از رویدادهای زندگیِ (رشد، تکثیر، آلوده‌سازی، گسترش و پایداری) یک موجود زنده توسط موجودات زنده دیگر [۵].

مطالعه کنترل پوسیدگی چوب با استفاده از عوامل زیستی از اواخر دهه ۱۹۶۰ میلادی آغاز شد [۶]. در آن زمان پژوهش‌ها بیشتر روی جداسازی میکروب‌های آنتاگونیست متمرکز بود [۱ و ۷]، درحالی‌که مکانیسم استفاده از آنتاگونیست‌ها به‌تازگی موردمطالعه قرارگرفته است [۸ و ۹]. به‌طورکلی استراتژی حفاظت چوب در ادامه روش‌های کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی است [۱۰ و ۱۱]، اما تاکنون تنها تعداد محدودی از آزمایش‌های میدانی روی چوب آلات تیمار شده انجام‌شده است و تعداد کمی برنامه کاربردی تجاری وجود دارد.

با توجه به مطالعات انجام‌شده این احتمال وجود دارد که میکروارگانیسم‌های آنتاگونیستی که به‌طور طبیعی در یک موجود زندگی می‌کنند گزینه مناسب‌تری برای حفاظت زیستی آن محسوب شوند. به‌عنوان‌مثال شاید بهترین میکروفلورا برای استخراج باکتری‌های آنتاگونیست به‌منظور حفاظت یک‌گونه چوبی تنه درخت همان‌گونه باشد، بااین‌حال در هیچ‌یک از پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه حفاظت زیستی چوب این نکته در نظر گرفته نشده است. ازاین‌رو در این پژوهش میزان مقاومت جدایه باکتریایی استخراج‌شده از درختان راش در برابر قارچ‌های مولد پوسیدگی در محیط کشت دوگانه با و بدون حضور بافت چوبی بررسی شد. در انتها مطالعات میکروسکوپیِ بافت چوبی در شرایط مختلف تحت تأثیر آنتاگونیست و قارچ پوسیدگی موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های چوبی

از گونه‌های چوبی راش (*Fagus orientalis* Lipsky) و نوئل (*Picea abies*) در این مطالعه استفاده شد. نمونه‌های

[1] Antagonism

www.SID.ir

Archive of SID

راش از جنگل آموزشی-پژوهشی خیرودکنار و نمونه‌های نوئل از چوب‌فروشی‌ها تهیه شدند. نمونه‌ها دارای ابعاد ۵×۱۵×۳۵ میلی‌متر (پهنا × عرض × طول) با تغییرات ۰/۱± میلی‌متر تهیه شدند. نمونه‌ها قبل از قرار گرفتن در محیط کشت برای یکسان‌سازی رطوبت به مدت ۴ هفته در اتاق کلیما با دمای ۲±۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵٪±۶۵ قرار داده شدند (طبق استاندارد EN113).

جدایه باکتریایی

جدایه باکتری موردمطالعه که پیش‌تر از درختان سرپای راش استخراج‌شده بود، پس از مراحل استخراج و با بررسی ملکولی و شناسایی توالی، باسیلوس آمیلولیکوفاسینس (*Bacillus amyloliquefaciens*) تشخیص داده شد. استخراج DNA، بررسی ملکولی و شناسایی توالی در آزمایشگاه مرکزی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد. تکثیر ناحیه 16s rDNA در حضور آغازگرهای R1- 27F و R2-1492R با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز نشان داد که در جدایه قطعه‌ای به‌اندازه حدوداً ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر یافت. مقایسه توالی به‌دست‌آمده جدایه منتخب باکتریایی با توالی‌های جدایه‌های استاندارد در بانک جهانی ژن (NCBL) نشان داد که جدایه باکتریایی با جدایه آمیلولیکوفاسینس بیشترین درصد تشابه را داشت.

طبق استاندارد EN 113 محیط کشت مالت اکسترکت آگار تهیه شد. از قارچ عامل پوسیدگی سفید (*Trametes versicolor*) برای آلوده کردن نمونه‌های چوبی راش (پیش و پس از تیمار با باکتری) و از قارچ عامل پوسیدگی قهوه‌ای (*Coniophora puteana*) برای آلوده کردن نمونه‌های چوبی نوئل استفاده شد. کلیه مراحل کشت قارچ بر روی بلوک‌های چوبی مطابق با استاندارد EN 113 انجام شد [۱۲].

بررسی قدرت ضد قارچی باکتری در محیط کشت دوگانه بدون بافت چوبی

برای بررسی قدرت ضد قارچی باکتری در محیط کشت دوگانه بعد از انجام مراحل کشت باکتری و قارچ‌های عامل پوسیدگی، مقداری از کلنی باکتری موردنظر در یک‌طرف پتری دیش و قارچ عامل پوسیدگی موردنظر در طرف دیگر قرار داده شد (شکل ۱). سپس نمونه‌ها در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز در انکوباتور قرار داده شدند. باکتری موردنظر در درون پتری دیش‌های مجزا در برابر قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید و قهوه‌ای قرار داده شدند. برای هر جدایه ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

میزان بازدارندگی هر یک جدایه ها طبق رابطه زیر محاسبه شد [۱۳].

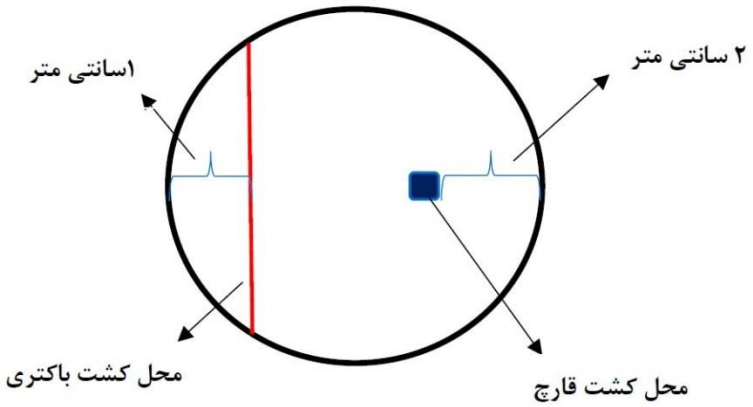
$$\frac{C-E}{C}\times 100 \qquad (۱)$$

تهیه محیط کشت قارچ‌های مولد پوسیدگی و آلوده کردن چوب به این قارچ‌ها

که در آن C میزان قطر کلنی قارچی در پتری دیش-های شاهد (بدون باکتری) و E قطر کلنی قارچی در پتری دیش‌های حاوی باکتری بوده است. از این رابطه برای قارچ‌های پوسیدگی در پتری‌های شاهد نیز استفاده شد که در آن C قطر هاله قارچی به میزان حداکثر (۶ سانتی-متر) و E مقدار قطر هاله قارچ در پتری‌های شاهد بدون حضور باکتری هست.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- محل دقیق کشت باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس و قارچ عامل پوسیدگی در پتری دیش

بررسی‌های آنزیمی باکتری

آزمون‌های سنجش آنزیمی به‌منظور بررسی تولید آنزیم‌های سلولاز، آمیلاز و کیتیناز انجام شد تا میزان تأثیر جدایه باکتریایی بر بافت چوب نیز در نظر گرفته شود.

سنجش آنزیم سلولاز

برای بررسی توان تولید آنزیم سلولاز در جدایه باکتریایی، جدایه موردنظر در محیط کشت CMC(کربوکسی متیل سلولز) به‌صورت نقطه‌ای کشت داده شدند. بعد از نگهداری پتری دیش‌های کشت‌شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور، سطح پتری دیش‌ها با محلول کنگورد[1] رنگ‌آمیزی شدند (سطح پتری‌ها به کنگورد آغشته گردید). چنانچه پس از ۱۵ دقیقه، هاله شفاف و واضح پیرامون کلنی جدایهء باکتری موردنظر تشکیل شود نشانگر توانایی تولید آنزیم سلولاز توسط جدایه هست.

سنجش آنزیم آمیلاز

به‌منظور سنجش آنزیم آمیلاز، به محیط کشت NA (Nutrient agar)، ۲ درصد نشاسته محلول افزوده و پس از اتوکلاو کردن، به پتری دیش منتقل شد. جدایه باکتری پس از کشت ۷ روزه در این محیط قرار گرفت. محیط مذکور پس از ۳ روز با محلول لوگول[2](ید- یدید پتاسیم) رنگ‌آمیزی شده و تجزیه نشاسته توسط باکتری موردبررسی قرار گرفت. برای تهیه محلول لوگو، مقدار دو گرم یدورپتاسیم با یک گرم ید به ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و چندین ساعت تا انحلال کامل نگه‌داری شد. میزان مناسبی از این محلول به پتری‌های حاوی محیط اضافه شد تا محیط رنگ‌شده و هاله مشاهده گردد. تشکیل هاله به معنی وجود آنزیم آمیلاز در پتری دیش است [۱۴].

سنجش آنزیم کیتیناز

محلول کیتین کلوئیدال تهیه و به میزان ۰/۴ درصد به محیط آگار ۱/۵ درصد اضافه شد. پس از اتوکلاو و انتقال به پتری دیش، باکتری به این محیط انتقال یافت. وجود هاله شفاف حاکی از تولید آنزیم کیتیناز هست. در این محیط، کیتین بعنوان منبع کربن برای باکتری به‌حساب آمده و هیدرولیز آن موجب ایجاد هاله خواهد شد [۱۵].

بررسی قدرت ضد قارچی باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس در بافت چوبی

کشت جدایه باکتری در محیط کشت مایع

به این منظور هشت گرم محیط کشت نوترینت براث (nb) به همراه هزار میلی‌لیتر آب مقطر در ارلن ریخته، روی همزن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس در داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ psi و به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. پس از سرد شدن محیط کشت، جدایه موردنظر در آن کشت شد و به مدت ۴۸ ساعت در

[1] Congo Red
[2] Lugol

www.SID.ir

Archive of SID

همزن انکوباتور با سرعت ۱۲۰ rmp و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا باکتری رشد کند.

تهیه سوسپانسیون آب مقطر و باکتری و تلقیح چوب با باکتری

در این مرحله با کمک دستگاه اسپکتوفتومتر و محیط کشت تازه و استریل شده، میزان جمعیت بهینه باکتری محاسبه و به 10^8 cfu (تعداد باکتری به ازای هر میلی‌لیتر آب مقطر) رسانده شد. سپس نمونه‌های سانتریفیوژ شده و باکتری از محیط کشت nb جداشده و در آب مقطر خالص و استریل (مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در هر یک از ارلن‌ها) قرار گرفت. در مرحله آخر زیر هود استریل، نمونه-های چوب در سوسپانسیون آب و باکتری قرارگرفته و در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت شش هفته باقی ماندند. پس از شش هفته مجاورت نمونه‌های آزمونی با جدایه باکتری موردنظر، نمونه‌ها زیر هودِ استریل از سوسپانسیون‌ها خارج‌شده و هر نمونه به‌طور جداگانه به مدت ۴۸ ساعت در پتری دیش‌های استریل قرار داده‌شده تا از رطوبت نمونه‌ها کاسته شود.

انتقال نمونه‌ها به محیط کشت قارچی

پس از رشد کامل قارچ‌ها در پتری دیش‌ها و همچنین کاهش رطوبت نمونه‌های چوبی بعد از دو روز قرار گرفتن در پتری‌های استریل، نمونه‌های آزمونی زیر هود به محیط قارچی منتقل شدند. نمونه‌های آزمونی به مدت هشت هفته در معرض قارچ‌های عامل پوسیدگی (سفید و قهوه‌ای) قرار گرفتند. همچنین برای انجام این آزمون، نمونه‌های شاهد نیز در هر پتری دیش قرار داده شدند. برای هر تیمار نیز ۴ تکرار در نظر گرفته شد. پتری‌ها به مدت ۸ هفته در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار داده شدند. پس از ۸ هفته نمونه از انکوباتور خارج و به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۵ ± ۱۰۳ مانند، سپس نمونه توزین شده و میزان کاهش جرم آن‌ها بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

که در آن W1 وزن خشک نمونه‌های چوبی قبل از قرار گرفتن در محیط کشت قارچ، W2 وزن خشک نمونه-ها بعد از قرار گرفتن در معرض قارچ و WL درصد کاهش وزن هست [۱۲].

بررسی مقاطع چوبی با میکروسکوپ نوری

نمونه‌های چوبی در سه حالت (چوب سالم بدون هیچ‌گونه تیمار، چوبی که در معرض قارچ مولد پوسیدگی قرارگرفته و چوبی که با باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس تیمار شده و در معرض قارچ مولد پوسیدگی قرارگرفته) موردبررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. برای این منظور با استفاده از میکروتوم لغزشی، مقاطع نازکی به ضخامت ۱۰ میکرون از راستای عرضی و شعاعی نمونه‌های چوبی تهیه شدند. رنگ‌آمیزی مضاعف مقاطع با محلول سافرانین ۰/۵ درصد و آسترابلو انجام شد و پس از مراحل آبگیری با الکل، توسط چسب انتلان بر روی لام مستقر شدند. پس از خشک شدن چسب، مقاطع زیر میکروسکوپ نوری BEL FLUO-3 (متصل به دوربین عکس‌برداری دیجیتال) مورد ارزیابی دقیق قرار گرفتند.

نتایج و بحث

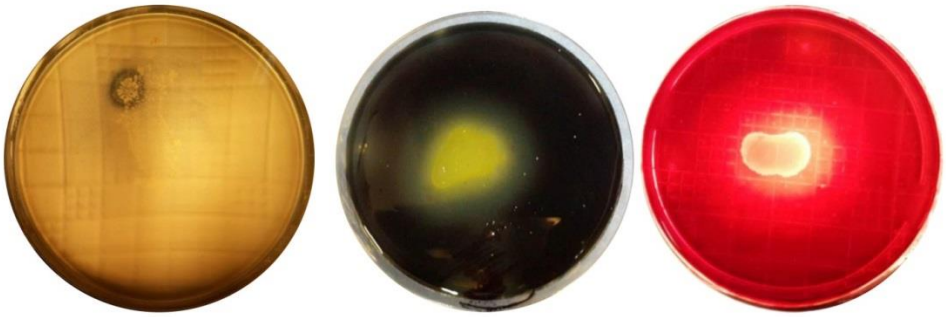
سنجش‌های آنزیمی

پس از ۱۵ دقیقه از تزریق محلول رنگی کنگورد هاله‌ای شفاف و واضح پیرامون کلنی مربوط به باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس ایجاد شد که نشان‌دهنده توانایی این باکتری در تولید آنزیم سلولاز هست (شکل ۲- الف). با توجه به تشکیل هاله شفاف بعد از اضافه کردن محلول لوگول به محیط کشت، مشخص شد که باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس توانایی تولید آنزیم آمیلاز را نیز داشت (شکل ۲- ب). نتایج مربوط به آزمون آنزیم کیتیناز نیز، تولید این آنزیم را توسط باکتری موردمطالعه با توجه به تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی مایید کرد (شکل ۲- ج).

$$WL = \frac{W1 - W2}{W1} \times 100 \quad (۲)$$

www.SID.ir

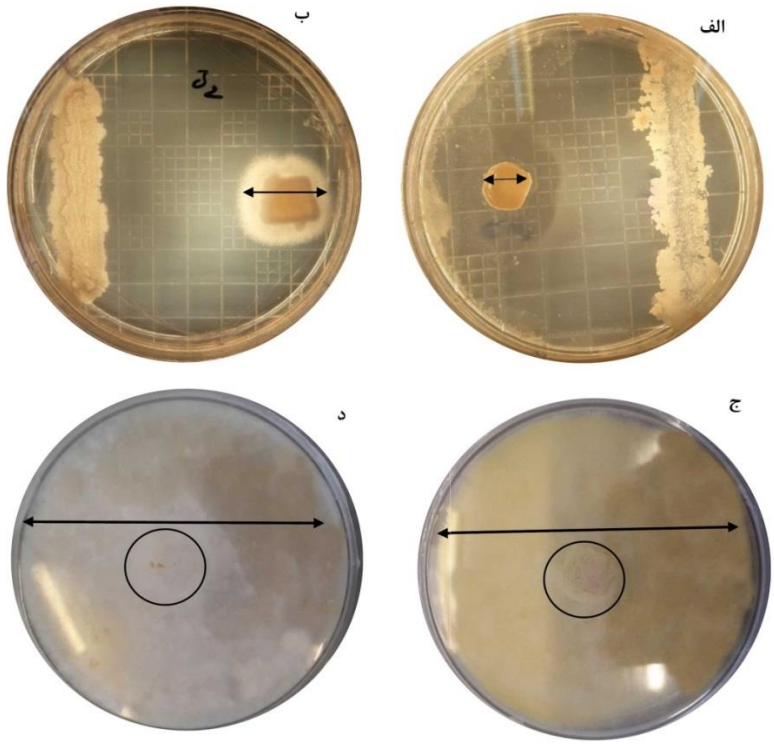
Archive of SID



شکل ۲-آزمون معرف رنگی برای بررسی ترشح آنزیم سلولاز (الف)، آمیلاز (ب) و کیتیناز (ج) توسط باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس

قدرت ضد قارچی باکتری در محیط کشت دوگانه بدون بافت چوبی

نتایج نشان دادند با توجه به رابطه تعیین میزان بازدارندگی، باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس در تمامی تکرارها به‌طور محسوسی موجب بازدارندگی از رشد قارچ‌های عامل پوسیدگی سفید و قهوه‌ای شد. این سویه باکتریایی در برابر قارچ عامل پوسیدگی سفید ۸۷/۶ درصد و در برابر قارچ مولد پوسیدگی قهوه‌ای ۹۵ درصد بازدارندگی در برابر رشد و توسعه هاله قارچی از خود نشان داد (شکل ۳-الف، ب).



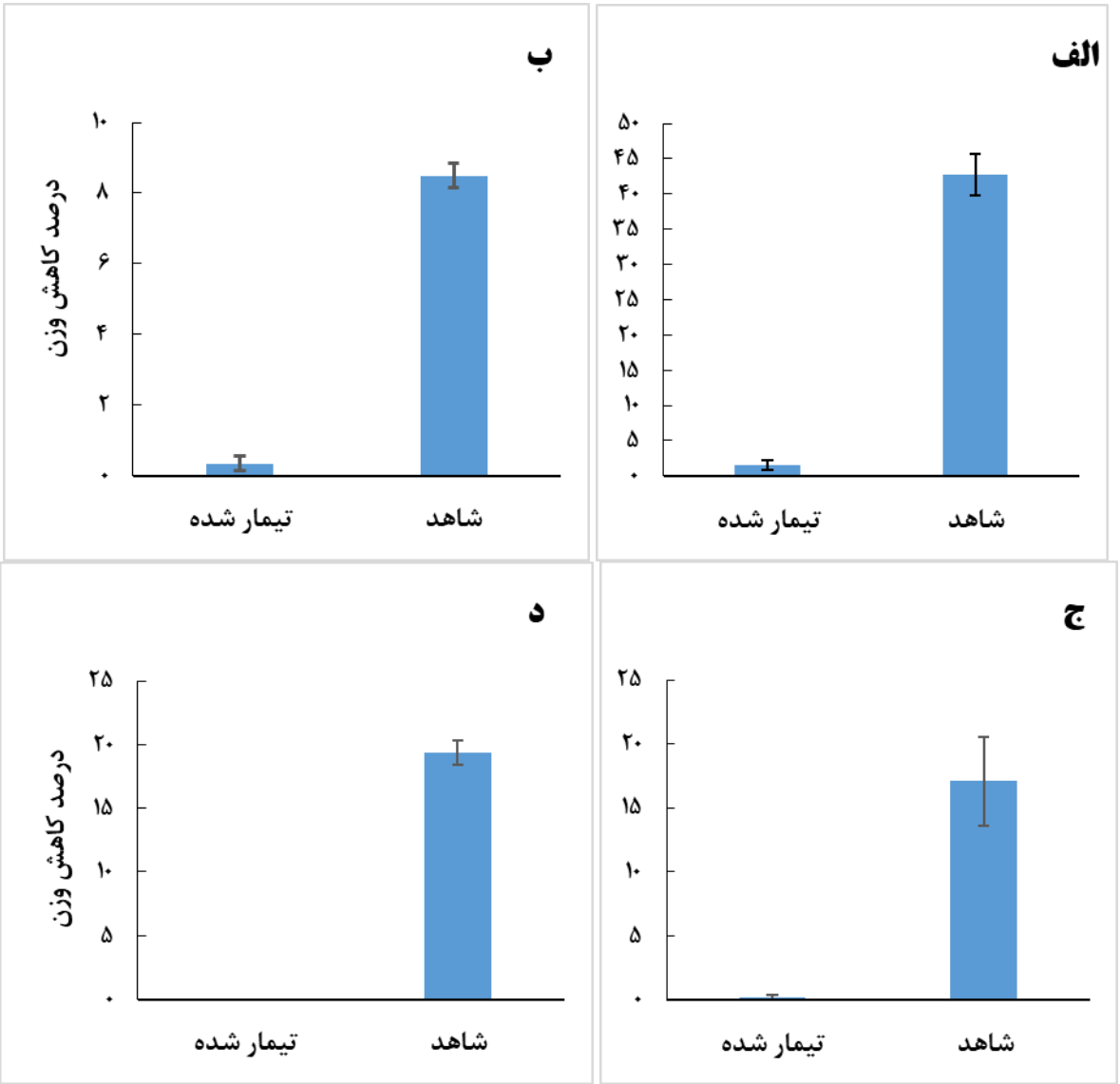
شکل ۳-کشت دوگانه باکتری آمیلولیکوفاسینس و قارچ عامل پوسیدگی قهوه‌ای (الف) و سفید (ب). کشت قارچ عامل پوسیدگی قهوه‌ای بدون باکتری (شاهد؛ ج). کشت قارچ عامل پوسیدگی سفید بدون باکتری (شاهد؛ د). فلش‌ها نشان‌دهنده میزان گسترش پوسیدگی قارچی و دایره‌ی وسط اندازه ریسه قارچی در ابتدای انتقال به پتری دیش است.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی قدرت ضد قارچی باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس در گونه راش

نمونه‌های چوبی تیمار شده با جدایه آمیلولیکوفاسینس تنها ۱/۴ درصد کاهش وزن براثر قارچ پوسیدگی سفید از خود نشان دادند و در مقابل در نمونه‌های شاهد ۴۲ درصد کاهش وزن رخ داد که نشان از قدرت این جدایه باکتریایی باسیلوس در بازدارندگی قارچ پوسیدگی سفید دارد (شکل ۴-الف). در مورد قارچ پوسیدگی قهوه‌ای نیز، جدایه باکتریایی آمیلولیکوفاسینس به‌طور معنی‌داری مانع از ایجاد و گسترش پوسیدگی در مقایسه با نمونه‌های شاهد شد، به‌طوری‌که درصد کاهش وزن در نمونه‌های شاهد ۹ برابر نمونه‌های تیمار شده هست (شکل ۴-ب).



شکل ۴- درصد کاهش وزن نمونه‌های چوبی راش تیمار شده با باکتری آمیلولیکوفاسیسنس در برابر قارچ پوسیدگی سفید (الف) و قهوه‌ای (ب)؛ درصد کاهش وزن نمونه‌های چوبی نوئل تیمار شده با باکتری آمیلولیکوفاسیسنس در برابر قارچ پوسیدگی سفید (ج) و قهوه‌ای (د)

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی قدرت ضد قارچی باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس در گونه نوئل

جدایهء باکتریایی آمیلولیکوفاسینس به‌طور فاحشی موجب بازدارندگی فعالیت قارچ عامل پوسیدگی سفید در گونه نوئل شد (شکل ۴-ج). بررسی نتایج مربوط به قارچ پوسیدگی قهوه‌ای در گونه نوئل نشان داد که در نمونه‌های تیمار شده با جدایه باکتریایی آمیلولیکوفاسینس هیچ‌گونه کاهش وزنی تحت تأثیر قارچ عامل پوسیدگی قهوه‌ای رخ نداد و در مقابل نمونه‌های شاهد در حدود ۱۹ درصد کاهش وزن داشتند (شکل ۴-د).

باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس ازجمله گونه‌های باکتریایی شناخته‌شده هست که طیف وسیعی از متابولیت‌ها با کاربرد گسترده را تولید می‌کند؛ بطوریکه بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط این‌گونه به‌عنوان دارو و نگه‌دارنده مواد غذایی استفاده می‌شود (سیاه متشه و همکاران ۱۳۹۵). هدف از این تحقیق بررسی قدرت بازدارندگی باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس در برابر قارچ‌های عامل پوسیدگی سفید و قهوه‌ای بود. طبق نتایج به‌دست‌آمده، این باکتری موفق به کنترل و مهار رشد قارچ‌های عامل پوسیدگی هم در محیط کشت دوگانه بدون حضور چوب و هم در بستر چوب شد. باآنکه تاکنون قدرت بازدارندگی برخی از جدایه‌های باکتری *B. subtilis* در مهار رشد قارچ عامل پوسیدگی و باختگی به اثبات رسیده است [۱۶] اما در این پژوهش نخستین بار است که گونه آمیلولیکوفاسینس برای کنترل زیستی با موفقیت پیشنهاد می‌شود.

تحقیقات مختلفی مکانیسم اثر آنتاگونیستی باکتری‌های جنس باسیلوس را بررسی کرده‌اند. باسیلوس آمیلولیکوفاسینس گونه‌ای از این جنس است که دامنه وسیعی از متابولیت‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی تولید می‌کند. این باکتری قادر به تولید اندوسپورهایی است که به تنش‌های شیمیایی و فیزیکی، مقاومت بالایی نشان می‌دهد. این عوامل و همچنین توانایی زیستن در خاک باعث شده که این باکتری یکی از عوامل مؤثر در کنترل زیستی به شمار آید [۱۷].

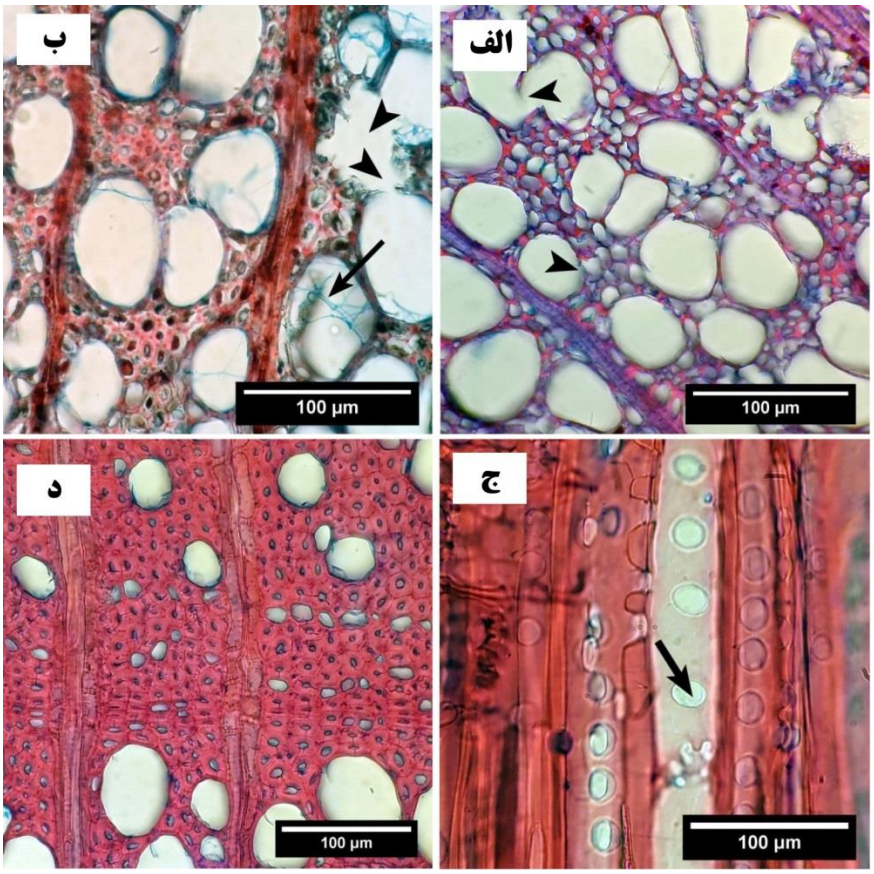
به نظر می‌رسد مهم‌ترین عامل مهار رشد قارچ‌های عامل پوسیدگی چوب توسط باکتری‌های جنس باسیلوس، تولید متابولیت‌های ضد قارچی از خانواده لیپوپروتئین-هاست که شامل ایتورین، فنجایسین و سرفکتین هست که می‌تواند روی کشش سطحی قارچ تأثیر گذاشته و منافذی را در سطح غشا ایجاد کنند و ورود و خروج مواد حیاتی سلول را دچار اختلال کرده، تنظیمات غشاء سلولی را به‌هم‌ریخته و درنهایت موجب مرگ سلول شود [۱۸]. از دیگر آثار متابولیت‌های تولیدشده توسط این باکتری، اثر بر سنتز یکی از اجزای مهم غشای سلول قارچ یعنی ارگوسترول هست که این امر موجب آسیب‌پذیری غشا و کاهش مقاومت آن می‌شود [۱۹]. تولید آنزیم کیتیناز توسط باکتری موردمطالعه در این پژوهش نیز مؤید توانایی باسیلوس‌ها در تولید طیفی از آنزیم‌های خارج سلولی ازجمله کیتیناز است که سبب تخریب دیواره سلولی قارچ می‌شوند [۲۰]. همچنین یکی از دیگر دلایل مهار رشد قارچ به‌وسیله باکتری آنتاگونیست را می‌توان پلاسمولیز، انقباض و تحلیل دادن میسیلیوم‌های قارچی از طریق متابولیت‌های تولیدشده دانست [۲۱]. در منطقه‌ای که مهار رشد قارچ در حالت بیشینه هست میسیلیوم‌ها متورم شده و دچار اعوجاج می‌شوند و از بین می‌روند [۲۲].

بررسی‌های میکروسکوپی مقاطع چوبی راش (پوسیدگی سفید و قهوه‌ای)

بررسی میکروسکوپی بافت چوبی، نتایج مربوط به درصد کاهش وزن نمونه‌ها را مایید کرد (شکل ۵). شکل‌های میکروسکوپی مقاطع نشان از تخریب شدید در دیواره آوند و فیبرهای چوب راش شاهد تحت تأثیر قارچ پوسیدگی سفید (شکل ۵- الف) و قهوه‌ای (شکل ۵-ب) دادند. براثر فعالیت قارچ مولد پوسیدگی سفید، حفرات مدور درشتی در دیواره فیبرها به وجود آمده بود (شکل ۵-ج). در مقابل، اثری از تخریب در نمونه‌های تیمار شده با جدایه آمیلولیکوفاسینس پس از مجاورت با قارچ دیده نشد (شکل ۵-د).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵- مقطع عرضی (الف) و طولی (ج) چوب راش آلوده به قارچ پوسیدگی سفید. سر فلش‌ها و فلش به ترتیب گسیختگی دیواره بین سلولی و حفرات روی دیواره فیبر را نشان می‌دهند؛ چوب راش پس از مجاورت با قارچ مولد پوسیدگی قهوه‌ای (ب)؛ سر فلش‌ها و فلش به ترتیب گسیختگی دیواره بین سلولی و ریسه‌های قارچ درون حفره آوند را نشان می‌دهند؛ مقطع عرضی چوب راش تیمار شده با باکتری آمیلولیکوفاسینس که در معرض قارچ پوسیدگی سفید قرارگرفته است.

نوئل (پوسیدگی سفید و قهوه‌ای)

براثر فعالیت قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید و قهوه‌ای، تراکئیدهای نوئل به‌خصوص از بخش منافذ بین‌تراکئیدی گسیخته شده بودند (شکل‌های ۶-الف و ب). با بررسی مقاطع طولی، مشخص شد که منافذ هاله‌ای بین‌تراکئیدی در هر دو نوع پوسیدگی و به‌خصوص پوسیدگی سفید بی‌رنگ یا آبی شده بودند که نشان از تخریب لیگنین در این ناحیه داشت (شکل‌های ۶-ج). در مقاطع عرضی و طولی نمونه‌های تیمار شده با جدایه باکتریایی که تحت تأثیر قارچ‌های مخرب قرارگرفته بودند، هیچ تخریب یا تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۶-د) که این امر تأییدی بر عدم توانایی قارچ‌ها در تخریب این نمونه‌هاست.

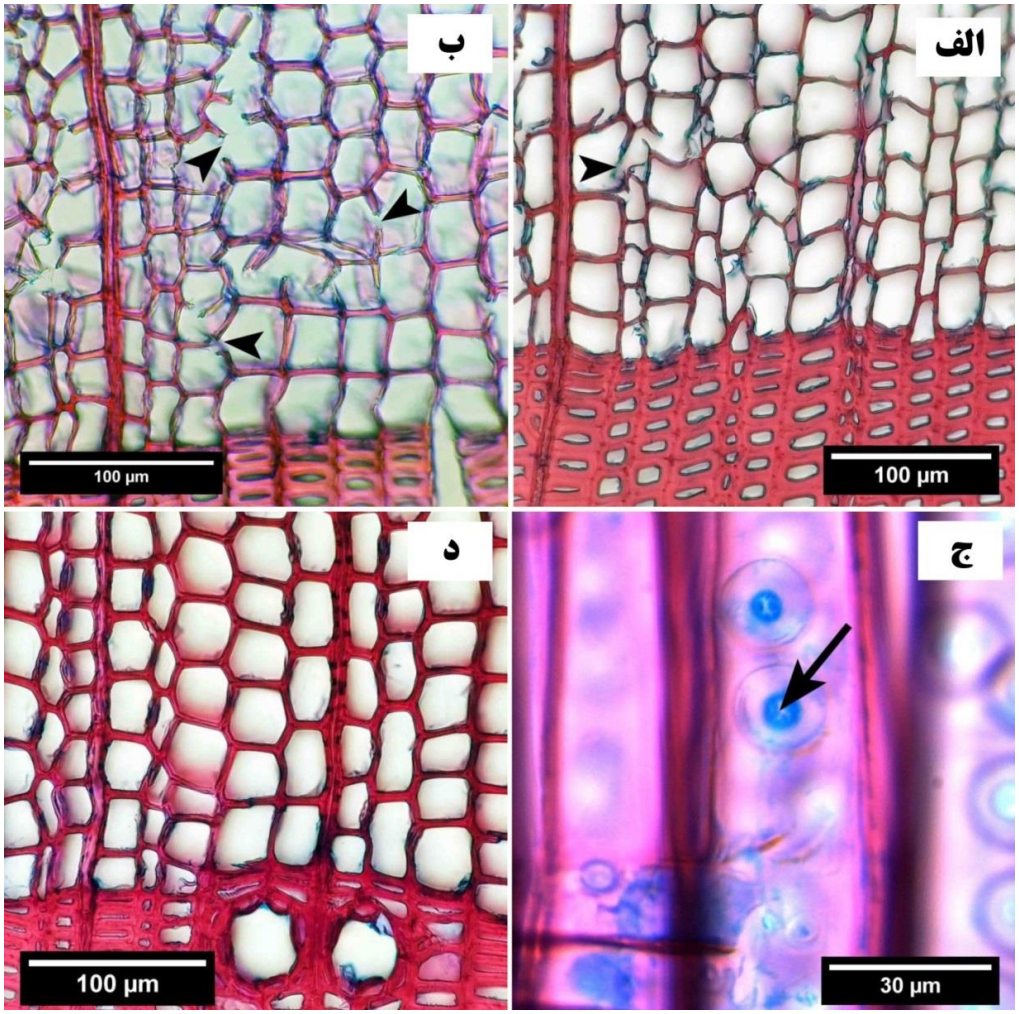
نتیجه‌گیری

تاکنون در چند پژوهش، به‌طور موفقیت‌آمیزی از باکتری باسیلوس آمیلولیکوفاسینس برای کنترل زیستی بیماری‌های قارچی گیاهی استفاده‌شده است (سیاه مشته و همکاران ۲۰۱۷)؛ بااین‌حال تاکنون توانایی این باکتری در حفاظت زیستی چوب بررسی نشده بود. در این پژوهش نشان داده شد که این باکتری به‌طور چشم‌گیری رشد قارچ‌های عامل پوسیدگی سفید و قهوه‌ای را هم در محیط کشت دوگانه و هم در بستر چوب مهار می‌کند. ازاین‌رو، این باکتری می‌تواند به‌عنوان عامل کنترل زیستی در چوب آلات مطرح شود. طبیعی است که با توجه به امکان رشد باکتری در محیط آبی، اسپری سوسپانسیون این باکتری بر روی چوب آلات تازه قطع‌شده که رطوبت بالایی دارند می‌تواند پوسیدگی قارچی آن‌ها را به‌طور معنی‌داری به

www.SID.ir

Archive of SID

تعویق بی انـدازد. در پژوهش‌هـای آتـی، عـلاوه بـر قـدرت بازدارندگی این بـاکتری، قـدرت مهـار آن در جلـوگیری از گسترش پوسیدگی در چوب آلوده به قارچ نیـز لازم اسـت موردبررسی قرار گیرد. همچنین، بـا توجـه بـه اینکـه ایـن جدایه از باکتری به‌طور طبیعی در تنه درختان راش ایرانی وجود داشـته و از آن استخراج‌شـده، ممکـن اسـت قـدرت استقرار آن در بافـت چـوبی (تشـکیل بیـوفیلم) از عوامـل کنترل زیستی با منشأ غیر درختی بهتر باشد.



شکل ۶- مقطع عرضی (الف) و طولی (ج) چوب نوئل آلوده به قارچ پوسیدگی سفید. سر فلش گسیختگی دیواره بین سلولی و فلش، تخریب منافذ بین‌تراکئیدی را نشان می‌دهند؛ چوب نوئل پس از مجاورت با قارچ مولد پوسیدگی قهوه‌ای (ب)؛ سر فلش‌ها گسیختگی دیواره بین‌تراکئیدی را نشان می‌دهند؛ مقطع عرضی چوب نوئل تیمار شده با باکتری آمیلولیکوفاسینس که در معرض قارچ پوسیدگی قهوه‌ای قرارگرفته است.

منابع

[1] Zabel, R.A. and Morrell, J.J., 1992. Wood microbiology: decay and its prevention. Academic Press, San Diego, USA, 476 p.

[2] Schmidt, O., 2007. Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. Mycological Progress, 6: 261-279.

[3] Baechler, R.H. and Gjovik, L.R., 1986. Looking back at 75 years of research in wood preservation at the U.S. forest products laboratory. In: Proceedings of the American Wood Preservers' Association, 82:133-147

www.SID.ir

Archive of SID

[4] Cook, R.J. and Baker, K.F., 1988. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Psychopathological Society, St. Paul Minnesota, USA, 539 p.

[5] Shahraki M., Heydari A. and Hasanzadeh N. 2009. Investigation of antibiotic, siderophore, volatile metabolites production by Bacillus and Pseudomonas bacteria. Iranian Journal of Biology, 22(1): 71-84. (In Persian)

[6] Hulme, M.A. and Shields, J.K., 1972. Interactions between fungi in wood blocks. Canadian Journal of Botany, 50: 1421-1427.

[7] Seifert, K.A., Hamilton, W.E., Breuil, C. and Best, M., 1987. Evaluation of Bacillus subtilis C186 as a potential biological control of sapstain and mould on unseasoned lumber. Canadian Journal of Microbiology, 33: 1102-1107.

[8] Fernando, W.G.D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A.S. and Savchuk, S.C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biology and Biochemistry, 37:955-964.

[9] Macagnana, D., Romeiro, R.D.S., Pomellac, A.W.V. and De Souza, J.T., 2008. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of Moniliophthora (ex Crinipellis) perniciosa by phyllo plane actinomycetes. Biological Control, 47: 309-314.

[10] Haas, D. and Défago, G., 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent Pseudomonas. Nature Reviews Microbiology, 3: 307-319.

[11] Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Barka, E.A., 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71: 4951-4959.

[12] Wood preservatives - Test method for determining the protective effectiveness against wood destroying basidiomycetes - Determination of the toxic values. EN 113 Standard, 1997.

[13] Saechow, S., Thammasittirong, A. and Thammasittirong, S., 2016. In vitro inhibitory effect of Bacillus subtilis BAS114 against Curvularia lunata. Advances in Environmental Biology, 10(1): 176-183

[14] Yazdanparast, R. 1993. Screening for starch-hydrolyzing bacteria. Medical Journal of Islamic Republic of Iran, 7(1): 35-41. (In Persian)

[15] Su, Y.Y., Qi, Y.L. and Cai, L., 2012. Induction of sporulation in plant pathogenic fungi. Mycology, 3 (3): 195–200.

[16] Sajitha ،K.L., Maria Florence, E.J., Suma Arun Dev., 2014. Screening of bacterial biocontrols against sapstain fungus (Lasiodiplodia theobromae Pat.) of rubberwood (Hevea brasiliensis Muell.Arg.). Research in Microbiology,165: 541-548.

[17] Huang, J., Wei, Z., Tan, S., Mei, X., Shen, Q. and Xu, Y., 2014. Suppression of bacterial wilt of tomato by bioorganic fertilizer made from the antibacterial compound producing strain Bacillus amyloliquefaciens HR62. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(44): 10708-16.

[18] Gordillo, M.A., Navarro, A.R., Benitez, L.M., Torres de Plaza, M.I. and Maldonado, M.C., 2009. Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a Bacillus sp. strain IBA 33. Microbiology Insights, 2: 15-24.

[19] Ghannoum, M.A. and Rice, L.B., 1999. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 501-17.

[20] Fortwendel, J.R., Juvvadi, P.R., Pinchai, N., Perfect, B.Z., Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. and Steinbach, W.J., 2009. Differential effects of inhibiting chitin and 1,3-(beta)-D-glucan synthesis in ras and calcineurin mutants of Aspergillus fumigatus. Antimicrob Agents Chemother, 53(2): 476-82.

[21] Ashwini, N. and Srividya, S., 2014. Potentiality of Bacillus subtilis as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by Colletotrichum gloeosporioides. Biotech, 4: 127–136

[22] Sajitha, K.L. and Suma A.D., 2016. Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in Bacillus subtilis B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood. Biological Control, 96: 78–85.

www.SID.ir

Archive of SID

Bio-control of white and brown rot in beech and spruce wood using Bacillus amyloliquefaciens

M. Ramezanpour[1]
R. Oladi[2*]
M. Ahmadzadeh[3]
A. Tarmian[4]

[1] Ph.D. student, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

[2] Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

[3] Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University of Tehran, Karaj, Iran.

[4] Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Corresponding author:
oladi@ut.ac.ir

Received: 2019/11/10
Accepted: 2020/01/23

Abstract

Nowadays, new and environmentally-friendly methods of wood preservation have been focused. One of these methods is the bio-protection of wood against destructive agents in which microorganisms are used to protect the wood instead of chemicals. The aim of this study was to protect the beech and spruce wood against white and brown rot using a bacterium extracted from beech (*Bacillus amyloliquefacien*). For this purpose, *B. amyloliquefaciens* was first placed in a dual culture medium against wood-destroying fungi and then in wood specimens. The results showed that this bacterium inhibited the growth of destructive fungi in both media. The studied bacterium is capable of producing chitinase, amylase, and cellulase enzymes and the microscopic study confirmed the results of weight loss tests. Overall, here, for the first time, *B. amyloliquefaciens* is proposed as an efficient bio-control of wood decay.

Keywords: wood decay, decay pattern, wood bio-protection, antagonism.

www.SID.ir