نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، ص. ۱۹-۱۰

Journal of Water and Soil
Vol. 23, No. 3, Fall 2009, p.10-19

تأثیر تلقیح آکتینومیست‌ها و بیوماس آنها در کمپوست بر روی رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای

علی پاکدین[۱] - محمد فارسی[۲*] - حسن مرعشی[۳]

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۳۰
تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۱۴

چکیده

قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید یک تجزیه کننده ثانویه می‌باشد و بایستی فعالیت میکروارگانیسم‌های دیگر، مواد اولیه خام را برای رشد آن تجزیه نمایند. آکتینومیست‌ها به دلیل توانایی‌شان در تجزیهٔ مولکول‌های پیچیده مخصوصاً سلولز، لیگنوسلولز و لیگنین، در تهیهٔ کمپوست مورد استفاده قارچ خوراکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. بیوماس میکروبی آکتینومیست‌ها حاوی میزان بالایی نیتروژن و مواد معدنی برای رشد قارچ خوراکی می‌باشد. از آکتینومیست‌های متعلق به جنس‌های *Streptomyces*، *Saccharomonospora*، *Thermomonospora*، *Nocardioides*، *Saccharopolyspora*، *Microbispora*، *Glycomyces* به منظور تلقیح کمپوست استریل شده و همچنین تهیه بیوماس باکتریایی و تهیه بستر کشت برای بررسی رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای استفاده شد. اندازه‌گیری رشد میسلیوم قارچ بر روی کمپوست تلقیح شده با آکتینومیست‌های مذکور نشان داد که این تلقیح می‌تواند موثر بوده و باعث افزایش رشد میسلیوم قارچ خوراکی نسبت به محیط شاهد گردد. آکتینومیست‌های جنس استرپتومایسس نسبت به جنس‌های دیگر آکتینومیست‌ها از رشد میسلیوم قارچ حمایت نمودند.

واژه‌های کلیدی: آکتینومیست، بیوماس میکروبی، کمپوست، قارچ خوراکی تکمه‌ای، *Agaricus bisporus*

مقدمه

افزایش روز افزون جمعیت و محدودیت زمین‌های قابل کشت محصولات کشاورزی نیازمند تولید هرچه بیشتر غذا از طریق منابع جایگزین مانند قارچها می‌باشد. تولید قارچ در سرتاسر دنیا درحال افزایش بوده و امروزه در تمامی طول سال برای استفاده در مقادیر زیاد در دسترس می‌باشد (۲ و۱۰). کمپوست حاصلخیز، اسپاون مرغوب و کنترل خوب شرایط محیطی سه عامل مهم دخیل در میزان عملکرد قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید می‌باشند. بهینه‌سازی هر یک از این عوامل می‌تواند میزان عملکرد را افزایش دهد. قارچهای پرورشی، مانند قارچ خوراکی تکمه‌ای، به علت وجود مواد غذایی متنوع در مواد خام کمپوست و مزیت رقابتی ارگانیسم‌های ساده‌تر در هضم کردن این مواد، قادر به رقابت با این ارگانیسم‌های پست‌تر (باکتریها و قارچهای متعلق به کلاس قارچهای ناقص) نمی‌باشند، از اینرو برای رشد بهینه به یک محیط رشد انتخابی و با کیفیت عالی نیاز دارند (۵ و ۲۱).

در فرایند تهیه کمپوست برای رشد قارچ تکمه‌ای سفید، میکروارگانیسم‌های گرمادوست معینی شامل آکتینومیست‌ها، قارچها و آکتینومایست های گرمادوست دخالت دارند و در گرم شدن خود به خودی مواد آلی نقش اصلی را ایفا می‌نمایند (۸ و ۲۰). بسیاری از گونه‌های گرمادوست در دماهای ۶۵ و حتی ۸۲ درجه سانتی‌گراد از کمپوست جداسازی شده‌اند (۳). در این میان آکتینومیست‌ها، مخصوصاً گونه های گرمادوست، بعنوان اجزای اصلی میکروفلور کمپوست‌ها شناخته شده‌اند. آکتینومیست‌ها به دلیل توانایی‌شان در تجزیهٔ مولکول‌های پیچیده مخصوصاً سلولز، لیگنوسلولز و لیگنین در تهیهٔ کمپوست حائز اهمیت می‌باشند (۱۴و ۱۵). آکتینومیست‌ها نسبت به قارچها دما و pH بالاتری را تحمل می‌کنند (۹). دو جنس *Streptomyces* و *Thermoactinomyces* فراوانترین آکتینومیست‌های گرمادوست در کمپوست می‌باشند. جمعیت آکتینومیست‌های گرمادوست در فاز دوم (قله حرارتی یا مرحله

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲و۳ – به ترتیب استاد و استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* – نویسنده مسئول: (Email: mihfarsi@yahoo.com

پاستوریزاسیون) به سرعت غالب می‌شود (۲۳).

فعالیت میکروبی، مواد خام اولیه شامل کاه و کلش و سایر زوائد آلی را به کمپوست قارچ تبدیل می‌کند. محصول نهایی این میکروارگانیسم‌ها (زنده و یا مرده) در کمپوست بیوماس میکروبی نامیده می‌شود. بیوماس میکروبی حاوی میزان بالایی نیتروژن می‌باشد و از آنجایی که میکروارگانیسم‌ها مواد معدنی را در حین کمپوست‌سازی در خود جمع می‌کنند، یک منبع خوب از نظر مواد معدنی برای رشد قارچ محسوب می‌شود (۴، ۵ و ۲۲). علاوه بر این برخی از جدایه‌های آکتینومیست‌ها قادرند تا ۴۰٪ لیگنین سوبسترا را به صورت محلول درآورند (۱۳).

بهبود فرایند تهیهٔ کمپوست و بدست آوردن کمپوست عالی برای پرورش قارچ با بهینه کردن ترکیب فلور میکروبی کمپوست می‌تواند عملکرد قارچ را افزایش دهد. در تلاش‌هایی به منظور سرعت بخشیدن به فرایند تهیهٔ کمپوست و همچنین افزایش عملکرد قارچ خوراکی، تعدادی از میکروارگانیسم‌های گرمادوست به طور مصنوعی به کمپوست اضافه شده اند. پوپ و همکاران (۱۷) قارچ‌های گرمادوست را در حین تهیهٔ کمپوست اضافه کردند، محققین دیگر در آزمایشات جداگانه آکتینومیست‌ها را با کمپوست در زمان مایه‌زنی مخلوط کردند و در هر دو مورد افزایش در عملکرد را گزارش نموده‌اند (۲۵).

شرایط دینامیک میکروارگانیسم‌ها در کمپوست می‌تواند بسیاری از تفاوت‌های موجود در نتایج گزارشات کاربرد مکمل‌های کمپوست و آزمایشات علمکرد را توضیح دهد. انجام مطالعات در زمینهٔ دستورزی محیط میکروبیولوژیکی و تأثیراتی که این میکروارگانیسم‌ها بر تولید قارچ دارند باید قبل از مسائلی نظیر مصرف شدن کمپوست و اثر افزودنی‌ها بر کمپوست مد نظر قرار گیرد. از آنجا که میکروارگانیسم‌های گوناگونی که در کمپوست‌سازی دخالت دارند نقش عمده‌ای در کیفیت نهایی کمپوست و عملکرد آن ایفا می‌نمایند، می‌توان با شناسایی و دستورزی میکروفلور کمپوست در طی مراحل مختلف فرایند کمپوست‌سازی و مهیا کردن زمینه رشد برای ارگانیسم‌های مطلوب، به اهداف مورد نظر دست یافت. با توجه به این که تحقیقات در این زمینه بیشتر توسط شرکت‌های خصوصی انجام می‌شود، نتایج حاصله در دسترس دیگران قرار نمی‌گیرد. از طرفی فلور میکروبی کمپوست با توجه به ترکیب متفاوت آن در کشورهای مختلف دارای گوناگونی فراوانی می‌باشد. با توجه به اینکه رابطه مثبت شدیدی بین میزان رشد میسلیوم در بستر کشت با عملکرد قارچ در واحد سطح وجود دارد، این تحقیق به منظور شناخت اثر حمایتی چند جدایه از آکتینومیست‌ها بر رشد میسلیوم قارچ خوراکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جدایه های آکتینومیست

در این تحقیق از آکتینومیست‌های متعلق به جنس‌های *Streptomyces*، *Saccharomonospora*، *Thermomonospora*، *Nocardioides*، *Saccharopolyspora*، *Microbispora*، *Glycomyces* برای تلقیح کمپوست استفاده شد. آکتینومیست‌های مورد استفاده توسط روش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی (رنگ‌آمیزی اسید–فست جزئی، هیدرولیز اوره، احیای نیترات، کاتالاز و تست مقاومت به لیزوزیم) و روش تجزیه و تحلیل الگوی قطعات برشی ژن 16S rRNA در آزمایشات قبلی توسط نویسندگان این مقاله شناسایی شده بودند (۱).

نژاد قارچ خوراکی تکمه‌ای

از نژاد هیبرید تجارتی قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید به‌نام IM008 در این تحقیق استفاده شد. این هیبرید تجاری در یک برنامه اصلاحی در آزمایشگاه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی در جهاد دانشگاهی مشهد تولید شده است. به منظور اندازه گیری رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای روی کمپوست تلقیح شده با آکتینومیست‌های مورد نظر، از اسپاون تجارتی این نژاد استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان رشد میسلیوم قارچ روی بستر کشت تهیه شده با عصاره آکتینومیست‌ها از کشت مادری نژاد IM008 که در محیط کشت کمپوست آگار رشد کرده بود، استفاده گردید (۱).

(جدول ۱)- جنس‌های آکتینومیست استفاده شده درتلقیح کمپوست و تهیه محیط کشت با بیوماس میکروبی

جنس	شماره ایزوله
Streptomyces	۱،۲۰ ، ۱۴، ۲۲، ۸، ۹، ۱۷
Saccharomonospora	۲، ۱۸
Thermomonospora	۴، ۵
Nocardioides	A_4،A_7
Saccharopolyspora	۱۳
Microbispora	۱۵
Glycomyces	۱۹

اندازه‌گیری رشد خطی میسلیوم قارچ

به منظور اندازه‌گیری میزان رشد روزانه میسلیوم قارچ در پتری‌دیش و در سطح کمپوست، قطر میسلیوم رشد کرده در دو ناحیه عمود بر هم اندازه‌گیری شد. میانگین قطرهای پرگنه اندازه‌گیری شده به‌عنوان میزان رشد میسلیوم درنظر گرفته شد (۲).

تلقیح کمپوست با آکتینومیست‌ها و بررسی میزان رشد میسلیوم قارچ

کمپوست پاستوریزه در دو روز متوالی هر روز به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد سترون شد (۱۳). بین این دو تیمار، کمپوست به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از سترون، به مقدار وزن ازدست رفته، آب استریل به کمپوست اضافه شد. کمپوست استریل شده پس از تلقیح با ۱۰ جدایه آکتینومایست گرمادوست به صورت انفرادی، به مدت ۵ روز در محدوده دمایی ۴۷ تا ۴۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس دمای کمپوست به ۲۴ درجه سانتی‌گراد کاهش داده شد. برای اندازه‌گیری میزان رشد میسلیوم قارچ در کمپوست از ظروف پلاستیکی یک‌بار مصرف درب دار استفاده شد. در این ظروف ۲۰۰ گرم کمپوست انکوبه شده و ۱۰ عدد اسپاون قارچ با فاصله کافی قرار داده شد و برای ریسه دوانی میسلیوم در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان رشد میسلیوم قارچ در هر ظرف کمپوست در روزهای چهارم و دهم پس از تلقیح با اسپاون اندازه‌گیری گردید (۲).

میزان رشد میسلیوم قارچ روی محیط کشت تهیه شده با عصاره آکتینومیستی

به منظور بررسی اثر بیوماس آکتینومایست ها بر رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای، تعداد ۱۶ جدایه آکتینومیست (جدول ۱) به صورت انفرادی در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع کمپوست آگار غنی شده با محیط کشت CYM (۱۸) به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر انکوباتور با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ rpm کشت داده شدند. محیط کشت در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شد و پلت آکتینومایست جدا شد. پلت‌های آکتینومیست به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا آکتینومایست ها منجمد شوند. با استفاده از دستگاه فریز درایر (Zirbus Technology, VaCo5) آکتینومیست‌ها تا رسیدن به وزن ثابت آبگیری شدند. برای تهیه محیط کشت جامد اندازه گیری رشد میسلیوم، مقدار ۰/۱ گرم از آکتینومایست های خشک شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA اضافه شد. محیط‌ها به خوبی بر روی همزن مغناطیسی هم زده شدند و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. بعد از اتوکلاو کردن، محیط کشت‌ها در پتری‌دیش‌های سترون ۱۰ سانتی‌متری توزیع شدند. محیط کشت PDA بدون اضافه کردن بیوماس آکتینومیستی به عنوان شاهد استفاده شد. برای هر تیمار تعداد ۶ پتری‌دیش تهیه شد. در این آزمایش مقدار رشد میسلیوم به صورت روزانه اندازه گیری و ثبت شد. پس از رتبه بندی ۱۶ جدایه آکتینومیست از نظر حمایت از رشد میسلیوم قارچ خوراکی، تعداد ۱۰ تا از بهترین ها انتخاب و همراه با محیط بدون عصاره آکتینومیست به عنوان شاهد در قالب طرح بلوکی کامل با ۶ تکرار مورد مقایسه قرار گرفتند. میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی در دو نوبت، ۴ و ۱۰ روز پس از تلقیح اندازه گیری شد. داده های هر نوبت توسط برنامه آماری JMP تجزیه واریانس و میانگین ها به روش آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تلقیح کمپوست با آکتینومیست‌ها و بررسی میزان رشد میسلیوم قارچ

پس از گذشت ۴ روز از تلقیح کمپوست با اسپاون، ایزوله‌های آکتینومیست مورد استفاده از نظر حمایت از رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای با هم اختلاف بسیار معنی‌داری داشتند (جدول ۲). تا ۴ روز، آکتینومیست‌های جنس استرپتومایسس (ایزوله های ۱ و ۹) بیشترین حمایت را از رشد میسلیوم نمودند (جدول ۳). پس از گذشت ۱۰ روز نیز اختلاف بین جدایه‌های آکتینومیست هنوز هم معنی‌دار بود. اما در این تاریخ مقدار رشد میسلیوم در کمپوست تلقیح شده با استرپتومایسس ایزوله ۱ به صورت معنی‌داری از بقیه کمپوست‌ها بیشتر شده بود، ولی با کمپوست کنترل (کمپوست سترون نشده) اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳). معنی‌دار شدن تاریخ اندازه‌گیری به دلیل تداوم رشد میسلیوم بر روی کمپوست تا زمان اندازه‌گیری دوم می‌باشد. در مجموع، پس از گذشت ۱۰ روز بیشترین میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای در کمپوست‌های تلقیح شده با ایزوله های جنس *استرپتومایسس* بود، اگر چه میزان رشد میسلیوم در گونه‌های مختلف این جنس مقداری متفاوت می‌باشد (جدول ۳). استرپتومایسس‌ها به افزایش درجه حرارت در تونل پاستوریزاسیون مقاوم می‌باشند، به طوری‌که با افزایش درجه حرارت به بیش از ۶۰ درجه سانتی گراد تولید اسپور مقاوم می‌نمایند، اسپورهای آکتینومیست‌های گرمادوست در برابر دماهای بالا مقاوم می‌باشند (۶). با سرد کردن کمپوست به ۵۰ – ۴۸ درجه سانتیگراد به منظور آمونیاک‌زدایی آن، این اسپورها جوانه زده و دوباره فعال می‌شوند. یکی از دلایل وفور استرپتومایسس‌ها در کمپوست آماده مایه زنی همین مقاومت آنها در برابر درجه حرارت مرحله پاستوریزاسیون می‌باشد. گونه‌های جنس استرپتومایسس آنزیم زایلناز

تولید می‌کند که در اثر هیدرولیز زایلن را به زایلوز، زایلوبیوز و آرابیوز تجزیه می‌نماید. حداکثر فعالیت این آنزیم نیز در درجه حرارت ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد و در اسیدیته ۶ تا ۷ می‌باشد (۱۲). گونه‌های این جنس منبع خوبی برای آنزیم سلولاز نیز می‌باشند (۱۴). میکروفلور کمپوست در حین کمپوست سازی دارای فعالیت لاکازی نمی‌باشد، اما قارچ خوراکی تکمه‌ای دارای سیستم نسبتا فعال لیگنولیتیک و سلولولیتیک قوی می‌باشد (۷).

نکته قابل تأمل در این آزمایش عدم تفاوت معنی‌دار بین رشد میسلیوم قارچ در حضور ایزوله شماره ۱ و کمپوست استریل نشده بود (جدول ۳). در کمپوست استریل نشده همه ایزوله‌های استخراج شده در این آزمایش همراه با انواع دیگری از ایزوله‌ها که استخراج نشده‌اند و انواع متعددی از قارچها حضور دارند. اینکه یکی از این ایزوله‌ها بتواند به اندازه ترکیبی از انواع ایزوله‌ها و قارچها از رشد میسلیوم قارچ حمایت نماید نکته بسیار مثبتی است. در کمپوست استریل نشده ایزوله‌ها و قارچهای زیادی فعالیت می‌کنند. تعدادی از آکتینومیست‌ها و قارچهایی که در کمپوست استریل نشده رشد می‌نمایند برای رشد میسلیوم قارچ مضر می‌باشد. اثرات منفی آنها می‌تواند مانع از بروز کامل اثرات مثبت آکتینومیست‌ها و قارچ‌های مفید شود. علاوه براین ممکن است که اثرات متقابل بین این میکروارگانیسم ها نیز برای رشد میسلیوم قارچ خوراکی مفید نباشد. همانطور که از نتایج این آزمایش بر می‌آید اگر بتوان با معرفی یک یا تعداد محدودی از آکتینومیستهای مفید به کمپوست برای رشد میسلیوم قارچ تکمه‌ای، تجزیه کمپوست را هدفمند نمود، عمل‌آوری کمپوست خیلی بیشتر از آن چیزی خواهد شد که امروزه تولید کنندگان ما تجربه می‌نمایند.

(جدول ۲)- تجزیه واریانس اندازه گیری اول و دوم به صورت مجزا

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات اندازه گیری پس از ٤ روز	میانگین مربعات اندازه گیری پس از ۱۰ روز
بلوک	۵	۶,۷۸*	۱۵,۲۳ns
ایزوله	۹	۲۸,۳۴**	۹۶,۱۸**
خطا	۴۵	۳,۰۴	۹,۹۱

(جدول۳)- میانگین رشد قطر پرگنه (mm) در دو تاریخ یاد داشت برداری

شماره ایزوله	تیمار	بعد از ٤ روز	بعد از ۱۰ روز	اختلاف رشد
۹	*Streptomyces*	۱۸,۷۸	۲۱,۲۵	۲,۴۷
۱	*Streptomyces*	۱۶,۹۲	۲۵,۹	۸,۹۸
کنترل	Control	۱۶,۴۷	۲۵,۳۱	۸,۸۴
۸	*Streptomyces*	۱۵,۲۳	۱۹,۲۲	۳,۹۹
۱۸	*Saccharomonospora*	۱۴,۰۵	۱۸,۶۷	۴,۶۲
۱۷	*Streptomyces*	۱۳,۹۳	۲۰,۲	۶,۲۷
۱۳	*Saccharopolyspora*	۱۳,۷۸	۲۲,۲۸	۸,۵
۱۶	*Saccharomonospora*	۱۲,۰۸	۱۷,۸۸	۵,۸
۷	*Nocardioides*	۱۱,۲۸	۱۵,۲۷	۳,۹۹
۲۲	*Streptomyces*	۱۱,۲۰	۱۵,۴۷	۴,۲۷
LSD 5%		۲,۰۱	۳,۵۶	

(جدول ٤)- تجزیه واریانس مرکب داده های حاصل از اندازه گیری رشد میسلیوم در کمپوست استریل تلقیح شده با ایزوله‌های آکتینومیست متفاوت در مجموع دو تاریخ

منابع تغییر	DF	SS	MS	Prob > F
بلوک	۵	۸۹,۲۴	۱۷,۸۵	۰,۰۲۷
تاریخ	۱	۱۱۴۳,۹۲	۱۱۴۳,۹۲	<۰,۰۰۰۱
نژاد	۹	۹۵۸,۰۰	۱۰۶,۴۴	<۰,۰۰۰۱
تاریخ * ایزوله	۹	۱۶۲,۶۱	۱۸,۰۷	<۰,۰۰۵۲
خطا	۹۵	۶۰۳,۵۳	۶,۳۵۲۹	
کل	۱۱۹	۲۹۵۷,۳۱		

(جدول ۵)- مقایسه میانگین ها برای رشد پرگنه در کمپوست تلقیح شده با آکتینومیست در مجموع دو اندازه گیری

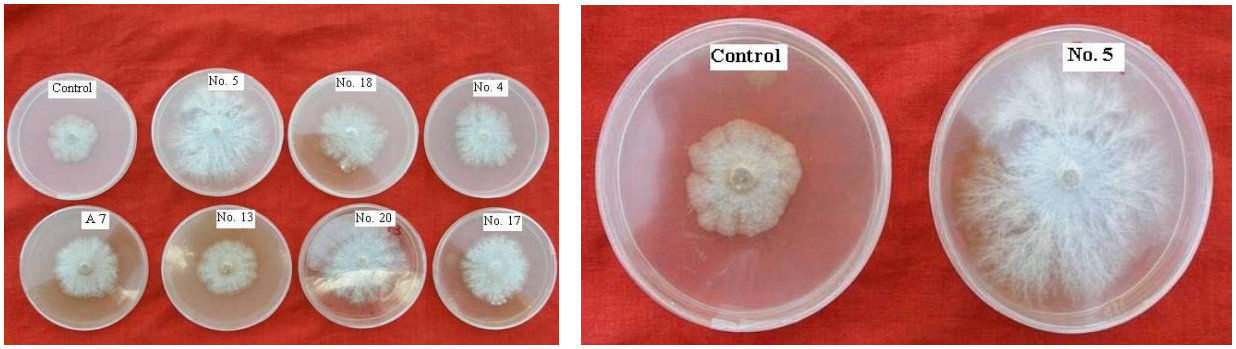
شماره ایزوله	تیمار	میانگین (mm)
کنترل	Control	۲۱,۹۱ a
۱	*Streptomyces*	۲۱,۴۱ ab
۹	*Streptomyces*	۱۹,۰۲ abc
۱۳	*Saccharopolyspora*	۱۸,۰۳ bcd
۸	*Streptomyces*	۱۷,۲۳ cd
۱۷	*Streptomyces*	۱۷,۰۷ cd
۱۸	*Saccharomonospora*	۱۶,۳۶ cde
۱۶	*Saccharomonospora*	۱۴,۹۸ de
۲۲	*Streptomyces*	۱۳,۳۳ e
۷	*Nocardioides*	۱۳,۲۸ e

بررسی رشد میسلیوم قارچ روی محیط کشت حاوی بیوماس آکتینومیست

در شکل (۱) میزان رشد میسلیوم قارچ در مدت ۱۷ روز روی محیط کشت PDA حاوی بیوماس ایزوله‌های مختلف در مقایسه با شاهد نشان داده شده است. همانطور که در شکل (۲) ملاحظه می‌شود میزان رشد میسلیوم در پتری‌دیش تلقیح شده با ایزوله شماره ۵ (سمت راست) در طی ۱۷ روز، بیش از دو برابر میزان رشد میسلیوم در محیط کشت PDA عاری از آکتینومایست می‌باشد. در شکل (۳) و جدول (۶) نیز همین نتیجه‌گیری مصداق دارد، بطوریکه ضریب رگرسیون (میزان رشد میسلیوم در هر روز) در محیط کشت تلقیح شده با ایزوله شماره ۵ بیش از دو برابر میزان رشد میسلیوم در محیط PDA می‌باشد. همانطور که از جدول شماره (۴) ردیف های ۱ و ۱۷ بر می‌آید این اختلاف در میزان رشد بسیار معنی‌دار است.

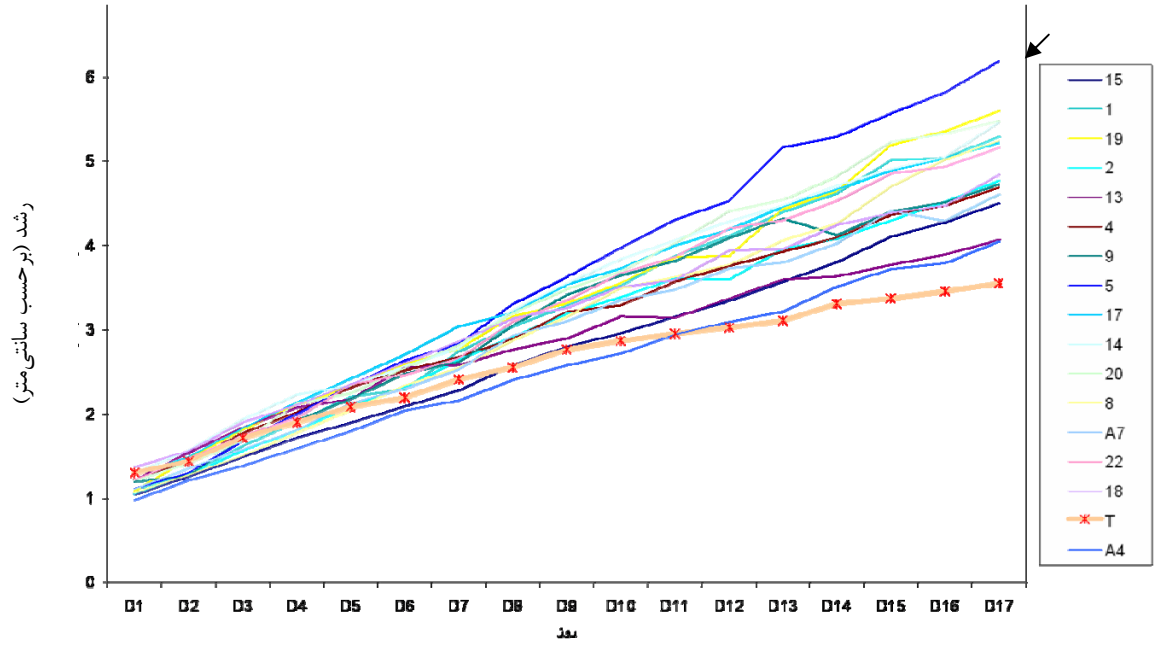
در شکل (۱) ب مشاهده می‌شود که میزان رشد میسلیوم قارچ در محیط های غذایی تلقیح شده با ایزوله های مختلف متفاوت می‌باشد. رشد بیشتر در هر محیط نشان از حمایت ترکیبات موجود در اجساد آن آکتینومیست از رشد میسلیوم قارچ خوراکی دارد، چون محیط زمینه برای همه PDA بوده است. این آکتینومایست‌ها در کمپوست رشد می‌نمایند و وقتی که کربن کمپوست به اتمام می‌رسد می‌میرند و اجساد آنها مورد تغذیه میسلیوم قارچ خوراکی قرار می‌گیرد.

در شکل (۲) میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای بر حسب سانتی‌متر در مدت زمان ۱۷ روز و ضرایب رگرسیون این نمودارها همراه با حدود اطمینان ۹۵٪ هر ضریب در جدول (۴) آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود ضریب رشد میسلیوم در ایزوله‌های مختلف متفاوت می‌باشد. در شکل (۳) میزان رشد میسلیوم در بهترین محیط کشت نسبت به شاهد آورده شده است.

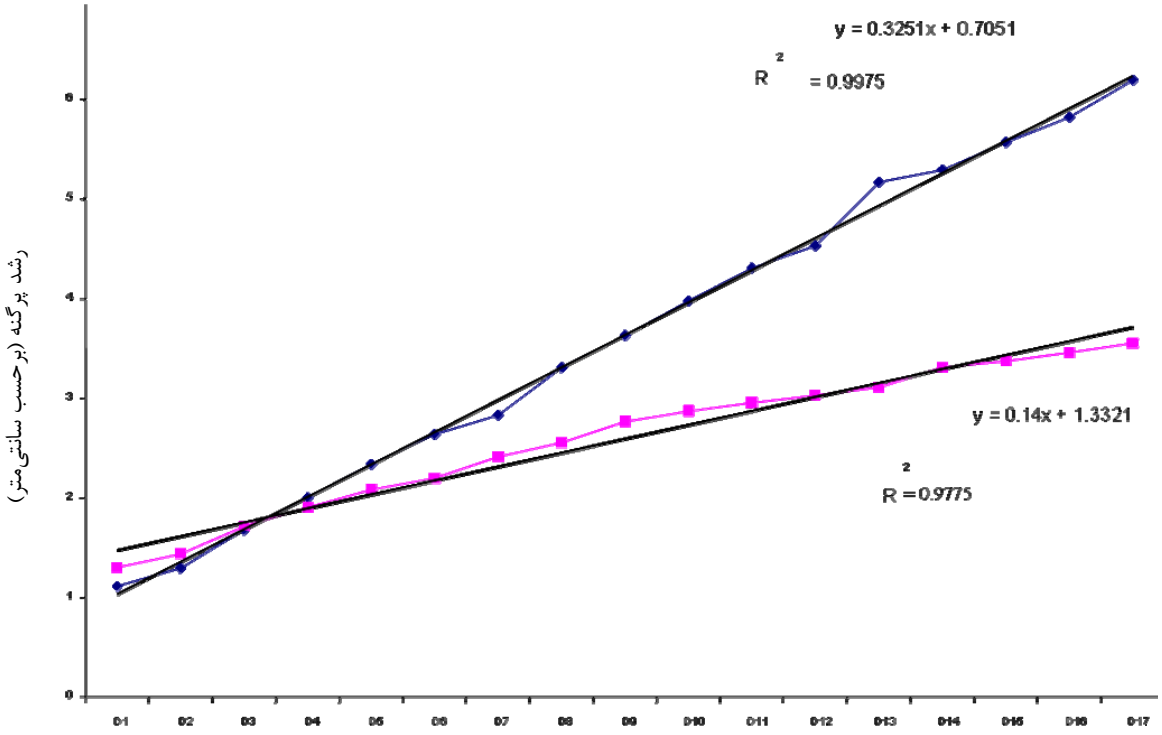


الف ب

(شکل ۱)- الف) مقایسه رشد میسلیوم در بهترین محیط کشت (راست) و محیط کشت شاهد (چپ) بعد از گذشت ۱۷ روز، ب) مقایسه رشد میسلیوم قارچ در محیط کشت‌های مختلف (۱۷ روز)



(شکل ۲)- میزان رشد میسلیوم قارچ در محیط های کشت حاوی بیوماس آکتینومیست، T : شاهد (محیط کشت PDA)، اعداد نشانگر شماره ایزوله می‌باشد



(شکل ۳)- میزان رشد میسلیوم در بهترین محیط نسبت به شاهد

(جدول٦)- فرمول تابعیت خطی میزان رشد میسلیوم (برحسب سانتی متر و زمان بر حسب روز) همراه با حدود اطمینان ۹۵٪ برای ضریب رگرسیون

ردیف	شماره ایزوله	فرمول رابطه خطی مقدار رشد	حد پایین	حد بالا
۱	۵	Yi = 0.71 + 0.33 Day	۰,۳۱۶	۰,۳۳۴
۲	۲۰	Yi = 0.92 + 0.28 Day	۰,۲۷۰	۰,۲۸۸
۳	۱۹	Yi = 0.91 + 0.27 Day	۰,۲۶۰	۰,۲۸۴
۴	۱	Yi = 0.82 + 0.27 Day	۰,۲۶۳	۰,۲۷۹
۵	۸	Yi = 0.76 + 0.26 Day	۰,۲۵۳	۰,۲۶۸
۶	۱۴	Yi = 1.12+ 0.26 Day	۰,۲۴۶	.۰,۲۶۷
۷	۲۲	Yi = 1.01 + 0.25 Day	۰,۲۴۳	۰,۲۶۳
۸	۱۷	Yi = 1.15 + 0.25 Day	۰,۲۴۰	۰,۲۶۲
۹	۹	Yi = 1.065 + 0.23 Day	۰,۲۱۱	۰,۲۵۳
۱۰	۲	Yi = 0.94 + 0.23 Day	۰,۲۱۹	۰,۲۴۲
۱۱	A7	Yi = 0.99 + 0.22 Day	۰,۲۰۸	۰,۲۳۲
۱۲	۱۵	Yi= 0.83 + 0.21 Day	۰,۲۱۰	۰,۲۱۸
۱۳	۴	Yi = 1.15 + 0.21 Day	۰,۲۰۵	۰,۲۲۳
۱۴	۱۳	Yi = 1.34 + 0.18 Day	۰,۱۵۴	۰,۱۸۱
۱۵	۱۸	Yi = 1.29 + 0.21 Day	۰,۲۰۰	۰,۲۲۱
۱۶	A4	Yi = 0.85 + 0.19 Day	۰,۱۸۴	۰,۱۹۳
۱۷	Control	Yi = 1.33 + 0.14 Day	۰,۱۲۸	۰,۱۵۱

با توجه به شکل (۳) و جدول (۴) آکتینومایست نژاد شماره ۵ که از جنس *ترمومونوسپورا* می‌باشد، نسبت به بقیه نژادهای مورد آزمایش به صورت معنی‌داری از رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای بیشتر حمایت نموده است. در این آزمایش آکتینومایست‌های جنس *استرپتومایسس* از نظر حمایت از میزان رشد میسلیوم قارچ بعد از جنس ترمونوسپورا قرار گرفتند. در یک تحقیق پیرامون فراوانی نسبی اسپورهای نژادهای مختلف در تونل کمپوست‌سازی مشخص شد که انبوهی از اسپورهای سه گونه از جنس ترمومونوسپورا در هوای تونل تخمیر در زمان مایه‌زنی کمپوست حضور دارند (۲۴). به نظر می‌رسد که گونه‌های این جنس می‌توانند شرایط محیطی مرحله پاستوریزاسیون را به خوبی تحمل نمایند. گونه ترمومونوسپورا کورواتا آنزیم بتازایلوزیداز تولید می‌نماید. حداکثر فعالیت این آنزیم در درجه حرارت ۶۸ – ۶۰ سانتی‌گراد و در اسیدیته ۶ تا ۷ می‌باشد (۱۹)، همان شرایطی که کمپوست در تونل پاستوریزاسیون قرار می‌گیرد. آکتینومایست جنس ترمومونوسپورا در آزمایش تلقیح کمپوست با ایزوله‌های آکتینومیستی استفاده نشده بود. بنابراین امکان مقایسه اثر آن با آکتینومیست‌های جنس استروپتومایسس ممکن نیست. این ایزوله پس از آزمایش تلقیح کمپوست استخراج شده بود که در آزمایش بیوماس میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

آکتینومیست‌های جنس استرپتومایسس و ساکارومایسس با معدنی‌کردن مواد آلی میزان دسترسی گیاه و یا میسلیوم قارچ به مواد غذایی دردسترس را افزایش می‌دهند (۱۱ و ۱۶). به نظر می‌رسد علاوه بر اینکه آکتینومیست‌های جنس ترمومونوسپورا و استرپتومایسس (آزمایش بررسی میزان رشد میسلیوم قارچ بر روی کمپوست تلقیح شده با آکتینومیست) دارای توانایی تجزیه خوب کمپوست می‌باشند ، قادرند مواد معدنی و نیتروژن مورد نیاز قارچ را در حین فرایند تهیه کمپوست در خود انباشته کرده و در زمان رشد میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای در دسترس آن قرار دهند. بنابراین قارچ خوراکی می‌تواند سریعتر پنجه‌دوانی کند که منجر به کاهش مدت زمان لازم برای برداشت اول می‌شود. از طرفی غالب شدن میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای در مدت زمان کوتاه سبب می‌شود که باکتری‌ها و قارچ‌های دیگر قادر به رقابت با آن نبوده و در نتیجه باعث کم شدن محصول نشوند.

با توجه به اینکه نتایج حاصل از میزان رشد میسلیوم روی کمپوست استریل شده و نتایج حاصل از رشد میسلیوم بر روی محیط کشت تهیه شده با بیوماس میکروبی تا اندازه قابل قبولی مطابقت دارد (جدول ۳ و ۴)، در مطالعات بعدی اندازه‌گیری میزان رشد میسلیوم روی محیط کشت تهیه شده با بیوماس میکروبی می‌تواند معیار خوبی برای سنجش اثر تلقیح کمپوست با آکتینومایست‌های مورد نظر باشد. این روش ساده‌تر و کم هزینه‌تر بوده و در مدت زمان کوتاهی با تعداد

بیشتری از تیمارها قابل اجرا می‌باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق، آکتینومیست‌ها بویژه جنس استرپتومایسس و ترمومونوسپورا دارای نقش مهمی در تهیه کمپوست و تجزیه مواد خام اولیه به یک محیط رشد عالی و انتخابی برای میسلیوم قارچ خوراکی تکمه‌ای می‌باشند. بقایای آکتینومیست‌ها که در مرحله مایه‌زنی در کمپوست آماده وجود دارند یک منبع خوب از نیتروژن و ریزمغذی‌های لازم برای رشد میسلیوم قارچ می‌باشند. با بهینه‌کردن شرایط برای رشد آکتینومیست‌ها در حین کمپوست‌سازی و همچنین تلقیح مصنوعی کمپوست با آکتینومیست‌ها در اوایل فاز دوم تهیه کمپوست می‌توان به یک کمپوست خوب و با بیوماس میکروبی مناسب در پایان این فاز دست یافت.

به دلیل ماهیت دینامیک میکروارگانیسم‌ها، بررسی برهمکنش آکتینومیست‌ها و قارچ‌های گرمادوست موجود در کمپوست ضروری می‌باشد. با انجام این بررسی‌ها می‌توان علاوه بر شناخت شرایط مساعد برای رشد میکروارگانیسم‌های دخیل در تهیه کمپوست به یک ترکیب مناسب از آنها برای تلقیح کمپوست و افزایش عملکرد آن دست یافت. قبل از ارائه هر نوع راهکاری، آزمایشات تکمیلی برای بررسی اثر توام بیوماس میکروبی آکتینومیست‌های جنس ترمومونوسپورا و استرپتومایسس همراه با تعدادی از قارچ‌های مفید ضروری است.

منابع

۱- پاکدین ع.، فارسی م. و مرعشی ح. ۱۳۸۶. شناسایی و بهینه سازی میکروفلور کمپوست قارچ خوراکی تکمه‌ای. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی مشهد. دانشگاه فردوسی مشهد

۲- فارسی م. و گردان ح.ر. ۱۳۸۶. پرورش و اصلاح قارچ‌های خوراکی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد

3- Beffa T., Blanc M., Lyon P.F., Vogt G., Marchiani M., Fischer J.L., and Aragno M. 1996. Isolation of Thermus strains from hot composts (60 to 80 degrees C). Appl. Environ. Microbiol., 62(5):1723-1727.

4- Beyer D.M. 2003. Basic procedures for *Agaricus* mushroom growing. Penn State's College of Agricultural Sciences, Agricultural Research and Cooperative Extension.

5- Chang S., and Miles P.G. 2004. Mushrooms cultivation, Nutritional value, Medicinal effect, and environmental Impact, second edition.2nd ed. Bocaraton, CRC press.

6- Fergus C.L. 1967. Resistance of spores of some thermophilic actinomycetes to high temperature. Mycopathologia, 23 (3):205-208.

7- Fermor T.R., and Smith J.F. 1984. Lignocellulose degradation in mushroom composts. Applied Biochemistry and Biotechnology, 9 (4):355-356.

8- Fordyce C. 1970. Relative numbers of certain microbial groups present in compost used for mushroom (*Agaricus bisporus*) propagation. App. Microbiol., 196-199.

9- Godden B., Ball A.S., Helvenstein P., McCarthy A.J., Penninckx M.J. 1992. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. J. Gen. Microbiol., 138(11):2441-2448.

10- Goyal R., Grewal R.B., and Goyal R.K. 2006. Nutritional attributes of *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju* mushrooms. Nutrition and health, 18(2): 179-184.

11- Higa T. 1996. Effective microorganisms - Their role in Kyusei Nature Farming. In: J.F. Parr, *et al*. (eds.), Proceedings of the 3rd International Nature Farming Conference. USDA; Washington, 20-23.

12- Holtz C., Kaspari H., and Klemme J.H. 1991. Production and properties of xylanases from thermophilic actinomycetes. Antonie van Leeuwenhoek, 59(1):1-7

13- Iiyama K., Stone B.A., and Macauley B.J. 1994. Compositional changing in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. App. and Environ. Microbiol. 6(5):1538-1546.

14- Jang H.D., and Chen K.S. 2003. Production and characterization of thermostable cellulases from *Streptomyces* transformant T3-1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19:263-268.

15- Lacey J. 1997. Actinomycetes in composting. Ann. Agric. Environ. Med., 4:113-121.

16- Piyadasa E.R., Attanayake K.B., Ratnayake A.D.A. and Sangakkara U.R. 1995. The role of effective microorganisms in releasing nutrients from organic matter. In: H.A.H. Sharifuddin, A.R. Anuar & M.F. Shahbuddin, (eds.) Proceedings of the Second Conference on Effective Microorganisms (EM), at Kyusei Nature Farming Center, Saraburi, Thailand, November, 1993. 7-14.

17- Pope S., Knaust H., and Knaust K. 1963. Production of compost by thermophilic fungi. Mushroom Sci, 5: 123-126.

18- Raper C.A., Raper J.R., and Miller R.E. 1972. Genetic analysis of the life-cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia, 64:1088-1117.

19- Singer R., and Harris B. 1987. Mushrooms And Truffles Botany, cultivation, and utilization.2nd rev., and enl. Ed:. Koeltz Scientific Books.`Koenigstein, Federal Republic of Germany.

20- Storm P.F. 1985. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. App. and Environ. Microbio,

1:906-913.
21- Stuzenberger F., and Bodine A.B. 1998. Thermostable B-xylosidase from *Thermomonospora curvata*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 20(1):55-60.
22- Suman B.C., and Sharma V.P. 2005. Mushroom Cultivation, Processing and uses. Agrobios, (India), 349 pp.
23- Tendler M.D., and Burkholder P.R. 1960. Studies on the thermophilic actinomycetes I. Methods of cultivation. App. Microbiol., 9:394-399.
24- Van den Bogart H.G., Van den Ende G., Van Loon P.C., and Van Griensven L.J. 1993. Mushroom worker's lung: serologic reactions to thermophilic actinomycetes present in the air of compost tunnels, 122(1):1-8.
25- Wiegant W.M**.** 1992. Growth characteristics of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production of mushroom compost. Appl. Environ. Microbiol., 58(4):1301–1307.

Journal of Water and Soil
Vol. 23, No. 3, Fall 2009, p.10-19

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، ص. ۱۹-۱۰

Investigation of the effects of actinomycetes inoculation and their biomass in compost on the growth of edible mushroom mycelia

A. Pakdin[1] – M. Farsi[2*] - H. Marashi[3]

Abstract

Edible white button mushroom is a secondary decomposer and the activity of other micro-organisms is necessary to decompose the raw compounds for its growth. Actinomycetes bacteria due to their ability to decompose the compound molecules such as cellulose, lingo-cellulose and lignin, play an important role in the composting process for the mushroom. Bacterial biomass of actinomycetes contains a high rate of nitrogen and minerals, necessary for growth of the mushroom. To investigate the effects of actinomycetes on growth of mushroom mycelia, isolates of the genus of *Streptomyces*، *Saccharomonospora*, *Thermomonospora*, *Nocardioides, Saccharopolyspora, Microbispora, Glycomyces* were used for inoculating of sterile compost and preparing bacterial biomass. The result showed that inoculating of compost with actinomycetes could have a significant effect on the growth of mushroom mycelia, compared to the control. Isolates belonging to the genus *Streptomyces* supported a higher growth of the mushroom mycelia.

Key words: Actinomycetes, Bacterial biomass, Compost, Edible button mushroom, *Agaricus bisporus*

1,2,3 - Contribution from Agricultural Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
(*- Corresponding author Email: mihfarsi@yahoo.com)