

بررسی آزمایشگاهی اثرات هم‌افزایی (سینرژیک) مخلوط‌های آفت‌کش‌های آلی، مواد کیلیت‌کننده فلز و آنتی‌اکسیدان در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین کمان

لطیف نظری^۱ و سید خلیل حسینی هاشمی^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، پست الکترونیک: hashemi@kiau.ac.ir

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۶

چکیده

در این تحقیق، اثرات مستقل و متقابل آفت‌کش‌های آلی پروبیوکونازول، تبوکونازول و کلروتالونیل با کیلیت‌کننده فلز اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و آنتی‌اکسیدان هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار (BHT) در غلظت‌های مختلف ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ ppm در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان (*Trametes versicolor*) آزمایش شد. آزمون‌ها در محیط آزمایشگاهی و به کمک محیط کشت مالت اکسترات آگار انجام شد. ابتدا محلول‌های حفاظتی با فرمول‌بندی‌ها و غلظت‌های مختلف به صورت مجزا و بعد به صورت ترکیبی توسط حلال آب تهیه شدند. آنگاه در زیر هود لامینار، به میزان ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت استریل در داخل پتری‌دیش‌ها ریخته شد. سه دیسک آنتی‌بیوگرام استریل (با موقعیت مثلثی شکل) روی محیط کشت قرار داده شد. به کمک نمونه‌بردار به میزان ۲۰ میکرولیتر محلول حفاظتی استریل شده بر روی هریک از دیسک‌ها به طور جداگانه ریخته شد. سپس به مقدار ۵ میلی‌متر از پلاگ میسیلیوم قارچ در مرکز پتری‌دیش‌ها قرار داده شد. پتری‌دیش‌ها به مدت یک هفته در داخل انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۷۵ درصد رطوبت نسبی قرار داده شدند. روزانه به مدت یک هفته، رشد میسیلیوم قارچ و اثرات بازدارندگی محلول‌های حفاظتی مختلف در برابر قارچ، اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که آفت‌کش کلروتالونیل به تنهایی هیچ اثر بازدارندگی بر روی رشد قارچ نداشته است، در حالی که آفت‌کش‌های پروبیوکونازول و تبوکونازول به تنهایی اثر معنی‌داری را در غلظت‌های مختلف بر روی رشد قارچ داشته‌اند. در بررسی اثر هم‌افزایی (سینرژیک) آفت‌کش‌های پروبیوکونازول، تبوکونازول و کلروتالونیل با افزودنی‌های غیر آفت‌کش EDTA و BHT این‌طور یافته شده است که بین آفت‌کش پروبیوکونازول و کیلیت‌کننده فلز EDTA در غلظت بالا مانند ۴۵۰ ppm اثر هم‌افزایی وجود داشته است، اما در ترکیب با بقیه محلول‌ها، اثر هم‌افزایی یافته نشده است. همچنین، هیچ‌گونه اثر هم‌افزایی بین آفت‌کش‌های تبوکونازول و کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی دیده نشده است.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش‌های آلی، EDTA، BHT، بازدارندگی رشد، هم‌افزایی، قارچ رنگین‌کمان

مقدمه

کفپوش‌ها، حصارها، تیرهای انتقال نیرو و غیره، دارای مصارف جهانی می‌باشد. متأسفانه، اگر رطوبت کافی در الوار، تیرها و فراورده‌های مرکب چوبی وجود داشته باشد،

چوب به‌عنوان یک منبع طبیعی و تجدیدشونده و یک ماده ساختمانی چندبهدی و فراگیر در ساخت خانه‌ها،

چوب (Ross, 2008) و فرمول‌بندی‌های حفاظت چوب مانند آزول مس (CA) و پروپیکونازول، تیوکونازول و ایمیداکلوپراید (PTI) استفاده بی‌دری داشته‌اند (Kamdem, 2008). به‌منظور افزایش کارایی تریازول‌ها در برابر قارچ‌های ویژه و گستردگی طیف فعالیت، این ماده با آفت‌کش‌های دیگری مانند کوآت‌ها، ۳-یدو-۲-پروپینیل بوتیل کربامات (IPBC) و یا مواد کمکی مانند اکسیدهای آمین فرمول‌بندی می‌گردد (Jiang & Walker, 2007; Hughes, 2004). قارچ‌کش‌های پروپیکونازول و تیوکونازول اغلب به‌منظور هم‌افزایی (با اثرات سینرژیک)، به‌صورت ترکیبی توصیه می‌شوند (Buschhaus & Valcke, 1995).

کلروتالونیل (۲، ۴، ۵، ۶-تترا کلرو ایزوفتالونیتریل) به‌طور ابتدایی به‌منظور کنترل کپک و باختگی مورد استفاده قرار گرفته است. این آفت‌کش با گلوپتاتینون (GSH)، به‌عنوان یکی از آنتی‌اکسیدان‌های گیاهان، حیوانات، قارچ‌ها و بعضی از باکتری‌ها و موجودات تک‌سلولی واکنش می‌دهد، به‌طوری‌که از عملکرد آنزیم جلوگیری می‌کند و منجر به مرگ سلول می‌شود (Stirling & Temiz, 2014). هرچند که این ماده در برابر پوسیدگی قارچی (Creffield *et al.*, 1996) و موربانه‌ها (Grace *et al.*, 1993)، نیز مؤثر است، اما این ماده انحلال‌پذیری کمی در حلال‌های متداول دارد و در فرمول‌بندی‌ها مشکل ایجاد می‌کند (Freeman *et al.*, 2006) و فقط در مقادیر کم برای حفاظت تعدادی از انواع چندسازه‌های چوبی مورد استفاده قرار گرفته است.

مطالعات انجام شده بر روی چوب‌های دارای دوام طبیعی زیاد، سازوکارهایی را که به‌وسیله آن فعالیت قارچ‌ها و حشرات کنترل می‌شوند را معرفی کرده است (Schultz & Nicholas, 2000). این مطالعات منجر به توسعه و ارزیابی فرمول‌بندی‌های مواد حفاظتی حاوی ترکیبات آنتی‌اکسیدان و کیلیت‌کننده فلز شده است (Little *et al.*, 2010; Schultz & Nicholas, 2006).

افزودنی‌های غیر آفت‌کش ممکن است روی گام‌های مشارکت مواد معدنی ضروری، عناصر، یا ترکیب‌هایی مانند

می‌تواند توسط موجودات زیادی از جمله قارچ‌ها به‌ویژه قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید، حشرات، موربانه‌ها و حیوانات مخرب دریایی موردحمله قرار گیرد و تخریب گردد. حمله قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید هم به لیگنین و هم به سلولز و همی‌سلولز به‌صورت ابتدایی و یا همزمان بسیار مورد توجه می‌باشد (Malakani *et al.*, 2014). یکی از روش‌های حفاظت در شرایط نامناسب، خشک نگه‌داشتن چوب است که می‌توان از تخریب چوب توسط چنین عواملی جلوگیری کرد؛ اما اگر نتوانیم فراورده‌های چوبی را به‌صورت خشک نگه‌داری کنیم یا چوب در تماس مستقیم با زمین یا محیط آبی باشد، در چنین حالتی باید چوب را به کمک آفت‌کش‌ها به‌منظور جلوگیری از ایجاد خسارت توسط قارچ‌ها یا حشرات تیمار حفاظتی کرد. چوب تیمار شده، مقاوم در برابر حمله قارچ‌ها و حشرات می‌گردد و صاحبان خانه را در حفاظت و ذخیره دارایی‌شان کمک می‌کند که به‌دنبال آن جنگل‌ها نیز حفظ خواهند شد (Leightley, 2003).

یک راهبرد بالقوه در کاهش هزینه و افزایش کارایی سیستم‌های حفاظتی چوب در آینده، ترکیب آفت‌کش‌های آلی و افزودنی‌های غیر آفت‌کش است. افزودنی‌های غیر آفت‌کشی که ممکن است بتوانند با آفت‌کش‌های آلی مخلوط شوند، عبارتند از مواد ضد آب، آنتی‌اکسیدان‌ها و کیلیت‌کننده‌های فلزات ویژه (آهن و منگنز) مورد نیاز برای رشد قارچ‌های مولد پوسیدگی چوب است.

تریازول‌ها از جمله آفت‌کش‌های آلی هستند که تأثیر زیادی در برابر پوسیدگی بازیدیومیست‌ها (قارچ‌های عامل پوسیدگی سفید و قهوه‌ای) دارند، اما در برابر پوسیدگی نرم (آسکومیست‌ها) تأثیر کمی دارند (Schultz & Nicholas, 2008). آنها به کمک بازدارندگی سنتز ارگوسترول کار می‌کنند. تریازول‌ها در برابر حشرات مؤثر نیستند، اما بعد از دهه ۱۹۸۰ برای حفاظت چوب معرفی شدند (Grundlinger & Exner, 1990; Wustenhofer *et al.*, 1990; Valcke, 1989) و به‌طور فعال در برابر باختگی (Schauwecker & Morrell, 2008)، در کارخانه‌های

(Switzerland)، تبوکونازول (TEB, SIGMA-ALDRICH, USA)، کلروتالونیل (CTN, SIGMA-ALDRICH, USA) و افزودنی‌های غیر آفت‌کش اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA, New Jersey, USA) و هیدروکسی تولوئن بوتیل دار (BHT, SIGMA-ALDRICH, USA) مورد استفاده قرار گرفتند.

ارزیابی فعالیت ضد قارچی

به منظور ارزیابی سمیت آفت‌کش‌ها، مواد کیلیت‌کننده فلز و آنتی‌اکسیدان، حدود ۲۲/۵ میلی‌گرم از این مواد را به‌طور جداگانه در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و از فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون Microsolve عبور داده شد و در داخل شیشه پنی‌سیلین ریخته شد. محیط کشت مالت اکستراکت آگار آماده شده با نسبت ۴۸g/L در داخل اتوکلاو مرطوب با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲-۱ اتمسفر استریل گردید. حدود ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت آماده شده در داخل هر یک از پتری‌دیش‌ها ریخته شد و ۳ دیسک آنتی‌بیوگرام با موقعیت مثلثی شکل بر روی محیط کشت‌های خنک شده قرار داده شد. به کمک نمونه‌بردار به میزان ۲۰ میکرولیتر از محلول‌های حفاظتی از قبل آماده شده بر روی دیسک‌های آنتی‌بیوگرام ریخته شد. ۵ غلظت (۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ و ۴۵۰ ppm) از محلول‌های حفاظتی آزمون شد و برای هر غلظت از ۳ دیسک آنتی‌بیوگرام و یک پتری‌دیش استفاده گردید. در مجموع ۷۵ پتری‌دیش و ۲۲۵ دیسک آنتی‌بیوگرام در این آزمون آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت.

پتری‌دیش‌ها در زیر هود لامینار خنک شدند و بعد حدود ۵ میلی‌متر پلاگ میسیلیوم قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان در مرکز پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت قرار داده شدند. پتری‌دیش‌های آلوده به قارچ، به انکوباتور با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و ۷۵ درصد رطوبت نسبی انتقال داده شدند. برای هر تیمار، ۳ دیسک آنتی‌بیوگرام به‌عنوان تکرار مورد استفاده قرار گرفت. قارچ در ۳ پتری‌دیش حاوی محیط کشت بدون محلول‌های حفاظتی به‌عنوان شاهد

آمینواسیدها برای رشد قارچ‌ها در چوب و تشکیل کولونی اثرگذار باشند. از این رو یک روش کنترل، جلوگیری از به‌دست آوردن عناصر ضروری مانند نیتروژن، فسفر یا کلسیم توسط قارچ‌ها خواهد بود. البته تاکنون نتایج مثبتی با مصرف تنها ترکیب کی‌لیت‌کننده کلسیم، N-Na-N-فتالویل هیدروکسامین (NHA، نمک سدیم) (Green III et al., 1997; Green III et al., 2000) به‌دست آمده است.

Hosseinihashemi (۲۰۱۶)، هم‌افزایی بین عصاره پوست درونی ساقه زرشک با آفت‌کش پروپیکونازول، کیلیت‌کننده فلز EDTA و آنتی‌اکسیدان BHT و مخلوط‌های آنها با یکدیگر را در برابر قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار داد و به این نتیجه رسید که عصاره پوست درونی زرشک به‌تنهایی خاصیت ضد قارچی نشان نداده است و خاصیت حفاظتی آن در ترکیب با پروپیکونازول بیشتر بوده است. پروپیکونازول و BHT درصد بازدارندگی ۴۳/۶ درصد و ۵۴/۳ درصد را به‌ترتیب در برابر رشد قارچ رنگین‌کمان نشان داده‌اند، به‌طوری‌که برای BHT در ۵۰ ppm مقدار آن به ۷۵ درصد رسید. با مخلوط کردن BHT و پروپیکونازول، اثرات هم‌افزایی دیده شد، به‌طوری‌که درصد بازدارندگی در ۱۵۰ ppm به ۶۲ درصد رسید.

گزارش‌ها در مورد اثر هم‌افزایی بین آفت‌کش‌های آلی و مواد کیلیت‌کننده فلز و آنتی‌اکسیدان در برابر بیماری‌های قارچی در محیط کشت آزمایشگاهی اندک بوده و یا وجود ندارد. در این تحقیق روش نوین به‌منظور تعیین اثرات هم‌افزایی بین فعال‌ترین آفت‌کش‌های آلی پروپیکونازول، تبوکونازول و کلروتالونیل با کیلیت‌کننده فلز EDTA و آنتی‌اکسیدان BHT مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

آفت‌کش‌ها و افزودنی‌های غیر آفت‌کش

آفت‌کش‌های پروپیکونازول (PCZ, SYNGENTA,)

قارچ طبق روش Hosseini Hashemi & Jahan Latibari (۲۰۱۱) تعیین شد. محلول‌های حفاظتی به صورت جداگانه و ترکیبی در ۵ غلظت مختلف ذکر شده به منظور مطالعه اثرات هم‌افزایی و فعالیت ضد قارچی آنها آماده گردید (جدول ۱).

نیز رشد کرد. رشد قارچ به طور روزانه بررسی شده و درصد نواحی پوشش داده شده توسط میسیلیوم ثبت شد. درصد رشد قارچ در برابر هر یک از محلول‌های حفاظتی توسط خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شده و سمیت غلظت‌های مختلف محلول‌های حفاظتی در بازدارندگی رشد

جدول ۱- تیمار آفت‌کش‌ها و افزودنی‌های غیر آفت‌کش با غلظت‌های مختلف

شماره تیمار	تیمار	کد تیمار	غلظت، ppm
۱	پروپیکونازول	P	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۲	تیبوکونازول	T	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۳	کلروتالونیل	C	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۴	EDTA	E	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۵	BHT	B	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۶	پروپیکونازول + EDTA	P + E	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۷	تیبوکونازول + EDTA	T + E	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۸	کلروتالونیل + EDTA	C + E	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۹	پروپیکونازول + BHT	P + B	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۱۰	تیبوکونازول + BHT	T + B	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۱۱	کلروتالونیل + BHT	C + B	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۱۲	پروپیکونازول + EDTA + BHT	P + E + B	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۱۳	تیبوکونازول + EDTA + BHT	T + E + B	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۱۴	کلروتالونیل + EDTA + BHT	C + E + B	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰
۱۵	پروپیکونازول + تیبوکونازول + کلروتالونیل	P + T + C	۴۵۰، ۳۵۰، ۲۵۰، ۱۵۰، ۵۰

پس از اندازه‌گیری رشد قارچ (قطر کولونی)، درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{رابطه (۱):} \quad \text{درصد بازدارندگی رشد قارچ} = [(C-T)/C] \times 100$$

به طوری که C، قطر کولونی شاهد (میلی‌متر) و T، قطر کولونی پتری‌دیش مورد آزمون (میلی‌متر) می‌باشد.

تحلیل آماری

دانکن و تکنیک تجزیه واریانس مورد تحلیل قرار گرفتند. بدین ترتیب تأثیر مستقل و متقابل هر یک از عوامل متغیر بر خواص مورد مطالعه در سطح اعتماد ۵ درصد بررسی شد.

نتایج به دست آمده در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از آزمایش‌های فاکتوریل با دو متغیر به کمک آزمون

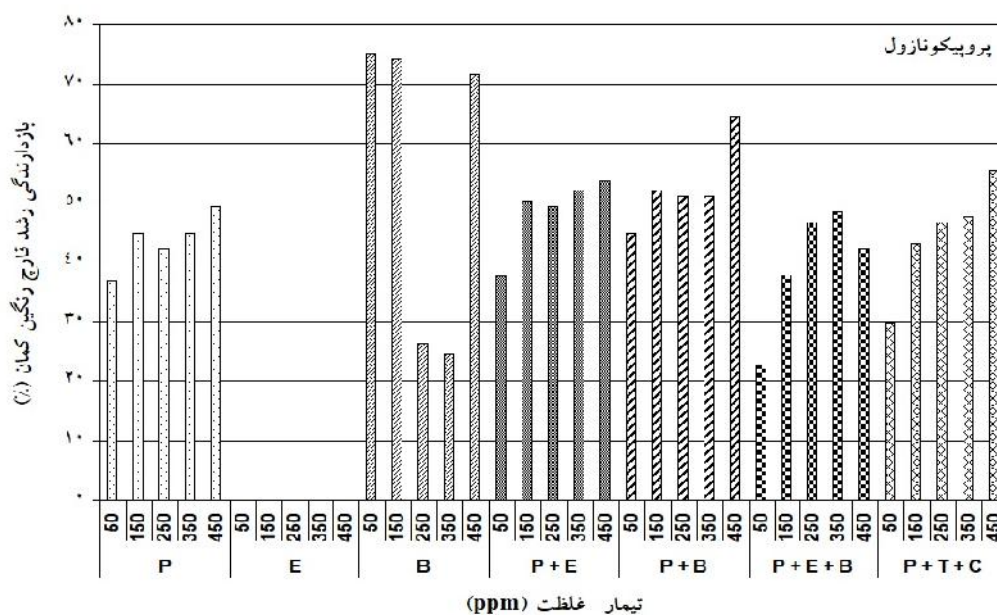
نتایج

بررسی اثر هم‌افزایی آفت‌کش پروپیکونازول با کیلیت‌کننده فلز EDTA و آنتی‌اکسیدان BHT تجزیه واریانس دو طرفه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان به‌منظور بررسی اثر هم‌افزایی آفت‌کش پروپیکونازول با سایر محلول‌های

حفاظتی و یا افزودنی‌های غیر آفت‌کش و همچنین تأثیر نوع تیمار و غلظت محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ در جدول ۲ نشان داده شده است. به‌طوری‌که تأثیر مستقل و متقابل نوع تیمار و غلظت محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ در سطح اعتماد ۵ درصد معنی‌دار بوده است.

جدول ۲- تجزیه واریانس فاکتوریل دو عاملی تأثیر هم‌افزایی آفت‌کش پروپیکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی و غلظت آنها بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌داری
تیمار (A)	۳۱۰۹۴/۵۸۷	۶	۵۱۸۲/۴۳۱	۴۴/۲۷۲	۰/۰۰۰
غلظت (B)	۲۲۳۱/۷۵۰	۴	۵۵۷/۹۳۷	۴/۷۶۶	۰/۰۰۲
اثر متقابل (A×B)	۹۸۷۲/۴۷۷	۲۴	۴۱۱/۳۵۳	۳/۵۱۴	۰/۰۰۰
خطای آزمایش	۸۱۹۴/۰۴۲	۷۰	۱۱۷/۰۵۸		
کل	۵۱۳۹۲/۸۵۵	۱۰۴			

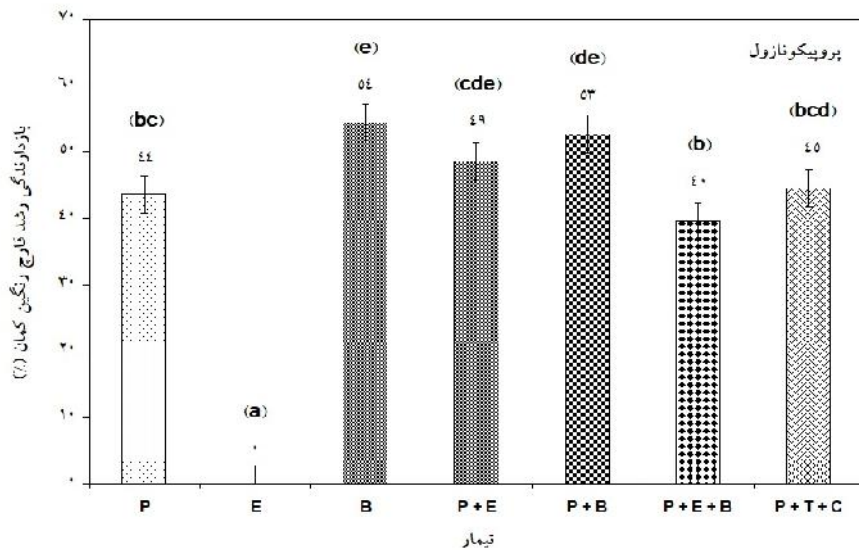


شکل ۱- اثر متقابل آفت‌کش پروپیکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی و غلظت آنها بر روی درصد بازدارندگی رشد قارچ

و گروه‌بندی میانگین‌ها در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ آمده است. بیشترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ (۷۵ درصد)

میزان معنی‌دار بودن درصد بازدارندگی رشد قارچ، با استفاده از روش دانکن بررسی شد. نتایج محاسبات آماری

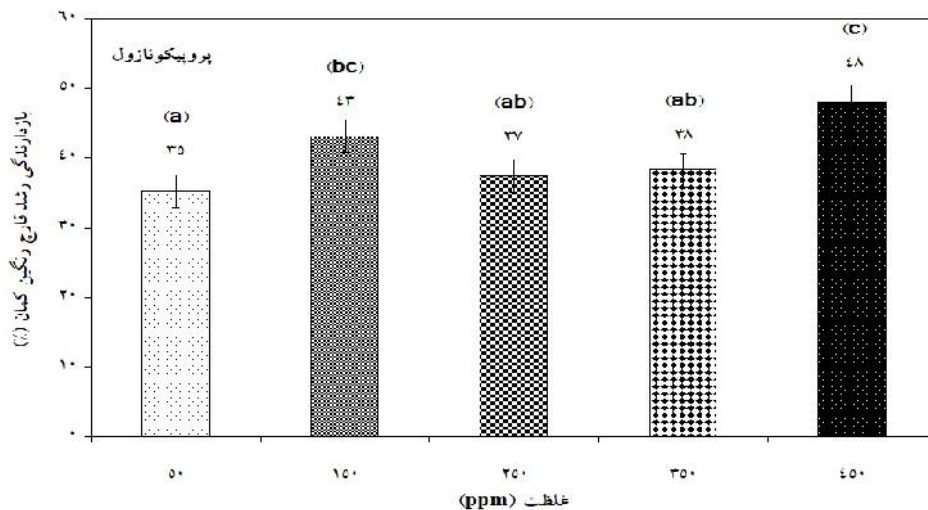
مربوط به تیمار آنتی‌اکسیدان BHT و غلظت ۵۰ ppm بود. کمترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ (صفر درصد) مربوط به تیمار کیلیت‌کننده فلز EDTA در تمام غلظت‌ها بوده است (شکل ۱).



شکل ۲- مقایسه تأثیر مستقل آفت‌کش پروپیکونازول و سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد).

کلروتالونیل در غلظت‌های مختلف وجود دارد، درحالی‌که کیلیت‌کننده فلز EDTA به‌تنهایی در تمامی غلظت‌ها، هیچ‌گونه تأثیری بر درصد بازدارندگی رشد قارچ نداشته است (شکل ۱ و ۲).

البته تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط تیمارهای پروپیکونازول، پروپیکونازول + EDTA + BHT، پروپیکونازول + پروپیکونازول + BHT + EDTA و پروپیکونازول + تیوکونازول



شکل ۳- مقایسه تأثیر مستقل غلظت آفت‌کش پروپیکونازول و سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌ها وجود دارد).

بررسی اثر هم‌افزایی آفت‌کش تبوکونازول با کیلیت‌کننده فلز EDTA و آنتی‌اکسیدان BHT داده‌های حاصل از اندازه‌گیری درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان به‌منظور بررسی اثر هم‌افزایی آفت‌کش تبوکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی و افزودنی‌های غیر آفت‌کش و تأثیر نوع تیمار و غلظت محلول‌های حفاظتی مختلف بر روی درصد بازدارندگی رشد قارچ در جدول ۳ نشان داده شده است. تأثیر مستقل و متقابل آفت‌کش تبوکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی و غلظت آنها بر درصد بازدارندگی رشد قارچ در سطح اعتماد ۵ درصد معنی‌دار بود.

در بررسی اثر هم‌افزایی و تأثیر مستقل آفت‌کش پروپیکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی، تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در کلیه تیمارها وجود داشته است. شکل ۱ و ۲ نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی بین آفت‌کش پروپیکونازول و کیلیت‌کننده فلز EDTA در غلظت ۴۵۰ ppm بوده، اما در ترکیب با بقیه محلول‌ها، اثر هم‌افزایی وجود نداشته است. در تأثیر مستقل غلظت محلول‌های مختلف، بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰ و ۴۵۰ ppm در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت، اما بین غلظت‌های ۲۵۰ و ۳۵۰ ppm اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس فاکتوریل دو عاملی تأثیر هم‌افزایی آفت‌کش تبوکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان

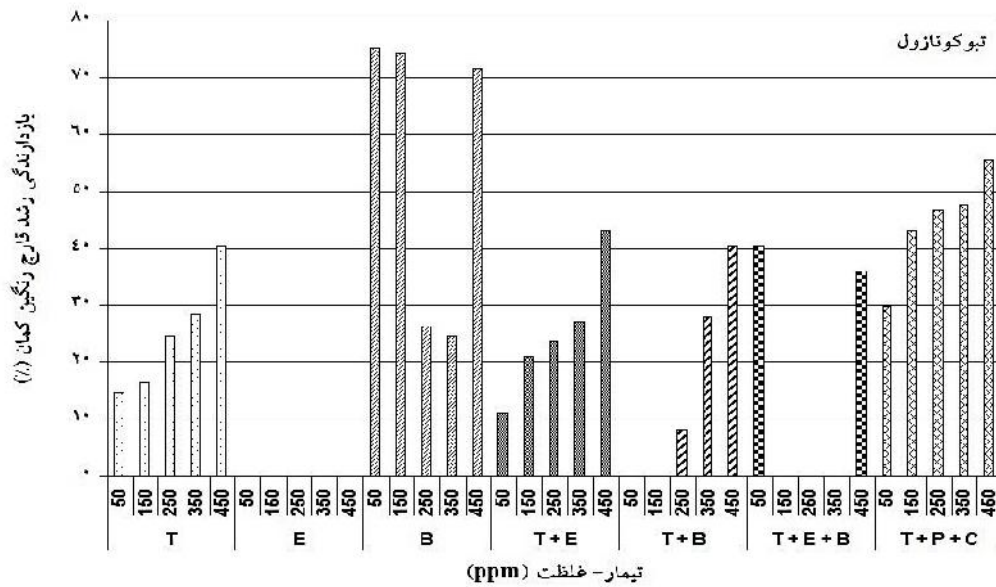
منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌داری
تیمار (A)	۳۰۷۷۳/۰۸۲	۶	۵۱۲۸/۸۴۷	۴۴/۶۴۷	۰/۰۰۰
غلظت (B)	۶۶۰۰/۷۷۵	۴	۱۶۵۰/۱۹۴	۱۴/۳۶۵	۰/۰۰۰
اثر متقابل (A×B)	۱۵۰۴۴/۵۱۹	۲۴	۶۲۶/۸۵۵	۵/۴۵۷	۰/۰۰۰
خطای آزمایش	۸۰۴۱/۳۴۶	۷۰	۱۱۴/۸۷۶		
کل	۶۰۴۵۹/۷۲۱	۱۰۴			

داشت، درحالی‌که بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط مخلوط‌های تبوکونازول + EDTA، تبوکونازول + BHT و تبوکونازول + EDTA + BHT در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۴).

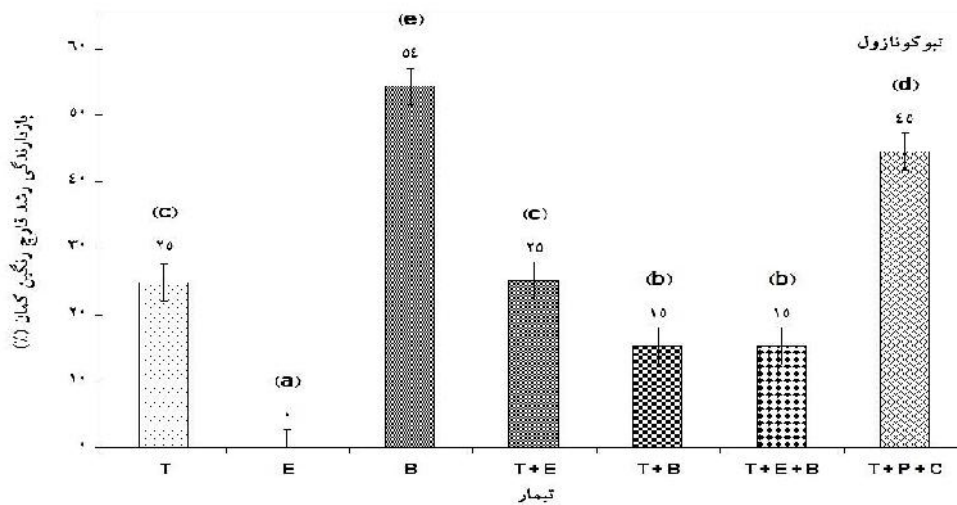
در بررسی اثر هم‌افزایی و تأثیر مستقل آفت‌کش تبوکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی، تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در تیمارهای مختلف وجود داشت، اما اثر هم‌افزایی بین آفت‌کش تبوکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی وجود نداشت (شکل ۵).

نتایج گروه‌بندی میانگین‌ها طبق آزمون دانکن در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ آمده است. بیشترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ (۷۵ درصد) مربوط به تیمار آنتی‌اکسیدان BHT و غلظت ۵۰ ppm بود. کمترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ (صفر درصد) مربوط به تیمار کیلیت‌کننده فلز EDTA در تمام غلظت‌ها بوده است (شکل ۴).

البته تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط تیمارهای تبوکونازول، BHT و تبوکونازول + پروپیکونازول + کلروتالونیل در غلظت‌های مختلف وجود



شکل ۴- اثر متقابل آفت کش تبوکونازول با سایر محلول‌های حفاظتی و غلظت آنها بر روی درصد بازدارندگی رشد قارچ



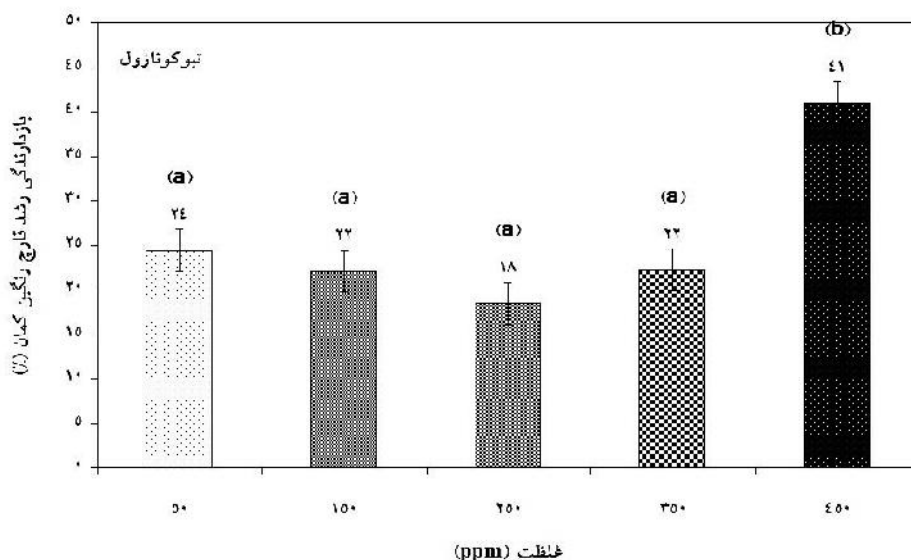
شکل ۵- مقایسه تأثیر مستقل آفت کش تبوکونازول و سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد).

بررسی اثر هم‌افزایی آفت کش کلروتالونیل با کیلیت‌کننده فلز EDTA و آنتی‌اکسیدان BHT
 نتایج آزمون تجزیه واریانس دو طرفه نشان داد که اثرات مستقل و متقابل تیمار آفت‌کش کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی و افزودنی‌های غیر آفت‌کش بر روی

در تأثیر مستقل غلظت محلول‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در غلظت ۴۵۰ ppm با سایر غلظت‌ها وجود داشته، اما بین غلظت‌های ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۳۵۰ ppm اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است (شکل ۶).

آفت‌کش بر درصد بازدارندگی رشد قارچ در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبوده است (جدول ۴).

عملکرد این قارچ‌کش در برابر رشد قارچ رنگین‌کمان کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی و افزودنی‌های غیر



شکل ۶- مقایسه تأثیر مستقل غلظت آفت‌کش تبوکونازول و سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌ها وجود دارد).

جدول ۴- تجزیه واریانس فاکتوریل دو عاملی تأثیر هم‌افزایی آفت‌کش کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین‌کمان

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌داری
تیمار (A)	۴۸۵۹۳/۱۵۶	۶	۸۰۹۸/۸۵۹	۶۸/۱۸۸	۰/۰۰۰
غلظت (B)	۱۰۴۳/۰۱۹	۴	۲۶۰/۷۵۵	۲/۱۹۵	۰/۰۷۸
اثر متقابل (A×B)	۸۵۸۴/۷۰۸	۲۴	۳۵۷/۶۹۶	۳/۰۱۲	۰/۰۰۰
خطای آزمایش	۸۳۱۴/۰۱۵	۷۰	۱۱۸/۷۷۲		
کل	۶۶۵۳۴/۸۹۸	۱۰۴			

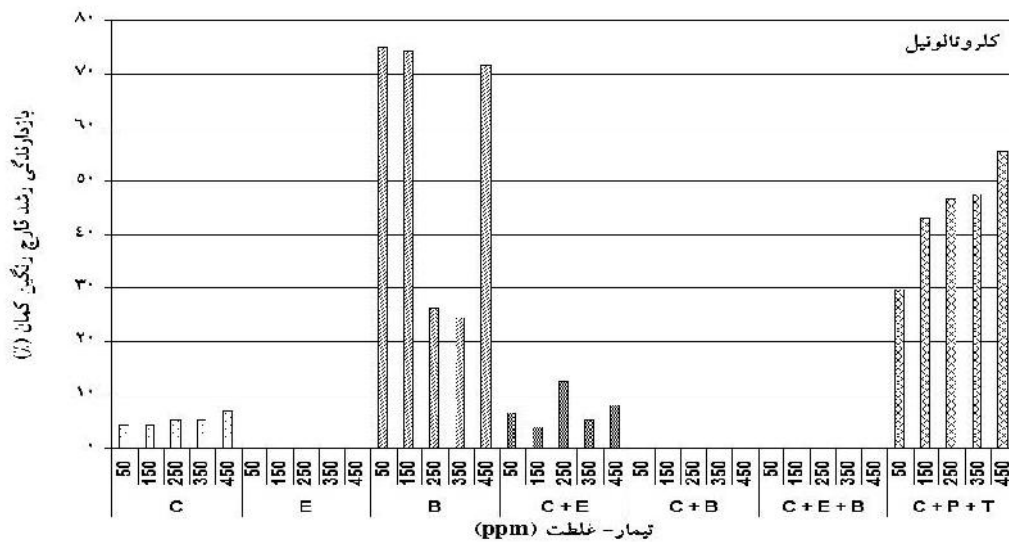
(صفر درصد) مربوط به تیمار کیلیت‌کننده فلز EDTA، کلروتالونیل + BHT و کلروتالونیل + BHT + EDTA در تمام غلظت‌ها بوده است (شکل ۷).

البته تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط تیمارهای کلروتالونیل، BHT و تبوکونازول + پروپیونازول + کلروتالونیل در غلظت‌های مختلف وجود

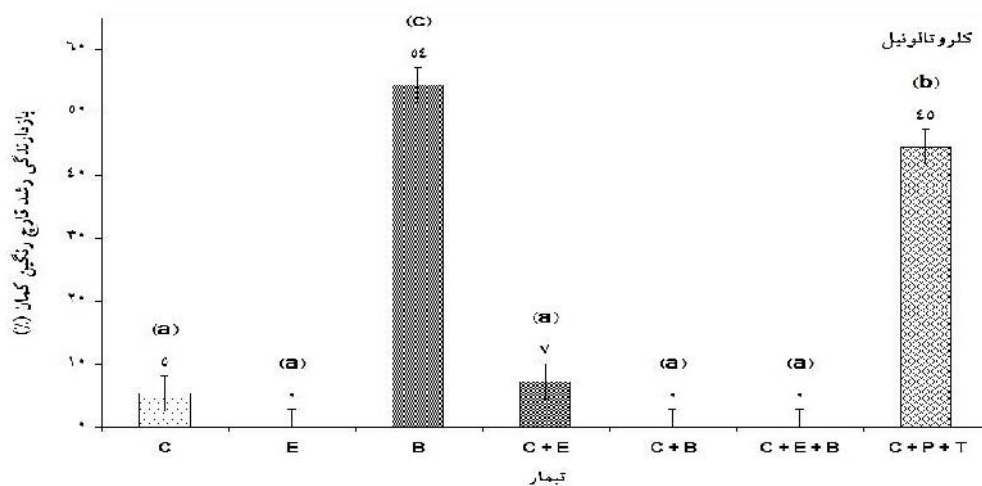
مشاهدات مربوط به بررسی میزان معنی‌دار بودن درصد بازدارندگی رشد قارچ با روش دانکن بررسی شد. نتایج محاسبات آماری و گروه‌بندی میانگین‌ها در شکل‌های ۷، ۸ و ۹ آمده است. بیشترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ (۷۵ درصد) مربوط به تیمار آنتی‌اکسیدان BHT و غلظت ۵۰ ppm بود. کمترین میزان درصد بازدارندگی رشد قارچ

در بررسی اثر هم‌افزایی و تأثیر مستقل آفت‌کش کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی، تفاوت معنی‌داری بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در تیمارها وجود داشت، اما شکل ۸ نشان‌دهنده این است که هیچ‌گونه اثر هم‌افزایی بین آفت‌کش کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی وجود نداشت.

داشت، درحالی‌که بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط تیمار کلروتالونیل و کلروتالونیل + EDTA وجود نداشت. همچنین بین مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ توسط تیمارهای کیفیت‌کننده فلز EDTA، کلروتالونیل + BHT و کلروتالونیل + EDTA + BHT در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است (شکل ۷).



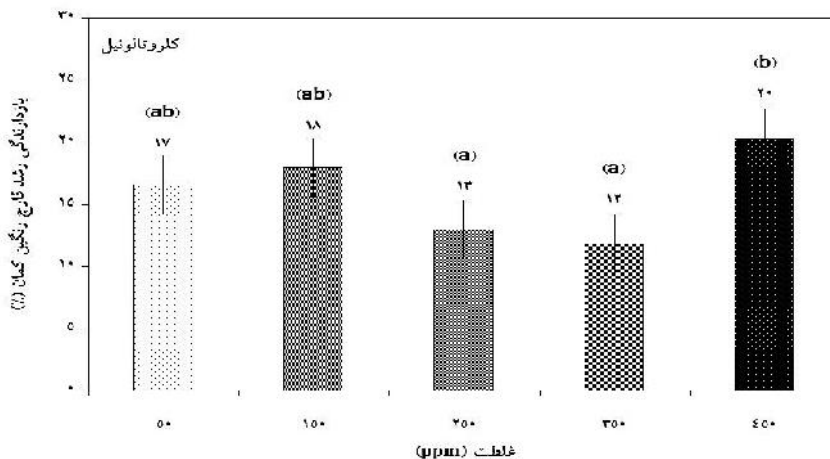
شکل ۷- اثر متقابل آفت‌کش کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی و غلظت آنها بر روی درصد بازدارندگی رشد قارچ



شکل ۸- مقایسه تأثیر مستقل آفت‌کش کلروتالونیل و سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد).

غلظت‌ها نشان داده شده است، اما بین غلظت‌های ۵۰ با ۱۵۰ ppm و ۲۵۰ با ۳۵۰ ppm اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است (شکل ۹).

با مقایسه تأثیر مستقل غلظت آفت‌کش کلروتالونیل و محلول‌های حفاظتی مختلف، اختلاف معنی‌داری در مقدار درصد بازدارندگی رشد قارچ در غلظت ۴۵۰ ppm با سایر



شکل ۹- مقایسه تأثیر مستقل غلظت آفت‌کش کلروتالونیل و سایر محلول‌های حفاظتی بر درصد بازدارندگی رشد قارچ رنگین کمان (حروف الفبای متفاوت نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌ها وجود دارد).

از این رو، افزودن کیلیت‌کننده‌های فلزی^۲ مناسب ممکن است فلزات قابل دسترس را برای قارچ‌ها محافظت کنند (Goodell et al., 1997; Suttie, 1997; Schultz & Nicholas, 2002).

در آزمون‌های آزمایشگاهی، یک آنتی‌اکسیدان یا کیلیت‌کننده فلز به تنهایی، اغلب دارای اثر حفاظتی کمی بوده یا اصلاً اثر حفاظتی ندارد (Kerem et al., 1999; Archer et al., 1995). همچنین آفت‌کش پروپیکونازول در غلظت‌های محلول تیماری تا حدود ۰/۱۲ درصد، ضرورتاً هیچ‌گونه حفاظتی را برای بلوک‌های چوبی در تماس با خاک زرد جنوبی در مدت زمان ۵ هفته قرار گرفتن در معرض قارچ مولد پوسیدگی قهوه‌ای *Gloeophyllum trabeum* ایجاد نکرده است و هیچ‌گونه فایده‌ای در هنگام ترکیب غلظت‌های تیماری یکسان پروپیکونازول هم با ۲ درصد پروپیل گالات و هم با ۳ درصد EDTA وجود نداشته است، اما وقتی که سه ترکیب با همدیگر مورد استفاده قرار گرفتند، بلافاصله کارایی در تمامی چهار سطوح

بحث

به‌طور کلی، قارچ‌های چوبی به‌منظور تخریب چوب نیازمند به تجزیه ابتدایی و باز کردن دیواره سلولی می‌باشند. قارچ‌ها با تولید ترکیب‌هایی (آنزیم‌ها) که به درون دیواره سلولی نفوذ می‌کنند و با ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنش‌پذیر، این کار را با موفقیت انجام می‌دهند، که در نهایت مواد لیگنوسلولزی چوب را تجزیه می‌کنند (Goodell et al., 1997; Tanaka et al., 2001; Kerem et al., 1999; Jensen et al., 2001). با توجه به این مطالب، وجود لاشخورهای رادیکال آزاد^۱ (آنتی‌اکسیدان‌ها یا عوامل ضد اکسیدکننده) در دیواره سلولی چوب، دیواره سلولی را از متخلخل شدن بیشتر محافظت خواهند کرد (Goodell et al., 1997; Schultz & Nicholas, 2000) و ممکن است از ایجاد تخریب زیستی در آفت‌کش آلی نیز جلوگیری کرده و به حفظ آن کمک کند.

فلزاتی مانند آهن یا منگنز هم به‌عنوان بخشی از یک سیستم آنزیمی و هم به‌عنوان یک فلز آزاد با مشارکت در سازوکارهای تخریب قارچی به‌خوبی شناخته شده‌اند.

پروپیکونازول، تبوکونازول و کلروتالونیل با افزودنی‌های غیر آفت‌کش EDTA و BHT این‌طور دیده شده که بین آفت‌کش پروپیکونازول و کیلیت‌کننده فلز EDTA در غلظت بالا و ۴۵۰ ppm اثر هم‌افزایی وجود داشته است، اما در ترکیب با بقیه محلول‌ها، اثر هم‌افزایی دیده نشده است. همچنین، هیچ‌گونه اثر هم‌افزایی بین آفت‌کش‌های تبوکونازول و کلروتالونیل با سایر محلول‌های حفاظتی مشاهده نشده است.

منابع مورد استفاده

- Archer, K., Nicholas, D.D. and Schultz, T.P., 1995. Screening of wood preservatives: comparison of the soil-block, agar-block, and agar-plate tests. *Forest Products Journal*, 45: 86-89.
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T. and Nilsson, T., 1992. Hydroxyl radical activity in brown-rot fungi studied by a new chemiluminescence method. *Holzforchung*, 46: 61-67.
- Buschhaus, H.U. and Valcke, A.R., 1995. Triazoles: Synergism between propiconazole and tebuconazole. IRG/WP 95-30092, International Research Group on Wood Protection, Helsingør, Denmark.
- Creffield, J.W., Woods, T.L. and Chew, N., 1996. In-ground performance of two formulations of chlorothalonil after five years of exposure at three test sites in Australia. International Research Group on Wood Preservation, Doc. No. IRG/WP/96-30101.
- Freeman, M.H., Nicholas, D.D. and Schultz, T.P., 2006. In environmental impacts of treated wood; Townsend, T.G., and Solo-Gabriele, H. eds. Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, 19-36.
- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszcynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L. and Xu, G., 1997. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi. *Journal of Biotechnology*, 53: 133-162.
- Grace, J.K., Laks, P.E. and Yamamoto, R.T., 1993. Efficacy of chlorothalonil as a wood preservative against the Formosan subterranean termite. *Forest Product Journal*, 43 (1): 21-24.
- Green III, F.G., Crawford, D., Lebow, S. and Yoshimura, T., 2000. Relative toxicity of N'-N-naphthaloylhydroxamine (NHA) toxicity against eastern and Formosan subterranean termites in southern yellow pine. *Forest Products Journal*, 40 (3): 235-239.
- Green III, F.G., Kuster, T.A., Ferge, L. and Highley, T.L., 1997. Protection of southern pine from fungal decay and termite damage with Na-N'-N-naphthaloylhydroxamine. *International Biodeterioration & Biodegradation* 39 (2-3):103-111.

آفت‌کش پروپیکونازول (۰/۰۱، ۰/۰۳، ۰/۰۶ و ۰/۱۲ درصد) افزایش یافت. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و تحقیقات قبلی با سطوح نسبتاً کم پروپیل گالات (Schultz & Nicholas, 2002) در مقایسه با سطوح بالاتر سایر آنتی‌اکسیدان‌های مورد استفاده مانند ۴ تا ۵ درصد از هیدروکسی تولوئن بوتیل‌دار (BHT) عجیب و جالب بوده است. البته این امکان وجود دارد که چنین نتایج خوبی ناشی از آنتی‌اکسیدان دوتایی و خواص کیلیت کردن فلز مشتقات گالات آورده شده است (Schultz & Nicholas, 2002).

بلوک‌های چوبی در تماس با آگار چوب‌برون صنوبر لرزانی که فقط با ۳ درصد EDTA اشباع شده‌اند و برای مدت زمان ۶ هفته در معرض قارچ مولد پوسیدگی سفید رنگین‌کمان *Coriolus versicolor* قرار گرفته‌اند، به طور شگفت‌انگیزی مؤثر بوده است (۱۰۰ درصد کاهش مقاومت برای نمونه‌های تیمار نشده در مقابل ۵/۴ درصد کاهش مقاومت برای نمونه‌های صنوبر لرزان تیمار شده توسط فقط ۳ درصد EDTA). اگرچه، در آزمون بلوک چوبی در تماس با خاک که فقط توسط EDTA تیمار شده، حفاظت کمی ارائه شده است. محققان گزارش کرده‌اند که وقتی فقط یک کیلیت‌کننده فلز در آزمون محیط خاکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، حفاظت کمی را برای چوب فراهم می‌کند، اما این ماده در آزمون محیط کشت آگار بسیار مؤثر می‌باشد (Green III *et al.*, 1997; Schultz & Nicholas, 2002). بنابراین این‌طور می‌توان گفت که در آزمون محیط خاکی، مواد معدنی زیادی از بین می‌رود و کیلیت‌کننده فلز غیرفعال می‌گردد، درحالی‌که در آزمون محیط آگار (که سطوح مواد معدنی نسبتاً کمی دارد)، یک کیلیت‌کننده فلز به‌تثابی ممکن است در حفاظت چوب کاملاً مؤثر باشد. به‌طور مشابه، وقتی آنتی‌اکسیدان‌ها مورد آزمون قرار می‌گیرند، اغلب نتایج بهتری توسط بلوک چوبی در تماس با آگار نسبت به بلوک چوبی در تماس با خاک به‌دست آمده است، زیرا ممکن است سطوح مختلفی از رادیکال‌ها (Schultz & Backa *et al.*, 1992) توسط مواد مختلف تولید گردد (Nicholas, 2000).

به‌طورکلی در بررسی اثر هم‌افزایی آفت‌کش‌های

- antistain chemicals by softwood lumber producers in the western United States during 2006: A survey. *Forest Products Journal*, 58 (10): 52-55.
- Schultz, T.P. and Nicholas, D.D., 2008. Improving the performance of organic biocides by using economical and benign additives. In: *Development of Commercial Wood Preservatives: Efficacy, Environmental and Health Issues*, ACS Symposium Series 982; Schultz, Militz, Freeman, Goodell, and Nicholas (eds.), Amer. Chemical Society, Washington, DC, chap. 16.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., Kirker, G.T., Prewitt, M.L. and Diehl, S.V., 2006. Effect of the antioxidant BHT on reducing depletion of chlorothalonil and treated wood after 54 months of ground-contact exposure. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57: 45-50.
- Schultz, T.P., Nicholas, D.D., Henry, W.P., Pittman, C.U., Wipf, D.O. and Goodell, B., 2005. Review of laboratory and outdoor exposure efficacy results of organic biocide: antioxidant combinations, an initial economic analysis and discussion of a proposed mechanism. *Wood and Fiber Science*, 37: 175-184.
- Schultz, T.P. and Nicholas, D.D., 2002. Development of environmentally benign wood preservatives based on the combination of organic biocides with antioxidants and metal chelators. *Phytochemistry*, 61 (5): 555-560.
- Schultz, T.P. and Nicholas, D.D., 2000. Naturally durable heartwood: Evidence for a proposed dual defensive function of the extractives. *Phytochemistry*, 54 (1): 47-52.
- Stirling, R. and Temiz, A., 2014. Fungicides and insecticides used in wood preservation. In: Schultz, T.P., Goodell, B., and Nicholas, D.D. (eds) *Deterioration and protection of sustainable biomaterials*. American Chemical Society Books. Washington, DC.
- Suttie, E., 1997. Novel wood preservatives. *Chemistry and Industry*, 18: 720-724.
- Tanaka, H., Itakura, S. and Enoki, A., 1999. Hydroxyl radical generation by an extracellular low molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 5 (1): 57-70.
- Valcke, A.R., 1989. Suitability of propiconazole (R 49362) as a new-generation fungicide. IRG/WP 3529. Conference: 89-05-22/26 Lappeenranta, Finland.
- Wustenhofer, B., Wegen, H.-W. and Metzner, W., 1990. Tebuconazole, a new wood preserving fungicide. The International Research Group on Wood Preservation, paper prepared for the 21st Annual Meeting Rotorua, New Zealand.
- Grundlinger, R. and Exner, O., 1990. Tebuconazole - A new triazole fungicide for wood preservation. IRG/Document No. IRG/WP/3629.
- Hosseinhashemi, S.K., Nazari, L., Lashgari, A., and Salem, M.Z.M., 2015. Evaluation of inner bark extract of barberry stem and its synergy with propiconazole, EDTA, BHT, and their combinations against the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *BioResources*, 11 (1): 1505-1517.
- Hosseini Hashemi, S.K. and Jahan Latibari, A., 2011. Evaluation and identification of walnut heartwood extractives for protection of poplar wood. *BioResources*, 6 (1): 59-69.
- Hughes, A.S., 2004. The tools at our disposal (Brussels: COST E22 environmental optimization of wood protection).
- Jensen, K.A., Houtman, C.J., Ryan, Z.C. and Hammel, K.E., 2001. Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2705-2711.
- Jiang, X. and Walker, L., 2007. Amine oxides for use in wood protection: I. A formulation adjuvant and performance enhancer for wood. The International Research Group on Wood Preservation. Doc. No. IRG/WP 07-30425.
- Kamdern, D.P., 2008. In development of commercial wood preservatives: Efficacy, environmental, and health issues. Schultz, T.P., Militz, H., Freeman, M.H., Goodell, B., Nicholas, D.D. eds. American Chemical Society: Washington, DC, 470-479.
- Kerem, Z., Jensen, K.A. and Hamel, K.E., 1999. Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. *FEBS Letters*, 446 (1): 49-54.
- Leightley, L.E., 2003. Protection of wood using combinations of biocides. in *Wood Deterioration and Preservation*, ACS Symposium Series No. 845, ed. by Goodell, B., Nicholas, D.D., and Schultz, T. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 390-398.
- Little, N.S., Schultz, T.P. and Nicholas, D.D., 2010. Termite-resistant heartwood. Effect of antioxidants on termite feeding deterrence and mortality. *Holzforschung*, 64: 395-398.
- Malakani, M., Khademieslam, H., Hosseinhashemi, S.K. and Zeinaly, F., 2014. Influence of fungal decay on chemi-mechanical properties of beech wood (*Fagus orientalis*). *Cellulose Chemistry and Technology*, 48 (1-2): 97-103.
- Ross, A.S., 2008. In development of commercial wood preservatives: Efficacy, environmental, and health issues. Schultz, T.P., Militz, H., Freeman, M.H., Goodell, B., Nicholas, D.D. eds. American Chemical Society: Washington, DC, 470-479.
- Schauwecker, C.J. and Morrell, J.J., 2008. Use of

Laboratory study of synergistic effects of mixtures of organic biocides, metal chelator, and antioxidant materials against rainbow white-rot fungus

L. Nazari¹ and S.K. Hosseinihashemi^{2*}

1-M.Sc., Department of Wood Science and Paper Technology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2*-Corresponding author, Associate Prof., Department of Wood Science and Paper Technology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran, Email: hashemi@kia.ac.ir

Received: June, 2017

Accepted: Sep., 2017

Abstract

In this research, the individual and interaction effects of three organic biocides (propiconazole, tebuconazole, and chlorothalonil) mixed the metal EDTA and the antioxidant BHT at different concentrations (50, 150, 250, 350, and 450 ppm) against the white-rot fungus, *Trametes versicolor* was investigated. The tests were done in the *in vitro* and using of sterilized malt extract agar in the wet autoclave. First, preservative solutions were prepared with different formulations and concentrations separately and then combined with water solvent. Under laminar sterile hood, about 25 mL of the media was poured into the Petri plates. Three antibiogram discs (with triangular position) were placed on the media. By micro-sampler, about 20 µL of sterilized preservative solutions was poured on every disc, separately. Then, about 5 mm of mycelium plug of intended fungus that was inoculated previously was put in the center of plates. The plates were incubated at 23 °C and 75% relative humidity and the mycelium growth of fungus and inhibition effects of different preservative solutions against fungus was measured daily for one week,. The results of this research demonstrated that chlorothalonil biocide by itself have not impose any inhibition effect on growth of fungus, whilst propiconazole and tebuconazole biocides by itself have significant effect at different concentrations on growth of fungus. In order to determined the synergistic effect of propiconazole, tebuconazole, and chlorothalonil biocides with non-biocides addition of EDTA and BHT, it has been found that there exist synergistic effect between propiconazole biocide and the EDTA at high concentration such as 450 ppm, but in combination with other solutions, synergistic effect has not been found. Also, no synergistic effect was found between tebuconazole and chlorothalonil biocides with other preservative solutions.

Keywords: Organic biocides, EDTA, BHT, growth inhibition, synergism, *Trametes versicolor*.