بررسی تأثیر مواد افزودنی مختلف روی ماندگاری مخمر *Pichia guilliermondii* در حامل‌های پودری و کارایی آنها در کنترل کپک آبی سیب*

INFLUENCE OF ADJUVANTS ON SHELF LIFE OF *Pichia guilliermondii* IN POWDER CARRIERS AND THEIR EFFICACY IN CONTROLLING BLUE MOLD OF APPLE

لاچین مختارنژاد[1]**، حسن‌رضا اعتباریان[1]، محمدرضا فاضلی[2] و محمدرضا خوشایند[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۱۶)

چکیده

در این مطالعه تأثیر سه ماده افزوده سوکروز، آلجینات سدیم و صمغ عربی روی پایداری سلول‌های مخمر *Pichia guilliermondii* در فرمولاسیون‌های پودری مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. سلول‌های مخمر پس از تکثیر در محیط کشت ملاس نیشکر با حامل‌های پودری تالک، کائولین، سبوس گندم و سبوس برنج و مواد افزوده مختلف شامل سوکروز، صمغ عربی و سدیم آلجینات مخلوط شدند. جمعیت مخمر در ۱۶ فرموله تهیه‌شده طی دوره شش‌ماهه مورد بررسی قرار گرفت. در پایان دوره شش ماهه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، بیشترین جمعیت سلول زنده مخمر در هر گرم فرمولاسیون با تعداد $1/4\times10^{11}$ و $6/5\times10^{10}$ به ترتیب در فرمولاسیون‌های شماره ۱۱(سبوس گندم همراه با صمغ عربی) و ۱۵ (سبوس گندم همراه با سوکروز) و کمترین جمعیت سلول زنده مخمر با تعداد $7/6\times10^{7}$ سلول در فرمولاسیون شماره ۲ (کائولین) دیده شد. در فرمولاسیون‌های نگهداری شده در ۲۴ درجه سانتی‌گراد نیز بیشترین جمعیت سلول زنده مخمر با تعداد $6/5\times10^{10}$ در فرمولاسیون شماره ۱۵ مشاهده شد. در دمای ۲۴ درجه نیز کمترین تعداد سلول زنده در فرمولاسیون شماره ۲ مشاهده گردید. در بررسی اثر فرمولاسیون در کنترل بیماری کپک آبی سیب در شرایط انبار نتایج قابل قبولی حاصل شد. در بررسی کارایی فرمولاسیون‌های نگهداری‌شده در هر دو دمای ۴ و۲۴ درجه سانتی‌گراد، بیشترین کاهش مساحت لکه بیماری روی میوه سیب با کاربرد فرمولاسیون شماره ۱۵ دارای سوکروز و سبوس گندم مشاهده شد. تحقیق حاضر نشان داد که نوع و مقدار مواد به کار رفته در فرمولاسیون باعث حفظ قدرت حیات و کارایی جدایه آنتاگونیست در طی مدت انبارداری شده و موجب حفظ شدت اثر آن در کنترل بیماری در شرایط انبار می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فرمولاسیون، *Penicillium expansum*، مواد حامل، کنترل بیولوژیک

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: lmokhtarnejad@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. دانشیار و استادیار گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم‌پزشکی تهران

مقدمه

با وجود امکانات و تجهیزات پیشرفته انبارداری خسارات بعد از برداشت میوه‌ها و سبزیجات در حدود ۴۰–۱۰ درصد ارزیابی شده است (Wilson & Wisniewski 1994, Arras & Arrue 1999) خسارت پوسیدگی‌های بعد از برداشت میوه‌ها و سبزیجات بسته به گونه‌های بیمارگر و تکنولوژی‌های مورد استفاده در بسته‌بندی‌ها و شرایط انبارداری مانند دما و رطوبت متفاوت است. بیماری‌های قارچی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای بعد از برداشت سیب هستند (Arras & Arru 1999) . قارچ‌های *Botrytis cinerea* Pers. و *Penicillium expansum* Link. دو بیمارگر مهم پس از برداشت هستند که باعث ایجاد آلودگی بر روی سیب در طی مرحله انبارداری می‌شوند. در سال‌های اخیر میزان خسارت این قارچ‌ها حدود ۱۲ تا ۲۵ درصد گزارش شده است (Abadias *et al*. 2003).

استفاده از قارچ‌کش‌های سنتزی اولین راه کنترل بیماری‌های بعد از برداشت میوه‌ها است اما عدم موفقیت در صادرات محصولات کشاورزی دارای باقیمانده سموم شیمیایی از یک طرف و تأثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل عوامل بیماری‌زای پس از برداشت، هزینه‌های بالای اقتصادی آن، اثرات مخرب زیست‌محیطی و هم‌چنین ظهور نژادهای مقاوم بیمارگر از طرف دیگر سبب محدودیت کاربرد آنها بخصوص در کنترل عوامل بیماری‌زای پس از برداشت شده است و محققین در پی یافتن راه‌هایی جایگزین و بی‌خطر برای محیط‌زیست هستند (Wilson & Wisniewski 1989). در سال‌های اخیر موفقیت‌های قابل ملاحظه‌ای در استفاده از آنتاگونیست‌های میکروبی برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت حاصل شده است و اطلاعات زیادی در این زمینه موجود می‌باشد (Vero *et al*. 2002). چندین میکروارگانیسم، خصوصاً مخمرها که به صورت طبیعی بر روی سطح میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند، برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت شناخته شده‌اند که برخی دارای توان بالایی در کاهش شیوع بیماری‌های قارچی بعد از برداشت بر روی میوه‌های مختلف در مقیاس‌های آزمایشگاهی و صنعتی می‌باشند اما تعداد کمی از این عوامل تجاری شده‌اند (Abadias *et al*. 2003). در استفاده تجاری، موفقیت یک عامل کنترل بیولوژیکی تا حد زیادی به فرمولاسیون آن بستگی دارد. فاکتور اصلی برای تجاری‌کردن عوامل کنترل بیولوژیک (Biological control agents= BCAs)، ایجاد یک محصول فرموله‌شده پایدار است که بتواند قابلیت کنترل‌کنندگی خود را طی یک دوره زمانی مشخص حفظ نماید (Janisiewics & Jeffers 1997).

موفقیت در زمینه استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک در شرایط تجاری اعم از حفظ قدرت حیاتی، ماندگاری و کارایی به طور قابل توجهی به فرمولاسیون بستگی دارد. از آنجائیکه موجودات زنده، ماده موثره فرآورده‌های بیولوژیک را تشکیل می‌دهند، هر فرمولاسیونی باید متضمن ماندگاری (shelf life) کافی بوده و قابلیت کنترل‌کنندگی آن در تمام مراحل فرمولاسیون؛ انبارداری طولانی مدت (حداقل یک سال) و آب‌گیری مجدد حفظ شود (Melin *et al*. 2006). علاوه براین هزینه تولید توده زنده (Biomass) سلولی باید مقرون به صرفه باشد که بتواند در مقیاس صنعتی استفاده شود. به عنوان مثال در مورد *Candida sake* محیطی بر پایه ملاس نیشکر ایجاد شده است که این ماده به عنوان فرآورده جانبی کارخانجات تولید شکر قابل دسترسی است (Adbaias *et al*. 2000). در یک فرمولاسیون، مواد حامل اولین جزء موثر در پخش شدن عوامل کنترل بیولوژیک در محیط

هدف هستند. اگر چه فرمولاسیون مایع از نظر استفاده آسان و آبگیری مجدد بر فرمولاسیون پودری ارجحیت دارد (Melin *et al*. 2006) ولی قابلیت ماندگاری آن در طول دوره نگهداری در مقایسه با فرمولاسیون پودری بسیار پایین می‌باشد (Melin *et al*. 2007). هدف از این پژوهش، ضمن بررسی تأثیر سوکروز، سدیم آلجینات و صمغ عربی روی زنده‌مانی مخمر *P. guilliermondii* در چهار حامل پودری تالک، کائولین، سبوس گندم و سبوس برنج و میزان کارایی فرمولاسیون‌های حاصل را در کنترل کپک آبی سیب ناشی از *P. expansum* مشخص می‌کند.

روش بررسی

جدایه مخمر و بیمارگر

جدایه مخمر *Pichia guilliermondii* Wick جداسازی شده از سطح میوه‌های سیب که قابلیت آنتاگونیستی آن در کنترل کپک آبی سیب مشخص شده است (Gholamnejad *et al*. 2009) از کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت گردید. جدایه مخمر در امولسیون گلیسرول (۰/۸۲ گرم در لیتر دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات؛ ۰/۱۸ گرم در لیتر پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات؛ ۰/۲۵ گرم در لیتر سولفات منیزیوم متبلور؛ ۰/۵۹ گرم در لیتر سدیم سیترات؛ ۲۱۲ گرم در لیتر گلیسرول) در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(Druvforse 2004). جدایه بیمارگر مورد استفاده *Penicillium expansum* Link.می باشد که از میوه سیب جداسازی شده است (Gholamnejad 2009).

تهیه زادمایه بیمارگر

سوسپانسیون اسپورهای بیمارگر از کشت هفت روزه آن در محیط کشت PDA در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در آب‌مقطر سترون تهیه شد. جمعیت اسپورها با استفاده از هماسیتومتر تعیین گردید. جهت انجام آزمایش‌ها، غلظت 10^5 اسپور در میلی لیتر آب مقطر مورد استفاده قرار گرفت.

تولید بیوماس مخمر

برای تهیه بیوماس مخمر از روش *کینای و ییلدیز* (Kinay & Yildiz 2008) با کمی تغییر استفاده شد. به این صورت که، جدایه مخمر از روی محیط کشت PDA توسط لوپ برداشته شد و با آب مقطر سترون سوسپانسیون تهیه شد. یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع Nutrient Yeast Dextrose Broth (NYDB) اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده (۱۲۰دور در دقیقه) در دمای اتاق قرار گرفت. سلول‌های مخمر با استفاده از سانتریفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه در g ۲۸۰۰) از محیط NYDB جدا شدند و برای برطرف‌کردن باقیمانده محیط غذایی، دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند.

سپس از سلول‌های مخمر در آب مقطر سترون سوسپانسیون تهیه شد. دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ملاس نیشکر اضافه شد و روی دستگاه تکان‌دهنده (۱۵۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از ۳۶ ساعت سلول‌های مخمر با استفاده از سانتریفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقهg ۲۸۰۰) از محیط ملاس جدا شد و با آب مقطر سترون شستشو گردیدند و پس از رقیق‌سازی، جمعیت آن با استفاده از هماسیتومتر به 1×10^9 سلول در میلی‌لیتر رسانده شد.

تهیه فرمولاسیون

از پودرهای تالک، کائولین، سبوس برنج و سبوس گندم به عنوان ماده حامل برای تهیه فرمولاسیون‌های میکروبی مخمر استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا سوسپانسیونی حاوی گلیسرول (۱۰ v/v ٪)، سدیم آلجینات (۱/۵ w/v ٪ Sigma-Aldrich،) و سلول مخمر با جمعیت 1×10^{9} تهیه شد (Shabana & Sauerborn 2003). سه ماده افزوده سوکروز (Merk)، سدیم آلجینات (Merk) و صمغ عربی (Merk) هر کدام به مقدار ۱ ٪ (w/v) به طور جداگانه به سوسپانسیون اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل به نسبت یک به چهار (V/W) به مواد حامل که در دو روز متوالی اتوکلاو شده بودند، اضافه و به طور کامل مخلوط گردید (Bora *et al*. 2004). مخلوط حاصل به مدت حداکثر ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه در محیط کاملاً سترون (زیر هود) خشک شد. فرمولاسیون حاصل در مخلوط‌کن پودر شد و درون لوله‌های فالکون ۵۰ سی سی در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای اندازه‌گیری رطوبت از روش *کریستف و همکاران* استفاده گردید (Christoph *et al*. 2004). رطوبت فرمولاسیون‌های پودر تالک و کائولین حدود ۱۲-۱۵ درصد و رطوبت فرمولاسیون‌های سبوس گندم و سبوس برنج حدود ۱۸-۲۰ درصد تنظیم شد.

بررسی ماندگاری فرمولاسیون‌ها در طی مرحله انبارداری

ماندگاری فرمولاسیون‌های نگهداری شده در شرایط تاریکی در دماهای چهار درجه سانتی‌گراد (یخچال) و ۲۴درجه سانتی‌گراد (انکوباتور) پس از دوره ۱۸۰ روزه با استفاده از روش سریال رقت (Serial dilution) بررسی شد. تأثیر مواد افزوده و حامل در میزان جمعیت سلول‌های مخمر زنده فرمولاسیون پودری هر ۳۰ روز یک بار طی نگهداری در دوره زمانی ۱۸۰ روزه محاسبه شد. یک گرم از هر فرمولاسیون مخمر به نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و ورتکس گردید. سپس ۱۰ سری رقت تهیه شد و از رقت‌های مورد نظر سوسپانسیون فرمولاسیون‌ها به طور جداگانه روی محیط کشت PDA به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر تشتک پتری با میله شیشه‌ای خم شده، پخش شد و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، بعد از ۴۸ ساعت که پرگنه‌های مخمر ظاهر شدند، کلونی‌ها با استفاده از دستگاه کلونی‌شمار شمارش شدند. سه تکرار برای هر رقت به کار رفت و تعداد سلول زنده مخمر در گرم فرمولاسیون محاسبه شد (Bora *et al*. 2004).

بررسی اثر فرمولاسیون‌ها در کنترل بیماری کپک آبی سیب ناشی از *P.expansum* در شرایط انبار

به این منظور از میوه‌های سیب رقم گلدن دلیشز که همگی سالم و فاقد هر گونه عارضه فیزیولوژیک بودند استفاده گردید. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد غوطه‌ور شده و سپس دو بار با آب سترون شستشو داده شده و نهایتاً به مدت پنج ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. سپس با استفاده از یک سوزن سترون روی هر میوه سه زخم به قطر۲/۵ میلی‌متر و عمق سه میلی‌متر با فواصل مساوی از دم میوه ایجاد گردید. پس از شش ماه نگهداری فرموله‌های تهیه شده ، بررسی قدرت کنترل‌کنندگی هر یک از آنها علیه بیماری کپک آبی سیب در شرایط انبار آزمایش شد. یک گرم از هر فرمولاسیون در نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون بصورت سوسپانسیون درآمد. زخم ها با ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر فرمولاسیون تیمار شدند و بعد از ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کنیدی‌های قارچ

بیمارگر (10^5 اسپور در میلی لیتر) به داخل هر زخم مایه‌زنی شد. سیب‌های تیمار شده در سینی‌های مقوایی بون تماس با همدیگر گذاشته و درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند با اسپری‌کردن آب سترون در درون کیسه‌ها رطوبت نسبی داخل آنها در سطح بالایی (حدود ۹۵ درصد) نگه داشته شد (Vero *et al*. 2002). سیب‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تیمارهای دیگر شامل، بیمارگر همراه با مواد حامل فرمولاسیون، مواد حامل فرمولاسیون به تنهایی، سوسپانسیون سلول‌های تازه مخمر همراه با بیمارگر، سلول‌های تازه مخمر به تنهایی، شاهد آلوده و شاهد سالم بودند. بعد از طی دوره نگهداری (۴۵ روز) زخم‌ها از نظر ایجاد پوسیدگی بررسی شدند و قطر لکه‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و مساحت آنها بر حسب میلی‌مترمربع محاسبه شد. در این آزمایش برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل یک میوه و هر میوه دارای سه زخم بود.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (V9.1) انجام گردید. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای Duncan در سطح ۱٪مقایسه شد.

نتایج

تأثیر فرمولاسیون‌های پودری مختلف در حفظ زنده مانی سلول‌های مخمر در طول شش ماه نگهداری در دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد

ماندگاری فرمولاسیون‌های نگهداری شده در شرایط تاریکی در دماهای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) و ۲۴ درجه سانتی‌گراد (انکوباتور) پس از پایان دوره ۱۸۰ روزه محاسبه شد (جدول ۱). آنالیز داده‌های ماه ششم نشان داد اختلاف معنی‌داری بین مواد حامل و مواد افزوده جهت پایداری مخمر در سطح ۱٪ وجود دارد. در بررسی فرمولاسیون نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، بیشترین تعداد سلول زنده جدایه *P. guilliermondii* در فرمولاسیون‌های شماره ۱۱ (سبوس گندم همراه با صمغ عربی) و ۱۵ (سبوس گندم همراه با سوکروز) مشاهده شد که جمعیت زنده این جدایه به ترتیب $1/4\times10^{11}$ و $6/5\times10^{10}$ لگاریتم تعداد سلول در گرم فرمولاسیون تخمین زده شد. از طرفی فرمولاسیون شماره ۲ (کائولین) کمترین میزان سلول زنده را دارا بود.

نگهداری فرمولاسیون‌های مختلف در دمای ۲۴ درجه نشان از تأثیر چشمگیر فرمولاسیون‌های ۱۵ و ۱۶ (سبوس برنج به علاوه سوکروز) در حفظ زنده‌مانی مخمر داشت بطوریکه جمعیت زنده آن به ترتیب $6/5\times10^{10}$ و $1/4\times10^{10}$ لگاریتم تعداد سلول زنده در گرم فرمولاسیون ارزیابی شد. در دمای ۲۴ درجه نیز کمترین تعداد سلول زنده در فرمولاسیون شماره ۲ مشاهده گردید(جدول ۱). براساس نتایج (شکل‌های ۱ و۲) از نظر تعداد سلول زنده در گرم فرمولاسیون‌ها، بین مواد حامل و مواد افزودنی در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد که نشان از ماندگاری متفاوت جدایه مخمر در فرمولـه‌ها دارد. اثر متقابل کاربرد مواد حامل و افزودنی نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار است. به طور کلی سوکروز بیشترین تأثیر را بر روی افزایش پایداری سلول‌های مخمر در حامل‌های مختلف دارد. در فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد (شکل ۱)، اضافه‌کردن سوکروز و صمغ عربی به فرمولاسیون‌های پایه‌ای که از سبوس گندم به عنوان ماده حامل استفاده شد باعث افزایش پایداری

جدول ۱. ماندگاری جمعیت زنده جدایه A6 مخمر *P. guilliermondi* در ۱۶ فرمولاسیون مختلف پودری (برحسب لگاریتم تعداد سلول مخمر در گرم فرمولاسیون)، پس از طی دوره انبارداری به مدت ۱۸۰ روز در دمای ۴ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد

Table 1. Survival of *P. guillermondi* in formulation with using different carriers and adjuvants (Log of viable cells per gram) at 4°C and 24°C

Formulations	Temperatures	
	4˚C	24˚C
1. Talc	8.71 ± 0.067 def	6.75 ± 0.033 g
2. Kaolin	7.87± 0.153 g	6.22 ± 0.171 i
3. Wheat bran	10.44 ± 0.040 ab	8.95 ± 0.104 c
4. Rice bran	9.62 ± 0.050 c	8.20 ± 0.069 d
5. Talk with sodium alginate	8.94 ± 0.018 d	6.79 ± 0.77 g
6. Kaolin with sodium alginate	8.77 ± 0.033 de	6.57 ± 0.084 gh
7. Wheat bran with sodium alginate	8.25 ± 0.187 efg	8.79 ± 0.060 c
8. Rice bran with sodium alginate	8.69 ± 0.066 def	8.39 ± 0.088 d
9. Talc with gum arabic	8.62 ± 0.112 def	6.35± 0.218 hi
10. Kaolin with gum arabic	7.16 ± 0.119 h	5.97 ± 0.026 j
11. Wheat bran with gum arabic	10.97 ± 0.592 a	8.95 ± 0.029 c
12. Rice bran with gum arabic	8.63 ± 0.104 def	8.19± 0.143 d
13. Talc with sucrose	8.15 ± 0.218 fg	7.85 ± 0.059 e
14. Kaolin with sucrose	8.30 ± 0.521 efg	7.20 ± 0.146 f
15. Wheat bran with sucrose	10.82 ± 0.013 a	9.95 ± 0.020 a
16. Rice bran with sucrose	10.14 ± 0.140 b	9.46 ± 0.067 a

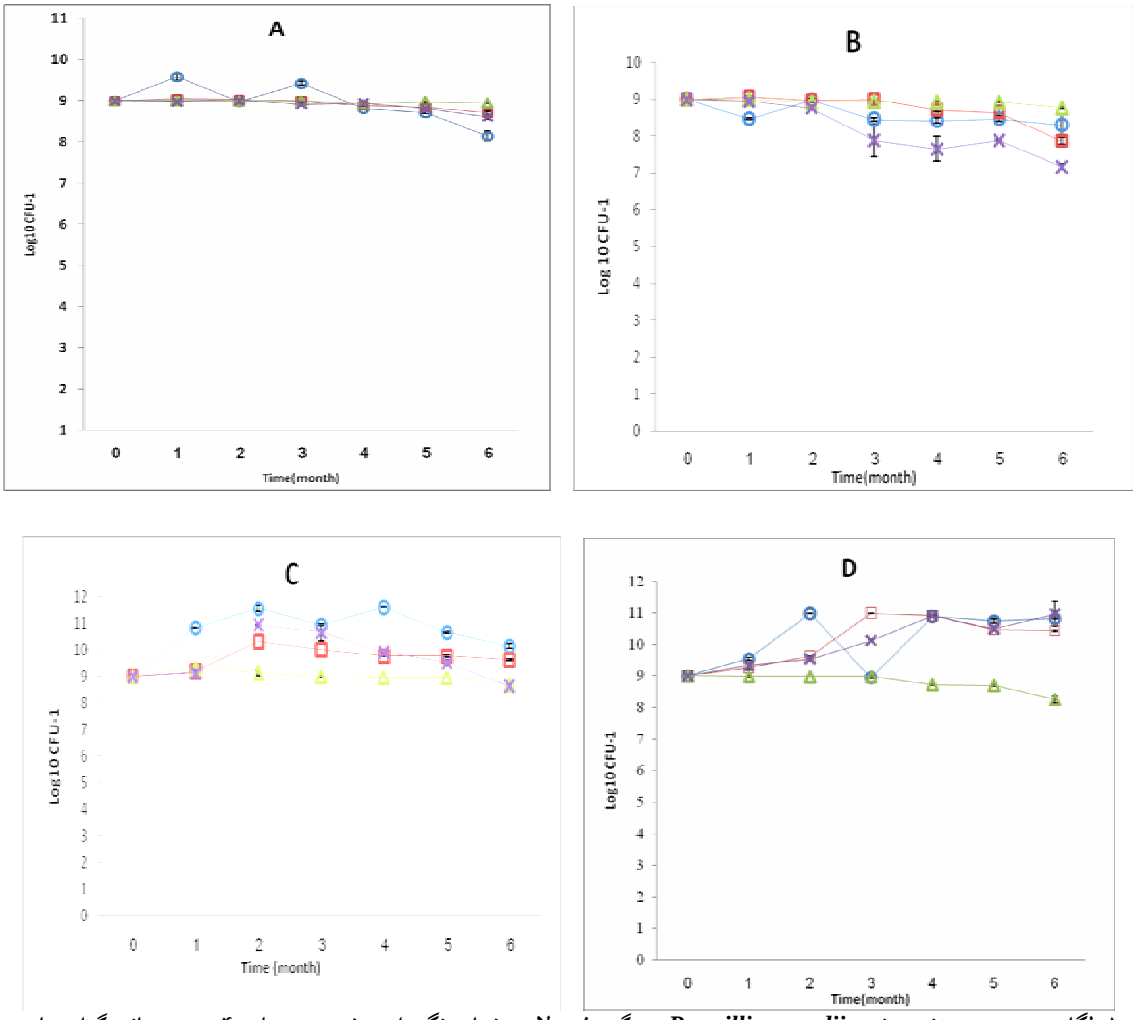
* اعداد متن جدول میانگین سه تکرار است (برای هر تکرار سه پتری در نظر گرفته شد).

*Each data in table is means of three replications.

** میانگین‌هایی که در با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار دارند.

**Means were separated by Duncan's multiple range tests ($P \leq 0.01$).

سلول‌های مخمر در فرمولاسیون‌ها گردید. در فرمولاسیون‌های بر پایه سبوس برنج، هر سه ماده افزوده مورد آزمایش تأثیر مثبت در پایداری مخمر در فرمولاسیون‌ها داشت. در فرمولاسیون‌هایی که از پودر تالک به عنوان حامل استفاده شد، اضافه کردن سدیم آلجینات باعث افزایش پایداری شد. هم‌چنین در فرمولاسیون‌هایی که از کائولین به عنوان ماده حامل استفاده شد، سدیم آلجینات و سوکروز موجب افزایش پایداری فرمولاسیون‌ها گردید. در فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد (شکل ۲) اضافه کردن سوکروز به فرموله‌هایی که از سبوس گندم، سبوس برنج یا پودر تالک به عنوان ماده حامل استفاده شده موجب افزایش زنده‌مانی مخمر در طول دوره نگهداری شد. درحالی‌که اضافه‌کردن صمغ عربی و سدیم آلجینات به این



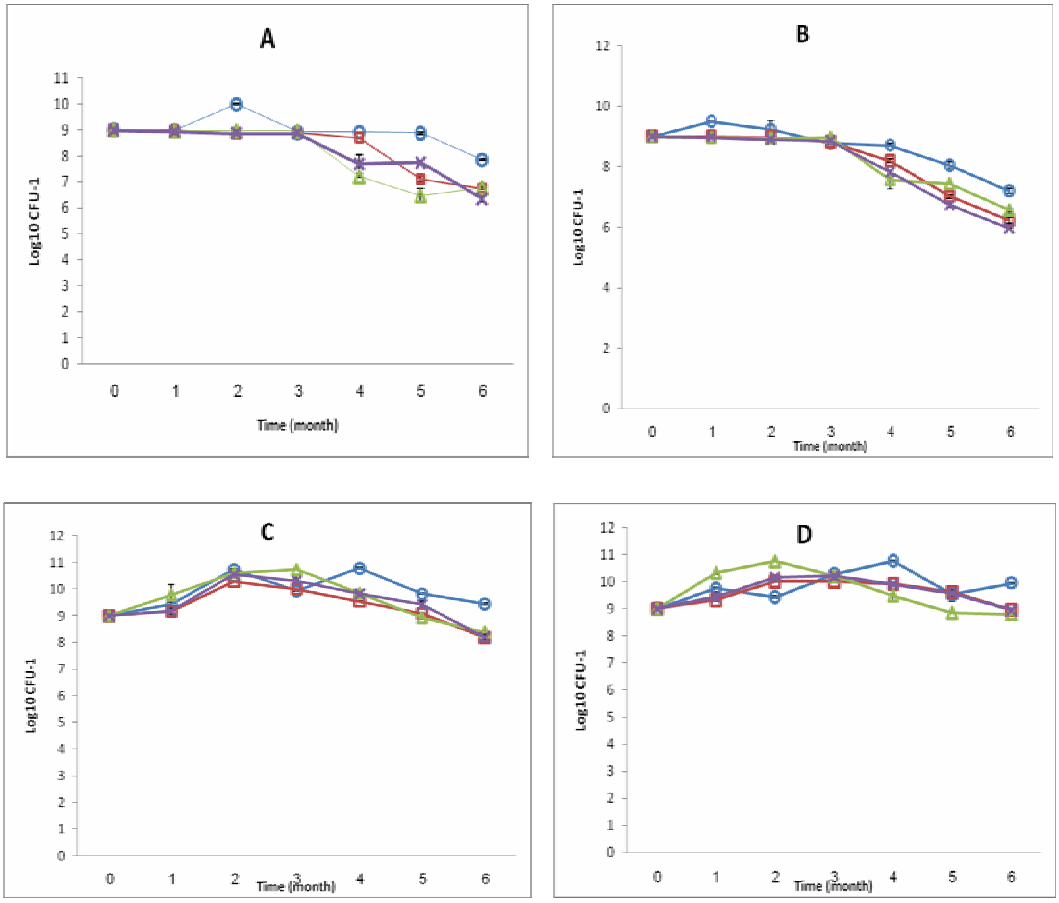
شکل ۱. لگاریتم جمعیت زنده مخمر *P. guilliermondii* در گرم فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حاوی مواد افزوده سدیم آلجینات (Δ)، سوکروز (O)، صمغ عربی (×) و فرمولاسیون‌های فاقد ماده افزوده (□) در طول شش ماه. A، فرمولاسیون‌های بر پایه تالک. B، فرمولاسیون‌های بر پایه کائولین. C، فرمولاسیون‌های بر پایه سبوس برنج. D، فرمولاسیون‌های بر پایه سبوس گندم.

Fig.1. Shelf life of the formulations of *P. guilliermondii* during storage at 4 °C consided of different adjuvants; Sodium alginate (Δ), Socruse (O), Gum arabic (×) and without adjuvant (□). A, Talc-based formulation; B, Kaolin based formulation; C, Rice bran-based formulations; D, Wheat bran-based formulations.

فرموله‌ها تأثیر معنی‌داری در پایداری سلول‌های مخمر در طول دوره نگهداری نداشت. در فرمولاسیون‌های بر پایه کائولین، اضافه کردن سوکروز و سدیم آلجینات باعث افزایش پایداری سلول‌های مخمر در فرموله‌ها گردید و اضافه کردن صمغ عربی تأثیر معنی‌داری نداشت.

بررسی تأثیر فرمولاسیون‌ها در شرایط انبار در جلوگیری از بیمارگر *Penicillium expansum*

در بررسی کارایی فرمولاسیون نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد (شکل ۳، a)، بیشترین کاهش مساحت لکه بیماری روی میوه سیب با کاربرد فرمولاسیون‌های پودر تالک با سدیم آلجینات، سبوس



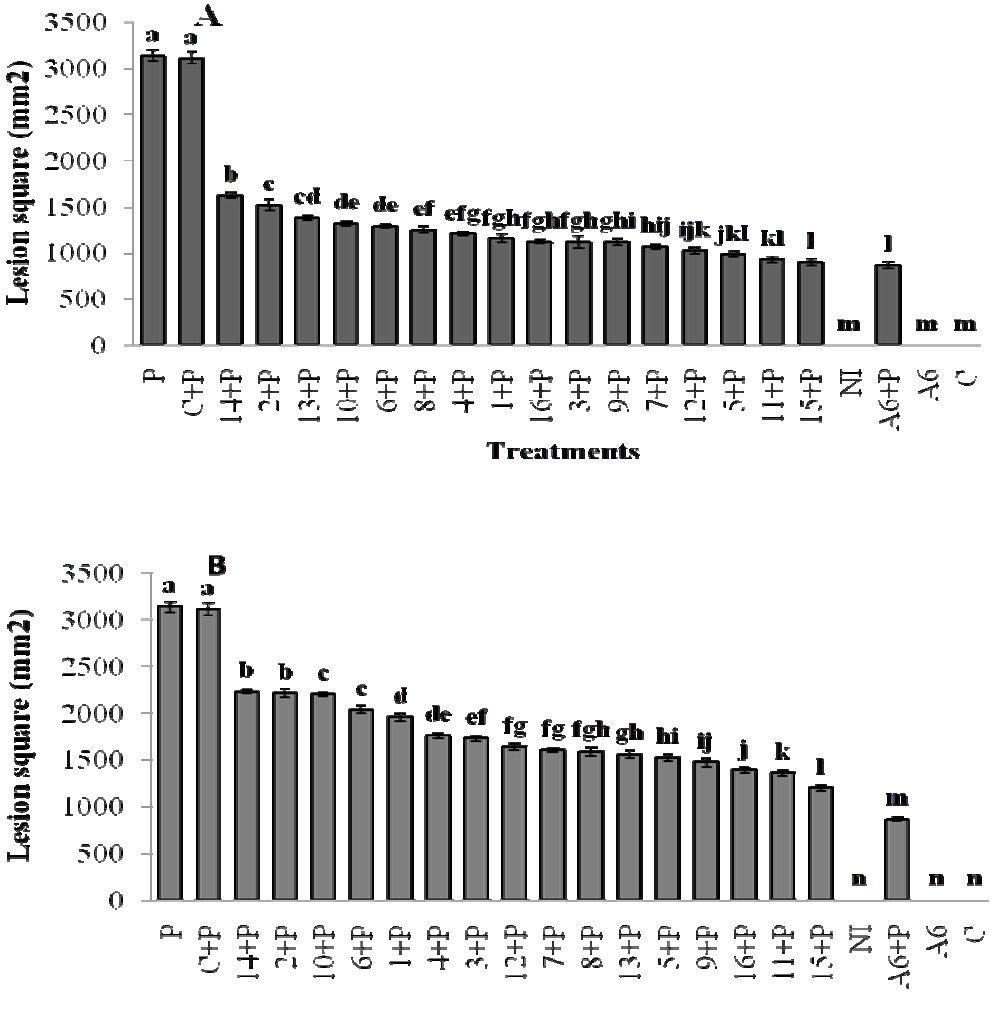
شکل ۲. لگاریتم جمعیت زنده مخمر *P. guilliermondii* در گرم فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد با مواد افزوده سدیم آلجینات (Δ)، سوکروز (O)، صمغ عربی (×)و فرمولاسیون‌های بدون هیچ ماده افزوده(□). A، فرمولاسیون‌های بر پایه تالک. B، فرمولاسیون‌های بر پایه کائولین. C، فرمولاسیون‌های بر پایه سبوس برنج. D، فرمولاسیون‌های بر پایه سبوس گندم.

Fig.2. Shelf life of the formulations of *P. guilliermondii* during storage at 24 °C including different adjuvants; Sodium alginate (Δ), Socruse (O), Gum arabic (×) and without adjuvant (□). A, Talc-based formulations; B, Kaolin based formulation; C, Rice bran-based formulations; D, Wheat bran-based formulations.

گندم با صمغ عربی و سبوس گندم با سوکروز مشاهده شد که مساحت لکه در مقایسه با شاهد آلوده به ترتیب به ۹۸۱/۳۶، ۹۲۵/۱۳ و ۸۹۵/۰۶ میلی‌مترمربع کاهش یافت. فرمولاسیون کائولین و کائولین با سوکروز کمترین میزان کارایی در کاهش مساحت لکه بیماری را دارا بودند. بررسی نتایج حاصل از کارایی فرمولاسیون‌های مختلف در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد که، فرمولاسیون شماره ۱۵ (کائولین به علاوه سوکروز) با مساحت لکه بیماری برابر با ۱۱۹۳/۲۱ میلی‌مترمربع، بیشترین تأثیر را در حفظ کارایی جدایه مخمر و کنترل بیماری نشان داده و فرمولاسیون‌های شماره ۲ ، ۱۰ و ۱۴ کمترین تأثیر را در کنترل بیماری دارا بودند (شکل ۳، b).

بحث

فرمولاسیون عوامل بیوکنترل یکی از جنبه‌های بسیار مهم مطالعات کنترل بیولوژیک می‌باشد (Melin *et al*. 2007).



شکل ۳. کارایی ۱۶ فرمولاسیون مختلف مخمر ***P. guilliermondii*** **A6** پس از طی دوره انبارداری به مدت ۱۸۰ روز در دمای ۴ **(A)** و **(B)**۲۴ درجه سانتی‌گراد در کنترل کپک آبی سیب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. **P**، آلوده به بیمارگر؛ **NI**، غیرآلوده به بیمارگر؛ **C**، مواد حامل؛ **A6**، سلول‌های تازه مخمر و فرمولاسیون‌ها به ترتیب شماره ۱: پودر تالک، ۲: کائولین، ۳: سبوس گندم، ۴: سبوس برنج، ۵: پودر تالک با سدیم آلجینات، ۶: کائولین با سدیم آلجینات، ۷: سبوس گندم با سدیم آلجینات، ۸: سبوس برنج با سدیم آلجینات، ۹: پودر تالک با صمغ عربی، ۱۰: کائولین با صمغ عربی، ۱۱: سبوس گندم با صمغ عربی، ۱۲: سبوس برنج با صمغ عربی، ۱۳: پودر تالک با سوکروز، ۱۴: کائولین با سوکروز، ۱۵: سبوس گندم با سوکروز و ۱۶: سبوس برنج با سوکروز. اعداد این شکل میانگین چهار تکرار (۱۲ زخم) است. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن **(P≤ 0.01)** دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Fig. 3. Efficacy of 16 formulations of *P. guilliermondii* after storage in the dark at 4 (A) and ۲۴°C (B) over a 180-day period on control of blue mold of apple at 4°C. P, infected by pathogen; NI, non infected control; C, Carriers; A6, Fresh cells of yeast; Formulations: 1, Talc; 2, kaolin; 3, Wheat bran; 4, Rice bran; 5, Talc with Sodium alginate; 6, Kaolin with Sodium alginate; 7, Wheat bran with Sodium alginate; 8, Rice bran with Sodium alginate; 9, Talk with Gum arabic; 10, Kaolin with Gum arabic; 11, Wheat bran with Gum arabic; 12, Rice bran with Gum arabic; 13, Talk with Sucrose; 14, Kaolin with Sucrose; 15, Wheat bran with Sucrose; 16, Rice bran with Sucrose. Each data in table is means of four replications. Mean values followed by the same letter are not significantly difference according to Duncan test (P≤ 0.01).

استفاده تجاری از عوامل آنتاگونیست به مایه تلقیحی نیاز دارد که سلول‌های آن به مدت زیاد زنده بماند و به آسانی حمل و نقل شود (Connick 1988). در مطالعات قبلی مشخص شده بود که مواد حامل سبوس گندم و سبوس برنج بیشترین پتانسیل را در پایداری و کارایی *P. guilliermondii* جهت تهیه فرمولاسیون موثر دارا بوده و پودر تالک و کائولین دارای پتانسیل نسبتاً قابل قبولی می‌باشند (Mokhtarnejad *et al*. 2010). بنابراین در تحقیق حاضر، امکان استفاده از مواد حامل آلی (سبوس گندم و سبوس برنج) و غیر آلی (پودر تالک و کائولین) و تأثیر اضافه نمودن سه ماده افزودنی سوکروز، سدیم آلجینات و صمغ عربی جهت تهیه فرمولاسیون‌های ارزان و موثر از جدایه مخمر بیوکنترل *P. guilliermondii* مورد بررسی قرار گرفت.

هرچند سلول‌های مخمر ماندگاری و پایداری خود را در مواد حامل مختلف به مدت بیش از شش ماه حفظ کردند ولی مشخص شد که نوع ماده حامل و افزوده و دمای نگهداری فرمولاسیون بر زنده مانی سلول‌های مخمر تأثیر معنی‌داری دارد به‌طوری‌که طی نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، ماده حامل سبوس گندم فاقد یا دارای هر یک از مواد افزودنی صمغ عربی و سوکروز نقش موثری در حفظ زنده مانی جدایه مخمر داشته و این در حالی است که در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد، سبوس گندم یا برنج به همراه ماده افزودنی سوکروز نقش چشمگیری در حفظ زنده مانی جدایه مخمر دارند. بنابراین به نظر می‌رسد صمغ عربی تنها در انبارداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در حفظ زنده‌مانی این جدایه در سبوس گندم نقش در خور توجهی داشته که با افزایش دما به ۲۴ درجه سانتی‌گراد، این نقش، کاهش معنی‌داری می‌یابد. تأثیر قابل قبول سوکروز در زنده‌مانی این جدایه و تفاوت بسیار اندک میزان ماندگاری این جدایه در فرمولاسیون‌های سبوس گندم و برنج حاوی سوکروز در پایان انبارداری در دمای چهار و ۲۴ درجه سانتی‌گراد نشان از نقش فوق‌العاده سبوس گندم، سبوس برنج و سوکروز در زنده‌مانی این جدایه دارد. مواد افزوده جزء بسیار مهم فرمولاسیون‌ها هستند که روی زنده‌مانی و دیگر خصوصیات مانند تشکیل سوسپانسیون یا امولسیون پایدار در آب و پراکندگی محصول بیوکنترلی روی سطح هدف تأثیر می‌گذارند. براساس نتایج این تحقیق، اضافه کردن سدیم آلجینات به فرمولاسیون‌ها باعث افزایش پایداری فرمولاسیون می‌شود. سدیم آلجینات یک پلی ساکارید است که محیط مناسبی برای نگهداری سلول‌های زنده بوده و با افزایش ویسکوزیته باعث پایداری فرمولاسیون شده هم‌چنین در چسبندگی و ماندگاری فرمولاسیون نقش دارد.

مزیت مهم این پلیمر سازگاری با محیط زیست و تجزیه‌پذیری در محیط زیست می‌باشد بدون اینکه مواد سمی و مضر برای میکروارگانیسم‌ها تولید کند. مشخص شده است که سدیم آلجینات عامل پایداری، چسبندگی و دوام فرمولاسیون می‌باشد (Kinay & Yildiz 2008). سدیم آلجینات برای افزایش خاصیت آنتاگونیستی سلول‌های مخمر در فرمولاسیون برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت معرفی شده (Spadaro & Gullino, 2004) و هم چنین باعث پایداری عامل آنتاگونیست در فرمولاسیون‌های خشک طی نگهداری به مدت شش ماه گردید (Muller-Stover *et al*. 2004). در این مطالعه مشخص شد صمغ عربی در مقایسه با سدیم آلجینات و سوکروز تأثیر کمتر در افزایش زنده‌مانی سلول‌های مخمر دارد. صمغ عربی علاوه بر افزایش زنده‌مانی سلول‌های جدایه‌های مختلف در برخی فرمولاسیون‌ها، به دلیل ایجاد قطب‌های هیدروفیلیک، رسوب و تجمع ذرات در آب را

به تأخیر انداخته و باعث تشکیل سوسپانسیون پایدار از فرمولاسیون می‌شود. بنابراین توصیه می‌شود صمغ عربی به همراه یک ماده افزوده دیگر مانند سوکروز و سدیم آلجینات که تأثیر بیشتری بر روی زنده‌مانی مخمر دارند، به فرمولاسیون‌ها اضافه گردد تا علاوه بر افزایش ماندگاری فرمولاسیون، پایداری سوسپانسیون فرمولاسیون در آب نیز بهبود یابد. در این تحقیق مشخص شد که اضافه کردن سوکروز باعث افزایش زنده‌مانی و خاصیت کنترل‌کنندگی جدایه مخمر می‌شود. در مطالعات قبلی *کینای و بیلدیز* (۲۰۰۸) گزارش کردند که اضافه کردن یک درصد سوکروز به فرمولاسیون مخمر ***Metschinkovia pulcherrima*** باعث افزایش زنده‌مانی و خاصیت کنترل‌کنندگی می‌شود ولی اضافه کردن مقادیر بالاتر سوکروز مانند ۱۰ درصد باعث کاهش حلالیت فرمولاسیون در آب می‌شود. نقش سوکروز در پایداری و نگهداری مخمرها و قارچ‌ها در مقالات متعددی به اثبات رسیده است (McCabe & Soper 1985, Caesar & Burr 1991; Kinay & yildiz 2008) که مشخص کردند سوکروز در حفاظت مایه تلقیح طی مرحله خشک کردن، افزایش جوانه زنی‌مایه تلقیح پس از انتقال به گیاه هدف و طولانی‌تر کردن دوره زنده‌مانی عوامل میکروبی آنتاگونیست نقش دارد.

کونیک و همکاران (Connic *et al*. 1998) مشاهده کردند که اضافه کردن سوکروز به فرمولاسیون گرانولی آرد گندم و کائولین باعث افزایش زنده‌مانی ***Colletotrichum truncatum*** در فرمولاسیون می‌شود. سوکروز با جایگزین کردن مولکول‌های آب در لایه‌های لیپیدی دو لایه، یک غشا در اطراف میکروارگانیسم ایجاد می‌کند که باعث محافظت از آن در طی مرحله خشک‌کردن و افزایش دوره زنده‌مانی می‌گردد (Zidack & Quimby 1999). در تحقیق ما مشخص شد به‌طورکلی فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در مقایسه با فرمولاسیون‌های نگهداری شده در ۲۴ درجه سانتی‌گراد از نظر حفظ زنده‌مانی (Shelf-life)ماندگارتر بود و به عبارتی نرخ کاهش جمعیت در فرمولاسیون نگهداری شده در ۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۲۴ درجه سانتی‌گراد کمتر است که با نتایج به دست آمده از فرمولاسیون‌های مخمر *Candida sake* CPA-1 (Abadias *et al*. 2003) و مخمر *Metschinkovia pulcherrima* (Kinay & Yildiz 2008) مطابقت دارد. ماندگاری طولانی‌تر در دمای پایین‌تر را می‌توان به فعالیت متابولیکی پایین‌تر عامل میکروبی آنتاگونیست در دمای پائین نسبت داد (Druvefors 2004).

مشخص شده است که قابلیت کنترل‌کنندگی آنتاگونیست‌ها، رابطه مستقیمی با تعداد سلول‌های آنتاگونیست نیز دارد (Hofstein *et al*. 1994). *درابی و همکاران* (Droby *et al*. 2004) دریافتند که در کنترل بیولوژیک ***P. digitatum*** در میوه گریپ فروت، میزان مقاومت به زمان کاربرد و غلظت مخمر ***Candida oleophila*** بستگی دارد. *یوسال و همکاران* (Usall *et al*. 2000). گزارش کردند هنگامی که غلظت سلول‌های مخمر ***C. sake*** از $۱/۶\times۱۰^{۵}$ CFU ml^{-1} به $۱/۶\times۱۰^{۶}$ CFU ml^{-1} افزایش یافت. اندازه لکه‌های ***P.expansum*** روی سیب کاهش یافت. در مطالعه ما نیز مشخص شد که کاربرد سوسپانسیون فرمولاسیون‌های حاوی بیشترین تعداد سلول زنده مخمر، در کاهش بیماری کپک آبی سیب موثرتر واقع شدند. هر چند کارایی فرمولاسیون‌ها در کاهش مساحت لکه ایجاد شده توسط بیمارگر در برخی فرمولاسیون‌ها در مقایسه با سلول‌های تازه مخمر در سطح پایین‌تری قرار داشت ولی نتایج به‌دست آمده برای کنترل بیماری

رضایت‌بخش می‌باشد. مواد حامل استفاده شده در این تحقیق به تنهایی قادر به کاهش مساحت لکه ایجاد شده توسط بیمارگر نبوده و هم‌چنین تیمار میوه‌های سیبا این مواد نشان داد که این مواد تأثیر منفی روی میوه‌های سیب ندارد. بنابراین تحقیق حاضر نشان داد که نوع مواد به کار رفته در فرمولاسیون باعث حفظ قدرت حیات و کارایی جدایه آنتاگونیست در طی مدت انبارداری شده و هم‌چنین ضمن سهولت انتقال، موجب حفظ شدت اثر آن در کنترل بیماری در شرایط انبار می‌شود.

در پایان باید متذکر شد که فرموله‌کردن یک محصول بیوکنترل تنها یک حلقه از زنجیره فرایندی است که برای تولید فرمولاسیون مؤثر لازم می‌باشد. فرمولاسیونی که از نظر حفظ قدرت حیات و افزایش کارایی عوامل آنتاگونیست در انبار بسیار مؤثر بوده و دوره نگهداری آن هم رضایت‌بخش باشد تا در نهایت به صورت انبوه و تجاری تولید شده و در اختیار کشاورزان قرار گیرد. از اولین شرایط مربوط به تجاری‌کردن عوامل کنترل بیولوژیک محسوب می‌شود. دیگر حلقه‌های این زنجیره شامل کشف عامل و جداسازی دقیق میکروارگانیزم ، ردیابی و پایش عامل بیوکنترل در محیط‌های طبیعی و ارزیابی دینامیک جمعیت آن در طی یک دوره زمانی مشخص، تولید انبوه با تکیه بر افزایش کمیت و کیفیت و هم‌چنین ملاحظاتی درمورد هزینه‌های آن هستند.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات آزمایشگاهی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و همکاری صمیمانه کارشناس محترم سرکار خانم مهندس مهرنوش محمدی‌فر و خانم مهندس مونا مختاری انجام شده که بدین وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (147-145) متن انگلیسی مراجعه شود.