DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jsb.2014.2494

شناسایی و کنترل بیولوژیک عوامل میکروبی ایجادکننده فساد در چغندرقندهای انبار شده در صنعت قند

Identification and biological control of microbial rotting agents of stored beets in sugar industry

سعیده نوری[۱]، نفیسه سادات نقوی[۲*]، مریم محمدی سیچانی[۳]، مهدیه گل گل جم[۴] و محمد علی ضیاء[۵]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش:۹۲/۹/۲۷

س. نوری، ن.س. نقوی، م. محمدی سیچانی، م. گل گل‌جم و م.ع. ضیاء . ۱۳۹۲. شناسایی و کنترل بیولوژیک عوامل میکروبی ایجادکننده فساد در چغندرقندهای انبار شده در صنعت قند. **مجله چغندرقند ۲۹(۲): ۱۶۱- ۱۴۷**

چکیده

از هنگام برداشت چغندرقند از مزارع تا انتقال به کارخانه قند و تبدیل آن به قند مدت طولانی صرف می‌گردد. چغندرقند در حین برداشت و انتقال، آسیب دیده و زخمی می‌شود و محل مناسبی از لحاظ دما، رطوبت، pH و غلظت قند برای رشد انواع میکروارگانیسم‌های ساکارولیتیک ایجاد می‌کند. در این تحقیق از ریشه‌های انبار شده در سه ماه بهار ۱۳۹۰ و هم‌چنین شربت فرآوری شده با حرارت در یکی از کارخانه‌های تولید قند و شکر اصفهان جهت جداسازی و شناسایی انواع میکروارگانیسم‌ها نمونه‌برداری تصادفی صورت گرفت. تکه‌های آلوده پس از شستشو و ضدعفونی کردن سطح ریشه‌ها از مناطق مختلف بافت آن‌ها جداسازی و پس‌از تهیه رقت، عملیات خالص‌سازی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها با روش‌های استاندارد میکروبیولوژیک انجام شد. در ادامه مطالعه، تأثیر عصاره اتانولی بره موم زنبورعسل به‌عنوان یک ماده ضدمیکروبی بیولوژیک در شرایط آزمایشگاهی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های جداسازی شده مورد ارزیابی قرار گرفت و تأثیر آن با دو ماده ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم و هیپوکلریت کلسیم مقایسه گردید. در نتیجه آزمایشات، انواع باسیل‌ها و کوکسی‌های گرم مثبت شامل جنس‌های *باسیلوس*، *لوکونوستوک*، *استافیلوکوکوس* و *استرپتوکوکوس* از گروه باکتری‌ها و انواع قارچ‌ها مانند جنس‌های *پسیلومایسس*، *کریزوسپوریوم*، *پنی سیلیوم*، *فوزاریوم* و *پیتیوم* جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شدند. در میان باکتری‌های جداسازی شده انواع بیماری زا شامل *استافیلوکوکوس ارئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* نیز حضور داشتند. شمارش باکتری‌ها در شربت فراوری شده با حرارت نشان دهنده بقای اسپور باکتری‌ها و رشد آن‌ها به تعداد ۵۳ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی لیتر پس از رویش بود. باکتری‌هایی که در شربت پس‌از فراوری باقی ماندند متعلق به جنس *باسیلوس* بودند. اعضای جنس *باسیلوس* به عنوان پاتوژن‌های فرصت‌طلب انسانی مطرح هستند و برخی از آن‌ها فراورده‌های حساسیت زا تولید می‌کنند، بنابراین رعایت مواردی که موجب کاهش تعداد آن‌ها در مراحل انبارداری چغندرقند می‌شود، علاوه‌بر کنترل کاهش کیفیت محصول از نظر بهداشتی نیز قابل توجه است. عصاره اتانولی بره موم به عنوان یک ماده بیولوژیک بی‌خطر برای سلامت انسان دارای تأثیر قابل توجهی بر روی میکروارگانیسم‌های جداسازی شده بود به طوری که کمترین غلظت لازم برای حذف کلیه باکتری‌ها و قارچ‌ها شش برابر کمتر از هیپوکلریت سدیم و ۱۲ برابر کمتر از هیپوکلریت کلسیم بود.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، انبارداری، شمارش میکروبی، بره موم زنبورعسل، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی، اصفهان، ایران

۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی- اصفهان *- نویسنده مسئول naghavi@ iaufala.ac.ir

۳ - مربی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی- اصفهان

۴- کارشناس دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، گروه میکروبیولوژی- اصفهان

۵ - استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوراسگان، گروه علوم پایه- اصفهان

مقدمه

چغندرقند از زمان انبارداری تا بهره‌برداری و شربت‌گیری، به‌دلیل آسیب دیدن غده‌ها و داشتن کربوهیدرات فراوان محل مناسبی برای تجمع انواع میکروارگانیسم‌هایی است که موجب تجزیه ساکارز و کاهش کیفیت چغندرقند می‌شوند. فعالیت میکروارگانیسم‌های موجود علاوه‌بر ایجاد ضایعات، موجب تولید اسیدهای آلی از جمله اسید لاکتیک، ترکیبات پلی‌ساکاریدی و هم‌چنین تبدیل نیترات به نیتریت می‌شود. این پدیده‌ها نه تنها باعث کاهش شدید عیار چغندرقند و میکروبی شدن شربت حاصل از آن می‌شود بلکه می‌توانند موجب بروز مشکلات فراوانی در فرآیند تولید شکر گردد. فعالیت میکروبی روی چغندرقند اگر تحت کنترل در نیاید علاوه‌بر بروز مشکلات ذکر شده، موجب اتلاف محصول نهایی و آلودگی فرآیندهای صنعتی ازجمله افزایش ویسکوزیته شربت به خاطر تبدیل ساکارز به دکستران می‌شود که باعث گرفتگی در مسیر انتقال شربت، کاهش انتقال حرارت، کاهش راندمان تبخیر کننده‌ها، کاهش راندمان کریستالیزاسیون، تغییر شکل کریستال‌ها، گرفتگی سانتریفوژها و اتلاف ساکارز در ملاس می‌گردد. هم‌چنین شربت خام حاصل از چغندرقندهای در حال فساد به دلیل فعالیت میکروارگانیسم‌ها، حاوی اسیدهای اضافی زیادی است که به مقدار بیشتری آهک برای خنثی سازی نیاز دارد (Belamri et al. 1991).

مطالعه‌ای که بلامری و همکاران (Belamri et al. 1991) در کارخانه‌های قند مراکش برای شناسایی باکتری‌های ساکارولیتیک در شربت خام چغندرقند انجام دادند، نشان داد باکتری‌های جنس *باسیلوس* آلوده‌کننده‌های اصلی شربت‌خام می‌باشند. در این راستا آن‌ها اقدام به جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده ساکارز از شربت‌خام چغندر کردند و نتیجه آن شناسایی تعدادی از گونه‌های باسیلوس به نام‌های *باسیلوس استئاروترموفیلوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس پومیلوس* و *باسیلوس ساکارولیتیکوم* بود که همگی آن‌ها قادر به اسیدی کردن محیط کشت بودند.

داکاری و همکاران (Dakkari et al. 1992) ارزش صنعتی چغندرقند را در شرایط اقلیمی مدیترانه‌ای مورد تحقیق قرار داده است. در این تحقیق ماده خشک چغندر و شیره چغندری که در آزمایشگاه از چغندرقند گرفته شده بود، جمع‌آوری گردید. آزمایش میکروبی چغندرهای سالم و فاسد نشان دهنده بالا بودن شمارش میکروبی پس از انبارداری و پایین آمدن کیفیت چغندر بود. برای رفع این مشکل بر بالا بردن کیفیت انبارداری تأکید شد.

علیمرادی (Alimoradi 2010)، در مطالعه‌ای مروری با عنوان تأثیر ضایعات بعداز برداشت در سیلو کردن و ارتباط آن با پوسیدگی قارچی ریشه در چغندرقند، بیان می‌نماید که این آلودگی بعد از مدت طولانی برای مثال ۱۲۰ روز بر میزان قند قابل استحصال چغندرهای سیلو شده تأثیر نامطلوب می‌گذارد. ولی پیش‌بینی دقیق این ضایعات قبل از برداشت دشوار است. با توجه به نتایج این گزارشات، پیشنهاد شده که از مزارع آلوده برداشت صورت نگیرد و در صورت برداشت، بایستی در اوایل بهره‌برداری و قبل از سیلو کردن، چغندرها را مصرف کرد.

بسیاری از بررسی‌هایی که بر روی عوامل بیماری‌زای گیاهی انجام شده است جهت شناسایی و کنترل فساد دانه‌ها و محصولات در حین کشت گیاه بوده است. این در حالی است که یکی از مشکلات صنایع تبدیلی فرآورده‌های گیاهی، فساد و آلودگی محصول پس از برداشت تا هنگام تبدیل آن به فرآورده مورد نظر می‌باشد. به علت این که برداشت محصولات در دوره

زمانی خاصی انجام می‌شود، انبار نمودن آن تا زمان بهره‌برداری اجتناب‌ناپذیر است.

بره موم (پروپولیس) ماده‌ای رزینی که زنبورهای عسل از درختان و گیاهان جمع‌آوری کرده و به کندوی خود حمل می‌کنند. ترکیبات اصلی بره‌موم رزین و موم می‌باشد (Greenaway et al. 1990). یکی از شناخته شده‌ترین خواص بره‌موم فعالیت ضدمیکروبی آن است (Bahrami et al. 2009). آزمایشات دیگر نیز کنترل میکروارگانیسم‌ها را به‌وسیله عصاره‌ها و کنسانتره‌های مختلف بره‌موم نشان داده‌اند (Uzel et al. 2005). بره‌موم خواص باکتری‌کشی یا باکتریواستاتیک قوی را از خود نشان می‌دهد (Rahman et al. 2010). داروهای تهیه شده از بره‌موم شامل داروی بی‌حسی یا بیهوشی، ضدحساسیت، ضداسید معده، ضدالتهاب، ضدتشعشع، آنتی‌اکسیدان، ضدعفونی کننده (ضدباکتری، ویروس و قارچ)، ضدتومور و تحریک کننده سیستم ایمنی می‌شوند (Fuliang et al. 2005, Bufalo et al. 2009; Uzel et al. 2005).

در این بررسی عوامل ایجادکننده فساد در چغندرقند در زمان انبارداری در صنعت تولید قند، جداسازی و شناسایی شد. هم‌چنین میزان آلودگی باکتریایی در شربت فراوری شده چغندرقند از طریق شمارش باکتری‌ها و اسپور آن‌ها به عنوان شاخصی از باقی ماندن آلودگی میکروبی پس از فرایند حرارتی ارزیابی شد و جمعیت باکتریایی که بعداز تهیه شربت باقی می‌مانند مورد شناسایی قرار گرفت. سپس اثر ضدمیکروبی بره‌موم زنبور عسل به عنوان یک عامل کنترل کننده بیولوژیک بر روی میکروارگانیسم‌های جداسازی شده، در مقایسه با دو ماده ضدعفونی کننده معمول (هیپوکلریت سدیم و هیپوکلریت کلسیم) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

از غده‌های انبار شده در سه ماهه بهار سال ۱۳۹۰ در کارخانه قند نقش جهان اصفهان استفاده شد. به این صورت که ابتدا ۱۰ نمونه در دو مرحله از سه سیلو با ظرفیت هر کدام ۳۰ هزار تن تهیه گردید. سپس در جهت جداسازی و شناسایی انواع میکروارگانیسم‌های موجود در چغندرقندهای در حال فساد از قسمت‌های فاسد شده نمونه‌برداری تصادفی صورت گرفت.

جداسازی و کشت باکتری‌ها

طبق روش ارائه شده به‌وسیله لون و کوریلان (Leuven and Croylaan 2000) تکه‌های آلوده پس از شستشو با آب و ضدعفونی کردن سطح غده‌ها با اتانول ۷۰ درصد از قسمت‌های مختلف بافت آن‌ها جداسازی شد که در مورد باکتری‌ها ابتدا بافت‌های آلوده به‌طور جداگانه کوبیده شد و سپس عصاره استخراج شده آن با آب مقطر استریل مخلوط و از آن رقت‌های مختلف تهیه گردید. پس از این مرحله باکتری‌ها از رقت‌های مختلف عصاره و آب مقطر به محیط مایع TSB (Trypticase soy broth) انتقال داده شد و بعد از غنی‌سازی باکتری‌ها در این محیط، عملیات جداسازی و خالص‌سازی آن‌ها روی محیط کشت جامد NA (Nutrient Agar) در شرایط دمای محیط و pH=۷ انجام پذیرفت. در نهایت شناسایی باکتری‌ها در نمونه‌های چغندر و شربت قند با روش‌های استاندارد میکروبیولوژیک از طریق رنگ‌آمیزی و تست‌های بیوشیمیایی به عمل آمد.

شمارش کل باکتری‌ها در شربت

از شربت قند قبل از ورود به مرحله تبلور نمونه تازه گرفته شد. پس از تهیه رقت‌های مختلف با آب مقطر استریل، یک میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌ها به پلیت حاوی محیط کشت NA انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس میزان رشد کل اسپورها و فرم‌های رویشی براساس مقیاس واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر $CFU.ml^{-1}$ گزارش گردید (Mohan et al. 2010).

شمارش اسپور باکتری‌ها در شربت

برای شمارش تعداد اسپورهای موجود در شربت، ابتدا در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری فرم‌های رویشی از بین برده شد و فقط اسپورها باقی ماندند. سپس رقت‌های مختلف تهیه گردید و از هرکدام یک میلی‌لیتر به محیط کشت NA انتقال داده شد. کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. شمارش بر اساس $CFU.ml^{-1}$ انجام شد(Mohan et al. 2010).

جداسازی و کشت قارچ‌ها

قسمت‌های کوچکی از نواحی مختلف بافت‌های آلوده تکه‌برداری و در محیط کشت‌های PDA (Potato dextrose agar) و(Soboraud dextrose agar) SDA در شرایط دمای محیط و pH=۶ (برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها) قرار داده شد، در نهایت پس از چندین بار تکرار کشت، قارچ‌ها و مخمرهای موردنظر خالص‌سازی و برای شناسایی قارچ‌ها از مطالعه میکروسکوپی، تهیه اسلاید کالچر و سپس از کلیدهای شناسایی استفاده شد (Samson et al. 2004).

روش اسلاید کالچر

این روش برای شناسایی قارچ‌های کپکی روش دقیق و متداولی است. در این روش اندام‌های زایشی قارچ به صورت سه بعدی مشخص می‌شود و از روی خصوصیات مورفولوژیک آن می‌توان قارچ را تشخیص داد. در ابتدا قطعه ای از محیط SDA با ابعاد یک سانتی‌متر مربع با رعایت موازین استریل روی مرکز لام قرار داده شد. سپس لام روی لوله U شکل درون یک پلیت شیشه‌ای بزرگ به صورت افقی قرار گرفت. با استفاده از آنس استریل، قارچ در چهار نقطه از محیط روی لام کشت داده شد. سپس یک لامل ضدعفونی شده با اتانول روی قطعه آگار کشت شده قرار داده شد. برای جلوگیری از خشک شدن قطعات آگار در طول مدت انکوباسیون حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل را در داخل پلیت ریخته شد و درب پلیت گذاشته شد. در نهایت پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای اطاق قرار گرفت. به این ترتیب بعضی از ریسه‌ها بعد از رشد از آگار خارج شده و به قسمت زیرین لامل می‌چسبند، به طوری که به آسانی زیر میکروسکوپ دیده می‌شوند. بعد از انکوباسیون لامل جدا شد. دو قطره رنگ لاکتوفنل کاتن بلو روی لام تمیز دیگری ریخته شد و لامل با قارچی که به آن چسبیده بود روی لام قرار داده شد (Leuven and Croylaan 2000). ساختمان ریسه‌های چسبیده به لامل با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

تهیه عصاره اتانولی بره‌موم

مقدار ۲۵ گرم از بره‌موم خام در ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شد. پس از طی شدن مدت زمان لازم برای حل شدن کامل بره‌موم در اتانول ۹۶ درصد، محلول به‌دست آمده با کاغذ

صافی پالایش شد. ناخالصی‌های به دست آمده در صافی اندازه‌گیری و از وزن ماده خشک محلول کم گردید.

تأثیر عوامل ضدمیکروبی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های جداسازی شده

از عصاره به‌دست آمده در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای رقت تهیه شد. به این منظور از محلول دی‌متیل سولفوکساید پنج درصد به عنوان حلال استفاده شد. مواد ضدعفونی کننده شیمیایی هیپوکلریت سدیم و هیپوکلریت کلسیم نیز به همین ترتیب با آب مقطر در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای رقیق شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در یکی از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و به هر کدام از رقت‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از میکروارگانیسم مورد نظر که معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند رشد یافته بود اضافه شد. یک چاهک کنترل حاوی میکروارگانیسم بدون ضدعفونی کننده و یک چاهک کنترل دیگر حاوی حلال نیز در نظر گرفته شد. رقتی از ماده ضد میکروبی که موجب توقف رشد میکروارگانیسم موردنظر نسبت به کنترل شده بود به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد (MIC، Minimum Inhibitory Concentration) ثبت گردید. از چاهک حاوی کمترین غلظت مهارکننده و دو چاهک قبل از آن، میکروارگانیسم‌ها به محیط‌های جامد (NA برای باکتری‌ها و PDA برای قارچ‌ها) منتقل شدند تا کمترین غلظت کشنده باکتری‌ها (MBC، Minimum Bactericidal Concentration) و کمترین غلظت کشنده قارچ‌ها (MFC،Minimum Fungicidal Concentration) که موجب عدم رشد در محیط جامد نیز می شود به دست آید (Rahman et al. 2010; James 1998). داده‌های حاصل از سه تکرار آزمایشات با نرم‌افزار Minitab آنالیز شد و روش‌ها با استفاده از آزمون t مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری‌ها

همانطور که در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است، باکتری‌های جداسازی شده در دو گروه کوکسی و باسیل بودند و واکنش گرم همه باکتری‌ها مثبت بود.

جدول ۱ خصوصیات کوکسی های گرم مثبت جداسازی شده

نوع باکتری	تخمیر روی مانیتول سالت آگار	رشد روی بایل اسکولین آگار	حساسیت به آنتی بیوتیک	تخمیر ساکارز	کاتالاز	کواگولاز	همولیز	مورفولوژی میکروسکوپی
Staphylococcus aureus	+	−	حساس به نوبیوسین	+	+	+	گاما	خوشه‌ای
Staphylococcus saprophyticus	+	−	مقاوم به نوبیوسین	+	+	−	گاما	خوشه‌ای
Staphylococcus epidermidis	−	−	حساس به نوبیوسین	+	+	−	گاما	خوشه‌ای
Leuconostoc mesentroides	+	+	مقاوم به وانکومایسین	+	−	−	گاما	خوشه‌ای و دوتایی
Streptococcus Spp.	−	متغیر	−	+	−	−	بتا	زنجیره‌ای

جدول ۲ خصوصیات باسیل‌های گرم مثبت اسپوردار جداسازی شده

گونه باکتری	لسیتیناز	لیپاز	تخمیر مانیتول	تخمیر گزیلوز	تخمیر سوربیتول	تخمیر ساکارز	حرکت	MR	VP	کواگولاز	همولیز
Bacillus bervis	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	بتا
Bacillus pumilus	−	+	متغیر	متغیر	متغیر	+	−	+	+	−	بتا
Bacillus stearotermophilus	−	+	+	+	متغیر	+	±	−	+	−	بتا
Bacillus subtilis	−	−	+	متغیر	−	+	+	+	+	−	بتا

شمارش کل باکتری‌ها و اسپورها در شربت خام حاصل از چغندرقند

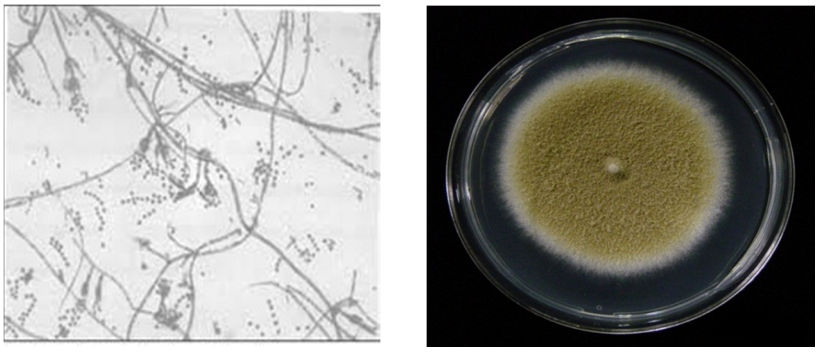
درصد ناچیزی از اسپورها در شربت فراوری شده برای تهیه قند قبل از مرحله تبلور باقی مانده بودند؛ به طوری که تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی برای کل باکتری‌ها و اسپورها ۵۳CFU.ml^{-1} به‌دست آمد که ۳ CFU.ml^{-1} آن (۵/۹٪) را اسپورها تشکیل می‌دادند. نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان می‌دهد میان تعداد باکتری‌ها قبل از فراوری حرارتی شربت و تعداد اسپورهای باقی مانده بعد از مرحله فرآوری اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). با این وجود، تعدادی از باکتری‌ها پس از مرحله فرآوری باقی می‌مانند و می‌توانند با تکثیر خود موجب کاهش کیفیت شربت شوند. باکتری‌های باقی مانده در شربت انواع گونه‌های جنس *باسیلوس* بودند که از چغندر خام نیز جداسازی شده بودند.

جدول ۳ آزمون تفاوت میانگین تعداد باکتری‌ها قبل از مرحله فراوری شربت با تعداد اسپورهای باقی مانده پس از فراوری

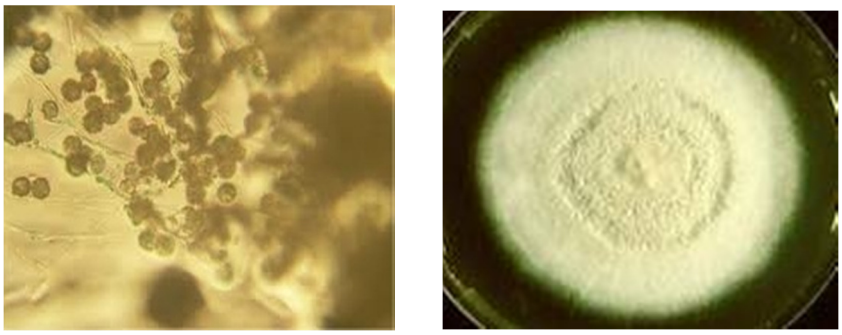
مرحله آزمایش	تعداد باکتری ها در میلی لیتر شربت (CFU.ml^{-1})	t	سطح احتمال
قبل از فراوری حرارتی	۵۳	۲۸/۵۷	۰/۰۴۳
بعد از فراوری حرارتی	۳		

جداسازی و شناسایی قارچ‌ها

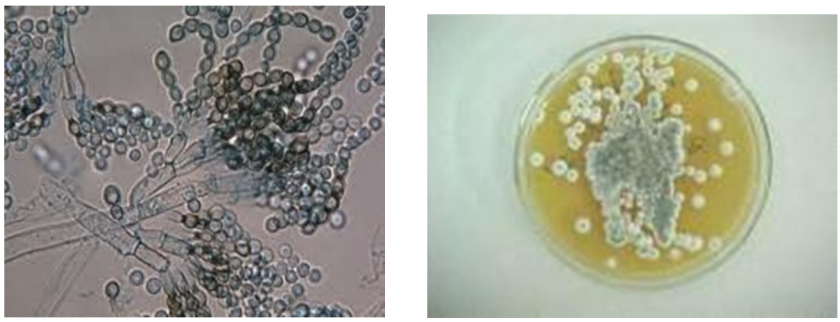
مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ‌های جداسازی شده و کشت داده شده با روش اسلاید کالچر در شکل‌های ۱ لغایت ۵ مشاهده می‌شود. قارچ‌های جداسازی شده براساس خصوصیاتشان متعلق به جنس‌های *پسیلومایسس*، *کریزوسپوریوم*، *پنی سیلیوم*، *فوزاریوم* و *پیتیوم* تشخیص داده شدند.



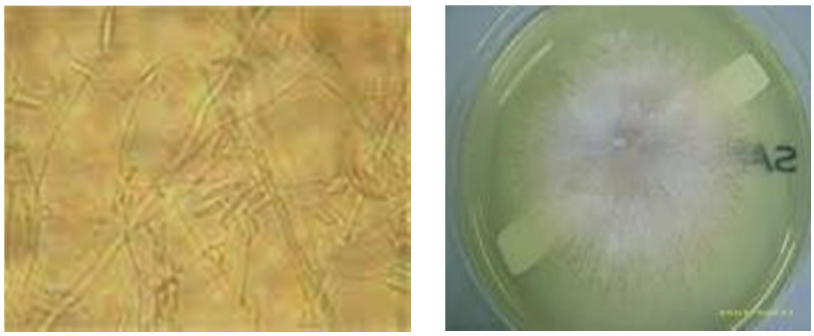
شکل ۱ مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ *پسیلومایسس* (*Paecilomyces*) جداسازی شده از چغندرقند



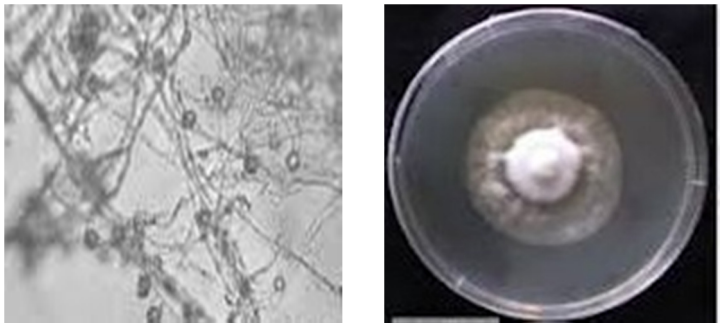
شکل ۲ مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ *کریزوسپوریوم* (*Chrysosporium*) جداسازی شده از چغندرقند



شکل ۳ مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ *پنی سیلیوم* (*Pencillium*) جداسازی شده از چغندرقند



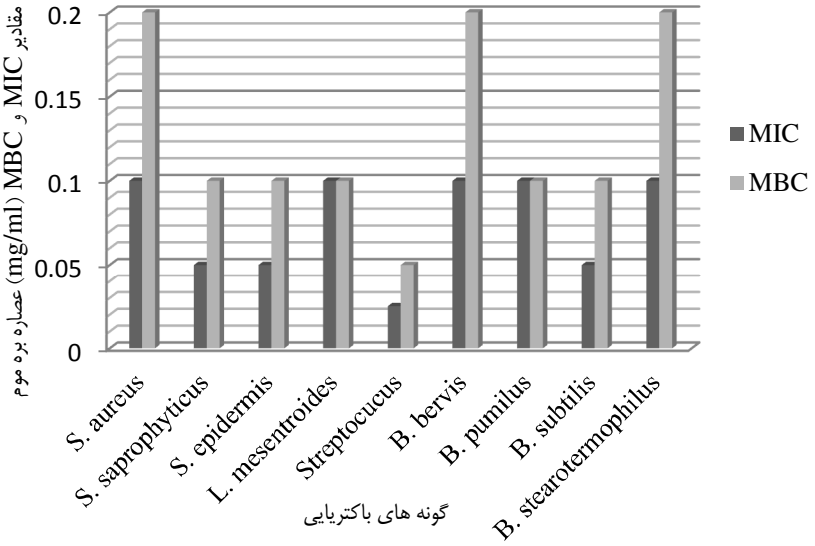
شکل ٤ مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ *فوزاریوم* (*Fusarium*) جداسازی شده از چغندرقند



شکل ۵ مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ *پیتیوم* (*Pythium*) جداسازی شده از چغندرقند

نتایج حاصل از تأثیر عصاره اتانولی بره‌موم زنبورعسل بر روی باکتری‌های جداسازی شده از چغندرقند

پس از شناسایی باکتری‌های عامل فساد در ریشه چغندرهای انبار شده، اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی بره‌موم بر روی باکتری‌های جداسازی شده بررسی گردید که نتایج آن در شکل ۶ آمده است.



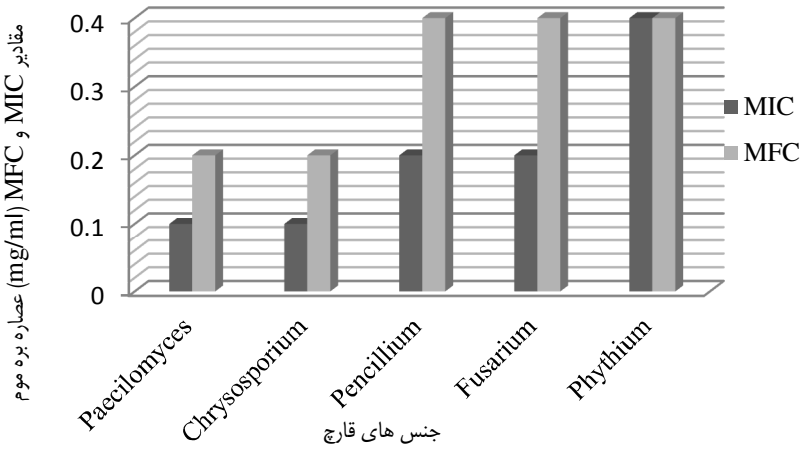
شکل ٦ اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی بره‌موم زنبور عسل بر باکتری‌های جداسازی شده از چغندرقند فاسد

همان‌طور که در شکل ۶ ملاحظه می‌شود گونه‌های مقاوم‌تر از باکتری‌های جداسازی شده که شامل *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس برویس* و *باسیلوس استئاروترموفیلوس* می‌باشند، دارای MIC یا مهار رشد در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و MBC یا عدم‌رشد در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بره‌موم هستند. *باسیلوس پومیلوس* و

لوکونوستوک مزنتروئیدس دارای MIC و MBC یکسان در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بره‌موم می‌باشند. حساس‌ترین باکتری، گونه *استرپتوکوکوس* با MIC یا مهار رشد در غلظت۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و MBC یا عدم رشد در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بره‌موم می باشد.

تأثیر بره‌موم زنبورعسل بر روی قارچ‌های جداسازی شده از چغندرقند

پس‌از شناسایی قارچ‌های عامل فساد میکروبی در چغندرقندهای انبارداری شده، اثر غلظت‌های مختلف بره‌موم بر روی آن‌ها بررسی گردید و نتایج آن در شکل ۷ آمده است.



شکل۷ اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی بره‌موم زنبورعسل بر قارچ‌های جداسازی شده از چغندرقند فاسد

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود جنس‌های مقاوم‌تر از قارچ‌های جداسازی شده مانند *پنسیلیوم* و *فوزاریوم* MIC یا مهار رشد در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و MFC یا عدم‌رشد در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره بره‌موم نشان دادند. جنس *پیتیوم* دارای MIC و MFC یکسان در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بره‌موم بود و جنس‌های حساس‌تر مانند *پسیلومایسس* و *کریزوسپوریوم* MIC و MFC به ترتیب در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره اتانولی بره‌موم نشان دادند.

مقایسه نتایج حاصل از مقایسه اثر عصاره اتانولی بره‌موم زنبورعسل با دو ماده ضدعفونی کننده شیمیایی

از مقایسه ماده ضدمیکروبی بیولوژیک به نام بره‌موم زنبورعسل و دو ماده شیمیایی ضدعفونی کننده هیپوکلریت سدیم و هیپوکلریت کلسیم در غلظت‌های مختلف بر روی کل باکتری‌ها و قارچ‌های جداسازی شده از چغندرقندهای فاسد نتایج ارائه شده در جدول ۴ به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد اثر کشندگی عصاره اتانولی بره‌موم به‌طور معنی‌داری بیشتر از اثر کشندگی دو ماده شیمیایی هیپوکلریت سدیم و هیپوکلریت کلسیم می‌باشد. در این نتایج، میانگین کمترین غلظتی که موجب کشته شدن همه انواع قارچ و باکتری شده است، در نظر گرفته شده است.

جدول ٤ مقایسه آماری نتایج به دست آمده از میانگین کمترین غلظت کشنده (MBC) مواد ضدمیکروبی مورد استفاده

عامل کنترل کننده	MBC (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	t	سطح احتمال
عصاره اتانولی بره موم	۰/۴	۰/۷۸	۰/۰۴۳
هیپوکلریت سدیم	۲/۴		
عصاره اتانولی بره موم	۰/۴	۱/۷۱	۰/۰۱۵
هیپوکلریت کلسیم	۵/۰		

بحث

بلامری و همکاران (Belamri et al. 1991) در مراکش اقدام به جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده ساکارز از شربت‌خام چغندر کرد و نتیجه آن شناسایی تعدادی از گونه‌های باسیلوس به نام‌های *باسیلوس استئاروترموفیلوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس برویس*، *باسیلوس پومیلوس* و *باسیلوس ساکارولیتیکوم* بود که همگی آن‌ها قادر به اسیدی کردن محیط کشت بودند. تعدادی از این گونه‌ها مانند *باسیلوس استئاروترموفیلوس*، *باسیلوس پومیلوس* و *باسیلوس برویس* در چغندرقندهای فاسد انبار شده نیز وجود داشتند که این نتایج نشان می‌دهد آلودگی چغندرقندهای سیلو شده باعث میکروبی شدن شربت حاصل از آن نیز می‌شود.

در مطالعه علیمرادی (Alimoradi 2010) در مورد چغندرهای آلوده هنگام برداشت توضیح داده شده و ارتباطی بین وجود ضایعات چغندرقندهای سیلو شده و افزایش پوسیدگی با منشاء قارچی در ریشه آن‌ها یافت شده است. در تحقیق حاضر نیز آلودگی‌های قارچی به خصوص قارچ *پیتیوم* و *فوزاریوم* که عامل پوسیدگی ریشه هستند از چغندرقندهای سیلو شده فاسد، جداسازی گردید که ممکن است این آلودگی از قبل در مزارع برداشت چغندرقند و یا در سیلوها و انبارهای آلوده وجود داشته باشد، درنتیجه پس از سیلو کردن به غده‌های سالم نیز منتقل گردد. با توجه به نتیچه این گزارشات، در این مقاله پیشنهاد شده که از مزارع آلوده برداشت صورت نگیرد و در صورت برداشت، باید در اوایل بهره‌برداری و قبل از سیلو کردن، چغندرها را مصرف کرد. هم‌چنین پس از اتمام مرحله سیلوکردن غده‌های چغندرقند، بایستی سیلوها از نظر بهداشتی، تمیز و ضدعفونی شوند.

در تحقیقات لوئیس و پاپاویزاس (Lewis and Papavizas 2000) و بردین (Bardin et al. 2004) تأکید شده است، به وسیله بیوکنترل محصولات گیاهی می‌توان با عوامل فساد در آن‌ها مبارزه کرد و باعث مهار رشد آن‌ها شد. در این زمینه استفاده از قارچ‌ها و مخمرهایی که حالت آنتاگوئیسم با میکروارگانیسم‌های دیگر دارند پیشنهاد شده است. هم‌چنین مطالعات زیادی بر روی بیماری‌های گیاهی بذرهای انبار شده چغندرقند انجام شده است. به طور مثال، بردین (2004) در تحقیقی که بر روی بیماری ناشی از قارچ *پیتیوم* در بذرهای چغندرقند انجام دادند، اثرات بیوکنترکی گیاهان دیگر مانند پوشال گشنیز، نخود، کتان و عدس را اثبات کردند.

در ایران در سال‌های اخیر مطالعاتی روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای چغندرقند و پیشگیری از آن‌ها در زمان کاشت گیاه انجام شده است. به عنوان مثال، اشرف

منصوری و همکاران (Ashraf Mansoori et al. 2010) هیبریدهای مقاوم چغندرقند را معرفی نمودند که به بیماری ویروسی پیچیدگی بوته در شرایط مزرعه مقاومت نشان می‌دادند. روزبه و همکاران (Rouzbeh et al. 2011) از نانوذرات نقره برای کنترل آلودگی این گیاه در کشت بافت استفاده کردند. اما در کشور ما با وجود این که فساد چغندرقند در زمان انبارداری یکی از مهم‌ترین مشکلات صنایع قند و شکر می‌باشد، مطالعه خاصی در زمینه میزان آلودگی و نوع میکروارگانیسم‌های عامل فساد در بذر و ریشه چغندرقند و نحوه پیشگیری از بروز آن‌ها انجام نشده است. به همین منظور بر آن شدیم مطالعه در این زمینه را با بررسی میکروارگانیسم‌های عامل فساد آغاز کنیم و راه کاری برای کنترل آن‌ها پیشنهاد نماییم.

عوامل میکروبی جداسازی شده در این تحقیق جزء میکروارگانیسم‌های هوازی یا بی‌هوازی اختیاری می‌باشند که همگی توانایی تجزیه ساکارز را دارند. پس چنانچه هریک از این گونه شناسایی شده در شرایط مطلوبی از لحاظ دما (برای قارچ‌ها بین ۲۵ تا ۲۸ و برای باکتری‌ها بین ۳۷ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و pH (قارچ‌ها کمی اسیدی و باکتری‌ها خنثی) و غلظت ساکارز موجود در چغندرقند قرار بگیرند، دارای حداکثر رشد در کوتاه‌ترین زمان می‌باشند. البته بعضی از گونه‌های باکتری مانند *باسیلوس برویس*، *باسیلوس پومیلوس*، *باسیلوس استئاروترموفیلوس* و *کلستریدیوم ترموساکارولیتیکوم* که اسپورزا نیز هستند قادر به تحمل دمای ۶۵ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد و pH بین ۵ تا ۷ می‌باشند و قارچ‌های جداسازی شده نیز می‌توانند دمای کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد را تحمل کنند (Shah 1999). در میان باکتری‌های جداسازی شده انواع بیماری‌زا مانند *استافیلوکوکوس ارئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و انواع بیماری‌زای فرصت‌طلب مانند *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مشاهده شدند (Brooks et al. 2010). لازم به ذکر است شربت قند در زمان تهیه در معرض دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد که در این دما اغلب فرم‌های رویشی باکتری‌ها از بین می‌روند. نکته مورد توجه که در شمارش باکتری‌های شربت فراوری شده مشاهده گردید، حداقل بودن قابل توجه تعداد اسپورها نسبت به فرم‌های رویشی است. این اختلاف می‌تواند نشان دهنده وجود شرایط مناسب رشد برای باکتری‌ها در شربت مورد استفاده برای تهیه قند و شکر پس از سرد شدن باشد که موجب خروج از مرحله اسپور و رشد فعال آن‌ها شده است. باکتری‌های باقی مانده در شربت قند پس از مرحله حرارت‌دهی متعلق به جنس باسیلوس می‌باشند. بعضی از گونه‌های تشخیص داده شده مانند باسیلوس پومی‌لوس، علاوه‌بر این که کیفیت چغندر انبار شده را کاهش می‌دهند، ازجمله باکتری‌هایی هستند که می‌توانند در انسان و گیاه ایجاد بیماری نمایند (Galal et al. 2006, Tenal et al. 2007). مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد باسیلوس سوبتیلیس نیز که یکی از گونه‌های اسپورزای باقی مانده در شربت است، به علت تولید سوبتیلیزین واکنش‌های ازدیاد حساسیت و آلرژیک در بدن تولید می‌کند(Kawabatai et al. 1996).

هیپوکلریت سدیم و هیپوکلریت کلسیم ازجمله مواد ضدعفونی کننده هستند که بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و هم‌چنین قارچ ا اثر مهاری و کشندگی خوبی دارند (Tully 1914; Memarian et al. 2005; Ebadian et al. 2007). در تحقیق حاضر غلظت ۲/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم و غلظت پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر هیپوکلریت کلسیم موجب کشته شدن همه قارچ‌ها و باکتری‌های آلوده کننده چغندرقند شد. هم‌چنین، اثر این ترکیبات با یک ماده بیولوژیک به

نام بره‌موم زنبورعسل برای کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد مقایسه شد. عصاره اتانولی بره‌موم در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر موجب از بین رفتن کلیه باکتری‌ها و قارچ‌های آلوده‌کننده چغندرقند شد. بنابراین اثر ضدمیکروبی عصاره اتانولی بره‌موم بر روی عوامل ایجاد کننده فساد در چغندرقند شش برابر هیپوکلریت سدیم و ۱۲ برابر هیپوکلریت کلسیم به‌دست آمد. مقایسه نتایج به‌دست آمده با مطالعات قبلی نشان می‌دهد عصاره اتانولی بره‌موم نسبت به ماده بره‌موم زنبورعسل خاصیت میکروب‌کشی قوی‌تری دارد. به عنوان مثال رحمان و همکاران(Rahman et al. 2010) فعالیت آنتی‌باکتریال بره‌موم را روی دو گونه باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشرشیا کلای* بررسی کرد. بهترین غلظت پیشنهاد شده از بره‌موم که روی هر دو گونه اثر مهاری و ضدمیکروبی داشته باشد ۳/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اعلام شد. گونه *استافیلوکوکوس آرئوس* در نتایج حاصل از باکتری‌های جداسازی شده از چغندرقندهای آلوده نیز وجود داشت. بهترین غلظتی از عصاره اتانولی بره‌موم که اثر کشندگی روی این گونه دارد ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

امروزه توجه خاصی به کنترل فساد میکروبی چغندرقند با استفاده از روش‌های بیولوژیک شده است. به عنوان مثال عصاره گیاهانی مانند رازک، جوهر سقز و روغن نخل در صنایع قند اتریش به جای ضدعفونی کننده‌های شیمیایی مورد استفاده قرار گرفته است (Sheikh Al eleslami 2010). در مطالعه حاضر نیز عصاره اتانولی بره‌موم زنبورعسل پیشنهاد می‌شود. با وجود این که در تحقیقات اخیر از این ماده ضدمیکروبی به طور وسیع استفاده می‌شود، مطالعه منتشر شده‌ای در زمینه استفاده از این ماده به صورت خاص برای کنترل آلودگی میکروبی چغندرقند در زمان انبارداری یافت نشد. این ماده به صورت خوراکی برای درمان بیماری‌ها هم مورد استفاده قرار می‌گیرد و استفاده از آن مقرون به صرفه است. بنابراین پیشنهاد می‌شود پس از طی کردن مراحل آزمایش میدانی به صورت اسپری بر روی چغندرها یا از طریق غوطه‌ور کردن آن‌ها قبل از انبارداری از این ماده استفاده شود.

جمع‌بندی

در این بررسی انواع مختلف باکتری‌های گرم مثبت شامل کوکسی‌ها و باسیل‌ها، هم‌چنین قارچ‌های متفاوتی از چغندرهای انبار شده جداسازی گردید. این میکروارگانیسم‌ها حتی پس از فرایند تولید شربت که در حرارت‌های ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شوند نیز به شکل فعال وجود داشتند که می‌توانند در فرایند تولید قند و شکر چه از لحاظ صنعتی و چه از لحاظ بهداشتی تأثیرگذار باشند. شرایط فعلی نگه‌داری چغندرقندهای برداشت شده در کارخانجات تولید قند و شکر به صورتی است که موجب فراهم آمدن زمینه فساد میکروبی آن‌ها به خصوص فساد باکتریایی و قارچی می‌شود. در میان گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق، انواع بیماری‌زای مطلق مانند استافیلوکوکوس ارئوس نیز وجود داشتند. البته پس از فرایند حرارت‌دهی و تهیه شربت، فقط انواع اسپورزا متعلق به جنس باسیلوس در تعداد قابل توجه باقی ماندند. برخی باکتری‌های باقی مانده پاتوژن‌های فرصت‌طلب هستند. این اسپورها می‌توانند پس از سرد شدن شربت رویش پیدا کرده، آلودگی میکروبی در محصول نهایی ایجاد کنند. مبارزه و جلوگیری از رشد این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فرصت‌طلب در انبارهای نگه‌داری چغندرقند برای حفظ سلامت محصولات تولید شده اهمیت زیادی دارد و موجب می‌شود از لحاظ بهداشتی و اقتصادی نیز با ضایعات کمتری

مواجه شویم. در این مطالعه یک ترکیب بی‌خطر بیولوژیک به نام بره‌موم زنبورعسل برای کنترل آلودگی چغندر قند در زمان انبارداری پیشنهاد می‌شود. عصاره اتانولی این ماده در غلظت بسیار پایین‌تری نسبت به ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی مانند هیپوکلریت سدیم و هیپوکلریت کلسیم موجب حذف انواع قارچ‌ها و باکتری‌های مولد فساد در چغندرقند شد.

تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم کارخانه‌قند نقش‌جهان اصفهان به دلیل کمک در تأمین هزینه‌های این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایم. هم‌چنین از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان به علت در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاهی قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده:

References:

Alimoradi A. The effect of post harvest deteriorations on storing and the correlation of it to fungal root rot in sugar beet. Journal of Sugar Industries. 2010; 200: 11-13 (in Persian, abstract in English).

Ashraf Mansoori GR, Darabi S, Vahedi S, Joukar L. Evaluation of resistance of sugar beet hybrids to curly top virus under field conditions. Journal of sugar beet. 2011; 26: 105-116 (in Persian, abstract in English).

Bahrami N, Momen BJ, Mansourian A, Esmaeili M, Amanloo M, Mohammadnia A. Evaluation of invitro anti microbial effect of propolis extract on the most prevalent oral damaging microorganisms (*Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus*). Dentistry Journal of Islamic Society Dentists. 2009; 3: 31-39 (in Persian, abstract in English).

Bardin SD, Huang HC, Moye JR. Control of Pythium damping-off of sugar beet by seed treatment with crop straw powders and a biocontrol agent. Biological Control. 2004; 29: 453–460.

Belamri M, Mekkaou AK, Tantaoui-Elaraki A. Saccharolytic bacteria in beet juices. International Sugar Journal. 1991; 93: 210–212.

Brooks G, Carroll KC, Butel J, Morse S, Mietzner T. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology, 25th Ed, Mc Grow Hill, USA, 2010, pp 168-210.

Bufalo MC, Barreiro DP, Sartori DRS, Sforcin JM. Absence of propolis effect on plasma glycaemic control and lipid metabolism in a diabetic rat model. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science. 2009; 1: 51 – 55.

Dakkari P. The value of technology sugar beet silege in the Meditarranean climate. Journal of food chemistry. 1992; 40: 356-366.

Ebadian D, Poorsina F, Saghaii S. Evaluation of the effect of sodium hypochlorite 0.5% and glutaraldehyde 2% on a thermo stable acrylic resin. Mashad J Dent Sch. 2007; 31: 217-221 (in Persian, abstract in English).

Fuliang HU, Hepburn HR, Xuan H, Chen M, Daya S, Radloff SE. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. Pharmacological Research. 2005; 51: 147-152.

Galal AA, El-Bana AA, Janse J. *Bacillus pumilus*, A new pathogen on Mango plants. Egypt J Phytopathol. 2006; 34: 17-29.

Greenaway W, Scaysbook T, Whatley FR. The composition and plant origins of propolis. Bee worked. 1990; 71: 107-118.

James A. Comparison of four methods for the determination of MIC and MBC of penicillin for viridans streptococci and the implications for penicillin tolerance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1998; 25: 209-216.

Kawabatai TT, Babcockls, Horn PA, Specific IgE and lgG1 responses to subtilisin carlsberg (alcalase) in mice: development of an intratracheal exposure model, Fundamental and Applied Toxicology. 1996; 29: 238-243.

Leuven KU, Croylaan W. A model of growth and sugar accumulation of sugar beet for potential production conditions. Agricultural Systems. 2000; 64: 1-19.

Lewis JA, Papavizas GC. Biocontrol of plant diseases: the approach for tomorrow. Crop Protection. 2000; 10: 95-105.

Mahon MR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th Ed, W.B. Saunders, USA, 2010, pp 580.

Memarian M, Azimnejad A. Evaluation of different concentration of sodium hypochlorite for disinfection of irreversible hydrocolloid impression . J Dent Sch. 2005; 23 (3):515-530 (in Persian, abstract in English).

Rahman MM, Richardson A, Sofian-Azirun M. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and Escherichia coli. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4: 1872-1878.

Roozbeh F, Davoudi D, Majidi A. The advantage of silver nanoparticles in the control of microbial contamination and recovery of double haploid sugar beet callus, in vitro. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 2011; 42: 445-450 (in Persian, abstract in English).

Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Introduction to Food- and Airborne Fungi, ASM press, USA, 2004, pp 340- 355.

Shah DM. Genetic engineering for fungal and bacterial diseases. Current Opinion in Biotechnology. 1999; 8: 208-214.

Sheikh Al eleslami R. The usage of disinfectants in Austria sugar industries. Journal of Sugar Industries. 2010; 201: 3-9 (in Persian, abstract in English).

Tenal D, Martínez-Torres J, Perez-Pomata MT, Saez-Nieto JA, Rubio V, Bisquert J. Cutaneous infection due to *Bacillus pumilus:* report of 3 cases. Clinical Infectious Disease. 2007; 44: 40-42.

Tully, EJ. A study of calcium hypochlorite as a disinfectant of water. Am J Public Health. 1914; 4: 423–435.

Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Salih B. Chemical composition and antimicrobial activities of four different Anatolian Propolis samples. Microbiol Res. 2005; 160: 189-95.