مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۸-۹)

پایداری مخمر *Pichia guilliermondii* در فرمولاسیون پودری و بررسی قابلیت کنترل‌کنندگی فرمولاسیون‌ها علیه کپک آبی سیب

لاچین مختارنژاد[۱]، حسن رضا اعتباریان[۲]* و محمدرضا فاضلی[۳]
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
۳، دانشیار گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۲۹ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۲/۵)

چکیده

در این مطالعه مواد حامل مختلف برای فرمولاسیون پودری *Pichia guilliermondii* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. سلول‌های مخمر پس از تکثیر در محیط کشت ملاس با مواد افزودنی مخلوط شده و سپس به پودر تالک، کائولین، سبوس گندم و سبوس برنج اضافه شد. پایداری فرمولاسیون‌ها در طی دوره شش ماهه مورد بررسی قرار گرفت. در پایان دوره شش ماهه، بیشترین جمعیت سلول زنده مخمر با تعداد $۲/۲\times۱۰^{۱۰}$ سلول و کمترین جمعیت سلول زنده مخمر با تعداد $۷/۶\times۱۰^{۷}$ سلول به ترتیب در فرمولاسیون‌های سبوس گندم و فرمولاسیون کائولین مشاهده شد. فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در مقایسه با فرمولاسیون‌های نگهداری شده در ۲۴ درجه سانتی‌گراد از نظر زنده‌مانی (Shelf-life) ماندگارتر بود. در بررسی اثر فرمولاسیون در کنترل بیماری کپک آبی سیب در شرایط انبار نتایج رضایت بخشی حاصل شد. اگر چه بین سلول‌های تازه مخمر و فرمولاسیون‌های مخمر در میزان کنترل بیماری اختلاف معنی‌داری وجود داشت با این وجود فرمولاسیون‌ها از نظر کاهش مساحت لکه از سطح بالای کنترل کنندگی برخوردار بودند. استفاده از فرمولاسیون سبوس برنج بیشترین کاهش را در مساحت لکه ایجاد شده توسط بیمارگر موجب گردید. بین فرمولاسیون پودر تالک و سبوس گندم از نظر کاهش مساحت لکه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این دو فرمولاسیون از نظر سطح کنترل‌کنندگی نسبت به فرمولاسیون کائولین در سطح بالاتر و نسبت به فرمولاسیون سبوس برنج در سطح پائین تر قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: فرمولاسیون، کنترل بیولوژیک، ***Pichia guilliermondii***، مواد حامل، سیب.

مقدمه

پوسیدگی میوه‌ها و سبزیجات در طول انبارداری بعد از برداشت، ارزش اقتصادی آن را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد. *Botrytis cinera* Pres. و *Penicillium expansum* Link دو بیمارگر مهم قارچی 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 (Abaias *et al.*, 2003). عموماً از ضدعفونی با قارچ‌کش‌های سنتزی برای کنترل این آلودگی‌ها استفاده می‌شود. اما نگرانی‌هایی که در مورد بقایای قارچ‌کش‌ها در محیط و افزایش مقاومت جدایه‌های عوامل بیماری‌زای بعد از برداشت به قارچ‌کش‌ها وجود دارد (Caffarelli *et al.*, 1999)، باعث تلاش در جهت توسعه

* نویسنده مسئول: حسن‌رضا اعتباریان تلفن: ۱۳۰۴۸۵۶ -۰۹۱۲ E-mail: etebar@ut.ac.ir

عوامل بیولوژیک به عنوان یک روش مکمل برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت گردیده است (Elzein *et al.*, 2004). 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). عوامل بیوکنترل به تنهایی یا به عنوان بخشی از مدیریت تلفیقی آفات برای کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها، به کار گرفته می‌شود. چندین میکرو ارگانیسم، خصوصا 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 مقیاس آزمایشگاهی و همچنین در مقیاس صنعتی می باشند (Jijak *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 1997). در مقایسه با قارچ‌های رشته‌ای عمده مزیت مخمرهای بیوکنترلی، عدم تولید اسپورهای حساسیت‌زا یا میکوتوکسین‌ها می‌باشد (Paulitz & Belanger, 2001). با وجود اینکه تعداد زیادی از آنتاگونیست‌های میکروبی برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت بررسی شده‌اند و عوامل بیوکنترلی مؤثری هستند اما تعداد کمی از این عوامل تجاری شده‌اند. Deco-182 با نام تجاری Aspire حاوی مخمر *Candida oleophila* که در ایالات متحده و اسرائیل به ثبت رسیده است، Yild plus حاوی مخمر *Cryptococcus albidus* در آفریقای جنوبی به ثبت رسیده است. Bio save 100 & 110 فرمولاسیون فریز شده باکتری *Pseudomonas syringe* است که در ایالات متحده به ثبت رسیده است (Abaias *et al.*, 2003). در استفاده تجاری، موفقیت یک عامل کنترل بیولوژیکی تا حد زیادی به فرمولاسیون آن بستگی دارد.مانع اصلی برای تجاری کردن محصولات بیوکنترلی، ایجاد یک محصول فرموله پایدار است که قابلیت کنترل‌کنندگی خود را همانند سلول‌های تازه حفظ کرده باشد (Janisiewics & Jeffers, 1997). با وجود آنکه پایداری سلول‌های *Candida sake* بعد از انجماد خشک ۸۵ درصد بود، اما تأثیر محصول خشک شده بر روی *P.expansum* سیب کمتر از سلول‌های تازه مشاهده شده است. علاوه بر این پایداری آن بعد از دو ماه نگهداری در دمای ۴ درجه به ۱۰ درصد کاهش یافت (Abaias *et al.*, 2001). از آنجایی که عوامل بیولوژیک موجودات زنده‌ای هستند، هر فرمولاسیونی باید متضمن زنده‌مانی (Shelf life) کافی باشد. علاوه بر این یک فرمولاسیون میکروبی مناسب، باید دارای صرفه اقتصادی برای تولید؛ زنده‌مانی مناسب و کافی برای مؤثر بودن آن و استفاده آسان بر روی میوه‌ها باشد. همچنین اگر مخمر به فرم خشک فرموله شده باشد باید به آسانی آبگیری مجدد شود. در نهایت قابلیت کنترل‌کنندگی آن باید در تمام مراحل فرمولاسیون؛ انبارداری طولانی مدت و آب گیری مجدد حفظ شود (Melin, 2006). یک فاکتور کلیدی قابل ملاحظه ایجاد یک محیط کم هزینه مناسب برای تولید بیوماس سلولی است. یک محیط کم‌هزینه که بتواند در مقیاس صنعتی استفاده شود. در مورد *C. sake* محیطی بر پایه ملاس نیشکر ایجاد شده است که این ماده به عنوان فرآورده جانبی کارخانجات تولید شکر قابل دسترسی است (Abaias *et al.*, 2000). هدف از این پژوهش، تأثیر حامل‌های آلی و غیرآلی مختلف بر روی زنده‌مانی مخمر در فرمولاسیون و کارایی مخمر در کنترل کپک آبی سیب ناشی از *P. expansum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه مخمر و بیمارگر

جدایه مخمر *P. guilliermondii* Wick جداسازی شده از سطح میوه‌های سیب که قابلیت آنتاگونیستی آن در پردیس ابوریحان بررسی گردیده و شناسایی جدایه مخمر توسط "Identification Service CBS" صورت گرفته بود (Alavifard, 2008) از کلکسیون گروه گیاه پزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت گردید. قابلیت آنتاگونیستی این مخمر در کنترل کپک آبی سیب بررسی شده و به عنوان یک جدایه مؤثر و کارا گزارش گردید (Gholamnejad, 2009; Gholamnejad *et al.*, 2009). 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 فریزر۸۰-

درجه سانتی‌گراد نگهدای شد (Druvforse, 2004).

جدایه بیمارگر *Penicillium expansum* Link. جداسازی شده از میوه سیب که در بخش بیماری شناسی پردیس ابوریحان، بیماری‌زایی آن بر روی میوه سیب به اثبات رسیده بود (Gholamnejad, 2009) از کلکسیون گروه گیاه پزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت گردید.

تهیه زادمایه بیمارگر

اسپورهای بیمارگر از کشت هفت روزه بیمارگر در محیط PDA در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد به وسیله لوپ برداشته شد و در آب مقطر سترون سوسپانسیون گردید. جمعیت بیمارگر با استفاده از لام هماسیتومتری تعیین گردید. جهت انجام آزمایشات، غلظت با $۱۰^{۵}$ اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر مورد استفاده قرار گرفت.

محیط کشت‌های مورد استفاده برای جدایه مخمر

جدایه مخمر بر روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) و Nutrient Yeast Dextrose Broth (NYDB) کشت داده شد. برای تولید بیوماس از یک محیط حاوی ملاس نیشکر (۲۰ گرم در لیتر، pH=۵/۵-۶) و عصاره مخمر (۱/۲ گرم در لیتر) استفاده شد (Usall *et al*., 2000).

تولید بیوماس مخمر

برای تهیه بیوماس مخمر از روش کینای و ییلدیز 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 سوسپانسیونی تهیه شد. یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع NYDB اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق قرار گرفت. سلول‌های مخمر با استفاده از سانتریفیوژ (به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۸۰۰g) از محیط NYDB جدا شدند و برای بر طرف کردن 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 دقیقه ۲۸۰۰g) از محیط ملاس جدا شد و با آب مقطر سترون شستشو گردیدند و پس از رقیق‌سازی، جمعیت آن با استفاده از لام هماسیتومتر به $۱۰^{۹}\times۱$ سلول در میلی‌لیتر رسانده شد (Kinay & Yildiz, 2008).

تهیه فرمولاسیون

سوسپانسیونی حاوی گلیسرول (v/v ۱۰٪)، سدیم آلجینات (w/v ۱/۵٪، Sigma-Aldrich) و سلول مخمر با جمعیت $۱۰^{۹}\times۱$ تهیه شد (Shabana & Sauerborn, 2003). سوسپانسیون حاصل به نسبت یک به چهار (V/W) به طور جداگانه به پودر تالک، کائولین، سبوس برنج و سبوس گندم که در دو روز متوالی اتوکلاو شده بودند، اضافه و به طور کامل مخلوط گردید (Bora *et al*., 2004). مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه در محیط کاملا سترون (زیر هود) خشک شد. فرمولاسیون حاصل در مخلوط کن پودر شد و درون لوله‌های فالکون ۵۰cc در دماهای ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای اندازه گیری رطوبت از روش Christoph *et al.* (2004) استفاده گردید. رطوبت فرمولاسیون‌های پودر تالک و کائولین حدود ۱۲-۱۵ درصد و برای فرمولاسیون‌های سبوس گندم و سبوس برنج حدود ۱۸-۲۰ درصد ارزیابی شد.

بررسی ماندگاری فرمولاسیون‌ها در طی مرحله انبارداری

ماندگاری فرمولاسیون‌های نگهداری شده در شرایط تاریکی در دماهای ۴ درجه سانتی‌گراد (یخچال) و ۲۴درجه سانتی‌گراد (انکوباتور) هر ۳۰ روز یک بار در طی دوره زمانی۱۸۰ روز با استفاده از روش سریال رقت (Serial dilution) محاسبه شد. یک گرم از هر فرمولاسیون مخمر به نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و ورتکس گردید. سپس۱۰ سری رقت تهیه شد و از رقت‌های مورد نظر سوسپانسیون فرمولاسیون‌ها به طور جداگانه روی محیط کشت PDA به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر در هر تشتک پتری با میله شیشه‌ای خم شده، پخش شد و در انکوباتور در در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از ۴۸ ساعت که کلونی‌های مخمر ظاهر شدند، کلونی‌ها با استفاده از دستگاه کلونی شمار 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 ۵ ثانیه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد غوطه ور شدند. سپس با استفاده از یک سوزن سترون روی هر میوه سه زخم به قطر ۲/۵ میلی‌لیتر و عمق ۳ میلی‌متر با فواصل مساوی از دم ایجاد گردید. هر یک از فرموله‌های تهیه شده بعد از شش ماه ماندگاری، بررسی قدرت کنترل‌کنندگی آنها علیه بیماری کپک آبی سیب در شرایط انبار آزمایش شد. یک گرم از هر فرمولاسیون در نه میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد. زخم‌ها با ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر فرمولاسیون تیمار شدند و بعد از ۲۴ ساعت ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بیمارگر (۱۰۵ اسپور در میلی‌لیتر) به داخل هر زخم مایه‌زنی شد. سیب‌های تیمار شده در سینی‌های مقوایی گذاشته و درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند با اسپری کردن 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 فرمولاسیون، مواد 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 شده و قطر لکه‌ها با استفاده از کولیس اندازه گیری و مساحت آنها بر حسب میلی متر مربع 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) به روش proc anova انجام گردید. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای Duncan در سطح ٪۱ مقایسه شد.

نتایج

پایداری سلول‌های مخمر در فرمولاسیون‌های مختلف

نتایج این آزمایش نشان داد که جمعیت سلول زنده *P. guilliermondii* در فرمولاسیون پودر تالک و فرمولاسیون کائولین در طول مدت زمان نگهداری شش ماهه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد دارای یک روند کاهشی بود. جمعیت زنده مخمر در فرمولاسیون‌های مذکور از $۱×۱۰^{۹}$ سلول زنده مخمر به $۷/۶×۱۰^{۷}$ سلول زنده مخمر در گرم فرمولاسیون کائولین و $۵/۲×۱۰^{۸}$ سلول زنده مخمردر گرم فرمولاسیون پودر تالک کاهش یافت (جدول۱). جمعیت سلول زنده مخمر در فرمولاسیون‌های سبوس برنج و سبوس گندم در طول مدت زمان نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا ماه سوم پس از نگهداری، افزایش یافته و بعد از آن تا پایان دوره نگهداری روند کاهشی داشت. جمعیت سلول زنده مخمر در فرمولاسیون‌های مذکور در پایان ۱۸۰ روز از $۱×۱۰^{۹}$ سلول زنده مخمر به $۴/۱×۱۰^{۹}$ سلول زنده مخمر در گرم فرمولاسیون سبوس برنج و $۲/۲×۱۰^{۱۰}$ سلول زنده مخمر در گرم فرمولاسیون سبوس گندم رسید که نسبت به جمعیت اولیه افزایش نشان داده بود (جدول۱). در دمای $۲۴^{\circ}C$ فرمولاسیون سبوس گندم با جمعیت $۹/۱×۱۰^{۸}$ سلول زنده مخمر و فرمولاسیون کائولین با جمعیت $۱/۷۶×۱۰^{۶}$ سلول زنده مخمر درپایان دوره نگهداری به ترتیب دارای بیشترین و کمترین جمعیت سلول زنده مخمر در گرم فرمولاسیون دارا بودند (جدول۲). در دمای $۲۴^{\circ}C$ نیز جمعیت سلول زنده مخمر در فرمولاسیون پودر تالک و فرمولاسیون کائولین دارای روند کاهشی بود و جمعیت سلول زنده مخمر در فرمولاسیون سبوس برنج و سبوس گندم تا ماه سوم نگهداری، افزایش یافته و بعد از آن تا پایان دوره شش ماهه نگهداری تقریباً ثابت و دارای روند کاهشی بود.

مقایسه جمعیت مخمرها در طول ۶ ماه نگهداری (شکل۱) نشان داده شده است. جمعیت مخمر در دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد در ماه‌های اول، دوم و سوم تقریباً یکسان اما جمعیت مخمر در ماه ششم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر بود.

جدول ۱- جمعیت زنده (CFU) مخمر *P. guilliermondii* در گرم فرمولاسیون در طی انبارداری به مدت ۱۸۰ روز در دمای ۴°C

مواد حامل	۱	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
کائولین	۱×۱۰^{۹}	$*۱/۱۷\times۱۰^{۹}b^{**}$	$۹/۳\times۱۰^{۸}c$	$۱/۱۲\times۱۰^{۹}c$	$۵/۲\times۱۰^{۸}b$	$۴/۷\times۱۰^{۸}c$	$۷/۶\times۱۰^{۷}d$
سبوس برنج	۱×۱۰^{۹}	$۱/۵۳\times۱۰^{۹}ba$	$۲\times۱۰^{۱۰}a$	$۱\times۱۰^{۱۰}b$	$۵/۸\times۱۰^{۹}b$	$۵/۸۲\times۱۰^{۹}b$	$۴/۱\times۱۰^{۹}b$
پودر تالک	۱×۱۰^{۹}	$۱/۱۱\times۱۰^{۹}b$	$۱/۰۷\times۱۰^{۹}c$	$۹/۶\times۱۰^{۸}c$	$۷/۶\times۱۰^{۸}b$	$۶/۹\times۱۰^{۸}c$	$۵/۲\times۱۰^{۸}c$
سبوس گندم	۱×۱۰^{۹}	$۱/۸۷\times۱۰^{۹}a$	$۴/۲۲\times۱۰^{۹}b$	$۹/۷۴\times۱۰^{۱۰}a$	$۸/۲\times۱۰^{۱۰}a$	$۳\times۱۰^{۱۰}a$	$۲/۲\times۱۰^{۱۰}a$

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

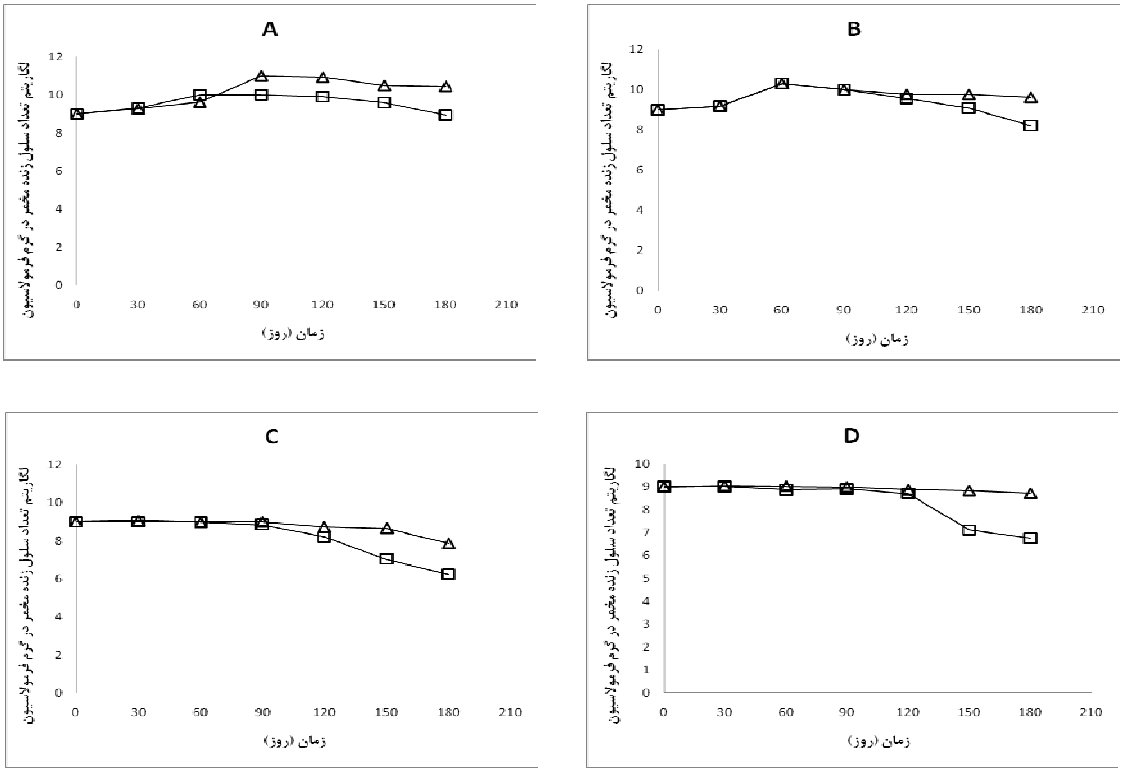
** میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار دارند.

جدول۲- جمعیت زنده (CFU) مخمر *P. guilliermondii* در گرم فرمولاسیون در طی انبارداری به مدت ۱۸۰ روز در دمای ۲۴°C

مواد حامل	۱	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰
کائولین	۱×۱۰^{۹}	$*۹/۹۶\times۱۰^{۸}c^{**}$	$۹/۳\times۱۰^{۸}c$	$۶/۷\times۱۰^{۸}b$	$۱/۶\times۱۰^{۸}d$	$۱۰/۶\times۱۰^{۷}c$	$۱/۷۶\times۱۰^{۶}d$
سبوس برنج	۱×۱۰^{۹}	$۱/۴۶\times۱۰^{۹}b$	$۲/۴\times۱۰^{۱۰}a$	$۹/۹\times۱۰^{۱۰}a$	$۳/۶۲\times۱۰^{۹}b$	$۱/۲۴\times۱۰^{۹}b$	$۶/۱\times۱۰^{۸}b$
پودر تالک	۱×۱۰^{۹}	$۹/۸\times۱۰^{۸}C$	$۷/۳۶\times۱۰^{۸}c$	$۷/۷\times۱۰^{۸}b$	$۵\times۱۰^{۸}c$	$۱/۳\times۱۰^{۷}c$	$۵/۶\times۱۰^{۶}c$
سبوس گندم	۱×۱۰^{۹}	$۲/۱\times۱۰^{۹}a$	$۱/۱\times۱۰^{۱۰}b$	$۱\times۱۰^{۱۰}a$	$۸/۱۳\times۱۰^{۹}a$	$۳/۹\times۱۰^{۹}a$	$۹/۱\times۱۰^{۸}a$

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

** میانگین هایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار دارند.



شکل۱- لگاریتم جمعیت زنده مخمر *P. guilliermondii* در هر گرم فرمولاسیون‌های مختلف در دو دمای ۴ (Δ) و ۲۴(□) درجه سانتی‌گراد. A) فرمولاسیون سبوس گندم. B) فرمولاسیون سبوس برنج. C) فرمولاسیون کائولین. D) فرمولاسیون پودر تالک.

مقایسه جمعیت زنده مخمر در فرمولاسیون نگهداری شده در دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد طی دوره انبارداری به مدت ۶ ماه نشان داده شده است (شکل۱). به طور کلی طی ماه‌های اول، دوم و سوم از دوره انبارداری، جمعیت زنده مخمر در هر دو دمای ۴ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد تقریباً یکسان بوده اما در پایان دوره انبارداری (۱۸۰ روز)، جمعیت زنده مخمر در فرمولاسیون نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بیشتر از همتای نگهداری شده در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد بود.

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

بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعات انباری، بین تیمارهای مایه‌زنی شده با فرمولاسیون‌های مخمر همراه با بیمارگر و سلول‌های تازه مخمر همراه با بیمارگر با تیمار شاهد آلوده (مایه‌زنی شده با بیمارگر) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین بین تیمارهای مایه‌زنی شده با فرمولاسیون‌های مخمر و سلول‌های تازه مخمر از نظر اثر کنترل کنندگی و کاهش مساحت لکه اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوری که مساحت لکه در تیمارهایی که از سلول‌های تازه مخمر استفاده گردید به طور معنی‌داری از مساحت لکه در تیمارهایی که از فرمولاسیون‌ها استفاده گردید کمتر بود. بین فرمولاسیون پودر تالک، فرمولاسیون سبوس برنج و فرمولاسیون سبوس گندم از نظر کاهش مساحت لکه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. فرمولاسیون‌های مذکور با فرمولاسیون کائولین در کاهش مساحت لکه اختلافی وجود نداشت. نتایج نشان داد بین تیمارهای مایه‌زنی شده با پاتوژن به همراه مواد حامل فرمولاسیون و تیمار مایه‌زنی شده با بیمارگر (شاهد آلوده) از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. بین تیمارهای مایه‌زنی با مواد حامل فرمولاسیون و مایه‌زنی با جدایه مخمر با تیمار مایه‌زنی شده با آب مقطر (شاهد) تفاوتی معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر فرمولاسیون‌های مخمر مربوط به مساحت لکه های ایجاد شده روی سیب مایه‌زنی شده با *P.expansum* در روز چهل و پنجم نگهداری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد

تیمار	مساحت لکه (mm^2)	تیمار	مساحت لکه (mm^2)
بیمارگر+ فرمولاسیون پودر تالک	۱۱۵۲/۸۸ c** *	بیمارگر + سبوس گندم	۳۱۸۵/۷۲ a
بیمارگر+ فرمولاسیون کائولین	۱۵۱۵/۷۵ b	برنج بیمارگر+ سبوس	۳۱۳۸/۷۲ a
بیمارگر + فرمولاسیون سبوس برنج	۱۱۷/۲۵dc	سبوس برنج	۰/۰۰ e
بیمارگر+ فرمولاسیون سبوس گندم	۱۲۰۲/۵۰ c	سبوس گندم	۰/۰۰ e
بیمارگر+ پودر تالک	۳۱۵۶/۲۵ a	کائولین	۰/۰۰ e
آنتاگونیست (مخمر) + پاتوژن	۸۶۴/ ۵۰ d	پودر تالک	۰/۰۰ e
بیمارگر+کائولین	۳۲۶۳ a	آنتاگونیست (مخمر)	۰/۰۰ e
شاهد آلوده (بیمارگر)	۳۲۵۵/۷۸ a	شاهد غیر آلوده (سالم)	۰/۰۰ e

* اعداد جدول میانگین چهار تکرار می باشند.

** تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در آزمون دانکن در سطح ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار می باشند.

بحث

فرمولاسیون عوامل بیوکنترل یکی از جنبه‌های بسیار مهم مطالعات کنترل بیولوژیک می‌باشد. موفقیت در زمینه استفاده از عوامل بیوکنترلی در شرایط تجاری اعم از حفظ قدرت حیات، ماندگاری و کارایی به طور کامل به فرمولاسیون بستگی دارد. در یک فرمولاسیون مواد حامل اولین جزء مؤثر در پخش شدن محصولات بیولوژیک در محیط هدف هستند. اگرچه فرمولاسیون مایع از نظر سهولت کاربرد 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 پائین می‌باشد (Melin *et al.*, 2007). در این تحقیق یک روش ارزان و مؤثر برای فرمولاسیون *P. guillermondii* با استفاده از مواد حامل آلی (سبوس گندم و سبوس برنج) و غیرآلی (پودر تالک و کائولین) مورد بررسی قرار گرفت. 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). ماندگاری مخمرهای‌های آنتاگونیست در فرمولاسیون‌های خشک گزارش شده است (Kinay & Yildiz, 2008). پودر وتابل برای نگهداری و کاربرد بسیار مناسب است (Bateman *et al.*, 1993). نتایج تحقیق حاضر نشان داد سلول‌های مخمر توانایی پایداری در مواد حامل مختلف به مدت بیش از شش ماه را دارند. همچنین توانایی مواد حامل مختلف در حفظ پایداری سلول‌های مخمر در طول مدت نگهداری شش ماهه در دمای چهار و ۲۴ درجه سانتی‌گراد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد. در

این بررسی، فرمولاسیون حاوی سبوس گندم ماندگاری بالایی حتی در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد داشت. سبوس گندم بهترین ماده حامل از نظر جمعیت زنده مخمر بعد از طی دوره شش ماهه بود. جمعیت سلول زنده مخمر در فرمولاسیون حاوی پودر تالک و کائولین به عنوان ماده حامل تقریباً ثابت و به مرور کاهش یافت. پس از طی دوره شش ماهه فرمولاسیون پودر تالک در مقایسه با فرمولاسیون کائولین دارای تعداد سلول زنده بالاتری بود که با نتایج Kinay & Yildiz (2008) در بررسی پایداری سلول‌های مخمر در پودر تالک و کائولین مطابقت دارد. همچنین بر اساس مطالعات صورت گرفته، پودر تالک حامل بسیار مناسبی برای فرمولاسیون باکتری‌ها است (Kinay & Yildiz, 2008). جمعیت زنده سلول مخمر در فرمولاسیون سبوس گندم و فرمولاسیون سبوس برنج بعد از ماه دوم نگهداری به میزان ۱۰۰ برابر افزایش یافت و در پایان ماه ششم جمعیت سلول زنده فرمولاسیون‌ها نسبت به جمعیت اولیه فرمولاسیون بالاتر بود. مشاهدات حاکی از تکثیر سلول‌های جدایه مخمر *P. guilliermondii* در فرمولاسیون‌های سبوس گندم و سبوس برنج در طول دوره انبارداری می‌باشد. قابلیت پایداری میکروارگانیسم‌ها بستگی به مواد غذایی و آب در دسترس، جدایه و گونه قارچی دارد. از آنجایی که سبوس گندم وسبوس برنج به عنوان منابع غنی از مواد غذایی شناخته شده‌اند، به نظر می‌رسد سلول‌های مخمر در تماس با این مواد و با استفاده از مواد غذایی موجود تکثیر می‌یابند. چنین استنباط می‌شود تخلخل زیاد بین ذرات سبوس گندم و سبوس برنج یکی از عوامل محرک تکثیر سلول‌های مخمر می‌باشد. سلول‌های مخمر در تماس با آب محصور شده در خلل و فرج درشت ذرات سبوس، آب مورد نیاز برای رشد و تکثیر را جذب نموده و باعث بالا رفتن جمعیت در فرمولاسیون‌های حاوی سبوس گندم و سبوس برنج می‌شود. در مطالعه‌ای که بر روی پایداری *Bacillus subtilis* AH18 در بستره‌های مختلف صورت گرفت، افزایش جمعیت در فرمولاسیون حاوی پرلیت در مقایسه با فرمولاسیون‌های حاوی کائولین و زئولیت را به بالا بودن تخلخل ذرات پرلیت در فرمولاسیون حاوی پرلیت نسبت دادند (Chung *et al.*, 2007). از شرایط محیطی لازم برای رشد میکروارگانیسم‌ها وجود رطوبت می‌باشد. چنانچه رطوبت را از محیط حذف کنند میکروارگانیسم رشد خود را از دست داده و حتی برخی از آنها از بین می‌روند. لذا وجود مواد غذایی (منابع کربن و ازت مناسب) در سبوس گندم و سبوس برنج و رطوبت لازم موجود در این سبوس‌ها باعث می‌شود که میکروارگانیسم‌ها از این منابع تغذیه کرده و رشد نمایند لذا تعداد کل میکروارگانیسم‌های موجود در فرمولاسیون به مرور افزایش پیدا کرده و در نهایت تعداد بیشتری از مخمر نسبت به فرمولاسیون‌های پودر تالک و کائولین مشاهده می‌شود. اما بهترین حالت فرمولاسیون، شرایطی است که با حفظ حالت کمون در فرمولاسیون باعث پایداری طولانی مدت فرمولاسیون می‌شود. بر اساس نتایج این آزمایش پیشنهاد می‌شود، پودر تالک و کائولین مواد حامل بسیار مؤثری در حفظ حالت کمون سلول‌های مخمر در طول شش ماه نگهداری هستند در حالی که سبوس برنج و سبوس گندم باعث تحریک رشد و تکثیر سلول‌های مخمر در طول دوره نگهداری می‌شوند. صرف‌نظر از فرمولاسیون‌های ما ،پیشنهاد می‌شود تکثیر و پایداری سلول‌های مخمر در بستره‌ها تابع مواد حامل و مواد افزودنی است.

در این بررسی برای افزایش پایداری فرمولاسیون‌ها از سدیم آلجینات و گلیسرول به عنوان ماده افزوده استفاده شد. چون مواد افزوده جزء بسیار مهم فرمولاسیون‌ها هستند که بر روی زنده‌مانی و دیگر خصوصیات نظیر حلالیت در آب و پراکندگی محصول بیوکنترلی بر روی سطح هدف تأثیر می‌گذارند. سدیم آلجینات به عنوان ماده افزوده به آسانی در آب حل می‌شود و به مدت زیادی در آب به صورت معلق (سوسپانسیون) باقی می‌ماند. سدیم آلجینات عامل پایداری، چسبندگی و دوام فرمولاسیون می‌باشد و گلیسرول در حفاظت و نگهداری از سلول‌های مخمر نقش دارد (Kinay & Yildiz, 2008).

Shabana & Sauerborn (2003) گزارش کردند که عصاره مخمرهمراه با سوکروز و گلیسرول یا عصاره مخمر همراه با سوکروز در ترکیب با سدیم آلجینات به عنوان بهترین مواد افزوده برای ساخت فرمولاسیون ماتریکس گلوتن گندم *Fusarium oxysporum* f.sp. *orthoceras*

(علف‌کش قارچی با عنوان Pesta) شناخته شده‌اند. سدیم آلجینات، کربوکسی متیل سلولز و کیتوزان به عنوان ماده افزوده برای اضافه کردن به سوسپانسیون مخمر به منظور افزایش کنترل‌کنندگی فرمولاسیون‌های بیولوژیکی پس از برداشت سیب، معرفی شده‌اند (Sparado & Gullino, 2004). همچنین، سدیم‌آلجینات موجب افرایش پایداری و بیماری‌زایی فرمولاسیون خشک *F. oxysporum* f. sp. *orthoceras* بعد از شش ماه گردید (Melin *et al.*, 2007).

فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در مقایسه با فرمولاسیون‌های نگهداری شده در ۲۴ درجه سانتی‌گراد از نظر حفظ زنده‌مانی ماندگارتر بود. این نتیجه با نتایج به دست آمده در رابطه با *Candida sake* CPA-1 نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مطابقت دارد (Abaias *et al.*, 2003). همچنین طبق بررسی صورت گرفته بر روی *Metschinkovia pulcherrima* فرمولاسیون‌های نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با فرمولاسیون‌های نگهداری شد در ۲۴درجه سانتی‌گراد پایدارتر می‌باشند (Jijak *et al.*, 1999). ماندگاری طولانی‌تر در دمای پائین‌تر را می‌توان به فعالیت متابولیکی پائین‌تر پروپاگول‌های قارچ‌ها در دمای پائین نسبت داد (Druvefors, 2004).

Usall *et al.* (2000) گزارش‌کردند هنگامی‌که غلظت سلول‌های مخمر *Candida 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. Gholamnejad (2009) گزارش نمود که فعالیت آنتاگونیستی مخمرهای *P. guilliermondii*، *Candida membranifaciens* و *Rhodotorula mucilaginosa* بر علیه کپک آبی سیب به غلظت آنها وابسته بوده و وقتی غلظت‌های $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر استفاده شد در غلظت‌های $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر نسبت به غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر از نظر سطح کنترل‌کنندگی در سطح پایین‌تری بودند در حالی که در غلظت $۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری با غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر نداشت و از نظر کنترل‌کنندگی با آن در یک سطح قرار داشت.

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که کاربرد سوسپانسیون فرمولاسیون جدایه *P.gillermondii* با استفاده از مواد حامل مختلف در کاهش بیماری کپک آبی سیب مؤثر است. هر چند کارایی فرمولاسیون‌ها در کاهش مساحت لکه ایجاد شده توسط بیمارگر در مقایسه با سلول‌های تازه مخمر در سطح پایین‌تری قرار داشت ولی نتایج به دست آمده برای کنترل بیماری رضایت بخش می‌باشد. بر طبق نتایج به دست آمده مواد حامل استفاده شده در این فرمولاسیون‌ها به تنهایی قادر به کاهش مساحت لکه ایجاد شده توسط بیمارگر نمی‌باشند همچنین تیمار سیب‌ها با این مواد نشان داد که این مواد تأثیر منفی بر روی میوه‌های سیب ندارد. کاربرد سلول‌های مخمر به تنهایی بر روی سیب نیز هیچ گونه اثر منفی روی میوه‌های سیب نداشت.

اگرچه کنترل بیولوژیک یکی از روش‌های امیدوارکننده کنترل تلفیقی به منظور جلوگیری از پوسیدگی‌های پنیسیلیومی بعد از برداشت سیب است، اما مشخص شده است که برخی از عوامل بیوکنترل فقط زمانی مؤثر هستند که به صورت سلول‌های تازه مورد استفاده قرار می گیرند و در محصول فرموله شده دارای کارایی رضایت بخشی نیستند (Brown & Chambers, 1996). نتایج این تحقیق نشان داد که ایجاد یک فرمولاسیون کارا و مؤثر مقدور می‌باشد.

با توجه به اینکه دمای پائین برای نگهداری طولانی مدت محصولات بیولوژیک ضروری می‌باشد که این مسئله موجب تحمیل هزینه‌های سنگین می‌شود، لازم است کارایی محصولات بیولوژیک به جای بررسی در دامنه دمایی محدود و کنترل شده در دامنه دمایی وسیع‌تری مورد بررسی قرار گیرد (Arual, 1994; Spotts & Sandesson, 1994).

هدف از تحقیق در زمینه فرمولاسیون، دستیابی به فرمولاسیونی است که از نظر حفظ قدرت حیات و افزایش کارایی عوامل آنتاگونیست در انبار بسیار مؤثر بوده و دوره نگهداری آن تا بیش از دو سال هم رضایت بخش باشد تا در نهایت به صورت انبوه و تجاری تولید شده و در اختیار کشاورزان قرار گیرد. در پایان پیشنهاد می‌شود جهت بهبود این فرمولاسیون‌ها، جنبه‌های دیگر

فرمولاسیون از جمله دماهای مختلف خشک کردن فرمولاسیون، میزان فعالیت آبی فرمولاسیون (a_w) و کشت مخمر در محیطی با فعالیت آبی پائین برای افزایش ماندگاری مخمر در طی مراحل فرمولاسیون (Mokiou & Magan, 2002) مورد بررسی و آزمایش قرار گیرد. به کار بردن یک محیط کشت صنعتی ارزان قیمت با کارایی بالا از ضروریات تحقیق در این زمینه می‌باشد تا اینکه بتوان یک محصول مناسب و مفید در اختیار کشاورزان قرار گیرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات آزمایشگاهی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران و همکاری صمیمانه کارشناس محترم سرکار خانم مهندس مهرنوش محمدی فر و خانم مهندس فاطمه سرافراز نیکو انجام شده که بدین وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را ابراز می‌دارند. همچنین از خانم مهندس شینا زمان که در تجزیه آماری این تحقیق ما را یاری کرده‌اند صمیمانه قدرانی و تشکر می‌شود.

REFERENCES

1. Abadias, M., Usall, J., Teixido, N. & Vinas, I. (2003). Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*, 93, 436- 442.
2. Abadias, M., Teixido, N., Usall, J., Benabarre, A. & Vinas, I. (2001). Viability, efficacy and stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*, 64, 856-861.
3. Abadias, M., Teixido, N., Usall, J., Vinas, I. & Magan, N. (2000). Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast candida ske. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 1009-1017.
4. Alavifard, F. (2008). Studies on biological control of grey mold in apple by yeasts and their mechanisms of antagonism. M.Sc. dissertation, University of Tehran. 51pp. (In Farsi).
5. Arual, J. (1994). Emerging technologies for the control of post-harvest diseases of fresh fruits and vegetables. In: C.L. Wilson and M.E. Wisniewski, Editors, *Biological Control of Postharvest Diseases–Theory and Practice*, CRC Press, Florida, pp. 1–7.
6. Bateman, R., Carey, M., Morre, D. & Prior, C. (1993). The enhanced infectivity of *Metarhizum flavoviridae* in oil formulations to desert locust at low humidities. *Annals Applied Biology*, 122, 145-152.
7. Bora, T., Ozakhtan, H., Gore, E. & Aslan, E. (2004). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology*, 152, 471-475.
8. Brown, G. E. & Chambers, M. (1996). Evaluation of biological products for the control of postharvest diseases of Florida citrus. In: Proceedings of *the Florida State Horticultural Society*, 109, 278-282.
9. Caffarelli, V., Rapagnani, M. R., Letardi, A., Triolo, L., Santaroni, P. & Lacia, B. (1999). Pesticide residues in horticultural product and carcinogenic risk for consumers. In: Del Re AAM, Brown CD, Capri E, Errera G,Evans SP, Trevisan M (eds) Human enviromental exposure to xenobiotics. La Goliardica Pavese, pavia, pp 665-669.
10. Christoph, R., Shrinivasa, N. & Stephane, B. (2004). Determination of water content in powdered milk. *Food chemistry*, 86, 457-464.
11. Chung, S., Mi-Lim, H. & Kim, S. D. (2007). Formulation of stable *Bacillus subtilis* AH18 against teperature fluctuation with highly heat-resistant endospores and micropore inorganic carriers. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 217-224.
12. Connick, W. R. (1988). Formulation of living biological control agents with alginate. *ACS-Symposium*, 371, 241-250.
13. Droby, S. & Chalutz, E. (1994). Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In:Wilson, C.L. Wisniewski, M.E., (Eds), *Biological control of postharvest diseases:Theory and Practic*. CRC Press, Boca Raton, pp.63-75.
14. Druvefors, U. A. (2004). Yeast biocontrol of grain spoliage moulds–mode of action of *Pichia anomala*. Doctor's dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, 44 pp.
15. Eckert, J. W. & Ogawa, J. M. (1988). The chemical control of post- harvest diseases: Deciduous fruits, berries, vegetables and root /tuber crops. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 433–469.
16. Elzein, A., Kroschel, J. & Muller-Stover, D. (2004). Optimization of Storage Conditions for Adequate Shelf-Life of Pesta Formulation of *Fusarium oxysporum* "Foxy 2", a Potential Mycoherbicide Striga:

Effect of Temperature, Granules Size and Water Activity , *Biocontrol Science & Technology*, 14, 545-559.

17. Gholamnejad, J. (2009). Studies on biological control of blue mold in apple by some yeast isolates and their mechanisms of antagonism. M.Sc. dissertation, University of Tehran. P 152. (In Farsi).
18. Gholamnejad, J., Etebarian, H. R., Sahebani, N. & Roustaee, A. (2009). Characterization of biocontrol activity of two strain from Iran against blue mold apple in order to reduce the environmental pollution. *Journal of International Environmental Application & Science*, 4, 28-36.
19. Janisiewics, W. J. & Jeffers, S. N. (1997). Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apples in cold storage. *Crop Protectection*, 16, 629–633.
20. Jijak, M. H., Lepoivre, P. & Grevesse, C. (1999). Yeast species for biocontrol of apple post-harvest diseases; An encouraging case of study for practical use. In: Upadhyay RK, Mukerji (eds). *Biotechnological approaches in biocontrol of plant pathogens*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp 31-49.
21. Kinay, P. & Yildiz, M. (2008). The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschinkowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control*, 45, 433-440.
22. Klopper, J. W. & Schroth, M. N. (1981). Development of powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*, 71, 590–592.
23. Lima, G., Ippolito, A., Nigro, F. & Salerno, M. (1997). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against post-harvest stawbery rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 169-178.
24. Melin, P., Hakansson, S. & Schnurer, S. (2007). Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the bicontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 1008-116.
25. Melin, P., Hakansson, S., Eberhad, T. H. & Schnurer, S. (2006). Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations and different temperatures, assessed by flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 264-271.
26. Mokiou, S. & Magan, N. (2002). Ecophysiological manipulation of the fermentation process improves viability of the biocontrol yeast *Pichia anomala*. *Biocontrol of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*. IOBC WPRS Bulletin, 25 (10), 395-398.
27. Muller-Stover, D., Thomas, H., Saureborn, J. & Kroschel, J. (2004). Two granular formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Orthoceras* to mitigate sunflower broomrape *Orbanche Cumana Biocontrol*, 49, 595-602.
28. Paulitz, T. C. & Belanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 103-133.
29. Shabana, Y. M. & Sauerborn, J. (2003). Granular pesta formulation of *Fusarium oxysporium* f. sp. *Orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biological Control*, 26(2), 189-201.
30. Sparado, D. & Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biologocal control of postharvest fruit diseases. Inter. *Journal of Food Microbiology*, 91 (2), 185-194.
31. Spotts, R. A. & Sandesson, P. G. (1994). The post-harvest environment and biological control. In: C.L. Wilson and M.E. Wisniewski, Editors, *Biological Control of Postharvest Diseases-Theory and Practice*, CRC Press, London, pp. 43–56.
32. Usall, J., Texido, M., Fons, E. & Vinas, I. (2000). Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Food Microbiology*, 58, 83-92.
33. Vero, S., Mondino, P., Burgaeno, J., Soubes, M. & Wisniewski, M. E. (2002). Chracterizatioin of biological activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 91-98.
34. Wilson, C. L. & Wisniewski, M. E. (1994). *Biolgical control of postharvest diseases – Theory and Practic*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 182pp.