کاهش فعالیت میکروبی خرمای مضافتی با بکارگیری پوشش‌های خوراکی و روغن‌های گیاهی

فرشته سلاجقه[1]، بهجت تاج‌الدین[2]، مهدخت ارجمند کرمانی[1]*

۱. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،کرمان، ایران.
۲. موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

***نویسنده مسئول:** *mahdokht_arjomand@yahoo.com*

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۶

چکیده

حفظ کیفیت مطلوب خرما، پاکسازی آن از آلودگی‌ها و بسته‌بندی مناسب برای افزایش عمر نگهداری، از اولویت‌ها و سیاست-های کشور است. از آنجایی‌که استفاده از پوشش‌های خوراکی همراه با روغن‌های گیاهی یکی از روش‌های جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها است، در این مطالعه، تاثیر پوشش‌دهی با پلیمرهای طبیعی زئین و کیتوزان همراه با اسانس روغنی گیاه بادیان رومی، بر رفتار میکروبی خرمای مضافتی طی یک سال نگهداری در دو دمای ۴ و ۱۸ درجه سلسیوس و سال دوم در دمای ۱۰ درجه سلسیوس بررسی شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شده و مقایسه میانگین نمونه‌ها به روش دانکن انجام گرفت. نتایج نشان داد نمونه رطب مضافتی منطقه بم با ۳۲ درصد رطوبت، دارای بار میکروبی بالایی بود. قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاوس، رایزوپوس استولونیفر* و *آلترناریا آلترناتا* روی آن رشد کردند. این قارچ‌ها به‌ویژه *آسپرژیلوس نایجر* در پوسیدگی و باکتری‌های *اسیدلاکتیک* در ترشیدگی خرمای مضافتی نقش داشتند. با اجرای این پژوهش، تعداد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* با استفاده از پوشش‌های خوراکی زئین و کیتوزان همراه با روغن بادیان، سه سیکل لگاریتمی کاهش یافت و قارچ‌های *پنی‌سیلیوم* به‌طور کامل از بین رفت. به طور کلی، کمترین تعداد رشد میکروبی به ترتیب در سال اول و دوم در تیمار زئین ۳۶۲/۵log cfu/g و ۱۵۰ و بیشترین تعداد در نمونه شاهد ۱۰۷۵۰log cfu/g و ۱۰۲۵ مشاهده شد. ضمنا استفاده از روغن بادیان در کاهش شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها تاثیر داشت. در نهایت، با توجه به نتایج میکروبی، استفاده از تیمار زئین توصیه می‌شود.

کلید واژه ها : بادیان رومی، پلیمر طبیعی، پوشش‌دهی، خرمای مضافتی، رشد میکروبی.

مقدمه

ایران یکی از بزرگترین کشورهای تولیدکننده خرما بوده و حدود ۱۴ درصد از تولید خرمای جهان را به خود اختصاص داده است. سطح زیر کشت خرما در استان کرمان ۲۷۷۲۷ هکتار بوده و میزان تولید آن ۱۵۵۵۲۷۴ تن است. میزان تولید خرما در کشور، سالانه حدود ۲/۱ میلیون تن برآورد می‌شود (Ahmadi et al., 2020). خرما از نظر ارزش غذایی، با تولید حدود ۳۰۰۰ کیلوکالری از هر کیلوگرم آن و نیز وجود مقادیر مناسبی ویتامین‌های A، B_1، B_2، نیاسین و املاح مختلف مانند پتاسیم، کلسیم و آهن محصول ارزشمندی است. البته مقادیر متوسطی از کلر، مس، منیزیوم و گوگرد نیز در خرما وجود دارد (Khodabakhshian ; Jalili 2005 Kargar and Emadi 2014). بنابراین در قسمت مهمی از مناطق جنوبی کشور به‌عنوان غذای عمده و انرژی‌زا محسوب شده و در درآمد مردم این مناطق نقش بسزایی دارد. خرمای مضافتی، یکی از خوش‌طعم‌ترین و دلچسب‌ترین انواع خرمای جهان است و به‌صورت رطب نیز استفاده می‌شود. موطن اصلی خرمای مضافتی، بم کرمان است اما در نقاط مختلف کشور، کشت می‌شود. این رقم، از گروه خرماهای نرم (مرطوب) و نیمه‌خشک با

رنگ قرمز تیره متمایل به سیاه است. بسته به زمان برداشت و مراحل کاشت آن دارای رطوبتی بین ۱۵ تا ۳۵ درصد است. به سبب همین رطوبت بالا است که محیط مناسبی برای رشد و فعالیت عوامل قارچی و دیگر میکروارگانیسم‌ها بوده و در اغلب موارد در بازارهای مصرف داخلی و خارجی دچار فساد می‌شود. مقدار ضایعات آن در مراحل انبارداری نیز به‌دلیل رطوبت بالا، زیاد است و در بسیاری از موارد، زیان کیفی وارد شده به محصول نیز آن‌چنان سنگین است که گاهی تمامی محصول را غیر قابل مصرف می‌کند (Golshan Tafti, Abufazl et al., 2017).

در بسیاری از نقاط جنوبی کشور، معمولا باغداران به مسائل برداشت، بسته‌بندی و نگهداری محصول خرما آشنا نبوده و روش‌های شستشو و بسته‌بندی خرما به صورتی که قابلیت پذیرش آن را تا حد قابل قبولی افزایش دهد دقیق و اصولی اشاعه نیافته است. اغلب نخل‌کاران و حتی کارگاه‌های بسته‌بندی، محصول خرما را به ساده‌ترین روش ممکن، بسته‌بندی می‌کنند که امکان صادرات و مدت نگهداری آن را کاهش می‌دهد و در نهایت روی صادرات آن تاثیر منفی دارد. عوامل زیادی از جمله نوع خرما، بار میکربی اولیه آن، طریقه نگهداری خرما قبل از ورود به کارگاه، روش حمل و نقل و عملیات فیزیکی که طی بسته‌بندی در کارگاه روی خرما انجام می‌شود، شستشو و خشک کردن، در این عمل موثر هستند. در زمینه میکروبیولوژی خرما، اطلاعات کمی در دسترس است. به‌هرحال، بنا به گزارش احمد و همکاران (۱۹۹۷) و موس و آدام (۲۰۰۰)، فساد در میوه خرما با رشد و فعالیت مخمرها و باکتری‌های *اسیدلاکتیک* همراه است. فعالیت این میکروارگانیسم‌ها، سبب ترشیدگی و بد طعمی خرما می‌شود. گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس* نیز در ارقام مختلف خرما و در مراحل رسیدگی میوه توسط احمد و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شده است. قارچ‌های مولد آفلاتوکسین، قادرند تا روی خرماهای آسیب‌دیده در مزرعه و در طول برداشت رشد و فعالیت کنند. بنابراین، چنین میوه‌هایی برای مصرف انسان مناسب نیستند. در بررسی ۱۶ رقم خرما در امارات متحده عربی در مراحل کیمری، رطب و تمر، قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس* جداسازی شدند. بیشترین تعداد قارچ‌ها در مرحله رطب، و کمترین شمارش در مرحله تمر بود. شناسی و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند که شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در مرحله رطب بالاست و باکتری‌های اسیدلاکتیک در این مرحله در ارقامی که قارچ‌های گروه *آسپرژیلوس* وجود داشتند، جداسازی شدند. قارچ‌های گونه‌های *آسپرژیلوس، رایزوپوس ، فوزاریوم و پنی‌سیلیوم* در پوسیدگی رطب مضافتی قبل از برداشت نقش دارند. در مرحله پس از برداشت محصول، و در طول مدت انبارداری نیز قارچ‌های مختلفی باعث پوسیدگی میوه خرما می‌شوند. بنا به گزارش برخی از محققین، فساد در خرما بوسیله گونه‌هایی از قارچ‌ها و مخمرها نظیر *Penicillum Parasirc*us, *Rhizopus Stolnifer, Aspergillus flavus Aspergillus niger, Alternaria alternate* و *Saccharomyces Spp.* اتفاق می‌افتد. طی مدت نگه داری، به دلیل خروج شیره (شربت) و از دست دادن رطوبت درسطح کشمش و خرما شکرک ایجاد می‌شود و به علت از دست دادن رطوبت بافت آن‌ها سفت می‌شود.

در سال‌های اخیر، استفاده از مواد ضد باکتریایی، پوشش-ها و فیلم‌های خوراکی این امکان را به تولیدکنندگان داده است تا غذاهای سالم‌تر و با مقبولیت بالاتر تولید کنند (Davidson and Zivanovic, 2003). پوشش‌دهی مواد غذایی با استفاده از پوشش‌دهنده‌های مختلف خوراکی، مانند سدی در برابر تبادل گازها، رطوبت و میکروارگانیسم‌ها عمل کرده و ماندگاری مواد غذایی را در فاصله تولید تا رسیدن به دست مصرف‌کننده حفظ می‌کند (Joerger, 2007). ایلدیکو (۲۰۰۶) با بررسی آلودگی‌های قارچی در خرمای نرم و سفت در عربستان سعودی، وجود قارچ‌های (*Aspergillus, Fusarium, Rhizopus, Penicillum*) را در این ارقام گزارش کردند. سلاجقه (۲۰۱۷) انواع آلودگی‌های میکروبی ارقام خرما مضافتی ، کلوته و زاهدی را در طول مراحل رسیدگی میوه (خارک، رطب و تمر) بررسی

کردنـد، آن‌هـا قـارچ‌هـای (*Alternaria, Pythium, Aspergillus*) و مخمرهـــــــای (*Candida, Zygosaccharomyces, Saccharomyces, Mycoderma*) را از ارقام مختلف خرمای مورد آزمـایش جدا کردند. بنا به گـزارش احمـد و همکـاران (۱۹۹۷)، و ادامز و همکاران (۲۰۰۰) و انصاری فر (۲۰۲۱)، فسـاد در میوه خرمـا بـا رشـد و فعالیـت مخمرهـا و بـاکتری‌هـای اسیدلاکتیک همراه است. فعالیت این میکروارگانیسم‌هـا، سبب ترشیدگی و بد طعمی خرما می‌شود. گونه‌های قارچ آسـپرژیلوس نیـز در ارقـام مختلـف خرمـا و در مراحـل رسـیدگی میـوه توسـط (ahmed et al., 1997؛ salajegheh et al., 2013) گزارش شده است. قارچ‌های مولد آفلاتوکسین، قادرندروی خرماهای آسـیب دیـده در مزرعه و در طول برداشت رشد و فعالیت کننـد. بنـابراین، چنین میوه‌هایی برای مصرف انسان مناسب نیستند.

براساس پژوهش‌های انجام شده توسـط Xie و همکـاران (۲۰۰۲) و واحـدکیا و همکـاران (۲۰۱۹) بـا اسـتفاده از پوشش‌های خوراکی زئین و کیتوزان، می‌توان تبادل گازها (عمدتاً دی‌اکسیدکربن) و رطوبت از طریق سـطح خرمـا را به حداقل ممکن رساند. پلـی‌سـاکارید کیتـوزان، پلیمـری زیست‌تخریب‌پذیر، سازگار با طبیعت و غیر سمی است کـه ویژگـــی‌هـــای عملکـــردی خـــوبی ماننـــد خصوصـــیات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان و تشکیل پوشـش و فـیلم دارد (No et al., 2007) . زئین نیز پلیمری طبیعی با خاصیت تشـــکیل فـــیلم و پوشـــش اســـت (Ildiko, 2006؛ Ghanbarzadeh et al., 2007).

گیاه بادیان رومی (*Pimpinella anisum*)، در اصل تخم رازیانه رومی است. گیاه چند ساله رازیانه (*Foeniculum vulgare*) از مهم‌ترین و پرمصـرف‌تـرین گیاهـان دارویـی تیره چتریـان اسـت کـه حـاوی ترکیبـات دارای خاصـیت میکروب‌کشـی بـوده و بـه همـین دلیـل از اسـانس آن در صنایع مختلف دارویی، غذائی و بهداشتی استفاده می‌شـود (Gross et al., 2002). در حـال حاضـر، بـرای حفـظ کیفیت محصول خرمـای مضـافتی، از روش ضـدعفونی بـا گاز متیل بروماید استفاده می‌شود. کاربرد این روش به‌علت سمیت و خطرهـای زیسـت محیطـی، مشـکل‌زا اسـت. در نتیجه استفاده از روش مناسب دیگری ضروری اسـت. بـه‌نظر می‌رسد اسـتفاده از پوشـش‌هـای خـوراکی همـراه بـا روغن‌های گیاهی از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری می‌کند زیرا اثر پوشانندگی کاملی داشـته و بـا تشـکیل دادن لایه محافظتی روی خرما، باعث می‌شود تا محصول شـکل ظاهری مناسب و براقی داشته باشد. علاوه بر ایـن، بـا ایـن عمل، پوسیدگی و ترشیدگی میوه در اثر شستشـوی میـوه وجود نخواهد داشت. از این‌رو، در این پژوهش، اثر پوشش‌های خوراکی مختلف زئین و کیتوزان و اسـتفاده از روغـن گیاهی بادیان رومی روی خرمـای مضـافتی تحـت شـرایط مختلف انبارداری (سردخانه و یخچال) به‌مدت ۱۲ مـاه در دو سال متوالی بررسی شد. سپس، بـا انجـام آزمـون‌هـای میکروبی و تعیین درصد آلودگی خرمـا بـه آفـت در طـول انبـارداری، شـرایط مطلـوب و مناسـب بـرای کـاهش بـار میکروبی خرما و حفظ کیفیت آن مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

پس از بازدید از نخلستان‌هـای ایسـتگاه عزیـز آبـاد مرکـز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان واقع در منطقه بم، به‌صورت تصادفی از ۱۰ درخت، تعـداد ۱۰ خوشه میوه خرمای مضافتی در مرحله رطب برداشـت شد. برای جلوگیری از آلـودگی، خوشـه‌هـای میـوه داخـل سبدهای تمیز قـرار گرفتـه و سـریع بـه آزمایشـگاه مرکـز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان منتقل شدند. برای اطلاع از وضعیت میکروبـی نمونـه‌هـای خرما و کسـب داده‌هـای روز صـفر، بلافاصـله آزمـون‌هـای شمارش کلی، کپک و مخمر، و کلی‌فرم اجرا شدند.

تهیه محلول‌های پوشش‌دهی

بـرای تهیـه محلـول کیتـوزان، از روش کـیم و همکـاران (۲۰۰۶)، استفاده شد. از آنجایی‌کـه کیتـوزان و زئـین، دو ترکیب پروتئینی هستند، برای حل کردن آن‌ها بایسـتی از حلال مناسب استفاده شـود. از ایـن‌رو، کیتـوزان در اسـید

استیک ۲درصد به‌مدت دو ساعت و نیم در بن ماری با دمای ۵۵ درجه سلسیوس همراه با هم زدن مداوم قرار گرفت تا محلول کیتوزان به‌دست آید. محلول حاصل دو قسمت شد. به نیمی از آن، روغن بادیان به‌میزان ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید، و نیمی دیگر، بدون اسانس برای تیمار C (جدول۱)، استفاده شد. محلول زئین ۱۰ درصد نیز از روش جانز و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از اتانول ۹۵ درصد تهیه شد. زئین نیز به دو قسمت تقسیم گردید. به یک قسمت آن روغن بادیان به میزان ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و روی نمونه‌ها تیمار گردید، و قسمت دیگر، بدون اسانس برای تیمار D (جدول۱)، استفاده شد.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده برای پوشش‌دهی خرمای مضافتی

تیمارها	کیتوزان	زئین	روغن بادیان(۱۰۰۰µg/mlit)		اسیداستیک ۱درصد	اتانول ۹۵درصد	شاهد
			کیتوزان	زئین			
	A	B	C	D	E	F	G

بعد از اعمال تیمارهای ذکر شده بر روی نمونه‌ها، کلیه نمونه‌ها داخل کارتن‌های کوچک به وزن ۵۰±۲۵۰ گرم بسته‌بندی شده و در سال اول در دو دمای ۴ و ۱۸- درجه سلسیوس (به ترتیب داخل یخچال و فریزر) و در سال دوم نمونه ها با اعمال تیمار مجدد در دمای ۱۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. هر سه ماه، نمونه‌هایی از هر تیمار، بدون باز شدن و در بسته اصلی خود، به آزمایشگاه منتقل شده و از نظر میکروبی آزمون شدند. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS، تجزیه و تحلیل آماری شده و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن صورت گرفت. آزمون میکربی، به شرح زیر اجرا شد.

آزمون میکروبی

پس از آماده‌سازی محیط کشت‌ها و استرلیزاسیون ظروف و مواد مورد نیاز، کشت نمونه‌های رطب مضافتی صورت گرفت. برای این کار، میوه‌ها، با استفاده از پنس‌های استریل و تحت شرایط استریل هسته‌گیری شدند. سپس، ۱۰گرم از نمونه‌های هسته‌گیری شده به ۹۰ میلی‌لیتر از محلول رقیق‌کننده رینگر یک چهارم اضافه گردید تا محلول اولیه با رقت یک چهارم تهیه شود. هموژنیزه کردن مخلوط حاصل با استفاده از دستگاه پالسی‌فایر به‌مدت ۴۵ ثانیه صورت گرفت. برای تهیه رقت‌های پائین‌تر، از لوله-های آزمایش محتوی ۹ میلی‌لیتر محلول رینگر یک چهارم استفاده شد. شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها، طبق روش پورپلیت[1] با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار اجرا شد. پس از کشت، پلیت‌ها به‌طور واژگون در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس، به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شده و در فواصل زمانی ۲۴ ساعته بررسی شدند. شمارش کپک و مخمر با استفاده از محیط‌کشت اکسی-تتراسایکلین گلوکوزیست اکسترکت (OTGYE)[2] در گرمخانه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵-۳ روز، صورت گرفت. محیط‌کشت OTGYE از ترکیب ۵ گرم عصاره قارچ[3]، ۲۰ گرم گلوکز، ۱۲ گرم آگار، ۱۰۰ میلی‌گرم اکسی‌تتراسایکلین در یک لیتر آب مقطر تهیه می‌شود.

پس از اتمام گرمخانه‌گذاری، پرگنه‌های ظاهر شده در سطح محیط‌کشت پلیت‌ها، شمارش شدند. شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و قارچ‌ها مطابق با روش کریم (۱۳۹۵) انجام گرفت. بدین‌صورت که دو پلیت از یک رقت که دارای ۳۰۰-۱۵ پرگنه بودند، انتخاب شدند و با استفاده از پرگنه‌شمار، تمام پرگنه‌ها شمارش گردیدند. میانگین حسابی دو شمارش در ضریب رقت ضرب شده و عدد حاصل به‌عنوان شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و قارچ‌ها گزارش گردید. فقط دو رقم معنی‌دار در گزارش شمارش میکروبی بیان شد. در نهایت، با استفاده از رابطه زیر، تعداد میکروارگانیسم‌ها در هر گرم از نمونه خرما (رابطه ۱) محاسبه شد.

[1] Pour plate
[2] Oxytetracycline Glucose Yeast Extract
[3] Yeast extract

$$N=\frac{\Sigma C}{(n_1+0/1\ n_2)\times d} \quad (1)$$

ΣC : مجموع پرگنه‌های شمارش شده در تمام پتری‌های انتخابی (با دو رقت متوالی)

n_1 : تعداد پتری‌های اولین رقت انتخابی

n_2 : تعداد پتری‌های دومین رقت انتخابی (رقت بعدی)

d : ضریب رقت در اولین رقت انتخابی

حاصل محاسبه، به صورت عددی با دو رقم معنی‌دار گرد شد و نتیجه به‌صورت حاصل‌ضرب عددی بین (۹/۹- ۱/۰) در x۱۰ بیان گردید.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس مربوط به شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. جدول ۳ اثر تیمار و زمان نگهداری را نشان می دهد. بین تیمارها، کمترین شمارش میکروبی را تیمار زئین و بیشترین را شاهد به خود اختصاص داد (جدول ۴).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس شمارش میکروبی خرما در سال اول نگهداری

منابع تغییر	*درجه آزادی*	*میانگین مربعات*	
		شمارش کلی	*کپک و مخمر*
تیمار	۶	۱۱۲۱۳۲۷۲۰ **	۳۸۷۰۰۶۴ **
دما	۱	۷۰۴۴۸۱۴۵ **	۴۸۸۴۴۴/۶ **
زمان نگهداری	۳	۳۹۴۴۸۸۹۲ *	۲۲۶۱۳۲۰/۸ **
تیمار × زمان	۱۸	۷۴۶۵۸۶۴۸/۸ *	۲۱۹۴۹۰/۵ *n.s*
دما × زمان	۶	۴۰۱۸۹۸۲۰/۸ *n.s*	۱۱۸۲۳۶ *n.s*
دما × تیمار	۶	۲۸۱۰۵۱۰۷/۵ *n.s*	۸۲۶۵۱۶۱۷**
خطای آزمایش	۳۸	۲۳۰۵۳۳۶۹۴	۱۲۹۶۳۶/۵

n.s ، * و ** به ترتیب بدون اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۳- میانگین بار میکروبی اثر تیمار و زمان نگهداری بر خرما طی مراحل نگهداری

زمان نگهداری	*تعداد کل میکروارگانیسم‌ها* *(log cfu/g)*	*تعداد کل قارچ‌ها* *(log cfu/g)*
سه ماه بعد از نگهداری	۴/۷	۰/۸
شش ماه بعد از نگهداری	۴	۱
نه ماه بعد از نگهداری	۱	۰/۱۷
دوازده ماه بعد از نگهداری	۱	۰/۳۱

نتایج تجزیه واریانس شمارش میکروبی خرما در سال دوم نگهداری و نیز مقایسه میانگین اثر تیمارها بر شمارش کلی و تعداد کپک و قارچ خرما در سال دوم به ترتیب در جداول ۵ و ۶ آورده شده اند. علاوه بر نتایج میکروبی که در بالا ذکر شد، نمونه ها از نظر قارچ نیز بررسی شدند. قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر (A. Niger)* ، *آسپرژیلوس فلاوس (A. flavus)* ، *ریزوپوس استولونیفر (R. stolonifer)* و *آلترناریا آلترناتا (A. Alternata)* در نمونه‌های خرمای پوشش داده شده با زئین و کیتوزان و تیمار ترکیبی آن‌ها با روغن بادیان مشاهده شد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تیمارها بر شمارش کلی و تعداد کپک و قارچ خرما در سال اول

تیمارها	شمارش کلی (log cfu/g)	تعداد کپک و قارچ (log cfu/g)
کیتوزان	۷۶۱/۲۵ a	۳۴۸/۷۵ ab
زئین	۳۶۲/۵ a	۱۳۶/۲۵ a
کیتوزان+ روغن بادیان	۱۳۵۱/۲۵ a	۱۹۸/۷۵ ab
زئین+ روغن بادیان	۸۸۸/۷۵ a	۵۶۲/۵ b
شاهد اسید استیک	۱۸۲۵ ab	۴۴۰ab
شاهد اتانول	۴۳۷/۵ a	۲۰۷/۵ ab
شاهد	۱۰۷۵۰ a	۲۱۱۲/۵ c

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس شمارش میکروبی خرما در سال دوم نگهداری

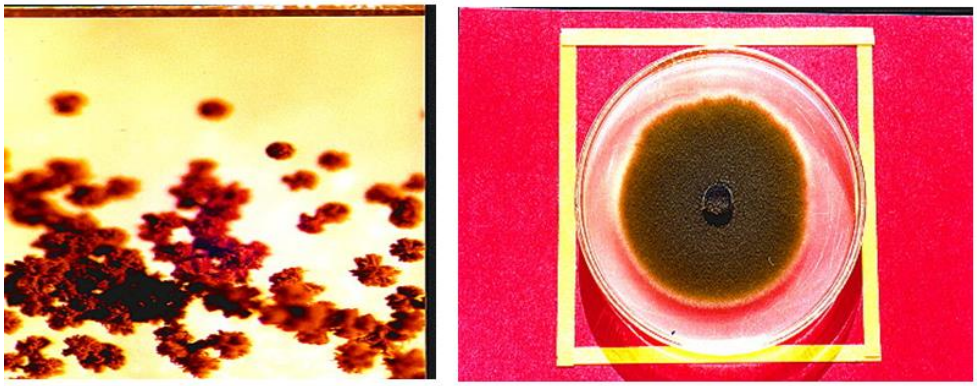
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		شمارش کلی	کپک و قارچ
بین تیمار ها	۴	۶۴۶۷۵۵ **	۸۱۳۳۹ **
بدون تیمارها	۱۵	۱۵۳۵۶۵	۹۴۵۹۵
خطا	۱۹		

n.s ، * و ** به ترتیب بدون اختلاف معنی‌دار، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

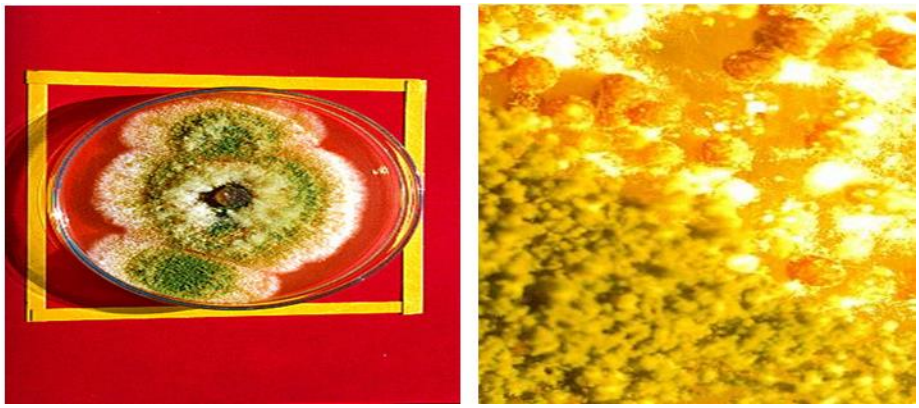
جدول ۶- مقایسه میانگین اثر تیمارها بر شمارش کلی و تعداد کپک و قارچ خرما در سال دوم

تیمارها	شمارش کلی (log cfu/g)	تعداد کپک و قارچ (log cfu/g)
کیتوزان	۶۲۵ ab	۱۷۵ a
زئین	۱۵۰ a	۶۲ a
کیتوزان+روغن بادیان	۱۴۰ a	۲۰۵ a
زئین+روغن بادیان	۵۷/۵ a	۶۵ a
شاهد	۱۰۲۵ b	۱۱۲۵ b

این در حالی است که در تیمار شاهد علاوه بر قارچ‌های فوق، قارچ‌های *پنی‌سیلیوم ایتالیکم*، *پنی‌سیلیوم اکسپنسوم* و *آسپرژیلوس* با سه سیکل لگاریتمی بالاتر مشاهده گردید. شناسایی این قارچ‌ها توسط مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کشور تایید شد. شکل های ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب قارچ های *آسپرژیلوس نایجر* (*A. Niger*)، *آسپرژیلوس فلاوس* (*A. Flavus*)، *آلترناریا آلترناتا* (*A. Alternata*) و *رایزوپوس استولونیفر* (*R. Stolonifer*) را نشان می دهند. به طور خلاصه خصوصیات تعدادی از گونه‌های قارچی توکسین‌زا در جدول ۷ آورده شده است.

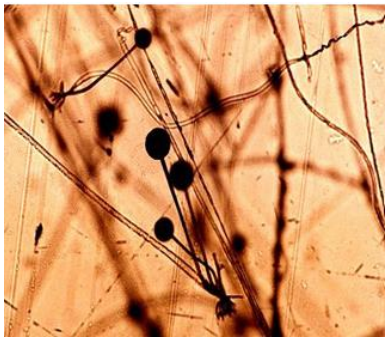


شکل ۱- قارچ آسپرژیلوس نایجر



شکل ۲- قارچ آسپرژیلوس فلاوس

شکل ۳- قارچ آلترناریا آلترناتا



شکل ۴- قارچ رایزوپوس استولونیفر

جدول۷- خصوصیات گونه‌های مختلف قارچ‌های توکسین‌زا

نام قارچ	اندازه μm	رنگ پایه	*وزیکول*	محیط کشت	رنگ پرکنه روی محیط کشت	کنیدی	کنیدیفور
آسپرژیلوس نایجر	۱۰۰-۵۰	قهوه	نیمه کروی	CZA	سیاه رنگ	شعاعی	متراکم
آسپرژیلوس فلاوس	۴۵-۲۵	سبز مایل به زرد	کروی شکل	CZA	قهوه‌ای کم رنگ	شعاعی	خاردار با دیواره زبر
آلترناریا الترناریا	۶۰-۵۰	سبز تا سبز لجنی	۵-۲ میلی متر	PCA	خاکستری تا سبز زیتونی	چماقی تا بیضوی	بدون انشعاب
آلترناریا الترناریا	۶۰-۵۰	سبز تا سبز لجنی	مخروطی	PCA	خاکستری تا سبز زیتونی	چماقی تا بیضوی	بدون انشعاب
رایزوپوس استولونیفر	۲۰۰۰-۱۰۰۰	سفیدپنبه‌ای‌تا قهوه‌ای	کروی تا مخروطی	PPA	خاکستری تا قهوه‌ای کم رنگ	گرد و تخم مرغی	ریزوئید در موقعیت کروی

بحث

همانطور که نتایج تجزیه واریانس مربوط به شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها نشان می دهد، بین تیمارها، از نظر تعداد میکروب‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. دما و زمان نگهداری روی افزایش تعداد میکروب‌ها نسبت به بقیه عوامل اثر بیشتری دارند. بیشترین تعداد میکروب‌ها در سه ماه بعد از نگهداری مشاهده شد و بعد از آن در شمارش میکروب، کاهش معنی‌داری ملاحظه شد که دلیل آن بالا بودن رطوبت محصول در سه ماه بعد از نگهداری است. بین تیمارها، کمترین شمارش میکروبی را تیمار زئین و بیشترین را شاهد به خود اختصاص داد که این تیمار توانسته است تعداد میکروب‌ها را نسبت به شاهد سی برابر کاهش دهد. به‌طور کلی، بررسی میکروبی میوه خرمای مضافتی مورد مطالعه در طول مراحل مختلف انبارداری، وجود گونه‌های مختلفی از قارچ‌های *آسپرژیلوس*، *آلترناریا* و *رایزوپوس* را نشان داد. گونه‌هایی از قارچ *آسپرژیلوس*، *رایزوپوس و پنی‌سیلیوم* توسط محققین دیگری نیز از ارقام خرما شناسایی شده است (Salajegheh, 2013). فراوانی گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاوس* در رطب ممکن است به علت غلظت بالای قند محصول باشد. این‌گونه از قارچ‌ها، *اسموتولرانس* بوده و در محیط‌های غلیظ قندی قادر به رشد هستند. رطب مضافتی دارای میزان قند بالا و pH نزدیک به خنثی است و به‌همین دلیل مورد تهاجم انواع میکروارگانیسم‌ها مخصوصا کپک‌ها و مخمرها قرار می‌گیرد. برخی پژوهشگران رشد و فعالیت شدید قارچ‌ها در ارقام خرما را ناشی از بالا بودن میزان قندهای احیاء-کننده و غیر احیاءکننده می‌دانند (salajegheh, 2013).به‌هرحال عوامل درونی در رطب مضافتی (میزان رطوبت بالا، pH نزدیک به خنثی) همراه با افزایش رطوبت نسبی هوا هنگام رسیدگی و برداشت محصول، امکان پوسیدگی و ترشیدگی رطب مضافتی را فراهم می‌سازد. نتایج پژوهش‌ها حاکی از نقش قارچ‌های *آسپرژیلوس* مخصوصا نایجر در پوسیدگی و باکتری‌های *اسید لاکتیک* در ترشیدگی رطب مضافتی است. گلشن‌تفتی و فولادی (۲۰۰۶) بیان کردند که پوسیدگی رطب مضافتی از زیر کلاهک و حاشیه آن شروع می‌شود و پس از لهیدگی گوشت میوه، اطراف هسته را سیاه می‌کند. آلودگی قارچی میوه مضافتی در سه ماه بعد از نگهداری بالا گزارش شد. به‌هر حال، بالا بودن شمارش میکروبی و قارچی در این مرحله از نگهداری به‌دلیل وجود مواد مغذی و رطوبت مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها است. پوشش‌های خوراکی بر پایه پروتئین مثل کیتوزان و زئین برای افزایش زمان ماندگاری و حفظ مواد مغذی و مواد کمی در میوه‌ها موثر است (Vahedikia etal, 2019). به‌عنوان مثال، استفاده از پوشش‌های خوراکی برای افزایش ماندگاری

توت‌فرنگی و تمشک تازه و منجمد در دمای ۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۸ درصد به‌مدت سه هفته یا در دمای ۲۳- درجه سلسیوس به مدت ۶ ماه توصیه شد (Han etal, 2004). نتایج این پژوهش نیز تاکید می‌کند که میوه خرمای پوشش داده شده تا 3 برابر، افزایش ماندگاری داشته است.

خصوصیات گونه‌های قارچی مذکور به‌شرح زیر است: پرگنه قارچ *آسپرژیلوس نایجر* روی محیط کشت CZA به رنگ سیاه با کنیدیوفورهای متراکم مشاهده شد. کنیدی‌ها به شکل شعاعی روی وزیکول قرار داشتند. کنیدیوفور با دیواره صاف و بی‌رنگ، و وزیکول، نیمه کروی و به اندازه ۱۰۰-۵۰ میکرومتر دیده می‌شد. کنیدی‌ها به‌رنگ قهوه‌ای با تزئینات و به شکل نیمه کروی و به قطر ۵-۳/۵ میکرومتر بودند. پرگنه قارچ *آسپرژیلوس فلاوس* روی محیط کشت CZA به رنگ سبز مایل به زرد ظاهر شد. کنیدی‌ها به شکل شعاعی بوده و روی وزیکول قرار داشتند. سلول کنیدی‌زا به صورت یک ردیف و دو ردیف-های، کنیدیوفور با دیواره زبر و بی‌رنگ و وزیکول، کروی شکل و با قطر ۴۵-۲۵ میکرو متر دیده می‌شد. کنیدی به صورت خاردار و نیمه کروی با قطر ۳/۵ میکرومتر بود. در بعضی از جدایه‌ها اسکروت نیز دیده می‌شد. پرگنه قارچ *آلترناریا آلترناتا* روی محیط کشت PCA با ظاهری خاکستری تا سبز زیتونی و به‌شکل پودری به‌سرعت رشد کرد. کنیدیوفورها اغلب بدون انشعاب با یک یا چند جای کنیدی به اندازه بیش از ۵۰ میکرومتر و به عرض ۶-۳ میکرومتر بودند. کنیدی‌ها چماقی تا بیضوی شکل با یک بیک کوتاه به اندازه‌های ۱۷-۸ × ۵۶-۲۳ میکرومتر دیده می‌شدند. پرگنه قارچ *رایزوپوس استولونیفر* روی محیط کشت PPA سفید پنبه‌ای بود که به‌مرور زمان به رنگ قهوه‌ای متمایل به تیره درآمد. در گره‌ها، ریزوئید اسپورانژیوفور بلند با طول ۲۰۰۰-۱۰۰۰ میکرومتر و عرض ۲۵-۱۳ میکرومتر وجود داشت. کالوملا با طول ۹۰-۷۰ میکرومتر، اسپور انجیوسپور گرد و تخم‌مرغی به ابعاد ۸-۷×۲۰-۱۰ میکرومتر و زئوسپور گرد و تخم‌مرغی با اندازه ۲۲۰-۱۶۰ میکرومتر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

در بررسی روند آلودگی میکروبی میوه خرمای مضافتی در مرحله رطب از نظر تعداد کل میکروارگانیسم‌ها و قارچ‌ها، قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاوس، رایزوپوس استولونیفر و آلترناریا آلترناتا*، در خرمای تحت تیمارهای مختلف این مطالعه، مشاهده شدند. بیشترین تعداد بر اساس مشاهدات چشمی انجام شده بعد از قرار دادن نمونه‌ها در سردخانه ۱۸- درجه سلسیوس مربوط به قارچ آسپرژیلوس نایجر بود. به عبارتی دیگر، تیمارهای مختلف توانستند جلوی رشد میکروب‌های دیگر را بگیرند اما قارچ *آسپرژیلوس نایجر* در حد کم رشد کرد. بین تیمارها، از لحاظ تعداد میکروب، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بدین صورت که تیمار دما و زمان نگهداری روی افزایش تعداد میکروب‌ها نسبت به بقیه عوامل اثر بیشتری داشتند. تاثیر مدت نگهداری بر تعداد کل میکروارگانیسم-ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. هم‌چنین، مرحله نمونه برداری و اثر متقابل آن دو، بر میزان آلودگی قارچی در سطح احتمال ی۱ درصد معنی‌دار بود در حالی-که سال و اثر متقابل آن بر میزان آلودگی قارچی معنی‌دار نشد. بیشترین تعداد میکروب‌ها در ۳ ماه بعد از نگهداری مشاهده شد و بعد از آن در شمارش میکروب کاهش معنی‌داری وجود داشت که دلیل آن بالا بودن رطوبت محصول در این مرحله است. بین تیمارها کمترین شمارش میکروبی را تیمار زئین و بیشترین را شاهد به خود اختصاص داد. این تیمار توانست تعداد میکروب‌ها را نسبت به شاهد ۳ سیکل لگاریتمی کاهش دهد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین در سال دوم نیز بیانگر آن است که کمترین تعداد میکروب رشد کرده در تیمار زئین و بیشترین تعداد در نمونه شاهد بوده است. در تجزیه واریانس بین تیمارها تفاوت معنی‌داری دیده شد. میانگین تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در میوه مضافتی در مراحل

نگهداری در محدوده log cfu/g ۴/۷-۱/۵۰ بود. بیشترین تعداد کل میکروارگانیسم‌ها در ۳ ماه بعد از نگهداری در نمونه‌ها مشاهده شد. میانگین تعداد کل قارچ‌ها و مخمرها در میوه خرمای مضافتی نمونه‌برداری شده از خرمای تیمارشده در زمان‌های مختلف مورد مطالعه درمحدوده log cfu/g ۱-۰/۱۷ دیده شد. به طور کلی، از نظر مجموعه نتایج حاصل از آزمون‌های میکروبی، زئین چه به تنهایی و چه با تیمار ترکیبی روغن بادیان بهترین تیمار تشخیص داده شد.

پیشنهادات

عوامل درونی در رطب مضافتی همراه با افزایش رطوبت-نسبی هوا هنگام رسیدگی و برداشت محصول، امکان پوسیدگی و ترشیدگی رطب مضافتی را فراهم می‌سازد. پوسیدگی و ترشیدگی از جمله عوامل مؤثر در فساد رطب مضافتی به شمار می‌آیند که منجر به کاهش بازارپسندی و افزایش ضایعات می‌شوند. میکروارگانیسم‌ها، به‌ویژه قارچ‌ها و برخی از باکتری‌ها در پوسیدگی و خراب‌شدن محصول نقش دارند. با توجه به اهمیت رطب مضافتی و تولید و مصرف بالای آن در کشور، بایستی روی روش‌های مؤثر حذف آلودگی‌های قارچی از رطب مضافتی با روش-های فیزیکی و نیز نقش باکتری‌های اسید لاکتیک در جلوگیری از رشد و فعالیت قارچ‌های مولد آفلاتوکسین و نیز سم آفلاتوکسین در میوه خرما مطالعات جامعی صورت گیرد.

منابع

1. Adams M.R, and Moss M.O. 2000. Food Mic. The Royal Society of Chemistry. U. K. 479 pp.
2. Ahmadi Karim., Ebadzadeh Hamidreza., Hatami Farshad., Hosseinpour Rababe and Abdshah Halda. (2020). Agricultural statistics of 2018: horticultural products (volume 3). Publications of the Ministry of Agricultural Jihad, Planning and Economic Deputy, Information and Communication Technology Center.
3. Ahmed I., Ahmed A, and Robinson R.K. 1997. Susceptibility of date fruits (Phoenix dactylifera) to aflatoxin production. J. Sci. of Food and Agriculture. 74:64-68.
4. Ansarifar E, and Moradinezhad F. 2021. Preservation of strawberry fruit quality via the use of active packaging with encapsulated thyme essential oil in zein nanofiber film. Int. J. Food Sci. Technol. 56, 4239–4247.
5. Davidson P.M, and Zivanovic S. 2003. The use of natural antimicrobials. pp. 5-8. In: Zeuthen P and Bogh Sorensen L. Food preservation techniques. Woodhead Publishing Limited and CRC Press. Washington.
6. Ghanbarzadeh B., Oromiehie A.R., Musavi M., Falcone P.M., Emam Djomeh Z, and Rad E.R. 2007. Study of mechanical properties, oxygen permeability and AFM topography of zein films plasticized by polyols. Packaging Technology and Science. 20:155-163.
7. Gross M., Friedman J., Dudai N., Larkov O., Cohen Y, and Bar E. 2002. Biosyn. of estragole and t-anethole in bitter fennel (Foeniculum vulgare Mill. var. vulgare) chemotypes. Changes in SAM: phenylpropene omethyltranferase activities during development. Plant Sci. 163:1047-1053.
8. Tafti G., Damankshan Abolfazl., Damankshan Bahare, and Shafiei L. (2015). Botany and characteristics of Mozafati dates. Ministry of Jihad and Agriculture, Organization of Jihad and Agriculture of Kerman Province, technical publication number 10.
9. Golshan Tafti A., Soleimani De Divan N, and Azizi A. 2017. The effect of acetic acid and sodium diacetate solutions on the artificial ripening of Mozafati date fruit. Iranian journal of food science and industry. Volume 85, Number 15, Pages 356-349.
10. Gross M., Friedman J., Dudai N., Larkov O., Cohen Y, and Bar E. 2002. Biosyn. of estragole and t-anethole in bitter fennel (Foeniculum vulgare Mill. var. vulgare).

11. chemotypes. Changes in SAM: phenylpropene omethyltranferase activities during development. Plant Sci. 163:1047-1053.
12. Han c., Zhao Y., Leonard S.W, and Traber M.G. 2004. Edible coating to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (Fragaria xananassa) and raspberries (Rubus ideaus). Postharvest Bio. & Tech. 33:67-78.
13. Ildiko T. 2006. Alternative polymers and processes for coating. Ph.D dissertation. Der Freien Universitat. Berlin.
14. Janes M.E., Kooshesh S, and Johnon M.G. 2002. Control of Listeria monocytogenes on the surface of refrigerated, ready- to- eat chicken coated with edible zein film coatings containing nisin and/or calcium propionate. J. Food Sci. 67:2754-2757.
15. Joerger R.D. 2007. Antimicrobial films for food application: A quantitative analysis of their effectiveness. Packaging Technology and Science. 20:231-273.
16. Khodabakhshian Kargar R, and Emadi B. 2014. Evaluation of some physical and chemical properties of Mozafati date fruit at different stages of maturity. The 8th National Congress on Agricultural Machinery Engineering (Biosystem) & Mechanization, Mashhad Ferdousi University. 2014/01/29.
17. Karim, Gitti. (2016). Microbial tests of food. 6th edition, Tehran University Press, page: 256-300.
18. Kim S.H., No H.K., Kim S.D, and Prinyawiwatkul W. 2006. Effect of plasticizer concentration and solvent types on shelf- life of eggs coated with chitosan. J. of Food Science. 71, S249-353.
19. Salagegheh F., Golshan Tafti A., Gafarzadah F., Beradaran G, and Alimohamadei M. 2013. Evaluating microbial quality of Mozafati rutab upon storage. Agricultural Engineering Research Institute, No., 4-84-14-87006.
20. Salagegheh F., Zaynali F., Alizadeh M, and Golshan Tafti A. 2017. Studying the effect of ozone gas and edible films on microbial features and qualitative properties of Mazafati date fruit during storage period, Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES).
21. Shenasi M., Aidoo K.E, and Candlish A.A.G. (2002). Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation. International J. Food Mic., 79.2002:113-119.
22. Vahedikia N., Garavand F., Tajeddin B., Cacciotti I., Jafari S.M., Omidi T, and Zahedi Z. 2019. Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. Colloids and Surfaces B: Biointerface. 177:25-32, Elsevier.
23. No H.K., Meyers S.P., Prinyawiwatkul W, and Xu Z. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf of foods: A review. J. of Food Science. 72, R 87-100.

The Edible Coatings Role on the Microbial Activity of Mozafati Date Fruits

Salagegheh F[1], Tajeddin B[2], Arjmand Kermani M[1]*

1. Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kerman, Iran.

2. Agricultural Engineering Research Institute (AERI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

***Corresponding author**: *mahdokht_arjomand@yahoo.com*

Received: 03 November 2021 Accepted: 26 January 2022

Abstract

Maintaining the desired quality of dates, clearing them of contaminants and proper packaging to increase shelf life are among the priorities of the country. Since the use of edible coatings with vegetable oils is one of the ways to prevent the growth of microorganisms, was used natural polymers including zein and chitosan, alone and along with pimpernel oil on microbial activity of Mazafati date fruits, for one year at 4 and -18°C and the second year at 10°C was investigated. The obtained data were analyzed using SPSS software and Duncan's mean comparison was performed. The results showed that these dates with 32% moisture content had a high microbial load. The fungi of Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Rhizopu stolonifers, and Alternaria alternata were grown on it. These fungi, in particular Aspergillus niger, were involved in its rotting and lactic acid bacteria in its rancidity. By doing this research, the number of Aspergillus niger fungi was reduced by logarithmic three cycles using zein and chitosan edible coatings with pimpernel oil; and penicillium fungi were completely eliminated. In general, the lowest number of microbial growth was observed in Zein treatment 362.5 & 150 log cfu/g , in the first and second years respectively, and the highest number was observed in the control samples 10750 & 1025 log cfu/g. The use of anise oil also had an effect on reducing the overall count of microorganisms. Finally, according to the microbial results, the use of zein treatment is recommended.

Keywords: Edible coating, Mazafati date fruits, Microbial activity, Natural polymers, Pimpernel.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.