جداسازی *آلیسایکلو باسیلوس* از آب میوه جات در ایران

ابراهیم رحیمی[1*]، عباس دوستی[2]، ساناز دهقانزاد[3]، زهرا حصیری[1]

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. دانش آموخته رشته میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *ebrahimrahimi55@yahoo.com*

تاریخ پذیرش : ۱۳۹۵/۹/۲ تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۷/۳

چکیده

آلیسایکلوباسیلوس به عنوان عامل فساد میکروبی آب میوه‌های صنعتی شناخته و مورد توجه قرار گرفته است. این باکتری دارای اسپور،گرما دوست و هاگزاست و تاکنون گزارشی از بیماری‌زایی آن منتشر نشده است اما از طریق ایجاد تغییر در طعم و بوی آب میوه‌های صنعتی موجب فساد و زیان اقتصادی فراوان می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی آلودگی کنسانتره‌های آب میوه بسته بندی شده به این باکتری صورت پذیرفته است. در این راستا، مجموع ۳۰۰ نمونه شامل آب انار، آب سیب، آب پرتقال، آب انبه، آب آناناس و آب انگور که از کارخانجات مختلفی استحصال و به بازار عرضه شده بودند به صورت تصادفی از فروشگاه‌های شهر اصفهان جمع‌آوری و از نظر حضور *آلیسایکلوباسیلوس* ارزیابی شدند. پس از کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی، نمونه‌های مثبت با استفاده از PCR مورد آزمایش قرار گرفته و حضور باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* در ۱۳ نمونه (۴/۳۳ درصد) تایید شد. بالاترین میزان آلودگی در بین نمونه‌های آب انار و آب پرتقال (۱۳/۳ درصد) دیده شد. آلودگی در آب آلبالو به میزان ۱۰ درصد، در آب میوه جات مخلوط ۶/۶۶ درصد و در مابقی نمونه‌های آب میوه‌جات (۹۵/۶۶ درصد) آلودگی به باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* مشاهده نشد. با توجه به گزارش فوق، به منظور جلوگیری از فساد آبمیوه‌های صنعتی، ممانعت از رشد این باکتری، به خصوص در طول حداکثر مدت زمان نگهداری آب میوه‌ها و تشخیص حضور یا عدم حضور این باکتری پس از اتمام مراحل پاستوریزاسیون و سالم سازی محصول، امری ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *آلیسایکلوباسیلوس*، فساد، آب میوه‌جات و PCR .

مقدمه

باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* میکروارگانیسمی گرم مثبت، دارای اسپور و گرما دوست می‌باشد که از قابلیت رشد در محیط‌های اسیدی به خوبی برخوردار است. دو ویژگی گرمادوستی و اسید دوستی این باکتری را به یک ارگانیسم مقاوم به پاستوریزاسیون در صنعت آب میوه تبدیل کرده است. *آلیسایکلوباسیلوس* بر خلاف بیشتر باکتری‌های مواد غذایی، ایجاد گاز نمی‌نماید و در نتیجه تغییر ظاهری خاصی در آب میوه‌های آلوده مشاهده نمی‌شود، اما با تولید ترکیبات گویاکول و هالوفنول‌هایی مانند ۲و۶- دی بورموفنول و۲و۶- دی کلروفنول باعث بوی نامطلوب شده و به بازارپسندی محصول لطمه وارد می‌نماید (Pettipher et al., 1997; Chang and Kang, 2004). اولین بار در سال ۱۹۸۴ این باسیل از آب سیب فاسد شده جدا گردید که می‌توانست در pH پایین(۲/۵) نیز رشد کند (Pontius et al., 1998). در ابتدا به آن *باسیلوس اسید تریس*[1] اطلاق شد، به دنبال پژوهش‌های علمی بیشتر بر روی این باکتری، باسیل گرما دوست اسید دوست ATB نامگذاری گشت و در نهایت به علت وجود مقادیر زیاد اسید چرب سیکلوهگزان غشاء سلولی این جنس از باکتری، آن‌ها را *آلیسایکلو باسیلوس* نام نهادند. این میکروارگانیسم در مقابل اسیدهای آلی چون مالیک، سیتریک، تارتاریک نیز مقاوم بوده و این مواد هیچگونه

1. Bacillus acidterrestris

اثر منفی بر قدرت تکثیر آن ندارد. *آلیسایکلوباسیلوس* یک باکتری هوازی، متحرک، میله‌ای شکل، هاگ دار با هاگ میانی یا نزدیک انتهایی بوده و قادر به رشد در دمای ۲۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد و محیطی با اسیدیته ۲/۵۵ تا ۵/۵ می‌باشد. البته سرعت رشد آن کند بوده و گاهی تا ۵ روز نیاز است تا بتوان پرگنه‌های آن را بر روی محیط کشت مشاهده کرد (Previdi et al., 1997; Pontius et al., 1998). به طور کلی محصولات حاصل از میوه‌ها از جمله آب میوه نکتار و کنسانتره‌ها همگی دارای محیط اسیدی اسیدی pH≤4/6 بوده و از این رو پاستوریزاسیون ساده با دمای حدو ۸۵ الی ۹۵ درجه سانتی‌گراد می‌تواند موجب ماندگاری مناسب این دسته از محصولات غذایی در دمای محیط گردد. چنین فرآوری موجب غیرفعال شدن تمامی باکتری‌های غیرهاگ دار شده واسیدیته پایین آن‌ها نیز باعث جلوگیری از رشد هاگ اکثر باکتری‌های هاگدار می‌شود ولی از آنجایی که باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* در اسیدیته پایین نیز قادر به ادامه حیات می‌باشد به محض اینکه آب میوه آلوده به این باکتری‌ها در دمای بالا قرار می‌گیرد شروع به رشد و تکثیر نموده و موجب فساد آن می‌گردد (Danyluk et al., 2011). فساد آب میوجات توسط این میکروارگانیسم به علت تولید گیاکول از وانیلین می‌باشد که طعم و بوی خاصی تولید می‌کند. تاکنون آلودگی به این باکتری در مواد غذایی اولیه و آماده مصرف و همچنین خط تولید آب میوه‌ها مانند آب سیب، آب پرتقال، آب گلابی، آب انار، آب هویج، آب انگور سفید، آب هلو، آب گریپ فروت و همچنین در آب گوجه فرنگی، انواع سس، شربت‌ها و حتی چای نیز گزارش شده است (Splittstoesser and Churry., 1996; Splittstoesser etal., 1998; Wisse and Parish., 1998). حضور این باسیل در آب میوه‌هایی مانند سیب، پرتقال، گریپ فوروت و انگور سفید منجر به تولید بوی دارویی، گوشت پخته شده یا باقلا پخته شده می‌گردد (قهفرخی و همکاران، ۱۳۹۲) البته لازم به ذکر است که همه گونه‌های این باکتری قادر به تولید گوالایکول نبوده و باعث ایجاد فساد در آبمیوه نخواهند شد، تنها چند گونه از آنها شامل *A. acidoterrestris*، *Alicyclobacillus herbarius*، *Alicyclobacillus acidiphilus* و *Alicyclobacillus sp.* از توانایی تولید گوالایکول برخوردار می‌باشند (Akira et al., 2007). این باکتری در محیط نوترینت آگار حتی اگر اسیدیته آن به ۳/۵ رسانیده شود رشد نمی کند (Wei Chen., 2013). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که pH اسیدی محیط BAT در ترکیب با درجه حرارت گرمخانه گذاری محیط از رشد سایر باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. عدم رشد *آلیسایکلوباسیلوس* در فرآورده‌های مربوط به انگور قرمز جای توجه و تامل فراوان دارد. به نظر می رسد حضور ترکیبات فنلی خنثی کننده در انگور قرمز از رشد این باکتری جلوگیری می‌کند (Churry., 1996; Splittstoesser and Splittstoesser et al., 1998). در دیگر تحقیقات مشخص شده است که ترکیبات فنولی موجود در انگور قرمز مانند رزوراترول ، اسید فرولیک، اسید کوماریک، اسید هیدروکسی بنزوئیک و پروآنتوسیانیدین می توانند A.acidoterrestris را غیرفعال کنند (Oita and Kohyama, 2002). درسال‌های اخیر روش‌های متفاوتی جهت جستجو و کنترل آلودگی به این باکتری درصنایع وابسته ابداع و به کار گرفته شده است. هریک از این روش‌ها نحوه نمونه برداری، حرارت دهی و محیط‌های کشت غنی کننده خاص خود را طلب می-نماید که از جمله این محیط‌ها، محیط PDA Agar و BAT Agar می‌باشند (خواجه نصیری و همکاران، ۱۳۸۶).با توجه به نکات یاد شده وجود یا عدم وجود این عامل فساد در محصول یکی از مهمترین فاکتورهای مطرح در صادرات آب میوه می‌باشد، به طوری که جستجوی آن در دستور کار آزمایشگاه

میکروبی مواد غذایی قرار گرفته است (Walls and Chuyate., 2000). با این وجود مطالعات محدودی در خصوص ردیابی این باکتری در مواد غذایی در ایران انجام شده است و بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی حضور *آلیسایکلو باسیلوس* به عنوان یک عامل فساد مهم در آب میوه جات طبیعی انجام شد.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه ها

از بهار تا اوایل زمستان سال ۱۳۹۲ در مجموع ۳۰۰ نمونه آب انار، آب سیب، آب پرتقال، آب انبه، آب آناناس، آب انگور از شرکت‌های مختلف تولید کننده آب میوه در اصفهان جمع آوری و از نظر حضور گونه‌های اسیکلوباسیلوس مورد آزمایش قرار گرفت. پس از ضد عفونی کردن ناحیه درب بسته بندی آب میوه جات با الکل ۷۰ درجه در کنار شعله، توسط پیپت استریل نمونه برداری شد و به داخل ظروف استریل شیشه انتقال یافت. ظروف حاوی نمونه در یخچال (۴درجه سانتی گراد) تا پایان آزمایش نگهداری شد. از نمونه‌ها رقت‌سازی انجام شد و رقت‌های تهیه شده بر روی محیط کشت اختصاصی BAT و آگار خوندار کشت داده شده و در درجه حرارت ۴۳ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز درگرمخانه گذاری شد. پرگنه‌های به دست آمده از نظر تعداد، اندازه، شکل و رنگ مورد بررسی قرار گرفته و از هر یک لام تهیه شد. از پرگنه-های مشکوک کشت خالص تهیه شده و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تبدیل نیترات به نیتریت، قدرت تخمیر قندهای رامینوز، لاکتوز، ال زایلوز، ملیبیوز، متیل آلفا دی مانوزید و همچنین نشاسته بر روی آنها انجام پذیرفت. در ادامه سوش‌های جدا سازی شده با استفاده از پرایمر اختصاصی زیر که در این تحقیق از روی شماره ثبت ژن KC893653 در بانک جهانی ژن طراحی شده اندبه روش آزمون زنجیره ای پلیمراز مورد تائید قرار گرفتند.

Alyc-F: 5’-
CGAAGGAAACCCAATAAGCACTC -3’
Alyc-R: 5’-
GCCCATTGTAGCACGTGTGTAG -3’

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA ژنومی از باکتری آلیسایکلو باسیلوس ازکیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن ایران مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. تمامی نمونه‌های DNA تا زمان انجام PCR، در فریزر۲۰- نگه داری شدند.

استخراج DNA و واکنش های PCR

DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن ایران و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده، از پرگنه‌های تیپیک رشد کرده، استخراج شد. تمامی نمونه های DNA تا زمان انجام PCR، در فریزر۲۰- نگه داری شدند. به منظور انجام تمام واکنش های زنجیره ای پلیمراز از دستگاه Master Cycler Gradiant (Eppendorf, Germany) در قالب برنامه‌های Multiplex PCR استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت ردیابی باکتری ویبریو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر × ۱۰ بافر PCR، ۵۰ میلی مول $Mgcl_2$ ، ۱۰ میکرو مول dNTP ، ۱میکرومول از زوج پرایمرهای جلویی و عقبی، ۵ میکرولیتر از هر نمونه DNA و ۰/۳ واحد آنزیم DNA Taq Polymerase، انجام پذیرفت. برنامه حرارتی مورد استفاده به منظور تکثیر گونه‌های باکتریایی مورد نظر شامل: ۵ دقیقه ۹۴ درجه سلسیوس،۳۵ ثانیه ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه ۵۳ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس، ۱/۵ دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس (۳۵ سیکل دمایی) و یک مرحله نهایی ۷ دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس، می‌باشد.

الکتروفورز محصولات PCR

در نهایت محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، الکتروفورز

شدند. برای این منظور، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCRرا با ۳ میکرولیتر رنگ نشانگر Loading buffer مخلوط و به داخل چاهک ژل منتقل گردید. الکتروفورز نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت و در نهایت محصول الکتروفورز توسط دستگاه قرائت کننده ژل مورد بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS شماره ۱۶، تجزیه و تحلیل گردید و با استفاده از آزمون مربع کای اختلافات آماری بین حضور گونه-های ویبریو[2] و فراوانی انواع فاکتورهای حدت در بین سوش‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس با ضریب اطمینان ۹۵درصد (Pvalue <0.05) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

مطالعه حاضر با هدف جدا سازی باکتری *آلیسایکلو باسیلوس* از آب میوه‌جات انجام گرفت. از مجموع ۳۰۰ نمونه آب انار، آب سیب، آب پرتقال، آب انبه، آب آناناس، آب انگور از شرکت‌های مختلف تولید کننده آب میوه جمع‌آوری و در شرایط استریل کشت داده شده و نمونه‌های مثبت با استفاده از PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. بر اساس آزمون کشت و به دنبال آن آزمون تائیدی PCR تعداد ۱۳ نمونه (۴/۳۳٪) از آب میوه‌جات آلوده به باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* بودند. همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شده است با لاترین میزان آلودگی در بین نمونه‌های آب انار و آب پرتقال(۱۳/۳۳٪) و پس آز آن نمونه‌های آب آلبالو (۱۰٪) و آب میوه‌جات مخلوط (۶۶/۶٪) بوده است. شماره‌های ۱ و ۲ نمونه‌های آب میوه که پس از استخراج DNA مستقیما مورد آزمایش PCR قرار گرفته‌اند و منفی هستند. شماره ۳، کنترل منفی برای نمونه‌های آب میوه. شماره ۴، مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز. شماره‌های ۵ و ۶، کلنی‌های *آلیسایکلو باسیلوس* که با PCR تایید شده و باند ۳۸۸ جفت بازی را نشان می‌دهند. شماره ۷ کنترل منفی برای PCR روی نمونه‌های حاصل از کشت.

بحث

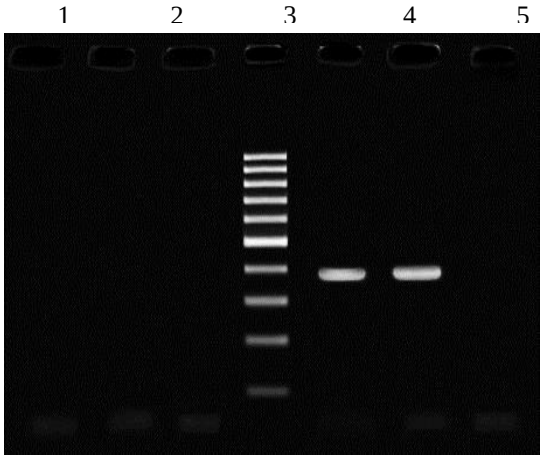
میکروارگانیسم‌ها و خصوصا باکتری‌های نقش مهمی را در صنایع غذایی و آشامیدنی ایفا می‌کنند از جمله کاربرد بیولوژیک آنها می‌توان از تولید اسیدهای آلی، پاد زیست‌ها و آنزیم نام برد. در برخی از موارد، باکتری‌ها فرایند فرآوری محصولات غذایی را آلوده کرده و موجب ضررهای اقتصادی کلانی می‌شوند. از جمله از این موارد باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* می‌باشد (Walls and Chuyate, 2000). از آنجایی که به جز این باکتری سایر میکروارگانیسم‌های رایج در آبمیوه‌ها و محصولات اسیدی دارای مقاومت دمایی پایین‌تری هستند، اخیرا از این باکتری به عنوان باکتری هدف در این محصولات نام برده می‌شود. مطالعات اندکی درباره میزان شیوع *آلیسایکلوباسیلوس* در صنایع آبمیوه انجام گرفته است. در سال ۱۳۸۶ اولین گزارش مبنی بر آلودگی کنسانتره سیب تولیدی در ایران به *A.acidoterrestris* منتشر شد طی مطالعه‌ای که توسط انجمن ملی فرآورده‌های غذایی بر روی آب میوه جات انجام شده است، در ۳۵ درصد از محصول شرکت‌هایی که مورد بررسی قرار گرفتند (عمدتا صنایع آب سیب)، آلودگی و فساد ناشی از *آلیسایکلوباسیلوس* مشاهده شد (قهفرخی و همکاران، ۱۳۸۶).Danylok و همکاران وضعیت الودگی آب میوه‌جات کشورهای مختلف را مورد بررسی قرار داده و به طور کلی از ۱۸۰ نمونه میوه مختلف، ۱۱ باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* (۶/۱ درصد) جدا سازی نمودند. به بیان جزئی‌تر، از ۱۲ نمونه میوه‌ی پرتقال غلیظ شده دو باکتری (۱۶/۶ درصد)، از ۲۶ نمونه پوره‌ی انبه ۴ باکتری (۱۵/۳ درصد)، از ۷ نمونه میوه تو سرخ غلیظ شده یک باکتری (۱۴/۲۸ درصد)، از ۱۶ نمونه میوه‌ی انبه غلیظ شده دو باکتری (۱۲/۵ درصد)، از ۳۴ نمونه

2.Vibrio spp.

آناناس غلیظ شده یک باکتری (۲/۹ درصد)، از ۴۵ نمونه کرم نارگیل یک باکتری (۲/۲۲ درصد)، و در ۹ نمونه پوره‌ی گووا، ۱۷ نمونه پوره موز، ۵ نمونه پوره‌ی انبه هندی و ۵ نمونه میوه پاسیون حضور *آلیسایکلوباسیلوس* مشاهده نشد (Danylok et al., 2011). از مقایسه نتایج مطالعه فوق و مطالعه حاضر، همخوانی قابل قبولی برداشت می‌شود. در سال ۲۰۰۹ در سائوپائولو برزیل مطالعه ای توسط McKnight و همکارانش بر روی آبمیوه‌های حاصل از میوه های بومی برزیل انجام پذیرفت که از مجموع ۱۰۷ نمونه شامل ۵۷ نمونه آبمیوه پاسیون و ۵۰ نمونه آب آناناس، ۱۶ نمونه (۲۸/۰۷ درصد) آلوده به *آلیسایکلوباسیلوس* گزارش شد. نمونه‌های آلوده فقط از آبمیوه پاسیون جداسازی شده و هیچ مورد آلوده‌ای از آبمیوه‌های آناناس جداسازی نشد (McKnight et al., 2010). با وجود اینکه نتیجه این مطالعه از نقطه نظر امکان حضور *آلیسایکلو باسیلوس* در برخی آبمیوه‌ها موید تحقیق حاضر است، اما ارتباط معنی‌داری از لحاظ میزان آلودگی بین نتایج این دو مطالعه مشاهده نمی‌شود. مطالعه دیگری در چین بر روی ۴۰۱ نمونه منتخب از ۱۸ نوع محصول تجاری مختلف انجام پذیرفت که تعداد

جدول ۱- نتایج کشت نمونه ها

نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت	درصد	تعداد نمونه‌های منفی	درصد
آب انار	۳۰	۴	٪۱۳۰۳۳	۲۶	٪۸۶,۶۶
آب سیب	۳۰	--	-	۳۰	٪۱۰۰
آب پرتقال	۳۰	۴	٪۱۳,۳۳	۲۶	٪۸۶,۶۶
آب انبه	۳۰	-	-	۳۰	٪۱۰۰
آب آناناس	۳۰	-	-	۳۰	٪۱۰۰
آب انگور قرمز	۳۰	-	-	۳۰	٪۱۰۰
آب انگور سفید	۳۰	-	-	۳۰	٪۱۰۰
آب هلو	۳۰	-	-	۳۰	٪۱۰۰
آب آلبالو	۳۰	۳	٪۱۰	۲۷	٪۹۰
آب میوه جات مخلوط	۳۰	۲	٪۶,۶۶	۲۸	٪۹۳,۳۳
مجموع	۳۰۰	۱۳	٪۴,۳۳	۲۸۷	٪۹۵,۶۶



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR نمونه‌های *آلیسایکلو باسیلوس*.

۷۶ نمونه (۱۸/۹۵ درصد) از نظر وجود *آلیسایکلوباسیلوس* مثبت اعلام شدند. سویه‌های جداشده شامل چهار جنس مختلف از این باکتری بودند (Zhang et al., 2013). نتایج این مطالعه به لحاظ درصد آلودگی قرابت قابل پذیرشی با مطالعه حاضر دارد. معتمدی و همکاران نیز گزارشی مبنی بر اثبات آلودگی تعدادی از آبمیوه‌های آلوورا به *A. acidoterrestris* منتشر کرده و بر طبق مطالعات تکمیلی مشاهده نمودند که جدایه‌های فوق ضمن حساسیت به آنتی بیوتیک نالیدیکسیک اسید، به آنتی بیوتیک پلی میکسین B نیز مقاوم بودند (معتمدی و همکاران، ۱۳۹۲). در جنوب آفریقا نیز حضور باکتری *A. acidoterrestris* در آب آلوورا در چند مورد گزارش شده است,Duvenage(2006). با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان به این نتیجه‌گیری رسید که آلودگی آب میوه‌جات به باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* به عوامل متعددی بستگی دارد. موقعیت جغرافیایی، وضعیت آب و هوایی، میزان بهداشت و توجه به استانداردها در پروسه تولید، روش‌های مختلف سالم-سازی، نوع بسته بندی و همچنین به کار گیری روش-های مختلف آزمایش در زمره این عوامل قرار می‌گیرند. در صنعت آبمیوه سازی عمده تمرکز حذف این باکتری بر روی آبمیوه های سیب و پرتقال است (معتمدی و همکاران، ۱۳۹۲)، اما همانطور که نتایج گزارشات حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات مشابه نشان داده‌اند، حضور این باکتری در انواع آب میوه‌ها امری محتمل به نظر می‌رسد و لازم است که اقدامات موثری در جهت پیشگیری و کنترل حضور این ارگانیسم در آب کل میوه‌جات صورت پذیرد. باتوجه به اینکه *آلیسایکلوباسیلوس* در خاک نیز یافت می‌شود از جمله اقدامات سودمند در راستای حذف این باکتری، اینست که عمل شست و شوی محصول به دلیل تماس با خاک به درستی انجام پذیرد، زیرا در واقع میزان آلودگی میوه‌ها به خاک با درجه آلودگی آنها به باکتری ارتباط مستقیم دارد (Cerny et al., 1984)، همچنین به منظور کنترل حضور این میکروارگانسیم در محصولات، ضروری است که پس از عمل پاستوریزاسیون آب میوه-ها، بررسی‌های لازم نسبت به وجود این باکتری صورت گیرد، تا از فساد آبمیوه توسط *آلیسایکلوباسیلوس* جلوگیری به عمل آید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بررسی حاضر از تمامی پرسنل کاردان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد و همچنین کارکنان مراکز صید و توزیع ماهی و میگو در شهرستان گناوه، کمال تشکر و قدردانی را دارند. همچنین از کمک های بی شائبه آقایان دکتر ممتاز، دکتر کلباسی و دکتر صفرپور دهکردی نیز تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱. خواجه نصیری، ش.، شیخی، ن.، حسینی م. (۱۳۸۶). گزارش اولین مورد جداسازی و شناسایی باکتری*Alicyclobacillus acidoterrestris* از آب انارهای صادراتی ایران، نشریه پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، شماره ۷۶، صفحه ۱۰۳-۹۹.

۲. شهابی قهفرخی، ا.، حجازی م.، احمدی زنوز، ع.، قنبرزاده، ب.، ایاسه، ع. (۱۳۹۰). کنترل باکتری*Alicyclobacillus acidoterrestris* در آب سیب بوسیله عصاره‌های پوست انار، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره۸، شماره ۳۲، صفحه ۹۰-۷۹.

۳. شهابی قهفرخی، ا.، قیاسی فر، ش. (۱۳۸۶). بررسی جمعیت باکتریایی *Alicyclobacillus acidoterrestris* در آب سیب تولیدی در ایران، هفدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی. ایران، ارومیه، ۲۴-۲۳ آبان. صفحه ۱۴۰.

۴. معتمدی، ح.، تاجبخش، ا. (۱۳۹۲). گزارش آلودگی آبمیوه های آلوورا به باکتری *Alicyclobacillus*

acidoterrestris. دومین همایش علوم و صنایع غذایی. ایران، قوچان، ۱۰-۹ اردیبهشت.

5. Cerny, G., Hennlich, W., Poralla, K. 1984. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage microorganism. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 179: 224–227.
6. Chang, S., Kang, D. 2004. *Alicyclobacillus spp*. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures, Crit Rev Microbio. 30: 55-74.
7. Duvenage, w. 2006. Detection and isolation of thermophilic bacteria from fruit juice. Department of food science faculty of AgriSciences Stellenbosch University, Thesis (Msc Food Sc (Food Science)), University of Stellenbosch.
8. Oita, S., Kohyama, N. 2002. Antibacterial effect of grape polyphenols against thermoacidophilic bacteria *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 49: 555-558.
9. Pettipher, G. L., Osmundson, M. E., Murphy, J.M. 1997. Method for detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-concentrating drinks. Let App Microbiol. 24: 185-189.
10. Pontius, A.J., Rushing, J.E., Foegeding, P.M. 1998. Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by various pH values and organic acids. J. Food Prot. 61: 41–46.
11. Previdi, M.P., Quintavalla, S., Lusardi, C., Vicini, E. 1997. Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices. Indust Conserve 72: 353–358.
12. Splittstoesser, D.F., Churry, J.J. 1996. Unique spoilage organism of musts and wines, p. 36-41. In: T. Toland and K.C. Fugelsang (ed), Wine Spoilage Microbiology Conference. California State University, Fresno, USA.
13. Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., Churry, J.J. 1998. Control of alicyclobacilus in the juice industry. Dairy Food Environ Sanitation. 18: 585-587.
14. Walls, I., Chuyate, R. 1998. *Alicyclobacillus*-Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy Food and Environ Sanitation. 18: 499-503.
15. Walls, I., Chuyate, R. 2000. Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Aust. 52: 286–288.
16. Wei, C., Harte, F.M., Davidson, P.M., Golden, D.A. 2013. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* using high pressure homogenization and dimethyl dicarbonate. J Food Prot. 76:1041-1045.
17. Wisse, C.A., Parish, M.E., 1998. Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. Dairy Food and Environ. Sanitation. 18: 504-509.
18. Yokota, A., Fujii, T., Goto, K. 2007. Alicyclobacillus: Thermophilic Acidophilic Bacilli. Springer. pp,160.

Isolation of *Alicyclobacillus* from fruits juice in Iran

Rahimi E[1*], Dehghanzad S[2], Doosti A[3], Hasiri z[1]

1. Department of Food Hygiene, College of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2. Assistant Professor of Biology, College of Fundamental Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3. Graduate of microbiology, College of Fundamental Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding Author:** *ebrahimrahimi55@yahoo.com*

Accepted: 22 November 2016 Received: 24 September 2016

Abstract

Heat-loving bacteria Bacillus Alicyclobacillus changing flavor juices and ready to use in recent years in a wide range of large amounts of fruit juice was corrupt world, although there is no previous report indicating its pathogenesis. This research was done to study contamination of packaged juice with the bacteria. A total of 300 samples of pomegranate juice, apple juice, orange juice, mangoes juice, pineapple juice, grape juice (from different companies) at Esfahan was collected and studied for Alicyclobacillus contamination. The samples were tested using culture, biochemical tests and PCR. According to the results, 13 samples (4.33%) were contaminated with Alicyclobacillus. The highest level of contamination among samples was found in pomegranate juice and orange juice (13.3%). Contamination in cranberry juice, mixed species and other samples was 10, and 6.66 %. No contamination was found the other species. Regarding to the obtained results, prevention of bacterial growth especially during storage time and detection of bacteria after pasteurization is necessary.

Keywords: Alysayclobacillus, Corruption, fruit juice, PCR