جداسازی باکتریوفاژ اختصاصی باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris* عامل فساد آب میوه از خاک

امیر تاج بخش[1]، سیده الهام رضا توفیقی[2]، حسین معتمدی[2*]، سولماز رفیعی[1]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

***نویسنده مسئول:** *motamedih@scu.ac.ir. hhmotamedi@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱

چکیده

باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris* مهم‌ترین باکتری عامل فساد آب میوه است و روش‌های مناسب برای حذف این باکتری از آب میوه مورد توجه خاص می‌باشد. استفاده از فاژ در محصولات غذایی به‌تازگی برای کنترل باکتری‌های مواد غذایی به‌طور صنعتی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش جداسازی باکتریوفاژ اختصاصی باکتری *A. acidoterrestris* از خاک می‌باشد. در این مطالعه نمونه‌های جمع‌آوری شده از خاک اطراف درختان کنار (سدر) پس از سانتریفیوژ و فیلتر شدن برای جستجوی فاژ مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار مشخصی از نمونه‌های محیطی به محیط کشت AAB واجد باکتری اضافه گردید و با روش آگار دو لایه جهت بررسی تشکیل پلاک مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل پلاک وجود باکتریوفاژها در مایع فیلتر شده را تأیید کرد. نتایج حاصل از این پژوهش وجود باکتریوفاژ اختصاصی باکتری *A.acidoterrestris* را در نمونه خاک اطراف درخت کنار نشان داد. پایداری این باکتریوفاژها در آب‌میوه‌ها، اختصاصی است و عدم صدمه به کیفیت آب میوه از جمله مزایای استفاده از این روش نسبت به سایر روش‌ها است.

واژگان کلیدی: *Alicyclobacillus acidoterrestris*، فساد آب میوه، باکتریوفاژ.

مقدمه

باکتریوفاژها ویروس‌هائی با قابلیت حمله به باکتری‌ها هستند و فقط میزبان خاص خود را آلوده می‌کنند و در آن تکثیر می‌یابند. اختصاصی بودن میزبان به‌طور کلی در سطح سویه، گونه و یا به‌ندرت در سطح جنس می‌باشد. با استفاده از این ویژگی می‌توان باکتری‌های مولد فساد مواد غذایی را مورد هدف قرار داد. استفاده از باکتریوفاژ در درمان بیماری‌های عفونی بعد از کشف باکتریوفاژها مورد توجه قرار گرفت (Hagens and Loessner, 2010). با وجود آن که تلاش‌های اولیه با موفقیت‌هایی همراه بود ولی با ظهور آنتی‌بیوتیک‌ها تحقیقات بر روی روش فاژ درمانی متوقف گردید. اما اخیراً به‌دلیل مقاوم شدن باکتری‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها توجه بیشتری به فاژ درمانی شده است. استفاده از فاژها برای حذف پاتوژن‌ها از مواد غذایی بسیار مهم می‌باشد. این امر به‌ویژه برای پاتوژن‌های باکتریایی مثل لیستریا، که پس از ورود به بدن میزبان، به‌عنوان پاتوژن‌های درون سلولی رفتار می‌کنند بسیار حائز اهمیت می‌باشد. زیرا این پاتوژن‌ها پس از ورود به بدن میزبان توسط سیستم ایمنی بدن و یا حتی تجویز فاژ در فرد مبتلا به لیستریوز قابل شناسایی و حذف نمی‌باشند، در حالی‌که در مواد غذایی به‌راحتی با استفاده از فاژها قابل شناسایی و حذف می‌باشند. استفاده از فاژها برای مواد غذایی با قوانین ساده‌تری همراه بوده است به‌طوری که چندین مجوز معتبر برای استفاده از فاژها در مواد غذایی صادر شده است (Hagens and Loessner, 2010; Heringa et al., 2010; Denes and Wiedmann, 2014). به‌دلیل اختصاصیت بالای باکتریوفاژها برای میزبان، در

درمان بیماری‌های با منشاء غذایی از مخلوط باکتریوفاژهای اختصاصی باکتری‌های خاص مواد غذایی استفاده می‌شود. از طرف دیگر فعالیت‌های سینرژیستی در کاربرد مخلوط فاژهای مختلف نیز مشاهده شده است. میان باکتریوفاژها و باکتریوسین‌ها نیز فعالیت سینرژیسم مشاهده شده است. در اوایل دهه ۹۰ میلادی به‌دنبال موج گرمای بی‌سابقه در اروپا مقادیر زیادی آب‌میوه دچار فساد با منشاء باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* شد که توجه اروپایی‌ها به‌این باکتری را بیشتر جلب نمود، به‌طوری‌که سایر کشورهای جهان نیز به این موضوع علاقمند گردیدند. از آنجا که رشد این باکتری بر خلاف بیش‌تر باکتری‌های مواد غذایی با ایجاد گاز همراه نیست، لذا از ظاهر بسته‌بندی آب میوه و مشاهده تورم در آن نمی‌توان به فساد و آلودگی آب‌میوه پی برد (Baumgart et al., 1997; Ling-Xia, 2012). انجمن بین المللی فرآوری مواد غذایی در سال ۱۹۹۸ بیان داشت که ۳۵ درصد فسادهای گزارش شده در آب‌میوه‌ها ناشی از فساد باکتری‌های اسپوردار اسید دوست است و از آنجا که به‌جز این باکتری سایر میکروارگانیسم‌های رایج در آب‌میوه‌ها و محصولات اسیدی دارای مقاومت دمایی پایین‌تری هستند، اخیراً از این باکتری به‌عنوان باکتری هدف در این محصولات یاد می‌شود. این باکتری جزء باکتری‌های بیماری‌زا نمی‌باشد ولی فساد ایجاد شده توسط این باکتری خسارت‌های اقتصادی فراوانی به‌دنبال خواهد داشت. محققان از تکنیک‌های پاستوریزاسیون فراوانی برای حذف این باکتری از آب‌میوه استفاده نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به‌مطالعه (Yamazakia et al., 2000) با استفاده از نایسین، (Baysal et al., 2010) با استفاده از گرادیان ولتاژ و دما، (Casas et al., 2012) با استفاده از فشار بالای گاز کربنیک نام‌برد که همگی دارای اثرات منفی بر روی رنگ ماده غذایی، قیمت نسبتاً بالا و محدودیت‌های فراوان برای جلوگیری از صدمه دیدن مواد غذایی می‌باشند و مهم‌تر از همه موارد ذکر شده، نداشتن اثرات دائمی می‌باشد. هدف از این پژوهش جدا کردن باکتریوفاژ اختصاصی این باکتری از خاک اطراف درختان کنار در شهرستان اهواز که متوسط دمای آن بالاست، می‌باشد.

مواد و روش کار

باکتری *A. acidoterrestris* یک باکتری خاک‌زی است و بهینه رشد آن در محیط‌های اسیدی با متوسط دمایی ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، لذا باکتریوفاژ آن نیز باید از چنین محیط‌هایی جداسازی گردد. خاک شهرستان اهواز به‌دلیل داشتن متوسط دمایی بالا و خاک زیر درختان کنار (سدر) به‌دلیل میوه‌هایی که معمولاً زیر آن می‌ریزد و تخمیر می‌شوند محیط اسیدی است و لذا مناسب برای انجام این پژوهش می‌باشد. نمونه‌های خاک از عمق ۵ سانتی‌متری برداشته شد و در ظروف استریل به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه خاک مورد نظر پس از اضافه کردن حجم مناسب آب مقطر، خوب مخلوط شد تا به‌طور کامل حل شود، سپس این محلول از صافی شنی عبور داده شد تا ذرات درشت آن گرفته شود. پس از آن از صافی کاغذی عبور داده شد تا ذرات معلق بیشتری از مخلوط حذف شد. مایع حاصله برای اولین مرحله غنی سازی درون ارلن‌های استریل ریخته شد و به آن ۵ میلی‌لیتر از کشت معادل نیم مک فارلند از باکتری *A. acidoterrestris* اضافه شد. باکتری قبلاً از آب‌میوه جداسازی و توسط روش‌های بیوشیمایی تشخیص و با روش مولکولی تأیید شده بود. سپس به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر آب سیب استریل اضافه شد و در گرم‌خانه با دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و با شیک ۱۱۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳ شبانه روز قرار داده شد. در مرحله بعد محیط کشت درون فالکون‌های استریل ریخته شد و در دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. از این مرحله به بعد تمامی فرآیندها برای جلوگیری از آلودگی در زیر هود

بیولوژیک و کنار شعله انجام پذیرفت. مایع رویی محلول از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد تا ذرات ریز معلق و باکتری‌ها حذف شوند. سپس مایع رویی مجدداً با فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای انجام مراحل بعدی نگهداری شد. در مرحله بعد ۱ میلی‌لیتر مایع فیلتر شده با ۱ میلی‌لیتر از براث حاوی باکتری در دوره رشد نیم مک فارلند مخلوط و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت AAB (Alicyclobacillus acidoterrestris Broth) تازه انتقال داده شده و به‌منظور غنی سازی مجدد برای یک شبانه روز در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۱۰ دور در دقیقه گرم‌خانه گذاری شد. بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت محتوی درون ارلن توسط فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد و مایع حاصله درون یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. لازم به‌ذکر است به‌دلیل اینکه مدارکی دال بر مقاومت باکتریوفاژ مورد نظر به کلروفرم وجود نداشت از کلروفورم استفاده نشد. در این مرحله، از تکنیک آگار دو لایه برای بررسی وجود باکتریوفاژ و تشکیل پلاک استفاده گردید. در تکنیک آگار دولایه، لایه اول دارای میزان ۲ درصد آگار و لایه دوم حاوی سافت آگار (۰/۸۲ درصد آگار) می باشد. ابتدا به‌دلیل مشخص نبودن تعداد باکتریوفاژ در مایع فیلتر شده، مقادیر ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر از آن به‌طور جداگانه به ۳ میلی‌لیتر سافت آگار به‌همراه ۵۰۰ میکرولیتر باکتری در مرحله رشد نیم مک فارلند اضافه شد و سریعاً ورتکس و برروی لایه اول پخش گردید و پس از چند دقیقه در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پلاک‌های حاصل با پیپت پاستور جمع‌آوری شده و درون میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر کلرید منیزیم مخلوط گردید. به میکروتیوب‌های حاوی پلاک‌های محیط کشت میزان ۱٪ نمک در غلظت نهایی یک مولار اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت درون یخ قرار داده شد. سپس این میکروتیوب‌ها با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و مایع رویی به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و توسط فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر و به دور از نور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بار دوم با تکنیک آگار میزان ۵۰ میکرولیتر از مایع حاوی فاژ به ۴۰۰ میکرولیتر از باکتری در فاز نیم مک فارلند و ۳ میلی‌لیتر سافت آگار AAM اضافه، ورتکس و بر روی لایه اول پخش گردید. پلیت‌ها در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید و پلاک‌های تک حاصله از لحاظ مورفولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند (Yu et al., 2006).

نتایج

از میان روش‌های مورد استفاده برای تأیید وجود باکتریوفاژ برای باکتری *A. acidoterrestris* از قبیل تکنیک آگار دولایه، کشت چمنی باکتری به‌همراه باکتریوفاژ و تکنیک قطره چکان، بهترین تکنیک برای تأیید وجود این باکتری، تکنیک آگار دولایه می باشد. پلاک‌های تشکیل شده در این روش مشاهده گردید. باکتریوفاژ مورد نظر دارای پلاک‌های تک متوسط از لحاظ اندازه بود. این باکتریوفاژ از خاک با اسیدیته زیر ۶ جداسازی شده است و در طی مراحل این پژوهش باکتریوفاژها در محیط کشت AAM دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته کم‌تر از ۵ توانایی لیز باکتری را داشتند. این موضوع نشان‌دهنده آن است که باکتریوفاژ جداسازی شده برای این باکتری، به دمای ۴۵- ۴۳ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته کم‌تر از ۵/۳-۵/۵ مقاوم است.

بحث

استفاده از باکتریوفاژها برای کنترل زیستی مواد غذایی در برابر عوامل میکروبی در سال‌های اخیر مورد توجه خاصی قرار گرفته است (Heringa et al., 2010). براساس پایگاهای اطلاعاتی علمی تاکنون گزارشی مبتنی بر جداسازی باکتریوفاژ برای باکتری *A. acidoterrestris* منتشر نشده است اما از میان جنس

Alicyclobacillus باکتریوفاژ گونه acidocaldarius از چشمه‌های آب گرم و اسیدی جداسازی و شناسایی شده است (Sakaki et al., 1977; Bamford, 2005; Sakaki and Oshima 1976). هم‌چنین در برخی مطالعات توانسته‌اند ۱۵۰ سویه باکتریوفاژ را از خاک‌های قلیایی چشمه‌های آب‌گرم جدا سازی کنند که از جمله می‌توان به باکتری‌های عفونت‌زای شاخه Deinococcus Thermus اشاره کرد (Yu, Slater et al., 2006). از جمله باکتریوفاژهایی که تاکنون برای باکتری‌های چشمه‌های آب‌گرم با محیط اسیدی یا قلیایی ذکر گردیده است می‌توان به فاژهای متعلق به خانواده Myoviridae، Siphoviridae، Tectiviridae و Inoviridae اشاره کرد که همگی از چشمه‌های آب‌گرم با شرایط قلیایی یا اسیدی جداسازی شده‌اند، خصوصاً از جداسازی باکتریوفاژ Tectiviridae برای جنس Alicyclobacillus نام برده شده است (Sakaki and Oshima, 1976). مطالعه حاضر به‌منظور جدا سازی باکتریوفاژ آلوده کننده باکتری *Alicyclobacillus acidoterrestris* به‌دلیل اهمیت آن در فساد آب میوه‌ها و هم‌چنین کارایی کم روش‌های استاندارد برای از بین بردن اسپور این باکتری صورت پذیرفت. در این پژوهش خاک زیر درخت سدر در شهر اهواز که در ماه‌های تابستان به‌دلیل دمای بالا و هم‌چنین وجود میوه‌های متعدد کنار در سطح خاک (تجریه میوه ها بر سطح خاک موجب اسیدی شدن نسبی خاک می‌گردد) و می‌تواند جایگاه مناسبی برای رشد این باکتری باشد، برداشت شد. جداسازی باکتریوفاژ این باکتری در این پژوهش تأیید کننده مطالعات قبلی صورت گرفته توسط سایر پژوهشگران می‌باشد که جایگاه هدف جداسازی همه آن‌ها محیط‌های گرم با شرایط اسیدی یا قلیایی می‌باشد، با این تفاوت که در این پژوهش دیگر چشمه‌های آب‌گرم جایگاه جداسازی نبوده است بلکه خاک زیر درخت سدر در مناطق گرم هدف جداسازی باکتریوفاژ بوده است. با توجه به‌اینکه مراحل کشت و جداسازی این فاژ در دمای نسبتاً بالا (۴۳ درجه سانتی گراد) و محیط اسیدی آب‌میوه بوده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این فاژ مقاومت نسبی به دما و pH اسیدی دارد و به‌راحتی می‌توان از این فاژ برای حذف این باکتری استفاده کرد. از جمله برتری‌هایی که فاژ برای حذف باکتری‌های عامل فساد نسبت به دیگر روش‌ها دارد این است که فاژ کاملا اختصاصی باکتری است و فقط توانایی لیز باکتری اختصاصی خود را دارد. بنابراین به دیگر باکتری‌ها و یا سلول‌های پر یاخته هیچ گونه تمایلی ندارند و در نتیجه صدمه‌ای هم به آن‌ها وارد نمی‌کنند. لذا با این روش می‌توان باکتری‌های عامل فساد که با فرآیندهای پاستوریزاسیون از بین نمی‌روند را حذف کرد. با توجه به‌اینکه در این پژوهش جداسازی باکتریوفاژها از زیر درختان سدر در مناطق با آب و هوای گرم صورت پذیرفته است می‌توان این باکتریوفاژ-ها را به‌عنوان یک کنترل کننده زیستی باکتری‌های عامل فساد آب‌میوه‌ها در زیر درختان میوه در این مناطق مورد استفاده قرار داد تا درصد آلودگی میوه‌ها کم‌تر شود. هم‌چنین پیش‌نهاد می‌شود که پودرهای حاوی این باکتریوفاژها را برروی میوه‌های در حال حمل به کارخانجات آب‌میوه‌گیری ریخته تا در مدت زمان حمل و نقل نیز فرایند حذف باکتری‌ها بر روی میوه‌ها صورت گیرد.

منابع

1. Bamford, D. 2005. Tectiviridae Virus taxonomy, Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, London, U.K.
2. Baumgart, J., and Husemann, M. 1997. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, significance and detection in beverages and beverage base. Flussiges Obst. 64: 178.

3. Baysal, A. H. and Icier, F. 2010. Inactivation kinetics of Alicyclobacillus acidoterrestris spores in orange juice by ohmic heating: effects of voltage gradient and temperature on inactivation. J Food Protect. 73: 299-304.
4. Casas, J., Valverde, M.T., and Marín-Iniesta, F. 2012. Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores by high pressure CO2 in apple cream. Int J Food Microbiol. 156: 18-24.
5. Denes, T., and Wiedmann, M. 2014. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: implications for improving applications in food safety. Curr Opin Biotechnol. 26: 45-49.
6. Hagens, S., and Loessner, M.J. 2010. Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. Curr Pharm Biotechnol. 11: 58-68.
7. Heringa, S.D., Kim, J., Jiang, X., Doyle, M.P., Erickson, M.C. 2010. Use of a mixture of bacteriophages for biological control of Salmonella enterica strains in compost. Appl Environ Microbiol. 76: 5327-5332.
8. Ling-Xia, J., Cheng-Wei, H., Ming-Tao, F., and Xin-Yuan, W. 2012. Optimization of DNA extraction by microwave treatment and PCR detection of spoilage *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice. Food Sci. 33: 154-157.
9. Sakaki, Y., and Oshima, T. 1976. A new lipid-containing phage infecting acidophilic thermophilic bacteria. Virol. 75: 256-259.
10. Sakaki, Y., Yamada, K., Oshima, M., and Oshima, T. 1977. Bacteriophage piNS11: a Lipid-Containing Phage of Acidophilic Thermophilic Bacteria. II. Purification and Some Properties of the Phage. J Biochem. 82: 1451-1456.
11. Yamazaki, K., Murakami, M., Kawai, Y., Inoue, N., and Matsuda, T. 2000. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. Food Microbiol. 17: 315-320.
12. Yu, M.X., Slater, M.R., and Ackermann, H.-W. 2006. Isolation and characterization of *Thermus bacteriophages*. Arch Virol. 151: 663-679.