گزارش آلودگی آب پرتقال پاستوریزه به باکتری *Bacillus licheniformis*

حسین معتمدی[1*]، امیر تاج بخش[2]

1. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.
2. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

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

چکیده

این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی باکتریهایی که قادر به تحمل شرایط پاستور یزاسیون آب پرتقال هستند، انجام شد. در این بررسی، 16 نمونه آب پرتقال تهیه و در شرایط استریل مورد مطالعه قرار گرفتند. مقدار 0/5 میلی لیتر از نمونه در محیط اورنج سرم آگار، تلقیح و در دمای 43 درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید و سویهها با استفاده از تستهای بیوشیمیایی شناسایی شدند. نتایج نشان داد که از 16 نمونه آب پرتقال، 2 نمونه آلوده به باکتری بودند. باکتری جدا شده از این نمونهها قادر به رشد در دمای 50 درجه سانتیگراد و تشکیل کیست روی محیط اورنج سرم آگار بود. این جدایه پس از شناسایی با استفاده از آزمون‌های سیستم طبقهبندی لینه گونه *Bacillus licheniformis* تشخیص داده شد. باکتری مذکور علیرغم بیماریزا نبودن ولی ممکن است در شناسایی اولیه با باسیلهای موجود در آب میوه که عامل فساد هستند اشتباه گرفته شود . لذا باید تستهای متمایز کنندهای را برای جداسازی آن از آلیسایکلویاسلوسها انجام داد تا آب میوه تولیدی به اشتباه آلوده گزارش نشود . به علاوه جداسازی این باکتری نشان دهنده نامناسب بودن شرایط اعمال شده برای از بین بردن باکتریهای موجود در آب میوه است و ممکن است امکان رشد باکتریهای عامل فساد آب میوه نیز فراهم شود.

واژگان کلیدی: فساد میکروبی، آب میوه، *Bacillus licheniformis*..

مقدمه

پاستوریزاسیون در نوشیدنی - های غیر الکلی با اسیدیته کمتر از 4، در شرایط 65 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه انجام میگیرد (Yokota et al., 2008). در ایران چندین روش برای پاستوراسیون آب میوه وجود دارد که مهمترین آن پاستوریزاسیون در دمای 70 تا 75 درجه سانتیگراد به مدت 20 دقیقه می باشد. این شرایط به باکتری های غیرمقاوم به دما، اجازه رشد نمیدهد و تنها باکتریهایی که به دما و اسید مقاوم هستند ، پس از انجام پاستوریزاسیون، توانایی بقاء در آب میوه را دارند. از جمله این باکتری ه ا آلیسایکلوباسیلوسها میباشند که عامل فساد آب میوه هستند. در میان سایر گونههای باسیلوس، اسپورهای باکتری *Bacillus licheniformis* دارای مقاومت دمایی بالایی بوده و دمای 135 درجه سانتی گراد را تحمل می کنند (Simmonds, Mossel et al., 2003; Janštová and Lukášová, 2001). این باکتری خاکزی، گرم مثبت و

میلهای شکل، بیهوازی اختیاری، تولید کنندهی اسید از اینوزیتول، احیا کنندهی نیترات و دارای قابلیت رشد در دمای 60 و 13 درجه سانتیگراد میباشد و بیشترین حساسیت را به آنتی بیوتیک سفالکسین با هاله عدم رشد 44 میلی متر دارد. این گونه دارای سرعت رشد و پخش شدن بالایی در محیط کشت است و از آن در صنعت برای تولید پروتئاز استفاده میشود (Bisset and Street, 1973; Wyrick and Rogers 1973)، همچنین توانایی تولید آنتی بیوتیک باسیتراسین را دارد و به آنتی بیوتیکهای باسیتراسین و پلیمیک سین B و سفیکسیم مقاوم است (Mandal, Mandal et al., 2005; Podlesek, Comino et al., 199) و اهمیت ویژهای در صنایع تولید مواد شوینده دارد ب ه طوری که پروتئازهای قلیایی مهمی از قبیل سوبتیلیسین NPB و سوبتیلیسین کارلسبرگ از این باکتری بدست میآید (Jacobs et al., 1985; Falahatpishe et al., 2005). همچنین از *Bacillus licheniformis* برای کنترل زیستی برخی بیماریهای غذایی گیاهی از جمله کنترل بیماری های میوه منگو و کنترل کپک خاکستری روی سیب استفاده می شود (Silimela and Korsten 2007; Jamalizadeh, et al., 2008). مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی این باکتری مقاوم به حرارت در آب پرتقال انجام شد.

مواد و روشها

به منظور انجام آزمایش، 16 نمونه آب پرتقال در پاکتهای پلاستیکی با لفافه آلومینیومی به صورت درب بسته مورد استفاده قرار گرفت. پس از ضدعفونی ناحیه درب آ ب میوهها بهوسیله الکل و در کنار شعله، میزان ۰/۵ میلیلیتر از آب میوه با استفاده از سمپلر و سرسمپلرهای استریل، برداشت شد و در دو محیط PDA (دارای سیکلوهگزامید به منظور جلوگیری از رشد قارچ و مخمر) و اورنج سرم آگار، عمل تلقیح صورت گرفت. محیطهای کشت در دمای 45 درجه سانتیگراد به مدت ۵-۳ روز گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت، به منظور کشت خالص، کلنیهای ظاهر شده بر روی محیط های کشت مجدداً بر روی محیط اورنج سرم آگار به روش خطی کشت داده شدند. سپس آزمون های مختلف تشخیص بیوشیمیایی بر اساس سیستم طبقه بندی لینه انجام گرفت. تست آنتی بیوگرام این باکتری برای آنتی بیوتیکهای شاخص به صورت کشت باکتری و قرار دادن دیسک آنتیبیوتیک در محیط مولر هینتون آگار صورت گرفت (CLSI, 2007). سوارمینگ این باکتری در محیط کشت نوترینت آگار و مولر هینتون آگار و اورنج سرم آگار با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و رنگ آمیزی اسپور باکتری با استفاده از رنگ مالاشیت گرین انجام شد.

نتایج

براساس سیستم طبقه بندی لینه، از ۱۶ نمونه آب پرتقال مورد آزمایش، 2 باکتری جدا شده *Bacillus licheniformis* تشخیص داده شد. نتایج سایر تستهای بیوشیمیایی در جدول 1 مشاهده میشود. در این بررسی قابلیت رشد این باکتری بر روی محیط های مولر هینتون آگار، نوترینت آگار، پوتیتو دکستروز

آگار و اورنج سرم آگار مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این باکتری بیشترین قابلیت رشد را بر روی مو لر هینتون آگار و اورنج سرم آگار دا رد، بهطوریکه با کشت یک لوپ از این باکتری در یک گوشه از پلیت 2/5 سانتیمتری اورنج سرم آگار، بعد از قرارگیری پلیت در گرمخانه با دمای 43 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت ، تمام محیط کشت را فرا گرفت . باکتری *Bacillus licheniformis* در محیط کشت اورنج سرم آگار ، سطح کشت را به حالت ریش هایی در میآورد و میتوان از این حالت برای شناسایی این باکتری استفاده نمود.

جدول 1- نتاج تستهای بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری *Bacillus licheniformis*

تست	تست اندول	تست کاتالاز	تست گرم	تست سیتراز	تست ژلاتین	تست لاکتوز	تست هوازی	تست اوره	تست VP	تست MR	هیدرولیز بیهوازی نشاسته	رشد دما، 60 درجه	رشد در دمای 65	رشد در دمای 13	تولید از گلوکز اسید	تولید گاز از گلوکز
نتایج	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+

بحث

اسپور باکتری *Bacillus licheniformis* مقاوم به دما و اسید است و دما و شرایط استریزاسیون را تحمل کند لذا میتواند در مواد غذایی بعد از فرایند استریزاسیون زنده بماند و در صورت ایجاد شرایط مناسب از حالت اسپور خارج شود و در محیط رشد و تکثیر کند. گزارش آلودگی آب میوهها به باسیلوس - هایی همچون *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* در مطالعات قبلی گزارش گردید است (Sherafati Chaleshtori and and Sherafati Chaleshtori 2008) ولی تا کنون گزارشی مبتنی بر تشخیص آلودگی به باکتری *Bacillus licheniformis* در آب میوهها در ایران یافت نشد. از گزارشات صورت گرفته در سایر کشورها میتوان به جداسازی اسپور باکتری از آب سیب، هویج و گوجه (Rodriguez, Cousin et al., 1992; Grande, Lucas et al., 2006; Tola and Ramaswamy 2014) و از سایر مواد غذایی میتوان به آرد، نان، شیر و ماست اشاره کرد (Mansour et al., 1999; Sorokulova et al., 2003; Tanaka, Ito et al., 2012). همچنین گزارش مستقیمی مبنی بر جداسازی این باکتری از آب پرتقال ارائه نشده است. با توجه به جداسازی این باکتری از آب سیب و گوجه که هر دو دارای شرایط اسیدی هستند، احتمال رشد این باکتری در آب پرتقال (به دلیل وجود شرایط اسیدی) نیز وجود دارد و مطالعه حاضر نیز این موضوع را تأیید میکند. باکتری *Bacillus licheniformis* دارای توانایی رشد سریع در محیط کشت میباشد (Bisset and Street, 1973). این موضوع نیز در مطالعه ما مشاهده و تأیید شد. باکتری *Bacillus licheniformis* با توجه به تولید اسپورهای مقاوم به دما و اسید، علیرغم بیماری- زا نبودن از این جنبه که در شناسایی اولیه با باسیلهای موجود در آب میوه که عامل فساد هستند ممکن است اشتباه گرفته شود، قابل اهمیت است و باید تستهای متمایز کنندهای را برای جداسازی آنها از آلیسایکلوباسیلوس انجام داد

تا آب میوه تولیدی به اشتباه آلوده گزارش نشود. تستهایی را که این گزارش برای متمایز کردن آلیسایکلوباسیلوس این گونه پیشنهاد میکند، تست احیای نیترات و هیدرولیز نشاسته میباشد که هر دو تست در *آلیسایکلوباسیلوس* منفی و در *Bacillus licheniformis* مثبت می - باشند. علاوه بر این، بروز این آلودگی نشان دهنده این است که ممکن است سایر باکتریهای مقاوم به پاستوریزاسیون، در آب میوههای پاستوریزه باقی مانده باشند و در صورت نگهداری آب میوه در شرایط مناسب رشد آنها، موجب فساد محصول شو د. تمامی باکتریهای جدا شده از آب میوه ها، باکتریهایی هستند که از محیط اطراف در حین تولید، زمان نگهداری و حمل و نقل و جابجایی، توسط افراد، وسایل، تجهیزات غیر استریل و آسیبهای وارده به ظروف آب میوه قابل انتقال به آب میوهها میباشند که در تمامی این مراحل با دقت بیشتر، شرایط تولید و نقل و انتقال و نگهداری بهتر قابل کنترل میباشد.

References

1. Bisset, K. and Street, J. 1973. Morphological Phases in the Swarm of *Bacillus licheniformis*, J General Microbiol. 76: 369-373.
2. CLSI, 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania.
3. Falahatpishe, H., Jalali, M. Badami, N., and Mardani, N. 2005. Production and purification of alkaline protease enzyme produced from *Bacillus licheniformis* of soil, J Rafsanjan Univ Med Sci. 5: 312-319.
4. Grande, M., Lucas, R. Abriouel, H., Valdivia, E., Ben Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Cañamero, M., and Gálvez, A. 2006. Inhibition of *Bacillus licheniformis* LMG 19409 from ropy cider by enterocin AS-48, J Appl Microbiol. 101: 422-428.
5. Jacobs, M., Eliasson, M. Uhlén, M., and Flock, J.I. 1985. Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*, Nucleic Acids Res. 13: 8913-8926.
6. Jamalizadeh, M., Etebarian, H. Alizadeh,A., and Aminian, H. 2008. Biological control of gray mold on apple fruits by *Bacillus licheniformis* (EN74-1), Phytoparasitica. 36: 23-29.
7. Janštová, B. and Lukášová, J. 2001. Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow's milk and farm environment, Acta Vet Brno. 70: 179-184.
8. Mandal, M.D., Mandal, S., and Nishith Kumar, P. 2005. Plasmid-mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a fresh water fish *Labeo rohita*, BioMed Res Int. 3: 280-286.
9. Mansour, M., Amri, D. Bouttefroy, A., Linder, M., Milliere, J.B. 1999. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations, J Appl Microbiol. 86: 311-324.
10. Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R., and Grabnar, M. 1995. *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance, Mol Microbiol. 16: 969-976.
11. Rodriguez, J., Cousin, M., and Nelson, P.E. 1992. Oxygen requirements of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* in tomato juice, ability to grow in aseptic packages, J Food Sci. 57: 973-976.
12. Sherafati Chaleshtori, F., and Sherafati Chaleshtori, R.S. 2008. Study of The Prevalence and associated factors of bacterial contamination in fruit juice packing, J Shahrekord Univ Med Sci. 10: 48-53.
13. Silimela, M., and Korsten, L. 2007. Evaluation of pre-harvest *Bacillus licheniformis* sprays to control mango fruit diseases, Crop Prot. 26: 1474-1481.
14. Simmonds, P., Mossel, B., Intaraphan, T., Deeth, H.C. 2003. Heat resistance of Bacillus spores when adhered to stainless steel and its

relationship to spore hydrophobicity, J Food Prot. 66: 2070-2075.

15. Sorokulova, I., Reva, O. Smirnov, V.V., Pinchuk, I.V., Lapa, S.V., Urdaci, M.C. 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of Bacillus strains isolated from flour and ropy bread, Lett Appl Microbiol. 37: 169-173.
16. Tanaka, T., Ito, A., and Kamikado, H. 2012. Control of *Bacillus licheniformis* Spores isolated from Dairy Materials in Yogurt Production, Biocontrol Sci. 17: 169-173.
17. Tola, Y.B. and Ramaswamy, H.S. 2014. Thermal destruction kinetics of *Bacillus licheniformis* spores in carrot juice extract as influenced by pH, type of acidifying agent and heating method, LWT-Food Sci Technol. 56: 131-137.
18. Wyrick, P.B. and Rogers, H.J. 1973. Isolation and characterization of cell wall-defective variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Jl Bacteriol. 116: 456-465.
19. Yokota, A., Fujii, T., and Goto, K. 2008. Alicyclobacillus: Thermophilic Acidophilic Bacilli, Springer. 159 p.

A report on pasteurized orange juice contamination to *Bacillus licheniformis*

Hossein Motamedi[1*], Amir TajBakhsh[2]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
2. MSc. Students, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

[*]Corresponding author: *hhmotamedi@yahoo.com, motamedih@scu.ac.ir*

Abstract

Presence of the Fruit juice spoilage bacteria, including *Bacillus* spp., can be problematic in fruit juice industry. The aim of this study was to isolate and identify the bacteria being able to tolerate orange juice pasteurization conditions. In this study, 16 samples of orange juice were prepared and investigated in sterile conditions. 0.5 ml of each sample was inoculated in orange serum agar medium and incubated at 43 °C. The isolates were identified using biochemical and antibiogram tests. As a result, From 16 prepared samples, 2 samples were contaminated with bacteria. The bacterium isolated from these samples was able to grow at up to 50 °C on Orange Serum agar. This isolate was then identified as *Bacillus licheniformis* using the classification system of Linnaeus. Despite of having no pathogenic nature and producing the spores resistant to temperature and acid, *Bacillus licheniformis* is of great importance according to the viewpoint that it can be mistaken in primary detection by *Bacilluses of fruit juice which are the* spoilage agents *and* differentiated tests should be done to separate them from *Alicyclobacillus* spp for preventing from presenting wrong report. Furthermore, the isolation of these bacteria indicates the inappropriateness of processing conditions to eliminate bacteria from fruit juice that may provide possibilities for growth of fruit juice spoilage bacteria.

Keywords: Microbial spoilage, Fruit juice, *Bacillus licheniformis*.