گزارش آلودگی آب پرتقال پاستوریزه به باکتری *Bacillus licheniformis*

حسین معتمدی[1*]، امیر تاج بخش[2]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران.

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱۸

چکیده

این تحقیق به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌هایی که قادر به تحمل شرایط پاستوریزاسیون آب پرتقال هستند، انجام شد. در این بررسی، ۱۶ نمونه آب پرتقال تهیه و در شرایط استریل مورد مطالعه قرار گرفتند. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در محیط اورنج سرم آگار، تلقیح و در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری گردید و سویه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. نتایج نشان داد که از ۱۶ نمونه آب پرتقال، ۲ نمونه آلوده به باکتری بودند. باکتری جدا شده از این نمونه‌ها قادر به رشد در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و تشکیل کیست در 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، ممکن است در شناسایی اولیه با باسیل‌های موجود در آب میوه که عامل فساد هستند اشتباه گرفته شود، لذا باید آزمون‌های متمایز کننده‌ای را برای جداسازی آن از آلیسایکلویاسلوس‌ها انجام داد تا آب میوه تولیدی به‌اشتباه آلوده گزارش نشود. به‌علاوه 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 نوشیدنی‌های غیر الکلی با اسیدیته کم‌تر از ۴، در شرایط ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام می‌گیرد (Yokota et al., 2008). در ایران چندین روش برای پاستوریزاسیون آب میوه وجود دارد که مهم‌ترین آن پاستوریزاسیون در دمای ۷۰ تا ۷۵ درجه سانتی‌گرادبه‌مدت ۲۰ دقیقه می‌باشد. این شرایط به باکتری‌های 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 باکتری‌ها آلیسایکلوباسیلوس‌ها می‌باشند که عامل فساد آب‌میوه هستند. در میان سایر گونه‌های باسیلوس، اسپورهای باکتری *B. licheniformis* دارای مقاومت دمایی بالایی بوده و دمای ۱۳۵ درجه سانتی‌گراد را تحمل می‌کنند (Simmonds 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 ۶۰و۱۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و بیشترین حساسیت را به آنتی‌بیوتیک سفالکسین با هاله عدم رشد ۴۴ 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 آنتی‌بیوتیک باسیتراسین را دارد و به آنتی‌بیوتیک‌های باسیتراسین و پلی‌میکسین B و سفیکسیم مقاوم است (Mandal et al., 2005; Podleseket al., 1995) و اهمیت ویژه‌ای در صنایع تولید مواد شوینده دارد به‌طوری‌که پروتئاز های قلیایی مهمی از قبیل سوبتیلیسین BPN و سوبتیلیسین کارلسبرگ از این باکتری به‌دست می‌آید (Jacobs et al., 1985; فلاحت پیشه و همکاران،

۱۳۸۴). هم‌چنین از*B. licheniformis* برای کنترل زیستی برخی بیماری‌های غذایی گیاهی از جمله کنترل بیماری‌های میوه انبه و کنترل کپک خاکستری روی سیب استفاده می‌شود (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 روش‌کار

به‌منظور انجام آزمایش، ۱۶ نمونه آب پرتقال در پاکت های پلاستیکی با پوشش آلومینیومی به‌صورت درب بسته مورد استفاده قرار گرفت. پس از ضدعفونی ناحیه درب آب 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 پوتیتو دکستروز آگار (دارای سیکلوهگزامید به‌منظور جلوگیری از رشد قارچ و مخمر) و اورنج سرم آگار، عمل تلقیح صورت گرفت. محیط‌های کشت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵-۳ روز گرم‌خانه گذاری شدند. پس از این مدت، به‌منظور کشت خالص، کلنی های ظاهر شده بر روی محیط های کشت مجدداً بر روی محیط اورنج سرم آگار به‌روش خطی کشت داده شدند. سپس آزمون‌های مختلف تشخیص بیوشیمیایی بر اساس سیستم طبقه بندی لینه انجام گرفت. تست آنتی بیوگرام این باکتری برای آنتی بیوتیک‌های شاخص به‌صورت 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، ۲ باکتری جدا شده *B. licheniformis* تشخیص داده شد. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ مشاهده می‌شود. در این مطالعه قابلیت رشد این باکتری بر روی محیط‌های مولر هینتون آگار، نوترینت آگار، پوتیتو دکستروز آگار و اورنج سرم آگار نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این باکتری بیشترین قابلیت رشد را بر روی مولر هینتون آگار و اورنج سرم آگار دارد، به‌طوری‌که با کشت یک لوپ از این باکتری در یک گوشه از پلیت ۲/۵ سانتی‌متری اورنج سرم آگار، بعد از قرارگیری پلیت در گرم‌خانه با دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، تمام محیط کشت را فرا گرفت. این باکتری در محیط کشت اورنج سرم آگار، سطح کشت را به‌حالت ریشه‌ایی در می‌آورد و می‌توان از این حالت برای شناسایی این باکتری استفاده نمود.

جدول ۱- نتاج آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی یاکتری *Bacillus licheniformis*

	احیای نیترات	تست تولید H_2S	تست اندول	تست کاتالاز	تست گرم	تست سیترات	تست ژلاتین	تست لاکتوز	تست هوازی	تست اوره	تست VP	تست MR	هیدرولیز نشاسته	رشد در جار بی‌هوازی	رشد در دمای ۶۰	رشد در دمای ۶۵	رشد در دمای ۱۳	تولید اسید از گلوکز	تولید گاز از گلوکز
نتایج	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-

بحث

اسپور باکتری *B. licheniformis* مقاوم به دما و اسید است و دما و شرایط استریلیزاسیون را تحمل کند لذا می‌تواند در مواد غذایی بعد از فرایند استریلیزاسیون زنده بماند و درصورت ایجاد شرایط مناسب از حالت اسپور خارج شود و در محیط رشد و تکثیر کند. گزارش آلودگی آب‌میوه‌ها به باسیلوس‌هایی همچون *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* در مطالعات قبلی گزارش گردید است (شرافتی چالشتری و شرافتی

چالشتری، ۱۳۸۷) ولی گزارشی مبتنی بر تشخیص آلودگی به باکتری *B. 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 *B. licheniformis* دارای توانایی رشد سریع در محیط کشت می‌باشد (Bisset and Street, 1973). این موضوع نیز در مطالعه ما مشاهده و تأیید شد. این باکتری با توجه به تولید اسپورهای مقاوم به دما و اسید، علی‌رغم بیماری‌زا 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 آزمون‌های متمایز کننده‌ای را برای جداسازی آن‌ها از *آلیسایکلوباسیلوس* انجام داد تا آب میوه تولیدی به‌اشتباه آلوده گزارش نشود. آزمون‌هایی را که این گزارش برای متمایز کردن *آلیسایکلوباسیلوس* از این گونه پیشنهاد می‌کند، احیای نیترات و هیدرولیز نشاسته می‌باشد که هر دو تست در *آلیسایکلوباسیلوس* منفی و در *B. licheniformis* مثبت می‌باشند. 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 درصورت نگهداری آب میوه در شرایط مناسب رشد آنها، موجب فساد محصول شود. تمامی باکتری‌های جدا شده از آب میوه‌ها، 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 آب‌میوه‌ها می‌باشند که در تمامی این مراحل با دقت بیشتر، شرایط تولید و نقل و انتقال و نگهداری بهتر، قابل کنترل می‌باشد.

منابع

۱. شرافتی چالشتری، فرهاد و شرافتی چالشتری، رضا. (۱۳۸۷). بررسی میزان شیوع آلودگی باکتریایی و عوامل مرتبط در آب میوه‌های بسته بندی، شهرکرد ۱۳۸۵. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، دوره ۱۰، شماره ۱، صفحه ۵۳-۴۸.

۲. فلاحت پیشه، حمیدرضا.، جلالی، محمود.، بادامی، ناصر و مردانی، نادیا. (۱۳۸۴). تولید و خالص سازی آنزیم پروتیاز قلیایی از باسیلوس قلیادوست جدا شده از خاک. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دوره ۴، شماره ۴، صفحه ۳۱۹-۳۱۲.

3. Bisset, K., and Street, J. 1973. Morphological Phases in the Swarm of *Bacillus licheniformis*. J General Microbiol. 76: 369-373.
4. CLSI, 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Mandal, M.D., Mandal, S., and Nishith Kumar, P. 2005. Plasmid-mediated dimethoate degradation by *Bacillus licheniformis* isolated from a fresh water fish *Labeorohita*. Biomed Res Int. 3: 280-286.
10. Mansour, M., Amri, D. Bouttefroy, A., Linder, M., and Milliere, J.B. 1999. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. J Appl Microbiol. 86: 311-324.
11. 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.
12. 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.
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., and 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., and 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*. J Bacteriol. 116: 456-465.
19. Yokota, A., Fujii, T., and Goto, K. 2007. *Alicyclobacillus*: Thermophilic Acidophilic Bacilli. Springer, Berlin, Germany.