پژوهش و سازندگی
امور دام و آبزیان شماره ۷۶ پاییز ۱۳۸۶

# گزارش اولین مورد جداسازی و شناسائی باکتری آلیسایکلو باسیلوس از آب انارهای صادراتی ایران

● **شمس الملوک خواجه نصیری**
مسئول فنی آزمایشگاه تشخیص و کلینیک دامپزشکی پاستور، تهران
● **نریمان شیخی**
استادیار واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
● **مسعود حسینی**
استادیار دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
تاریخ دریافت: آذرماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۵
Email: info@pasteurvetlab

## چکیده

**فساد میکروبی آب‌میوه‌ها و صنایع وابسته به آن توسط باکتری آلیسایکلو باسیلوس از اوائل دهه نود میلادی مورد توجه جهانیان قرارگرفته است. این باکتری هاگ‌دار گرما دوست سبب تغییر طعم و بوی آب‌میوه‌های آماده مصرف شده ولی از نظر بهداشت انسانی تاکنون گزارش خاصی منتشر نشده است. در این تحقیق یکی از کنسانتره‌های آب‌میوه‌های بسته‌بندی شده از نظر آلودگی به این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت به‌طوری‌که برای اولین بار در ایران جدا سازی و شناسائی این عامل از کنسانتره‌های آب انار صورت پذیرفت. این باکتری با استفاده از محیط کشت اختصاصی جداسازی و خالص و بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیائی شناسائی گردید. موارد دیگری از آلودگی در سایر آب‌میوه‌های صادراتی نسبت به حضور این باکتری نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند که موارد مثبت ۳۵٪ است. جلوگیری از رشد این باکتری، به‌خصوص در طول حداکثر مدت زمان نگهداری آب‌میوه‌ها و همچنین تشخیص حضوریا عدم حضور این باکتری در آب‌میوه‌های صادراتی با توجه به میزان حساسیت بالای روش جداسازی به‌کارگرفته شده، از اهمیتی محوری در تضمین صادرات آب‌میوه‌ها برخوردار است.**

**کلمات کلیدی: آلیسایکلو باسیلوس، فساد، آبمیوه، آب انار**

Pajouhesh & Sazandegi No:76 pp: 99-103

**Isolation and identification of alicyclobacillus in pomegranate juices**

*By:Sh. Khageh-Nasire, Responsible Manager, Pasteur Veterinary Clinic & Laboratory , N. Sheikhi, Assistant Professor, Science & Research Campus of the Islamic Azad University, M. Hosseini,Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Shahid Beheshti*

Microbial spoilage of juices and its related industry with is a considerable international issue since early 1990s. This spore-forming acidophilic thermophilic bacteria cause changes in juices odor and taste. In this study, one of the export pomegranate juices examined for the isolation and identification of Alicyclobacillus that was positive, by using specific medium. Confirmation was undertaken by examining its morphology and biochemistry characterization. Samples from other sources also tested with 35% positive rate. The isolation and identification of Alicyclobacillus contamination in fruit, and its related industry, in regards to the sensitivity of the used test, has pivotal role on prevention and control of this type of spoilage bacterium in HACCP manner.

**Key words:** Alicyclobacillus, Spoilage, Fruit Juice

## مقدمه

میکروارگانیسم‌ها خصوصا باکتری‌ها نقش مهمی را درصنایع غذائی و آشامیدنی ایفاء می‌کنند از جمله کاربرد بیولوژیک آنها می‌توان از تولید اسیدهای آلی، پاد زیست‌ها و آنزیم‌ها نام برد.

در برخی ا ز موارد باکتری‌ها فرآیند فرآوری محصولات غذائی را آلوده کرده و موجب ضررهای ا قتصادی کلانی می‌شوند. از جمله این عوامل، باکتری آلیسا یکلوباسیلوس (Alicyclobacillus) می‌باشد که طی سالیان اخیردرسطح وسیعی از دنیا موجب فساد مقادیر زیادی آب‌میوه شده و ازعوامل مطرح دراین صنعت محسوب که طعم و بوی نامناسب در نوشیدنی‌های با منشا میوه جات ایجاد می‌کند(۱۵).

در اوایل دهه ۹۰ میلادی به دنبال موج گرمای بی سابقه در اروپا مقادیر زیادی آب میوه دچارفساد با منشاء این باکتری شدند که توجه اروپائی‌ها به این باکتری را بیشتر جلب نمود، به‌طوری‌که سایرکشورهای جهان نیزبه این مسئله علاقمند گردیدند. از آنجائی‌که رشد این باکتری برخلاف بیشتر باکتری‌های عامل فساد مواد غذائی، ایجاد گاز نمی‌نماید، لذا از ظاهر بسته‌بندی آب‌میوه و مشاهده تورم درآن، نمی‌توان به فساد یا آلودگی به این باکتری پی برد. با توجه به نکات یاد شده وجود یا عدم وجود این عامل فساد در محصول یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مطرح درصادرات آب میوه می‌باشد (۱)، به‌طوری‌که جستجوی آن در دستور کار آزمایشگاه‌های میکروبی مواد غذائی قرار گرفته است(۱۳، ۱۴).

با کتری جنس آلیسایکلو باسیلوس ازجنس باسیل‌های گرمادوستی می‌باشد که همگی درمحیط اسیدی رشد کرده و درخاک یافت می‌شوند. اولین بار درسال ۱۹۸۴ این باسیل از آب سیب فاسد شده جدا گردید که می‌توانست در pHپائین (۲/۵) نیز رشد کند (۲). درا بتدا به آن باسیلوس اسید تریس(*Bacillus acidoterrestris*) اطلاق شد و درطول کارهای علمی بر روی این باکتری، نام باسیل گرمادوست اسیددوست[۱] ATB نیز به آن داده شده به علت وجود مقادیر زیاد اسید چرب سیکلوهگزان [۲] غشاء سلولی این جنس از باکتری آن‌ها را آلیسیکلو باسیلوس نام نهادند. علاوه برآن در مقابل اسیدهای آلی چون مالیک، سیتریک، تار تاریک نیز مقاوم بوده و این مواد هیچگونه اثرمنفی برقدرت تکثیر آن ندارند. این باکتری هوازی متحرک، میله‌ای شکل، هاگ‌دار باهاگ میانی یا نزدیک انتهائی بوده و قادر به رشد دردمای ۲۵ تا ۶۰ درجه سانتیگراد و محیطی با اسیدیته ۲/۵۵ تا ۵/۵ می‌باشد. البته سرعت رشد آن کند بوده وگاهی تا ۵ روز نیاز است تا بتوان پرگنه‌های آنرا بر روی محیط کشت مشاهده کرد (۶، ۷، ۸). تا به امروز کلیه سویه‌های این باکتری قابلیت تبدیل نیترات به نیتریت را نداشته و قندهای رامنوز[۳] و لاکتوز[۴] را تخمیر می‌نمایند. اما توانائی تخمیر قندهای ال زایلوز [۵]، ملیبیوز[۶]، متیل‌آلفادی مانوزید [۷] و نشاسته [۸] را ندارند. از نظر سایر خواص بیوشیمیائی بین‌گونه‌های مختلف این باکتری که دارای هفت سویه می‌باشد، تفاوت وجود دارد که می‌توان از آن درتعیین سویه‌های مختلف این باکتری استفاده نمود(۱۶،۱۷).

به‌طور کلی محصولات حاصل از میوه‌ها از جمله آب‌میوه نکتار و کنسانتره‌ها همگی دارای محیطی اسیدی pH ≤ ۴/۶ بوده و از این رو پاستوریزاسیون ساده با دمای حدود ۸۵ الی ۹۵ درجه سانتیگراد می‌تواند موجب ماندگاری مناسب این دسته از محصولات غذائی دردمای محیط گردد.چنین فرآوری موجب غیرفعال شدن تمامی باکتری‌های غیرهاگدار شده و اسیدیته پائین آن‌ها نیز موجب جلوگیری از رشد هاگ اکثر باکتری‌های هاگدار می‌شود ولی از آنجائی‌که باکتری آلیسایکلوباسیلوس در اسیدیته پائین نیز قادر به ادامه حیات می‌باشد به‌محض این‌که آب‌میوه آلوده به این باکتری در دمای بالا قرار می‌گیرد شروع به رشد و تکثیر نموده و موجب فساد آن می‌گردد(۴). فساد آن به علت تولید گیاکول [۹] از وانیلین [۱۰] می‌باشد که طعم و بوی خاصی تولید می‌کند. تاکنون آلودگی به این باکتری در مواد اولیه و آماده مصرف و همچنین خط تولید آب‌میوه‌ها مانند: آب سیب، آب پرتقال، آب گلابی، آب انار، آب هویج، آب انگور سفید، آب هلو و آب گریپ فروت و همچنین در آب گوجه فرنگی، کنسرو گوجه فرنگی، انواع سس‌ها، شربت‌ها و حتی چای نیز گزارش شده است(۱۱ ، ۱۲ ، ۱۶).

درطی سالیان اخیر روش‌های متفاوتی جهت جستجو و کنترل آلودگی

به این باکتری درصنایع وابسته ابداع و به‌کار گرفته شده است. هریک از این روش‌هـا، نحوه نمونه‌برداری، حرارت دهی و محیط‌های کشـت غنی کننده خـاص خود را طلب می‌نماید که از جمله این محیط‌ها محیط PDA Agar و BAT Agar می‌باشند.

## موا د و روش‌ها

نمونه‌های آب انار مورد آزمون در بسته‌بندی‌های کیسه‌هائی پلاستیکی بـا لفافـه آلومینیومی بـه صورت در بسـته مـورد آزمایش قـرار گرفتند. آب‌میوه‌های مورد آزمون همگی از نظر رنگ و طعم در وضعیت اسـتاندارد مطلوب تولیدی قرار داشتند.

پـس از ضدعفونـی کردن ناحیـه درب با الکل ۷۰ درجـه در زیر هود میکروبیولوژی سـطح II از ناحیه درب بسـته‌بندی توسـط پیپت استریل نمونه‌برداری به‌عمل آمد و به‌داخل ظروف شیشـه اسـتریل انتقـال یافت. شیشـه‌های حاوی نمونه در یخچال (۴درجه سـانتی‌گراد) تا پایان آزمایش نگهداری گردید.

از رقت‌های تهیه شـده بر روی پلیت‌های مختلف حاوی محیط کشـت اختصاصی BAT و آگار خوندار کشـت اولیه تهیه گردید. محیط‌های کشت سپس در درجه حرارت۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز در گرمخانه قرار داده شـدند. پرگنه‌های بدست آمده از نظر تعداد، اندازه، شکل و رنگ مورد بررسی قرار گرفتند و از هر یک لام تهیه شد. لام‌ها به روش گرم رنگ‌آمیزی شـدند. همچنین به منظور تهیه کشت خالص میکروبی چندین بار تجدید کشت صورت پذیرفت.

آزمون‌های بیوشـیمیائی مربـوط به تبدیل نیترات بـه نیتریت، قدرت تخمیر قندهای رامینوز، لاکتوز، ال زایلوز، ملیبیوز، متیل آلفا دی مانوزید و همچنین نشاسته انجام پذیرفت(جدول شماره ۱).

## نتایج و بحث

آب‌میوه‌هـا بـه طور کلی دارای رنـگ، مزه و بوی مورد انتظـار از یک آب‌میـوه انـار و به طور اخص فاقد کدورت ناشـی از رشـد باکتری خاصی بودند.

با استفاده از مواد و تبعیت از روش‌های ذکر شده باکتری مورد نظر پس از ۴ الی ۵ روز به آسانی بر روی پلیت‌ها قابل شناسائی می‌شدند.

در رنگ‌آمیزی گرم مشـخص گردید که باکتری جدا شـده از نوع گرم مثبت و با طول ۴ الی ۷ میکرون می‌باشد.

پرگنه‌هـای این باکتری با قطری حدود ۲ تا ۵ میلی‌متر و به رنگ کرم تیره با اطراف نازکتر و قسمت میانی بر آمده بر روی محیط کشت دیده شد. پرگنه‌های بدست آمده و پلیت محیط کشت از نظر عدم حضور مخمرها به شکل میکروسکوپی مورد آزمایش قرار گرفتند(تصاویر شماره ۱ و ۲).

همانطور که اشاره شـد فساد با این باکتری یکی از مشکلات جدی در صنایع مربوط به میوه، آب‌میوه و فرآورده‌های آن بوده که از اواسط دهه نود میلادی به آن توجه خاصی شده است.

تشـخیص چشمی آلودگی بسیار سـخت تلقی می‌گردد، چرا که ظاهر آب‌میوه طبیعی اسـت، گازی تولید نمی‌شود و رسـوب بسیار کمی ممکن است ملاحظه شود(۹).

بوی گیاکول ناشی از رشد این باکتری کاملاً مشخص است، به‌طوری‌که مسـئول تغییر مـزه و بـو در آب‌میوه‌های آلوده به آلیسـایکلو باسـیلوس می‌باشـد. البته این ارتباط همیشگی نیست بلکه بایسـتی در مراحل اولیه تولید آب‌میوه، باکتری شروع به رشد نماید تا امکان تولید گیاکول در آینده و بـه هنگام ماندگاری آبمیوه فراهم شـود، به‌طوری‌کـه جمعیت میکروبی $10^5$ - $10^6$ cfu/ml از آلیسـایکلو باسـیلوس در آب سـیب می‌تواند تغییر در طعم و بو را سـبب شـود (۵ ، ۹). آمـوزش کارکنان کنتـرل کیفی در کارخانه‌ها یا کارشناسان آزمایشگاه در شناسائی بو و طعم مشخص گیاکول می‌تواند به‌عنوان اولین قدم در اقدام به انجام کشـت و جداسـازی باکتری آلیسایکلوباسیلوس باشد.

به‌نظر می‌رسد عامل اکسیژن در میزان رشد باکتری در آب‌میوه‌ها موثر است، به‌طوری‌که کمبود آن رشـد باکتری آلیسایکلو باسیلوس در آب‌میوه را محدود می‌کند (۱۲).

نتایج این مطالعه نیز تائید کننده این باور بود که pH اسـیدی محیط BAT در ترکیب با درجه حرارت بالای گرمخانه‌گذاری این محیط از رشـد سایر میکروب‌های همراه جلوگیری می‌کند.

عدم رشـد این باکتری در فرآورده‌های مربوط به انگور قرمز جای تامل فراوان دارد. به‌نظر می‌رسـد حضور ترکیبات فنلی خنثـی در انگور قرمز از

**جدول ۱: توانائی باکتری نسبت به تخمیر قندها و نیترات‌ها**

| نوع آزمون | | نمونه ۱ | نمونه ۲ | نمونه ۳ |
|---|---|---|---|---|
| تخمیر قندها | رامنوز | +ve(*) | +ve | +ve |
| | لاکتوز | +ve | +ve | +ve |
| | ال زایلوز | -ve(**) | -ve | -ve |
| | ملی بیوز | -ve | -ve | -ve |
| | متیل آلفا دی مانوزید | -ve | -ve | -ve |
| | نشاسته | -ve | -ve | -ve |
| سایر | تبدیل نیترات به نیتریت | -ve | -ve | -ve |

+ve: مثبت
-ve: منفی

( تصویر شماره ۱ ) تصویر پرگنه جداسازی شده

( تصویر شماره ۲ ) شکل میکروسکوپی باکتری آلیسایکلو باسیلوس

رشـد این باکتری جلوگیری می‌نماید (۱۰ ، ۱۱). لذا افزودن این ترکیبات به آب‌میوه‌های آماده مصرف خود می‌تواند یکی از راهکارهای پیشـگیری از رشد این باکتری باشد.

بـا توجـه بـه آلـوده بـودن مـوارد متعـددی از آب‌میوه‌هـا و کنسـانتره‌های ارجاع شـده به این آزمایشـگاه باید توجه داشـت که به بررسـی منشـاء آلودگی این مواد توجه شـود و جهت پیشـگیری، کنتـرل و نابودی این باکتری از روش‌های نوین اسـتفاده گردد. چه بهتـر که قبل از رد شـدن صلاحیت میکروبـی آبمیوه‌های صادراتی، نسـبت به بررسـی وجود یا عدم وجود آلودگی و کوشش در رفع آن اقدامـات موثر به‌عمل آید. پیشـگیری یا کنتـرل آلودگی مواد اولیه، خـط تولید و محصـول نهائی آماده مصرف به ایـن میکروب می‌تواند بخشـی از برقـراری سیسـتم HACCP در کارخانجات تولیـد کننده ایـن فرآورده‌ها باشـد. لـذا پایش مواد غذائی وابسـته بـه میوه‌های مختلـف از نظـر آلودگی به این باکتری بایسـتی مد نظـر قرار گیرد. از آنجائی‌کـه ایـن باکتـری منشـاء محیطـی مانند چشـمه آب گرم و به‌خصـوص خـاک دارد(۳)، ترجیحـاً در جمع‌آوری میوه‌ها سـعی شـود آلودگی با خاک اتفاق نیافتد. بـه تعبیری دیگر درصد آلودگی میوه‌هـا به خاک با درجـه آلودگی با این میکروب ارتباط مسـتقیمی دارد. امکان حـذف قطعی این باکتری در فرآینـد تهیه میوه و تولید فرآورده‌هـای مختلـف از آن امکان‌پذیـر نمی‌باشـد، ولـی به‌راحتی می‌تـوان بـا تمهیدات خاصـی جمعیـت میکروبی را کاهـش و تحت کنتـرل قرار داد، اگر چه حضور تعداد کمی میکروب در طویل المدت می‌تواند مشکلاتی را ایجاد کند.

## پاورقی‌ها

1- Acidophilic Thermophilic Bacteria
2- ώ Alicyclic Fatty Acid
3- Ramnose
4- Lactose
5- L-Xylose
6- Melibiose
7- Methyl X, D-Mannoside
8- Starch
9- Guaiacol
10- Vanillin

## منابع مورد استفاده

1- Baumgart, J., Husemann, M. and Schmidt, C., 1997; *Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, significance and detection in beverages and beverage base. Flss. Obst 64: 178–180.

2-Cerny, G., Hennlich, W. and Poralla, K., 1984; Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage microorganism. Z. Lebensm.-Unters. Forsch. 179: 224–227.

3- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K. and Altan, E., 1987; *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. System. Appl. Microbiol. 10: 47–53

4- Murakami, M., Tedzuka, H. and Yamazaki, K., 1998; Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH. Food Microbiol. 15: 577–582.

5- Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., and Murphy, J.M. 1997; Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit-juice-containing drinks. Letters in Applied Microbiology 24:185-189.

6- Pontius, A.J., Rushing, J.E. and 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.

7- Previdi, M.P., Colla, P. and Vicini, E., 1995; Characterization of alicyclobacillus, a spore-forming thermophilic acidophilic bacterium. Indust. Conserve 70: 128–132.

8- Previdi, M.P., Quintavalla, S., Lusardi, C. and Vicini, E., 1997; Heat resistance of alicyclobacillus spores in fruit juices. Indust. Conserve 72: 353–358.

9- Silva, F.M., Gibbs, P., Vierira, M.C. and Silva, C.L.M. 1999; Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit process. International of Food Microbiology. 51:95-103

10- Splittstoesser, D.F., Churry, J.J. and Lee, C.Y., 1994; Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. J. Food Prot. 57: 1080–1083.

11- Splittstoesser, D.F. and 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

12- Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., and Churry, J.J. 1998; Control of alicyclobacilus in the juice industry. Dairy Food and Environment Sanitation. 18: 585-587.

13- Walls, I.,1997; Alicyclobacillus,an overview, Session 36-1 presented at 1997; Institute of Food Technologists Annual Meeting in Orlando, FL, 14–18 .

14- Walls, I. and Chuyate, R 1998; Historical perspective and preliminary characterization study. Dairy Food and Environment Sanitation. 18: 499-503.

15- Walls, I. and Chuyate, R., 2000; Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Aust. 52: 286–288.

16- Wisse, C.A., and 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.

17- Yamazaki, K., Teduka, H. and Shinano, H., 1996; Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 543–545.