بررسی آلودگی برخی انواع آب میوه به باکتری *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* با استفاده از روش PCR و RFLP

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: *hhmotamedi@yahoo.com*

تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۱۰ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۳/۷/۱۸

چکیده

آلیسایکلوباسیلوس باکتری اسپوردار و مقاوم به‌گرماست که موجب تغییر مزه و بوی آب‌میوه می‌شود و خسارات قابل توجهی را به صنایع آب میوه سازی وارد می‌سازد. هدف از این تحقیق شناسایی این باکتری از آب‌میوه‌های مختلف با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بود. برای این منظور، پس از انتقال به محیط کشت و گرم‌خانه گذاری، استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بر روی نمونه‌ها صورت گرفت. نتایج حاکی از آلودگی ۵ نمونه از مجموع ۲۴ نمونه بررسی شده بود. پس از برش با آنزیم EcoR1 و انجام الکتروفورز باندهایی واضح در نواحی ۱۱۸ و ۵۲۸ جفت بازی مشاهده شد که این حالت مطابق با الگوی RFLP حاصل از باکتری *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* می‌باشد. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که آلودگی به این باکتری در صنایع تولید آب‌میوه مشکل ساز است و برای تشخیص آن تکنیک PCR با دقت بالا، موجب کاهش هزینه‌ها و صرفه‌جویی در زمان می‌شود.

واژگان کلیدی: *آلیسایکلوباسیلوس*، فساد آب‌میوه، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، باکتری ترموفیل.

مقدمه

در اوایل دهه ۹۰ میلادی به‌دنبال موج گرمای بی‌سابقه در اروپا مقادیر زیادی آب میوه دچار فساد با باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* شدند که توجه اروپایی‌ها به این باکتری را بیشتر جلب نمود، به‌طوری که سایر کشورهای جهان نیز به این موضوع علاقه‌مند گردیدند (Smit et al., 2011). از آنجا که رشد این باکتری بر خلاف بیشتر باکتری‌های مواد غذایی، ایجاد گاز نمی‌نماید، لذا از ظاهر بسته‌بندی آب‌میوه و مشاهده تورم در آن نمی‌توان به فساد و آلودگی آب‌میوه پی برد (Khageh-Nasir et al., 2006; Baumgart et al., 1997). باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* اولین بار در سال ۱۹۸۴ از آب سیب فاسد شده جدا گردید که می‌تواند در pH پایین (۲/۵) نیز رشد کند (Danyluk et al., 2011; Steyn et al., 2011). این باکتری از باکتری‌های گرمادوستی است که در محیط اسیدی رشد کرده و در خاک یافت می‌شوند (Jianke et al., 2013; Cerny et al., 1984). باکتری مذکور با تولید گوالایکول و هالوفنول‌ها در آب‌میوه‌هایی مانند سیب، پرتقال، گریپ فروت و انگور سفید منجر به‌تولید بوی دارویی، گوشت پخته شده یا باقالا پخته شده می‌شود (Bianchi et al., 2010; Witthuhn et al., 2012). انجمن بین المللی فرآوری مواد غذایی در سال ۱۹۹۸ بیان داشت که ۳۵٪ از فساد گزارش شده در آب‌میوه‌ها ناشی از باکتری‌های اسپوردار اسید دوست است و از آن‌جایی 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. *آلیسایکلوباسیلوس* دارای بیشترین اهمیت در زمینه فساد آب‌میوه است، لذا بررسی آلودگی آب‌میوه به این باکتری به‌منظور اقدامات کنترلی و کاهش بار آلودگی ضروری است (Durak et al., 2010; Groenewald et al., 2009)؛ برای این منظور انجام آزمون‌های دقیق بیوشیمیایی و مولکولی امری اجتناب ناپذیر برای

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی گونه *آلیسایکلوباسیلوس* می‌باشد. تکنیک PCR به‌دلیل سرعت و دقت بالا بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، به‌طوری که با صرف زمان حداکثر سه ساعت تا یک روز امکان شناسایی باکتری تا حداقل تعداد ۲۰۰ باکتری *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* در آب‌میوه‌ها وجود دارد (Ling-Xia et al., 2012; Postollec et al., 2010). ژن هدف در این مطالعه، ژن آنزیم Squalene Cyclase می‌باشد که در چرخه تولید کلسترول در باکتری *آلیسایکلوباسیلوس* نقش دارد (Wendt et al., 1997) و از تکنیک RT-PCR به‌منظور شناسایی دقیق این باکتری استفاده می‌شود (Yamazaki et al., 1996) ولی قیمت نسبتاً بالای آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و همچنین نیاز به جداسازی باکتری محدودیت‌هایی را ایجاد می‌کند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، روش سریعی است که می‌تواند بدون کشت و به‌طور مستقیم در نمونه حضور باکتری را مشخص نماید. یکی از رهیافت‌های دیگر تکثیر ژن *16S rRNA* و تعیین توالی فرآورده آن می‌باشد که این روش نیز هزینه بر بوده و زمان را افزایش می‌دهد. ژن *Squalene Cyclase* ژن هدف مناسبی برای این منظور می‌باشد و بطور اختصاصی و بدون نیاز به تعیین سکانس می‌تواند حضور باکتری را در نمونه مورد آزمایش مشخص کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی آلودگی آب‌میوه‌های تولیدی داخلی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بود.

مواد و روش کار

تعداد ۲۰ عدد آب‌میوه شامل آب‌میوهای سیب، پرتقال، آلوئه‌ورا، مخلوط و سیب موز از دو شرکت تولید کننده آب‌میوه بصورت تصادفی تهیه گردید. ابتدا آب‌میوه‌ها در ظروف شیشه‌ای استریل، ریخته شد و در ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داد شد تا باکتری‌ها از حالت اسپوردار به حالت رویشی تبدیل شوند. سپس به مدت یک شب در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد همراه با لرزاندن مدوام با (۱۱۰ دور در دقیقه) گرم‌خانه گذاری شدند. سپس آب‌میوه‌ها در فالکون‌های ۴۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۹۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گشت. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصل در ۱ میلی‌لیتر آب‌مقطر دوبار تقطیر حل شد. با استفاده از دو پرایمر اختصاصی طراحی شده برای ژن *squalene-hopene cyclase* باکتری *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس*، با توالی CGGCACCTGGTCCATTTATC و TCGAGCCCTTCAAACCCTTT حضور این باکتری در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. این جفت پرایمر که توالی با طول ۶۴۸ جفت بازی ژن *shc* را تکثیر می‌دهد به‌طور کاملاً اختصاصی وجود عامل اصلی فساد آب‌میوه (*آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس*) را از سایر گونه‌های *آلیسایکلوباسیلوس* تشخیص می‌دهد. از رسوب ته‌نشین شده پس از سانتریفیوژ ۱ میلی‌لیتر از آن به‌منظور انجام فرآیند استخراج DNA برداشته شد. نمونه‌ها در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته و استخراج ژنوم با استفاده از روش کیت استخراج ژنوم سیناژن انجام پذیرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با دستگاه ترموسایکلر Bio Rad یک مرحله واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل با شرایط: ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۷۵ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای ۷۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و در انتها یک مرحله ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۸ دقیقه انجام گرفت (Danyluk et al., 2011). در هر ۲۵ میکرولیتر از مخلوط ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مول)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر در غلظت ۱۰ میکرومول، ۲ میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۵ واحد از آنزیم تک، ۱ میکرولیتر از نمونه DNA و ۱۵/۷۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استفاده گردید. از الکتروفورز افقی در آگارز ۱/۵ درصد به‌مدت ۴۰ دقیقه و ولتاژ ۸۵ ولت برای مشاهده نتایج محصول استفاده شد.

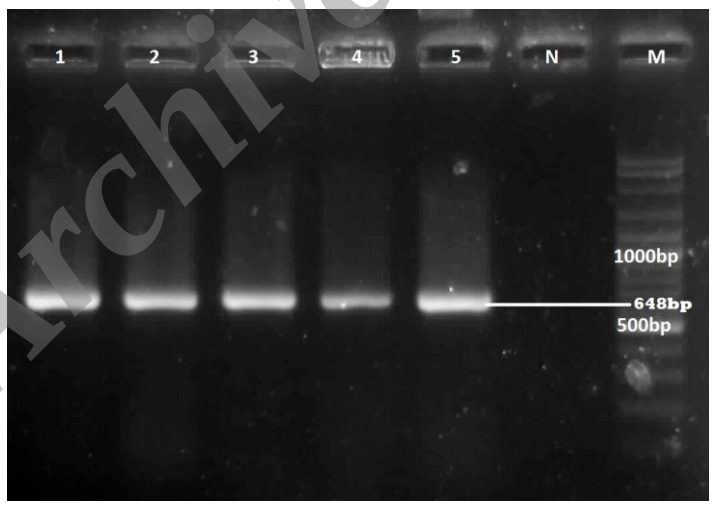
Archive of SID

www.SID.ir

هم‌چنین از ژنوم چند نمونه *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* شناسائی شده نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به‌منظور تأیید صحت قطعه تکثیر شده از تکنیک RFLP استفاده شد. برای این منظور مقدار ۴ میکرولیتر از محصول PCR و ۵ میکرولیتر از بافر ۱۰X آنزیم و مقدار ۵ الی ۱۰ واحد آنزیم EcoR1 مخلوط و با آب مقطر دوبار تقطیر حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. محصولات PCR شماره ۱ و ۵ که از آب‌میوه‌های متفاوت جدا سازی شده بودند برای این واکنش انتخاب شدند. سپس به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. محصول حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی Safe Stain به‌مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۸۵ ولت تفکیک شد. سپس از ژل عکس‌برداری شد و باندها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

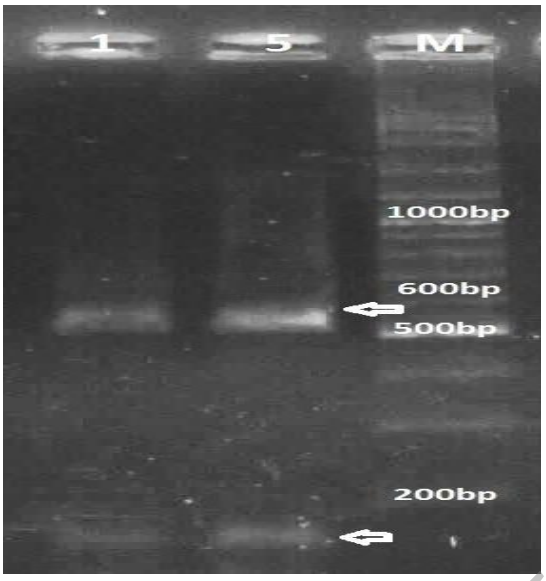
در بررسی ۲۲ نمونه آب‌میوه شامل آب‌میوه‌های سیب، پرتقال، آلوئه‌ورا، مخلوط و سیب موز، ۵ مورد تکثیر قطعه ۶۴۸ جفت بازی ژن *shc* با نتیجه مثبت همراه بود که نشان‌دهنده‌ی وجود آلودگی در این نمونه‌هاست. آنزیم EcoR1 جایگاه ۳۴۳ و ۱۰۹۶ژن *shc* را برش می‌زند، که تنها جایگاه ۳۴۳ در قطعه تکثیر شده از این ژن قرار دارد و جایگاه ۱۰۹۶ خارج از ناحیه تکثیری می‌باشد، پس انتظار می‌رود که باندهای ۱۱۸ و ۵۲۸ جفت بازی مشاهده شود. تصویر شماره ۱، نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز را نشان می‌دهد. با توجه به تصویر ۲ و پس از برش با آنزیم EcoR1 باند هایی واضح در نواحی ۱۱۸ و ۵۲۸ جفت بازی مشاهد شد که این حالت مطابق با الگوی RFLP باکتری *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* می‌باشد و هر دو نمونه الگوی واحدی را نشان دادند.



شکل ۱- چاهک‌های شماره ۱ تا ۵ مربوط به نمونه‌های مثبت می‌باشد.
N: کنترل منفی، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- نتایج حاصل از PCR-RFLP برای نمونه‌های ۱ و ۵ واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

بحث

آب میوه‌های مصرفی در بازار به‌طور کلی دارای رنگ، مزه و بوی مطلوب بوده و فاقد کدورت ناشی از باکتری خاصی می‌باشند. تشخیص چشمی آلودگی به‌دلیل اینکه ظاهر آب‌میوه طبیعی است، گازی تولید نمی‌شود و رسوب بسیار کمی مشاهده می‌شود، بسیار سخت است. بیش‌تر آلودگی آب میوه‌ها به‌دلیل تماس میوه‌ها با خاک است و در نتیجه بررسی آلودگی آب میوه‌ها قبل از ارسال آن به بازار مصرف می‌تواند خسارات ناشی از فساد آب میوه‌ها و کاهش بازار پسندی این محصولات را کم کند. *آلیسایکلوباسیلوس* باکتری اسپوردار و مقاوم به گرماست که موجب تغییر مزه و بوی آب میوه (با تولید موادی هم‌چون تولید گوالایکول و هالوفنول‌ها) می‌شود و خسارات قابل توجهی را به صنایع آب‌میوه سازی وارد می‌سازد (Witthuhn et al., 2012). شناسایی وجود باکتری عامل فساد آب میوه (*آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس*) تاکنون در ایران بر اساس تکنیک‌های کشت آزمایشگاهی و تست‌های شیمیایی صورت گرفته است که زمان بر می‌باشند. تشخیص این باکتری در سایر کشورها نیز بر اساس روش‌های متعددی صورت می‌پذیرد که می‌توان به کشت در محیط‌های آزمایشگاهی، تست‌های بیوشیمیایی، تکنیک‌های مولکولی نظیر RT-PCR، تکثیر ژن *16S rRNA* و تعیین توالی فرآورده آن یا شناسایی ژن *16S rRNA* با تکنیک real-time PCR اشاره کرد (Yamazaki, Teduka et al., 1996; Pettipher, Osmundson et al. 1997; Gouws, Gie et al. 2005). از موارد استفاده از تکنیک PCR برای تشخیص این باکتری می‌توان به برخی تحقیقات صورت گرفته اشاره کرد (Bonilla et al., 2010; Ling-Xia et al., 2012). با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود PCR ژن *shc* به‌عنوان یک روش دقیق و سریع جایگزین روش‌های تشخیص بیوشیمیایی گردد. به این ترتیب می‌توان با هزینه کم‌تر تعداد بسیار زیادتری نمونه را در زمان کم مورد غربال‌گری قرار داد. با توجه به باندهای حاصل از PCR-RFLP این قطعه نیز دلیل دیگری بر اختصاصیت PCR به‌کار رفته برای باکتری *آلیسایکلوباسیلوس اسیدوترستریس* می‌باشد. حذف کامل این باکتری از آب میوه‌ها و فرآورده‌های آن‌ها امکان پذیر نمی‌باشد ولی می‌توان با تمهیدات خاص و آموزش پرسنل شرکت‌های تولید کننده آب میوه از بار آلودگی به باکتری‌های فساد آب میوه کم کرد و با

Archive of SID

www.SID.ir

تشخیص سریع محصولات با بار آلودگی و خارج کردن این محصولات از روند آب میوه سازی، محصول با کیفیتی را به بازار ارائه کرد.

منابع

1. Baumgart, J., Husemman, M., and Schmidt, C. 1997. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, significance and detection in beverages and beverage base. Fluessiges Obst. 64: 178-180.
2. Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Mattarozzi, M., Musci, M., Concina, I., and Gobbi, E. 2010. Characterization of the volatile profile of orange juice contaminated with *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Food Chem. 123: 653-658.
3. 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.
4. Danyluk, M.D., Friedrich, L.M., Jouquand, C., Goodrich-Schneider, R., Parish, M.E., and Rouseff, R. 2011. Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. Food Microbiol. 28: 472-477.
5. Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D., and Worobo, R.W. 2010. Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages. Int J Food Microbiol. 142: 286-291.
6. Gouws, P. A., Gie, L. Pretorius, A. and Dhansay, A. 2005. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. Int J Food Sci Technol. 40: 789-792.
7. Groenewald, W.H., Gouws, P.A., and Witthuhn, R.C. 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. Food Microbiol. 26: 71-76.
8. Jianke, L., Kai X., and Chaozhou, Y. 2013. Detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice concentrate by enzyme-linked immunosorbent assay. Food Control. 30: 251-254.
9. Khageh-Nasir, SH., Sheikhi, N., and Hosseini, M. 2006. Isolation and identification of *Alicyclobacillus* in pomegranate juices. Res Dev. 76: 99-103.
10. 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.
11. Postollec, F., Bonilla, S., Baron, F., Jan, S., Gautier, M., Mathot, A.G., Hallier-Soulier, S., Pavan, S., and Sohier, D. 2010. A multiparametric PCR-based tool for fast detection and identification of spore-forming bacteria in food. Int J Food Microbiol. 142: 78-88.
12. Smit, Y., Cameron, M., Venter, P., and Witthuhn, R.C. 2011. *Alicyclobacillus* spoilage and isolation-A review. Food Microbiol. 28: 331-339.
13. Steyn, C. E., Cameron, M., and Witthuhn, R.C. 2011. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment - A review. Int J Food Microbiol. 147: 1-11.
14. Wendt, K.U., Poralla, K., and Schulz, G.E. 1997. Structure and function of a

Archive of SID

www.SID.ir

15. squalene cyclase. Science. 277: 1811-1815.
16. Witthuhn, R.C., van der Merwe, E., Venter, P., and Cameron, M. 2012. Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Int J Food Microbiol. 157: 113-117.
17. Yamazaki, K., Teduka, H., Inoue, N., and Shinano, H. 1996 Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR. Lett Appl Microbiol. 2: 350-354.

Archive of SID

www.SID.ir