

# جداسازی و شناسایی گونه‌های *Alicyclobacillus* از مراحل مختلف خط تولید رب گوجه فرنگی با استفاده از روش مبتنی بر کشت و مولکولی و بررسی اثر بریکس بر رشد باکتری های *Alicyclobacillus*

شهناز بختیاری<sup>۱</sup>، محمدرضا عدالتیان دوم<sup>۲\*</sup>، محمدباقر حبیبی نجفی<sup>۳</sup>، مسعود یاورمنش<sup>۴</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۸/۲۸)

## چکیده

هدف تحقیق، جداسازی و شناسایی آلیسیکلوباسیلوس از مراحل تولید رب گوجه‌فرنگی و بررسی کارایی پاستوریزاسیون در حذف این باکتری‌ها بود. ایزوله‌ها از هر مرحله شامل پوره، رب گوجه‌فرنگی قبل از پاستوریزاسیون و پس از پاستوریزاسیون نهایی، شش نمونه در سه روز برداشته شد و پس از شوک حرارتی، با روش‌های مبتنی بر کشت جداسازی شدند. جهت ارزیابی توانایی رشد باکتری و اثر بریکس بر رشد آن، نمونه‌هایی با بریکس ۸ و ۱۱ از رب گوجه‌فرنگی با بریکس ۲۷-۲۵، با رقیق‌سازی تهیه و همراه پوره بررسی گردید. ۱۷ ایزوله پس از توالی‌یابی و BLAST تا مرحله جنس و گونه شناسایی شدند. ۱۳ سویه شناسایی شده مربوط به گونه *Alicyclobacillus acidocaldarius* بودند و ۴ ایزوله شامل جنس های *Bacillus* جنس *Brevibacillus* (۲ ایزوله) و یک ایزوله باکتری ناشناخته بودند. تعداد سلول های آلیسیکلوباسیلوس در واحد حجم، بر مبنای کشت در رب قبل از پاستوریزاسیون  $2/34 \pm 0/29$  cfu/ml و در رب پس از پاستوریزاسیون نهایی  $2/31 \pm 0/17$  بود که بیانگر تاثیر فرایند پاستوریزاسیون در کاهش تعداد سلول در واحد حجم بود. نتایج آزمون t جفت شده رب گوجه‌فرنگی نشان داد که وابستگی ضعیفی (ضریب همبستگی ۰/۴۹۱ و ۰/۴۰۹) بین تعداد سلول های آلیسیکلوباسیلوس در واحد حجم با بریکس وجود دارد و همچنین بین تعداد سلول آلیسیکلوباسیلوس در واحد حجم در بریکس ۸ و ۱۱ اختلاف معنی داری وجود ندارد. این بدان معنی است که افزایش ۳ درجه بریکس تفاوت معنی داری در تعداد سلول باکتری در واحد حجم، ایجاد نمی‌کند.

کلید واژگان: آلیسیکلوباسیلوس، بریکس، رب گوجه‌فرنگی، PCR

\*مسئول مکاتبات: edalatian@um.ac.ir

## ۱- مقدمه

ترکیبات دارویی و مواد ضد عفونی کننده و همچنین بوی فنی دارد [۱۹ و ۲۰]. محتمل ترین فرضیه تولید گوآیاکول از طریق متابولیسم اسید فرولیک می‌باشد که ترکیبی است که در ساختار پلی ساکاریدهای دیواره سلولهای گیاهی وجود دارد [۲۱] و در طبیعت به وفور در بافت میوه ها و سبزیجات، برگ ها، حبوبات و دانه های روغنی یافت می شود [۲۲]. به غیر از گوآیاکول ترکیبات فنی دیگری نظیر ۶و۲ دی کلروفنل [۲۳] و همچنین ۶و۲ دی بروموفنل [۶] از جمله متابولیت های شناخته شده ای می‌باشند که باکتری *آلیسکلوباسیلوس سیکلوهمپتانیکوس* قادر به تولید هر دو نوع می‌باشد [۲۴]. در محصولات تغلیظ نشده گوجه فرنگی ترکیب دیگری به نام 2-Metyltetrahydrotriphene-3-one با استفاده از روش گاز کروماتوگرافی به عنوان ترکیب عامل طعم بد شناسایی شده است [۲۵].

فرانسس چینی و همکاران در سال ۲۰۱۵ توانستند گونه هایی از باکتری های *آلیسکلوباسیلوس* را از پوره و رب گوجه فرنگی جدا کنند [۲۶]. در تحقیقی دیگر، گونه *آلیسکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* از فراورده های گوجه فرنگی جداسازی شد که از نظر مقاومت حرارتی بسیار مقاوم بودند، بطوریکه  $D_{105}$  معادل ۱۵/۳، ۵/۰۹ و ۶/۳۴ دقیقه داشتند [۲۵].

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی گونه های باکتری *آلیسکلوباسیلوس* از مراحل مختلف خط تولید رب گوجه فرنگی با استفاده از روش مولکولی و آنالیز ژن 16S rRNA و انجام PCR و بررسی اثر پاستوریزاسیون در دمای  $3 \pm 95^{\circ}\text{C}$  و زمان ۳۰ دقیقه بر این باکتری ها می‌باشد. همچنین، با توجه به اینکه افزایش درصد مواد جامد محلول (بریکس) موجب افزایش مقاومت حرارتی گونه های *آلیسکلوباسیلوس* می گردد [۹] تأثیر بریکس های مختلف بر روی بقا و زنده ماندن این باکتری مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش ها

## ۱-۲- مواد

شش نمونه پوره گوجه فرنگی با بریکس ۷-۵ و همچنین شش نمونه رب گوجه فرنگی از مرحله قبل از پاستوریزاسیون اولیه با بریکس ۲۶-۲۷ و شش نمونه رب گوجه فرنگی پس از پاستوریزاسیون نهایی با بریکس ۲۶-۲۷ از خط تولید رب گوجه فرنگی نمونه برداری شد. سویه رفرنس باکتری

نقش باکتری های *آلیسکلوباسیلوس* در فساد مواد غذایی اسیدی و آبمیوه ها برای اولین بار در سال ۱۹۸۴ به دنبال فساد گسترده آب سیب پاستوریزه صنعتی در آلمان مورد توجه قرار گرفت. مطالعات بعدی بر روی مقاومت حرارتی، توانایی این میکروب ها را در زنده ماندن طی فرایند پاستوریزاسیون که در صنعت برای آبمیوه ها و غذاهای اسیدی به کار می رود، آشکار کرد [۱]. این باکتری ها به راحتی قادر به رشد در pH حدود ۲/۵ هستند [۲] و محدوده دمایی ۷۰-۲۰ درجه سانتیگراد برای رشد اغلب گونه های این باکتری مناسب می باشد [۳]. به طور کلی این جنس شامل گروهی از باکتری های گرمادوست و اسید دوست، گرم مثبت، هوازی، غیر بیماری زا و تولیدکننده اندوسپور می باشد [۵ و ۴]. منشأ اصلی این باکتری ها خاک باغات و جنگل ها می باشد و از طریق میوه های آلوده به خاک به خطوط تولید و تجهیزات آن راه می یابند [۵]. اگر چه این باکتری ها بیماری زا نیستند ولی متابولیت های حاصل از آنها باعث غیر قابل مصرف شدن محصول و خسارت به تولید کنندگان و کارخانه ها می گردد [۶ و ۷]. فساد ناشی از فعالیت این باکتری ها اغلب با تغییر طعم و بو همراه با رسوب یا بدون رسوب، تغییر رنگ محصول و ایجاد کدورت و بدون تولید گاز می باشد [۸]. گونه های *آلیسکلوباسیلوس* قندها را بدون تولید گاز متابولیزه می کنند و میزان فعالیت آب ( $a_w$ ) بیشتر از ۰/۹ برای رشد این باکتری ها مورد نیاز می باشد [۹]. گونه های *آلیسکلوباسیلوس* در ارتباط با فساد آبمیوه های پاستوریزه [۲]، پالپ میوه ها و چای سرد [۱۰]، آبمیوه های گازدار [۱۱]، آب ایزوتونیک و لیموناد [۱۲] و کنسرو گوجه فرنگی قطعه شده [۱۳] شناخته شده اند. به طور کلی مقاومت حرارتی این باکتری ها را مرتبط با نقش اسیدهای چرب  $\omega$ -Alicyclic و هوپانوئید<sup>۱</sup> در غشاء سلولی می دانند [۱۴ و ۱۵] در بین گونه ها و زیرگونه های ژنومیکی شناخته شده این باکتری تاکنون ۱۴ گونه مانند *Alicyclobacillus acidocaldarius* دارای اسیدهای چرب امگا سیکلوهمپتان<sup>۲</sup> در غشاء سلولی می باشند [۱۶ و ۱۷].

متابولیت غالب را در ارتباط با باکتری *آلیسکلوباسیلوس*، گوآیاکول (۲-متوکسی فنل) می باشد [۱۸] که بو و طعم مشابه

1. Hopanoid
2.  $\omega$ -cyclohexane

دقیقه شوک حرارتی داده شدند و بلافاصله تا دمای  $45^{\circ}\text{C}$ – $40^{\circ}\text{C}$  سرد شدند. سپس  $0/1$  میلی لیتر از نمونه ها بر روی محیط کشت YSG (Yeast Starch Glucose) طبق دستورالعمل مندرج بر روی بسته تهیه و در اتوکلاو (ساخت شرکت ریحان طب) استریل شده بود و با کمک اسید سولفوریک ۱ مولار در حدود  $0/2 \pm 3/7 = \text{pH}$  تنظیم شده بود به صورت سطحی روی دو پلیت کشت داده شد و سپس در گرمخانه (ساخت شرکت بهداد)  $45^{\circ}\text{C}$ – $40^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳–۵ روز گرمخانه گذاری گردیدند [۹].

### ۲-۳-۲- کشت های تأییدی

از کلنی های مرحله اول دو پلیت کشت خطی بر روی محیط کشت YSG تهیه شد. سپس یک پلیت در دمای  $60^{\circ}\text{C} \pm 1$  به مدت ۲–۳ روز و یک پلیت دیگر در دمای  $45^{\circ}\text{C} \pm 1$  به مدت ۳–۵ روز گرمخانه گذاری گردیدند. همینطور یک پلیت کشت خطی هم بر روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar Plate Count Agar) و نیز بر روی محیط کشت PCA (Plate Count Agar) یک پلیت کشت خطی تهیه و به مدت ۳–۵ روز در دمای  $45^{\circ}\text{C} \pm 1$  گرمخانه گذاری گردیدند [۹].

### ۲-۳-۲- بررسی توانایی رشد

در این مرحله نمونه های پوره گوجه فرنگی در گرمخانه  $60^{\circ}\text{C} \pm 1$  به مدت ۴ روز گرمخانه گذاری گردیدند و پس از این مدت بر روی محیط کشت YSG در سه تکرار کشت سطحی داده شدند و سپس در  $60^{\circ}\text{C} \pm 1$  به مدت ۳–۵ روز گرمخانه گذاری گردیدند و پس از آن کلنی ها شمارش گردیدند. از نمونه های رب گوجه فرنگی هر دو مرحله قبل از پاستوریزاسیون اولیه و پس از پاستوریزاسیون نهایی نیز با استفاده از سرم فیزیولوژی بریکس ۸ و ۱۱ تهیه شد و پس از انجام شوک حرارتی در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه سپس سرد کردن تا دمای  $45^{\circ}\text{C}$ – $40^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ روز گرمخانه گذاری گردیدند و پس از آن بر روی محیط کشت YSG در سه تکرار از هر نمونه کشت سطحی انجام شد و به مدت ۳–۵ روز در دمای  $60^{\circ}\text{C} \pm 1$  گرمخانه گذاری گردیدند و سپس کلنی های تشکیل شده شمارش شدند [۲۶].

### ۲-۴- بررسی ویژگی های مورفولوژیکی،

### فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

آلیسیکلویباسیلوس اسیدوترستریس DSM 3922 از کلکسیون کشت و سلولهای آلمان<sup>۱</sup> تهیه شد.

### ۲-۲- روش ها

#### ۲-۲-۱- نمونه برداری

نمونه برداری از سه نقطه مربوط به خط تولید رب گوجه فرنگی شامل پوره گوجه فرنگی (بریکس معادل ۷–۵) و همچنین رب گوجه فرنگی قبل از پاستوریزاسیون اولیه (بریکس معادل ۲۷–۲۵) و رب گوجه فرنگی بسته بندی شده در قوطی پس از پاستوریزاسیون نهایی (بریکس معادل ۲۷–۲۶) براساس فرمول آماری:  $n = \frac{\log_{10}(1-p)}{\log_{10}(1-d)}$  انجام شد [۲۷].

$n$  = تعداد نمونه

سطح احتمال (p) معادل ۹۵٪

$d$  = نمونه های معیوب مورد انتظار

نمونه های معیوب قابل انتظار ( $d$ ) معادل ۴۰٪ در نظر گرفته شد که بر اساس نتایج کشت های آزمایشی اولیه از حضور باکتری های آلیسیکلویباسیلوس تخمین زده شد. بر همین اساس تعداد نمونه های هر مرحله  $n = 6$  محاسبه گردید. نمونه برداری در سه مقطع زمانی تکرار شد.

#### ۲-۲-۲- اندازه گیری خصوصیات فیزیوشیمیایی و

#### میکروبی

#### ۲-۲-۲-۱- اندازه گیری pH و بریکس

pH نمونه های پوره و رب گوجه فرنگی با دستگاه pH متر (Metrohm ساخت سوئیس) استاندارد شده با بافرهای ۷ و ۴ مرک (Merck) اندازه گیری شد و سپس بریکس آنها با رفاکتومتر (AB ساخت انگلیس) استاندارد شده با آب مقطر آزمایشگاهی اندازه گیری شد.

#### ۲-۲-۲-۲- شوک حرارتی و کشت سطحی

در این مرحله نمونه ها در حمام آب (Mettmert آلمان) در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شدند و بلافاصله تا دمای  $45^{\circ}\text{C}$ – $40^{\circ}\text{C}$  به منظور ایجاد شوک حرارتی سرد شدند. نمونه های رب گوجه فرنگی از هر دو مرحله قبل از پاستوریزاسیون اولیه و پس از پاستوریزاسیون نهایی به نسبت ۱:۱۰ با محلول سرم فیزیولوژی در لوله آزمایش رقیق شدند [۲۶] و سپس در حمام آب با دمای  $80^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰

1. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur

پرایمرهای یونیورسال: 27F (توالی-5' با توالی-3' 1492R.AGAGTTTGATYMTGGCTC AG-3') با توالی (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3')  
 (ساخت شرکت ماکروژن کره جنوبی) هرکدام به میزان ۱ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ میکرومول)، آب عاری از نوکلئاز تولید شرکت دنا زیست آسیا) به میزان ۲۰ میکرولیتر.  
 برای مشاهده نتایج، از الکتروفورز افقی در ژل آگارز (پودر آگارز ساخت شرکت فرمتناز) ۱/۵ درصد (حاوی ۸ میکرولیتر Gel stain ساخت شرکت SMOBIO کشور تایوان، که قبل از ریختن ژل در سینی به آن اضافه و مخلوط شده بود) به مدت ۴۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ ولت استفاده شد. آزمایشات مولکولی گونه رفرنس *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوترستریس DSM 3922* همزمان انجام و پس از به دست آوردن باندهای قابل قبول محصولات PCR جهت توالی یابی به شرکت توالی یاب ماکروژن کره جنوبی ارسال گردیدند و پس از دریافت جواب های توالی یابی عملیات BLAST در NCBI صورت گرفت و شناسایی نمونه ها تا مرحله جنس و گونه انجام شد [۲۹].

### ۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از این طرح با استفاده از نرم افزار Excel 2013 و همچنین از طریق آزمون t جفت شده یا وابسته، مقایسه میانگین تعداد سلول باکتری *آلیسیکلوباسیلوس* در واحد حجم با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای رسم درخت فیلوژنتیک از نرم افزارهای Clustal X, Fig tree, Clustal Omega استفاده شد.

### ۳- نتایج و بحث

باکتری‌های *آلیسیکلوباسیلوس* به عنوان مخاطره مهم برای صنایع آبمیوه و غذا های اسیدی پاستوریزه به شمار می‌آیند. این باکتری‌ها از طریق میوه‌های آلوده به خاک، به تجهیزات تولید کارخانه ها و در نهایت محصول راه یافته و با تولید متابولیت هایی نظیر گوآیاکول باعث ایجاد طعم نامطلوب در محصول و غیرقابل مصرف شدن آن می‌گردند. این ۱۳ جدایه به عنوان ۳ گونه از باکتری *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* شناسایی شدند. باکتری *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* قبلاً از آبمیوه های فاسد، خاک باغ های میوه و محیط های

ویژگی مورفولوژیکی جدایه ها با انجام رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی و مقایسه آن با شکل ظاهری گونه رفرنس *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوترستریس DSM 3922* بررسی شد.

برای بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی از کلنی‌های تشکیل شده در کشت های تأییدی برداشته و در محیط کشت YSGB<sup>1</sup> (کشت داده شد و سپس در دماهای ۲۵°C، ۳۵°C، ۴۵°C و ۶۰°C به مدت ۳-۵ روز گرمخانه گذاری گردید و از نظر ایجاد کدورت و رسوب به صورت چشمی بررسی شد. همچنین از گونه رفرنس *DSM 3922* به همین روش کشت تهیه و با جدایه های کشت داده شده مقایسه شد [۲۶].

ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه ها و گونه رفرنس با انجام تست های کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز نشاسته و تست احیای نترات، بررسی و با یکدیگر مقایسه گردید. [۲۸].

### ۲-۵- شناسایی گونه های جنس *آلیسیکلوباسیلوس* به روش مولکولی و آنالیز ژن 16S rRNA

شناسایی نهایی گونه ها با انجام آزمایشات مولکولی از طریق آنالیز توالی ژن 16S rRNA انجام شد. این آزمایشات در سه مرحله استخراج DNA ژنومیکی، انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز و الکتروفورز انجام شد. پس از ایجاد کدورت و رسوب در لوله‌ها، استخراج DNA باکتری طبق پروتکل کیت استخراج DNA ژنومیکی (Roche ساخت آلمان) انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز دستگاه ترموسایکلر (Sens Quest ساخت آلمان) شامل یک مرحله واسرشت اولیه در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه یک سیکل، سپس ۳۳ سیکل با شرایط: ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶/۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه و در انتهای یک مرحله توسعه نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد [۲۹].

فرمول استفاده شده برای مخلوط واکنش به میزان ۵۰ میکرولیتر شامل این اجزاء بود:

۲۵- میکرولیتر از Red Master Mix (ساخت شرکت Amplicon III دانمارک)، ۳ میکرولیتر DNA الگو،

1. Yeast Starch Glucose Broth

اوسوپال و همکاران در سال ۲۰۱۶ از آب پرتغال جداسازی گردیده است [۳۴] نتایج حاصل از کشت اولیه پوره و رب گوجه فرنگی در جدول ۱ آمده است.

مختلف تولیدی جداسازی گردیدند [۳۰، ۳۱، ۳۲]. با توجه به اینکه باکتری آلیسیکلوپاسیلوس اسیدوکالداریوس در ابتدا از خاک جداسازی گردیده [۳۳] حضور آن در جدایه‌های شناسایی شده این تحقیق حاکی از آلودگی مواد اولیه به خاک می باشد. باکتری *Alicyclobacillus acidocaldarius* strain ULAG36 شناسایی شده در این تحقیق در پژوهش

**Table 1** Results of Brix, pH and *Alicyclobacillus* counts (Log cfu/ml) of tomato puree, tomato paste before initial pasteurization and tomato paste samples after final pasteurization on YSG.

Stage	Sample code	Brix(BX±SD)	pH±SD	Log cfu/ml±SD
Tomato puree	P1	5.27±0.25	4.25±0.06	2.13±0.46
	P2	5.43±0.6	4.24±0.01	1.75±0.78
	P3	5.53±0.45	4.30±0.06	1.70±0.35
	P4	4.90±0.78	4.30±0.05	1.76±0.6
	P5	5.03±0.90	4.32±0.01	1.23±0.33
	P6	5.13±1.00	4.34±0.07	1.60±0.8
	Average (Mean)	5.215	4.29	1.69±0.29
Tomato paste samples before initial pasteurization	T1	27.17±0.30	4.18±0.01	2.15±0.21
	T2	27.83±1.26	4.17±0.01	2.68±0.12
	T3	26.47±0.06	4.17±0.03	2.15±0.21
	T4	27.17±0.35	4.2±0.02	2.76±0.1
	T5	27.17±1.15	4.18±0.04	2.15±0.21
	T6	26.83±0.58	4.21±0.04	2.15±0.21
	Average (Mean)	27.10	4.185	2.34±0.29
Tomato paste samples after final pasteurization	TC <sub>1</sub>	27.3±0.52	4.06±0.04	2.15±0.21
	TC <sub>2</sub>	27.47±0.90	4.03±0.03	2.23±0.33
	TC <sub>3</sub>	27.66±0.76	4.02±0.03	2.35±0.31
	TC <sub>4</sub>	27.66±0.76	4.04±0.01	2.15±0.21
	TC <sub>5</sub>	27.86±0.32	4.08±0.03	2.58±0.15
	TC <sub>6</sub>	27.6±0.36	4.04±0.04	2.45±0.21
	Average (Mean)	27.59	4.04	2.31±0.17

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato puree is 1.69±0.29.

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato paste before initial pasteurization is 2.34±0.29.

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato paste after final pasteurization is 2.31±0.17.

گوجه‌فرنگی از پوره تا محصول نهایی حضور داشتند. تعداد سلول آن در واحد حجم از رب قبل از پاستوریزاسیون تا رب پس از پاستوریزاسیون نهایی کاهش کلی یافته بود به طوری که میانگین آن در رب گوجه‌فرنگی قبل از پاستوریزاسیون اولیه  $2.34 \pm 0.29 \log \text{ cfu/ml}$  و در رب گوجه‌فرنگی پس از پاستوریزاسیون نهایی معادل  $2.31 \pm 0.17 \log \text{ cfu/ml}$  بود. همچنین در نتایج کشت های اولیه پوره (پوره P=) و رب گوجه‌فرنگی قبل از پاستوریزاسیون اولیه (T) و بعد از پاستوریزاسیون نهایی (TC) مشاهده گردید که در نمونه

به طور کلی در مرحله اولیه کشت ۵/۵۵٪ نمونه های پوره و ۴۴/۴۴٪ نمونه های رب گوجه فرنگی از هر دو مرحله قبل از پاستوریزاسیون اولیه و پس از پاستوریزاسیون نهایی از نظر رشد میکروبی منفی ارزیابی شدند. در پژوهشی دیگر که توسط فرانسس چینی و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد، از ۲۵ نمونه رب گوجه فرنگی و پوره گوجه فرنگی ۱۶ نمونه (۶۴٪) در مجموع از نظر حضور باکتری های آلیسیکلوپاسیلوس مثبت و ۳۶٪ نمونه ها منفی بودند [۲۶]. از طرف دیگر می توان گفت که باکتری های آلیسیکلوپاسیلوس در تمامی مراحل تولید رب

یافته که دلیل آن، افزایش درجه بریکس و متعاقب آن افزایش مقاومت حرارتی باکتری در حین فرایند تغلیظ از مرحله پوره به مرحله رب قبل از پاستوریزاسیون می‌باشد. ولی این افزایش بریکس از نمونه‌های رب قبل از پاستوریزاسیون (۲۷/۱) به نمونه‌های بعد از پاستوریزاسیون (۲۷/۵۹) چندان محسوس نمی‌باشد. همزمان با آن، دلیل کاهش  $\log \text{cfu/ml}$  از نمونه‌های رب قبل از پاستوریزاسیون (۲/۳۴) به نمونه‌های بعد از پاستوریزاسیون نهایی (۲/۳۱)، می‌تواند مرتبط با فرایند حرارتی پاستوریزاسیون نهایی باشد.

کشت‌های تأییدی به منظور شناسایی بهتر کلنی‌های مرحله اول انجام شد که نتایج آن در جدول ۲، آمده است. در این مرحله کلنی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت PCA حذف شدند.

های  $P_2$  و  $T_2$  و  $TC_2$  میانگین تعداد سلول در واحد حجم از  $\log \text{cfu/ml} \pm SD$  به  $1/75 \pm 0/78$  در پوره به  $2/68 \pm 0/12$  در رب قبل از پاستوریزاسیون افزایش و  $2/23 \pm 0/33$  در رب پس از پاستوریزاسیون کاهش گردیده است. علت افزایش تعداد سلول در واحد حجم ( $\log \text{cfu/ml}$ ) از نمونه‌های پوره به نمونه‌های رب گوجه فرنگی قبل از پاستوریزاسیون اولیه، را می‌توان به افزایش درجه بریکس و به دنبال آن افزایش مقاومت حرارتی باکتری‌ها نسبت داد. همانطور که از جدول ۱، مشخص می‌شود میانگین بریکس از (۵/۲۱) در نمونه‌های پوره گوجه فرنگی به (۲۷/۱) در نمونه‌های رب گوجه فرنگی قبل از پاستوریزاسیون افزایش یافت. همزمان میانگین شمارش تعداد سلول در واحد حجم، در پوره از ۱/۶۹ به ۲/۳۴ در رب گوجه فرنگی قبل از پاستوریزاسیون، افزایش

**Table 2** Results obtained from confirmation culture from tomato puree, tomato paste before pasteurization and tomato paste samples after final pasteurization.

Sample code	CULTURE MEDIUM YSG		CULTURE MEDIUM PDA	CULTURE MEDIUM PCA
	45±1°C	60±1°C		
P1	-	-	-	-
	-	-	-	-
P2	-	-	-	-
	+	-	+	+
P3	-	+	+	+
	-	-	-	-
P4	-	-	-	-
	+	-	+	+
P5	+	-	-	+
	-	-	-	-
P6	-	-	-	-
	-	-	-	-
T1	+	-	+	+
	-	-	-	-
T2	-	-	-	-
	-	-	-	-
T3	-	-	-	-
	-	-	+	-

T4	-	-	-	-
	+	-	-	+
T5	-	-	-	-
	-	-	-	-
T6	-	-	-	-
	-	-	-	-
TC1	-	-	-	-
	-	-	-	-
TC2	-	-	-	-
	-	-	-	-
TC3	+	-	-	-
	-	-	-	-
TC4	+	+	+	+
	-	-	-	-
TC5	-	-	-	-
	-	-	-	-
TC6	-	-	-	-
	-	-	-	-

نتایج حاصل از کشت در محیط YSG برات برای بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیکی نشان داد که بهترین دمای رشد برای گونه‌ها، دماهای  $45^{\circ}\text{C} \pm 1$  و  $60^{\circ}\text{C} \pm 1$  می‌باشد که بیشترین میزان رسوب و کدورت را ایجاد کرده بود. در دمای  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  و  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  رشدی مشاهده نشد. همچنین سویه رفرنس DSM 3922 نیز بیشترین رشد را در دمای  $45^{\circ}\text{C} \pm 1$  و همچنین  $60^{\circ}\text{C} \pm 1$  نشان داد. مشاهدات دیگر توسط دین هارد و همکاران (۱۹۸۷) نشان داد که باکتری‌های آلپسیکلو باسیلوس اسیدوترستریس در دمای کمتر از  $35^{\circ}\text{C}$  تا حدود  $55^{\circ}\text{C}$  رشد می‌کرد و آلپسیکلو باسیلوس اسیدوکالداریوس در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  تا بالاتر از  $55^{\circ}\text{C}$  هم رشد می‌کرد [۳۵].

نتایج حاصل از جدول ۲، مبین این حقیقت است که در روی محیط YSG آگار، تعداد کلنی‌های تشکیل شده در دمای ۴۵ درجه بیشتر از دمای ۶۰ درجه می‌باشد. این نتایج با نتایج حاصل از تحقیقات گروین والد و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت [۲۹].

تست‌های بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه‌ها و مقایسه آن با ویژگی باکتری‌های آلپسیکلو باسیلوس و همچنین سویه رفرنس آلپسیکلو باسیلوس اسیدوترستریس DSM 3922 انجام شد و نتایج آن در جدول ۳، آمده است. در جدول فوق، حروف سمت چپ بیانگر منشأ جدایه، حروف میانی حرف اول نام محیط کشت و اعداد بیانگر دمای گرمخانه گذاری نمونه‌ها هستند.

Potato : P ، Yeast starch Glucose Medium : Y  
Tomato Paste : T ، Puree: P ، dextrose Agar  
Tomato Paste : TC ؛ before pasteurization  
canned after final pasteurization

**Table 3** Biochemical tests of isolates from puree and tomato paste and *Alicyclobacillus* DSM3922 *acidoterrestris* DSM 3922 as a reference strain.

ROW	Sample code	Oxidase test	Catalase test	Hydrolysis of starch	Nitrate reduction
1	DSM 3922	-	weak	+	-
2	P <sub>2</sub> -Y-45	-	+	+	-
3	P <sub>2</sub> -P-45	-	+	-	-
4	P' <sub>2</sub> -Y-60	-	+	-	-
5	P' <sub>2</sub> -Y-45	-	+	+	-
6	P' <sub>2</sub> -P-45	-	+	+	-
7	P <sub>3</sub> -Y-60	-	+	+	-
8	P <sub>4</sub> -Y-45	-	+	+	-
9	P <sub>4</sub> -P-45	-	+	+	-
10	P' <sub>4</sub> -Y-45	-	+	+	-
11	P <sub>6</sub> -Y-45	-	+	+	-
12	P <sub>6</sub> -P-45	-	+	+	+
13	T <sub>3</sub> -P-45	-	+	+	-
14	T <sub>4</sub> -Y-45	-	+	+	-
15	T <sub>4</sub> -P-45	-	+	+	-
16	TC <sub>2</sub> -Y-45	-	+	+	+
17	TC <sub>3</sub> -Y-60	-	+	-	-
18	TC <sub>3</sub> -Y-45	-	+	-	-
19	TC' <sub>3</sub> -Y-60	-	+	+	-
20	TC' <sub>3</sub> -Y-45	-	+	+	-
21	TC' <sub>3</sub> -P-45	-	+	+	-

No Growth : (-)

Growth : (+)

حرارتی زیادی داشتند و D<sub>105</sub> معادل ۱۵/۳ و ۵/۰۹ و ۶/۳۴ دقیقه را نشان دادند. [۲۵].

رنگ آمیزی گرم برای بررسی مورفولوژی جدایه‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل و گرم مثبت را تأیید کرد. گونه رفرنس DSM 3922 نیز باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبت را نشان داد.

### ۳-۱- بررسی اثر بریکس بر رشد باکتری‌های

#### آلیسیکلوباسیلوس

نتایج حاصل از رشد باکتری‌های ایزوله شده از نمونه‌های پوره و رب گوجه فرنگی از هر دو مرحله با بریکس ۸ و ۱۱ در جداول ۴ تا ۸ آمده است.

در نمونه‌های P<sub>4</sub>، T<sub>4</sub> و TC<sub>4</sub> میانگین تعداد سلول در واحد حجم از  $\log \text{cfu/ml} \pm \text{SD}$   $2.34 \pm 0.1$  در پوره به  $\log \text{cfu/ml} \pm \text{SD}$   $2.32 \pm 0.02$  در رب گوجه‌فرنگی قبل از

در پژوهشی دیگر، لوتیسی ۲۰۰۶، گونه‌هایی از آلیسیکلوباسیلوس جدا شده از گوجه فرنگی و فراورده‌های میوه ای با دو گونه رفرنس مقایسه شدند و ویژگی‌های بیوشیمیایی و توانایی جوانه زنی آنها را در محیط کشت و آب گوجه فرنگی و آب میوه‌ها بررسی نمودند. گونه‌های جدا شده از فراورده‌های گوجه فرنگی از نوع آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس بودند و گونه‌های جدا شده از فراورده‌های میوه ای آلیسیکلوباسیلوس اسیدوترستریس بودند. گونه‌های اسیدوکالداریوس فقط در محیط کشت و دمای ۳۷C، ۴۴C، ۵۵C، ۶۵C رشد کردند ولی گونه‌های اسیدوترستریس در تمامی محیط‌ها با دماهای ۳۷C، ۴۴C، ۵۰C رشد کردند. همچنین نتیجه اندازه‌گیری مقاومت حرارتی نشان داد که گونه‌های جدا شده از گوجه فرنگی مقاومت



داد. در واقع می‌توان گفت که پاستوریزاسیون نهایی در کاهش میانگین تعداد سلول در واحد حجم این باکتری‌ها موثر بوده است. در خصوص فرآورده های میوه، گزارش شده است که بریکس نزدیک به ۱۰، اجازه رشد آلیسیکلوپاسیلوس /اسیدوتریستریس را می‌دهد. همچنین مشخص شده است که توانایی رشد این باکتری به عنوان تابعی از مواد جامد محلول، به نظر می‌رسد که رابطه نزدیک و تنانگی با سویه و نژاد موجود در فرآورده دارد [۲۶].

پاستوریزاسیون با بریکس ۱۱ رسید و کاهش جزئی نشان می‌دهد ولی در رب گوجه‌فرنگی بعد از پاستوریزاسیون نهایی با بریکس ۱۱ به  $0.33 \pm \log \text{ cfu/ml} \pm \text{SD}$  رسید و کاهش نشان داد. همچنین میانگین تعداد سلول در واحد حجم رب گوجه‌فرنگی پس از پاستوریزاسیون نهایی با بریکس ۱۱ معادل  $0.1 \pm \log \text{ cfu/ml} \pm \text{SD}$  (جدول ۸) می‌باشد که نسبت به رب قبل از پاستوریزاسیون اولیه با بریکس ۱۱ که معادل  $0.59 \pm \log \text{ cfu/ml} \pm \text{SD}$  می‌باشد، کاهش نشان

**Table 4** Results of Tomato Puree culture on YSG agar in  $60^\circ\text{C} \pm 1$ . (Brix=5)

SDLog cfu/ml±					
P <sub>6</sub>	P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>1</sub>
2.38±0.12	1.58±0.15	2.34±0.1	2.55±0.01	2.02±0.02	2.38±0.12

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato puree is  $2.20 \pm 0.35$ .

**Table 5** Results of culture of Tomato paste samples before pasteurization in  $60^\circ\text{C} \pm 1$  (Brix=8).

SDLog cfu/ml±					
T <sub>6</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>
2.18±0.09	1.68±0.12	2.08±0.12	1.68±0.12	1.38±0.54	1.76±0.12

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato paste samples before pasteurization is  $1.79 \pm 0.29$ .

حرارت حین تغلیظ و اثرافزایش غلظت (بریکس) بر مقاومت حرارتی این باکتری‌ها باشد (جدول ۴ و ۵).

داده های  $\log \text{ cfu/ml}$  از بریکس ۵ در نمونه‌های پوره به نمونه‌های رب قبل از پاستوریزاسیون اولیه (بریکس ۸) یک روند کاهشی را نشان می‌دهد. دلیل این کاهش می‌تواند

**Table 6** Results of culture of Tomato paste samples before pasteurization in  $60^\circ\text{C} \pm 1$  (Brix=11).

SDLog cfu/ml±					
T <sub>6</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>1</sub>
1.82±0.13	2.53±0.33	2.32±0.02	1.15±0.21	1.15±0.21	1.38±0.35

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato paste samples before pasteurization is  $1.72 \pm 0.59$ .

**Table 7** Results of culture of Tomato paste samples after final pasteurization in  $60^\circ\text{C} \pm 1$  (Brix=8) .

SDLog cfu/ml±					
TC <sub>6</sub>	TC <sub>5</sub>	TC <sub>4</sub>	TC <sub>3</sub>	TC <sub>2</sub>	TC <sub>1</sub>
1.23±0.33	1.15±0.21	1.38±0.54	1.15±0.21	2.58±0.11	2.76±0.07

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato paste samples after final pasteurization is  $1.70 \pm 0.75$ .

**Table 8.** Results of culture of Tomato paste samples after final pasteurization in  $60^\circ\text{C} \pm 1$  (Brix=11) .

SD±Log cfu/ml					
TC <sub>6</sub>	TC <sub>5</sub>	TC <sub>4</sub>	TC <sub>3</sub>	TC <sub>2</sub>	TC <sub>1</sub>
1.15±0.21	1.15±0.21	1.23±0.33	1.3±0.42	1.15±0.21	1.41±0.09

Mean ± SD of Log (cfu/ml) of tomato paste samples after final pasteurization is  $1.23 \pm 0.1$ .

مقایسه میانگین تعداد سلول در واحد حجم در بریکس ۸ و ۱۱ (t-test):

**Table 9** Results of Mean Comparison Test (t-test) of  $\log \text{ cfu/ml}$  of tomato paste before pasteurization in Brix 8 and 11.

Paired data	(Log cfu/ml )	Standard Deviation	(correlation coefficient)	P-value
Brix 11	1.72	0.59	0.491	0.761
Brix 8	1.79	0.29		

**Table 10** Results of Mean Comparison Test (t-test) of log cfu/ml of tomato paste after pasteurization in Brix 8 and 11.

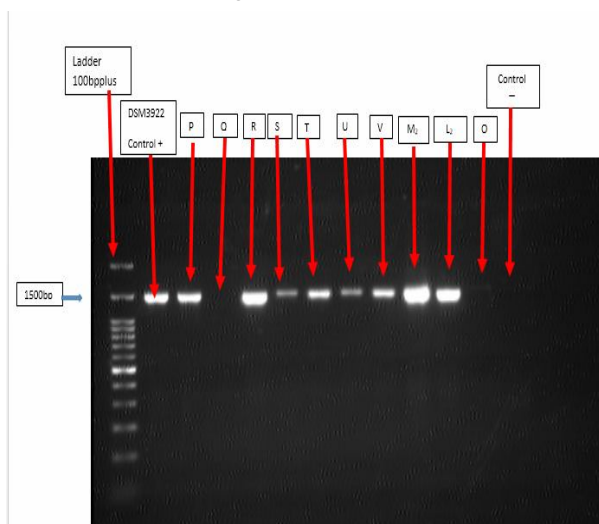
Paired data	(Log cfu/ml)	Standard Deviation	correlation coefficient	P-value
Brix 11	1.23	0.1	0.409	0.163
Brix 8	1.70	0.75		

بودند که درصد مشابهت این ایزوله‌ها با گونه‌های ثبت شده در پایگاه NCBI در حدود ۹۹-۹۷٪ مشخص گردید. در تحقیقی که توسط گروئن والد و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، نتیجه توالی یابی قطعات ۱۱۱۹ - ۷۷۸ bp، ۱۶ جلدایه از آب شستشو و کنسانتره گلابی، درصد مشابهت ۹۹/۴-۹۸/۵٪ به باکتری های *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوترستریریس* و در ۳ جلدایه از خاک، بشکه‌های سرکه و پوره گلابی پیش پاستوریزه شده درصد مشابهت ۹۹-۹۸/۹٪ را با سویه *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* نشان داد [۲۹]. در یک تحقیق دیگر پس از جداسازی گونه‌ها از محصول با استفاده از روشهای مبتنی بر کشت به مقایسه ویژگی‌های آنها با گونه‌های رفرنس DSM 3922، 2498 پرداختند. براساس نمودار دندروگرام رسم شده گونه‌های رفرنس تفاوت زیادی با گونه‌های جدا شده داشتند و میزان شباهت آنها حدود ۶۳٪ بود همچنین میزان شباهت دو گونه جدا شده از محصول با کدهای SSICA 22b، 22g حدود ۹۵٪ بود و وابستگی بین سایر گونه‌های جدا شده و گونه رفرنس *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* حدود ۷۷/۸٪ بود [۲۶]. از آنجا که باکتری-های *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* اولین بار از خاک جداسازی شدند وجود این باکتری‌ها در محصول حاکی از آلودگی مواد اولیه به خاک می باشد [۳۳]. *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس* تا کنون از آب میوه های فاسد، باغ های میوه، مواد خام، تجهیزات تولید جداسازی گردیده اند [۳۰، ۳۱، ۳۲].

نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنتیک نشان دادند که ۱۷ جلدایه شناسایی شده در سه خوشه اصلی قرار دارند. خوشه اول شامل نمونه‌های با کد  $D_1, E_2, F_1, M_2$  که به ترتیب مربوط به ایزوله‌هایی از جنس‌های *Brevibacillus*، باکتری ناشناخته، *Brevibacillus* و باسیلوس می‌باشد. خوشه دوم شامل نمونه‌های  $C_1, TC_1, Z_2, K_1$  می‌باشد که در برگیرنده جنس‌های *Alicyclobacillus*، *Alicyclobacillus* و *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* می‌باشند.

مقایسه میانگین تعداد سلول یا log cfu/ml برای هر دو مرحله رب گوجه فرنگی از طریق آزمون t نشان داد که وابستگی ضعیفی (ضریب همبستگی ۰/۴۹۱) برای رب قبل از پاستوریزاسیون و ۰/۴۰۹ برای رب پس از پاستوریزاسیون (نهایی) بین تعداد سلول در بریکس ۸ و ۱۱ وجود دارد و همچنین نتیجه آزمون t جفت شده نشان داد که بین میانگین تعداد سلول در بریکس ۸ و ۱۱ اختلاف آماری معنی‌داری وجود ندارد. در نتیجه می‌توان گفت که افزایش ۳ درجه بریکس تفاوت معنی‌داری بر تعداد سلول یا log cfu/ml و رشد میکروبی ندارد.

**۳-۲- نتایج آنالیز مولکولی و شناسایی به روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA ایزوله‌های جدا شده از مراحل مختلف تولید رب گوجه فرنگی**  
نتایج حاصل از آزمایشات مولکولی و توالی‌یابی و شناسایی جنس و گونه در جدول شماره ۱۱ و شکل ۱ آمده است.



**Fig 1.** Gel electrophoresis of some selected isolates from puree and tomato paste samples and Strain DSM3922. Codes M2, S, O, R, P related to tomato puree; Codes L2, V, U, T, Q related to Tomato paste before pasteurization.

در این پژوهش توالی‌های با طول ۱۵۴۸-۱۱۶۲ سکانس شدند. از نمونه که در قطعه معادل ۱۵۰۰ bp باند داده بودند، ۱۳ نمونه باکتری *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالداریوس*

**Table 11** Identified genus and species based on 16S rRNA gene sequencing during stages of Tomato paste processing line

Row	Stage of processing	Code sample	Identification based on NCBI	% Similarity NCBI
1	Tomato Puree	D <sub>1</sub>	<i>Bacillus</i> *	96
2	Tomato Puree	F <sub>1</sub>	<i>Bacterium</i> B2-C1-P2G1	83
3	Tomato Puree	K <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus</i>	96
4	Tomato Puree	M <sub>2</sub>	<i>Brevibacillus</i>	96
5	Tomato Puree	P <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus</i>	96
6	Tomato Puree	R <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	98
7	Tomato Puree	S <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	97
8	Tomato Puree	Z <sub>2</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	97
9	Tomato Paste before Pasteurization	E <sub>2</sub>	<i>Brevibacillus</i>	81
10	Tomato Paste before Pasteurization	H <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> strain ULAG36	97
11	Tomato Paste before Pasteurization	L <sub>2</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	97
12	Tomato Paste before Pasteurization	T <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus</i>	96
13	Tomato Paste before Pasteurization	V <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> strain ULAG36	98
14	Tomato Paste before Pasteurization	U <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	99
15	Tomato Paste after Final pasteurization	A <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> subsp. <i>acidocaldarius</i>	97
16	Tomato Paste after Final pasteurization	C <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus</i>	95
17	Tomato Paste after Final pasteurization	TC <sub>1</sub>	<i>Alicyclobacillus</i>	96

\*: Isolates which their similarity (%) in NCBI have been calculated lower than 97%, only reported up to genus level.

در ULAG36 در آن قرار دارند. نمونه های L<sub>2</sub> و P<sub>1</sub> در یک خوشه کوچک جداگانه قرار گرفتند که شامل سویه های *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* و جنس *Alicyclobacillus* می باشد.

خوشه سوم شامل نمونه های S<sub>1</sub>, H<sub>1</sub>, V<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>, R<sub>1</sub>, A<sub>1</sub>, U<sub>1</sub>, *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *acidocaldarius* و *Alicyclobacillus acidocaldarius* strain می باشد که سویه های *Alicyclobacillus acidocaldarius* strain



**Fig 2** Phylogenetic tree from puree and tomato paste isolate with the help of Clustal Omega for 17 isolates (soil isolates deposited in NCBI and DSM 3922 as a reference strain).

- [2] Cerny, G., Hennlich, W., Poralla, K., (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 179: p. 224-227.
- [3] Karavaiko, G.I., Bogdanova, T.I., Tourova, T.P., Kondrat'eva, T.F., Tsaplina, I.A., Egorova, M.A., Krasil'nikova, E.N., Zakharchuk, L.M., (2005). Reclassification of 'Sulfobacillus thermo sulfidooxidans subsp. thermotolerans' strain K1 as *Alicyclobacillus tolerans* sp. nov. and *Sulfobacillusdisulfidooxidans*Dufresne et al., 1996 as *Alicyclobacillusdisulfidooxidans* comb. nov., and emended description of the genus *Alicyclobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: p. 941-947.
- [4] Baumgart, J. (1999). Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*, 34: p. 161-164.
- [5] Chang, S.S., Kang, D.H., (2004). *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30: p. 55-74.
- [6] Borlinghaus, A., Engel, R., (1997). *Alicyclobacillus* incidence in commercial apple juice concentrate (AJC) supplies e method development and validation. *Fruit Processing*, 7: p. 262-266.
- [7] Walls, I. and Chuyate, R., (2000); Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Food Australia*, 52: p. 286-288.
- [8] Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., Lee, C.Y., (1994). Growth characteristics of aciduricsporeforming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection*, 57: p.1080-1083.
- [9] Yokota A, Fujii T, Goto K (2007) *Alicyclobacillus thermophilic acidophilic bacilli*. Springer, Japan.
- [10] Duong, H.A., Jensen, N., (2000). Spoilage of iced tea by *Alicyclobacillus*. *Food Australia*, 52: p. 292.
- [11] Pettipher, G.L., Osmundson, M.E., Murphy, J.M., (1997). Methods for the detection and numeration of *Alicyclobacillusacidoterrestris* and investigation of growth and production of

همچنین در این درخت فیلوژنتیک، ارتباط ۱۷ جدایه این پژوهش با سویه‌های موجود در بانک ژن NCBI و *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوترسترئیس* سویه DSM 3922 تعیین شد. همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود تنها سویه‌های موجود در بانک ژن NCBI منشأ خاک داشتند که در آلمان شناسایی شده و نسبت به ۱۷ جدایه این پژوهش و *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوترسترئیس* سویه DSM 3922 در یک خوشه جداگانه و با فاصله قرار گرفتند.

## ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش، حضور باکتری‌های *آلیسیکلوباسیلوس* در مراحل مختلف تولید رب گوجه فرنگی بررسی شد و اثر فرایند حرارتی پاستوریزاسیون بر روی این باکتری‌ها ارزیابی شد. نتایج نشان دادند که باکتری‌های *آلیسیکلوباسیلوس* در تمام مراحل تولید رب گوجه فرنگی حضور دارند که از طریق خاک به محصول راه یافتند و تعداد سلول در واحد حجم از ابتدا تا انتهای فرایند تولید روند کاهشی یکنواختی را نشان نمی‌دهد و کیفیت ماده اولیه و میزان آلودگی آن، همچنین افزایش غلظت در اثر فرایند تغلیظ و فرایند حرارتی پاستوریزاسیون، از عوامل موثر بر تعداد سلول در واحد حجم این باکتری‌ها در محصول نهایی می باشند. با این حال مشخص شد که دمای پاستوریزاسیون  $3 \pm 95^{\circ}\text{C}$  و زمان ۳۰ دقیقه در حذف کامل این باکتری‌ها مؤثر نمی‌باشد. از نظر آماری وابستگی ضعیفی بین تعداد سلول این باکتری در بریکس ۸ و ۱۱ وجود داشت و نتایج آزمون t جفت شده نشان داد که بین میانگین شمارش میکروبی در بریکس ۸ و ۱۱ اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد. ( $P>5\%$ ) در نتیجه می‌توان گفت افزایش ۳ درجه بریکس تفاوت معنی داری بر تعداد سلول در واحد حجم ندارد. باکتری‌های شناسایی شده مربوط به سویه‌های *آلیسیکلوباسیلوس اسیدوکالدارپوس* بودند. به هر حال نیاز به بررسی میزان متابولیت‌های حاصل از فعالیت آنها برای ارائه اقدامات اصلاحی وجود دارد.

## ۵- منابع

- [1] Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y., Churey, J.J., (1998). Control of *Alicyclobacillus* in the juice industry. *Dairy Food Environmental Sanitation Journal*, 18: p. 585-587.

- Journal of Industrial Microbiology*, 15: p. 457-471.
- [23] Jensen, N., Whitfield, F.B., (2003). Role of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the development of a disinfectant taint in shelf-stable fruit juice. *Letters in Applied Microbiology*, 36: p. 9-14.
- [24] Gocmen, D., Elston, A., Williams, T., Parish, M., Rouseff, R.L., (2005). Identification of medicinal off-flavours generated by *Alicyclobacillus* species in orange juice using GC-olfactometry and GC-MS. *Letters In Applied Microbiology*, 40: p.172-177.
- [25] Lottici, C., Previdi, M.P., Bolzoni, L., (2006). Characterization and study of alicyclobacilli isolated from tomato products. *Industria Conserve*, 81: p. 251-267.
- [26] Franceschini, B., Manganelli, E., Bloise, C., Previdi, M.P., (2015). Tomato Products spoilage by *Alicyclobacillus* spp: growing ability of spores naturally present as a function of the total soluble solids and isolates characterization. *Journal of Food Processing & Beverages*, 3(1): p.1-6.
- [27] Jarvis, B. (2008). Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods. *Academic Press*.
- [28] Mortazavi, A., Zirjani, L., Tabatabaei Yazdi, F. (1388). Applied and experimental Food Microbiology. Ferdowsi University Press. Mashhad. p: 52-56, 151.
- [29] Groenewald, W.H., Gouws, P.A., 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 Microbiology*. 26: p. 71-76.
- [30] Danyluk, M.D., Friedrich, L.M., Jouquand, C., Goodrich-Schneider, R., Parish, M.E., Rouseff, R., (2011). Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrate. *Food Microbiology*. 28: p. 472-477.
- [31] Gouws, P.A., Gie, L., Pretorius, A., Dhansay, N., (2005). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *International Journal of Food Science and Technology*. 40: p. 789-792.
- taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 24: p.185-189.
- [12] Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N., Shinano, H., (1997). Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores. *Letters in Applied Microbiology*, 25: p.153-156.
- [13] Walls, I., Chuyate, R., (1998). *Alicyclobacillus* e historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy Food Environ. Sanit.* 18: p. 499-503.
- [14] Kannenberg, E., Blume, A., Poralla, K., (1984). Properties of u-cyclohexane fatty acids in membranes, *FEBS Letters*, 172: p. 331-334.
- [15] Poralla, K., Kannenberg, E., Blume, A., (1980). A glycolipid containing hopane isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. *FEBS Letters*, 113: p.107-110.
- [16] Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., Fox, G.E., Deinhard, G., Poralla, K., (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a newgenus, *Alicyclobacillus* gen. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: p. 263-269.
- [17] Uchino, F., Doi, S., 1967. Acidothermophilic bacteria from thermal waters. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31: p. 817-822.
- [18] Orr, R.V., Beuchat, L.R., (2000). Efficacy of disinfectants in killing spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and performance of media for supporting colony development by survivors. *Journal of Food Protection*, 63: p. 1117-1122.
- [19] Wasserman, A.E., (1966). Organoleptic evaluation of three phenols present in wood Smoke. *Journal of Food Science*, 31: p.1005-1010.
- [20] Jensen, N., (2000). *Alicyclobacillus* in Australia. *Food Australia*, 52: p. 282-285.
- [21] Kirk, T.K., (1971). Effects of microorganisms on lignin. *Annual Review of Phytopathology*, 9: p.182-210.
- [22] Rosazza, J.P.N., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T., Rousseau, B., (1995). Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product.

- [34] Osopal, B. A., Witthuhn, C. R., Albertyn, J., Oguntoyinbo, F. A., (2016). Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus* species in contaminated commercial fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 56: p. 21-28.
- [35] Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Altan, E., (1987a) . *Bacillus acidoterrestris* sp. nov. a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Syst. Applied Microbiology*. 10: p. 47-53.
- [32] Groenewald, W.H., Gouws, P.A., Witthuhn, R.C., (2008). Isolation and identification of species of *Alicyclobacillus* from orchard soil in the Western Cape, South Africa. *Extremophiles*, 12: p.159-163.
- [33] Albuquerque, L., Rainey, F.A., Chung, A.P., Sunna, A., Nobre, M.F., Grote, R., Antranikian, G., da Costa, M.S., (2000). *Alicyclobacillus hesperidum* sp. Nov. and a related genomic species from solfataric soils of São Miguel in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 p.: 451–457.

## Isolation and identification of *Alicyclobacillus* spp. from different steps in the production line of tomato paste using culture-dependent and molecular methods and Evaluation of brix effect on *Alicyclobacillus* growth

Bakhtiyari, Sh. <sup>1</sup>, Edalatian Dovom, M. R. <sup>2\*</sup>, Habibi Najafi, M. B. <sup>3</sup>, Yavarmanesh, M. <sup>4</sup>

1. Former MSc student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
2. Associate Professor, Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Professor, Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
4. Associate Professor, Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

(Received: 2018/03/03 Accepted:2018/11/19)

Objective of study was isolation and identification of *Alicyclobacillus* spp. from different steps in production of tomato paste and efficiency of pasteurization for elimination aforementioned bacteria. From each step of processing line including puree, tomato paste before first pasteurization and after final pasteurization, and six samples were obtained in 3 days. Following the heat-shock, *Alicyclobacillus* spp were isolated using culture-dependent methods. To evaluate growth ability of *Alicyclobacillus* and effect of Brix on its growth, samples were prepared with dilution corresponding to Brix 8 and 11 from tomato paste with Brix= 25-27 and evaluated along with puree samples. 17 isolates following sequencing and BLAST were identified up to genus and species level. 13 identified strains belonged to *Alicyclobacillus acidocaldarius* and four other isolates were *Bacillus licheniformis* strain TS\_16, un known Bacterium, *Brevibacillus thermoruber* strain TS\_05, and *Brevibacillus thermoruber* strain TS\_06. *Alicyclobacillus* count was culturally calculated  $2.34 \pm 0.29$  and  $2.31 \pm 0.17$  cfu/ml $\pm$ SD in tomato paste before and after pasteurization, respectively. This implies the effect of pasteurization in lowering the *Alicyclobacillus* count. Results of the paired t-test of tomato paste showed a weak correlation (correlation coefficient =0.491, 0.409) between microbial counts in tomato paste of Brix 8 with those of Brix 11 and also there was no significant difference of *Alicyclobacillus* count between Brix 8 and 11. This means that three-degree increase of Brix didn't cause any significant variation in the microbial count.

**Key words:** *Alicyclobacillus*, Brix, Tomato paste, PCR.

---

\* Corresponding Author E-Mail Address: edalatian@um.ac.ir