بررسی تنوع گونه‌ای باسیلوس‌های جدا شده از بیوفیلم مخازن و تجهیزات فرآوری محصولات شیر

امیرحسین انصاری[۱]، شهرام حنیفیان[۲، ۳*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۵/٤/۲۷ پذیرش نهایی: ۹۵/۹/۱۹)

چکیده

جنس باسیلوس نوع غالب از انواع باکتری‌های گرم مثبت مولد اسپور هستند که برخی از آن‌ها برای کیفیت مواد غذایی و سلامتی مصرف‌کنندگان تهدید محسوب می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی میزان آلودگی و تنوع گونه‌ای باسیلوس‌ها در مخازن شیر و تجهیزات فرآوری و هم‌چنین قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها انجام پذیرفت. برای این منظور تعداد ۸۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه از مخازن حمل و نگه‌داری شیرخام، ۳۰ نمونه از تجهیزات فرآوری فرآورده‌های شیر و ۲۰ نمونه از سطوح مختلف سالن تولید نمونه‌گیری صورت گرفت. با توجه به نتایج حاصل مشخص گردید ۱٦/٦٦٪ از نمونه‌های اخذ شده از مخازن حمل و نگه‌داری شیر خام، ۲۰٪ تجهیزات فرآوری فرآورده‌های شیر و ٤۰٪ نمونه‌های مربوط به سطوح سالن تولید آلوده به گونه‌های باسیلوس بودند. هم‌چنین، گونه‌های متنوعی از جنس باسیلوس در نمونه‌های بررسی شده یافت گردید و بالاترین میزان فراوانی مربوط به *باسیلوس سرئوس* با ۳٦٪ و کم‌ترین میزان فراوانی مربوط به *باسیلوس آلوئی* و *باسیلوس پومیلوس* با ٤٪ فراوانی بود. نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌ها مشخص نمود که ۹٦٪ جدایه‌ها قابلیت تولید بیوفیلم داشتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، می‌توان به این جمع‌بندی رسید که روش متداول شستشوی درجا (CIP) بازده کافی برای رفع کامل بیوفیلم باسیلوس از سطوح مختلف را ندارد و نیاز به استفاده از رویکردی جدید برای رفع این مشکل وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، بیوفیلم، مخازن شیر خام، تجهیزات فرآوری فرآورده‌های شیر

مقدمه

گونه‌های باسیلوس، باکتری‌هایی هستند گرم مثبت، میله‌ای شکل و اسپورزا که اغلب دارای آرایش زنجیره‌ای داشته و هوازی یا بی‌هوازی اختیاری هستند. این جنس پراکندگی زیادی در طبیعت دارد و در خاک، آب، سطح گیاهان و در بدن حیوانات یافت می‌شود (Rajkowski and Bennet, 2003 Razavilar, 2002). مدت‌زمان تکثیر (Doubling time) گونه‌های آن ۲۷-۱۸ دقیقه است و می‌توانند در pH= ٤/٩-٩/٣ و غلظت بالای نمک (حدود ۷/۵ درصد) رشد کنند. باسیلوس‌ها یکی از شایع‌ترین باکتری‌های یافت شده در دامداری‌های تولید شیر هستند و عمدتاً به‌دلیل آلوده شدن نوک پستان دام با خاک، وارد شیر خام می‌شوند (Bremer *et al*., 2009; Svensson *et al*., 2004) و نوع غالب از باکتری‌های گرم مثبت موجود در شیر خام را تشکیل می‌دهند (Bremer *et al*., 2009). هم‌چنین این باکتری‌ها می‌توانند به‌طور ثانویه و از طریق تجهیزاتی که به‌طور کامل پاک‌سازی نشده‌اند به فرآورده‌های شیر راه پیدا کنند (Jessen and Lammert, 2003; Burgess *et al*., 2010). میزان D_{100} اسپورهای باسیلوس ٥/٤-٢/٢ دقیقه است که نشان‌دهنده مقاومت بالا به حرارت می‌باشد (Batt, 2014). اسپوردار بودن باسیلوس‌ها موجب مقاومت آن‌ها به مواد ضدعفونی کننده و حرارت شده و علاوه بر کاهش کیفیت فرآورده‌های شیر (Bremer *et al*., 2009)، برخی گونه‌های آن با تولید انتروتوکسین و شیوع مسمومیت غذایی، سلامتی مصرف‌کنندگان را با مخاطره مواجه می‌کنند (Svensson *et al*., 2004; Kumari *et al*., 2014). در این میان گونه‌های *آنتراسیس* (*anthracis*)، *سرئوس* (*cereus*)، *سوبتیلیس* (*subtilis*)، *ماسرانس* (*macerans*) و *پلی‌میکسا* (*polymyxa*) از اهمیت بیشتری از نظر بهداشت مواد غذایی برخوردارند (Rajkowski and Bennet, 2003). باسیلوس‌ها با آنزیم‌های خارج سلولی موجب تخریب ترکیبات غذایی می‌شوند و با واسطه پلی‌مرهایی خارج سلولی، علاوه‌بر تغییر در ویژگی‌های حسی مواد غذایی (Jenson, 2014)، نسبت به حرارت مقاومت پیدا می‌کنند (Flint *et al*., 1997; Marchand *et al*., 2012). شکل‌گیری بیوفیلم در مسیر دستگاه شیردوش و در سطوح تجهیزات فرآوری فرآورده‌های شیر بیانگر یک مشکل بهداشتی مستمر است و می‌تواند به زیان‌های بهداشتی و اقتصادی جدی در مواد غذایی و اختلال در عملکرد تجهیزات منجر شود (Pasvolsky *et al*., 2014).

بیوفیلم در اصطلاح به تجمعی از سلول‌های میکروبی که توانایی رشد بر روی سطوح مختلف را دارند و در داخل نوعی ماتریکس خارج‌سلولی و بی‌شکل احاطه شده‌اند، گفته می‌شود (Rodrigues *et al*., 2010). چسبندگی باکتریایی و تشکیل بیوفیلم در مراحل مختلف شامل: اتصال اولیه، اتصال غیرقابل برگشت، توسعه اولیه ساختار بیوفیلم و تکمیل ساختار بیوفیلم می‌باشد که در نهایت متلاشی شده و باکتری‌های داخل آن پراکنده می‌شوند (Kumar *et al*., 1998; Marchand *et al*., 2012; Srey *et al*., 2013). باکتری‌های موجود در شیر توانایی چسبیدن و تجمع بر روی سطوح استیل ضدزنگ را دارند؛ در نتیجه در مخازن ذخیره و خطوط فرآوری شیر بیوفیلم تشکیل می‌دهند (Marchand *et al*., 2012). بیوفیلم‌ها با مسدود کردن لوله‌ها در مبدل‌های حرارتی و برج‌های

خنک‌کننده، میزان انتقال حرارت را به‌طور محسوس کاهش داده و هم‌چنین سبب تجزیه غشاهای فراپالایش می‌شوند (Kumar *et al*., 1998; McDonogh *et al*., 1994; Anand *et al*., 2014). علاوه بر اختلال در فرایندهای تکنولوژیکی و آلودگی خطوط با بیوفیلم، موجب بروز بیماری‌های غذایی می‌گردد (Bryers, 2000).

با توجه به تبعات بهداشتی و اقتصادی ناشی از بیوفیلم‌ها در صنعت غذا و هم‌چنین نبود اطلاعات در مورد نقش باسیلوس‌ها در صنایع شیر و قابلیت تولید بیوفیلم توسط آن‌ها، هدف این مطالعه بررسی میزان آلودگی تانکرهای حمل شیرخام و تجهیزات فرآوری شیر و فرآورده‌های آن با باسیلوس‌ها و هم‌چنین قابلیت تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های این باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- روش نمونه‌گیری و کشت

نمونه‌برداری در یکی از کارخانه‌های تبریز و در طی سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. در مجموع ۸۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه از تانکرهای حمل و مخازن نگه‌داری شیرخام، ۳۰ نمونه از تجهیزات فرآوری، نگه‌داری و بسته‌بندی فرآورده‌های شیر (خطوط تولید شیر پاستوریزه، شیر استریلیزه، پنیر فراپالایش، دوغ و ماست) و ۲۰ نمونه از سطوح مختلف سالن تولید (نظیر کف سالن تولید، سطح تجهیزات، تسمه‌های نقاله و ...) نمونه‌گیری صورت گرفت. به این منظور پس از شستشو و پاک‌سازی متداول و انجام شستشوی درجا (Cleaning in place: CIP) بر اساس دستورالعمل جدول (۱)، نمونه‌ها با استفاده از برس سیمی استریل و به‌صورت مکانیکی از روی سطوح تراشیده و در سرم رینگر مخلوط گردید و سپس در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافت.

جدول (۱)- مراحل CIP مورد استفاده در کارخانه

مراحل	زمان (دقیقه)
شستشوی اولیه با آب	۱۰
شستشو با سود ۱ درصد (۷۰ درجه سلسیوس)	۳۰
آبکشی	۱۰
شستشو با اسید ۱٪-۰/۸ درصد (۶۰ درجه سلسیوس)	۳۰
آب‌کشی نهایی	۱۰
استریل کردن با آب داغ (۹۰ درجه سلسیوس)	۱۰

نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با دور g ۴۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب داده شدند. رسوب به‌دست آمده در محیط تریپتیک سوی آگار (Merck, Germany) به‌صورت پورپلیت کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید.

پرگنه‌های به‌دست آمده تحت آزمون‌های غربال‌گری و تأییدی قرار گرفتند.

- آزمون‌های غربال‌گری و افتراقی

ابتدا جدایه‌ها مورد ارزیابی مورفولوژیکی شامل رنگ‌آمیزی گرم و رنگ‌آمیزی اسپور قرار گرفتند و باسیل‌های گرم مثبت و حاوی اندواسپور به‌عنوان جنس باسیلوس انتخاب شدند. سپس هر یک از پرگنه‌ها (با خصوصیات ظاهری متفاوت) در محیط کشت تریپتیک سوی آگار به‌صورت خطی کشت داده شدند تا از خالص بودن آن‌ها اطمینان حاصل شود (Tortorelli and Anderson, 2001). برای شناسایی افتراقی گونه‌های باسیلوس از آزمون‌های مرفولوژیکی و بیوشیمیایی استاندارد مطابق جدول (۱) استفاده شد (Cowan *et al*., 2004).

جدول (۱)- جدول تشخیص تفریقی گونه‌های باسیلوس (Cowan *et al.*, 2004)

آزمون	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱٥	۱٦	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲٤
واکنش گرم	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	D	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
زنجیره سلولی	+	+	+	+	d	d	+	+	d	d	d	d	D	d	-	d	-	-	-	-	+	d	-	d
تحرک*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
طول سلول	+	+	+	+	-	-	d	-	-	-	-	+	-	+	d	d	d	d	d	+	+	-	-	-
موقعیت و شکل اسپور	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VTX	TYX	VX	VX	VTX	VX	VX	VX	TY	VTX	VX	VX	VTX
تورم سلول مادری	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	d	+	+
رشد در ۵۰ °C	-	-	-	-	-	-	-	d	-	+	+	+	+	-	d	d	-	+	-	-	d	+	+	+
رشد در ۱۰٪ کلریدسدیم	+	d	d	d	+	-	-	+	d	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد بی‌هوازی	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	d	-	-
تولید اسید از:																								
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
سلوبیوز	-	d	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	-	+	-	+	d	+	+	-	-	d	d	d
گالاکتوز	-	-	d	-	-	d	+	+	d	+	d	d	-	d	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
مانوز	-	-	-	d	d	+	d	+	+	+	+	+	D	d	-	+	d	+	+	-	-	+	d	+
ملیبیوز	-	-	-	-	-	d	+	d	d	d	d	+	-	d	-	+	-	+	+	-	-	d	-	+
رافینوز	-	-	-	-	-	-	d	+	+	d	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	d	d	+
سالیسین	-	+	d	d	-	d	+	+	+	+	+	d	D	d	-	+	-	+	+	-	-	d	+	d
زایلوز	-	-	-	-	-	-	+	+	d	+	d	d	-	-	-	+	-	+	+	-	-	d	+	-
ONPG	-	-	d	-	d	+	+	+	+	+	d	d	D	d	d	+	-	+	+	-	-	d	-	-
استفاده از سیترات	-	d	d	+	-	-	+	+	+	+	d	d	-	-	d	-	-	-	d	d	-	-	-	-
اوره‌آز	-	d	d	-	-	+	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-
ایندول	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	d	d	+	-	d	+	d	+	-	-	d	+	d
کاهش نیترات	+	+	+	+	+	-	d	-	-	+	+	d	d	-	d	d	+	+	+	d	-	+	-	d
هیدرولیز کازئین	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	d	-	+	+	d	-	-	d
هیدرولیزهیپورات	-	-	-	-	+	+	-	+	d	-	-	+	-	+	+	-	d	d	-	-	d	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
اکسیداز	d	d	d	d	-	+	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	+	-	+	d	-	-	-

۱- *باسیلوس آنتراسیس* ۲- *باسیلوس سرئوس* ۳- *باسیلوس میکوئیدیس* ٤- *باسیلوس تورنجینسیس* ٥- *باسیلوس فیرموس* ٦- *باسیلوس لنتوس* ۷- *باسیلوس مگاتریوم* ۸- *باسیلوس پومیلوس* ۹- *باسیلوس سوبتیلیس* ۱۰- *باسیلوس لیشنی فورمیس* ۱۱- *باسیلوس آمیلولیکونیفاسینس* ۱۲- *باسیلوس کوآگولانس* ۱۳- *باسیلوس پانتوتنتیکوس* ۱٤- *باسیلوس آلوئی* ۱٥- *باسیلوس برویس* ۱٦- *باسیلوس سیرکولانس* ۱۷- *باسیلوس لاتروسپورس* ۱۸- *باسیلوس ماسرانس* ۱۹- *باسیلوس پلی‌میکسا* ۲۰- *باسیلوس اسفریکوس* ۲۱- *باسیلوس بادیوس* ۲۲- *باسیلوس استئاروترموفیلوس* گروه I ۲۳- *باسیلوس استئاروترموفیلوس* گروه II ۲٤- *باسیلوس استئاروترموفیلوس* گروه III

*گونه‌های متحرک ممکن است موتانت‌های غیرمتحرک تولید کنند. T: اسپورها در حالت ترمینال؛ V: اسپورها در حالت مرکزی/ساب ترمینال؛ X: اسپورها به‌شکل بیضی؛ O: اسپورها به‌شکل گرد؛ (+): ۱۰۰-۸۵٪ سویه‌ها مثبت؛ (-): ۱۵-۰٪ سویه‌ها منفی؛ d: ۸٤-۱٦٪ سویه‌ها مثبت

- قابلیت تولید بیوفیلم

برای تعیین قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها از روش کمی میکروپلیت (Microplate quantitative assay) استفاده شد (Srey *et al*., 2013). بر اساس این روش، جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر (Merck, Germany) به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس تجدید کشت شدند. سپس مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۲ درصد ساکارز و ۲ درصد گلوگز به هر گوده میکروپلیت انتقال داده شد و در ادامه ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی تجدید کشت شده در آن تلقیح گردید. تمامی جدایه‌ها و هم‌چنین نمونه شاهد منفی (از محیط کشت استریل استفاده شد) در سه تکرار ارزیابی شدند. میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید و در پایان این مدت، محتویات آن تخلیه و ۳ مرتبه با ۲۵۰ میکرولیتر آب یون‌زدایی شده (Deionized water) شستشو داده شد. برای تثبیت بیوفیلم در داخل گوده‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد به هر گروه اضافه و پس از ۱۵ دقیقه، تخلیه و در دمای آزمایشگاه خشک گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کریستال‌ویوله ۲ درصد به هر گوده اضافه و بعد از ۵ دقیقه آب‌کشی و در شرایط محیطی خشک گردید. کریستال‌ویوله باقیمانده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به هر گوده حل شد و شدت رنگ ایجاد شده با ELISA Reader (TECAN, Switzerland) در طول‌موج ٤۹۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید. نتیجه میزان تولید بیوفیلم با استفاده از الگوی مندرج در جدول (۲) تفسیر گردید:

جدول (۲)- میزان جذب نوری و نحوه محاسبه مقدار تولید بیوفیلم در جدایه‌های باسیلوس

جذب نوری*	تولید بیوفیلم
$OD_X \leq OD_T$	عدم تولید
$OD_T < OD_X \leq 2OD_T$	کم
$2OD_T < OD_X \leq 4OD_T$	متوسط
$OD_X > 4OD_T$	زیاد

* OD_T و OD_X به‌ترتیب جذب نوری نمونه‌های شاهد و مجهول می‌باشد.

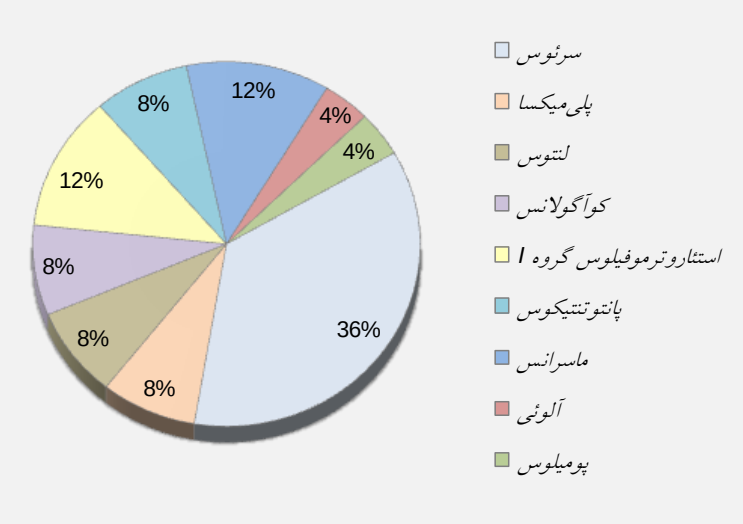
یافته‌ها

نتایج به‌دست آمده از نمونه‌برداری در جدول (۳) آمده است. با توجه به نتایج آزمون‌های غربال‌گری و افتراقی، از ۸۰ نمونه اخذ شده از محل‌های مختلف، ۱۹ نمونه (۲۳/۷۵٪) آلوده به جنس باسیلوس‌ها بودند. ازاین بین میزان آلودگی مخازن حمل و نگه‌داری شیرخام ۱٦/٦٦٪، تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی فرآورده‌های شیر ۲۰٪ و سطوح مختلف سالن تولید ٤۰٪ برآورد شد.

جدول (۳)- تعداد نمونه، تعداد و درصد موارد مثبت و تنوع گونه‌ای باسیلوس محل‌های نمونه‌گیری

محل نمونه‌برداری	تعداد نمونه (نمونه مثبت)	درصد نمونه مثبت	تنوع میکروبی
مخازن حمل و نگه‌داری شیرخام	۳۰ (۵)	٪۱۶/۶۶	۵
تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی	۳۰ (۶)	٪۲۰	۷
سطوح سالن	۲۰ (۸)	٪۴۰	۱۳

بر اساس نتایج آزمون‌های افتراقی، ۲۵ جدایه به‌دست آمده متشکل از ۹ گونه متنوع بودند. بالاترین میزان فراوانی گونه *سرئوس* با ۳۶٪ و کم‌ترین میزان فراوانی به گونه‌های *آلوئی* و *پومیلوس* با ٤٪ اختصاص داشت (نمودار ۱).



نمودار (۱)- درصد فراوانی گونه‌های باسیلوس جدا شده از نمونه‌های مختلف

بر اساس یافته‌های جدول (٤) به‌غیر از یک مورد، تمامی جدایه‌ها مولد بیوفیلم بودند و درجات مختلفی از بیوفیلم را تولید نمودند. در بین گونه‌های مختلف باسیلوس، گونه *پلی‌میکسا* تولیدکننده قوی، گونه‌های *کواگولانس* و *ماسرانس* مقادیر متوسط و سایر گونه‌ها مولدین ضعیف بیوفیلم شناسایی شدند.

جدول (٤)- وضعیت تولید بیوفیلم در گونه‌های مختلف باسیلوس بر اساس میزان جذب نوری

گونه باسیلوس	تعداد جدایه	جذب نوری (Mean ± SD)*	تولید بیوفیلم
سرئوس	۹	۰/۲٥٤ ±۰/۰۸٦	ضعیف
پلی‌میکسا	۲	۳/۲۰٥ ±۰/۳٤	قوی
لنتوس	۲	۰/۲۷۲ ±۰/۰٦۳	ضعیف
کواگولانس	۲	۰/٤۸۰ ± ۰/۱۱	متوسط
استئاروترموفیلوس (گروه I)	۳	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۲۷	ضعیف
پانتوتنتیکوس	۲	۰/۲۱۸ ±۰/۰۳۱	ضعیف
ماسرانس	۳	۰/۳۱۱ ±۰/۰٥	متوسط
آلوئی	۱	۰/۲۲۳ ±۰/۰۲	ضعیف
پومیلوس	۱	۰/۲۸۷ ±۰/۱۱	ضعیف
نمونه شاهد		۰/۱٦٥	منفی

* اعداد میانگین سه تکرار می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۲۳/۷٥٪ از کل نمونه‌ها آلوده به جنس باسیلوس تشخیص داده شدند. در مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که به‌رغم استفاده روش‌های مختلف پاک‌سازی و آلودگی‌زدایی، گونه‌های مختلف باکتریایی و از آن جمله گونه‌های باسیلوس از بیوفیلم تانک بالانس، تسمه‌های نقاله و تانک ذخیره شیر و تجهیزات فرآوری شیر و فرآورده‌های آن جداسازی شده است (Marchand *et al*., 2012). در این مطالعه، آلودگی‌ها در بخش‌های مختلف از جمله تانکرهای حمل و نگه‌داری شیر خام، تسمه‌های نقاله، زانوی خروجی و کف سالن تولید یافت شد. با توجه به این‌که نمونه‌برداری بعد از شستشوی درجا صورت گرفته بود، انتظار می‌رفت که آلودگی تا حد قابل‌ملاحظه‌ای برطرف شده باشد. وجود نمونه‌های مثبت فراوان در سطوح مختلف سالن تولید اعم از کف سالن و تسمه نقاله بیان‌گر وجود منبع آلودگی و احتمال بروز فساد در فرآورده‌ها است. وجود درز و شکاف در کف سالن، عدم رعایت اصول شستشوی کف سالن و نظایر آن باعث حضور گسترده باسیلوس‌ها در محل فرآوری محصول شده است. زانوی خروجی تانک‌ها به‌عنوان نقاط کور و زاویه‌دار دور از دید کارکنان قرار گرفته و از طرفی محلول‌های شستشو در این قسمت‌ها گردش مناسب و در نتیجه کارایی لازم را ندارند. تانکرهای حمل و نگه‌داری شیرخام نیز از منابع آلودگی بودند که عدم کارایی شستشوی درجا را در تانکرها نشان می‌دهد. محلول‌های شستشو تمامی سطوح تانکرها را در برنمی‌گیرند و محل‌های اتصال ورق‌های فلزی به‌ویژه در تانکرهای غیراستاندارد حمل شیر، درب تانکر، نازل منفذدار سقف تانکر و زانوی خروجی شیر از مکان‌هایی هستند که به‌سختی شستشو می‌شوند و عملاً محلول‌های شستشوی درجا به‌تنهایی کفایت لازم را برای ضدعفونی این مناطق ندارند. باقی‌ماندن آلودگی در این قبیل بخش‌ها، کانون‌هایی برای آلودگی ثانویه فرآورده‌ها تشکیل می‌دهند؛

به‌طوری‌که در مطالعه‌ای *باسیلوس سرئوس* کـه پـس از شستشوی درجا در تانک‌های خنک‌کننده شیر باقی‌مانـده بود، در نتیجه مساعد شدن شرایط محیطی بـه حـدود ٦ واحد لگاریتمی در هر سانتی‌متـر مربـع از سـطح تـانکر افزایش یافت (Kumari and Sarkar, 2014).

در این مطالعه، آلودگی از همـه منـاطق نمونـه‌گیـری جداسازی شد و از ۲۵ جدایه، ۱۸ مورد مربوط به تسمه نقاله‌ها، کف سـالن و زانـوی لولـه‌هـا بودنـد. در مـورد محل‌های مستعد برای حضـور آلـودگی‌هـای میکروبـی، نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد که هرقدر سطوح ناصاف‌تر و دارای شیارها و منافذ بیشتری باشند و هم‌چنین دارای نقاط کور و غیرقابل دسترس باشند، احتمـال حضـور و تشکیل بیوفیلم میکروبی بیشتر خواهد بـود (Adetunji *et al.*, 2011). در مقابل، بیوفیلم‌ها در سطوح شیشـه‌ای به‌دلیل داشتن سطحی صاف و صیقلی و مقاومت بالا در برابر خوردگی نسبت کمتر تشکیل مـی‌شـوند (Srey *et al.*, 2012).

در بررسـی حاضـر گونـه‌هـای متنـوعی از جـنس باسیلوس یافت گردید. تولید شیر در دامداری‌های سنتی و شیردوشی دستی، امکـان آلـوده شـدن شـیر از منـابع محیطی را افزایش می‌دهد و این آلودگی‌ها به تانک‌های حمل و تجهیزات فرآوری انتقـال مـی‌یابنـد. هـم‌چنـین آلودگی‌های هوا و پدیده گرد و غبـار و ذرات معلـق در هوا که به‌همراه خود، میکـروب‌هـای مختلـف بـه‌ویـژه اسپورداران را در محیط کارخانه انتشار می‌دهنـد، عامـل دیگری اسـت کـه مـی‌توانـد دلیـل وجـود تنـوع بـالای گونه‌هـای باسـیلوس باشـد. در تحقیقـی کـه در منطقـه آذربایجان‌شرقی بر روی باکتری‌های اسپوردار هوازی در شیر خام و پاستوریزه انجام گرفت، مشابه مطالعـه اخیـر گونه‌های متنوعی از باسیلوس (متشـکل از ۱۲ گونـه در شـیر خـام و ۸ گونـه در نمونـه‌هـای شـیر پاسـتوریزه) شناسایی گردید (Shayegh *et al.*, 2016).

در بررسی اخیر نیز آلودگی با *باسیلوس سـرئوس* در ۹ قسمت از نقاط مختلف کارخانه شـیر از جملـه کـف سالن فرآورده‌های استریل، تسمه نقاله و دسـتگاه پـرکن دوغ و غشـای فراپـالایش جداسـازی گردیـد کـه نشان‌دهنده مقاومت بالای این باکتری به مواد شـوینده و شرایط محیطی است. در یک مطالعه بر روی *باسـیلوس سرئوس* جداشده از تانک‌های خنک کننده شـیر، بعـد از عمل تمیز کردن نشـان داد کـه تعـداد ایـن بـاکتری بـه $۱۰^{٦}$ cfu/cm^2 افزایش پیـدا کـرده اسـت (Kumari and Sarkar, 2014).

بر اساس نتایج بـه‌دسـت آمـده، ۹٦٪ جدایـه‌هـا (۲٤ مورد از ۲۵ جدایه) توانایی تولید بیوفیلم داشتند. با ایـن توضیح که درجات مختلفی از تولید بیوفیلم از «ضعیف» تا «قوی» در بین گونه‌های مختلـف باسـیلوس مشـاهده شد. از نظر مقدار تولیـد بیـوفیلم، گونـه‌هـای *سـرئوس*، *لنتـوس*، *پـانتوتنتیکوس*، *اسـتئاروترموفیلوس*، *آلـوئی* و *پومیلوس* ضـعیف و *کواگـولانس* و *ماسـرانس* متوسـط بودند و فقط یکی از گونه‌های *پلـی‌میکسـا* مولـد قـوی بیوفیلم بود و جذب نوری ۱۹ برابر نمونه شاهد داشت. این در حالی است که دیگر گونه *پلی‌میکسا* (جـدا شـده از تانکر حمل شیر خـام) در سـه تکـرار آزمـایش فاقـد توانایی تولید بیوفیلم تشخیص داده شد و ایـن موضـوع حاکی از تفاوت تولید بیوفیلم نه‌تنها در بـین گونـه‌هـای مختلف باسیلوس، بلکه در سویه‌های مختلف یک گونـه واحد می‌باشد. بـه‌عـلاوه، ایـن سـویه‌هـا از مکـان‌هـای مختلف و با شرایط محیطی متفاوت جدا شدند؛ بنابراین

ممکن است تفاوت‌های محیطی در بعضی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و رفتاری آن‌ها تأثیرگذار باشد.

با توجه به نتایج مطالعه می‌توان به این جمع‌بندی رسید که روش شستشو و پاک‌سازی متداول در صنایع شیر برای رفع کامل آلودگی‌ها به‌ویژه در بخش‌هایی که دارای سطح ناصاف و درز و شکاف هستند، مؤثر نمی‌باشد. جداسازی گونه‌های متنوع باسیلوس حاکی از وجود کانون‌های متعدد آلودگی اولیه و ثانویه در شیر و فرآورده‌های آن می‌باشد. به‌ویژه این‌که اکثر این جدایه‌ها قابلیت تولید بیوفیلم داشتند و این خاصیت امکان پاکسازی آن‌ها از سطوح را با مشکل همراه می‌سازد. استفاده از روش‌های تکمیلی فیزیکی (امواج اولتراسوند و پاکسازی مکانیکی) و شیمیایی (آنزیم‌ها، سورفتکتانت‌ها، ...) توأم با نظارت دقیق بر نحوه انجام شستشوی درجا، بازرسی، تمیز نمودن یا تعویض دوره‌ای قطعاتی که مستعد تشکیل بیوفیلم هستند، می‌تواند از بروز پیامدهای بهداشتی و ضرر و زیان‌های اقتصادی جلوگیری کند.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد و با استفاده از امکانات آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی دانشکده کشاورزی انجام گرفت.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Adetunji, V.O. and Isola, T.O. (2011). Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and Listeria spp on wood, steel and glass surfaces. Global Veterinaria, 6(1): 6–10.
- Anand, S., Singh, D., Avadhanula, M. and Marka, S. (2014). Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13(1): 18–33.
- Batt, C.A. (2014). *Bacillus cereus*, In: Batt, C.A. and Robinsson, R.K. (Editors), Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edition, Academic Press, pp. 124–129.
- Bremer, P.J., Seale, B., Flint, S. and Palmer, J. (2009). Biofilms in dairy processing. In: Fratamico, P.M., Annous, B.A. and Gunther, N.W. (Editors), Biofilms in the Food and Beverage Industries. Oxford, Cambridge, New Delhi: Wood head Publishing Limited, pp. 396–431.
- Burgess, S.A., Lindsay, D. and Flint, S.H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal Food Microbiology, 144(2): 215–225.
- Cowan, S.T., Barrow, G.I., Steel, K.J. and Feltham, R.K.A. (2004). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press. p. 55.
- Tortorelli S. and Anderson, J.E. (2001). In: Downes, F.P. and Ito, K. (Editors), Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods. 4th Edition, American Public Health Association, Washington DC. pp. 223–226.
- Flint, S.H., Bremer, P.J. and Brooks, J.D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. Biofouling, 11(1): 81–97.
- Jenson, I. (2014). Bacillus, In: Batt, C.A. and Robinsson, R.K. (Editors), Encyclopedia of Food Microbiology, 2th Edition, Academic Press, pp. 111–117.

- Jessen, B. and Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. International Biodeterioration & Biodegradation, 51(4): 265–269.
- Kumar, C.G. and Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology, 42(1): 9–27.
- Kumari, S. and Sarkar, P.K. (2014). In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. Food Control, 36(1): 153–158.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M. and Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments: influence on milk quality and safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11(2): 133–147.
- McDonogh, R., Schaule, G. and Flemming, H.C. (1994). The permeability of biofouling layers on membranes. Journal of Membrane Science, 87(1): 199–217.
- Pagedar, A., Singh, J. and Batish, V.K. (2011). Efflux mediated adaptive and cross resistance to ciprofloxacin and benzalkonium chloride in *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin. Journal of Basic Microbiology, 51: 289–295.
- Pasvolsky, R., Zakin, V., Ostrova, I. and Shemesh, M. (2014). Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of Bacillus species. International Journal of Food Microbiology, 181(2): 19–27.
- Rajkowski, K.T. and Bennett, R.W. (2003). *Bacillus cereus*, In: Miliotis, M.D. and Bier, J.W. (Editors), International Handbook of Foodborne Pathogens, Marcel Dekker Inc, pp. 27–39.
- Razavilar, V. (2002). Pathogenic Microorganisms in the Foods and Epidemiology of food Poisoning. 2nd Edition, University of Tehran Publication, pp. 153–157 [In Persian].
- Rodrigues, L.B., Santos, L.R.D., Tagliari, V.Z., Rizzo, N.N., Trenhago, G., Oliveira, A.P.D. *et al*., (2010). Quantification of biofilm production on polystyrene by Listeria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Brazilian Journal of Microbiology, 41(4): 1082–1085.
- Srey, S., Jahid, I.K. and Ha, S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food Control, 31(2): 572–585.
- Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H. and Christiansson, A. (2004). Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. International Dairy Journal, 14(1): 17–27.

Diversity of Bacillus species isolated from biofilm of raw milk tankers and dairy processing equipment

Ansari, A. H.[1], Hanifian, S.[2, 3*]

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3. Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author's E.mail: hanifian@iaut.ac.ir

(Received: 2016/7/17 Accepted: 2016/9/9)

Abstract

Bacillus is the dominant genus encloses gram-positive spore-formers that some are considered as a threat to the quality of foods and consumers' health. This study aimed to explore the occurrence of Bacillus species in raw milk tankers and dairy processing equipment as well as to examine the biofilm-forming ability of the isolates. For this reason, a total of 80 samples consisting of 30 samples obtained from raw milk tankers, 30 samples of dairy processing equipment and 20 samples from various surfaces of the production plant was collected. According to the results, 16.66% of the samples obtained from raw milk tankers, 20% of dairy processing equipment and 40% of surface samples were found positive for Bacillus species. Various species of the Bacillus were found; amongst *B. cereus* with 36% and *B. aloe* and *B. pumilus* with 4% occurrence rate, were the most and least abundant species, respectively. Results of biofilm production revealed that 96% of the isolates were capable of producing biofilm. Eventually, it was concluded that conventional CIP procedure is unable to entirely remove the biofilm of Bacillus species from dairy plant surfaces. Hence, there is a need for a new approach to conquering the problem.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Bacillus, Biofilm, Raw milk tankers, Dairy processing equipment