

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

امیرحسین انصاری<sup>۱</sup>، شهرام حنیفیان<sup>۲،۳\*</sup>

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: ۹۵/۴/۲۷ 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 بیوفیلیم جدایه‌ها انجام پذیرفت. برای این منظور تعداد ۸۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه از مخازن حمل و نگهداری شیر خام، 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 ۱۶/۶۶٪ از نمونه‌های اخذ شده از مخازن حمل و نگهداری شیر خام، ۲۰٪ تجهیزات فرآوری فرآورده‌های شیر و ۴۰٪ 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 ۳۶٪ و کم‌ترین میزان فراوانی مربوط به باسیلوس آلوی و باسیلوس پومیلوس با ۴٪ فراوانی بود. نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلیم توسط جدایه‌ها مشخص نمود که ۹۶٪ جدایه‌ها قابلیت تولید بیوفیلیم داشتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، می‌توان به این جمع‌بندی رسید که روش متداول شستشوی درجا (CIP) بازده کافی برای رفع کامل بیوفیلیم باسیلوس از سطوح مختلف را ندارد و نیاز به استفاده از رویکردی جدید برای رفع این مشکل وجود دارد.

**واژه‌های کلیدی:** باسیلوس، بیوفیلیم، 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). مدت زمان تکثیر (Doubling time) گونه‌های آن ۲۷-۱۸ دقیقه است و می‌تواند در  $pH= 4/9-9/3$  و غلظت بالای نمک (حدود ۷/۵ درصد) رشد کنند. باسیلوس‌ها یکی از شایع‌ترین باکتری‌های یافت شده در دامداری‌های تولید شیر هستند و عمدتاً به دلیل 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 تجهیزات آبی که به‌طور کامل پاک‌سازی نشده‌اند به فرآورده‌های شیر راه پیدا کنند (Jessen and Lammert, 2003; Burgess et al., 2010). میزان  $D_{100}$  اسپورهای باسیلوس ۲/۲-۵/۴ 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 انترتوکسین 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 پلی‌مرهای خارج سلولی، علاوه بر تغییر در ویژگی‌های حسی مواد غذایی (Jenson, Flint, 2014)، نسبت به حرارت مقاومت پیدا می‌کنند (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 خارج سلولی 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

## مواد و روش

### - 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 فرپالایش، 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 به صورت مکانیکی از روی سطوح تراشیده و در سرم رینگر مخلوط گردید و سپس در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافت.

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

جدول (۱) - مراحل CIP مورد استفاده در کارخانه

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

پورپلیت کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید.

نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ g سانتیفریوژ و رسوب داده شدند. رسوب به دست آمده در محیط تریپتیک سوی آگار (Merck, Germany) به صورت

سوی آگار به صورت خطی کشت داده شدند تا از خالص بودن آنها اطمینان حاصل شود ( Tortorelli and Anderson, 2001). برای شناسایی افتراقی گونه‌های باسیلوس از آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استاندارد مطابق جدول (۱) استفاده شد (Cowan *et al.*, 2004).

پرگنه‌های به دست 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 به عنوان جنس باسیلوس انتخاب شدند. سپس هر یک از پرگنه‌ها (با خصوصیات ظاهری متفاوت) در محیط کشت تریپتیک

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

آزمون	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴
واکنش گرم	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	d	D	d	-	d	+	-	-	d	+	d	d	d
زنجیره سلولی	+	+	+	+	d	d	d	d	d	d	d	d	D	d	-	d	-	-	-	-	-	d	d	d
تحریک*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
طول سلول	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
موقعیت و شکل اسپور	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX	VX
تورم سلول مادری	-	-	-	-	d	d	d	d	d	d	d	d	D	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در ۵۰ °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد در ۱۰٪ کلرید سدیم	+	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	D	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد بی‌هوازی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید اسید از:																								
گلوز	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سولویوز	-	d	d	-	-	+	+	d	+	-	d	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
گالاکتوز	-	-	-	-	-	+	+	-	-	d	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
مانوز	-	-	-	-	-	+	+	d	+	-	d	+	D	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ملیبیوز	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رافینوز	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سالیسین	-	+	d	-	-	+	+	-	+	-	d	+	D	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+
زایلوز	-	+	d	-	-	+	+	-	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	d	+	D	d	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+
استفاده از سیترات	-	-	-	-	d	d	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اوره‌آز	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ایندول	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	d	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
کاهش نیترات	+	+	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز کازئین	+	-	-	d	+	+	-	d	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز هیپورات	-	+	+	d	-	-	d	d	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هیدرولیز نشاسته	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d

- ۱- باسیلوس آنتراسیس
- ۲- باسیلوس سرئوس
- ۳- باسیلوس میکوثیادیس
- ۴- باسیلوس تورنجینسیس
- ۵- باسیلوس فیرموس
- ۶- باسیلوس لنتوس
- ۷- باسیلوس مگاتریوم
- ۸- باسیلوس پومیوس
- ۹- باسیلوس سوتیلیس
- ۱۰- باسیلوس لیشتنی فورمیس
- ۱۱- باسیلوس آمیلولیکونیفاسینس
- ۱۲- باسیلوس کوآگولانس
- ۱۳- باسیلوس پاتوتنتیکوس
- ۱۴- باسیلوس آلوتی
- ۱۵- باسیلوس برویس
- ۱۶- باسیلوس سیرکولانس
- ۱۷- باسیلوس لاتروسپورس
- ۱۸- باسیلوس ماسرانس
- ۱۹- باسیلوس پلی میکسا
- ۲۰- باسیلوس اسفریکوس
- ۲۱- باسیلوس بادیرس
- ۲۲- باسیلوس استئاروترموفیلوس گروه I
- ۲۳- باسیلوس استئاروترموفیلوس گروه II
- ۲۴- باسیلوس استئاروترموفیلوس گروه III

\*گونه‌های متحرک ممکن است موتانت‌های غیر متحرک تولید کنند. T: اسپورها در حالت ترمینال؛ V: اسپورها در حالت مرکزی/ساب ترمینال؛ X: اسپورها به شکل بیضی؛ O: اسپورها به شکل گرد؛ (+): ۱۰۰-۸۵٪ سوبه‌ها مثبت؛ (-): ۱۵-۰٪ سوبه‌ها منفی؛ d: ۸۴-۱۶٪ سوبه‌ها مثبت

## - قابلیت تولید بیوفیلیم

برای تعیین قابلیت تولید بیوفیلیم جدایه‌ها از روش کمی میکروپلیت (Microplate quantitative assay) استفاده شد (Srey *et al.*, 2013). بر اساس این روش، جدایه‌ها در محیط تریپتیک سوی برات حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر (Merck, Germany) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس تجدید کشت شدند. سپس مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی برات حاوی ۲ درصد ساکارز و ۲ درصد گلوکز 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 به مدت ۴۸ 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 بیوفیلیم 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 طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید. نتیجه میزان تولید بیوفیلیم با استفاده از الگوی مندرج در جدول (۲) تفسیر گردید:

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

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

\*  $OD_x$  و  $OD_T$  به ترتیب جذب نوری نمونه‌های شاهد و مجهول می‌باشد.

## یافته‌ها

نمونه (۲۳/۷۵٪) آلوده به جنس باسیلوس‌ها بودند. از این بین میزان آلودگی مخازن حمل و نگه‌داری شیرخام ۱۶/۶۶٪، تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی فرآورده‌های شیر ۲۰٪ و سطوح مختلف سالن تولید ۴۰٪ برآورد شد.

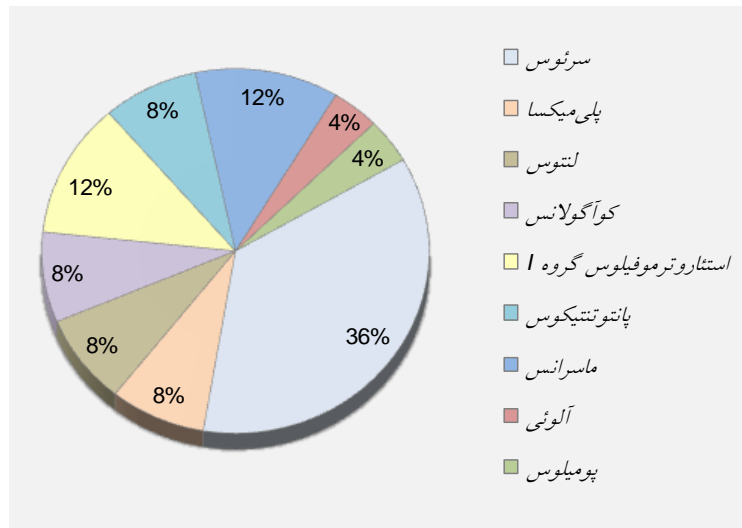
نتایج به دست آمده از نمونه‌برداری در جدول (۳) آمده است. با توجه به نتایج آزمون‌های غربال‌گری و افتراقی، از ۸۰ نمونه اخذ شده از محل‌های مختلف، ۱۹

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

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

گونه سرئوس با ۳۶٪ و کم‌ترین میزان فراوانی به گونه‌های آلئویی و پومیلوس با ۴٪ اختصاص داشت (نمودار ۱).

بر اساس نتایج آزمون‌های افتراقی، ۲۵ جدایه به‌دست آمده متشکل از ۹ گونه متنوع بودند. بالاترین میزان فراوانی



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

باسیلوس، گونه پلی‌میکسا تولیدکننده قوی، گونه‌های کوآگولانس و ماسرانس مقادیر متوسط و سایر گونه‌ها مولدین ضعیف بیوفیلم شناسایی شدند.

بر اساس یافته‌های جدول (۴) به‌غیر از یک مورد، تمامی جدایه‌ها مولد بیوفیلم بودند و درجات مختلفی از بیوفیلم را تولید نمودند. در بین گونه‌های مختلف

جدول (۴) - وضعیت تولید بیوفیلیم در گونه‌های مختلف باسیلوس بر اساس میزان جذب نوری

گونه باسیلوس	تعداد جدایه	جذب نوری (Mean ± SD)*	تولید بیوفیلیم
سرنوس	۹	۰/۲۵۴ ± ۰/۰۸۶	ضعیف
پلی میکسا	۲	۳/۲۰۵ ± ۰/۳۴	قوی
لنتوس	۲	۰/۲۷۲ ± ۰/۰۶۳	ضعیف
کواگولانس	۲	۰/۴۸۰ ± ۰/۱۱	متوسط
استناروترموفیلوس (گروه I)	۳	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۲۷	ضعیف
پاتوتنتیکوس	۲	۰/۲۱۸ ± ۰/۰۳۱	ضعیف
ماسرانس	۳	۰/۳۱۱ ± ۰/۰۵	متوسط
آلونی	۱	۰/۲۲۳ ± ۰/۰۲	ضعیف
پومیلوس	۱	۰/۲۸۷ ± ۰/۱۱	ضعیف
نمونه شاهد		۰/۱۶۵	منفی

\* اعداد میانگین سه تکرار می‌باشند.

## بحث و نتیجه‌گیری

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؛

در این مطالعه ۲۳/۷۵٪ 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 بیوفیلیم 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 قابل ملاحظه‌ای 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



گونه‌های متنوعی از باسیلوس (متشکل از ۱۲ گونه در شیر خام و ۸ گونه در نمونه‌های شیر پاستوریزه) شناسایی گردید (Shayegh et al., 2016).

در بررسی اخیر نیز آلودگی با باسیلوس سرئوس در ۹ قسمت از نقاط مختلف کارخانه شیر از جمله کف سالن فرآورده‌های استریل، تسمه نقاله و دستگاه پرکن دوغ و غشای فرآپالایش جداسازی گردید که نشان‌دهنده مقاومت بالای این باکتری به مواد شوینده و شرایط محیطی است. در یک مطالعه بر روی باسیلوس سرئوس جدا شده از تانک‌های خنک کننده شیر، بعد از عمل تمیز کردن نشان داد که تعداد این باکتری به  $10^6$  cfu/cm<sup>2</sup> افزایش پیدا کرده است (Kumari and Sarkar, 2014).

بر اساس نتایج به دست آمده، ۹۶٪ جدایه‌ها (۲۴ مورد از ۲۵ جدایه) توانایی تولید بیوفیلیم داشتند. با این توضیح که درجات مختلفی از تولید بیوفیلیم از «ضعیف» تا «قوی» در بین گونه‌های مختلف باسیلوس مشاهده شد. از نظر مقدار تولید بیوفیلیم، گونه‌های سرئوس، لنتوس، پانتوتنتیکوس، استئاروترموفیلوس، آلوئی و پومیلوس ضعیف و کواگولانس و ماسرانس متوسط بودند و فقط یکی از گونه‌های پلی میکسا مولد قوی بیوفیلیم بود و جذب نوری ۱۹ برابر نمونه شاهد داشت. این در حالی است که دیگر گونه پلی میکسا (جدا شده از تانکر حمل شیر خام) در سه تکرار آزمایش فاقد توانایی تولید بیوفیلیم تشخیص داده شد و این موضوع حاکی از تفاوت تولید بیوفیلیم نه تنها در بین گونه‌های مختلف باسیلوس، بلکه در سویه‌های مختلف یک گونه واحد می‌باشد. به علاوه، این سویه‌ها از مکان‌های مختلف و با شرایط محیطی متفاوت جدا شدند؛ بنابراین

به طوری که در مطالعه‌ای باسیلوس سرئوس که پس از شستشوی درجا در تانک‌های خنک‌کننده شیر باقی مانده بود، در نتیجه مساعد شدن شرایط محیطی به حدود ۶ واحد لگاریتمی در هر سانتی متر مربع از سطح تانکر افزایش یافت (Kumari and Sarkar, 2014).

در این مطالعه، آلودگی از همه مناطق نمونه‌گیری جداسازی شد و از ۲۵ جدایه، ۱۸ مورد مربوط به تسمه نقاله‌ها، کف سالن و زانوی لوله‌ها بودند. در مورد محل‌های مستعد برای حضور آلودگی‌های میکروبی، نتایج به وضوح نشان می‌دهد که هر قدر سطوح ناصاف‌تر و دارای شیارها و منافذ بیشتری باشند و هم چنین دارای نقاط کور و غیرقابل دسترس باشند، احتمال حضور و تشکیل بیوفیلیم میکروبی بیشتر خواهد بود (Adetunji et al., 2011). در مقابل، بیوفیلیم‌ها در سطوح شیشه‌ای به دلیل داشتن سطحی صاف و صیقلی و مقاومت بالا در برابر خوردگی نسبت کمتر تشکیل می‌شوند (Srey et al., 2012).

در بررسی حاضر گونه‌های متنوعی از جنس باسیلوس یافت گردید. تولید شیر در دامداری‌های سنتی و شیردوشی دستی، امکان آلوده شدن شیر از منابع محیطی را افزایش می‌دهد و این آلودگی‌ها به تانک‌های حمل و تجهیزات فرآوری انتقال می‌یابند. هم‌چنین آلودگی‌های هوا و پدیده گرد و غبار و ذرات معلق در هوا که به همراه خود، میکروب‌های مختلف به ویژه اسپورداران را در محیط کارخانه انتشار می‌دهند، عامل دیگری است که می‌تواند دلیل وجود تنوع بالایی گونه‌های باسیلوس باشد. در بررسی‌ای که در منطقه آذربایجان شرقی بر روی باکتری‌های اسپوردار هوازی در شیر خام و پاستوریزه انجام گرفت، مشابه مطالعه اخیر

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.

### سیاسگزاری

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

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

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، سورفکتانت‌ها، ...) توأم با نظارت دقیق بر نحوه انجام

### 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 Robinson, R.K. (Editors), *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2<sup>nd</sup> 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*. 4<sup>th</sup> 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 Robinson, R.K. (Editors), *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2<sup>nd</sup> 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.
  - Pasvolksy, 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*. 2<sup>nd</sup> 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.,<sup>1</sup> Hanifian, S.<sup>2, 3\*</sup>

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