مقاله الگو نشریه بهداشت مواد غذایی

مقاله در صفحات A4 با حاشیه‌های بالا: ۳/۵، پایین: ۳، راست: ۲/۳، چپ: ۲/۳؛
فاصله سطرها ۱ سانتی‌متر (single)؛
فونت کلمات فارسی: B Lotus و فونت کلمات انگلیسی Times New Roman

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

عنوان کوتاه/گردان: حداکثر در ۸ کلمه (B Lotus 12 Bold) تنظیم شود.

در عنوان از اصطلاحات اختصاری غیرمعمول استفاده نشود.
(B Lotus 16 Bold و وسط‌چین)

تنوع گونه‌ای باسیلوس‌های جدا شده از تجهیزات فرآوری

اسامی نویسندگان و آدرس آن‌ها (Affiliation) نباید در فایل «اصل مقاله» نوشته شوند؛ لازم است این اطلاعات در فایل مجزا و با عنوان «مشخصات نویسندگان» درج و در پورتال مجله بارگذاری شود.

امیرحسین انصاری[۱]، شهرام حنیفیان[۲*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد 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
*نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ----- پذیرش نهایی: ----------)

اسامی نویسندگان با شماره‌های Superscript مشخص گردند. برای نشان دادن نویسنده مسئول از علامت ستاره (*) استفاده شود (B Lotus 12 Bold).

مرتبه علمی، وابستگی سازمانی و نام کامل دانشگاه وسط چین با فونت B Lotus 10

درج ایمیل دانشگاهی نویسنده مسئول مقاله با علامت ستاره *؛ تاریخ ارسال و پذیرش مقاله (B Lotus 10 وسط چین) درج شود.

Times New Roman 8

چکیده

ساختار چکیده شامل: زمینه، هدف، روش کار، یافته‌ها، نتیجه‌گیری و واژه‌های کلیدی است.
حجم چکیده حداکثر ۲۵۰ کلمه باشد (متن فارسی B Lotus 11 و انگلیسی Times New Roman 9).

در متن فارسی به‌جای علامت «%» از عبارت «درصد» استفاده شود.

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 ۱۶/۶۶ درصد از نمونه‌های اخذ شده از مخازن حمل و نگه‌داری شیر خام، ۲۰ درصد تجهیزات فرآوری فرآورده‌های شیر و ۴۰ درصد 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 درصد و کم‌ترین میزان فراوانی مربوط به *باسیلوس آلوئی* و *باسیلوس پومیلوس* با ٤ درصد فراوانی بود. نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌ها مشخص نمود که ۹۶ درصد 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

کلمه "واژه‌های کلیدی" B Lotus 12 Bold

واژه‌ها بین ۳ تا ۵ کلمه به‌ترتیب اولویت موضوعی و ارتباط با تحقیق، با فونت B Lotus 11

حذف فاصله در کلمات مرکب و رعایت نیم‌فاصله‌ها: در تمامی کلمات ترکیبی با کلیدهای (ctrl+shift2)

نام‌های علمی شامل نام جنس و گونه میکروب‌ها یا گیاهان به‌صورت *ایتالیک* نوشته شوند. برگردان فارسی هر نام نوشته شود و اصل واژه لاتین در داخل پرانتز درج گردد. نام میکروارگانیسم‌ها در نوبت اول به‌طور کامل و در نوبت‌های بعدی فقط حرف اول جنس نوشته شود. به مثال‌های موجود در «مقدمه» مقاله الگو، رجوع شود.

تیترها بدون شماره‌گذاری
B Lotus 14 Bold

نحوه استناد به منبع با یک نویسنده

نحوه استناد به منبع با دو نویسنده

به جای پاورقی، معادل انگلیسی اصطلاحات در متن و داخل پرانتز درج گردد.

مقدمه

گونه‌های باسیلوس، باکتری‌هایی هستند گرم مثبت، میله‌ای شکل و اسپورزا که اغلب دارای آرایش زنجیری و تنفس 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 می‌توانند در pH= ۹/۳–٤/۹ و غلظت بالای نمک (حدود ۷/۵ درصد) رشد [illegible]س‌ها یکی از شایع‌ترین باکتری‌های یافت شده در دامداری‌های تولید شیر هستند و عمدتاً به‌دلیل آلوده [illegible]ستان دام با خاک، وارد شیر خام می‌شوند (Bremer *et al.*, 2009; Svensson *et al.*, 2004) و نوع غالب از باکتر[illegible]ای گرم مثبت موجود در شیر خام را تشکیل می‌دهند (Bremer *et al.*, 2009). هم‌چنین این باکتری‌ها می‌توانند به‌طور ن[illegible]یه 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 ٤/۵–۲/۲ 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 پلی‌مرهای خارج‌سلولی، علاوه بر 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 محصولات 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).

کلمه *et al* به‌صورت ایتالیک نوشته شود.

نحوه استناد به منبع با بیش از دو نویسنده

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 منتشر 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). علاوه‌بر 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.

واحدهای فرعی با خط تیره – با فونت B Lotus 12 Bold مشخص شود.

مواد و روش‌ها

- روش نمونه‌گیری و کشت

پرانتزها به‌صورت فارسی تنظیم شوند.

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.

B Lotus 10

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

عنوان جدول B Lotus 10 Bold

کل خطوط عمودی و خطوط فرعی (میانی) افقی به حالت نامرئی

در داخل جدول یا نمودار از علامت «%» استفاده شود.

متن جدول فونت فارسی B Lotus 10 فونت انگلیس Times New Roman 8

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 (۲) استفاده شد (Cowan *et al.*, 2004).

قبل از درج جدول، نمودار یا شکل، نسبت به معرفی آن در متن مقاله اقدام شود.

جدول (۲)- 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	+	+	+
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	+	+	-	-	+	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	+	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	+	-	-	-	+	-	+	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 بروویس*
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 ترمینال؛ V: اسپورها مرکزی/ساب ترمینال؛ X: اسپورها به‌شکل بیضی؛ O: اسپورها به‌شکل گرد؛ (+): ۱۰۰-۸۵ درصد سویه‌ها مثبت؛ (-): ۱۵-۰ درصد سویه‌ها منفی؛ d: ۸٤-۱٦ درصد 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 ٢٤ 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 ٤٨ 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 طول موج ٤٩٢ نانومتر اندازه‌گیری گردید. نتیجه میزان تولید بیوفیلم با استفاده از الگوی جدول (۳) تفسیر گردید:

نام برند تجاری و نام کشور سازنده وسایل و تجهیزات به انگلیسی در داخل پرانتز اشاره شود.

جدول (۳)- 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.

توضیحات جدول در پایین هر جدول درج شود.

یافته‌ها

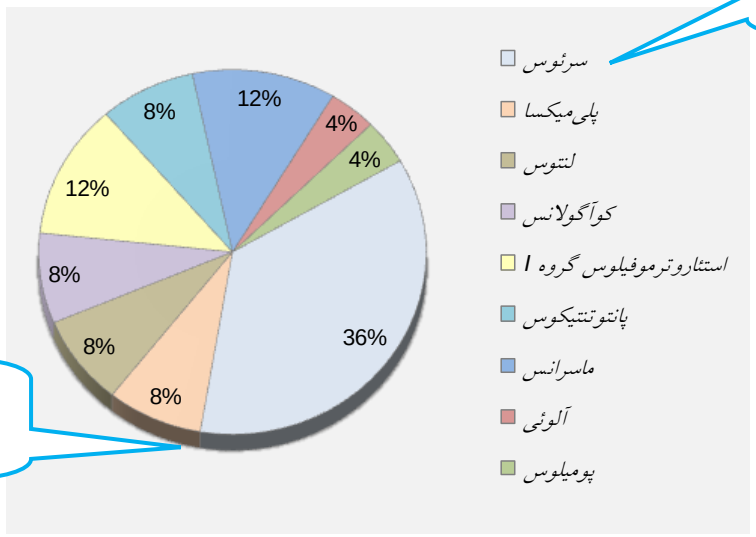
نتایج به‌دست آمده از نمونه‌برداری در جدول (٤) آمده است. با توجه به نتایج آزمون‌های غربال‌گری و افتراقی، از ۸۰ نمونه اخذ شده از محل‌های مختلف، ۱۹ نمونه (۲۳/۷۵ درصد) آلوده به جنس باسیلوس‌ها بودند. از این بین میزان آلودگی مخازن حمل و نگه‌داری شیرخام ١٦/٦٦ درصد، تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی فرآورده‌های شیر ۲۰ درصد و سطوح مختلف سالن تولید ٤٠ درصد برآورد شد.

جدول (٤)- تعداد نمونه، تعداد و درصد موارد مثبت و تنوع گونه‌ای باسیلوس به‌تفکیک محل‌های نمونه‌گیری

محل نمونه‌برداری	تعداد نمونه (نمونه مثبت)	درصد نمونه مثبت	تنوع میکروبی
مخازن حمل و نگه‌داری شیرخام	۳۰ (۵)	۱٦/٦٦	۵
تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی	۳۰ (٦)	۲۰	۷
سطوح سالن	۲۰ (۸)	٤۰	۱۳

براساس نتایج آزمون‌های افتراقی، ۲۵ جدایه به‌دست آمده متشکل از ۹ گونه متنوع بودند. بالاترین میزان فراوانی گونه *سرئوس* با ۳٦ درصد و کم‌ترین میزان فراوانی به گونه‌های *آلوئی* و *پومیلوس* با ٤ درصد اختصاص داشت (نمودار ۱).

توضیحات نمودار حدالامکان به فارسی نوشته شوند.



نمودارها به صورت رنگی یا سیاه و سفید با وضوح و امکان تفکیک بالا طراحی شوند.

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

براساس 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			منفی

* اعداد میانگین سه

بحث و نتیجه‌گیری به‌صورت یک‌جا تنظیم شود.

استناد به منابع در متن مقاله به‌صورت غیر مستقیم (indirect) انجام گیرد و در پایان جمله در داخل پرانتز به منبع مربوطه استناد گردد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۲۳/۷٥ درصد 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 بر نمی‌گیرند 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* که پس از شستشوی درجا در تانک‌های خنک‌کننده شیر باقی‌مانده

بود، در نتیجه مساعد شدن شرایط محیطی به حدود ٦ واحد لگاریتمی در هر سانتی‌متر 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 به‌وضوح نشان می‌دهد که هر قدر سطوح ناصاف‌تر و دارای شیارها و منافذ بیشتری باشند و هم‌چنین دارای نقاط کور و غیرقابل دسترس باشند، احتمال حضور و تشکیل بیوفیلم میکروبی بیشتر خواهد بود (Adetunji *et al*., 2011). اما بیوفیلم‌ها در سطوح شیشه‌ای –به‌دلیل داشتن سطحی صاف و صیقلی و مقاومت بالا در برابر خوردگی– 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 به‌همراه خود میکروب‌های مختلف به‌ویژه اسپورداران را در محیط کارخانه انتشار می‌دهند، عامل دیگری است که می‌تواند دلیل وجود تنوع بالای گونه‌های باسیلوس باشد. در بررسی‌ای که در منطقه آذربایجان‌شرقی بر روی باکتری‌های اسپوردار هوازی در شیر خام و پاستوریزه انجام گرفت، مشابه مطالعه اخیر 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 فراپالایش جداسازی گردید که نشان‌دهنده مقاومت بالای این باکتری به مواد شوینده و شرایط محیطی است. در یک مطالعه بر روی *باسیلوس سرئوس* جداشده از تانک‌های خنک کننده شیر، بعد از عمل تمیز کردن نشان داد که تعداد این باکتری به 10^6 cfu/cm^2 افزایش پیدا کرده است (Kumari and Sarkar, 2014).

بر اساس نتایج به‌دست آمده، ۹٦ درصد جدایه‌ها (۲٤ مورد از ۲۵ جدایه) توانایی تولید بیوفیلم داشتند. با این توضیح که درجات مختلفی از تولید بیوفیلم از «ضعیف» تا «قوی» در بین گونه‌های مختلف باسیلوس مشاهده شد. از نظر مقدار تولید بیوفیلم، گونه‌های *سرئوس*، *لنتوس*، *پانتوتنتیکوس*، *استئاروترموفیلوس*، *آلوئی* و *پومیلوس* ضعیف و *کواگولانس* و *ماسرانس* متوسط بودند و فقط یکی از گونه‌های *پلی‌میکسا* مولد قوی بیوفیلم بود و جذب نوری ۱۹ برابر نمونه شاهد داشت. این در حالی است که دیگر گونه *پلی‌میکسا* (جدا شده از تانکر حمل شیر خام) در سه تکرار آزمایش فاقد توانایی تولید بیوفیلم تشخیص داده شد و این موضوع حاکی از تفاوت تولید بیوفیلم نه‌تنها در بین گونه‌های مختلف باسیلوس، بلکه در سویه‌های مختلف یک گونه واحد می‌باشد. به‌علاوه، این سویه‌ها از مکان‌های مختلف و با شرایط محیطی متفاوت جدا شدند؛ بنابراین ممکن است تفاوت‌های محیطی در بعضی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و رفتاری آن‌ها تأثیرگذار باشد.

در پاراگراف آخر جمع‌بندی یافته‌ها ذکر شود.

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، موثر 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.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

نام‌خانوادگی و حرف اول نام نویسنده/نویسندگان

بدون فاصله

بین نام نویسنده آخر و ماقبل آخر «and» درج شود.

عنوان کامل مجله نوشته شود.

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.

نویسندگان کتاب

فصلی از کتاب مرجع

نویسندگان فصل

- 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 co[illegible]rn. Food Control, 31(2): 572–585.
- Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H. and Christiansson, A. (2004). Characterisation of *Bacillus* [illegible]*us* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. International Dairy Journal [illegible]): 17–27.

مشابه متن مقاله، در فهرست منابع نیز برگردان انگلیسی منابع درج گردد و عبارت [In Persian] به انتهای منبع اضافه شود.

برای بیش از شش نویسنده از عبارت "*et al*" استفاده شود.

طبق فرمت مجله به پایاننامه‌ها، همایش‌ها و مطالب وب‌سایت‌های غیرمعتبر استناد صورت نگیرد.

Times New Roman 15 Bold

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

Running title

Contamination rate and Biofilm formation of Bacillus

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

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding author: hanifian@iaut.ac.ir

(Received: ----------Accepted: ----------)

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 equipments 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 equipments 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 equipments 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 conquer the problem.

Conflict of interest: None declared.

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

جمله‌بندی	علامت نقطه " . " و ویرگول " ، " به کلمه ماقبل خود نزدیک و بدون فاصله بوده و از کلمه بعدی خود به اندازه یک کاراکتر فاصله دارند.
در متن فارسی در صورت استفاده از عبارات انگلیسی متعدد، علامت ویرگول بین کلمات انگلیسی باید با فونت فارسی باشد و به کلمه پیشین نزدیک و از کلمه بعدی یک کاراکتر فاصله داشته باشد و در مورد آخرین عبارت از حرف عطف "و" با فاصله استفاده شود.	مثال: *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*
در چکیده و متن اصلی مقاله اگر حروف مخفف برای اولین بار استفاده شده است	عبارت به طور کامل در داخل پرانتز نوشته شود.
از عبارات انگلیسی مانند second، minute، hour، gram در متن فارسی استفاده نشود.	این عبارات در چکیده انگلیسی به‌صورت sec، min، hr و g نوشته شود.
In vivo و *In vitro*	به صورت *ایتالیک* نوشته شود.
p-value	علامت *p* با حرف کوچک بدون فاصله نوشته شود و مقادیر p به فارسی و بدون فاصله نوشته شود. مثال: (*p*<۰/۰۱) یا (*p*<۰/۰۵)
mg/dl و mg/kg	با حروف کوچک نوشته شود.
اسیدیته	اسیدیته محلول‌ها با علامت pH نشان داده شود (مثال: pH=٦/٥)
سپاسگزاری	در صورت لزوم می‌توان از اشخاص حقیقی، حقوقی، سازمان‌ها و نهادهایی که در انجام تحقیق نقش موثری داشته‌اند، با عبارت "سپاسگزاری" تقدیر و تشکر در چند جمله کوتاه بیان کرد.
در جداول از خطوط مورب و همچنین پس‌زمینه استفاده نشود.	جداول با دستور Insert و Table در نوار ابزار به صورت ساده طراحی شود.
شکل (۱)-	از کلمه "تصویر"، "نگاره" و ... خودداری شود. شکل‌ها از وضوح مناسب برخوردار بوده و نشانه‌گذاری‌ها (مانند پیکان، ستاره و ...) باید در روی شکل (با برنامه فتوشاپ) تثبیت شده باشند.
جدول (۱)-	در عنوان جداول از علائم اختصاری استفاده نشود. جداول به فارسی نوشته شده و از راست به چپ تنظیم شوند. از هرگونه فاصله اضافی بین اعداد و ارقام و علائم اجتناب شود. از علامت ویرگول به جای علامت اعشار استفاده نشود. (مثال: ٦٥/٣٢±٨٤/٢٥). عنوان جدول در بالای جدول و توضیحات آماری در ذیل جدول ارائه شود. در جداول و نمودارها واحد سنجش پارامترها نوشته شود. در جداول باید اختلاف معنی‌دار بین گروه ها با علائم (* و یا #) یا حروف (a, b , c, ...) به درستی مشخص شده باشند.
نمودار (۱)-	در عنوان نمودارها از علائم اختصاری استفاده نشود. از نمودارهای رنگی و با پس‌زمینه و حالت سه بعدی اجتناب گردد. نمودارها باید دارای Error Bar بوده و اختلافات آماری بین گروه‌ها با استفاده از علامت‌گذاری مناسب (* و یا #) و یا حروف (a, b , c, ...) مشخص شده باشد. در نمودارها عنوان و توضیحات آماری در ذیل نمودار نوشته شود. در نمودارها اعداد به فارسی نوشته شوند.