# شناسایی برخی باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم از خط تولید شیر پاستوریزه

**سیده صالحه واعظی[1*]، آرزو طهمورث پور[2]، محمد گلی[3]**

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

۳. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

[*]**نویسنده مسئول:** *ssvaezi@ymail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۲۸

## چکیده

بیوفیلم به مجموع میکروارگانیسم‌های محصورشده در پلی‌ساکارید خارج سلولی متصل به سطح جامد، اطلاق می‌گردد. به دلیل مقاومت بالای بیوفیلم به عوامل ضدمیکروبی، بیوفیلم‌ها به عنوان اصلی‌ترین مشکل صنعت غذا بالاخص در آلودگی‌های پس از پاستوریزاسیون به‌شمار می‌آیند. به همین دلیل در این پژوهش، بیوفیلم تشکیل‌شده در خط تولید شیر پاستوریزه، جداسازی شده تا باکتری‌های مؤثر در آلودگی پس از پاستوریزاسیون شیر، شناسایی شوند. بدین منظور پس از انجام سیستم شست‌وشو در مکان، از ۱۰ نقطه خط‌تولید با ۳ تکرار نمونه برداری صورت گرفت و پس از خالص‌سازی باکتری‌ها، شناسایی جنس و گونه احتمالی آن‌ها با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و تطابق آن‌ها با جداول راهنمای برگی صورت پذیرفت. نتایج حاکی از حضور جنس‌های *Listeria*، *Shigella*، *Staphylococcus*، *Pseudomonas*، *Escherichiai*، *Corynebacterium*، *Bacillus*، *Aeromonas*، *Klebsiella*، *Proteus*، *Lactobacillus* و *Micrococcus* می‌باشد که در این بین غالب‌ترین جنس باکتریایی، *Staphylococcus* با ۱۹٪ از جمعیت کل و غالب‌ترین باکتری براساس جنس و گونه احتمالی، *Shigella sonnei* با ۱۱٪ جمعیت کل باکتریایی می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** باکتری، بیوفیلم، شیر، آزمون بیوشیمیایی.

## مقدمه

بیوفیلم، گروهی از سلول‌های میکروبی در ارتباط با ماتریکسی از جنس اگزوپلی‌ساکارید متصل به یک سطح جامد متصل است (Costerton, 2001; Rzhepishevska et al., 2014; Kafil et al., 2015). ساختار بیوفیلم، باکتری را در برابر تنش‌های محیطی حفاظت می‌کند به گونه‌ای که سبب می‌گردد تا ترکیبات ضدمیکروبی متداول، تأثیر معنی‌داری بر روی آن‌ها نداشته باشند (Rendueles et al., 2013). بیوفیلم باکتریایی در سطوح مختلف از قبیل پلاستیک، شیشه، فلز، چوب و حتی محصولات غذایی تشکیل می‌گردد (Jessen et al., 2003; Sharma et al., 2002).

تشکیل بیوفیلم یکی از مشکلات اصلی در صنعت غذا به حساب می‌آید زیرا که رعایت اصول بهداشت در سطوح، تأثیر مستقیم بر کیفیت و امنیت محصولات غذایی دارد (Anand et al., 2014). بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که بیوفیلم بر جای‌مانده در خطوط تولید، حتی پس از انجام

اصول بهداشتی، حذف نمی‌گردند (Marchand et al., 2012; Fouladynezhad et al., 2013). در خطوط تولید شیر نیز تشکیل بیوفیلم یکی از مشکلات پر خطر محسوب می‌گردد زیرا ضررهای اقتصادی سنگینی در طی فرآیند تولید، فساد سریع و نهایتاً اختلالات عدیده‌ای در دستگاه‌ها و تجهیزات را به دنبال دارد (Somers et al., 2004; Bremer et al., 2006; Gram et al., 2007; Adetunji et al., 2014a). Simões و همکاران (۲۰۱۰) نیز بیان می‌دارند که باکتری‌های موجود در بیوفیلم قابلیت کاتالیزوری واکنش‌های شیمیایی و میکروبی منجر به خوردگی در سیستم‌های لوله‌کشی و مخازن را دارند. همچنین بیوفیلم‌های ضخیم می‌توانند در صفحات مبدل حرارتی و لوله‌کشی‌ها سبب کاهش انتقال حرارت باشند آنان سبب ایجاد اختلال در فیلترهای غشائی اسمزمعکوس و اولترافیلتراسیون نیز می‌گردند (Anand et al., 2014; Muthukumaran et al., 2005).

آلودگی‌های غذایی ناشی از بیوفیلم باکتریایی سال‌ها گریبان‌گیر صنعت غذا شده‌است به‌گونه‌ای که Zottola و Sasahara (۱۹۹۴) برای اولین بار، اتصال باکتری‌های بیماری‌زای غذایی مثل *Pseudomonas fragi* را در سطوح استیل خطوط مواد غذایی گزارش کردند. در طی تحقیق به‌عمل آمده در فرانسه در سال ۱۹۹۶ بیان شد که ۴۰/۵٪ از عفونت‌های ناشی از غذا، به سبب آلودگی خطوط تولید با خطر تشکیل بیوفیلم است (Bryers, 2000). پس از آن، آلودگی گوشت‌های همبرگر با *Escherichia coli* و آلودگی خطوط تولید شیر پاستوریزه و پنیر با *Listeria monocytogenes* در سال ۱۹۹۸ در آمریکا گزارش شد (Djordjevic et al., 2002). با گذشت حدود بیست سال از اولین گزارش بیوفیلم غذایی، Srey و همکاران (۲۰۱۳) باکتری‌های محصور در بیوفیلم را عامل اصلی آلودگی‌های غذایی خوانده‌اند. Ntsama-Essomba و همکاران (۱۹۹۷) و Vlkova و همکاران (۲۰۰۸) ثابت کردند که حضور شیر و اگزوپلیمرها باعث کاهش فعالیت و راندمان عملکرد بیوسایدها می‌گردد. زیرا این ترکیبات اطراف شبکه بیوفیلم را احاطه کرده و به تشکیل و ثبات بیوفیلم یاری می‌رسانند.

آن‌چه که بیوفیلم را حائز اهمیت می‌کند، این نکته است که میکروارگانیسم‌ها در تماس با سطوح آلوده در صنعت، به راحتی قادر به جابه‌جایی هستند و می‌توانند به سطوح مختلف منتقل گردند. حال با توجه به آن‌که باکتری‌های بیوفیلم در برابر ضدعفونی‌کننده‌ها چندین بار قوی‌تر از باکتری‌های آزاد هستند، رشد باکتری به صورت بیوفیلم بر روی سطوح، شست‌وشوی آنان را نیز دشوارتر می‌سازد.

هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم در خط تولید شیر پاستوریزه و تعیین غالب‌ترین آنان می باشد تا بدین طریق باکتری‌های خطرساز در آلودگی‌های پس از پاستوریزاسیون و نهایتاً فساد و بیماری‌زایی شیر پاستوریزه شناسایی شوند.

## مواد و روش‌کار

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در یکی از کارخانه‌های شیر استان اصفهان در اردیبهشت ماه صورت گرفته‌شد. بدین منظور ابتدا خطوط تولید شیر پاستوریزه مورد نظر برای نمونه‌برداری، از محصول تخلیه شده و پس از شست‌وشو در مکان، از نقاط کور خط تولید که با کمک مسئول فنی کارخانه شناسایی شده‌بودند نمونه‌برداری تحت شرایط سترون (در کنار چراغ الکلی) انجام گرفت بدین صورت که پس از باز کردن تجهیزات خط، از قسمت درونی آن‌ها با سواب سترون نمونه‌برداری شده، سواب‌های حاوی نمونه‌ها به فسفات بافر سالین سترون منتقل شده و نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه برده‌شدند. نهایتاً

نقاط نمونه‌برداری که بر مبنای تجزیه و تحلیل خطر و نقاط کنترل بحرانی ( HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point) انتخاب شده عبارتند از: زوایای درونی تانک پروسس پنیر خامه‌ای؛ زوایای درونی تانک استارتر؛ نازل اول شیر بطری بعد از پاستوریزاسیون؛ نازل دوم شیر بطری بعد از پاستوریزاسیون؛ دهانه لوله ارسال شیر پس از پاستوریزاسیون به سالن بسته‌بندی؛ زانوی لوله ارسال شیر پس از پاستوریزاسیون به سالن بسته‌بندی؛ زانوی لوله خروجی شیر پاستوریزه بعد از پلیت سردکن؛ تانک پخت خامه خروجی از سپراتور؛ زانوی لوله ورودی به تانک پخت خامه خروجی از سپراتور؛ زانوی لوله خروجی تانک استارتر خط اولترافیلتراسیون. لازم به ذکر است که از تمامی نقاط، نمونه‌برداری با سه تکرار صورت پذیرفت.

شمارش کلی باکتری‌ها

به منظور شمارش کلی باکتری‌ها، بلافاصله پس از نمونه-برداری و تهیه رقت‌های $10^{-1}$ تا $10^{-6}$، از تمامی نمونه‌ها و رقت‌های آن‌ها بر روی محیط‌کشت Plate Count Agar (Merck، ساخت کشور آلمان) کشت سطحی داده‌شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه-گذاری و هر ۲۴ ساعت شمارش کلونی‌ها انجام پذیرفت.

خالص‌سازی

در اولین گام به منظور شناسایی باکتری‌ها، پس از شمارش کلی آن‌ها، به بررسی پرگنه‌های با ظاهر متمایز از یک‌دیگر پرداخته‌شد. بدین منظور تمام نمونه‌های انتقال یافته از کارخانه به آزمایشگاه بر روی محیط‌کشت‌های اختصاصی کشت داده‌شدند و نهایتاً پرگنه‌های با ظاهر متمایز بر روی محیط‌کشت شناسایی شده، به روش کشت خطی خالص سازی گشتند. خالص‌سازی باکتری‌ها بر روی محیط‌کشت-های اختصاصی Listeria Palcam agar (Biolife، ساخت کشور ایتالیا)، MRS agar (Biolife، ساخت کشور ایتالیا)، EMB agar (Biolife، ساخت کشور ایتالیا)، MYP agar (Biolife، ساخت کشور ایتالیا)، SS agar (Biolife، ساخت کشور ایتالیا) و MSA agar (Biolife، ساخت کشور ایتالیا) به روش کشت خطی انجام شد.

شناسایی باکتری‌ها

پس از خالص‌سازی باکتری‌ها روی محیط‌کشت‌های اختصاصی به شناسایی آن‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی جداول برگی پرداخته‌شد ( Garrity et al., 2005). در این راستا پس از رنگ‌آمیزی گرم، واکنش گرم باکتری‌ها با آزمون پتاسیم هیدروکسید ۳٪ تأیید گردید و سپس شکل، آرایش و واکنش گرم باکتری‌ها آزمون‌های بیوشیمیایی مناسب انجام شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته بر روی باسیل‌های گرم مثبت و کوکوباسیل‌های گرم مثبت عبارتند از بررسی توان رشد در شرایط بی‌هوازی، بررسی توان تشکیل اسپور، بررسی تورم اسپور، مقاوم به اسید، کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز نشاسته، تخمیر گلوکز (گاز و اسید)، تخمیر لاکتوز، تخمیر مانیتول، تخمیر آرابینوز، متیل‌رد (MR)، وژپروسکوئر (VP)، سیترات، اورنیتین دکربوکسیلاز، رشد در برابر ۶/۵٪ سدیم-کلرید، رشد در pH زیر ۷، تولید هیدروژن‌سولفید؛ حرکت و اوره (Garrity et al., 2005).

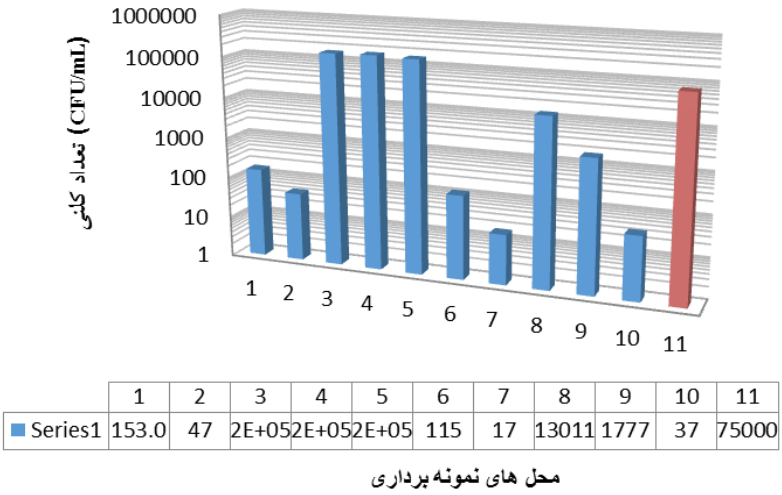
آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته بر روی کوکسی‌های گرم مثبت عبارتند از کاتالاز، رشد در شرایط بی‌هوازی، اکسیداز، تخمیر مانیتول، تخمیر گلوکز، تخمیر لاکتوز، تخمیر آرابینوز، ایندول، حساسیت به نووابیوسن، رشد در برابر ۱۰٪ سدیم‌کلرید، رشد در ۱۵ °C، رنگ کلنی بر روی Nutrient Agar، تولید هیدروژن‌سولفید، حرکت، اوره، هیدرولیز نشاسته، اورنیتین دکربوکسیلاز، میتل‌رد، وژپروسکوئر و سیترات (Garrity et al., 2005).

آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته بر روی باسیل‌های گرم منفی عبارتند از اکسیداز، کاتالاز، رشد در شرایط بی‌هوازی، تخمیر گلوکز (اسید و گاز)، تخمیر لاکتوز، تخمیر آرابینوز، تخمیر مانیتول، اورنیتن دکربوکسیلاز، ایندول، سیترات، حرکت، تولید هیدروژن‌سولفید، میتل‌رد، وژپروسکوئر، اوره و هیدرولیز نشاسته. نهایتاً برای بررسی درصد حضور باکتری‌های شناسایی شده داده‌های بدست‌آمده با استفاده از نرم افزار اکسل تحلیل و نمودارها رسم گردید (Garrity et al., 2005).

شمارش کلی باکتری ها

جمعیت باکتری‌ها بر اساس شمارش کلی بر روی Plate Count Agar پس از ۷۲ ساعت در نمودار ۱ مشاهده می‌شود. بیشترین آلودگی در نقاط ۳، ۴ و ۵ (نازل اول شیر بطری بعد از پاستوریزاسیون، نازل دوم شیر بطری بعد از پاستوریزاسیون و دهانه لوله ارسال شیر پس از پاستوریزاسیون به سالن بسته‌بندی) و کمترین آلودگی نیز در نقطه ۷ (زانوی لوله خروجی شیر پاستوریزه بعد از پلیت سردکن)، می‌باشد.

## نتایج




| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Series1 | 153.0 | 47 | 2E+05 | 2E+05 | 2E+05 | 115 | 17 | 13011 | 1777 | 37 | 75000 |

نمودار ۱- شمارش کلی باکتری‌ها در نقاط نمونه برداری پس از ۷۲ ساعت رشد بر روی Plate Count Agar

۱: تانک پروسس؛ ۲: تانک استارتر؛ ۳: تازل اول؛ ۴: نازل دوم؛ ۵: دهانه لوله ارسال؛ ۶: زانوری لوله ارسال؛ ۷: زانوی لوله خروجی؛ ۸: تانک پخت؛۹: زانوی لوله ورودی؛ ۱۰: زانوی لوله خروجی؛ ۱۱: استاندارد جمعیت میکروبی در شیر پاستوریزه

شناسایی باسیل‌های گرم مثبت

نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی که بر روی باسیل‌های گرم مثبت انجام پذیرفته نشان از آن است که بیشترین جنس را در این مجموعه، *Bacillus* با تنوع چهار گونه *Bacillus insolitus*، *Bacillus circulans*، *Bacillus alcalophilus* و *Bacillus subtilis* به خود اختصاص داده‌است. دیگر باکتری‌های باسیل گرم مثبت عبارتند از *Corynebacterium xerosis*، *Lactobacillus casei* و *Listeria monocytogenes*.

شناسایی باکتری‌های کوکسی گرم مثبت

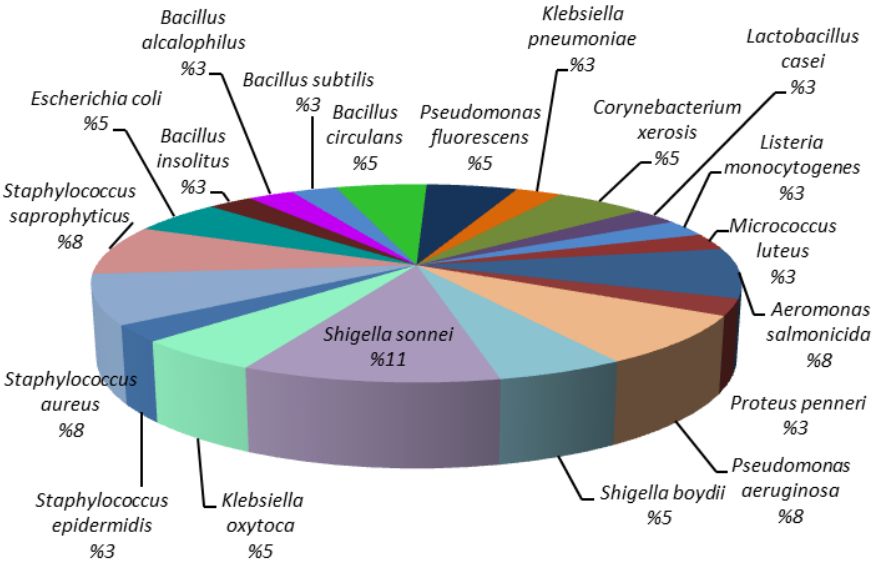
نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی کوکسی‌های گرم مثبت حاکی از این است که در این مجموعه از باکتری‌ها بیشترین جنس

متعلق به *Staphylococcus* با تنوع ۳ گونه شناسایی شده *Staphylococcus saprophyticus*، *Staphylococcus epidermidis* و*Staphylococcus aureus* می‌باشد همچنین باکتری *Micrococcus luteus* نیز در گروه شناسایی شد.

شناسایی باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم منفی

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم منفی بیان گر این است که جنس *Shigella* با اختصاص دو گونه *Shigella boydii* و *Shigella sonnei* به خود، بیشترین جنس شناسایی شده در این مجموعه محسوب می‌گردد. سایر باکتری‌های شناسایی شده در این مجموعه عبارتند از: *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas fluorescens*، *Klebsiella oxytoca*، *Klebsiella pneumoniae*، *Aeromonas salmonicida*، *Escherichia coli* و *Proteus penneri*.

در نمودار ۲ درصد تمامی باکتری‌های شناسایی شده برحسب جنس و گونه احتمالی آورده شده‌است. غالب‌ترین جنس شناسایی شده در بیوفیلم مورد بررسی در این تحقیق، *Staphylococcus* با ۱۹٪ از جمعیت کل بوده‌است و کم جمعیت‌ترین جنس‌ها شامل *Proteus*، *Micrococcus*، *Listeria*و *Lactobacillus* هر کدام با کسب ۳٪ جمعیت کل، می‌باشد. غالب‌ترین باکتری بر اساس جنس و گونه احتمالی شناسایی شده در بیوفیلم جدا شده در این پژوهش، *Shigella sonnei* با ۱۱٪ جمعیت میکروبی موجود در بیوفیلم، می‌باشد و پس از آن *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus saprophyticus* و *Pseudomonas aeruginosa*، هر کدام با ۸٪ جمعیت میکروبی در رتبه بعدی قرار دارند. کم جمعیت‌ترین باکتری‌های شناسایی شده در این بیوفیلم بر اساس جنس و گونه احتمالی نیز شامل باکتری‌های *Proteus penneri*، *Staphylococcus epidermidis*، *Bacillus insolitus*، *Bacillus alcalophilus*، *Bacillus subtilis*، *Klebsiella pneumoniae*، *Lactobacillus casei*، *Listeria monocytogenes* و *Micrococcus luteus* هر کدام با ۳٪ از جمعیت کل باکتریایی است.




نمودار ۲-درصد باکتری‌ها برحسب جنس و گونه احتمالی شناسایی شده بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی

**بحث**

تعداد قابل توجهی از گزارشات مبنی‌بر آلودگی غذا، ناشی از ارتباط غذا با سطوح آلوده به بیوفیلم بوده است. از آن جایی که بهداشت سطوح در تماس با مواد غذایی، تأثیر بسزائی در کیفیت و امنیت غذا دارد، می‌توان بیوفیلم را اصلی‌ترین مشکل در صنعت غذا دانست (Anand et al., 2014).

مطابق با نمودار ۱ نتایج شمارش کلی باکتری‌ها حاکی از آلودگی بیش از حد استاندارد یعنی $۷/۵\times۱۰^{۴}$ CFU/mL (مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۷) در نقاط ۳، ۴ و ۵ به ترتیب نازل اول شیر بطری بعد از پاستوریزاسیون، نازل دوم شیر بطری بعد از پاستوریزاسیون و دهانه لوله ارسال شیر پس از پاستوریزاسیون به سالن بسته‌بندی می‌باشد. از آن‌جایی که تمام نقاط نمونه‌برداری پس از عملیات شست‌وشو در مکان در خطوط پس از پاستوریزاسیون بوده‌اند، دلیل این آلودگی احتمالاً شست‌وشوی ناکافی در مکان می‌باشد. همان طور که Anand و همکاران (۲۰۱۴) بیان داشتند، بهداشت سطوح در تماس با موادغذایی نقش بسزائی در سلامت و امنیت غذا ایفا می‌کنند لذا حضور این بار آلودگی می‌تواند یک تهدید برای امنیت شیر مصرفی به‌شمار آید. نتایج تحقیقات Dufour و همکاران (۲۰۰۴) و Bremer و همکاران (۲۰۰۶) نیز بی‌کفایتی روش استاندارد شست‌وشو در مکان را در حذف بیوفیلم گزارش کرده‌است. همچنین مطابق با تحقیقات Duanis-Assaf و همکاران در سال ۲۰۱۶، می‌توان از جمله دلایل قدرت و گستردگی بیوفیلم باکتریایی در خطوط تولید شیر را حضور لاکتوز شیر دانست چرا که لاکتوز منجر به تحریک تولید بیوفیلم باکتریایی بالاخص *Bacillus subtilis* و الحاق سایر گونه‌های باکتریایی فاقد توانایی تولید بیوفیلم به ماتریکس گسترش یافته بر سطح می گردد.

در بین باکتری‌های شناسایی شده، باکتری‌های *Listeria monocytogenes*، *Shigella*، *Staphylococcus*، *Pseudomonas*، *Escherichia coli*، *Corynebacterium* و *Bacillus* از جمله شایع‌ترین باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم در خط تولید شیر به‌شمار می‌آیند. سایر باکتری‌های شایع بیوفیلم شیر که در این پژوهش یافت نشدند عبارتند از: *Yersinia*، *Campylobacter*، *Salmonella* و *Citrobacter* (Masadeh et al., 2013; Aarnisalo et al., 2007; Gunduz et al., 2006; Anand et al., 2014; Lapidot et al., 2006; Burgess et al., 2014; Teh et al., 2014; Latorre et al., 2010; Djordjevic et al., 2002;).

Dwivedi و Singh در سال ۲۰۱۵ به منظور راه‌کاری در کنترل بیوفیلم باکتریایی، به بررسی توان تشکیل بیوفیلم ۳۰ سویه *Streptococcus* پرداختند و نهایتاً به منظور حذف بیوفیلم ۱۸ سویه که بیوفیلم قوی و متوسط داشتند از دو ترکیب امبلین و پیپرین استفاده کردند. نتایج نشان از تأثیر معنی‌دار ضدبیوفیلمی این ترکیبات بود. هرچند لازم به ذکر است که این روش به دلیل مضرات ترکیبات شیمیایی برای انسان، به منظور استفاده در خطوط تولید صنایع غذایی پیشنهاد نمی‌گردند. در مطالعه دیگری Nan و همکاران در سال ۲۰۱۵ با افزودن عنصر مس دو ظرفیتی به ساختار آلیاژی استیل ضدزنگ، سبب ممانعت از چسبیدن باکتری *Staphylococcus aureus* به سطح استیل شدند. آنان علت این امر را ممانعت مس برای چسبیدن پلی‌ساکارید خارج سلولی به سطح اعلام کردند زیرا که باکتری‌هایی که دارای سطح سلولی هیدروفوب هستند نسبت به باکتری‌هایی که دارای سطح سلولی

هیدروفیل هستند، در اتصال به سطوح دارای خاصیت هیدروفوبیستی بالا، موفق‌تر می‌باشند

نتایج بررسی‌های Gunduz و Tuncel (۲۰۰۶) بر روی بیوفیلم جداسازی شده از خط تولید بستنی نشان داد که بیشترین باکتری‌های گرم منفی به خانواده *Enterobacteriaceae* تعلق داشته است. آن‌ها گونه‌های *Proteus*، *Enterobacter*، *Citrobacter*، *Shigella* و *Escherichia* را شناسایی کردند. سایر باکتری‌های گرم منفی جداسازی شده در تحقیق آن‌ها، *Aeromonas*، *Pseudomonas* و *Moraxella* بود. باکتری‌های گرم مثبت شناسایی شده عبارت بودند از: *Staphylococcus*، *Bacillus*، *Listeria* و *Lactic acid bacteria* نظیر *Streptococcus* و *Leuconostoc*. آن‌ها اظهار داشتند که بیشترین مشکل را *Listeria* و *Shigella* ایجاد می‌کنند. در این پژوهش نیز به جز *Enterobacter*، *Citrobacter*، *Moraxella* و *Leuconostoc*. سایر باکتری‌های مذکور شناسایی شدند. همان طور که انتظار می‌رود چون هر دو تحقیق در خطوط کارخانه شیر صورت گرفته است تشابه زیادی در باکتری‌های شناسایی شده وجود دارد و دلیل تفاوت کم باکتری‌ها نیز به دلیل متفاوت بودن مکان‌های نمونه‌برداری (خط تولید شیر و بستنی) می‌باشد.

Adetunji و همکاران (۲۰۱۴b) درپی یافتن روشی به منظور کنترل بیوفیلم باکتریایی، به بررسی تأثیر زمان گرم‌خانه‌گذاری بر میزان سرعت رشد و گسترش بیوفیلم پرداختند. آنان با افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری از ۱۸ تا ۷۲ ساعت برای باکتری‌های*Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*، نشان دادند که نه تنها با افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری، جمعیت میکروبی کاهش نمی‌یابد بلکه افزایش حجم بیوفیلم توسط این باکتری‌ها اتفاق می‌افتد.

Wong (۱۹۹۸) بیوفیلم‌های *Lactobacillus curvatuse* و *Lactobacillus fermentum*، را در خطوط تولید پنیر گزارش کرده حال آن‌که در بیوفیلم این تحقیق تنها *Lactobacillus* شناسایی شده، *Lactobacillus casei* بوده‌است. Zottola و Sasahara (۱۹۹۴) حضور بیوفیلم *Pseudomonas fragi* را در خطوط تولید شیر اعلام کرده بود اما نتایج این پژوهش، از جنس *Pseudomonas* به دو گونه *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fluorescens* رسید. Salo و همکاران (۲۰۰۶) نیز بیوفیلم *Pseudomonas* را از خطوط تولید شیر جداسازی کردند. Marchand و همکاران (۲۰۱۲) نیز حضور *Pseudomonas*، *Listeria* و *Aeromonas* را در آب شست‌وشوی خطوط تولید شیر یکی از عوامل آلودگی این خطوط به بیوفیلم این دسته از باکتری‌ها دانستند.

در سال ۲۰۱۶، Masiello و همکاران در طی جداسازی باکتری‌های کلی‌فرم در شیر پاستوریزه به روش HTST در آمریکای شمالی توانستند *Enterobacter*، *Hafnia*، *Citrobacter*، *Serratia*، *Raoultella* را شناسایی کنند. درصد حضور این باکتری‌ها به ترتیب عبارت بودند از: ۴۲٪، ۱۳٪، ۱۲٪، ۱۰٪ و ۹٪. که در این پژوهش هیچ یک از باکتری‌های کلی‌فرم مذکور شناسایی نشد بلکه کلی‌فرم‌های شناسایی شده در این پژوهش عبارتند از: *Escheriachia*، *Klebsiella*، *Proteus* و *Shigella* می‌باشد. که دلیل این تفاوت را می توان در متفاوت بودن منبع نمونه‌برادری این دو پژوهش (شیر پاستوریزه در آمریکای شمالی و خط تولید کارخانه شیر در ایران) دانست.

September و همکاران (۲۰۰۷) در طی جداسازی باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم از سیستم توزیع آب خوراکی در آفریقای جنوبی، به حضور *Aeromonas*، *Pseudomonas*، *Klebsiella* و *Enterobacter* رسیدند اما نتایج آزمون‌های آن‌ها جواب منفی دال بر حضور *Salmonella* و *Shigella* نشان می‌داد. مطالعات Rivardo و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ بر روی بیوسورفکتانت *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* بر روی بیوفیلم *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* سبب کاهش ۹۷٪ و ۹۰٪ بیوفیلم شد. تشکیل بیوفیلم یکی از مهم‌ترین مسائل عملیاتی در غشاءهای فیلتراسیون در طول بازه‌های زمانی طولانی شست‌وشو محسوب می‌شود به گونه‌ای که در سیستم‌های اولترافیلتراسیون و فیلتر غشائی اسمزمعکوس با بیوفیلم‌های تکامل یافته‌ای مواجه هستیم (Anand et al., 2014). علاوه بر این‌که شیر خام یک محیط ایده‌آل برای رشد باکتری‌های می‌باشد، باکتری‌های موجود در شیر نیز قابلیت بالایی در اتصال به سطوح استیل ضدزنگ و تشکیل بیوفیلم دارند. رشد بیوفیلم در تجهیزات خطوط تولید شیر سبب افزایش آلودگی در محصولات نهایی می‌گردد. این بیوفیلم می‌تواند شامل باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زا باشد. باکتری‌های موجود در بیوفیلم در برابر اصول بهداشتی اجرایی در کارخانه‌های شیر مقاومت یافته‌اند و این سدهای ایمنی اجرایی را به راحتی پشت‌سر می‌گذارند و به فرآورده‌های شیر منتقل می‌گردند (Marchand et al., 2012; Rodrigues et al., 2010; Fouladynezhad et al., 2013). این امر می‌تواند سبب فساد فرآورده‌های شیر از کارخانه تا خانه گردد.

آن‌چه که می‌تواند راه‌کاری مؤثر بر کاهش این بار آلودگی باشد، در درجه اول کاهش بار اولیه شیر خام در مزرعه می‌باشد و هرچه اصول بهداشتی در مزرعه و گاوداری‌ها بیشتر رعایت گردد، به تبع بار اولیه میکروبی شیر خام کاهش می‌یابد و مشکلات عدیده‌ای که بار اولیه شیر در کارخانه ایجاد می‌کند کاهش می‌یابد. چه‌بسا که این راه، پراثرترین راه‌کار مبارزه با بیوفیلم باشد. درضمن تغییر سیستم شست‌وشو در مکان و استفاده از مواد ضدمیکروبی GRAS (شناخته شده ایمن) نیز از اهمیت ویژه‌ای در صنایع‌غذایی برخوردار است که بیوسورفکتانت‌ها از این دسته به‌شمار می‌آیند.

**منابع**


۱. سازمان ملی استاندارد ایران. (۱۳۸۷). تجدید نظر دوم. میکروبیولوژی شیر و فرآورده‌های آن-ویژگی‌ها. استاندارد شماره ۲۴۰۶.

2. Aarnisalo, K., Lundén, J., Korkeala, H., and Wirtanen, G. 2007. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. LWT-Food Sci Technol. 40(6):1041-1048.

3. Adetunji, V.O., Adedeji, A.O., and Kwaga, J. 2014a. Assessment of the contamination potentials of some foodborne bacteria in biofilms for food products. Asian Pacific J Tropical Medicine. 7:S232-S7.

4. Adetunji, V.O., Kehinde, A.O., Bolatito, O.K., and Chen, J. 2014b. Biofilm formation by *Mycobacterium bovis*: influence of surface kind and temperatures of sanitizer treatments on biofilm control. BioMed Res Int.

5. Anand, S., Singh, D., Avadhanula, M., and Marka, S. 2014. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. Comp Rev Food Sci Food Safety. 13(1):18-33.

6. Bremer, P.J., Fillery, S., and McQuillan, A.J. 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. Int J Food Microbiol. 106(3):254-262.

7. Bryers, J.D. 2000. Biofilms II: Process analysis and applications. Wiley-Liss.

8. Burgess, S.A., Lindsay, D., and Flint, S.H. 2014. Biofilms of *Thermophilic Bacilli* Isolated from Dairy Processing Plants and Efficacy of Sanitizers. Methods Mol Biol. 1147:367-377.

9. Costerton, J.W. 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. Trends Microbiol. 9(2):50-52.

10. Djordjevic, D., Wiedmann, M., and McLandsborough, L. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl Enviro Microbiol. 68(6):2950-2958.

11. Duanis-Assaf, D., Steinberg, D., Chai, Y., and Shemesh, M. 2016. The LuxS based quorum sensing governs Lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. Front Microbiol.

12. Dufour, M., Simmonds, R.S., and Bremer, P.J. 2004. Development of a Laboratory Scale Clean-In-Place System To Test the Effectiveness of Natural Antimicrobials against Dairy Biofilms. J Food Protect. 67(7):1438-1443.

13. Dwivedi, D., and Singh, V. 2015. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. J Traditional and Complementary Medicine.

14. Fouladynezhad, N., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., and Son, R. 2013. Efficiency of four Malaysian commercial disinfectants on removing *Listeria monocytogenes* biofilm. Int Food Res J. 20(3):1485-1490.

15. Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, New York. Springer.

16. Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y.Y., Gymoese, P., and Vogel, B.F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food control. 18(10):1165-1171.

17. Gunduz, G.T., and Tuncel, G. 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. Antonie van Leeuwenhoek. 89(3-4):329-336.

18. Jessen, B., and Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. Int Biodeter Biodegr. 51(4):265-269.

19. Kafil, H.S, and Mobarez, A.M. 2015. Assessment of biofilm formation by *Enterococci* isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. J King Saud Uni-Sci. 6: 124-128.

20. Lapidot, A., Romling, U., and Yaron, S. 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. Int J Food Microbiol. 109(3): 229-233.

21. Latorre, A., Van Kessel, J., Karns, J., Zurakowski, M., Pradhan, A., Boor, K., Jayarao, B.M., Houser, B.A., Daugherty, C.S., and Schukken, Y.H. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. J Dairy Sci. 93(6): 2792-2802.

22. 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. Comp Rev Food Sci Food Safety. 11(2): 133-147.

23. Masadeh, M.M., Mhaidat, N.M., Alzoubi, K.H., Hussein, E.I., and Al-Trad, E.I. 2013. In vitro determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. Inf Drug Res. 6: 27-32.

24. Masiello, S.N., Martin, N.H., Trmcic, A., Wiedmann, M., and Boor, K.J. 2016. Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. J Dairy Sci. 99(1): 130-140.

25. Muthukumaran, S., Kentish, S., Lalchandani, S., Ashokkumar, M., Mawson, R., Stevens, G.W., and Grieser, F. 2005. The optimisation of ultrasonic cleaning procedures for dairy fouled ultrafiltration membranes. Ultrason Sonochem. 12(1): 29-35.

26. Nan, L., Yang, K., and Ren, G. 2015. Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. J Mater Sci Eng. 51: 356-361.

27. Ntsama-Essomba, C., Bouttier, S., Ramaldes, M., Dubois-Brissonnet, F., and Fourniat, J. 1997. Resistance of *Escherichia coli* growing as biofilms to disinfectants. Veterinary Res. 28(4): 353-363.

28. Rendueles, O., Kaplan, J.B., and Ghigo, J.M. 2013. Antibiofilm polysaccharides. Environ Microbiol. 15(2): 334-346.

29. Rivardo, F., Turner, R., Allegrone, G., Ceri, H., and Martinotti, M. 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by Bacillus spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. J Appl Microbiol Biotechnol. 83(3): 541-553.

30. Rodrigues, L.B., Santos, L.Rd., Tagliari, V.Z., Rizzo, N.N., Trenhago, G., Oliveira, A.Pd., Goetz, F., and Nascimento, V.P.D. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Brazilian J Microbiol. 41(4): 1082-1085.

31. Rzhepishevska, O., Hakobyan, S., Ekstrand-Hammarström, B., Nygren, Y., Karlsson, T., Bucht, A., Elofsson, M., Boily, J.F., and Ramstedt, M. 2014. The gallium (III)–salicylidene acylhydrazide complex shows synergistic anti-biofilm effect and inhibits toxin production by *Pseudomonas aeruginosa*. J Inorg Biochem. 138: 1-8.

32. Salo, S., Ehavald, H., Raaska, L., Vokk, R., and Wirtanen, G. 2006. Microbial surveys in Estonian dairies. LWT-Food Sci Technol. 39(5): 460-471.

33. September, S.M., Els, F.A., Venter, S.N., and Brozel, V.S. 2007. Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. J Water Health. 5(2): 219-227.

34. Sharma, M., and Anand, S. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry–a case. Food control. 13(6): 469-477.

35. Simões, M., Simoes, L.C., and Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT-Food Sci Technol. 43(4): 573-583.

36. Somers, E.B., and Wong, A.C.L. 2004. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. J Food Protec. 67(10): 2218-2229.

37. 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.

38. Teh, K.H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., and Lindsay, D. 2014. Biofilm− An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products?. Int Dairy J. 34(1): 32-40.

39. Vlkova, H., Babak, V., Seydlova, R., Pavlik, I., and Schlegelova, J. 2008. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms–a Review. Czech J Food Sci. 26(5): 309-323.

40. Wong, A.C.L. 1998. Biofilms in food processing environments. J Dairy Sci, 81(10): 2765-2770.

41. Zottola, E.A., and Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry–Should they be a concern?. Int J Food Microbiol. 23(2): 125-148.

# Identification of some of the biofilm forming bacteria from the pasteurized milk production line

**Saleheh Vaezi S[1*], Tahmourespoor A[2], Goli M[3]**

1. Young Researchers and Elite Club, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Department of Basic Medical Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
3. Department of Food Industries Engineering, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

***Corresponding author:** *ssvaezi@ymail.com*

Received: 19 December 2015 Accepted: 20 November 2015

## Abstract

Biofilm is a collection of microorganisms in an extracellular exopolysaccharide matrix (EPS) which is adhered to the surface. Biofilms are considered as the most important food industry`s problem, especially in the post-contamination of pasteurized products. It is due to the high resistance feature of biofilm to the antimicrobial factors and Cleaning in Place (CIP) process. In this study, the bacterial biofilm from the inner part of pasteurized milk production line were isolated and bacterial compositions were assessed in order to identification of effective agents of post-contamination of pasteurized products. In order to conduct this survey, after CIP process, sampling was done from ten different parts of the production line (in 3 replicates). Isolation, purification and probable identification of isolated bacteria according to Bergey's Manual of systematic bacteriology were performed. Results showed the presence of bacteria from different genera of *Listeria*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Aeromonas*. *Klebsiella, Proteus*, *Lactobacillus* and *Micrococcus* in which *Staphylococcus* and *Shigella sonnei* were the most predominant isolated genus and specie with 19% and 11% of the whole population, respectively.

**Keywords:** Bacteria, Biofilm, Milk, Biochemical test.