# بررسی میزان آلودگی و تولید بیوفیلم باکتری‌های سرماگرا در مخازن شیر خام و تجهیزات فرآوری محصولات لبنی

**رسول رضاپور[1]، شهرام حنیفیان[2*]**

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، ایران

**[*]نویسنده مسئول:** *hanifian@iaut.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۱۶

## چکیده

سرماگرا گروه نامتجانسی از باکتری‌ها هستند که توانایی رشد در دمای یخچال را دارند. اغلب این باکتری‌ها با تولید لیپازها و پروتئازهای خارج‌سلولی موجب تجزیه لیپیدها و پروتئین‌های شیر می‌شوند و آثار مخرب آن‌ها بعد از پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون از بین نمی‌رود. این مطالعه باهدف بررسی میزان آلودگی و تنوع گونه‌ای سرماگراها در مخازن شیر و تجهیزات فرآوری و هم‌چنین قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها انجام پذیرفت. تعداد ۸۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه از مخازن حمل و نگه‌داری شیر خام، ۳۰ نمونه از تجهیزات فرآوری محصولات لبنی و ۲۰ نمونه از سطوح مختلف سالن تولید نمونه‌گیری صورت گرفت. طبق نتایج مطالعه از بین ۸۰ نمونه‌های مختلف، ۲۶/۲۵٪ آلوده به باکتری‌های سرمادوست بود که به ترتیب ۶۵٪ از نمونه‌های مربوط به سطوح مختلف سالن تولید، ۲۳/۳۳٪ از مخازن حمل و نگه‌داری شیر خام و ۳/۳٪ از نمونه‌های تجهیزات فرآوری محصولات لبنی آلوده تشخیص داده شدند. از ۳۱ جدایه شناسایی شده، بالاترین و پایین‌ترین میزان فراوانی به ترتیب مربوط به جنس باسیلوس (۳۲/۲۵٪) و کم‌ترین درصد مربوط به *سودوموناس آیروجینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس* و *آلکالیجنز فکالیس* (۳/۲٪) بود. نتایج حاصل از بررسی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌ها مشخص نمود که ۲۱ جدایه (۶۷/۷۵٪) قابلیت تولید بیوفیلم داشتند. به نظر می‌رسد روش متداول CIP در برخی موارد بازده کافی برای رفع کامل بیوفیلم سرماگراها را ندارد و لازم است به موازات CIP از روش‌های تکمیلی فیزیکی یا شیمیایی برای رفع کامل بیوفیلم در صنایع لبنی به استفاده شود.

**واژگان کلیدی:** سرماگرا، بیوفیلم، مخازن شیر خام، تجهیزات فرآوری لبنی.

## مقدمه

اصطلاح باکتری‌های سرماگرا به باکتری‌هایی اطلاق می‌گردد که صرف نظر از دمای بهینه رشد، در دمای ۲ الی ۷ درجه سلسیوس قادر به رشد و فعالیت هستند (Santos et al., 1996). غالب سرماگراها منشأ آبی و خاکی دارند و در روده نشخوارکنندگان یافت می‌شوند (Cousin, 1982). این باکتری‌ها فلور غالب شیر خام نگه‌داری شده در دماهای پایین بوده و از عمده‌ترین عوامل فساد شیر محسوب می‌شوند. جمعیت سرماگراهای شیر و میزان تأثیر آن‌ها بر روی محصولات لبنی به طول مدت و درجه حرارت ذخیره‌سازی شیر قبل از پاستوریزاسیون بستگی دارد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۱). از این رو حضور این باکتری‌ها در محصولات پاستوریزه به آلودگی ثانویه مربوط است (Bremer et al., 2009). اغلب باکتری‌های سرماگرا در دسته باکتری‌های میله‌ای گرم منفی هستند (Abdou, 2003) و به گونه‌های *سودوموناس*، *آکروموباکتر*، *آلکالیجنز* و *فلاوباکتریوم* تعلق دارند و گاهی بعضی از انواع *میکروکوک*، لاکتوباسیل و آیروباکتر نیز می‌توانند به این گروه اضافه شوند (Cousin, 1982; Lafarge et al., 2004; Munsch-Alatossava et al., 2006; Dodd, 2014). معمولاً باکتری‌های گرم منفی بیش از ۹۰ درصد جمعیت میکروبی شیر خام ذخیره شده در دماهای سرد را تشکیل می‌دهند (Cousin, 1982). باکتری شاخص این گروه سودوموناس است که بعضی از گونه‌های آن از نظر بهداشتی حائز اهمیت هستند؛ *سودوموناس آیروجینوزا* یک پاتوژن انسانی فرصت‌طلب بوده و موجب عفونت چشم و بیماری‌های ریوی می‌شود (Dodd, 2014). برخی از سرماگراها مانند *سودوموناس*

*فلورسنس* و *سودوموناس فراجی* آنزیم‌های لیپولیتیک و پروتئولیتیک مقاوم به حرارت تولید می‌کنند و باعث ایجاد عطر و طعم نامطلوب و تغییرات فیزیکوشیمیایی در محصولات استریل می‌شوند. محققان با بررسی فعالیت آنزیمی باکتری‌های سرماگرا در پنیر به این نتیجه رسیدند که کلیه سویه‌های سرماگرا در دمای ۷ درجه سلسیوس دارای فعالیت پروتئولیتیک هستند (Santos et al., 1996). برخی سرماگراها نظیر گونه‌های *آلکالیجنز* سبب بروز عوارض نامطلوبی در شیر و فرآورده‌های آن می‌شوند. به‌طور مثال *آلکالیجنز ویسکولاکتیس* سبب طنابی‌شدن[1] شیر و *آلکالیجنز متالکالیجنز* موجب لزج شدن پنیر کاتیج می‌گردد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸۱؛ Bremer et al., 2009).

اصطلاح بیوفیلم[2] به توده‌ای از سلول‌های میکروبی اطلاق می‌گردد که عموماً به‌وسیله ماتریکسی از مواد پلیمری خارج سلولی[3] با منشأ میکروبی روی سطوح تثبیت شده‌اند (Rodrigues et al., 2010). برخی از باکتری‌های موجود در شیر خام توانایی چسبیدن و تجمع روی سطوح فولاد ضدزنگ را دارند؛ درنتیجه منجر به شکل‌گیری بیوفیلم در تانکرهای ذخیره‌سازی و خطوط فرآوری شیر می‌گردند (Marchand et al., 2012). چسبیدن باکتری و تشکیل بیوفیلم در مراحل مختلفی شامل اتصال اولیه، اتصال غیرقابل برگشت، توسعه اولیه ساختار بیوفیلم، تکمیل (بلوغ) ساختار بیوفیلم و مرحله پراکنده شدن ساختار اتفاق می‌افتد (Kumar et al., 1998; Srey et al., 2013). در صنایع شیر وجود بیوفیلم به‌عنوان یک عارضه مهم شناخته شده است، به این معنی که بیوفیلم‌ها از طریق مسدود کردن لوله‌ها در مبدل‌های حرارتی و برج‌های خنک‌کننده، میزان انتقال حرارت را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهند و نیز سبب تجزیه تدریجی غشاهای فرا پالایش و اسمز معکوس می‌شوند (McDonogh et al., 1994; Kumari et al., 2014). به‌علاوه باکتری‌های موجود در بیوفیلم به دلیل حضور مواد پلیمری خارج‌سلولی در مقابل مواد ضدعفونی‌کننده مقاوم بوده و زنده باقی می‌مانند. بقای این باکتری‌ها متعاقباً موجب بروز آلودگی‌های ثانویه در محصولات لبنی می‌شود (Marchand et al., 2012). گونه‌های *سودوموناس* و *استرپتوکوکوس* از جمله باکتری‌هایی هستند که اغلب در صنایع غذایی از سطوح جدا شده‌اند (Flint et al., 1999; Flint et al., 2000; Simões et al., 2008). اگرچه استرپتوکوک‌ها عمدتاً در صفحات مبدل حرارتی و در سمت پایین بخش‌های پاستوریزه، بیوفیلم‌های تک گونه[4] تشکیل می‌دهند (Flint et al., 1999; Bouman et al., 1982; Driessen et al., 1984). اما گونه سودوموناس غالباً روی جدار مخازن خنک‌کننده شیر یا خط لوله قبل از فرآوری حرارتی، بیوفیلم‌های چندگونه‌ای[5] ایجاد می‌کنند (Flint et al., 2000; Bouman et al., 1982).

با توجه به اهمیت بهداشتی باکتری‌های سرماگرا و نقش آن‌ها در فساد شیر و فرآورده‌های آن و هم‌چنین بقای طولانی مدت آن‌ها به حالت متصل به سطوح و در تماس مستقیم با مواد غذایی و از سوی دیگر نبود اطلاعات کافی در ارتباط با حضور سرماگراها و قابلیت تولید بیوفیلم توسط آن‌ها در صنایع لبنی، لذا مطالعه میزان آلودگی با این باکتری‌ها و قابلیت آن‌ها در تشکیل بیوفیلم در تانکرهای حمل و نگه‌داری شیر خام و تجهیزات فرآوری و نگه‌داری فرآورده‌های لبنی دارای اهمیت است.

**مواد و روش کار**

روش نمونه‌گیری و کشت

[1] Ropiness
[2] Biofilm
[3] EPS: Extra Polymeric Substance
[4] Single strain
[5] Multiple strain

نمونه‌برداری از کارخانه‌های شیر استان آذربایجان شرقی و در طی سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. در مجموع ۸۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه از مخازن حمل و نگه‌داری شیر خام، ۳۰ نمونه از تجهیزات فرآوری، نگه‌داری و بسته‌بندی محصولات شیر (خطوط تولید شیر پاستوریزه، شیر استریل، پنیر فرا پالایش، دوغ و ماست) و ۲۰ نمونه از سطوح مختلف سالن تولید (شامل کف سالن تولید، سطح تجهیزات، تسمه‌های نقاله) صورت گرفت. به این منظور پس از شستشو و پاک‌سازی متداول در کارخانه و انجام پاک‌سازی درجا[1] مطابق مراحل مندرج در جدول ۱، نمونه‌ها با استفاده از برس سیمی استریل و به‌صورت مکانیکی از روی سطوح تراشیده (شکل ۱) و در سرم رینگر مخلوط گردید و سپس در مجاورت سرما به آزمایشگاه انتقال یافت.

جدول (۱)- مراحل انجام پاک‌سازی درجا

| مراحل | دما (°C) | زمان (دقیقه) |
|---|---|---|
| شستشوی مقدماتی با آب | ۲۰ | ۱۰ |
| شستشو با سود ۱٪ | ۷۰ | ۳۰ |
| آبکشی | ۲۰ | ۱۰ |
| شستشو با اسید ۱٪ | ۶۰ | ۳۰ |
| آبکشی نهایی | ۲۰ | ۱۰ |
| استریل کردن با آب داغ | ۹۰ | ۱۰ |

شکل (۱)- روش نمونه‌گیری از تجهیزات فرآوری

[1] CIP: Cleaning In Place

جداسازی و شناسایی افتراقی سرماگراها

سوسپانسیون نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با شدت g ۴۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب داده شدند. رسوب حاصله در محیط تریپتیک سوی آگار[2] (Merck, Germany)، کشت داده شد و در دمای ۱±۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز گرمخانه گذاری گردید. سپس کلونی‌های 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 اولیه، جدایه‌ها تحت آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرام، کاتالاز و اکسیداز قرار گرفتند. به دلیل این‌که سرماگراها گروه نامتجانسی از جنس‌ها و گونه‌های باکتریایی هستند، آزمایش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی انجام گرفت. آزمایش‌های مورفولوژی شامل شکل باکتری، وجود یا عدم وجود کپسول و تاژک، قابلیت تشکیل اسپور و موقعیت اسپور بر روی نمونه‌ها انجام بودند. رشد در دماهای مختلف، رشد در محیط‌های کشت اختصاصی، قابلیت اکسیداسیون یا تخمیر، قابلیت مصرف قندهای مختلف و تولید یا عدم تولید گاز و اسید، قابلیت تحرک، تولید رنگ‌دانه، قابلیت مصرف سیترات از جمله آزمایش‌های استاندارد و متداول معرفی شده در منابع مختلف برای شناسایی افتراقی جنس‌ها و گونه‌های باکتریایی سرماگرا استفاده گردید (Tortorelli and Anderson, 2001; Batt, 2014; Cowan et al., 2003; Dodd, 2014).

قابلیت تولید بیوفیلم

قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها با روش کمی در میکروپلیت[3] اندازه‌گیری شد (Srey et al., 2013). بر اساس این روش، جدایه‌ها ابتدا در محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر (Merck,

[2] Tryptic Soy agar
[3] Microplate quantitative assay

Germany) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس تجدید کشت گردیدند. سپس مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی براث[1] حاوی ۲ درصد ساکارز و ۲ درصد گلوکز به هرگوده میکروپلیت انتقال داده شد و در ادامه ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون تجدید کشت شده تلقیح گردید. 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 میکرو لیتر آب یون‌زدایی شده[2] شستشو داده شد. برای تثبیت بیوفیلم در داخل گودهها، مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر متانول ۹۹ درصد به هر گوده اضافه و پس از ۱۵ دقیقه، تخلیه و در دمای آزمایشگاه خشک گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به هر گوده اضافه و بعد از ۵ دقیقه آب‌کشی و در شرایط محیطی خشک گردید. برای حل کردن کریستال‌ویوله باقیمانده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به هر گوده حل شد و شدت رنگ ایجاد شده با ELISA Reader در طول موج ۴۹۲ نانومتر اندازه‌گیری گردید. قابلیت تولید بیوفیلم تمامی جدایه‌ها و هم‌چنین نمونه شاهد منفی (محیط کشت استریل تریپتیک سوی براث) در سه تکرار ارزیابی شد. نتیجه میزان تولید بیوفیلم بر اساس جذب نوری نمونه شاهد منفی تعیین شد.

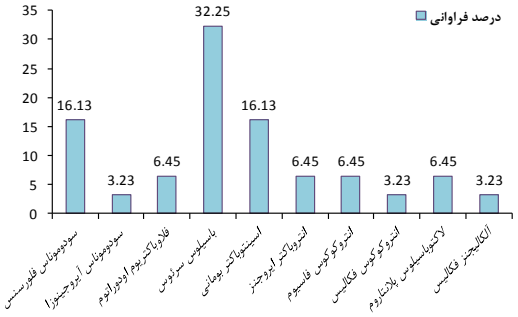
## نتایج

نتایج به دست آمده از نمونه‌برداری در جدول (۲) نشان داده شده است. با توجه به نتایج کشت میکروبی، از ۸۰ نمونه اخذ شده از محل‌های مختلف، ۲۱ نمونه (۲۶/۲۵٪) آلوده به جنس سرماگراها بودند. از این بین بیش‌ترین میزان آلودگی به ترتیب در سطوح مختلف سالن تولید ۶۵٪، مخازن حمل و نگه‌داری شیر خام ۲۳/۳۳٪ و تجهیزات فرآوری، نگه‌داری و بسته‌بندی محصولات لبنی ۳/۳٪ به دست آمد.

بر اساس نتایج آزمون‌های افتراقی، ۳۱ جدایه به دست آمد که متشکل از ۱۰ گونه متنوع باکتریایی بودند. بالاترین درصد فراوانی مربوط به *باسیلوس سرئوس* با ۳۲/۲۵٪ و کم‌ترین درصد مربوط به باکتری‌های *سودوموناس آیروجینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس* و *آلکالیجنز فکالیس* با ۳/۲٪ بود (شکل ۲).

جدول (۲)- تعداد نمونه، تعداد و درصد موارد مثبت و تنوع گونه‌ای سرماگراها به تفکیک گروه‌های مختلف نمونه

| محل نمونه‌برداری | تعداد نمونه | تعداد (درصد) موارد مثبت | تنوع میکروبی |
|---|---|---|---|
| مخازن حمل و نگه‌داری شیر خام | ۳۰ | ۷ (۲۳/۳۳٪) | ۹ |
| تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی | ۳۰ | ۱ (۳/۳۳٪) | ۲ |
| سطوح سالن | ۲۰ | ۱۳ (۶۵٪) | ۲۰ |
| کل | ۸۰ | ۲۱ (۲۶/۲۵) | ۳۱ |




شکل ۲- درصد فراوانی گونه‌های سرماگرای جداسازی شده

از ۲۱ جدایه سرماگرا، ۱۱ مورد (۵۲/۳۸٪) مولد بیوفیلم و ۱۰ جدایه (۴۷/۶۲٪) فاقد این توانایی تشخیص داده شدند. در جدایه‌های مولد بیوفیلم مقادیر متفاوتی از تولید بیوفیلم به دست آمد (جدول ۳). این حالت در بین سویه‌های مختلف یک گونه نیز مشاهده گردید؛ به‌عنوان مثال سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* هر سه مقدار «کم»، «متوسط» و «زیاد» بیوفیلم را تولید نمودند. بیشترین میزان تولید بیوفیلم در بین جدایه‌ها نیز مربوط به یکی از سویه همین باکتری بود.

[1] Tryptic Soy Broth
[2] Deionized water

جدول (۳)- میزان تولید بیوفیلم در گونه‌های مختلف سرماگرا بر اساس میزان جذب نوری (میانگین ± انحراف‌معیار)*

| جدایه | گونه‌های سرماگرا | جذب نوری | تولید بیوفیلم |
|---|---|---|---|
| ۱-۵ | *سودوموناس فلورسنس* | ۰/۳۳ ± ۰/۰۹ | کم |
| | | ۰/۲۱ ± ۰/۰۳ | کم |
| | | ۰/۱۶ ± ۰/۰۰۹ | منفی |
| | | ۰/۵۱ ± ۰/۱۳ | متوسط |
| | | ۳/۲۹ ± ۰/۸۹ | زیاد |
| ۶ | *سودوموناس آیروجینوزا* | ۰/۱۵ ± ۰/۰۰۳ | منفی |
| ۷-۸ | *فلاوباکتریوم اودوراتوم* | ۰/۱۹ ± ۰/۰۳ | کم |
| | | ۰/۱۵ ± ۰/۰۱ | منفی |
| ۹-۱۸ | *باسیلوس سرئوس* | ۰/۲۰ ± ۰/۰۷ | کم |
| | | ۰/۳۲ ± ۰/۱۵ | کم |
| | | ۰/۲۰ ± ۰/۰۳ | کم |
| | | ۰/۱۷ ± ۰/۰۱ | کم |
| | | ۰/۱۵ ± ۰/۰۰۱ | منفی |
| | | ۰/۲۸ ± ۰/۰۱ | کم |
| | | ۰/۱۶ ± ۰/۰۱ | منفی |
| | | ۱/۴۵ ± ۰/۰۹ | زیاد |
| | | ۰/۱۸ ± ۰/۰۴ | کم |
| | | ۰/۱۵ ± ۰/۰۰۶ | منفی |
| ۱۹-۲۳ | *اسینتوباکتر بومانی* | ۰/۴۶ ± ۰/۱۱ | متوسط |
| | | ۰/۱۸ ± ۰/۰۰۷ | کم |
| | | ۰/۱۷ ± ۰/۰۱ | کم |
| | | ۰/۱۵ ± ۰/۰۱ | منفی |
| | | ۰/۱۹ ± ۰/۰۱ | کم |
| ۱۴-۲۵ | *انتروباکتر ایروجنز* | ۰/۷۸ ± ۰/۱۳ | زیاد |
| | | ۰/۶۸ ± ۰/۳۱ | زیاد |
| ۲۶-۲۷ | *انتروکوکوس فاسیوم* | ۰/۱۶ ± ۰/۰۰۹ | منفی |
| | | ۰/۲۴ ± ۰/۰۸ | کم |
| ۲۸ | *انتروکوکوس فکالیس* | ۰/۱۵ ± ۰/۰۰۲ | منفی |
| ۲۹-۳۰ | *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* | ۰/۱۴ ± ۰/۰۱ | منفی |
| | | ۰/۲۵ ± ۰/۰۱ | کم |
| ۳۱ | *آلکالیجنز فکالیس* | ۰/۳۶ ± ۰/۰۰۸ | متوسط |
| | نمونه شاهد | ۰/۱۶۷ | منفی |

* اعداد میانگین سه تکرار می‌باشند.

## بحث

آلودگی شیر با میکروارگانیسم‌های سرماگرا به‌طور ویژه‌ای در صنایع لبنی مورد توجه قرار دارد؛ زیرا ذخیره و توزیع محصولات شیر و محصولات آن در درجه حرارت‌های مناسب برای رشد این ارگانیسم‌ها انجام می‌گیرد. از طرفی میکروارگانیسم‌های سرماگرا طیف گسترده‌ای از میکروب‌های عامل بیماری و فساد را تشکیل می‌دهند که در صورت زنده ماندن در زنجیره فرآوری مواد غذایی می‌توانند مخاطراتی برای مصرف‌کنندگان ایجاد نمایند یا موجب فساد و کاهش ماندگاری مواد غذایی شوند. این قبیل میکروب‌ها در صورت تولید بیوفیلم در برابر عوامل ضدمیکروبی و ضدعفونی کننده‌ها مقاومت نموده و می‌توانند به یک

مشکل جدی در صنایع غذایی مبدل شوند (Cousin, 1982). بسیاری از سرماگراها لیپاز خارج‌سلولی مقاوم به حرارت، پروتئازها و لاکتیناز تولید می‌کنند. به‌علاوه، بسیاری از این آنزیم‌ها حتی پس از مراحل فرآوری حرارتی پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون فعال باقی می‌مانند. تخریب ترکیبات تشکیل دهنده شیر از طریق فعالیت‌های مختلف آنزیمی می‌تواند عمر مفید شیر فرآوری شده را کاهش دهد (Marchand et al., 2012; Shah, 1994; Sørhaug et al., 1997).

در این مطالعه از ۸۰ نمونه بررسی شده، تعداد ۲۱ نمونه آلوده به باکتری‌های سرمادوست تشخیص داده شدند که از این تعداد ۷ مورد (۲۳/۳۳٪) از مجموع ۳۰ نمونه، از تانکرهای حمل و نگهداری شیر خام جداسازی شدند و شامل ۹ گونه متنوع باکتری‌های سرماگرا بودند. طی مطالعه‌ای در آمریکا از ۱۳۱ تانک شیر خام نمونه‌برداری گردید و نتایج نشان داد ۷۶/۳٪ تانکرها آلوده به باکتری‌های گرم منفی غیرکلی‌فرمی بودند و جمعیت آن‌ها بین صفر تا ۶/۲ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر برآورد شد. در این بررسی ۲۳۴ جدایه به دست آمد که ۴۹/۵۷٪ از آن‌ها مربوط به گونه‌های مختلف سودوموناس بودند (Jayarao et al., 1999). مقایسه درصد فراوانی آلودگی در بررسی فوق و مطالعه اخیر نشانگر اختلاف چند برابری میزان آلودگی و نقش شستشو و CIP در کاهش درصد آلودگی و به احتمال زیاد در شدت آلودگی در تانکرهای شیر خام است. این میزان آلودگی می‌تواند در کشورهایی نظیر ایران با سیستم دامداری غالباً سنتی، شیردوشی دستی و کمبود امکانات سرمایشی و انتقال بهداشتی شیر بیشتر باشد. در خصوص میزان آلودگی تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی شیر و محصولات آن، با وجود این‌که فرایند CIP با مراحل مشابه برای تانکرهای حمل شیر خام و تجهیزات فرآوری اجرا می‌شد، اختلاف قابل توجه ۷ برابری در میزان موارد آلوده به باکتری‌های سرماگرا بین دو گروه نمونه مشاهده شد. این تفاوت ممکن است در نتیجه غیراستاندارد بودن برخی از تانکرهای حمل و نگهداری شیر خام و وجود درز و شکاف در جداره داخلی تانکرها باشد که کانون‌هایی برای شکل‌گیری بیوفیلم و عدم کارایی CIP در رفع آن‌ها باشد (Bremer et al., 2009).

در مورد محل‌های مستعد برای تشکیل بیوفیلم و جداسازی باکتری‌ها مولد از آن‌ها، در مطالعه حاضر از ۳۱ جدایه، ۱۳ مورد از تسمه‌های نقاله جداسازی شد که دارای شیارها و تخلخل بیشتری نسبت به سایر سطوح نمونه‌برداری هستند. هم‌چنین ۷ مورد از نمونه‌های مثبت از تانک‌های حمل و ذخیره شیر خام، ۶ مورد از کف سالن‌های تولید، ۴ مورد از زانوی لوله‌ها و صرفاً یک مورد از بخش داخلی قسمت بسته‌بندی جدا شده‌اند. نتایج نشان می‌دهد که هرچقدر شیار و منافذ بیشتر، سطح ناصاف‌تر و دارای نقاط کور و غیرقابل دسترس باشند، احتمال حضور و تشکیل بیوفیلم بیشتر خواهد بود. محققان با بررسی تشکیل بیوفیلم در چوب، فولاد ضدزنگ و سطوح شیشه‌ای به این نتیجه رسیدند که چوب به دلیل تخلخل و خاصیت جذب‌کنندگی بالا، اتصال بیشتری با مواد آلی و باکتری‌ها ایجاد می‌کند و موجب تقویت تشکیل بیوفیلم می‌شود. هم‌چنین دریافتند که شیشه به دلیل خواص مقاوم در برابر خوردگی و داشتن سطح صاف، جنس ارجحی نسبت به سایر سطوح در تماس با مواد غذایی محسوب می‌شود (Srey et al., 2013).

در بررسی اخیر جنس‌های متنوعی از باکتری‌های سرماگرا در نمونه‌های مطالعه شده یافت گردید. بالاترین درصد فراوانی مربوط به *باسیلوس سرئوس* با ۳۲/۲۵٪ و کم‌ترین درصد به‌طور مشترک مربوط به *سودوموناس آیروجینوزا*، *انتروکوکوس فکالیس* و *آلکالیجنز فکالیس* با ۳/۲٪ بود. علت بالا بودن میزان فراوانی *باسیلوس سرئوس* ممکن است مربوط به توانایی تولید اسپورهای مقاوم به حرارت و از طرفی تولید ترکیبات پلی‌ساکاریدی باشد که قابلیت چسبیدن به

سطوح استیل ضدزنگ را فراهم می‌آورد. وجود تاژک‌های پیرامونی که قابلیت حرکت به این باکتری می‌دهد، از دیگر ویژگی‌هایی است که پتانسیل تشکیل بیوفیلم توسط آن را افزایش می‌دهد (Kumari et al., 2014). آلودگی مخزن نگهداری، تجهیزات تبادل حرارتی و آلودگی ثانویه پس از پاستوریزاسیون از جمله منابع مهم برای *باسیلوس سرئوس* می‌باشند (Rysstad et al., 2006).

از ۳۱ جدایه به دست آمده، ۲۱ مورد بیوفیلم تشکیل دادند و با این توضیح که درجات مختلفی از تولید بیوفیلم در بین گونه‌های مختلف سرماگرا مشاهده شد. *آلکالیجنز فکالیس* قدرت متوسطی از لحاظ تولید بیوفیلم داشت. گونه‌های این جنس از باکتری در شرایطی که مواد مغذی کم و شرایط محیطی دشوار است با تولید مواد لزج، پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PBH) و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و ایجاد ساختارهای مستحکم سلولی زنده باقی می‌مانند. آلکالیجنزها در محصولات لبنی، گوشت و ماهی باعث آلودگی می‌شوند و شیر به دلیل داشتن مواد مغذی و نگه‌داری در دمای یخچال محیط بسیار مناسبی برای این باکتری است. یکی از گونه‌های این باکتری که موجب لزج شدن شیر می‌شود *آلکالیجنز ویسکولاکتیس* است. این باکتری با تولید مواد لزج و پلاستیک مانند PHB توانسته در برابر CIP مقاومت نموده و زنده باقی بماند (Batt, 2014) و وجود بیوفیلم این باکتری در تانک‌های ذخیره شیر خام گزارش شده است (Teixeira et al., 2005).

از مجموع ۶ جدایه سودوموناس، یک مورد از گونه‌های *فلورسنس* و گونه *آیروجینوزا* بیوفیلم مولد بیوفیلم نبودند. در حالی که بیش‌ترین میزان تولید بیوفیلم در بین تمامی جدایه‌ها مربوط به یکی از جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* به دست آمد که این میزان حدود ۱۹ برابر متوسط OD شاهد بود. این نمونه از تسمه نقاله پرکن شیر جدا شد. با توجه به درزهای فراوانی که در تسمه نقاله وجود دارد حضور چنین میکروبی در این مکان دور از انتظار نبود. میانگین جذب نوری ۶ جدایه سودوموناس (۰/۷۷۵)، بیش از چهار برابر نمونه شاهد (۰/۱۶۷) برآورد شد که نشان‌دهنده این موضوع است که در مجموع جنس سودوموناس می‌تواند مولد قوی بیوفیلم محسوب شود. این باکتری در شرایط خاصی با غیرفعال کردن ژن تولید تاژک و فعال نمودن ژن مولد آلژینات (که یک پلی‌ساکارید آنیونی خارج سلولی است) باعث افزایش چسبندگی و مقاومت سودوموناس در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (Marchand et al., 2012; Jayarao et al., 1999). در مطالعه مشابهی در کارخانه لبنی، گونه‌های سودوموناس با قابلیت تولید بیوفیلم از نوار نقاله و سپراتور جداسازی نمودند (Gunduz et al., 2006). نتایج تولید بیوفیلم سایر جدایه‌ها نشان داد که از ۱۰ مورد نمونه آلوده به *باسیلوس سرئوس*، ۳ مورد فاقد توانایی تولید بیوفیلم بودند و یک جدایه بیوفیلم زیادی تولید نمود. در مطالعه حاضر *باسیلوس سرئوس* غالباً در نمونه‌های محیطی (سطوح سالن و تجهیزات) یافت شد. به نظر می‌رسد مقاومت *باسیلوس سرئوس* نسبت به حرارت به‌واسطه اسپوردار بودن این باکتری موجب پایداری بیشتر آن در قیاس با سرماگراهای دیگر شده است که در برابر حرارت آب داغ مورد استفاده برای شستشو و آبکشی محیط کارخانه حساس می‌باشند. هر دو جدایه *انتروباکتر ایروجنز* بیوفیلم قوی تولید کردند و متوسط OD آن‌ها ۰/۷۳۶ به دست آمد. دلیل این امر را می‌توان توانایی گونه‌های این جنس در قابلیت تولید مواد لزج، رشد در دامنه دمایی ۶ الی ۴۷ درجه سلسیوس و تحمل محدوده pH بین ۴/۵ تا ۱۰ دانست (Marchand et al., 2012).

تحقیقات مشخص نمود که رشد توأمان دو یا چند باکتری اثر هم‌افزایی بر میزان تولید بیوفیلم دارد. طوری که رشد هم‌زمان *سودوموناس فلوروسنس* و

*باسیلوس سرئوس* در حدود ۵ برابر بیوفیلم بیشتری در مقایسه با حالت رشد تکی *سودوموناس فلورسنس* تولید نمود. هم‌چنین همزیستی *سودوموناس فلوروسنس* با *باسیلوس سرئوس* موجب مقاومت بیشتر به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. (Simões et al., 2008). در مطالعه دیگری محققان نشان دادند که بیوفیلم لاکتوکوکوس در شیر فرادما (در دمای ۷ درجه سلسیوس) میزان اتصال سلولی سودوموناس را ۱۵ تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌دهد. دلیل هم‌افزایی را به این صورت تفسیر نمودند که لاکتوکوکوس با تولید اسیدلاکتیک، کربن مورد نیاز سودوموناس را فراهم می‌آورد و در مقابل مقدار pH محیط در محدوده مناسب برای رشد و فعالیت لاکتوکوکوس حفظ می‌شود (Kives et al., 2005). در تحقیق حاضر دو باکتری *سودوموناس فلوروسنس* و *باسیلوس سرئوس* از یک محل و نمونه مشابه جداسازی شدند. هم‌چنین در بعضی از نمونه‌های دیگر *باسیلوس سرئوس* به همراه سایر باکتری‌ها نظیر *سودوموناس آیروجینوزا*، *فلاووباکتریوم اودوراتوم* و *اسینتوباکتر بومانی* جداسازی شد. می‌توان از نتایج به دست آمده چنین استنباط نمود که احتمالاً این باکتری در حالت رشد توأمان عملکرد بهتری از نظر بقاء و تولید بیوفیلم داشته باشد. در سایر نمونه‌ها نیز *انتروباکتر ایروجینز* به همراه *انتروکوکوس فاسیوم*، *سودوموناس فلورسنس* به همراه *آلکالیجنز فکالیس* و *اسینتوباکتر بومانی* به همراه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند.

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده وجود نتایج مثبت و آلوده متعدد در نمونه‌های محیطی در سالن تولید است که بیانگر پتانسیل بالای این مکان‌ها برای آلوده کردن محصولات لبنی است. وجود درز و شکاف بین کاشی‌ها و ترک‌خوردگی آن‌ها، عدم شستشوی مؤثر کف سالن باعث حضور گسترده این ارگانیسم‌ها شده است. دیگر گروه نمونه‌ها که آلودگی بالایی داشتند تانکرهای حمل و نگه‌داری شیر خام بودند. در هنگام CIP تانکرها، محلول‌های شستشو تمامی سطوح تانکر را در بر نمی‌گرفت و محل‌هایی نظیر اطراف درب تانکر و زانوی خروجی شیر آغشته به محلول‌های ضدعفونی کننده نمی‌گردید؛ طوری که در بعضی از تانکرها بیوفیلم تشکیل شده به‌راحتی با چشم قابل مشاهده بود. برای رفع چنین بیوفیلم‌هایی لازم است از روش‌های تکمیلی شیمیایی یا فیزیکی به موازات CIP بهره برد. علاوه بر این، زانوهای لوله‌های خروجی تانک‌ها به‌عنوان نقاط کور و زاویه‌دار بهترین مکان برای تجمع میکروب‌ها هستند به‌نحوی که چندین جدایه از این مکان‌ها جداسازی شد. در مجموع می‌توان به این جمع‌بندی رسید که اجرای منظم و اصولی CIP در کنار بهسازی سالن تولید و تجهیزات، استفاده از روش‌های مکانیکی و در صورت لزوم تعویض قطعه و یا تعمیر مکان تخریب شده می‌تواند تا حدود زیادی از بروز مشکلات میکروبی جلوگیری کند.

## منابع

۱. مرتضوی، علی؛ کاشانی نژاد، مهدی؛ ضیاء الحق وزیری، حمیدرضا (۱۳۸۱). میکروبیولوژی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، چاپ دوم، صفحه ۹۰-۳۳.

2. Abdou, A. M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic Serratia marcescens lipase. J Dairy Sci. 86(1): 127-132.

Batt C. A. (2014). Alcaligenes, In: Batt, C.A. and Robinsson, R.K. (Editors), Encyclopedia of Food Microbiology, 2th Edition, Academic Press, 38-41.

Bouman, S., Lund, D. B., Driessen, F. M., Schmidt, D. G. (1982). Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times. J Food Protect. 45(9): 806-812.

Bremer, P. J., Seale, B., Flint, S., Palmer, J., Fratamico, P., Annous, B. (2009). Biofilms in dairy processing. Biofilms in the food and beverage industries. 396-431.

Cousin, M. A. (1982). Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk

Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. Appl Enviro Microbiol. 70(9): 5644-5650.

Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Compr Rev Food Sci Food Saf. 11(2): 133-147.

McDonogh, R., Schaule, G., Flemming, H. C. (1994). The permeability of biofouling layers on membranes. J Membr Sci. 87(1-2): 199-217.

Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. Microbiol Res. 161(4): 334-346.

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

Rysstad, G., Kolstad, J. (2006). Extended shelf life milk—advances in technology. Int J Dairy Sci. 59(2): 85-96.

Santos, J. A., López-Díaz, T. M., Garcia-Fernández, M. C., García-López, M. L., Otero, A. (1996). Characterization and extracellular activity of psychrotrophic bacteria isolated from Villalón cheese (fresh variety of Spanish sheep's milk cheese). Int J food Microbiol. 33(2-3): 301-306.

Shah, N. P. (1994). Psychrotrophs in milk: a review. Milchwissenschaft (Germany). 49(8): 432-437.

Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2008). Physiology and behavior of Pseudomonas fluorescens single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. Int J Food Microbiol. 128(2): 309-316.

Sørhaug, T., Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. Trends Food Sci Tech. 8(2): 35-41.

Srey, S., Jahid, I. K., Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food Contr. 31(2): 572-585.

and dairy products: a review. J Food Protect. 45(2): 172-207.

Cowan, S. T., Steel, K. J. (2003). Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Cambridge university press.

Dodd, C.E.R. (2014). Pseudomonas, In: Batt, C.A. and Robinsson, R.K. (Editors), Encyclopedia of Food Microbiology, 2th Edition, Academic Press, 244-247.

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.

Driessen, F. M., De Vries, J. O. G. É., KIngma, F. (1984). Adhesion and growth of thermoresistant streptococci on stainless steel during heat treatment of milk. J Food Protect. 47(11): 848-852.

Flint, S. H., Brooks, J. D., Bremer, P. J. (2000). Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. J of Food Eng. 43(4): 235-242.

Flint, S. H., van den Elzen, H., Brooks, J. D., Bremer, P. J. (1999). Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonising stainless steel. Int Dairy J. 9(7): 429-436.

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

Jayarao, B. M., Wang, L. (1999). A Study on the Prevalence of Gram-Negative Bacteria in Bulk Tank Milk. J of Dairy Sci. 82(12): 2620-2624.

Kives, J., Guadarrama, D., Orgaz, B., Rivera-Sen, A., Vazquez, J., SanJose, C. (2005). Interactions in biofilms of Lactococcus lactis ssp. cremoris and Pseudomonas fluorescens cultured in cold UHT milk. J of Dairy Sci. 88(12): 4165-4171.

Kumar, C. G., Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. Int J Food Microbiol. 42(1): 9-27.

Kumari, S., 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 Contr. 36(1): 153-158.

Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R., Vieira, M. J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. Food Microbiol. 22(2): 247-251

# Contamination rate and biofilm formation by psychotrophic bacteria from bulk milk tanks and dairy processing equipment

**Rezapour R[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: 7 September 2017 Accepted: 7 November 2017

## Abstract

Psychorotrophs are the heterogeneous group of bacteria that can grow at refrigerator temperatures. Most of these bacteria produce extracellular proteases and lipases which decompose lipids and proteins in milk that leads to undesirable defect in milk. These defects do not disappear even after pasteurization and sterilization. This study aimed to investigate the occurrence rate and diversity of psychotropic bacteria in raw milk tankers and dairy processing equipment as well as the biofilm-forming ability of the isolates. A total of 80 samples including 30 samples of raw milk tanks, 30 samples of dairy product processing equipment and 20 samples from different surfaces of the production line were collected. According to the results, 26.25% of the samples were found contaminated with psychrotrophic bacteria. Amongst, 65% of the surface samples of production line, 23.33% of the raw milk tanks and 3.3% of the processing equipment were positive for psychrotrophic bacteria. Out of 31 isolates, Bacillus genus had the highest contamination rate (32.25%), whilst Alcaligenes showed the lowest rate (3.2%). The results of biofilm formation revealed that 21 isolates (67.75%) were able to produce biofilm. It was concluded that in some cases, current CIP procedure is not efficient for the entire removal of biofilm from the processing equipment. It seems that it is necessary to apply complementary physical/chemical approaches along with the current CIP procedure to complete obliteration of biofilms from dairy industry.

**Keywords**: Psychrotrophic bacteria, Biofilm, Raw milk tanks, Dairy processing equipment.