باکتری‌های اسپوردار هوازی در شیرهای خام و پاستوریزه منطقه آذربایجان‌شرقی: فراوانی، کمیت و تنوع گونه‌ای

مریم جبارپور ستاری[1]، جلال شایق[2*]، شهرام حنیفیان[3]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

۲. گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران

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

[*]نویسنده مسئول: *jalal_shayegh@iaushab.ac.ir*

تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱/۱۷ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۵/۷/۲۹

چکیده

رشد و تکثیر باکتری‌های *اسپوردار* علاوه بر ایجاد فساد در مواد غذایی، با تولید توکسین موجب بیماری در مصرف‌کنندگان می‌شوند. انواع هوازی این باکتری‌ها گسترش زیادی در طبیعت دارند و از اهمیت بالایی در صنایع شیر برخوردارند. هدف این مطالعه، بررسی میزان آلودگی، کمیت و تنوع گونه‌ای باکتری‌های اسپوردار هوازی در شیرهای خام و پاستوریزه منطقه آذربایجان‌شرقی بود. برای این منظور، تعداد ۸۰ نمونه شیر خام و ۴۰ نمونه شیر پاستوریزه به‌صورت تصادفی نمونه‌گیری شد و جمعیت *اسپورداران مزوفیل و ترموفیل* در آن‌ها برآورد گردید. تنوع گونه‌ای با استفاده از آزمون‌های متداول مورفولوژیکی و بیوشیمیایی تعیین گردید. بر اساس یافته‌های مطالعه، آلودگی باکتری‌های *اسپوردار مزوفیل و ترموفیل* به‌ترتیب در ۸۲/۵ و ۸۷/۵ درصد نمونه‌های شیر خام مشاهده شد و این مقدار برای نمونه‌های شیر پاستوریزه به‌ترتیب ۷۷/۵ و ۸۲/۵ درصد برآورد گردید. به‌علاوه، شدت آلودگی با باکتری‌های *اسپوردار هوازی* در نمونه‌های خام و پاستوریزه بسیار متغیر (از ۲ تا ۸ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر) تعیین شد. در شیر خام و پاستوریزه به‌ترتیب ۱۲ و ۸ گونه *باسیلوس* شناسایی شد که در این بین گونه‌های *ماسرانس* و *سرئوس* گونه‌های اصلی جداسازی شده بودند و این دو گونه در مجموع ۷۶ و ۶۴ درصد باسیلوس‌ها را به‌ترتیب در شیر خام و پاستوریزه تشکیل می‌دادند. طبق نتایج مطالعه، آلودگی‌های محیطی شیرخام می‌تواند دلیل اصلی حضور جمعیت بالای باکتری‌های اسپوردار باشد؛ به‌طوری که فرایند پاستوریزاسیون تأثیر قابل‌توجهی در کاهش شدت آلودگی نداشت. در نهایت می‌توان به این جمع‌بندی رسید که حضور گونه‌های مولد توکسین در شیر پاستوریزه می‌تواند مخاطره بهداشتی برای مصرف‌کنندگان باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اسپوردار هوازی، شیرخام، شیر پاستوریزه، تنوع گونه‌ای.

مقدمه

شیر به‌دلیل داشتن شرایط داخلی ایده‌آل نظیر فعالیت آبی (Activity of water: a_w) بالا، pH تقریباً خنثی، مواد مغذی متنوع شامل ترکیبات لیپیدی، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و املاح معدنی، محیط بسیار مناسبی برای طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌هاست. در دام‌های سالم، شیر هنگام ترشح در داخل پستان عاری از هر گونه آلودگی میکروبی است، اما قبل از خروج از پستان به میکروارگانیسم‌های موجود در کانال پستانی آلوده می‌شود. در شیرهایی که تحت شرایط بهداشتی دوشیده شده‌اند گونه‌های میکروکوکوس و استافیلوکوکوس، کورینه‌باکتریوم بوویس و در برخی موارد سایر گونه‌ها قابل ردیابی هستند. هنگام دوشش، این باکتری‌ها وارد شیر شده و جمعیت میکروبی متشکل از تعداد بسیار اندک تا ۱۵۰۰ عدد در هر میلی‌لیتر خواهند داشت و در آزمایش استاندارد پلیت کانت، این قبیل شیرها بار میکروبی کمتر از ۱۰۰ cfu/ml را نشان می‌دهند (Walstra et al., 1999). در دام‌های مبتلا به بیماری‌های عفونی و به‌ویژه در موارد ورم‌پستان، آلودگی‌های میکروبی با تعداد زیاد در داخل پستان حضور دارند. به‌علاوه، آلودگی می‌تواند به‌طور ثانویه و از طریق

دست شیردوش، ظروف جمع‌آوری و نگه‌اری، آلودگی مدفوعی، محیط دامداری و مخازن حمل شیر به شیر خام انتقال یابد (Chambers, 2002). باکتری‌های اسپوردار مهم در مواد غذایی متعلق به جنس‌های *باسیلوس* (هوازی) و *کلستریدیوم* (بی‌هوازی) هستند. محیط شیر به‌دلیل داشتن پتانسیل اکسید (Eh^+) محیط مناسبی برای رشد و فعالیت کلستریدیوم‌ها نمی‌باشد، در مقابل باسیلوس‌ها امکان رشد در این محیط را دارند (Walstra et al., 1999). باسیلوس‌ها باکتری‌هایی میله‌ای شکل، گرم مثبت، هوازی-بی‌هوازی‌اختیاری، *مزوفیل و ترموفیل*، متحرک و غیرمتحرک و اغلب آرایش زنجیری دارند. این جنس پراکندگی زیادی در طبیعت دارد و در خاک، آب، سطح گیاهان و در بدن حیوانات یافت می‌شوند. به‌دلیل توانایی در تولید اسپور در برابر شرایط محیطی نامساعد نظیر گرما یا سرمای بیش از حد، خشکی، کمبود مواد مغذی، مواد ضدعفونی کننده و اشعه فرابنفش و فشار مقاوم هستند و به‌مدت طولانی به‌حالت غیرفعال به حیات خود ادامه می‌دهند. جنس باسیلوس دارای ۲۴ گونه مختلف است که در این میان گونه‌های *آنتراسیس*[1]، *سرئوس*[2]، *سوبتیلیس*[3]، *ماسرانس*[4] و *پلی‌میکس*[5] اهمیت بیشتری از نظر بهداشتی و غذایی برخوردارند. در طول آماده‌سازی و به‌ویژه متعاقب فرایندهای حرارتی، اسپورها در نتیجه شوک حرارتی به‌حالت فعال درآمده و پس از جوانه زدن، رشد و تکثیر پیدا می‌کنند (Rajkowski and Bennet, 2003). پیامد فعالیت باسیلوس‌ها در شیر، لخته شدن پروتئین‌ها و تغییر در طعم و مزه شیر می‌باشد. در مورد گونه‌های مولد توکسین نظیر برخی سویه‌های *باسیلوس سرئوس*، در صورت مهیا بودن شرایط محیطی و رسیدن به تعداد کافی ($> 10^5$ cfu/g)، تولید توکسین نموده و موجب مسمومیت در مصرف‌کنندگان می‌شود (Bennet and Belay, 2001). در مطالعات مختلف حضور گونه‌های متنوعی از باکتری‌های اسپوردار در شیر و فرآورده‌های آن گزارش شده است. اغلب یافته‌ها حاکی از غالب بودن *باسیلوس سرئوس* است و گونه‌هایی نظیر *لیشنی‌فورمیس* (*licheniformis*)، *پومیلوس* (*pumilus*)، *سوبتیلیس*، *ماسرانس* و *پلی‌میکسا* با فراوانی کمتر در رده‌های بعدی قرار داشتند (Crielly et al., 1994; Coorevits et al., 2008; Lücking et al., 2013). به‌علاوه، توانایی سنتز آنزیم‌های پروتئولیتیک، لیپولیتیک، لیسیتیناز و لاکتاز توسط گونه‌های باسیلوس جداسازی شده از شیر خام و فرآورده‌های آن به اثبات رسیده است (Jonghe et al., 2010). این آنزیم‌ها موجب لخته شدن پروتئین‌های شیر، تندشدگی چربی‌ها، تجزیه لیسیتین و در نتیجه از بین رفتن حالت امولسیونی چربی شیر (bitty/broken cream) و بادکردگی - در نتیجه تخمیر لاکتوز - در محصولات شیر می‌گردند (Walstra et al., 1999). توانایی گونه‌های باسیلوس در تولید آنزیم‌های مولد فساد و توکسین‌های مختلف در کنار گسترش زیاد و شیوع بالا در شیر خام و منابع محیطی، گونه‌های باسیلوس را به یک معظل جدی در صنایع شیر مبدل ساخته است. با توجه به ضرورت حفظ و کنترل کیفیت میکروبی شیر و فرآورده‌های آن با هدف تضمین سلامتی مصرف‌کنندگان و هم‌چنین کنترل فساد در این محصولات و بنابه به نبود اطلاعات جامع در زمینه کیفیت میکروبی شیرهای خام منطقه آذربایجان‌شرقی از نظر سطح آلودگی با باکتری‌های اسپوردار، لذا هدف این مطالعه ارزیابی میزان فراوانی، کمیت و تنوع گونه‌ای باکتری‌های اسپوردار هوازی در شیرهای خام و پاستوریزه تولید شده در استان آذربایجان‌شرقی بود.

مواد و روش کار

نحوه نمونه‌گیری

در مجموع ۱۲۰ نمونه شامل ۸۰ نمونه شیرخام و ۴۰ نمونه شیر پاستوریزه جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری در طی سال ۱۳۹۳ به‌روش تصادفی طبقه‌ای از مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی صورت گرفت. نمونه‌ها در شرایط سرد به آزمایشگاه انتقال یافتند و در همان روز مورد آزمون‌های میکروبی قرار گرفتند.

1. *B. anthracis*
2. *B. cereus*
3. *B. subtilis*
4. *B. macerans*
5. *B. polymyxa*

شمارش جمعیت اسپورداران هوازی

برای شمارش باکتری‌های اسپوردار هوازی *مزوفیل و ترموفیل*، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر همگن شده در بن‌ماری ۸۰ درجه سلسیوس تحت تیمار حرارتی قرار گرفت به‌نحوی که دمای مزبور به‌مدت ۱۰ دقیقه روی نمونه اعمال گردد (Lues et al., 2003). برای کنترل تیمار حرارتی مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه شیر به‌همراه دماسنج الکلی داخل آن، در بن‌ماری غوطه‌ور شد. مدت زمان ۱۰ دقیقه از هنگام رسیدن دمای نمونه شاهد به ۸۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. سپس با استفاده از لوله‌های سریال رقت، رقیق‌سازی از 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه و به‌صورت کشت مخلوط دو لایه در محیط Tryptic Soy Agar (TSA) حاوی ۰/۵ درصد (وزنی-حجمی) عصاره مخمر (Merck, Germany) کشت داده شد. برای شمارش باکتری‌های اسپوردار *مزوفیل* از دمای گرمخانه‌گذاری ۳۷ درجه سلسیوس و برای انواع ترموفیل از دمای ۵۰ درجه سلسیوس برای مدت ۲ تا ۳ روز استفاده گردید. جمعیت هر گروه از اسپورداران به‌طور جداگانه و طبق قوانین شمارش در استاندارد پلیت کانت محاسبه شد (Lues et al., 2003).

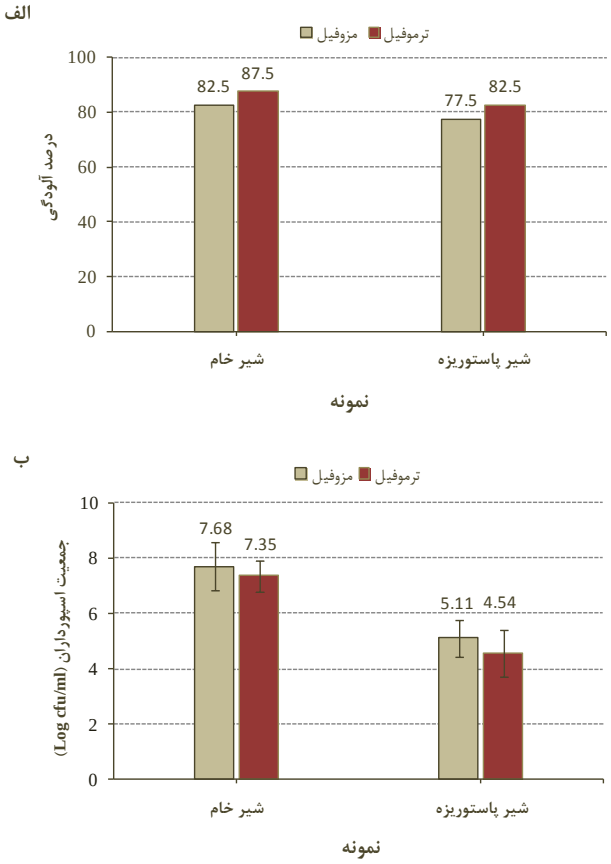
شناسایی افتراقی جدایه‌ها

از پرگنه‌های شمارش شده در محیط TSA که دارای مورفولوژی (شکل، اندازه، حاشیه و ارتفاع کلونی) متنوعی بودند برای تشخیص افتراقی استفاده شدند. برای این منظور ابتدا پرگنه مورد نظر در محیط Brain Heart Infusion (BHI) agar (Merck, Germany) به‌شکل خطی کشت و خالص‌سازی شدند. سپس بر روی جدایه‌های خالص شده آزمون‌های غربال‌گری نظیر رنگ‌آمیزی گرام، رنگ‌آمیزی اسپور و کاتالاز انجام گرفت. جدایه‌های باسیلی شکل، اسپوردار و کاتالاز مثبت برای آزمون‌های افتراقی انتخاب شدند. برای تشخیص تفریقی گونه‌های باسیلوس از آزمایش‌های زیر استفاده شد: طول سلول باکتریایی، موقعیت اندوسپور در سلول مادری، تورم سلول مادری توسط اندوسپور، رشد بی‌هوازی، رشد در حضور ۱۰ درصد نمک، اکسیداز، مصرف قندهای گلوکز، سلوبیوز، گالاکتوز، مانوز، ملیبیوز، رافینوز، سالیسین، زایلوز، ONPG، مصرف سیترات، اوره‌آز، ایندول، VP، احیای نیترات، هیدرولیز کازئین و نشاسته (Barrow and Feltham, 2003).

نتایج

در نمودار (۱) درصد نمونه‌های آلوده به اسپورداران هوازی *مزوفیل و ترموفیل* (الف) و کمیت آن‌ها (ب) در شیر خام و پاستوریزه نشان داده شده است. بر اساس این یافته‌ها، نمونه‌های شیر خام دارای درصد آلودگی تقریباً یکسانی از نظر اسپورداران *مزوفیل و ترموفیل* (به‌ترتیب ۸۲/۵ و ۸۷/۵ درصد) بودند؛ این‌حالت در نمونه‌های شیر پاستوریزه نیز مشاهده گردید و به‌ترتیب ۷۷/۵ و ۸۲/۵ درصد آلودگی به‌دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری (Chi-Sqaure) نتایج نشان داد که نمونه‌های آلوده به باکتری‌های اسپوردار هوازی در شیرهای خام و پاستوریزه از نظر درصد فراوانی، تفاوت معنی‌داری نداشتند. به‌علاوه یافته‌ها نشان دادند، میانگین جمعیت اسپورداران هوازی *مزوفیل* (۷/۶۸ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر) و *ترموفیل* (۷/۳۵ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر) در نمونه‌های شیر خام تفاوت غیرمعنی‌داری (Independent Sample t-Test) داشتند. همین حالت در نمونه‌های شیر پاستوریزه (به‌ترتیب ۵/۱۱ و ۴/۵۴ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر) نیز مشاهد گردید. البته جمعیت اسپورداران هوازی

درنمونه‌های شیر پاستوریزه نسبت به شیر خام به‌طور معنی‌داری (P< ۰/۰۱) کاهش یافت.

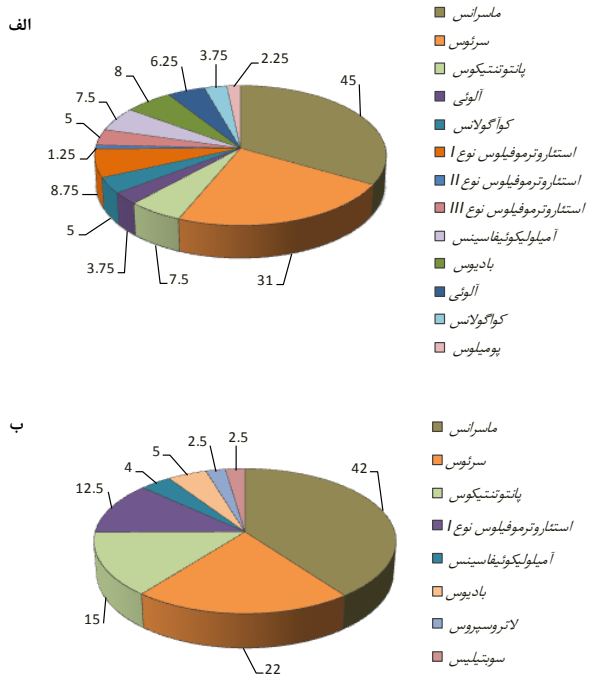


نمودار (۱)- درصد فراوانی (الف) و جمعیت (ب) باکتری‌های اسپوردار هوازی مزوفیل و ترموفیل (میانگین ± خطای معیار) در شیر خام و پاستوریزه

جدول (۱)- دامنه آلودگی (واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر) باکتری‌های اسپوردار هوازی مزوفیل و ترموفیل و تعداد و درصد نمونه‌های آلوده شیر خام و پاستوریزه

نوع نمونه	تعداد نمونه	دامنه آلودگی	تعداد (درصد) نمونه‌های آلوده	
			مزوفیل	ترموفیل
شیر خام	۸۰	<۲	۲ (۳/۰۳)	۱۰ (۱۴/۲۸)
		۲/۰۱-۴	۹ (۱۳/۶۴)	۱۴ (۲۰)
		۴/۰۱-۶	۲۹ (۴۳/۹۳)	۳۰ (۴۲/۸۶)
		۶/۰۱-۸	۱۹ (۲۸/۸)	۱۴ (۲۰)
		>۸	۷ (۱۰/۶)	۲ (۲/۸۶)
شیر پاستوریزه	۴۰	<۲	۱ (۳/۲۳)	۰ (۰)
		۲/۰۱-۴	۱۲ (۳۸/۷۱)	۱۳ (۳۹/۴)
		۴/۰۱-۶	۱۱ (۳۵/۴۸)	۱۴ (۴۲/۴۲)
		۶/۰۱-۸	۵ (۱۶/۱۳)	۴ (۱۲/۱۲)
		>۸	۲ (۶/۴۵)	۲ (۶/۰۶)

دامنه‌های متفاوتی از آلودگی با باکتری‌های اسپوردار هوازی در نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه به‌دست آمد (جدول ۱). دامنه تغییرات از ۲ > تا ۸ > واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر متغیر برآورد شد؛ اما بیشترین درصد نمونه‌های شیر خام و پاستوریزه دارای بار میکروبی عمدتاً در حدود ۶-۴/۰۱ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر ف.در آزمون افتراقی جدایه‌ها، گونه‌های متنوعی از باسیلوس یافت شدند (نمودار ۲). به این معنی که ۱۲ گونه باسیلوس در نمونه‌های شیر خام (الف) و ۸ گونه (ب) در نمونه‌های پاستوریزه شناسایی گردید. گونه‌های *ماسرانس*، *سرئوس*، *پانتوتنتیکوس*، *استئاروترموفیلوس* نوع I، *آمیلولیکوئیفاسینس* (*B. amyloliquefaciens*) و *بادیوس* (*B. badius*) از هر دو گروه از نمونه‌ها ردیابی شدند؛ در حالی‌که گونه‌های *استئارترموفیلوس* (*B. stearothermophilus*) نوع II و III، *آلوئی* (*B. alvei*)، *کواگولانس* (*B. coagulans*) و *پومیلوس* فقط از شیر خام و گونه‌های *لاتروسپروس* (*B. laterosporus*) و *سوبتیلیس* صرفاً از نمونه‌های شیر پاستوریزه جداسازی گردیدند.



نمودار (۲)- درصد فراوانی گونه‌های باسیلوس در شیر خام (الف) و پاستوریزه (ب)

بحث

باسیل‌های اسپوردار به‌عنوان آلوده‌کننده‌های بالقوه در صنایع مختلف مطرح می‌باشند، به‌ویژه در فرایندهایی که از درجه حرارت‌های بالا استفاده می‌شود. از آن جمله می‌توان به صنایع قند، خشک کردن سبزیجات، کنسروسازی و صنایع شیر اشاره نمود. با وجود این‌که اغلب گونه‌های باسیلوس بیماری‌زا نیستند اما با تولید اسید و آنزیم موجب تغییرات نامطلوب و در نتیجه بروز فساد در مواد غذایی می‌شوند. حضور باسیلوس‌ها در مواد

غذایی به نوعی نشانگر شرایط بهداشتی نامناسب می‌باشد (Burgess et al., 2010). در مطالعه اخیر، به‌طور میانگین ۸۵ درصد نمونه‌های شیر خام حداقل به یکی از گونه‌های باسیلوس آلودگی داشتند. هم‌چنین این نمونه‌ها حاوی ۰/۷۶ ± ۷/۵۱ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر از گونه‌های باسیلوس بودند. این موضوع حاکی از شیوع و کمیت بالای این گروه از باکتری‌ها در شیرهای خام منطقه آذربایجان‌شرقی است. در مطالعات مشابه بار میکروبی اسپورداران در شیر خام مورد بررسی قرار گرفته است. به‌طور مثال، در بررسی کیفیت میکروبی شیر خام در تانزانیا، میزان آلودگی به جنس باسیلوس‌ها به‌طور میانگین ۷/۰۸ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر گزارش گردید (Kivaria et al., 2006). هم‌چنین در بخشی از مطالعه مرادی خاتون‌آبادی و همکاران (۱۳۹۲)، جمعیت اسپورداران هوازی در سه مرکز جمع‌آوری شیر خام در استان گلستان بررسی گردید. یافته‌ها حاکی از وجود بار میکروبی بیش از ۴ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر بود که در مقایسه با استانداردهای ملی و بین‌المللی سطح بالاتری از آلودگی را به اسپورهای هوازی و به‌ویژه *باسیلوس سرئوس* داشتند. ایشان شرایط بهداشتی دامداری‌های سنتی و صنعتی را در میزان بار میکروبی شیرخام تأثیرگذار می‌دانستند اظهار داشتند که و کاهش یا عدم دریافت شیرخام از دامداری‌های سنتی بر ویژگی‌های شیر خام تأثیر مثبتی داشته است. با توجه به این‌که بخش اعظم شیر خام منطقه آذربایجان‌شرقی در دامداری‌های سنتی تولید می‌شود و در این نوع از سیستم دامداری شیردوشی به‌صورت دستی انجام می‌گیرد، لذا شرایط بهداشتی به‌طور مؤثر رعایت نمی‌گردد (Hanifian and Khani, 2016).

نتایج مطالعه اخیر نشان داد، درصد فراوانی اسپورداران هوازی *مزوفیل و ترموفیل* در شیرهای پاستوریزه نسبت به شیر خام، ۵ درصد کاهش داشته است که از نظر آماری غیرمعنی‌دار بود؛ در حالی‌که جمعیت اسپورداران هوازی *مزوفیل و ترموفیل* در شیرهای پاستوریزه به‌ترتیب کاهش ۲/۵۷ و ۲/۸۱ واحد لگاریتمی (کاهش تقریبی ۶۰۰ برابری) نشان دادند ($P< ۰/۰۱$). این کاهش می‌تواند در نتیجه شوک حرارتی فرایند پاستوریزاسیون و در نتیجه رویا شدن تعداد از اسپورها باشد. فرم رویای باسیلوس‌ها در طی تیمار حرارتی مورد استفاده در شمارش اختصاصی اسپورداران (۸۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه) غیرفعال شده و در نتیجه موجب کاهش چشمگیر جمعیت آن‌ها شده است. با این وجود، حضور مقادیر بالای (۵/۱۱ و ۴/۵۴ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر انواع مزوفیل و ترموفیل) اسپورداران شیرهای پاستوریزه نشان‌دهنده عدم رفع مشکل موجود به‌رغم اعمال تیمار پاستوریزاسیون می‌باشد. بقای اسپور باسیلوس‌ها و رویا شدن آن‌ها در محصولات حرارت‌دیده می‌تواند پیامدهایی به‌دنبال داشته باشد. گونه‌های سرماگرای باسیلوس در دماهای ۷ درجه سلسیوس رشد نموده و عوارض متعددی ایجاد می‌کنند. به‌طور مثال برخی سویه‌های *باسیلوس سرئوس* با تولید آنزیم لیسیتیناز، لیستین غشای گلبول‌های چربی را به دی‌گلیسیرید و فسفوریل کولین هیدرولیز می‌کنند که نتیجه آن تجمع نامطلوب چربی‌های شیر می‌باشد. در ادامه کولین به تری‌متیل‌آمین تجزیه شده که موجب حالت نامطلوب «بوی ماهی»[6] می‌گردد. علاوه بر این، عوارض دیگری از جمله لخته شیرین[7] و بوی نامطبوع توسط سویه‌های *باسیلوس سرئوس* در شیر ایجاد می‌شود (Walstra et al., 1999). گونه‌های مولد گاز نظیر *ماسرانس* و *پلی‌میکسا* با تولید گاز زیاد موجب بادکردگی شیر و پنیر می‌گردند (Jay et al., 2005).در مطالعه حاضر علاوه بر ردیابی جمعیت بالای باسیلوس در شیر خام و پاستوریزه، گونه‌های متنوعی از این جنس نیز جداسازی و شناسایی گردید. در این میان گونه‌های *ماسرانس* و *سرئوس* بیشترین فراوانی را در نمونه‌های شیر خام (به‌ترتیب ۴۵ و ۳۱ درصد) و پاستوریزه (به‌ترتیب ۴۲ و ۲۲درصد) داشتند و پس از آن‌ها گونه‌های

6.Fishy smell
7.Sweet culdling

پانتوتنتیکوس، *استئاروترموفیلوس* نوع I، II و III، *آمیلولیکوئیفاسینس*، *بادیوس*، *آلوئی*، *کواگولانس* و *پومیلوس* با فراوانی کم‌تر جداسازی شدند. نکته جالب توجه حضور گونه‌های *لاتروسپروس* و *سوبتیلیس* (هر دو با فراوانی ۲/۵ درصد) در نمونه‌های شیر پاستوریزه بودند. چرا که گونه‌های مزبور در هیچ‌یک از نمونه‌های شیر پاستوریزه یافت نشدند. در نتیجه ممکن است گونه‌های *لاتروسپروس* و *سوبتیلیس* از طریق محیط کارخانه و یا از را تجهیزات فرآوری و بسته‌بندی دچار آلودگی ثانویه شده باشند. در این زمینه بررسی‌های مشابه متعددی صورت پذیرفته است که در مجموع اسپورداران هوازی متفاوتی از شیر و فرآورده‌های آن جداسازی شده است. برای مثال در یک بررسی در آمریکا *باسیلوس لیشنی‌فورمیس* به‌طور میانگین از ۵۶ درصد شیرهای خام جداسازی گردید و گونه غالب محسوب می‌شد. گونه‌های *سوبتیلیس*، *سونورنسیس* (*B. sonorensis*) و *پومیلوس* به‌ترتیب از ۹/۴، ۸/۲ و ۱۰/۸ درصد نمونه‌ها، جداسازی شد (Buehner et al., 2014). در مطالعه دیگری جنس باسیلوس در ۶۸/۹ درصد نمونه‌های شیر خام ردیابی شد که در این بین گونه *لیشنی‌فورمیس* بالاترین فراوانی را داشت. هم‌چنین اختلاف چشم‌گیری بین جنس‌ها و گونه‌های جداسازی شده از شیر خام، مشتقات شیر و محیط کارخانجات فرآوری محصولات لبنی به‌دست آمد (Miller et al., 2015). در مطالعه‌ای که از توالی 16S rRNA برای برررسی تنوع گونه‌ای اسپورداران هوازی در شیرهای پاستوریزه استفاه گردید، مشخص شد که اکثریت جدایه‌ها مربوط به جنس باسیلوس بودند و در ۹۷ درصد نمونه‌ها گونه‌های *لیشنی‌فورمیس*، *پومیلوس*، *سیرکولانس* (*B. circulans*)، *سوبتیلیس* و *سرئوس* ردیابی شدند (Coorevits et al., 2008). با توجه به تفاوت یافته‌های مطالعات فوق می‌توان به این نتیجه‌گیری رسید که تنوع گونه‌ای اسپورداران به‌طور اعم تحت تأثیر جمعیت میکروبی هر منطقه، راه‌های متنوع آلودگی شیر خام و محصولات آن و احتمالاً روش‌هایی است که برای جداسازی و شناسایی اسپورداران هوازی مورد استفاده قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، میزان آلودگی، کمیت آلودگی و تنوع گونه‌ای اسپورداران هوازی در شیرهای خام و پاستوریزه مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد درصد بالایی از شیرهای خام آلوده به اسپورداران هوازی *مزوفیل و ترموفیل* بودند. با این توضیح که شدت آلودگی در نمونه‌های شیر خام بسیار متغیر (کمتر از ۲ تا بیش‌تر از ۸ واحد لگاریتمی در هر میلی‌لیتر) برآورد گردید. با توجه به این‌که شیر منطقه آذربایجان اغلب در دامداری‌های سنتی تولید می‌گردد لذا امکان آلودگی‌های محیطی (از طریق دست افراد شیردوش، ظروف، گرد و غبار حاصل از علوفه و محیط دامداری) در این حالت به حداکثر می‌رسد؛ در حالی‌که در گاوداری‌های صنعتی با رعایت شرایط بهداشتی هنگام آماده‌سازی حیوان برای شیردوشی و هم‌چنین پس از شیردوشی و حمل و نقل شیر خام، شدت آلودگی به حداقل می‌رسد. اختلاط این نوع شیرها در مجموع موجب کاهش کیفیت میکروبی شیر دریافتی در کارخانه می‌گردد. بالا بودن جمعیت اسپورداران در شیر خام دریافتی موجب شده است که به رغم پاستوریزاسیون، هنوز جمعیت‌های بالایی از این گروه از باکتری‌ها قابل ردیابی باشند. این اسپورداران در صورت فعال شدن، علاوه بر ایجاد عوارض نامطلوب، ممکن است موجب مخاطرات بهداشتی برای مصرف‌کنندگان گردند. جداسازی گونه‌های باسیلوس متفاوت از انواع ردیابی شده در شیر خام، بیانگر ضرورت رعایت موازین بهداشتی در محیط کارخانه می‌باشد تا از ورود گونه‌های محیطی و احتمالاً خطرناک به محصولات حرارت‌دیده پیشگیری شود.

سپاس‌گزاری
این مطالعه در قالب پایان نامه کارشناسی‌ارشد و با استفاده از امکانات آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی دانشکده‌های کشاورزی و دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز و حمایت مالی بخش تحقیق و توسعه کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان‌شرقی انجام گرفت.

منابع

۱. مرادی خاتون‌آبادی، ژیلا؛ مقصودلو، یحیی؛ عزت‌پناه، حمید؛ خمیری، مرتضی؛ امین‌افشار، مهدی (۱۳۹۲). میزان حضور *باسیلوس سرئوس* در شیر خام دریافتی کارخانجات تولیدکننده پنیر فراپالایش. مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی انجمن علمی بهداشت محیط ایران، دوره ششم ، شماره چهارم، صفحه ۵۵۶-۵۴۵.

2. Barrow, G. and Feltham, R. 2003. Cowan and Steels Manual for the Identification of Medical Bacteria, 3rd Edition, Cambridge University Press, pp. 87–88.

3. Bennet, R.W. and Belay, N. 2001. *Bacillus cereus*, In: Pouch Downes, F., Ito, K. (eds.), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd Edition, American Public Health Association, Washington DC, pp. 311–316.

4. Buehner, K.P., Anand, S., Djira, G.D. and Garcia, A. 2014. Prevalence of thermoduric bacteria and spores on 10 Midwest dairy farms. J Dairy Sci. 97(11): 6777–6784.

5. Burgess, S.A., Lindsay, D. and Flint, S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. Int J Food Microbiol. 144: 215–225.

6. Chambers, J.V. 2002. The Microbiology of Raw Milk. In: Robinson R.K. (ed.), Dairy Microbiology Handbook. 3rd Edition, John Wiley & Sons, Inc., pp. 50–58.

7. Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., and Heyndrickx, M. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. Syst Appl Microbiol. 31: 126–140.

8. Hanifian, S. and Khani, S. 2016. Tracking of *Mycobacterium avium paratuberculosis* load in milk poduction chain: a real-time qPCR and culture assay. J. Food Saf. 36: 136–141.

9. Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th Edition, Springer Science+Bussiness Media Inc. p. 169.

10. Kivaria, F., Noordhuizen, J.P.T.M. and Kapaga, A. 2006. Evaluation of the hygienic quality and associated public health hazards of raw milk marketed by smallholder dairy producers in the Dar es Salaam region, Tanzania. Trop Anim Health Prod. 38: 185–194.

11. Lues, J.F.R., Venter, P. and van der Westhuizen, H. 2003. Enumeration of potential microbiological hazards in milk from a marginal urban settlement in central South Africa. Food Microbiol. 20: 321–326.

12. Miller, R.A., Kent, D.J., Watterson, M.J., Boor, K.J., Martin, N.H. and Wiedmann, M. 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. J Dairy Sci. 98: 8492–8504.

13. Rajkowski, K.T. and Bennett, R.W. 2003. *Bacillus cereus*. In: International Handbook of Foodborne Pathogens. Miliotis, M.D., Bier, J.W., (eds.), Marcel Dekker Inc., pp. 27–39.

14. Walstra, P., Guerts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., and van Buekel, M.A.J.S. 1999. Dairy Technology: Priciples of Milk Properties and Processess. Marcel Dekker, Inc., pp 149–168.

Aerobic spore-forming bacteria in raw and pasteurized milks of East-Azarbaijan area: occurrence, quantity and diversity

Maryam Jabbarpour Sattari[1], Jalal Shayegh[2*], Shahram Hanifian[3]

1. M. Sc Graduate, Department of Biology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

2. Department of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

3. Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

[*]**Corresponding Author**: *jalal_shayegh@iaushab.ac.ir*

Received : 5 Aprill 2016 Accepted : 20 October 2016

Abstract

Growth and proliferation of spore-forming bacteria cause food spoilage or may contribute in foodborne illness through the production of toxins. Aerobic spore-formers are widely distributed in nature and are of greater concern in dairy industry. The aim of this study was to investigate the occurrence, quantity and diversity of spore-forming bacteria in raw and pasteurized milks of East-Azarbaijan area. For this reason, 80 raw milks and 40 pasteurized milk samples were randomly obtained and the populations of mesophilic together with thermophilic spore-formers were estimated. The diversity of the enumerated colonies was determined using routine biochemical assays. According to the results, the occurrence of mesophilic and thermophilic spore-formers in raw milks was 82.5% and 87.5%, and for the pasteurized milk samples it was 77.5% and 82.5%, respectively. Results revealed remarkable loads of spore-formers (ranged 2-8 log cfu/ml) both in raw and pasteurized milks. Moreover, 12 and 8 Bacillus species were identified in raw and pasteurized milks, respectively; amongst *B. macerans* and *B. cereus* were the major species which accounted for the overall 76% and 64% of the isolates in raw and pasteurized milk samples, respectively. Results revealed that contamination of milk via environmental sources could be the main reason for the presence of high loads of spore-forming bacteria, so that pasteurization process was not appreciably efficient. It was concluded that the presence of toxin-producing species in pasteurized milks could be considered as a health hazard for the consumers.

Keywords: spore-forming bacteria, raw milk, pasteurized milk, diversity.