مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۹ شماره ۲/ سال ۱۳۹۸/ صفحات ۱۷ تا ۲۸

میزان آلودگی، تنوع گونه‌ای و قابلیت تولید بیوفیلم کلی‌فرم‌های جدا شده از بیوفیلم مخازن حمل شیر خام و تجهیزات فرآوری محصولات شیر

شلاله زاهدی‌نیا[۱] و شهرام حنیفیان[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۳۰

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[۲]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
*مسئول مکاتبه: Email: hanifian@iaut.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: کلی‌فرم‌ها گروه مهمی از خانواده *انتروباکتریاسه* هستند که ۱۰٪ از جمعیت میکروبی روده را تشکیل می‌دهند و اکثراً بیماری‌زا نیستند. آزمون‌های میکروبی مرتبط با جستجو و شمارش کلی‌فرم به‌صورت وسیع در صنایع شیر به‌عنوان میکروارگانیسم‌های شاخص جهت نشان دادن خطای فرآیند، بهداشت محیط و آلودگی ثانویه در محصول استفاده می‌شوند. **هدف:** این مطالعه با هدف بررسی میزان آلودگی و تنوع گونه‌ای کلی‌فرم‌ها در بیوفیلم مخازن حمل و نگهداری شیر خام و تجهیزات فرآوری محصولات شیر انجام گرفت. هم‌چنین قابلیت تولید بیوفیلم هر یک از جدایه‌های کلی‌فرمی ارزیابی گردید. **روش کار:** برای این منظور تعداد ۸۰ نمونه شامل ۳۰ نمونه از مخازن حمل و نگه‌داری شیرخام، ۳۰ نمونه از تجهیزات فرآوری محصولات لبنی و ۲۰ نمونه از سطوح مختلف سالن تولید نمونه‌گیری شد. **نتایج:** با توجه به نتایج حاصل مشخص گردید که ۸/۷۵٪ کل نمونه‌ها آلوده به کلی‌فرم‌ها بودند. بالاترین میزان فراوانی مربوط به جنس‌های انتروباکتر و کلبسیلا با ۳۱/۲۵٪ و کم‌ترین میزان فراوانی مربوط به سیتروباکتر با ۱۲/۵٪ به‌دست آمد. نتایج الایزا نشان داد از ۱۶ جدایه شناسایی شده، ۸۷/۵٪ قابلیت تولید بیوفیلم دارند و فقط ۲ (۱۲/۵٪) جدایه *اشریشیا کولای* فاقد این توانایی بودند. **نتیجه‌گیری نهایی:** در مجموع می‌توان گفت وجود آلودگی بالای کلی‌فرمی در کف سالن و تسمه نقاله‌ها، نشان دهنده پتانسیل بالای این مکان‌ها برای آلوده کردن فرآورده‌های شیر است و نیاز به استفاده از رویکردی جدید برای رفع این مشکل وجود دارد.

واژگان کلیدی: کلی‌فرم‌ها، بیوفیلم، مخازن شیر خام، تجهیزات فرآوری شیر

مقدمه

کلی‌فرم‌ها متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه*، باسیلی شکل، بی‌هوازی اختیاری با اپتیمم دمای رشد ۳۷ درجه سلسیوس، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و با توانایی تخمیر لاکتوز و تولید اسید و گاز از آن می‌باشند (رضویلر ۲۰۰۲؛ اِدن ۲۰۱٤). اصطلاح کلی‌فرم برای باکتری‌های باسیلی، گرم منفی و فرمانتاتیو گفته می‌شود که به‌صورت فراوان در مدفوع حیوانات

خونگرم یافت می‌شوند هرچند کلی‌فرم‌ها به‌راحتی قابل تشخیص می‌باشند، ولی نمی‌توان به‌طور قطعی حضور آن‌ها را شاخصی برای آلودگی به مدفوع دانست؛ زیرا تعدادی از کلی‌فرم‌ها به‌طور طبیعی در محیط، آب، خاک و در سبزی‌ها یافت می‌شوند (ابرهارت ۱۹۷۷؛ پاتل و همکاران ۲۰۱٤؛ ادن ۲۰۱٤). کلی‌فرم‌ها شامل جنس‌های انتروباکتر، سیتروباکتر، کلبسیلا و اشریشیا می‌باشند. این میکروارگانیسم‌ها اساساً بیماری‌زا نیستند، اما برخی از گونه‌های *اشریشیا کولای* مولد بیماری‌اند (رضویلر ۲۰۰۲؛ ادن ۲۰۱٤). *اشریشیا کولای* سروتیپ $O_{157}:H_7$ یکی از عوامل اصلی ایجادکننده عفونت غذایی و بیماری‌هایی نظیر اسهال خفیف، کولیت خونریزی‌دهنده، سندرم همولیتیک‌اورمیک و مرگ در انسان است (شکرفروش و همکاران ۲۰۰۷؛ جمشیدی و همکاران ۲۰۰۸؛ سولوماکوس و همکاران ۲۰۰۸). کلی‌فرم‌های مدفوعی عمدتاً شامل سویه‌های *اشریشیا کولای* است اما بعضی از باکتری‌های روده‌ای هم‌چون کلبسیلا نیز می‌تواند جزو کلی‌فرم‌های مدفوعی تلقی شود (ریپی و همکاران ۱۹۸۷؛ گرنت ۱۹۹۷). معمولاً پس از پاستوریزاسیون جمعیت کلی‌فرم‌ها به صفر می‌رسد و در مواقعی، چند عدد کلی‌فرم در شیر پاستوریزه مشاهده می‌گردد، که احتمالاً عوامل مؤثر شامل ناکافی بودن فرآیند حرارتی، آلودگی ثانویه، شستشوی ناکافی تانک‌های ذخیره و غلظت نامناسب سود و اسید باشد. این میکروارگانیسم‌ها از طریق نوک پستان، سطوح خارجی پستان، تجهیزات حمل‌ونقل و شیردوشی، تانک‌های حمل شیر، به شیرخام منتقل می‌شوند و در اثر فرآیند پاستوریزاسیون غیرفعال می‌گردند، بنابراین حضور آن‌ها در شیر پاستوریزه شاخصی از آلودگی پس از فرآیند می‌باشد (فلاح و همکاران ۲۰۱۱).

به‌دلیل پراکندگی بالای کلی‌فرم‌ها در طبیعت و بدن حیوانات، آلودگی شیر توسط این میکرواورگانیسم‌ها بسیار محتمل است. برخی از جنس‌های کلی‌فرم علاوه بر ایجاد فساد در فرآورده‌های شیر، بیماری‌زای انسانی نیز هستند. در بخش‌هایی از کارخانه که فاقد وضعیت بهداشتی مناسبی می‌باشد، تعداد اولیه این ارگانیسم‌ها بسیار بالاست و همین امر احتمال ورود آن‌ها را به فرآورده‌های شیر افزایش می‌دهد. بسیاری از کلی‌فرم‌ها آنزیم‌های خارج سلولی تولید می‌کنند و در اثر تخریب ترکیبات تشکیل‌دهنده شیر، ماندگاری فرآورده‌های شیر را کاهش می‌دهند. از طرفی، این میکروب‌ها قابلیت چسبیدن و تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح مختلف را دارند و در نتیجه مقاوم شدن در برابر عوامل ضدمیکروبی و ضدعفونی کننده‌ها، به یک معضل بهداشتی در صنایع شیر تبدیل شده‌اند (فولادی‌نژاد و همکاران ۲۰۱۳؛ رودریگز و همکاران ۲۰۱۰).

بیوفیلم به تجمع میکروارگانیسم‌هایی گفته می‌شود که به سطوح متصل شده و رشد می‌کنند. مراحل تشکیل بیوفیلم شامل اتصال اولیه؛ اتصال غیرقابل برگشت؛ توسعه اولیه ساختار بیوفیلم؛ تکمیل ساختار و پخش شدن میکروارگانیسم‌هاست (کومار و همکاران ۱۹۹۸؛ سری و همکاران ۲۰۱۳). شکل‌گیری و توسعه بیوفیلم تحت تأثیر عوامل متعددی از نظیر جنس و گونه باکتری، ویژگی سطوح، پارامترهای زیست‌محیطی مانند pH، غلظت مواد مغذی و درجه حرارت رشد می‌باشد (مکدوناگ ۱۹۹٤). ساختار بیوفیلم طوری است که باکتری را در برابر تنش‌های محیطی حفاظت می‌کند به گونه‌ای که سلول‌های بیوفیلم در مقابل عوامل ضدمیکروبی در مقایسه با باکتری پلانکتونی (منفرد) مقاوم‌تر هستند زیرا دارای حفاظ خوبی از انواع میکروب‌ها هستند که موجب جلوگیری یا کاهش تماس با عوامل ضدمیکروبی می‌شود (رندیولیز و همکاران ۲۰۱۳). در نتیجه بیوفیلم در صنایع شیر، فرآوری ماهی، مرغ، گوشت و غذاهای آماده به یک مشکل اساسی تبدیل شده است (مکدوناگ ۱۹۹٤). تشکیل بیوفیلم علاوه بر داشتن تبعات بهداشتی، از طریق مسدودکردن لوله‌ها در مبدل‌های حرارتی و برج‌های خنک‌کننده در کارخانجات فرآوری محصولات شیر،

میزان انتقال حرارت را به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد و نیز سبب تجزیه و پوسیدگی غشاهای فراپالایش مورد استفاده در تولید پنیر و اسمز معکوس می‌شود (کومار و همکاران ۱۹۹۸). در مطالعات انجام شده، باکتری‌های متنوعی نظیر سودوموناس، آیروموناس، استافیلوکوکوس، باسیلوس‌ها، باکتری‌های لاکتیکی، خانواده انتروباکتریاسه و لیستریا، از نظر تولید بیوفیلم در بخش‌های مختلف کارخانه‌های فرآورده شیر، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. بر اساس یافته‌های این مطالعات، مخازن حمل شیر خام، تانک بالانس، دستگاه هواگیر، شیرآلات و دریچه‌ها، قسمت‌های لاستیکی تجهیزات، غشاهای فراپالایش و دستگاه‌های پرکن مهم‌ترین بخش‌هایی بودند که آلودگی بیوفیلم میکروبی داشتند (ویتانن و سالو ۲۰۰٤؛ تیکسیرا و همکاران ۲۰۰۵؛ آگاروال و همکاران ۲۰۰٦؛ گوندوز و تونجل ۲۰۰٦). باکتری‌های روده‌ای و کلی‌فرم‌ها بیشتر در آب آشامیدنی و سیستم لوله‌کشی آب شهری مورد بررسی قرار گرفته است (فارکاس همکاران ۲۰۱۳a؛ فارکاس و همکاران ۲۰۱۳b). مطالعات داخلی بر روی بیوفیلم کلی‌فرم‌ها نشان داد ۹۸ درصد نمونه پنیر تازه لیقوان حداقل به یک نوع از کلی‌فرم‌ها آلوده بودند. میزان آلودگی نمونه‌ها به *اشریشیا کولای* ۵۰٪، پروتئوس ٪۱۵، سالمونلا ۱۲٪، سیتروباکتر ٪۹، کلبسیلا ٪٦ و انتروباکتر ٪۱ به‌دست آمد (وزیری و نقشبندی ۲۰۱۱). یک تحقیق تجربی نشان داد *اشریشیا کولای* سروتیپ O_{111} توانایی تولید بیوفیلم و چسبیدن به سطوح استیل ضدزنگ و پلاستیکی را دارد (موثق غازانی و همکاران ۲۰۰۷).

پراکندگی بالای کلی‌فرم‌ها در محیط کارخانجات فرآوری شیر و توانایی تشکیل بیوفیلم توسط این ارگانیسم‌ها بر روی سطوح تجهیزات فرآوری، بسته‌بندی و نگه‌داری موادغذایی، اهمیت این گروه از باکتری‌ها را بیشتر آشکار می‌سازد. هدف این مطالعه بررسی میزان آلودگی و تنوع گونه‌ای کلی‌فرم‌ها در تانکرهای حمل شیرخام و تجهیزات فرآوری و نگه‌داری فرآورده‌های شیر و قابلیت کلی‌فرم‌ها در تشکیل بیوفیلم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌گیری و کشت

نمونه‌برداری از یکی از کارخانه‌های فرآوری شیر و فرآورده‌های آن واقع در استان آذربایجان‌شرقی و 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 لبنی (خطوط تولید شیر پاستوریزه، شیر استریل، 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 در محل (CIP) مخازن و تجهیزات بر اساس دستورالعمل تعریف شده برای این کار (جدول ۱)، نمونه‌ها با استفاده از برس سیمی استریل و به‌صورت مکانیکی از روی سطوح تراشیده شد و پس از انتقال به سرم رینگر استریل، در ٤ °C به آزمایشگاه انتقال یافتند (پرسیوال و همکاران ۲۰۱٤).

نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه با دور ٤۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و رسوب حاصله در محیط ویولیت رد بایل آگار (Scharlau, Spain)، به‌صورت پورپلیت کشت داده شد و در دمای ۳۷ °C به‌مدت ٤۸-۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. کلونی‌های به‌دست آمده تحت آزمون‌های غربال‌گری و تأییدی قرار گرفتند (رضویلر، ۲۰۰۲).

شکل ۱- نحوه نمونه‌گیری از تجهیزات فرآوری شیر

Figure 1- Sampling from milk processing equipments

جدول ۱- نحوه انجام (شرایط دمایی و زمانی) CIP

Table 1. Instructions (temperature and time) applied for CIP

Step	Temperature (°C)	Time (min)
Pre-rinsing	20	10
Alkali cleaning	70	30
Rinsing	20	10
Acid cleaning	60	30
Post-rinsing	20	10
Hot water rinse	90	10

جدول ۲- آزمون‌های تشخیص تفریقی گونه‌های کلی‌فرم

Table 2- Coliforms differentiation tests

Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Motility	+	d	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	d	+	+
MacConkey agar	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+
Simmons' Citrate	−	-	d	-	-	+	+	d	+	-	+	+	+	+	+	+
KCN	+	-	-	+	-	+	+	d	d	d	+	+	-	+	-	+
H_2S in TSI	−	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MR (37°C)[a]	+	+	+	+	+	d	d	+	+	+	+	+	+	d	+	-
MR (18-22°C)[b]	+	+	d	+	+	d	d	+	+	+	+	-+	+	-	-	-
VP (37°C)[a]	−	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	d	-	d
VP (18-22°C)[b]	−	-	-	-	-	d	d	-	-	-	-	-	-	d	d	d
Indole	+	+	d	+	-	+	-	-	-	-	+	d	+	-	-	-

1. *Escherichia adecarboxylata*
2. *Escherichia coli*
3. *Escherichia fergusonii*
4. *Escherichia hermanii*
5. *Escherichia vulneris*
6. *Klebsiella oxytoca*
7. *Klebsiella pneumoniae*
8. *Klebsiella pneumoniae ozaenae*
9. *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*
10. *Klebsiella pneumoniae rhinoscleromatis*
11. *Citrobacter amalonaticus*
12. *Citrobacter freundii*
13. *Citrobacter aerogenes*
14. *Enterobacter cloacae*
15. *Enterobacter giorgione*
16. *Enterobacter sakazakii*

[a] incubation for 2 days

[b] incubation for 2 days

[d] 16%-84% of the strains are +

آزمون‌های غربال‌گری و افتراقی

ابتدا چند پرگنه با خصوصیات ظاهری متفاوت در محیط کشت عصاره قلب و مغز (Merck, Germany) به‌صورت خطی کشت داده شدند تا ضمن احیای باکتری در یک محیط عمومی، از خالص بودن کشت‌ها اطمینان حاصل شود (کورناکی و جانسون ۲۰۰۱). در ادامه

رنگ‌آمیزی گرم و آزمون‌های کاتالاز و اکسیداز بر روی جدایه‌ها صورت گرفت. برای تشخیص افتراقی گونه‌های کلی‌فرم از آزمون‌های بیوشیمیایی مطابق با جدول ۲ استفاده شد (کوان و همکاران ۲۰۰٤).

قابلیت تولید بیوفیلم

برای تعیین مقدار تولید بیوفیلم تولید شده توسط جدایه‌ها، از تکنیک «*ارزیابی کمی در میکروپلیت*» و مطابق با روش سری و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد. بر اساس این روش جدایه‌ها ابتدا در محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر (Merck, Germany) به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ °C تجدید کشت گردیدند. مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۲ درصد ساکارز و ۲ درصد گلوگز به هر گوده میکروپلیت انتقال داده شد و ۱۰ میکرولیتر از کشت تازه جدایه‌ها در هر گوده تلقیح گردید. برای نمونه‌های شاهد منفی از ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت استریل استفاده شد. تمامی جدایه‌ها و هم‌چنین نمونه شاهد منفی در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. میکروپلیت در دمای ۳۷ °C به‌مدت ٤۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس محتویات آن‌ها تخلیه و ۳ مرتبه با ۲۵۰ میکرولیتر آب یون‌زدایی شده (Deionized water) شستشو داده شدند. برای تثبیت بیوفیلم در داخل گوده‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد به هر گوده اضافه و پس از ۱۵ دقیقه، تخلیه و در دمای آزمایشگاه خشک گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به هر گوده اضافه و بعد از ۵ دقیقه آب‌کشی و در شرایط محیطی خشک شد. کریستال‌ویوله باقیمانده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اسیداستیک ۳۳ درصد به هر گوده حل شد و شدت رنگ ایجاد شده با دستگاه الایزا در طول موج ٤۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و نتایج میزان تولید بیوفیلم با استفاده از الگوی جدول ۳ تفسیر گردید (رودریگز و همکاران ۲۰۱۰).

جدول ۳- میزان جذب نوری اندازه‌گیری شده با الایزا و میزان تولید بیوفیلم در جدایه‌های کلی‌فرم

Table 3- Optical density (OD) measured by ELISA and biofilm production by coliform isolates

OD_{492}*	Biofilm production amount
$OD_X \leq OD_T$	negative
$OD_T < OD_X \leq 2OD_T$	low
$2OD_T < OD_X \leq 4OD_T$	medium
$OD_X > 4OD_T$	high

* OD_x and OD_T are optical density of the control and tested samples, respectively.

نتایج و بحث

تعداد موارد آلودگی و تنوع باکتریایی در نمونه‌های آلوده در بین نمونه‌های مختلف در جدول ٤ نشان داده شده است. بر این اساس، از ۸۰ نمونه اخذ شده از محل‌های مختلف، ۷ نمونه (۸/۷۵٪) آلوده به جنس کلی‌فرم‌ها بودند. بیش‌ترین میزان آلودگی از نمونه‌های محیطی و سطوح مختلف سالن تولید به‌دست آمد.

نکته قابل‌توجه در ارتباط با میزان آلودگی کلی‌فرمی در نمونه‌های مختلف، عدم وجود آلودگی در تجهیزات فرآوری محصولات شیر بود. با توجه به این‌که در مطالعه حاضر نمونه‌برداری بعد از CIP انجام گرفت، لذا عدم وجود آلودگی کلی‌فرم در تجهیزات نشان‌دهنده کفایت CIP در برطرف کردن این نوع از آلودگی کلی‌فرمی از تجهیزات می‌باشد. با این‌حال در سایر نمونه‌ها از جمله کف سالن تولید، سطح تسمه نقاله و زانوی خروجی تانک حمل شیرخام موارد آلودگی یافت شد. در تحقیقات انجام شده بر روی بیوفیلم باکتری‌های خانواده روده‌ای در کارخانه‌جات شیر، بیوفیلم‌ها در مناطقی مانند تانک بالانس، تسمه نقاله و تانک‌های حمل شیر خام یافت گردید (ویرتانن و ماتیلاساندهولم ۱۹۹۲؛

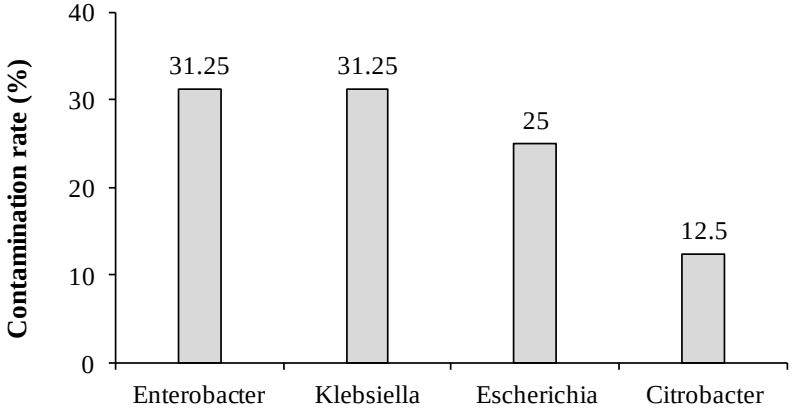
تیکشرا و همکاران ۲۰۰۵). در مورد سایر باکتری‌ها، موارد متعددی از آلودگی با سودوموناس (روسی و همکاران ۲۰۱۸)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (تیران و همکاران ۲۰۱۸) و کرونوباکتر (گوپتا و همکاران ۲۰۱۸) در صنایع شیر گزارش شده است.

بر اساس نتایج آزمون‌های افتراقی، ۱۶ جدایه به‌دست آمده متشکل از ٤ گونه متنوع بودند. بیش‌ترین فراوانی مربوط به جنس‌های انتروباکتر و کلبسیلا و کم‌ترین میزان فراوانی مربوط به سیتروباکتر بود (شکل ۲).

جدول ۴- تعداد نمونه، فراوانی موارد مثبت و تنوع گونه‌ای کلی‌فرم‌ها به تفکیک محل‌های نمونه‌گیری

Table 4- Number of samples, frequency and diversity of the positive samples from different sampling places

Sampling place	No. of samples	No. (%) of positive samples	Diversity
Raw milk tanks	30	1 (3.33%)	3
Processing and packaging equipments	30	0 (0%)	0
Surfaces of production line	20	6 (30%)	13



شکل ۲- میزان آلودگی ایجاد شده توسط هر یک از جنس‌های کلی‌فرمی

Figure 2- Contamination rate caused by each of the coliforms bacteria

در بررسی حاضر، با وجود این‌که فقط تعداد محدودی (۸٪/۷۵) از نمونه‌ها آلوده به کلی‌فرم بودند، اما گونه‌های متنوعی از کلی‌فرم‌ها جداسازی و تشخیص داده شدند. انتروباکتر و کلبسیلا با ۳۱/۲۵٪، اشریشیا با ۲۵٪، و سیتروباکتر با ۱۲/۵٪ یافت شدند. در همین راستا تحقیقی در آمریکا بر روی تانک‌های حمل شیر خام انجام شد و از مجموع ۱۳۰ نمونه آزمایش شده، ۷۷ نمونه دارای آلودگی کلی‌فرمی بود و سهم هر یک از کلی‌فرم‌های شناسایی شده به‌ترتیب کلبسیلا ۳٦/٤٪، انتروباکتر ۳۲/۵٪، اشریشیا ۲۲/۱٪ و سیتروباکتر ۹٪ گزارش شد (جایریو و وانگ ۱۹۹۹). نکته قابل‌توجه شباهت زیاد نتایج دو مطالعه از نظر تنوع جنس‌های کلی‌فرمی و درصد فراوانی آن‌ها می‌باشد. بالا بودن فراوانی جنس کلبسیلا ممکن است به‌دلیل قابلیت تولید کپسول توسط این باکتری و در نتیجه سهولت اتصال آن به سطوح و تشکیل بیوفیلم باشد (رضویلر ۲۰۰۲؛ گوندوگان ۲۰۱٤). در مطالعه دیگری غشای UF مورد استفاده در صنایع شیر، به‌صورت تجربی با تعداد ۷ واحد لگاریتمی در میلی‌لیتر از *کلبسیلا اکسیتوکا* آلوده شد و سپس به‌طور متداول فرآیند CIP بر روی آن اعمال گردید. نتایج نشان داد که CIP موجب حذف کامل بیوفیلم باکتری نمی‌شود. در این مطالعه مؤثرترین

روش برای حذف بیوفیلم استفاده از مخلوط آنزیمی (Quatro Zyme) معرفی شد، هرچند در پایان هم‌چنان تعداد محدودی از باکتری زنده باقی ماندند (تانگ و همکاران ۲۰۱۰).

بر اساس یافته‌های مطالعه، ۸۷/۵٪ جدایه‌ها (به‌جز دو جدایه *اشریشیا کولای*)، مولد بیوفیلم بودند و مقادیر مختلف بیوفیلم را تولید کردند. در این میان، بیش‌ترین تولید بیوفیلم توسط *سیتروباکتر فروندای* اندازه‌گیری شد (جدول ۵). جدایه‌های مولد بیوفیلم مقادیر متفاوت بیوفیلم تولید نمودند. به‌طوری‌که گونه‌های *اشریشیا کولای*، *انتروباکتر کلوکا*، *انتروباکتر ساکازاکی* ضعیف و *کلبسیلا نومونیه* و *کلبسیلا ایروجنز* متوسط بودند. توانایی تشکیل بیوفیلم نه‌تنها در بین گونه‌های مختلف تا حد زیادی متفاوت برآورد شد، بلکه می‌تواند در میان جدایه‌های یک گونه نیز به‌طور قابل‌توجهی متفاوت بود.

جدول ۵- میزان تولید بیوفیلم (Mean ± SD) در گونه‌های مختلف کلی‌فرم

Table 5- Amounts of biofilm produced by the different types of coliform bacteria

Bacteria	Sampling place	OD_{492}*	Biofilm production level
Klebsiella pneumoniae	yogurt filling machine conveyor	0.29 ± 0.04	low
	UHT milk line conveyor	0.41 ± 0.16	medium
	yogurt filling machine conveyor	0.26 ± 0.09	low
Enterobacter sakazakii	UHT milk processing line	0.44 ± 0.23	medium
	UHT milk processing line	0.18 ± 0.004	low
	UHT milk processing line	0.17 ± 0.006	low
	UHT milk processing line	0.20 ± 0.03	low
Enterobacter cloacae	floor of UHT milk processing plant	0.19 ± 0.06	low
Escherichia coli	raw milk tank drain valve	0.17 ± 0.004	low
	raw milk tank drain valve	0.13 ± 0.005	negative
	raw milk tank drain valve	0.16 ± 0.02	negative
	UF cheese coagulation tunnel	0.31 ± 0.01	low
Citrobacter freundii	UF cheese coagulation tunnel	0.96 ± 0.5	high
	UHT milk processing plant	0.74 ± 0.41	high
Klebsiella aerogenes	buttermilk filling machine conveyor	0.52 ± 0.25	medium
	buttermilk filling machine conveyor	0.21 ± 0.04	low
Control		0.164	negative

* Mean value of three repetitions.

در بین جدایه‌ها، *سیتروباکتر فروندای* مولد قوی بیوفیلم تشخیص داده شد که بیوفیلم معادل (OD = ۰/۹۶۵) ۵/۱۸ برابر نمونه شاهد تولید نمود. این باکتری از تونل انعقاد پنیر UF و هم‌چنین از کف سالن UHT جداسازی شد. دلیل وجود چنین باکتری‌هایی وجود درز و شکاف در نواحی مزبور است که محل مناسبی را برای تجمع باقیمانده مواد غذایی و باکتری فراهم می‌آورد و از طرفی عمل شستشو و ضدعفونی این قسمت‌ها به‌طور کامل ممکن نمی‌باشد. نتایج مشابه توسط روسی و همکاران (۲۰۱۸) و تیران و همکاران (۲۰۱۸) به‌دست آمد که طی مطالعات آن‌ها میزان آلودگی در سالن تولید و سطوح ناصاف تجهیزات بیشتر از مناطق دیگر نمونه‌برداری بود. مطالعات نشان داده است، علاوه بر جنس و میزان صیقلی بودن سطوح و نیز نقاط زاویه‌دار و بن‌بست در تجهیزات، عوامل دیگری نظیر حضور ترکیبات مغذی و پیش‌سازهای سنتز مواد پلی‌مری، pH محیط و اثرات سینرژیستی میکروب‌ها، بر مقدار تولید بیوفیلم تأثیرگذار هستند (دونلن ۲۰۰۲). در مطالعه‌ای

شنگ و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند pH بر تعامل بین سلول‌های باکتریایی و سطح فلز تأثیرگذار است. به‌نظر می‌رسد نیروی چسبندگی باکتری- فلز زمانی به بالاترین مقدار خود می‌رسد که pH محلول در نزدیکی نقطه ایزوالکتریک باکتری‌ها باشد و هرچه نیروی چسبندگی بیشتر باشد، باکتری‌ها با نیروی قوی‌تری به سطوح خواهند چسبید.

نتیجه‌گیری

با بررسی محل‌های شناسایی جدایه‌ها به‌خوبی می‌توان به منابع شایع آلودگی کلی‌فرمی در کارخانه‌جات تولید فرآورده‌های شیر پی‌برد. وجود نمونه‌های آلوده فراوان (۴۳٪/۷۵) در کف سالن، نشان‌دهنده پتانسیل بالای این مکان‌ها برای آلوده کردن فرآورده‌های شیر است. وجود شکاف و درزهای فراوان، حضور باقیمانده مواد آلی - که به کانون تمرکز میکروب‌ها مبدل می‌شوند- و عدم توجه کافی کارکنان در شست‌وشوی و ضدعفونی کف سالن می‌تواند اصلی‌ترین دلایل حضور آلودگی در این نواحی باشد. علاوه بر سطوح سالن تولید، تسمه‌های نقاله (۳۷/۵٪) و زانوی خروجی تانک حمل شیر خام (۱۸/۷۵٪) از آلودگی بالایی برخوردار بودند. هنگام شستشو و CIP تانکرهای حمل شیر، ممکن است دسترسی کامل به تمامی سطوح تانکر میسر نباشد و محل‌های جوشکاری و زانوی خروجی شیر از مکان‌هایی هستند که به‌طور موثر ضدعفونی نمی‌شوند؛ طوری‌که در بعضی از تانکرها به‌وضوح بیوفیلم تشکیل شده قابل مشاهده است. برای رفع چنین بیوفیلم‌هایی به موازات CIP، باید از روش‌های کمکی مکانیکی استفاده شود. باید به این نکته توجه داشت که آلودگی کلی‌فرمی می‌تواند از طریق پرسنل به سالن تولید راه یابد. عدم استفاده از حوضچه‌های ضدعفونی در ورودی سالن‌ها و رعایت نکردن بهداشت فردی کارکنان می‌تواند باعث تشدید آلودگی‌ها و انتقال آن‌ها به سایر قسمت‌های کارخانه و محصول تولیدی شود (سیمویز و همکاران ۲۰۰۶). استفاده از آب پرفشار و با درجه حرارت بالا برای تمیز کردن سطوح می‌تواند علاوه بر اعمال نیروی فیزیکی لازم جهت رفع مؤثر آلودگی‌ها (مائوکونن و همکاران ۲۰۰۳) در غیرفعال‌سازی حرارتی و در نتیجه کاهش جمعیت فرم‌های رویشی میکروب‌ها نقش داشته باشد (کمیلوزکی و فرانک ۲۰۰۶). علاوه‌بر این، تمیزکردن فقط رفع و جداسازی حدود ۹۰ درصد از باکتری‌ها از سطوح را امکان‌پذیر می‌سازد و ممکن است آلودگی به سطوح دیگر متصل شده و بیوفیلم جدیدی تشکیل دهند. لذا ضدعفونی کردن با هدف از بین بردن کامل عوامل آلوده‌کننده محیطی ضروری است (گرام و همکاران ۲۰۰۷). استفاده از روش‌های شستشو و ضدعفونی تکمیلی، آموزش کارکنان برای رعایت بهداشت فردی، نظارت بیش‌تر بر شست‌وشوی کف سالن، تعویض مصالح آسیب‌دیده، نظارت بیشتر بر CIP تانکرهای حمل شیر خام و به‌کارگیری روش‌های کارآمد می‌تواند آلودگی‌های کلی‌فرمی را تا حدود زیادی کاهش دهد.

منابع مورد استفاده

رضویلر و، ۱۳۸۱. میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران.

وزیری س و نقشبندی ن، ۱۳۹۰. بررسی آلودگی پنیرهای محلی لیقوان تبریز به کلیفرم‌ها و اشرشیا کلی در شهر مراغه، مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، ۵، ۲۸-۲۳.

Agarwal S, Sharma K, Swanson BG, Yüksel GU and Clark S, 2006. Nonstarter lactic acid bacteria biofilms and calcium lactate crystals in Cheddar cheese. Journal of Dairy Science 89: 1452-1466.

Chmielewski RAN and Frank JF, 2006. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. LWT-Food Science and Technology 39: 11-19.

Cowan ST, Barrow GI, Steel KJ and Feltham RKA, 2004. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press.

Donlan RM, 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases 8: 881-889.

Eberhart RJ and Buckalew JM, 1977. Intramammary infections in a dairy herd with a low incidence of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* infections. Journal of the American Veterinary Medical Association 171: 630-634.

Eden R, 2014. Classical and Modern Methods for Detection and Enumeration. pp. 667-673. In: Batt CA and Robinsson RK (eds). Encyclopedia of Food Microbiology. 2nd Edition, Academic Press.

Fallah S, Chamani M, Amin Afshar M. and Ezzat Panah H, 2011. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from milk. Journal of Biology Science 5: 61-69.

Farkas A, Butiuc-Keul A, Ciatarâş D, Neamţu C, Crăciunaş C, Podar D and Drăgan-Bularda M. 2013a. Microbiological contamination and resistance genes in biofilms occurring during the drinking water treatment process. The Science of Total Environment 15: 932-938.

Farkas A, Crăciunaş C, Chiriac C, Szekeres E, Coman C and Butiuc-Keul A, 2013b. Exploring the role of coliform bacteria in class 1 integron carriage and biofilm formation during drinking water treatment. Microbial Ecology 72: 773-782.

Fouladynezhad N, Afsah Hejri L, Rukayadi Y, Nakaguchi Y, Nishibuchi M, and Radu S, 2013. Efficiency of four Malaysian commercial disinfectants on removing *Listeria monocytogenes* biofilm. International Food Research Journal 20: 1485-1490.

Gram L, Bagge-Ravn D, Ng YY, Gymoese P and Vogel BF, 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food control 18: 1165-1171.

Grant MA, 1997. A new membrane filtration medium for simultaneous detection and enumeration of *Escherichia coli* and total coliforms. Applied and Environmental Microbiology 63: 3526-4530.

Gundogan N, 2014. Klebsiella, pp. 383-388. In: Batt CA and Robinsson RK (eds), Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edition, Academic Press.

Gunduz GT and Tuncel G, 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. Antonie Van Leeuwenhoek 89: 329-336.

Gupta TB, Mowat E., Brightwell G and Flint SH, 2018. Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand Cronobacter isolates. Journal of Food Safety 10.1111/jfs.12430.

Jamshidi A, Bassami MR and Rasooli M, 2008. Isolation of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 from ground beef samples collected from beef markets, using conventional culture and polymerase chain reaction in Mashhad, northeastern Iran. Iranian Journal of Veterinary Research 9: 72-76.

Jayarao BM and Wang L, 1999. A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. Journal of Dairy Science 82: 2620-2624.

Kumar CG and Anand SK, 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology 42: 9-27.

Maukonen J, Mättö J, Wirtanen G, Raaska L, Mattila-Sandholm T and Saarela M, 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 30: 327-356.

McDonogh R, Schaule G and Flemming HC, 1994. The permeability of biofouling layers on membranes. Journal of Membrane Science 87: 199-217.

Movassagh Ghazani MH, Karim G and Ahmadzadeh AR, 2007. Biofilm formation of *Escherichia coli* O_{111} on milk contact stainless steel and rubber surfaces. Iranian Veterinary Journal 4: 221-226.

Patel AK, Singhania RR, Pandey A, Joshi VK, Nigam PS and Soccol CR, 2014. Enterobacteriaceae, Coliforms and *E. coli*, pp. 659-665. In: Batt CA and Robinsson RK (eds). Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edition, Academic Press.

Percival SL, Williams DW, Randle J, ooper T, 2014. Biofilms in Infection Prevention and Control. Elsevier.

Rendueles O, Kaplan JB and Ghigo JM, 2013. Antibiofilm polysaccharides. Environmental Microbiology 15: 334-346.

Rippey SR, Adams WN and Watkins WD, 1987. Enumeration of fecal coliforms and *E. coli* in marine and estuarine waters: an alternative to the APHA-MPN approach. Water Pollution Control Federation 59: 795-798.

Rodrigues LB, Santos LRD, Tagliari VZ, Rizzo NN, Trenhago G, Oliveira APD, Goetz F and Nascimento VPD, 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by Listeria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Brazilian Journal of Microbiology 41: 1082-1085.

Rossi C, Serio A, Chaves-López C, Anniballi F, Auricchio B, Goffredo E, TerzoCenci-Goga B, Lista F, Fillo S and Paparella A, 2018. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. Food Control 86: 241-248.

Shekarforoush SS, Nazer AHK, Firouzi R and Rostami M, 2007. Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in barbecued chicken used in Iran. Journal Food Control 18: 1428-1433.

Sheng X, Ting YP and Pehkonen SO, 2008. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. Journal of Colloid and Interface Science 321: 256-264.

Simões M, Simões LC, Machado I, Pereira MO and Vieira MJ, 2006. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. Food and Bioproducts Processing 84: 338-345.

Solomakos N, Govaris A, Koidis P and Botsoglou N, 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O_{157}:H_7 in minced beef during refrigerated storage. Journal of Meat Science 80: 159-166.

Srey S, Jahid IK and Ha SD, 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food Control 31: 572-585.

Tang X, Flint SH, Bennett RJ and Brooks JD, 2010. The efficacy of different cleaners and sanitisers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. Journal of Membrane Science 352: 71-75.

Teixeira P, Lopes Z, Azeredo J, Oliveira R, Vieira MJ, 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. Food Microbiology 22: 247–251.

Thiran E, Di Ciccio PA, Graber HU, Zanardi E, Ianieri A and Hummerjohann J, 2018. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. Journal of Dairy Science 101: 1000-1012.

Kornacki JL and Johnson JL, 2001. pp. 69–79. In: Downes, FP. and Ito, K. (eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods. 4th Edition, American Public Health Association, Washington DC.

Witanen G and Salo S, 2004. Biofilm risks. pp. 50-57. In: Lelieveld HLM, Mostert MA, Holah J. (eds). Handbook of Hygiene Control in the Food Industry, CRC Press, Washington DC.

Wirtanen G and Mattila Sandholm T, 1992. Biofilm formation in the industry: a review. Food Reviews International 8: 573-603.

Contamination rate, diversity and biofilm formation of the coliforms isolated from raw milk tankers and dairy processing equipment

Sh Zahediniya[1] and S Hanifian[2*]

Received: June 7, 2017 Accepted: May 20, 2018
[1]MSc Graduate of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: hanifian@iaut.ac.ir

Introduction: Coliforms are an important broad class of Enterobacteriaceae that make 10% of the intestinal microbial population and they are not basically pathogen. Microbial evaluations dealing with the detection and enumeration of coliforms as indicator microorganisms are extensively used in dairy industries to show process error, environmental health and secondary contamination of the products (Eden, 2014; Cowan et al., 2004). A biofilm is microbial cells that enclosed in an EPS (extracellular polymeric substance) matrix and attached to surfaces (Srey et al., 2013). The biofilm structure is such that it protects the bacteria against environmental stresses so that biofilm cells are more resistant to antimicrobial agents than planktonic (individualized) bacteria (Rendueles et al. 2013). As a result, biofilms have become a major problem in the milk industry, the processing of fish, poultry, meat and prepared foods (McDonogh 1994). The formation of biofilms, in addition to having health effects, by blocking pipes in heat exchangers and cooling towers in milk processing plants, significantly reduces the amount of heat transfer, and also decomposes and decays the UF membranes used in the production of cheese and reverse osmosis (Kumar et al. 1998). This study aimed to evaluate the contamination rate and biodiversity of coliform bacteria in raw milk tanks and dairy processing equipment as well as to assess the ability of the isolates to produce biofilm.

Material and methods: A total of 80 samples, consisting of 30 samples of raw milk tanks, 30 samples of dairy processing, storage and packaging equipment (processing lines of pasteurized milk, sterilized milk, buttermilk, and yogurt) and 20 samples from different surfaces (such as production floor, equipment surface, conveyor belts) were sampled. For this purpose, after cleaning in place (CIP), the specimens were obtained by sterilized wire brush and mechanically removed from the surfaces and transferred to the sterile ringer serum (Percival et al. 2014). The samples were centrifuged for 4 minutes at 4000 g for 5 minutes and the precipitate was cultured on VRBA agar and incubated at 37°C for 24-48 h. The colonies were subjected to screening and confirmation tests (Razavilar 2002). To determine the amount of biofilm produced by the coliform isolates, the quantitative microplate technique was conducted (Srey et al., 2013).

Results and discussion: According to the results, 8.75% of the samples were contaminated with coliforms. Amongst Enterobacter and Klebsiella had the highest contamination rate of 31.25%; meanwhile Citrobacter showed the lowest contamination rate of 12.5%. The results of ELISA assay showed that among the 16 isolates, 87.5% had the biofilm-forming capability, however 2 (5.12%) *Escherichia coli* isolates were found biofilm-negative. According to the findings of the study, 87.5% of the isolates (except for the two *E. coli* isolates) were biofilm producers and produced different biofilm values. Meanwhile, the largest production of biofilms was measured by *Citrobacter freundii*. Biofilm producing isolates produced different biofilm values. So that *E. coli*,

Enterobacter cloacae, and *E. sakazakii* produced a low amount of biofilm; meanwhile, medium amounts of biofilm were formed by *Klebsiella pneumoniae* and *K. aerogenes*. The ability to form biofilms was not only widely differentiated among different species, but could also be significantly different among isolates of a specific species.

Conclusion: Presence of high contaminated specimens (43.75%) on the floor and surfaces of processing plants indicates the high potential of these places for contamination of milk products. The existence of cracks, the presence of residual organic matter –as the sources of the microbes- and the lack of insufficient washing and disinfection of the floor can be the main reasons for the presence of contamination in these areas. In addition to the floors, conveyor belt (37.5%) and raw milk tank drain valve (18.75%) had a high contamination rate. During washing and CIP of tank trucks, it is not possible to have full access to all surfaces of the tanker and consequently is not effectively disinfected; so as biofilm was clearly visible in some of the tankers. To eliminate such biofilms along with the CIP, mechanical methods should be used (Simões et al., 2006). The use of supplemental washing and disinfection techniques, staff training for personal hygiene, more supervision over floor cleaning, replacement of damaged materials, monitoring of CIP and the use of efficient methods for raw milk tankers can greatly reduce coliform contamination.

Keywords: Coliform, Biofilm, raw milk tanks, Dairy processing equipment