

جداسازی و شمارش باسیلوس سرئوس از شیر خام عرضه شده در شهر تبریز و جستجوی ژن *ces* در جدایه‌ها

مهدیه حیدرزاده^{۱*}، افشین جوادی^۲

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، مؤسسه آموزش عالی ربیع رشید، تبریز، ایران

۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: mahdiah.heydarzadeh@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۶/۱۶ پذیرش نهایی: ۹۶/۸/۳۰)

چکیده

باسیلوس سرئوس یک باکتری گرم مثبت، اسپوردار است که انتشار وسیعی در طبیعت دارد و به‌عنوان یکی از عوامل عمده پاتوژن مواد غذایی شناسایی شده است، اغلب در آلودگی غذاهای آماده و فراورده‌های شیر نقش ایفا می‌کند و باعث ایجاد دو نوع مسمومیت غذایی: نوع اسهالی و نوع استفراغی می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی و شمارش باسیلوس سرئوس در شیر خام عرضه شده در فروشگاه‌های سطح شهر تبریز و جستجوی ژن *ces* در جدایه‌ها می‌باشد. برای این منظور، تعداد ۱۲۰ نمونه شیر خام، طی اسفند ماه ۱۳۹۵ تا خرداد ۱۳۹۶ از فروشگاه‌های شهر تبریز به‌صورت تصادفی ساده انتخاب و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی منتقل شد تا مورد جستجو، شناسایی و شمارش باسیلوس سرئوس به‌روش استاندارد ملی ایران و PCR قرار گیرند. طبق نتایج به‌دست آمده از روش کشت، از تعداد ۱۲۰ نمونه شیر خام، (۱۰/۸۳ درصد) ۱۳ نمونه آلوده به باکتری باسیلوس سرئوس بودند که میانگین بار آلودگی آن‌ها ۲/۸ بود. نتایج PCR نشان داد که از ۱۳ نمونه مثبت باسیلوس سرئوس ۱۲ نمونه (۹۲/۳ درصد) دارای ژن استفراغ‌زای *ces* بودند. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که شیر خام پتانسیل مسمومیت‌زایی به باسیلوس سرئوس را دارد و به‌کار گرفتن روش‌هایی جهت کاهش آلودگی به این باکتری در جریان فراوری فراورده‌های شیر الزامی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس سرئوس، شیر خام، ژن *ces*

مقدمه

شیرخام، محیط بسیار مغذی برای جلبک‌ها، پروتوزوآها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها است. در این میان، باکتری‌ها به دلیل رشد سریع، توانایی استفاده از مواد مغذی، رشد در گستره دمایی وسیع و تولید اسپور در شرایط نامناسب دارای اهمیت هستند. انواع مختلفی از باکتری‌های بیماری‌زا از شیرخام جداسازی شده‌اند. برخی از این باکتری‌های بیماری‌زا، اسپورزا هستند که می‌توانند شرایط پاستوریزاسیون را تحمل کرده، وارد محصول پاستوریزه گردند و ایمنی محصول و سلامت مصرف کننده را به خطر اندازند. باسیلوس سرئوس از جمله این میکروارگانیسم‌هاست و مهم‌ترین بیماری‌زایی است که فرآیند پاستوریزاسیون را تحمل می‌کند (Moradi-Khatoonabadi et al., 2014). در نتیجه یک عامل محدود کننده برای عمر مفید شیر پاستوریزه می‌باشد (Magnusson et al., 2007). این باکتری معمولاً آلوده کننده شیرخام است و یک مشکل عمده میکروبیولوژیکی در صنایع لبنی در نظر گرفته می‌شود، اسپور مقاوم به گرمای باسیلوس سرئوس در شیر، یک منبع آلودگی برای فراورده‌های شیر می‌باشد (Shaheen et al., 2010).

باسیلوس سرئوس یک باکتری گرم مثبت، هوازی-بی‌هوازی اختیاری، متحرک، میله‌ای شکل با آرایش زنجیره‌ای و با اندازه ۴-۳×۱ میکرومتر از خانواده باسیلاسه است (Evelyn and Silva, 2015). سویه‌های باسیلوس سرئوس اکثراً ساپروفیت هستند و انتشار وسیعی در طبیعت دارند که این ناشی از مقاومت اسپورها به استرس‌های گوناگون و بقاء طولانی آن‌ها در شرایط نامساعد است (Messaudi et al., 2010).

یکی از پاتوژن‌های مهم مواد غذایی باکتری باسیلوس سرئوس می‌باشد که باعث آلودگی در غذاهای مختلف به خصوص فراورده‌های شیر می‌شود و سبب ایجاد دو نوع مسمومیت غذایی: نوع اسهالی و نوع استفراغی می‌شود (Lay et al., 2015). نوع اسهالی دارای دوره کمون ۱۶-۸ ساعت است و دردهای شکمی و اسهال مشخص ایجاد می‌شود. این بیماری توسط انتروتوکسین‌ها در طی رشد و رویش باسیلوس سرئوس در روده کوچک ایجاد می‌شود (Molayi Kohneh et al., 2015). نوع دیگر بیماری، استفراغی است که دارای دوره کمون ۵-۱ ساعت می‌باشد و با حالت تهوع و استفراغ مشخص مشابه مسمومیت غذایی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشد (Schoeni et al., 2010; Jung-Beom et al., 2005; and Wong). این نوع مسمومیت از طریق بلع توکسین استفراغی به نام سرئولید (Cereulide) در مواد غذایی رخ می‌دهد، سرئولید به راحتی توسط عملیات حرارتی نابود نمی‌شود و می‌تواند ۹۰ دقیقه در ۱۲۶°C مقاومت کند و در برابر شرایط اسیدی معده و آنزیم‌های پروتئولیتیک نیز مقاوم است (Samapundo et al., 2011; Soleimaninanadegani et al., 2013). سرئولید توسط ژن *ces* سنتز می‌شود و مکانیسم عمل آن به گونه‌ای است که وقتی به گیرنده‌های 5-HT₃ متصل می‌شود، عصب واگ آوران را تحریک می‌کند و باعث بروز تهوع و استفراغ می‌شود این اثر سرئولید باعث نقص کبد می‌شود. ترمیم تغییرات آسیب‌شناسی و احیاء هپاتوسیت‌ها بعد از ۴ هفته مشاهده می‌شود. سرئولید هم‌چنین باعث آسیب بافت سلولی و نیز مهار کشندگی طبیعی سلول‌های سیستم ایمنی انسان می‌شود (Ehling-

آلودگی به باسیلوس سرئوس در شیرخام عرضه شده در تبریز و مقایسه بار آلودگی با حد استاندارد و هم‌چنین تعیین فراوانی ژن عامل استفراغ‌زای ces انجام شد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

در مطالعه حاضر تعداد ۱۲۰ نمونه شیرخام از فروشگاه‌های سطح شهر تبریز به صورت تصادفی ساده طی اسفند ماه سال ۱۳۹۵ تا اردیبهشت ۱۳۹۶ جمع‌آوری و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی منتقل گردید تا مورد جستجو و شمارش باسیلوس سرئوس به روش کشت قرار گیرند.

- جداسازی و شمارش باسیلوس سرئوس

طبق استاندارد ملی ایران ابتدا رقیق‌سازی انجام گرفت و رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} بدست آمد و در محیط کشت اختصاصی (MYP (Merck, Germany) (مانیتول زرده تخم‌مرغ پلی‌میکسین فنل‌رد آگار) کشت داده شد. کلنی‌های بزرگ و صورتی رنگ و هاله دار به‌عنوان باسیلوس سرئوس احتمالی شناخته و شمارش شد و برای تأیید جدایه‌ها آزمون همولیز و رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت. با توجه به این‌که باکتری باسیلوس سرئوس یک باکتری بتاهمولیتیک می‌باشد نمونه‌های مثبت آن در اطراف کلنی لیز کامل گلوبول‌های قرمز به صورت هاله‌ای شفاف بر روی آگار خوندار ایجاد کردند. در رنگ‌آمیزی گرم، باسیلوس سرئوس به صورت میله‌ای شکل با آرایش تسبیح مانند دیده می‌شود و لبه‌های کروی دارند (برخلاف باسیلوس آنتراسیس که لبه‌های تیز و آجری شکل دارد) و اسپور

Schulz *et al.*, 2005 ; Ankolekar *et al.*, 2009 ; (Molayi Kohneh Shahri *et al.*, 2015).

این باکتری علاوه بر بیماری‌زا بودن، با داشتن فعالیت پروتئولیتیک، لیپولیتیک و آمیلولیتیک یکی از عوامل ایجاد فساد در مواد غذایی نیز به‌شمار می‌رود. هم‌چنین به دلیل وجود برخی از انواع سرماگرای این باکتری که قادر به رشد در دمای $4-6^{\circ}\text{C}$ هستند، امکان فساد محصول طی نگهداری در دمای یخچالی نیز وجود دارد. معایبی نظیر ایجاد بد طعمی (Bad Flavor)، لخته شیرین (Sweet Clot) و لخته تلخ (Bitter Clot) در اثر فعالیت پروتئیناز، لیپاز و فسفولیپازهای حاصل از باسیلوس سرئوس، در فرآورده‌های شیری مشاهده شده است (Moradi-Khatoonabadi *et al.*, 2014).

یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد که اغلب نمونه‌های شیرخام در مقایسه با استانداردهای ملی و بین‌المللی دارای سطح بالایی از آلودگی به اسپورهای هوازی و به‌ویژه باسیلوس سرئوس بودند (Moradi-Khatoonabadi *et al.*, 2014). در یک مطالعه دیگر بررسی‌ها نشان داد که از ۲۵ نمونه پنیر ساخته شده از شیر خام، ۲۸ درصد آن آلوده به باسیلوس سرئوس بود که همه سویه‌ها قادر به تولید انتروتوکسین بودند (Williams and Withers *et al.*, 2010). نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد که ۹/۸ درصد نمونه‌های شیرخام آلوده به باکتری باسیلوس سرئوس بودند، که از این تعداد ۱/۱ درصد نمونه‌ها دارای ژن ces بودند (Cui *et al.*, 2016). با توجه به نقش باسیلوس سرئوس در مسمومیت غذایی و ایجاد فساد در شیر و فرآورده‌های شیر که یکی از پرمصرف‌ترین مواد غذایی در برنامه غذایی انسان‌ها می‌باشد، این مطالعه با هدف تعیین میزان

اسپکتروفتومتری نانودراپ (Nano Drop) (Thermo, USA) استفاده گردید. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر قطعه ۱۵۴bp از ژن ces جفت پرایمری که در جدول (۱) آمده است، مورد استفاده قرار گرفت (Zhang et al., 2014).

آن به صورت میانی قابل رؤیت است (ISIRI, 2324/2006).

برای جستجوی ژن ces در جدایه‌ها آزمون PCR انجام گرفت، به این ترتیب که: ابتدا استخراج DNA به روش جوشاندن (boiling) انجام گرفت. سپس برای سنجش غلظت و خلوص DNA های استخراج شده از

جدول (۱) - پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR (Zhang et al., 2014)

پرایمر	توالی	طول قطعه
cesB-F:	F: 5'- ACCCATCTTGCATC -3'	
cesB-R:	R: 5'- CAGCCAAGTGAAGAATACC -3'	154 bp

جدول (۲) - غلظت اجزای تشکیل دهنده واکنش زنجیره پلیمرازی

اجزای تشکیل دهنده	مقدار مورد نیاز برای هر واکنش	مقدار مورد نیاز برای کل
Master mix	12.5 µl	162.5 µl
Primer forward	1 µl	13 µl
Primer reverse	1 µl	13 µl
DNA	1 µl	13 µl
dH ₂ O	9.5 µl	123.5 µl
جمع	25 µl	325 µl

(Safe stain) (سیناژن، ایران) به آن اضافه شد، در یکی از چاهک‌ها از یک نمونه مثبت باسیلوس سرئوس (PTCC: ۱۰۱۵) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

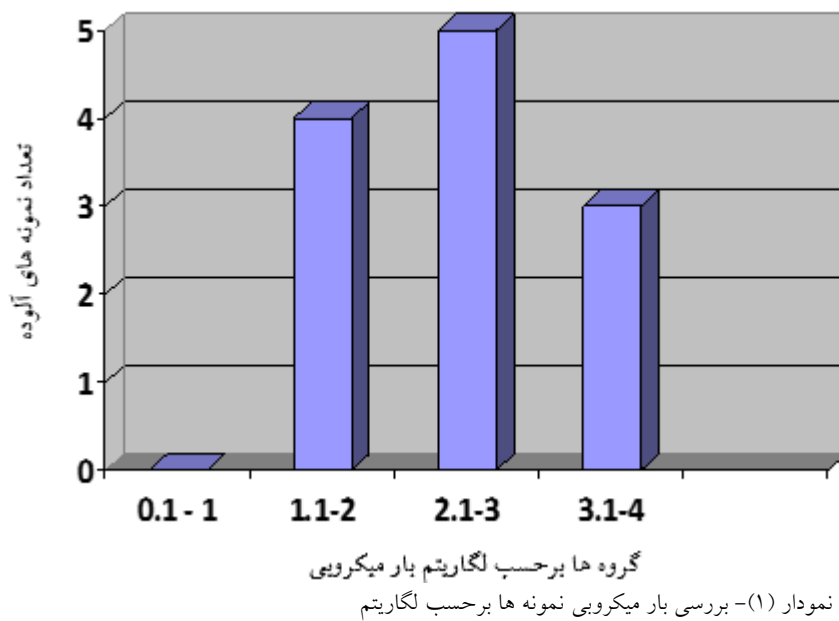
داده‌های این مطالعه با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ پردازش و با شاخص‌های مرکزی و پراکندگی ارائه شد (سطح اطمینان ۹۵٪ و $\alpha=۰.۰۵$).

به این منظور ترکیب جدول (۲) با برنامه زمان‌بندی شده واکنش زنجیره پلیمرازی با چرخه‌های واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد. برای تفکیک قطعات تکثیر یافته، ابتدا، ژل ۱ درصد آگارز (Sigma, USA) ساخته شد و رنگ سیف استین

یافته‌ها

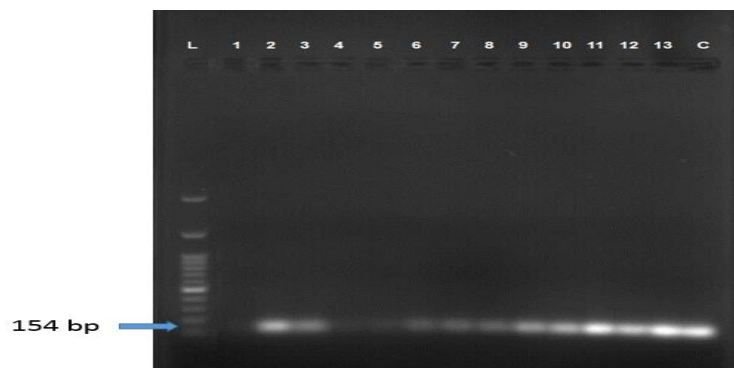
میانگین بار میکروبی برحسب Log CFU/gr or ml برابر با ۲/۸ بود. همان‌طوری که در نمودار (۱) نشان داده شده است، آلودگی‌ها برحسب لگاریتم بار میکروبی به ۴ گروه دسته‌بندی شد: (0/1-1, 1.1-2, 2.1-3, 3.1-4)

در مطالعه حاضر به‌طورکلی ۱۲۰ نمونه شیرخام مورد آزمایش قرار گرفت که از این تعداد ۱۳ نمونه (۱۰/۸۳ درصد) به باکتری باسیلوس سرئوس آلوده بودند و



منفی بوده ولی بقیه نمونه‌ها در قطعه ۱۵۴ bp باند تشکیل دادند.

نتایج حاصل از PCR نشان داد که از تعداد ۱۳ جدایه، ۱۲ مورد دارای ژن *ces* بودند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود نمونه شماره (۱) از نظر ژن *ces*



شکل (۱) - الکتروفورز باسیلوس سرئوس های جدا شده از نمونه‌های شیرخام، شماره ۱-۱۳ نمونه‌های جدا شده. L: DNA Ladder: C: کنترل مثبت یا نمونه شاهد مثبت

بحث و نتیجه‌گیری

عوامل زیادی در کیفیت میکروبی شیرخام مؤثرند که از این بین چهار منبع اصلی برای آلودگی میکروبی شیرخام در نظر گرفته شده است. این منابع شامل: ۱- درون مخزن پستان دام ۲- بخش‌های بیرونی پستان دام ۳- عوامل محیطی ۴- تجهیزات شیردوشی و نگهداری شیرخام. جهت تهیه شیر و فرآورده‌هایی ایمن و مناسب از آن، می‌بایستی عملیات خوب بهداشت (Good Hygienic Practice Hazard Analysis and Critical Control Point) HACCP طی زنجیره تولید تا مصرف رعایت گردد و این پیش‌نیازها در زنجیره تأمین شیرخام باید مورد توجه قرار بگیرد (Moradi-Lues et al., 2003 ; Moradi-Khatoonabadi et al., 2014).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که از ۱۲۰ نمونه شیرخام، ۱۳ نمونه (۱۰/۸۳ درصد) به باکتری باسیلوس سرئوس آلوده بودند. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که باسیلوس سرئوس از ۹ درصد نمونه‌های شیرخام جداسازی شد (Moradi-Khatoonabadi et al., 2014). در مطالعه‌ای دیگر از ۱۰۰ نمونه شیرخامی که مورد بررسی قرار گرفته بود ۱۰ درصد نمونه‌ها آلوده به باسیلوس سرئوس بودند (Irannia et al., 2012). در تحقیقی ۳۳/۳ درصد نمونه‌های شیر آلوده به باسیلوس سرئوس بودند (Gitahi et al., 2009). نتایج تحقیقی که بر روی شیر و محصولات لبنی انجام گرفته شده بود نشان داد که از ۲۶۰ نمونه ۶۳ مورد معادل ۲۴/۲۳ درصد به باکتری باسیلوس سرئوس آلوده می‌باشند (Reyes et al., 2013). هم‌چنین در مطالعه‌ای نشان داده شد که روی شیر و فرآورده‌های آن انجام گرفت، از

۲۲۰ نمونه، ۵۰ نمونه معادل ۲۲/۷ درصد آلوده به باسیلوس سرئوس بودند (Meybodi et al., 2009). بنابراین نتایج مطالعه حاضر با مطالعه‌های ذکر شده تا حدودی مشابه است و اندک اختلافی با برخی مطالعه‌ها دارد که احتمالاً عدم رعایت نکات بهداشتی و نوع دامداری‌ها از نظر سنتی و صنعتی، عوامل محیطی و مراحل تولید شیر از عوامل دخیل در نتایج مختلف به‌دست آمده از تحقیقات انجام شده در این زمینه باشد. یافته‌های بررسی حاضر در مورد حضور ژن *ces* در ایزوله‌ها نشان داد که از ۱۳ نمونه تعداد ۱۲ مورد معادل ۹۲/۳ درصد دارای ژن *ces* بودند. این درحالی است که یافته‌های مطالعه‌ای که بر روی نمونه‌های بستنی انجام گرفت نشان داد که از ۵۰۸ نمونه باسیلوس سرئوس جدا شده ۲۴ عدد معادل ۴/۷ درصد دارای ژن تولیدکننده سرئولید (*ces*) بودند (Messelhauser et al., 2010). در مطالعه دیگری که روی نمونه‌های ماکارونی پخته شده، گوشت چرخ کرده و لازانیا انجام گرفت، مشخص شد که از ۸۰ سویه جدا شده باسیلوس سرئوس هیچ‌کدام ژن *ces* مورد نیاز برای تولید سم استفراغ را بیان نکردند (Samapundo et al., 2011). یافته‌های تحقیقی نشان داد که از ۹/۸ درصد باسیلوس سرئوس جدا شده از نمونه‌های شیرخام ۱/۱ درصد دارای ژن *ces* بودند (Cui et al., 2016). بنابراین نتایج مطالعه حاضر با مطالعات دیگر تفاوت دارد و این تفاوت ممکن است به علت انتقال ژنی باشد که به مرور زمان از طریق پلاسمید انتقال یافته است، به نظر می‌رسد در منطقه جغرافیایی ما سویه‌های دارای ژن *ces* فراوانی بیشتری دارند.

سپاسگزاری

این مقاله با حمایت موسسه آموزش عالی ربع رشید تبریز انجام گردید. نویسندگان این مقاله از تمام کسانی که در موسسه آموزش عالی ربع رشید تبریز، آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی واقع در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد تبریز همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

یافته‌های این تحقیق، نشانگر آلودگی به باسیلوس سرئوس در نمونه‌های شیرخام می‌باشد و با عنایت به این‌که ژن *ces* با میزان قابل توجهی ردیابی شد، در صورت عدم رعایت اصول بهداشتی پتانسیل مسمومیت‌زایی در شیر و فراورده‌های لبنی وجود دارد، در نتیجه در تهیه و تولید آن‌ها باید بیشتر دقت کرد و بهتر است جهت کاهش آلودگی به این میکروب که نسبت به شرایط محیطی بسیار مقاوم است، زنجیره سرما رعایت گردد، زیرا در این خصوص عمده‌تأ عدم رعایت زنجیره سرما موجب تکثیر باکتری و بروز مشکلات جدی می‌شود.

منابع

- Ankolekar, C., Rahmati, T. and Labbe, R.G. (2009). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in US rice. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 460-466.
- Cui, Y., Liu, X., Dietrich, R., Martlbauer, E., Cao, J., Ding, S. and et al. (2016). Characterization of *Bacillus cereus* isolates from local dairy farms in China. *Federation of European Microbiological Societies*, 363(12).
- Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Märtilbauer, E. and et al. (2005). Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 105-113.
- Evelyn, E. and Silva, F.V.M. (2015). Thermosonication versus thermal processing of skim milk and beef slurry modeling the inactivation kinetics of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores. *Food Research International*, 67: 67-74.
- Gitahi, N.J., Ombui, J.N., Nduati, D.W., Gicheru, M.M. (2009). Genetic characterisation of food borne *Bacillus cereus* strains from milk, cheese and rice by multiplex pcr assay. *Journal of Integrative Biology*, 5(2), 82-6.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2006). Counting and identification of *Bacillus cereus* in food. 2nd revision, ISIRI No. 2324. [In Persian]
- Iran Food and Drug Administration. Customer Microbiology-table limits. (2014). M.5:SOP. No review: 2. [In Persian].
- Jung-Beom, K., Kim, J.M., Park, Y.B., Han, J.A., Lee, S.H. and Kwak, H.S. (2010). Evaluation of Various PCR Assays for Detection of Emetic-Toxin-Producing *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiol Biotechnol*, 20(7): 1107-1113.

- Kumari, S. and Sarkar, P.K. (2014). In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Journal of Food Control*, 36: 153-158.
- Lay, J.L., Bahloul, H., Serino, S., Jobin, M. and Schmitt, PH. (2015). Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiology*, 46: 314-321.
- Lues, J., Venter, P. and Van Der Westhuizen, H. (2003). Enumeration of potential microbiological hazards in milk from a marginal urban settlement in central South Africa. *Journal of Food Microbiology*, 20(3): 321-26.
- Magnusson, M., Christiansson, A. and Svensson, B. (2007). *Bacillus cereus* Spores during housing of dairy cows factors affecting contamination of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 90: 2745–2754.
- Messaoudi, K., Clavel, T., Schmitt, Ph. and Duport, C. (2010). mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F4430/73. *Research in Microbiology*, 61(1): 30-39.
- Messelhauser, U., Kämpf, P., Fricker, M., Ehling-Schulz, M., Zucker, R., Wagner, B. and et al. (2010). Prevalence of emetic *Bacillus cereus* in different ice creams in Bavaria. *Journal of Food Protection*, 73(2): 395-399.
- Meybodi, M. and Behzadian Nejad, G. (2009). Isolation of *B. cereus* from dairy products and detoxification of 20 selected strains. *Hakim Research Journal*, 2(2): 114-119. [In Persian]
- Molayi Kohneh Shahri, Sh., Hoseinzadegan, H. and Taghi Nejad, J. (2015). A review of the structure of virulence of *B.cereus*. *Quarterly Lab and Recognition*, 29: 51-67. [In Persian]
- Moradi-Khatoonabadi, Z., Maghsoudlou, Y., Ezzatpanah, H., Khomeiri, M. and Aminafshar, M. (2014). Occurrence of *Bacillus cereus* in raw milk receiving from UF-feta cheese plants. *Iranian Journal of Health and Environment*, 6(4): 545-556.
- Reyes, A.L., Montanhini, M.T., Bittencourt, J.V., Destro, M.T. and Bersot, L.S. (2013). Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4): 1195-1198.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R. and Devlieghere, F. (2011). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1): 34-41.
- Schoeni, J.L. and Wong, A.C.L. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Prot*, 68(3): 636-648.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M.A., Christiansson, A. and Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*, 27: 347-355.
- Soleimaninanadegani, M. (2013). Evaluation of critical level in *Bacillus Cereus* growth curve in milk products with different conditions based on experimental data and combase predictive models, *Journal of Webmed Central* , 4(9): 2046-1690.
- Verraes, C., Vlaemyneck, G., Weyenberg, S.V., Zutter, L.D., Daube, G. and Sindic, M. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50: 32-44.
- Williams, A.G. and Withers, S.E. (2010). Microbiological 9haracterization of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland. *International Journal of Dairy Technology*, 63: 356-369.
- Zhang, Z., Wang, L., Xu, H., Aguilar, Z. P., Liu, C., Gan, B. and et al. (2014). Detection of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* by propidium monoazide multiplex PCR (PMA-mPCR) with internal amplification control. *Food Control*, 35(1): 401-406.

Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in raw milk distributed in Tabriz, Iran and detection of *ces* gene among the isolates

Heydarzadeh, M.^{1*}, Javadi, A.²

1. MSc Student of Microbiology, Cellular and Molecular Biology Department, Institute of Rab-Rashid, Tabriz, Iran

2. Associate Professor of Food Hygiene, Bio-technology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author email: mahdieh.heydarzadeh@gmail.com

(Received: 2017/9/7 Accepted: 2017/11/21)

Abstract

Bacillus cereus is a gram-positive and spore-forming bacterium which is widely distributed in nature. It also has been known as a major food borne pathogen that often plays a role in the contamination of ready-to-eat and dairy products. It causes two different types of food poisoning in human: the diarrheal type and the emetic type. The aim of this study was to isolate and enumerate *B. cereus* in raw milk distributed in the stores of Tabriz city, Iran and to detect *ces* gene among the isolates. For this purpose, 120 samples of raw milk were randomly selected from the stores during February to June 2017. They were transferred to the Laboratory of food hygiene under sterile conditions in order to isolate, identify and enumerate *B. cereus* according to the national standard method of Iran and PCR. According to the results of microbial culture, out of 120 samples of raw milk, 13 (10.83%) samples were contaminated with *B. cereus* and the mean rate of contamination was 2.8 log₁₀/ml. PCR results showed that of 13 positive samples, 12 (92.3%) samples contained *ces* gene which is responsible for vomiting. The results of this study showed that raw milk has the potential for human intoxication by *B. cereus*; and the use of procedures to reduce the bacterial contamination during the processing of dairy product is required.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Bacillus cereus*, Raw milk, *ces* gene