جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جداسازی و شناسایی *Bacillus cereus* در شیر

ثمره فلاح *[۱]، محمد چمنی[۲]، مهدی امین افشار[۳]، حمید عزت پناه[۴]

۱*و۴- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران- ایران، صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵

۲ و ۳- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران – ایران، صندوق پستی: ۴۹۳۳-۱۴۱۵۵

samarehfallah@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۲۳

چکیده

اسپور *B. cereus* به صورت گسترده در طبیعت پراکنده است، و می‌توان آن را از مواد غذایی گوناگونی جدا نمود. این باکتری تولید کننده آنتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع بوده و قادر به ایجاد سندرم اسهال و تهوع می‌باشد. لذا بررسی وجود آن در شیر پاستوریزه و احتمال بیماریزایی آن از اهمیت بسزایی برخوردار است. هدف از این مطالعه ردیابی *B. cereus* در مراحل مختلف تولید شیر پاستوریزه و میزان افزایش آن می‌باشد. هم چنین بتوانیم ارتباط بین میزان افزایش این ارگانیسم با سایر میکروارگانیسم‌های شیر از جمله *Coliform*، بار کلی میکروبی و اسپورهای هوازی را مشخص نماییم. در این تحقیق در طی دو ماه اردیبهشت و خرداد از مراحل گوناگون خط تولید شیر پاستوریزه نمونه‌گیری، و آزمون‌های میکروبی مربوطه بلافاصله انجام شد و داده‌ها با استفاده از روش آماری kruskal wals در سطح احتمال ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید: اولاً تعداد *B. cereus* در زمان نگهداری شیر پاستوریزه افزایش یافته و هم چنین اختلاف معنی‌دار نیز نشان داده شد ($p<$ ۰/۰۱). ثانیاً معلوم شد تعداد *Coliform* در اثر فرایند پاستوریزاسیون کم شده و اختلاف معنی‌دار نمایان گردید ($p<$ ۰/۰۱). ثالثاً تعداد اسپورهای هوازی در شیر خام و شیرپاستوریزه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد وجود نداشته است ($p<$ ۰/۰۱). احتمال می‌رود کاهش بار میکروبی شیر عامل موثری در ایجاد شرایط مناسب برای تکثیر *B. cereus* باشد.

کلمات کلیدی: شیر پاستوریزه، *B. cereus*، آنتروتوکسین، باکتری.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

کیفیت شیر خام بر کیفیت شیر پاستوریزه تأثیر بسزایی دارد. شیر خام با کیفیت بالا برای تهیه شیر پاستوریزه با ماندگاری طولانی ضروری است. افزایش تعداد کل باکتری‌ها در شیر خام نمی‌تواند تنها عامل تعیین کننده باشد، بلکه نوع باکتری‌ها نیز در این میان اهمیت بسزایی دارد. شیر خام آلوده به باکتری‌های سرمادوست و مخصوصاً گونه‌های مقاوم به حرارت در مقایسه با *Coliform* و یا شیرخام با همان تعداد کل باکتری ولی در انواع متفاوت سبب می‌شود شیر پاستوریزه تولید شده از گروه اول ماندگاری کمتری داشته باشد (۵).

باکتری‌های سرمادوست به دلیل اینکه قدرت رشد و فعالیت در دمای پایین را دارند، با دارا بودن این قابلیت در فساد مواد غذایی نگهداری شده در یخچال موثر می‌باشند. این باکتری‌ها با تولید آنزیم خارج سلولی گوناگون باعث تغییر ترکیبات مواد غذایی شده و در نهایت منجر به فساد مواد غذایی می‌شوند (۹). فعالیت این باکتری‌ها در شیر خام نیز اهمیت ویژه‌ای دارد، زیرا در مدت زمان دریافت شیر خام تا فرآوری حرارتی شیر خام این دسته باکتری‌ها در سرمادوست به رشد و تکثیر خود ادامه می‌دهند، و با فعالیت آنزیمی خود کیفیت شیرخام و حتی محصولات تولیدی آن را کاهش داده و گاهی تا حدی پیشرفت می‌کنند، که محصول غیرقابل مصرف می‌باشد (۸).

در مطالعه‌ای در سوئد *B. Polymxsa* و *B. cereus* عامل فساد ۷۷ درصد از نمونه‌های فاسد شده شیر را تشکیل دادند. عوامل دیگر مانند سویه‌های باسیلوس و باکتری‌های اسید لاکتیک در ایجاد فساد نقش کمتری دارند (۱۲).

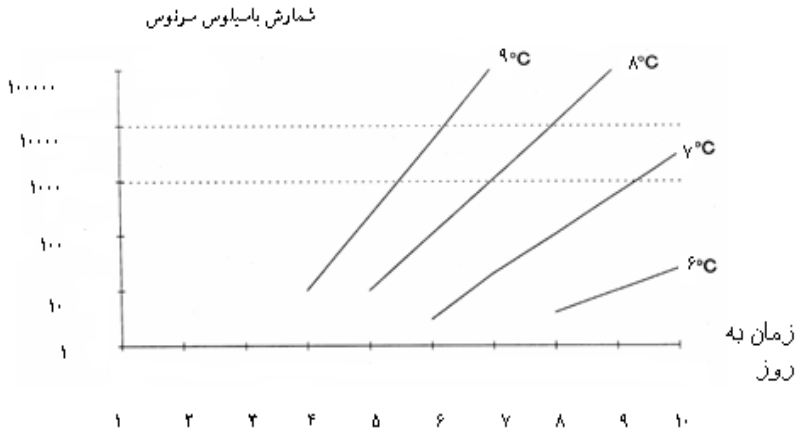
B. cereus در سال ۱۹۹۸- ۱۹۹۳، ۱ تا ۲ درصد از بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی در اروپا به آن نسبت داده شده است (در سال‌های ۱۹۹۳ تا ۱۹۹۸ در نروژ ۳۳ درصد و در فرانسه بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۰، ۴۵ درصد بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی به این میکروارگانیسم مربوط بود) (۱۳).

B. cereus گرم مثبت می‌باشد، اما سلول‌ها ممکن است در فاز ثابت تغییر گرم دهند، از مشخصات دیگر این ارگانیسم هوازی و بی‌هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت و اسپوردار می‌باشد. و بر روی نوترینت آگار رشد می‌کند و با آمینواسید و ویتامین‌ها غنی سازی می‌شود. توانایی سنتز آنزیم خارج سلولی، توکسین و آنتی بیوتیک را دارد برای نمونه پروتئیناز، آمیلاز، فسفولیپاز و همولیزین تولید می‌کند. می‌تواند عامل چندین عفونت و بیماری ناشی از غذا باشد. اسپور این باکتری همچنین توانایی چسبیدن به سلول‌های اپیتیال روده را دارد، پس از آن جوانه می‌زنند و آنترو توکسین تولید می‌کنند (۷).

B. cereus دو نوع بیماری ایجاد می‌کند که توسط دو نوع متابولیت گوناگون ایجاد می‌شود بیماری اسهال بوسیله یک پروتئین با وزن مولکولی بالا و مسمومیت غذایی بوسیله یک پروتئین مقاوم به حرارت با وزن مولکولی کم حاصل می‌شود (۱۵).

منابع مهم *B. cereus* عبارتند از خاک، شیر، گوشت، سبزیجات، غلات، ادویه و میوه‌ها (۱۰). به منظور بروز بیماری تعداد 10^5 تا 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر یا گرم از ماده غذایی لازم است. نکته مهم آن که در pH اسیدی معده سلول‌های رویشی و اسپورهای آن باقی می‌مانند (۹). نمودار ۱ رشد *B. cereus* را در دماهای گوناگون نشان می‌دهد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



نمودار ۱: رشد *B. cereus* در دماهای مختلف

با توجه به اینکه این ارگانیسم عامل ایجاد فساد و مسمومیت مواد غذایی از جمله شیر و فرآورده‌های آن می‌باشد و موجب خسارات اقتصادی به تولیدکنندگان و مصرف کنندگان می‌شود بنابراین با توجه به بار میکروبی بالای شیر در ایران (۴) این مطالعه با هدف اندازه‌گیری بار کلی میکروبی[1] و کلی فرم در مقایسه با *B. cereus* و ردیابی این باکتری در مراحل مختلف تولید شیر پاستوریزه صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق کلیه محیط کشت‌های میکروبی از شرکت مرک[2] آلمان خریداری گردید. نمونه‌ها در دو ماه اردیبهشت و خرداد از شرکت شیر سحر (شیر روزانه) واقع در استان قزوین تهیه گردید.

از مراحل تولید شیر پاستوریزه شامل شیر خام، بالانس تانک، خروجی سپراتور، خروجی پاستوریزاتور، تانک ذخیره شیرپاستوریزه نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در اسرع وقت و بر اساس استاندارد جهت آزمون‌های میکروبی به آزمایشگاه منتقل گردید (۶).

در این مطالعه سعی شده است که با توجه به معیارهای میکروبی بتوان به کیفیت میکروبی شیر پاستوریزه رسید، و رابطه بین میزان آلودگی شیر یعنی بارکلی میکروبی، اسپورهای هوازی، کلی فرم با میکروارگانیسم *B. cereus* را مشخص کرد.

شمارش کلی باکتری‌های مزوفیل بر اساس استاندارد به روش پورپلیت[3] با استفاده از محیط کشت پلیت کانت آگار انجام شد. سپس نمونه‌ها در ۱± ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ± ۴۸ ساعت نگهداری شده و پس از آن کلنی‌های ظاهر شده بر محیط کشت شمارش شدند (۱۶).

به منظور تعیین تعداد کلی فرم‌ها از استاندارد استفاده شد، و محیط کشت ویولت رد بایل آگار[4] مورد استفاده قرار گرفت . پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۱±۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از مدت زمان ذکر شده کلی فرم‌ها شمارش گردیدند (۱۷و۲۱).

جهت شمارش اسپورهای هوازی بر اساس استاندارد به روش پورپلیت با استفاده از محیط کشت

[1] total count
[2] Merk
[3] Pour plate
[4] Violed Red Bail Agar

پلیت کانت آگار انجام شد. سپس نمونه‌ها در ۱± ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ± ۴۸ ساعت نگهداری شدند و تعداد کلنی‌های ظاهر شده بر محیط کشت شمارش شدند (۱۶).

شمارش *B. cereus* بر اساس استاندارد به روش کشت سطحی با استفاده از محیط کشت اختصاصی (MYP) انجام شد. نمونه‌ها در ۱±۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از آن کلنی‌های ظاهر شده بر محیط کشت شمارش شدند (۲و۱۷).

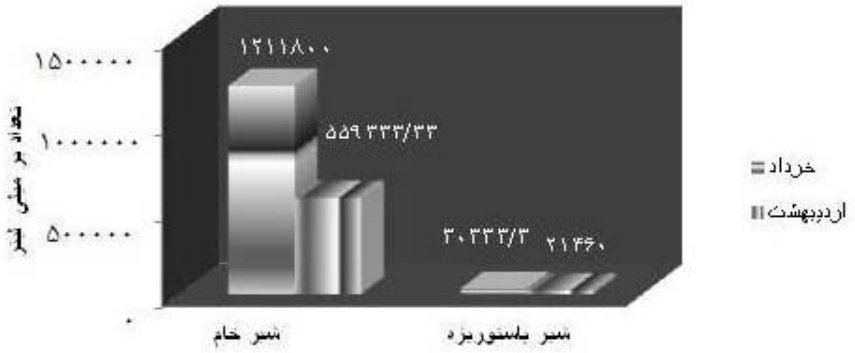
در مورد شیر خام در آغاز، شیر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلیسیوس حرارت داده شد. در نتیجه این عمل باکتری‌های مزاحم از بین رفتند و از آن جا که *B. cereus* اسپوردار می‌باشد در محیط باقی ماند (۷).

برای جدا کردن *B. cereus* از شیر پاستوریزه در رقت ۰/۱ به صورت کشت سطحی در محیط اختصاصی کشت داده شدند (۷).

ابتدا در ۶۰ روز متوالی، تعداد ۶۰ نمونه شیر به صورت مجزاء و در هر بار شروع استریلیزاسیون از مخازن ورودی شیر به دست می‌آید. همچنین پس از اتمام مراحل استریلیزاسیون نیز مجدداً از شیر استریل شده در مخازن خروجی نمونه‌گیری می‌شود. در مرحله بعد، پس از شمارش میکرورگانیسم‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌دار بین میانگین ۶۰ نمونه شیر قبل و بعد از استریلیزاسیون جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون غیر پارامتری kruskal wallis مورد استفاده قرار گرفت. و معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد بررسی شد.

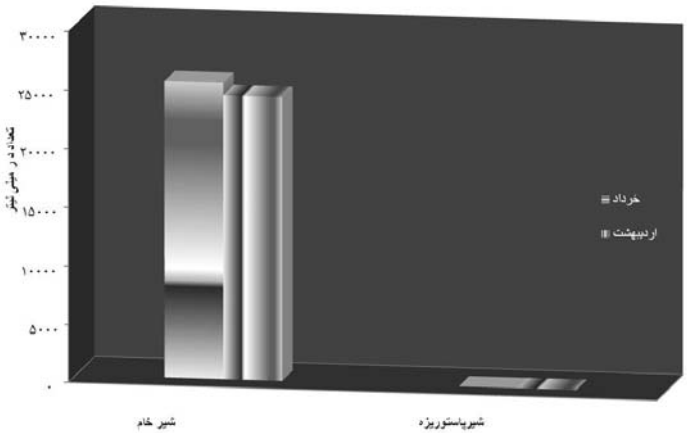
نتایج

نتایج شمارش میکروبی در نمونه‌های شیرخام و شیرپاستوریزه نشان داد که در دو ماه اردیبهشت و خرداد بار کلی میکروبی موجود در شیرخام و پاستوریزه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۱$). بار کلی میکروبی موجود در شیرخام ماه‌های مذکور تفاوت معنی‌دار دارد ($p<۰/۰۱$). روند تغییرات بارکلی میکروبی در نمودار ۲ نشان داده شده است.



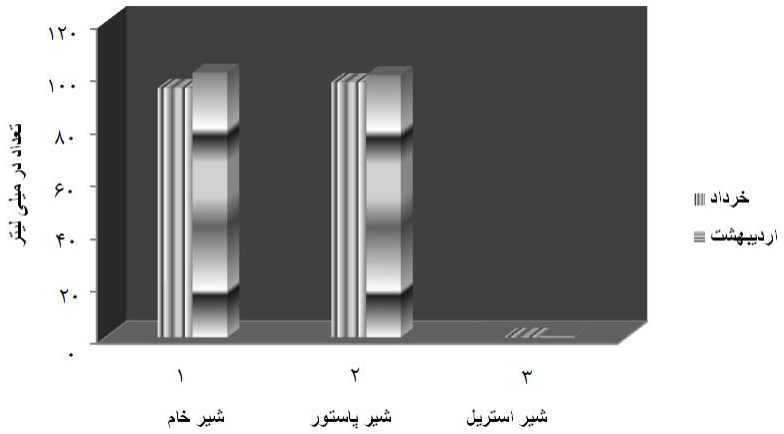
نمودار ۲: روند تغییرات بار کلی میکروبی در شیر خام و پاستوریزه

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که در دو ماه خرداد و اردیبهشت تعداد کلی فرم موجود در شیر خام و پاستوریزه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۱$). که می‌تواند تأثیر فرآیند پاستوریزاسیون را در از بین رفتن این میکروارگانیسم نشان دهد تعداد کلی فرم موجود در شیر خام خرداد و اردیبهشت تفاوت معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۱$). روند تغییرات کلی فرم در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۳: روند تغییرات کلی فرم

با توجه به بررسی‌های انجام شده و شمارش تعداد اسپورهای هوازی مشخص گردید، داده‌ها در طی دو ماه اردیبهشت و خرداد اختلاف معنی‌دار ندارند ($p<۰/۰۵$). در حالی که در ماه‌های مذکور بین تعداد اسپورهای موجود در شیرخام و شیر استریل تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۱$). هم چنین در دو ماه اردیبهشت و خرداد تعداد اسپور شیر پاستوریزه در مقایسه با تعداد اسپور شیر استریل تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$). تعداد اسپورهای شیرخام و شیر پاستوریزه در طی دو ماه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p<۰/۰۵$). نمودار ۴ روند تغییرات اسپورهای هوازی را در شیر نشان می‌دهد.

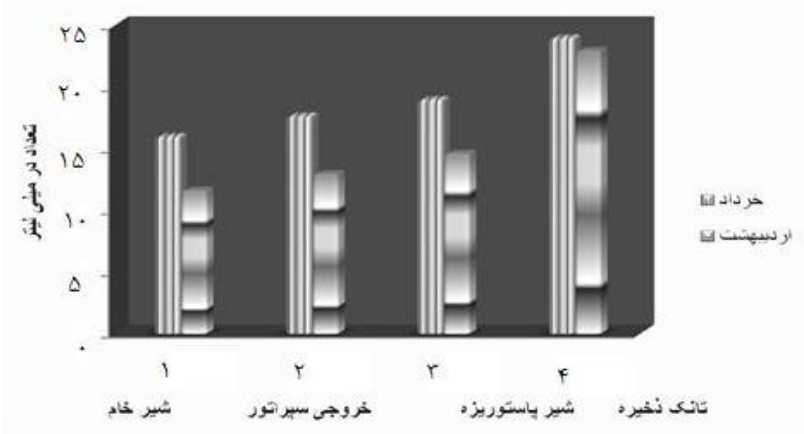


نمودار ۴: روند تغییرات اسپورهای هوازی در مراحل تولید شیر UHT

نتایج نشان داد که شیر خام دارای *B. cereus* می‌باشد و در هر میلی‌لیتر شیر ۱۰ تا ۲۰ کلنی مشخص گردید.کلنی‌های بزرگ صورتی با هاله رسوب‌دار را به عنوان *B. cereus* احتمالی شمارش می‌کنیم. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از شمارش *B. cereus* شیر خام با تانک ذخیره شیر پاستوریزه در دو ماه اردیبهشت و خرداد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$).

تعداد *B. cereus* شیر خام خرداد ماه با شیر خروجی سپراتور و پاستوریزاتور اردیبهشت ماه اختلاف معنی‌دار نشان می‌دهد ($p<۰/۰۱$). در حالی که *B. cereus* شیر خام دو ماه اختلاف معنی دار ندارد ($p<۰/۰۵$).

تعداد *B. cereus* شیر خروجی سپراتور دو ماه مذکور با شیر تانک ذخیره اختلاف معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۱$) که نشان دهنده افزایش تعداد این میکروارگانیسم در طی مسیر پاستوریزاسیون می‌باشد. نمودار ۵ روند تغییرات *B. cereus* را در مراحل تولید شیر پاستوریزه نشان می‌دهد.



نمودار ۵: روند تغییرات *B. cereus* در مراحل مختلف تولید شیر پاستوریزه

بحث

نتایج شمارش میکروبی در نمونه‌های شیرخام و شیرپاستوریزه نشان داد که در دو ماه اردیبهشت و خرداد بار کلی میکروبی شیر پاستوریزه کاهش یافت، می‌تواند تأثیر فرایند پاستوریزاسیون را در کاهش بار کلی میکروبی نشان دهد. بار کلی میکروبی موجود در شیرخام خرداد ماه نسبت به اردیبهشت ماه افزایش را مشخص کرد، می‌تواند نشان دهنده شرایط بهداشتی نامساعدتر خرداد ماه نسبت به اردیبهشت ماه باشد. احتمالاً به علت تأثیر بالا رفتن درجه حرارت هوا در خرداد ماه نسبت به اردیبهشت ماه است (۲۹).

در تمام نمونه‌های شیر پاستوریزه مورد آزمون تعداد کلی فرم‌ها پس از پاستوریزاسیون به صفر رسید، چند مورد کلی فرم در شیر پاستوریزه مشاهده گردید، که احتمالاً عوامل موثر در این مشاهده شامل ناکافی بودن فرایند حرارتی، آلودگی ثانویه، شستشوی ناکافی تانک‌های ذخیره و غلظت نامناسب سود و اسید باشند کلی فرم‌ها به عنوان شاخص رعایت بهداشت در طی فرایند و پس از پاستوریزاسیون به شمار می‌آیند. این

میکروارگانیسم‌ها از طریق نوک پستان، سطوح خارجی پستان، تجهیزات حمل و نقل و شیر دوشی، تانک‌های حمل شیر به شیر خام منتقل می‌شوند. در اثر فرایند پاستوریزاسیون غیر فعال می‌شوند، بنابراین حضور آن‌ها در شیر پاستوریزه شاخصی از آلودگی پس از فرایند و عدم رعایت موازین بهداشتی است (۱۱و۳۱).

تعداد اسپورهای هوازی بعد فرایند پاستوریزاسیون تغییری در آن مشاهده نشد. این نشان می‌دهد احتمالاً فرایند پاستوریزاسیون بر روی تعداد اسپورهای هوازی تأثیر چندانی نداشته است. تعدا اسپورهای هوازی بعد فرایند استریل کاهش یافت و در مواردی به صفر رسید، می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر فرایند استریل بر اسپورها باشد. چند موردی هم که اسپور در شیر استریل مشاهده شد برروی محیط کشت اختصاصی باسیلوس ثکثیر نشد و در رنگ‌آمیزی گرم وجود نوعی کوکسی مشخص گردید (۳۰).

نتایج افزایش *B. cereus* را در طی فرایند پاستوریزاسیون شیر نشان داد احتمالاً علت افزایش *B. cereus* در تانک ذخیره شیر پاستوریزه از بین رفتن و کاهش بار میکروبی شیر پاستوریزه می‌باشد. به علت از بین رفتن محیط رقابتی *B. cereus* در این شرایط مناسب ایجاد شده تکثیر می‌یابد. فرایند پاستوریزاسیون تعداد کل میکروارگانیسم‌های شیر خام را همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است ۹۰ تا ۹۹ درصد کاهش می‌دهد (۲۸). شیر پاستوریزه به علت فعالیت آبی مناسب، pH نزدیک خنثی، حضور ترکیبات نیتروژن دار و منابع کربنی در دسترس و عوامل رشد گوناگون وکاهش بار میکروبی محیطی مناسب جهت رشد *B. cereus* فراهم می‌کند (۳). رشد تدریجی میکروارگانیسم *B. cereus* و تغییرات متابولیکی ناشی از فعالیت آن در شیر پاستوریزه نگهداری شده در یخچال سبب فساد آن می‌گردد. این نتایج با نتایج ارئه شده توسط محققان مطابقت دارد (۲۰). می‌توان احتمال داد این مقدار افزایش تعداد *B. cereus* در طی مسیر پاستوریزاسیون نشان دهنده لانه گزینی و تکثیر *B. cereus* باشد، این نتایج با نتایج ارائه شده توسط محققان مطابقت دارد (۴، ۱۳، ۱۴، ۱۹، ۲۲، ۲۴، ۲۵ و ۲۶).

هم چنین نتایج کشت آب حاصل از شستشوی خطوط تولید و تجهیزات وجود *B. cereus* را نشان می‌دهد. می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که فرآیند شستشوی معمول خطوط با سود و اسید *B. cereus* را از بین نبرده است. *B. cereus* احتمالاً در خطوط لوله و تجهیزات خط تولید خصوصاً گوشه‌ها، زانوها، فیلترها و نقاط کور باقی مانده، تکثیر می‌یابد و سبب افزایش تعداد *B. cereus* در شیر پاستوریزه می‌شود (۷، ۲۳و ۲۷).

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری صمیمانه مدیریت شرکت سحر و سایر پرسنل محترم آن شرکت که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده اند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

۱. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۴۰۶، میکروبیولوژی شیر و فراورده های آن- ویژگی‌ها تجدید نظر دوم.
۲. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۳۲۴، میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام - روش شمارش *B.*

cereus احتمالی به روش کلنی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس- روش آزمون.

۳. قاسمیان صفایی، ح.، ۱۳۷۸. میکروب شناسی مواد غذایی. انتشارات مانی. صفحات ۲۵۲- ۲۵۴.

۴. مصلحی شاد، م.، ۱۳۸۸. رابطه شمار سلول‌های سوماتیک و تحولات میکروبی شیر پاستوریزه طی دوره ماندگاری.جله علوم غذایی و تغذیه. ش: ۶. ص: ۲- ۱۱.

5. Andersne, B.; Langsrud, T. and Terde, S., 2003. Inhibition of bacillus by strain of lactobacillus and lactocococeus in milk. Hnternational gournal of food microbiology. 205- 212.
6. Association of official analytical chemist., 1990. Official methds of analysis of the AOAC. (15 th ed). Arlington, USA.
7. Birgitta, S.; Eneroth, A. and Brendehaug, J., 2000. Involvement of a pasteurzer in the contamination of milk by Bacillus cereus in a commericaldairy plant. Journal Dairy reseach. 455-460.
8. Birgitta, S.; Kerstin, E.; Hiroshi, O. and Anders, Ch., 2004. Characterization of bacillus cereus isolated from milk silo tank at eight different dairy plant. International dairy journal. 17- 27.
9. Bramley, A.J. and Mckinnon, C.H., 1990. The micro biology of raw milk. In: robinson, R.K.(ed) dairy microbiology. Vol: 1 elsevier applid science, London,p. 163-204.
10. Britz, T.J. and Rabinson, K.R., 2008. Advanced dairy science and technology. Published by Blackwell publishing LTD. 108- 111.
11. Buzby, J.C., 2001.children end microbial foodborne illness.food review, 24(2), 32-37.
12. Christiansson, A. and Te Giffel, M.C., 2001. Bacillus cereus in milk and milk prducts. Agricultural university wageningen. 40- 46.
13. Gerrit, S., 2000. Good hygienic practice in milk processing.dairy processing improving qual. 4: 56-67.
14. Gitahi, J.; Jackson, N.; Nduati, W. and Gicheru, M., 2009. Genetic characterization of food borne bacillus cereus strains from milk, chees and rice by multiplex PCR assay. Public health pharmacology and toxicology, university of Nairobi, Kenya zoological sciences, Kenyatta university.ity.68-80.
15. Greth, I.; Borge, A.; Skeie, M.; Sqrhaug, T.; Langsrud, T. and Granum, P.E., 2001. Growth and toxin profiles of Bacillus cereus isolated from different food souces. Journal of food microbiology. 237- 246.
16. Iso 8261/IDF 122020010 milk and milk products- general Guidance For the preparation of test samples initial Suspension and decial dilutions for microbiological examination.
17. IDF standard 73B (1998). ENUMERATION of coliforms.
18. IDF standard 181 (1998). ENUMERATION of Bacillus cereus, Janstova, B.; Lukasova, J.; Drackova, M. and Vorlova, L., 2004. influence of Bacillus spp. Enzymes on ultra High temperature- treated milk proteins. ACTA VET. BRNO 2004,73: 393- 400.
19. Manvi S. and Anand, S.K., 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry. Food control. 469- 477.
20. Marshall, R.T, ed., 1992. Standard method For the examination of dairy products. 16 th ed. Am. publ. health Assoc., Inc., Washington, Dc.
21. Ndhiu, J.; Jackson, N.; Nduati, W. and Gicheru, M., 2009. Genetic characterization of food borne bacillus cereus strains from milk, cheese and rice by multiplex PCR assay. Public healht pharmacology and toxicog, university of Nairobi. 82-86.
22. Perchat, S.; Buisson, C.; Chaufaux, J.; Sanchis, V. and Lereclus, D., 2005. bacillus cereus produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxin. J. invertebr. puthol . 90: 131-133.

23. Pilar, T.; Zulmira, L.; Joana A.; Rosario O. and Joao, M., 2005. Physico- chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. Food microbiology. 247- 251.
24. Schoen, J. and Wong, C., 1999. Heterogeneity observed in the components of hemolysin BL , an enterotoxin produced by bacillus cereus. Int. j. food microbiol. 53:159-167.
25. Shaheen, R.; Svensson, B.; Andersson, M.A. and Christiansson, A., 2009. Persistence strategies of bacillus cereus spores isolated from dairy silo tank.food microbiology.food microbial.27: 347- 355
26. Te Giffel, M.C.; Beumer, R.R.; Granum, P.E. and Rombouts, F.M., 1997. isolation and characterization of bacillus cereus from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. International journal of food microbiology. 307- 318.
27. Rebecca, J.; Phelps and Johan, L. Mckllip, 2002. Enteroxin production in natural islates of bacillaceae of bacillus cereus grup . 68: 3147- 3151.
28. Robberston, G.L., 2006. FOOD packaging: prienciles and practice. CRC press. 388-390.
29. Roux, Y.L.E.; Laurent, F. and Moussaui, F., 2003. Polymorphonuclear prtelyticactivity and milk compositin change.34:629- 645.
30. Walstra, P.; Boekel, V.; Noomen, A.; Jelema, A. and Gerts, T.J., 1999. Dairy technology- principle of milk properties and processes. New York, 153- 170.