



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

میکروبیولوژی شیر

تئوری آزمایش:

■ شیر: منبعی غنی شده از پروتئین و قند و املاح و ویتامین هاست و مهم ترین عامل در مسمومیت انسانها محسوب می شود. بسیاری از بیماری های واگیردار از جمله : سل ، تب مالت ، تیفوئید ، عفونت های استرپتو کوکی و ... از طریق شیر منتقل می شوند. در حالت معمول نباید انتظار داشت که جمعیت مشخصی از میکروارگانیسم ها وجود داشته باشند و یا شیر دارای فلور طبیعی باشد. در شرایط ایده آل شیر باید استریل باشد.

منشاء وجود میکروارگانیزم ها در شیر:

- 1- از طریق بافتهای بدن دام
- الف) دام درگیر بیماری سیستمیک باشد. در این حالت میکروب در همه ترشحات بدن یافت می شود.
- ب) دام مشکل عمومی ندارد، و تنها دچار ماستیتیس mastitis (ورم پستان) است. بنابراین عوامل از طریق شیر منتقل می شوند.
- 2- آلودگی در حین مراحل شیردوشی و پس از آن
- * همیشه حضور و فعالیت میکروارگانیزم ها در شیر ناخواسته نیست، حضور و فعالیت کنترل شده میکروارگانیزم ها در شیر، راه عمده تولید فرآورده های لبنی در شرایط کنترل شده است.



تهیه کننده : سهیلا عباسی

4 دسته از فعالیت میکروارگانیسم ها در محصولات لبنی:

- 1- تولید اسید : مهم ترین باکتری هایی که فعالیت تولید اسید در شیر را برعهده دارند در تولید ماست مورد استفاده قرار می گیرند. لاکتوز را به لاکتیک اسید تبدیل می کنند.
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
استرپتوکوکوس لاکتوس
میکروباکتریوم لاکتیوم
- 2- تولید گاز: معمولا آن دسته از میکروارگانیسم ها که تولید اسید می کنند ، تولید گاز نیز می کنند. این عمل در تولید دوغ و پنیر مطرح است.
- 3- ایجاد لخته و یا دلمه شیر: انعقاد پروتئین کازئین شیز عامل این لختگی است. رنین باعث لخته شدن شیر می شود. در تولید پنیر مورد استفاده قرار می گیرد. روند تولید پنیر ، یک روند آنزیمی است. آنزیمهای بسیاری از باکتریها باعث لخته شدن شیر می شوند از جمله: پسدوموناسها ، باسیلها.
- اما این روند همیشه یک روند آنزیمی نیست، بلکه تغییر در pH هم باعث چنین انعقادی می شود.
- 4- تجزیه چربی ها: به واسطه لیپاز موجود در میکروارگانیسم ها چربی به اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه می شود، که عامل تغییردر طعم و رنگ و بوی مواد لبنی است.

فرآیند پاستوریزاسیون:

- ▶ فرآیندی که با اعمال دما میکروارگانیسم های رویشی بیماریزای شیر را به حداقل می رسانیم.
- ▶ روش 1) اعمال دمای پایین (7/61 درجه سانتیگراد) در مدت زمان بالا (30 دقیقه)
- ▶ روش 2) HTST اعمال دمای بالا (7/71 درجه سانتیگراد) در مدت زمان کم (15 الی 30 ثانیه)



روشهای بررسی میکروبیولوژیک شیر:

➤ 1- رنگ آمیزی گرم:

➤ روش کار:

➤ رقت 1/0 از شیر را تهیه کرده و گسترش را آماده کرده و فیکس می کنیم و لام را حدود 1 دقیقه در گزیلول (عامل حذف چربی های شیر) قرار می دهیم. بعد از تبخیر گزیلول و خشک شدن لام، رنگ آمیزی گرام کرده و تسخیص می دهیم. در لام تهیه شده به دنبال:

➤ 1- میکروکوکسی

➤ 2- لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

➤ باسیل های نسبتا بلند، گرام مثبت

➤ 3- استرپتوکوکوس لاکتوس

➤ کوکسی های زنجیری، گرام مثبت

➤ 4- میکروباکتریوم لاکتیوم

➤ فاقد اسپور، مقاوم به دما

2- روش آزمایش احیای متیلن بلو یا تست ردوکتاز:

- حیات تمام موجودات از جمله میکروارگانیسم ها وابسته به متابولیسم است ، عمده واکنشهایی که در متابولیسم رخ می دهد ، اکسیداسیون و احیا است. برخی از ترکیبات شیمیایی مثل برخی از رنگها از جمله متیلن بلو می توانند در شرایط آزمایشگاهی در نقش پذیرنده های الکترون باشند، وقتی احیا می شوند بی رنگ می شوند.
- اگر به نمونه شیر مشکوکی متیلن بلو اضافه کنیم و بی رنگ شود ، احیای متیلن بلو دلیل بر پذیرش الکترون است و الکترونهایی در میکروارگانیسم های شیر وجود دارد که باعث اکسیداسیون و احیا می شود و متیلن بلو نیز احیا می شود.

روش کار:

- 5 لوله به شرح زیر تهیه می کنیم:
- لوله اول 9 سی سی شیر + 1 سی سی آب مقطر + 1 سی سی متیلن بلو = رقت: 0.9
- لوله دوم 8 سی سی شیر + 2 سی سی آب مقطر + 1 سی سی متیلن بلو = رقت 0.8
- لوله سوم 7 سی سی شیر + 3 سی سی آب مقطر + 1 سی سی متیلن بلو = رقت 0.7
- لوله چهارم 6 سی سی شیر + 4 سی سی آب مقطر + 1 سی سی متیلن بلو = رقت 0.6
- لوله پنجم 5 سی سی شیر + 5 سی سی آب مقطر + 1 سی سی متیلن بلو = رقت 0.5
- لوله ها آبی رنگ می شوند و سر لوله ها را با پارافیلیم می بندیم. زمان بی رنگ شدن متیلن بلو در لوله اول ملاک قضاوت است. سرعت بی رنگ شدن متیلن بلو ارتباط مستقیم با تعداد و فعالیت میکروارگانیزم های شیر دارد. اگر در حالتی لوله دوم بی رنگ نشد ولی لوله سوم بی رنگ شد، در می یابیم که آزمایش درست انجام نگرفته است. باید لوله ها به ترتیب بی رنگ شوند.

نتیجه:

- 1. اگر شیر در لوله اول در زمانی بیش از 5:30 ساعت بی رنگ شود ، تعداد باکتری ها در 1 سی سی از شیر کمتر از 500000 است. شیر بسیار خوب است.
- 2. اگر شیر در لوله اول در زمانی بین 2 تا 5:30 ساعت بی رنگ شود ، تعداد باکتری ها در 1 سی سی از شیر بیش از 500000 و کمتر از 4 میلیون است. شیر قابل قبول است.
- 3. اگر شیر در لوله اول در زمانی بین 2 ساعت تا 20 دقیقه بی رنگ شود ، تعداد باکتری ها در 1 سی سی از شیر بین 4 تا 20 میلیون است. شیر بد است.
- 4. اگر شیر در لوله اول در زمانی کمتر از 20 دقیقه بی رنگ شود ، تعداد باکتری ها در 1 سی سی از شیر بیش از 20 میلیون است. شیر غیر قابل مصرف است.

3- روش بررسی میکروبی با شمارش تعداد میکروب ها:

روش کار:

■ در این روش برای شیر پاستوریزه رقت 0.01 و برای شیر خام رقت 0.0001 تهیه می کنیم. سپس کشت می دهیم و با شمارش پرگنه ها به قضاوت می پردازیم.



تهیه کننده : سهیلا عباسی

- شیر هنگامی که از پستان دام سالم دوشیده شود ، دارای تعداد بسیار کمی باکتری است یا به عبارت دیگر بارمیکروبی کمتر از 1000 باکتری در میلی لیتر دارد. البته این مقدار در دامهای مختلف تا حد زیادی متغیر است و در مواردی حتی تا 15000 میکروارگانیسم در میلی لیتر نیز می رسد .شیر به دلیل رطوبت کافی ، pH نزدیک به خنثی ، غنی بودن مواد غذایی محیط مناسبی برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم هاست .
- در ضمن منبع غنی از انرژی در شکلهای مختلف نظیر قند شیر(لاکتوز)، ترکیبات نیتروژنی مانند پروتئین ها ، اسیدهای آمینه و... می باشد. بسیاری از ترکیبات ضد میکروبی (لاکتوپراکسیداز ، آگلوتنین) در شیر تازه دوشیده شده وجود دارند، اما به علت تخمیر قند و تولید اسید توسط باکتریهای معمول شیر خام به سرعت بی اثر می شوند. بنابراین بسیاری از میکروارگانیسم ها قادر به رشد در چنین محیطی هستند.

البته گروهی از این میکروارگانیسم ها نظیر برخی از گونه های باکتریهای اسید لاکتیک مفیدند و برای تولید فراورده های مختلف شیری مورد استفاده قرار می گیرند.

- این باکتریهای لاکتیکی عمدتاً از کربوهیدراتهایی نظیر لاکتوز استفاده می کنند و اسیدلاکتیک تولید می کنند. این میکروارگانیسمها نظیر لاکتوکوکس و لاکتوباسیلوس هستند. لاکتوکوکس لاکتیس زیر گونه لاکتیس و کروموریس به سرعت به ویژه در دمای حدود 20 درجه سانتی گراد رشد می کنند .
- بنابراین شیر در صورتیکه سرد نشود ترش می شود. البته قبل از اینکه شیر کاملاً ترش شود برای فرآوری مناسب نیست.
- باکتریهای اسیدلاکتیک مزوفیل توسط پاستوریزاسیون (15"/72°C) و حتی ترمیزاسیون (15"/65°C) می میرند، اما انواع ترموفیل نظیر استرپتوکوکوس تروفیلوس تحت چنین شرایطی از بین نمی روند و البته لازم به ذکر است که برخی از استرپتوکوکوکهایی که به ویژه در اثر بیماری ورم پستان افزایش می یابند بیماریزا هستند.

کلی فرم ها

کلی فرم ها متعلق به خانواده انتروباکتریاسه ، بی هوازی اختیاری با اپتیمم دمای رشد 37 درجه سانتی گراد، قادرند لاکتوز را تخمیر و تولید گاز و اسید نمایند. این میکروارگانیسمها اساسا بیماریزا نیستند، اما برخی از گونه های ECOLI بیماریزا می باشند. کلی فرمها طی فرایند پاستوریزاسیون سریع از بین می روند و حضورشان در شیر بیانگر آلودگی ثانویه است.

میکروارگانیزم های سرماگرا

- شامل انواعی از میکروارگانیزمها نظیر سودوموناس، اکروموباکتر، فلاوباکتریوم، آلكالی ژنز هستند، که در دمای زیر 15 درجه سانتی گراد به راحتی رشد می کنند و حتی در دمای 4 درجه سانتی گراد نیز قادر به رشدند. دمای اپتیمم رشدشان 20الی 30درجه سانتی گراد است. میکروارگانیزمهای سایکروتروف از عمده ترین عوامل فساد شیر محسوب می شوند.
- اغلب آنها طی فرایند پاستوریزاسیون از بین می روند ، اما برخی از آنها مثل سودوموناس فلورسنس و سودوموناس فراچی آنزیم های لیپولیتیک و پروتئولیتیک مقاوم به حرارت تولید می کنند و عامل ایجاد عطر و طعم نامطلوب و تغییرات فیزیکوشیمیایی حتی در شیر استریل می شوند ، به عنوان مثال از طریق هیدرولیز پروتئین ها ایجاد طعم تلخی می کنند وتعداد بیش از 10⁵×5 میلی لیتر آنها در شیر نامطلوب است.

باکتری های مقاوم به حرارت

- ▶ باکتریهای مقاوم به حرارت باکتریهایی هستند که پس از عملیات پاستوریزاسیون نیز باقی می مانند ولی در دمای پاستوریزاسیون قادر به رشد نیستند. این باکتریها غالبا شامل گونه های میکروکوکوس، مایکوباکتریوم، استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، گونه های کورینه فرم، باسیلوس وکلستریدیوم می باشند.
- ▶ برخی از باکتریها نظیر مایکوباکتریوم لاکتیوم، استرپتوکوکوس ترموفیلوس و گونه های خاص میکروکوکوس اسپور تولید نمی کنند، اما سلولهای رویشی آنها در دمای پاستوریزاسیون یا در مواردی نظیر استفاده از دمای بالا در طی عملیات شستشوی واحدهای تولید شیر فعال می مانند. این باکتریها در دمای بالاتر از 80 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه از بین می روند. منابع اولیه آلودگی به باکتریهای ترومودوریک، شستشو و ضد عفونی ناقص پستان و تجهیزات شیردوشی می باشد.

اسپوره‌های باکتریایی:

■ باسیلوس و کلستریدیوم قادر به تولید اسپوره‌های مقاوم به حرارتند و اغلب از طریق خاک و گرد و غبار و غذای دام وارد شیر می شوند. بعضی از گونه های مهمی که در این گروه قرار دارند شامل باسیلوس سرئوس ، باسیلوس سوبتیلیس ، باسیلوس استئاروترموفیلوس می باشند.

اسپور باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس استئاروترموفیلوس مقاوم به حرارت بوده و در صورتیکه استریلیزاسیون در حد کفایت نباشد عامل فساد این محصولات می شوند، اما اسپور باسیلوس سرئوس چندان مقاوم به حرارت نمی باشد.

میکروارگانیزم‌های عامل فساد:

- فساد به معنای تخریب بافت ، رنگ ، بو یا طعم مواد غذایی است که از نظر مصرف کننده نامطلوب است، فساد میکروبی غذا اغلب شامل تجزیه پروتئین ها ، چربیها توسط میکروارگانیزمها یا آنزیمهای آنهاست.
- در شیر میکروارگانیزمهایی که عمدتاً در فساد نقش دارند، میکروارگانیزمهای سایکروتروف هستند. به طور کلی میکروارگانیزمهای عامل فساد از طریق مصرف مواد مغذی مورد نیازشان که شامل لاکتوز ، پروتئین ، چربیها و سایر مواد لازم جهت رشدشان عامل ایجاد ، رنگ و طعم نامطلوب و افت پایدار حرارتی شیر و فراورده های آن می شوند.

میکروارگانیسم های بیماریزا:

- بیش از 200 نوع بیماری از طریق مصرف مواد غذایی آلوده به باکتریها ، قارچها ، ویروسها و انگلها به انسان منتقل می شوند .سالانه در آمریکا 76 میلیون نفر در اثر مصرف این غذاها بیمار می شوند، که از میان آنها 300000 نفر در بیمارستان بستری و پنج هزار نفر نیز جان خود را از دست می دهند.این در حالی است که آمریکا یکی از ایمن ترین تأمین کنندگان غذا در دنیا به شمار می آید
- مواد غذایی با منشأ حیوانی نظیر گوشت گاو ، ماکیان، حیوانات دریایی و شیر و تخم مرغ عمده ترین منابع آلودگی وانتقال بیماری به انسان محسوب می شوند .معمولترین میکروارگانیسهای بیماریزا شامل : کامپیلوباکتر ججونی، سالمونلا ، لیستریا ، توکسوپلازما و ECOLI می باشند.همانگونه که اشاره شد از طریق شیر نیز میکروارگانیسم های بیماریزا می توانند به انسان منتقل شوند، که در اینجا به آنها اشاره خواهیم کرد.

➤ مایکوباکتریوم توبرکلی سیس:

➤ میکروارگانیسم بیماریزایی است که از طریق گاو یا کارگر شیر دوش آلوده به شیر منتقل می شود . در میان بیماریزایی که اسپور تولید نمی کنند میکروب مقاوم به حرارت می باشد که در اثر پاستوریزاسیون از بین می رود.

➤ کامپیلوباکتر ججونی:

➤ میکروبهای روده ای هستند و بروز اسهال و دردهای شکمی از نشانه های ابتلا به کامپیلوباکتریوزیس به شمار می آیند. این میکروارگانیسم ها بسیار حساس به حرارت بوده و در اثر پاستوریزاسیون از بین می روند.
کامپیلوباکتر معمولترین عامل بروز بیماری با منشأ غذایی است و کودکان زیر یکسال بیشترین گروه در معرض خطر هستند ، دومین گروه سنی که بیشتر در معرض خطر ابتلا به بیماری قرار دارند جوانان 20 الی 29 سال می باشند.

➤ سالمونلا:

➤ سالمونلا وشیگلا از طریق آب آلوده یا از طریق کود به شیر منتقل می شود و عامل بروز بیماریهای روده ای می گردند.
مصرف مواد غذایی آلوده با منشاء حیوانی نظیر گوشت گاو ، گوشت ماکیان ، حیوانات دریایی ، تخم مرغ ، شیر و فراورده های آن عامل شیوع سالمونلوزیس می شود. بزرگترین مورد شیوع بیماری در سال 1985 در شیکاگو با 200000 مورد ابتلا به بیماری و 14 مورد مرگ رخ داد. کودکان زیر ده سال و نوزادان بیشتر در معرض خطر ابتلا به این بیماری قرار دارند

لیستریا منوسایتوجنس:

لیستریا منوسایتوجنس *Listeria monocytogenes* میکروارگانیسمی بیماریزا، هوازی، گرم مثبت است که در دمای 5 °C رشد می کند. عامل بروز مننژیت، سقط جنین و در مواردی مرگ می شود. اکثر مواد غذایی می تواند به این میکروارگانیسم آلوده شوند اما در میان آنها گوشت ماکیان و محصولات شیری به عنوان مهمترین منابع آلودگی محسوب می شوند. بزرگترین مورد شیوع لیستریوزیس در آمریکای شمالی (لس آنجلس) در سال 1985 در اثر مصرف پنیر نرم آلوده به این میکروارگانیسم رخ داد، 140 مورد ابتلا به بیماری شامل 13 مورد مننژیت، حداقل 48 مورد مرگ و 20 مورد سقط جنین و تولد زودرس گزارش شد.

سایر میکروارگانیسم های بیماریزا

بسیار میکروارگانیسم های بیماریزای شیر شامل استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، ویبریو کلرا، کوکسیلا برنتی، گلستریدیوم پرفرنژنس، لپتوسپیرا، اکتینومیسس و... می باشند. که از میان آنها استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان مهم ترین میکروارگانیسم عامل بروز بیماری ورم پستان در دنیا محسوب می شود و غالباً تولید بیموم مقاوم به حرارت می کند و عامل التهاب غدد پستانی دام می شود. استرپتوکوکوس آگالاکتیه و اشرشیاکلی نیز که از عوامل بروز بیماری ورم پستان هستند، برای انسان بیماریزا می باشند. کوکسیلا برنتی نیز که متعلق به خانواده ریکتسیا می باشد و عامل تب Q است یکی از میکروارگانیسم های عامل بیماری ورم پستان محسوب می شود. البته این میکروارگانیسم در شیر دام های سالم نیز وجود دارد و در دمای 15/72 °C از بین می رود اما در 30 / 60 °C فعال باقی می ماند.

