

بررسی منابع آلودگی شیر به انواع اسپورهای کلستریدیوم

دکتر سید مهدی رضوی روحانی *

خلاصه

میکروارگانیسیمهای غیر هوازی تولید کننده اسید بوتیریک می توانند در بعضی از انواع پنیر تولید گاز و بوی نامطبوع نمایند. گاز دیررس که توسط این ارگانیسیمها در پنیر بوجود می آید ضمن ایجاد فساد در محصول موجب ضرر اقتصادی نیز می گردد. چون گلستریدیا از منابع مختلف مانند بستر و فضولات دامی و خاک و مواد غذایی و بخصوص سیلوی با کیفیت نامرغوب وارد شیر می شوند، در این بررسی سعی شده است منابع آلودگی شیر به انواع کلستریدیوم مشخص گردد.

نتایج حاصله که در تابلوهای شماره ۳-۱ آمده است بیانگر سطح بالای آلودگی در زمستان بخصوص هنگام مصرف دام از سیلوی با کیفیت بد می باشد. همچنین اثر مثبت شستشو در کاهش آلودگی شیر و سوابهای سرپستان تاکید گردیده است. تعداد میکرو ارگانیسیمها در مدفوع خیلی بالاتر از بستر دام بوده و تعداد آنها در مواد خوراکی دام حداقل و در نمونه های آبکشی که از دستگاه شیر دوشی و تانکهای شیر تهیه گردید تقریباً برابر صفر بود. از ۷۵ نمونه آزمایش شده از منابع مختلف ۱۶ مورد *C. perfringens* ۱۱ مورد *C. butyricum* و ۸ مورد *C. tyrobutyricum* و ۵ مورد *C. beijerinckii* جدا گردید.

مقدمه

گونه های جنس کلستریدیوم که متعلق به گروه بوتیریک هستند در فساد مواد غذایی مختلف شامل پنیر، شربتها، غذاهای کنسرو شده، آب گوجه فرنگی، زیتون و آب انگور نقش دارند (۲).

* گروه آموزشی بهداشت مواد غذایی - دانشکده دامپزشکی - دانشگاه ارومیه

در صنایع پنیر سازی مهمترین ضایعه حاصله توسط این گروه از باکتریها به تورم دیررس^۱ معروف است که چند هفته بعد از تولید پنیر حاصل می شود. این عیب بخصوص توسط گونه های تخمیر کننده لاکتات کلاستریدیوم نظیر *C. butyricum* و *C. tyro butyricum* بوجود می آید که نقش دومی مهمتر است زیرا می تواند در شرایط نامساعد رشد از قبیل اسید و نمک باقی مانده، تکثیر یافته و گاز دیررس ایجاد نماید (۱۴، ۱۳، ۱۰، ۲). فعالیت کلاستریدیو مها بیشتر در پنیرهایی دیده می شود که دارای لخته سخت تری بوده و مدت رسیدن طولانی تری دارند، مثل پنیرهای گرویر، آدام،^۲ چدار^۴ و سویس^۵. رشد کلاستریدیومها در پنیر علاوه بر امکان ایجاد تورم و شکاف، با ظهور طعم اسیدی، حفرات بزرگتر و بیشتر از حد معمول و بوی بد نیز همراه می باشد (۳، ۲). اعضای جنس کلاستریدیوم در بستر و مواد مدفوعی و لوله گوارش انسان و دام یافت می شود، و می تواند از طریق مدفوع، خاک، مواد غذایی دام و بخصوص سیلووارد شیر شود (۱۲). سیلوئی که در زمستان به عنوان جیره غذایی دام به کار می رود منبع اصلی آلودگی شیر است، بخصوص که اگر در شرایط نامساعدی نگهداری شده باشد. چنین سیلوئی معمولا " حاوی اسپورهای بی هوازی بخصوص از نوع *C. tyrobutyricum* است که مسیر لوله گوارش گاو را طی کرده و در بستر و مواد مدفوعی جمع می شود. لذا در هنگام دوشش، درجه آلودگی شیر به اسپور کلاستریدیومها قویا " بستگی به رعایت بهداشت شیر دوشی خواهد داشت. ولی حتی با کاربرد روشهای مدرن شیر دوشی نیز نمی توان از آلودگی هر چند خیلی مختصر اجتناب جست (۱۰، ۴، ۳).

باتوجه به اهمیت کلاستریدیومها در صنایع پنیر سازی و ذکر این مطلب که در صورت افزایش انواع کلاستریدیومها بخصوص افزایش کلاستریدیوم تایرو بوتیریوم شیر به پیش از ۱۰ عدد در هر میلی لیتر، این شیر برای تهیه بعضی از انواع پنیر نامناسب تشخیص داده می شود. (۵)، در این بررسی سعی شده است با تعیین میزان آلودگی منابع مختلف به کلاستریدیوم و تعیین گونه های آن در فصول سرد و گرم، معیاری از نحوه آلودگی شیر به انواع کلاستریدیوم بدست آید.

1-Late blowing

2- Gruyere

3- Edam

4- Cheddar

5- Swiss

مواد روش کار

از گاوداری مزرعه موسسه تحقیقاتی NIRD^۱ در ردینگ انگلستان نمونه‌گیری بعمل آمد. نمونه شیر وسواب از نوک پستان گاوها قبل و پس از شستشوی معمول روزانه تهیه گردید. همچنین از تانک ذخیره شیروماشین شیر دوشی دامپروری بطریقه آبکشی و از فضولات دام و انواع بستر و مواد خوراکی دام بطور تصادفی نمونه برداری بعمل آمد (۹) برای شمارش اسپورکلوستریدیاها از روش MPN^۲ استفاده گردید و با مراجعه به جداول مک‌کرادی^۳ شمارش انجام شد. بدین منظور پس از نابودی فرمهای رشته‌ای^۴ کلوستریدیاها که با قرار دادن نمونه‌ها بمدت ۱۵ دقیقه در حمام آب ۸۵ درجه سانتیگراد انجام می‌گرفت. یک میلی‌لیتر از هر وقت در ۳ سری لوله سه تایی محتوی محیط RCMB^۵ کشت و به منظور حصول نتیجه به مدت ۱۴-۱ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد (۱۲، ۶، ۱۱). برای تهیه سوشهای خالص کلوستریدیوم با استفاده از محیط RCMA^۶ و رعایت شرایط بی‌هوازی چندین کشت مجدد بعمل آمد (۸، ۶) و سپس با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی و مرفولوژیکی طبق روش شرح داده شده توسط کودکاف^۷ و شارپ^۸ در سال ۱۹۶۶ سوشهای موجود مورد شناسایی قرار گرفتند.

نتایج

نتایج حاصله در تابلوهای شماره یک الی سه نشان داده شده است.

1- National Institute for Research in Dairing. 2- Most Probable Number. 3- Mc Crady. 4-Vegetative forms. 5- Reinforced Clostridial Medium Broth. 6-Reinforced Clostridial Medium Agar. 7-Goudkov 8- Sharpe.

تابلوی شماره ۹- شمارش اسپورهای گلسترید بوم در شیروسوابهای سرپستان قبل و بعد از شستشوی پستان

ردیف و تعداد نمونه	تاریخ	شیرپستان نشسته (تعداد اسپور)	شیرپستان شسته (تعداد اسپور)	سواب پستان نشسته (تعداد اسپور)	سواب پستان شسته (تعداد اسپور)
۱	۱۲/۹	۱۵	۵۵۰	۵۵۰/۰	NT
۲	۱۲/۱۲	۱۱۰	۷۰۰	۱۲۵/۰	"
۳	"	۹	۷۵۰	۷۰۰/۰	"
۴	"	۴	۲۲۵	۲۲۵/۰	"
۵	"	۴	۴۷۵	۴۷۵/۰	"
۶	"	۴	۲۷۵	۲۷۵/۰	"
۷	۱۲/۲۳	۲/۵	۳	۵۵۰/۰	۵۵۰/۰
۸	"	NT	NT	۱۲۵/۰	۱۲۵/۰
۹	۱/۸	۲/۵	۴۸	۷۰۰/۰	۷۰۰/۰
۱۰	"	NT	NT	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
۱۱	۱/۲۲	۰/۴	منفی	۱۲/۵	۱۲/۵
۱۲	"	NT	منفی	۲۲/۵	۲۲/۵
۱۳	۳/۱۶	منفی	منفی	"	"
۱۴	"	"	"	"	"
۱۵	۳/۲۳	"	"	"	"
۱۶	"	"	"	"	"
میانگین شمارش اسپور	۱۱/۶	۰/۸۷	۲۸۳	۱۵۱	

* گاوها در مرتع بودند.
** آزمایش انجام نشده است.

تابلوی شماره ۲ - شمارش اسپوره‌های کسترید بیوم در نمونه‌های متفرقه

آبکشی هم	مواد مدفوعی	مواد بستری (هرگرم)	مواد خوراکی دام (در هر گرم)	تاریخ	تعداد نمونه		
تاک شیر ماشین شيرودوشی	تاک شير (در هر گرم)	کاهی	ماسه‌ای	تفاله چغندر	علوفه خشک	سیلوی ذرت	میانگین شمارش اسپور
NT	NT	NT	NT	۰/۴ NT	۴۵/۰ NT	۲/۵ NT**	۱۲/۲۹
"	"	"	۹۰۰۰	"	"	"	۱۱/۱۰
"	"	۱۴۰۰	"	"	"	"	۱/۱۲
"	"	۱۴۰	"	"	"	"	۱۲/۹
"	"	۴۵۰۰۰	"	"	"	"	۱/۲۸
"	۹۵	NT	"	"	"	"	۳/۱۶
"	۴۵۰	"	"	"	"	"	۳/۲۳
منفی	NT	"	"	"	"	"	۲/۴
"	"	"	"	"	"	"	"
"	۲۷۳	۱۵۵۰۰	۹۰۰۰	۰/۴	۴۵/۰	۲/۵	میانگین شمارش اسپور

* گاوها در مرتع بودند

** آزمایش انجام نشده است

تابلوی ۳- تعداد گونه‌های کلوستریدیوم که از منابع متفاوت جدا شده‌اند .

جمع	مواد	بستر	بستر	آبکشی‌ها	خشک چغندر	علوفه تفاله	* * *		تعداد نمونه	
							سیلو	شیر		
	مدفوعی	کاهی ماسه‌ای	تازک	پستان نشسته	پستان نشسته	شیر سرپستان	شیر سرپستان	پستان شسته		
۷۵	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۱۸	۱۳	۱۰	C.tyrobutyricum
۸	۲	****	۱	-	-	-	۲	-	-	C.tyrobutyricum
۱۱	-	"	۲	-	-	-	۳	۱	۲	C.butyricum
۵	-	"	-	-	-	-	-	۱	-	C.brijerinckii
۱۶	۲	"	۱	-	-	-	۲	۵	-	C.perfringens

* از مزارع مختلف نمونه گیری بعمل آمده است
 ** سیلو با شرایط کیفی خوبی بوده است
 *** گاوها در مرتع بودند
 **** آزمایش انجام نشده است .

بحث

تابلوی شماره ۱ مبین این است که تعداد اسپورهای کلستریدیوم در شیر و سوابهای سرپستان با شستن پستان قبل از شیردوشی یا سواب زدن کاهش می یابد. این موضوع موافق با یافته های استوارت^۱ در ۱۹۷۸ می باشد که نمونه های خود را به چهار گروه تقسیم نموده بود. الف: از پستانهای شسته شده با دقت، ب: از پستانهای شسته شده بطور سریع، ج: از پستان نشسته تمیز و بالاخره د: از پستان نشسته کثیف.

وقتی که گاوها در تابستان از اصطبل به مرتع رفتند، شمارش اسپور کلستریدیوم در آنها بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافت (تابلوی شماره ۱). این موضوع توسط پیترسون^۲ در سال ۱۹۶۱ چنین بیان شده است که بیشترین تعداد اسپورها در شیر در ماههای فوریه و مارچ (بهمن و اسفند) مشاهده شده، همچنین نتایج مشابهی توسط گودکاف^۳ و شارپ^۴ در ۱۹۶۶ و استوارت^۱ در ۱۹۷۸ گزارش گردیده است.

نقش مصرف سیلوی با کیفیت بد در بعضی از انواع پنیر توسط محققین شرح داده شده است (۴، ۱۵). میزان طبیعی اسپورهای *C. tyrobutyricum* در شیرهای تحت آزمایش در نیوزلاند کمتر از یک در هر ده میلی لیتر بود. بجز زمانی که سیلوی با کیفیت نامناسب مصرف می گردید که در آن موقع سطح میکروارگانیزم به ۱/۵ در هر ده میلی لیتر رسید (۷). در تائید گودکاف^۳ و شارپ^۴ در ۱۹۶۶ که اظهار داشته اند شمارش بالای کلستریدیا در زمستان می تواند به علت نحوه تغذیه دام و عدم رعایت استانداردهای بهداشتی در فصول سرد باشد، استوارت^۱ در سال ۱۹۷۸ بیان داشته است که تعداد اسپورهای کلستریدیا در شیر زمستانی از گاوهایی که با سیلو تغذیه می گردیدند. حدوداً " بیست بار بیشتر از گاوهایی بوده که با علوفه معمولی تغذیه می شدند. وی همچنین اظهار داشته در زمانی که گله هایی که با سیلو تغذیه می شدند جیره سیلو قطع و دامها به مراتع هدایت می گردیدند. تعداد اسپورها بطور قابل ملاحظه ای کاهش یافته و برعکس وقتی که در پاییز گاوها در گاوداری نگهداری شده با سیلو تغذیه شده اند تعداد شمارش اسپورها در شیر بطور قابل توجهی افزایش یافته است.

نمونه هایی از آبکشی دستگاههای شیر دوشی و تانکرها، مواد خوراکی دام، بسترو فضولات دام نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. همان طوری که در تابلوی شماره ۲

1- Stewart

2- Peterssen

3- Goudkov

4- Sharpe

نشان داده شده است. تعداد اسپورهای کلستریدیوم در فضولات دام خیلی بالا بوده و آلودگی بستر در ردیف دوم قرار دارد. تعداد اسپور در مواد خوراکی دام کم دیده شده و در آبکشی‌ها تقریباً " رقم صفر بود. لازم به تذکر است که به علت این که منظور اصلی تاثیر شستشوی پستان در کاهش تعداد کلستریدیا بوده نمونه‌گیری عمدتاً " از شیر و سوابهای سرپستان بعمل آمده است. بطور کلی محققین عقیده دارند که چون کلستریدیاها از لوله گوارش می‌توانند عبور کنند، مدفوع و در نتیجه بستر دام از منابع مهم آلودگی بوده و باعث انتقال میکروارگانیزم از طرق سرپستان گاو به شیر می‌باشد (۱۲، ۱۵، ۴، ۳).

گونه‌های کلستریدیا که از منابع مختلف جدا شده‌اند در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. مقایسه موارد جدا شده از شیر و سوابهای سرپستان در دو حالت پستان شسته شده و شسته نشده چنین نتیجه می‌دهد که شستشو، تاثیر قابل توجهی در روی تعداد سوشهای جدا شده ندارد. بجزء *C. perfringens* که در شیر حاصله از پستان شسته ۵ بار دیده شده ولی در شیر حاصله از پستان شسته مشاهده نشده است. از مجموع ۱۸ نمونه شیر حاصله از مزارع مختلف فقط یک مورد مثبت *C. tyrobutyricum* وجود داشت.

هیچ مورد کلستریدیوم از مواد غذایی دام و آبکشی‌های حاصله از دستگاهها حاصل نگشت. چنین استنباط می‌شود که منابع اخیر و به خصوص سیلو اگر در شرایط خوب تهیه و نگهداری شده باشد منبع آلودگی مهمی برای شیر نیستند. اگر چه مطالعات زیادی موجود است که بیانگر رول سیلوی بد در آلودگی شیر به کلستریدیاها و تخمیر کننده لاکتات می‌باشد. (۱۵، ۹).

بستر مدفوع در دو نوبت مورد آزمایش قرار گرفتند. *C. tyrobutyricum* و *C. perfringens* در هر دو مورد نمونه‌های مدفوع و یک مورد از نمونه‌های بستر جدا شدند. *C. butyricum* فقط دو بار از نمونه بستر جدا شد ولی از مدفوع جدا نگردید. نتایج بیانگر این است که این مواد می‌توانند به عنوان منابع احتمالی آلودگی شیر به کلستریدیاها و تخمیر کننده لاکتات بخصوص *C. tyrobutyricum* محسوب گردند.

References.

- 1- British standards Institution. 1968: Methods of Microbiological examination for dairy purposes. British standards House., London p.p.20-21.
- 2- Defigueiredo, M.P., Splittstoesser, D.F. 1976: Food microbiology: public Health and spoilage aspects. The Avi publishing Company, Inc., westport p.p.356-386.
- 3- Fox. P.F. 1987: Cheese: Chemistry, Physics and microbiology, vol 2 Elsevier Applied., Essex. p.p. 85-86.
- 4- Gibson, T. 1965: Clostridia in silage. J. appl. Bacteriol. 28;56-62.
- 5- Goudkov, A.V., Sharpe, M.E. 1965: Clostridia in dairying J appl. Bacteriol, 28:63-73.
- 6- Goudkov, A.V. Sharpe, M.E. 1966: A preliminary investigation of the importance of Clostridia in the production of rancid flavour in Cheddar Cheese. J. Dairy Res. 33, 139-149.
- 7- Halligan, A.C. Fryer, T.F. 1976: The development of a method for detecting spores of Clostridium tyrobutyricum in milk. N.Z.J. Dairy Sci. Technol. 11.100-106.
- 8- Hirsch, A. Grinsted, E. 1956: Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from Cheese, with observations on the effect of nisin. J. Dairy Res. 21, 101.
- 9- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food 1968: Bacteriological techniques for dairy purposes. Technical Bulletin No 17. Her Majesty, Stationery office., London p.p: 87-100.

-
- 10- Mocquot, G. 1979: Reviews of the progress of dairy science; Swiss-type Cheese. J. Dairy Res. 46; 133-160.
 - 11- Peterssen, I. 1961: Svenska Mejeritidn. 53, 329. Cited by Goudkov and Shaspe, 1966.
 - 12- Stewart, D.B. 1978: The incidence of bacterial spores in Northern Ireland milk supplies. 20 th International Dairy congress, Paris P.P: 91-82.
 - 13- Robinson, R.K. 1981: Dairy Microbiology, Vol 1. Applied science publishers., London p.p: 119- 164.
 - 14- Robinson, R.K. 1981: Dairy Microbiology. Vol 2. Applied science publisher., London P.P. 157-244.

A Study of milk pollution Caused by different
Kinds of Clostridial spores

M. Razavi-Rohani*

Summary:

Butyric acid anaerobes Can produce unpleasant gas and odour in some Kinds of cheese. Late blowing produced by these organisms, While decaying the product, Causes financial losses.

Since milk pollution by Clostridia originates from sources such faecal and bedding materials, feed and especially low standard sillage, in this study attempt has been made to specify the milk pollution sources of different Clostridia.

The obtained results presented on tables 1-3 show a high- level of pollution in winter, especially when the cattle consume sillage of bad quality. The positive effect of washing in pollution reduction of milk and of teat swabs has been confirmed. The number of microorganisms of faecal material Origin has been much more than of bedding material, origin in feed it is very low and in rinses of milking machine and milk tanks equal to zero

From 75 samples tested from different sources 16 cases had been C. perferingens, 11 C. butyricum, 8 C. tyrobutyricum and 5C. beijerinckii.

* Department of food science, School of Veterinary
Medicine, University of Urmia Urmia, IRAN,