# بررسی آلودگی پنیر سفید سنتی کازرون به کلی فرم و اشریشیا کولای و تعیین سروتیپ آن

دکتر محمد حسین مرحمتی زاده[۱]*، دکتر گیتی کریم[۲]، دکتر ابولفضل نعمتی نوبندگانی[۳]، جمیله پیکر[٤]


## چکیده

به منظور بررسی میزان آلودگی پنیر سنتی سفید کازرون به کلی فرم ها و اشریشیا کولای، طی سه ماه فروردین، اردیبهشت و خرداد ۸٤ از کلیه فروشگاه های لبنیات کازرون ۵۰ نمونه تهیه شد. برای جداسازی، تشخیص و شمارش کلی فرم و اشریشیا کولای استانداردهای ملی مدنظر قرار گرفت. نتیجه آزمایش های میکروبی به صورت زیر بود: از مجموع ۵۰ نمونه پنیر مورد آزمایش، ٤۹ نمونه (۹۸٪) به کلی فرم ها آلوده بودند که در این میان ٤۰ نمونه (۸۰٪) آلودگی به کلی فرم ها را بالاتر از حد مجاز نشان دادند. ۲۳ نمونه (٤٦٪) به کلی فرم های مدفوعی آلوده بودند که در بین آنها ۲۱ نمونه (٤۲٪) به اشریشیا کولای آلوده بودند. آزمایش های بیوشیمیایی تکمیلی نشان داد که همه اشریشیا کولای جدا شد از نوع بیماری زای روده ای بودند. نتیجه آزمایش های سرولوژی به صورت زیر بود: از ۲۱ اشریشیا کولای جدا شده، ۱۰ مورد متعلق به گروه سرولوژی poly I (شامل سروتیپ های $O_{111}$، $O_{55}$ و $O_{26}$) بودند. ٦ مورد متعلق به گروه سرولوژی poly III (شامل سروتیپ های $O_{128}$، $O_{126}$، $O_{125}$ و $O_{44}$) بودند و ۵ مورد متعلق به گروه سرولوژی poly IV (شامل سروتیپ های $O_{114}$ و $O_{20}$) بودند. با توجه به آلودگی بالای پنیر سنتی کازرون به کلی فرم ها و اشریشیا کولای لزوم یک برنامه ریزی دقیق بهداشتی برای مراحل تهیه و توزیع این فراورده غذایی پیشنهاد می شود.


***واژگان کلیدی:*** *کلی فرم ، اشریشیا کلی، پنیر، سرو تایپینگ*

**Contamination of Kazeroun traditional white cheese with coliforms and serotyping of Escherichia coil**

**Marhamatizadeh, M.[1] , Karim, G.[2], Neemati nobandegani, A.[3] , Peikar, J.[4]**

*1-Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazeroun Branch, Kazeroun, Iran*
*2-Department of Food Hygiene, Faculty of Specialised Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Scince & Research Branch, Tehran, Iran*
*3-Graduated of Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazeroun Branch, Kazeroun, Iran*
*4-Islamic Azad University, Kazeroun Branch, Iran.*

During three months (April, May and June 2005) 50 samples obtained from all dairy shops in Kazeroon city. To prepare the samples and for identification and counting of bacterea, the methods of national Iranian standards were used. Microbiological tests result summarized as follow: 49 samples out of 50 (98%) showed coliforms contamination and 40 samples (80%) were higher than standard level. 23 sample (46%) had fecal coliform and from which, 21 sample (42%) showed Escherichia coli. Complementary biochemical tests on separated Escherichia coli, showed that all the isolated Escherichia coli strains belong to entropathogenic group. Serological tests results are as follows: from 21 isolated Escherichia coli, 10 samples were in serological group poly I (including serotypes O111, O55, O26) 6 sample were of serological group poly III (including serotypes O128, O126, O125, O44) and 5 sample were in serological group poly IV (including serotypes O114, O20).It is concluded that using of hygienic programe for production of this traditional cheese, is neccessary.

***Key words:*** *Coliform, Escherichia coli, cheese, serotyping*

## مقدمه

کلی فرم ها عبارتند از باکتری های میله ای شکل، گرم منفی، بدون هاگ، هوازی و بی هوازی اختیاری که قادرند لاکتوز را در عرض ٤۸ ساعت در حرارت ۳۷-۳۰ درجه‌ی سانتی گراد تخمیر کرده و تولید گاز نمایند (٤،۳ و۹).

از آن جهت که باکتری اشریشیا کولای در محتویات روده انسان و حیوان یافت می شود، وجودش در خارج از روده می تواند دلیلی بر آلودگی با مدفوع انسان یا حیوان باشد (٦و۸). بازیابی باکتری اشریشیا کلی از مواد غذایی می تواند احتمال وجود میکروارگانیسم هایی که منشاء مدفوعی

۱- دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۳- دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
٤- کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

دارند، را در داخل مواد غذایی نشان دهد، از طرفی بعضی از سویه های این باکتری می توانند مسمومیت غذایی ایجاد کنند (۳). چند نوع عفونت اشریشیا کلی شناخته شده است، نظیر اسهال، عفونت مجرای ادراری، عفونت های سپتی سمیک و گاهی همراه با مننژیت (٤).

هدف از این تحقیق بررسی وضعیت آلودگی پنیرهای سنتی شهرستان کازرون به کلی فرم ها و اشریشیا کولای و مشخص نمودن سویه و سروتیپ آنها می باشد.

از آنجایی که کلی فرم ها و اشریشیا کولای از مهم ترین شاخص های بررسی تشخیص آلودگی مواد غذایی می باشند؛ به واسطه این تحقیق می توانیم تا حدودی وضعیت بهداشتی تولید و عرضه پنیر سنتی را مورد سنجش قرار دهیم و در نهایت اقدامات عملی در جهت بالا بردن و ارتقاع سطح بهداشتی و سلامت مردم کازرون ارائه دهیم.

## مواد و روش کار

پس از شناسایی فروشندگان پنیر سنتی در سطح شهرستان کازرون، به صورت تصادفی و طی ٦ مرحله تعداد ۵۰ نمونه پنیر تهیه و به صورت استریل به آزمایشگاه منتقل شد.

برای جستجو و شمارش اشریشیا کولای از استاندارد ملی به شماره ۵۲۳٤ استفاده شد.

### سروتایپینگ

آنتی سرم های چهارگونه اشریشیاکولای جدول ۱ را قبل از آزمایش از یخچال بیرون آورده شد و به درجه حرارت اتاق رسید.

از لام های شیشه ای تمیز استفاده نموده و بر روی یکطرف هر لام یک قطره آنتی سرم و در طرف دیگر یک قطره سرم فیزیولوژی بعنوان کنترل ریخته شد.

از پرگنه های اشریشیاکولای از کشت تازه (١٦ تا ١٨ ساعته) رشد یافته بر روی محیط های غیرمهاری (که در این تحقیق از محیط اگار خون دار (Blood agar) استفاده شد) مقداری را توسط لوپ برداشته و در قطره آنتی سرم و جداگانه در قطره کنترل برده کاملا حل کردیم، به طوری که یک قطره سوسپانسیون غلیظ و یکنواخت به وجود آید. علت برداشتن باکتری از محیط غیرانتخابی این است که استفاده از پرگنه های رشد یافته بر روی محیط های اختصاصی مک کانکی آگار و E.M.B agar برای انجام تست آنتی سرمی اغلب موجب ایجاد اتواگلوتیناسیون یا مثبت کاذب می گردد.

هر لام به صورت دورانی حرکت داده شد و واکنش را قبل از ۳۰ ثانیه در زمینه یک صفحه سیاه و مات از نظر آگلوتیناسیون به دقت مورد بررسی قرار دادیم.

لخته شدن مشخص و یا آگلوتیناسیون کامل در این مدت، بدون مشاهده لخته در قطره کنترل به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد.

نمونه ای که ایجاد یک واکنش مثبت مشخص با آنتی سرم می کند، آلودگی قطره چکان با یک باکتری دیگر است.

اگر باکتری مورد آزمایش در سرم فیزیولوژی نیز خود به خود آگلوتینه شود، این باکتری از نوع Rough بوده و نتیجه آزمون قابل اعتماد نیست.

در صورت عدم مشاهده اگلوتیناسیون در هیچ یک از قطره ها، احتمال دارد، سویه از جمله سویه های کپسول دار باشد؛ بنابراین جهت اجتناب از منفی کاذب، بهتر است آزمون بر روی میکروب کشته شده، حرارت انجام گیرد. نتیجه مثبت: اگلوتیناسیون واضح در کمتر از سی ثانیه (هرگونه واکنش مثبت بعد از ۳۰ ثانیه باید منفی در نظر گرفته شود).

نتیجه منفی: عدم مشاهده اگلوتیناسیون در هیچ یک از قطره ها. نتیجه ضعیف: نشانگر تشابه آنتی ژن های مینور باکتری نمونه، با ساختارهای آنتی ژنی یاد شده بر روی قطره چکان می باشد (۱۱، ۱۲، ۱۳ و ١٤).

**جدول۱**- آنتی سرم های چند دودمانی اشریشیاکولای‌های پاتوژن

| گروه های سرولوژیکی در هر آنتی سرم | آنتی سرم های مورد آزمایش |
|---|---|
| O26 , O55 , O111 | E.coli Antiserum poly Group I |
| O86 , O127 | E.coli Antiserum poly Group II |
| O44 , O125 , O126 , O128 | E.coli Antiserum poly Group III |
| O20 , O114 | E.coli Antiserum poly Group IV |

## نتایج

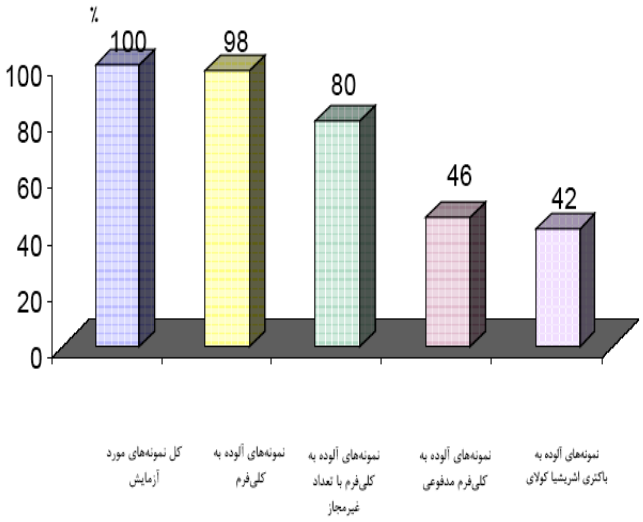
pH تمامی نمونه های پنیر تهیه شده در حد فاصل ٤/٢ تا ٤/٦ قرار داشت. از مجموع ٥٠ نمونه پنیر سنتی آزمایش شده، تعداد ٤٩ نمونه (معادل ٩٨ درصد از کل نمونه ها) آلوده به کلی فرم بودند که از این تعداد ٤٠ نمونه (معادل ٨٠ درصد از کل نمونه ها) آلوده به کلی فرم با تعداد غیرمجاز بودند (طبق استاندارد ملی ایران تعداد مجاز کلی فرم در پنیر ١٠٠ عدد در گرم می باشد(استاندارد شماره ٢٣٤٤ ) (نمودار ١).

تعداد ٢٣ نمونه (معادل ٤٦ درصد از کل نمونه ها) آلوده به کلی فرم مدفوعی بودند که از این تعداد ٢١ نمونه (معادل ٤٢ درصد از کل نمونه ها) آلودگی به باکتری اشریشیاکولای را از خود نشان دادند (نمودار ١).

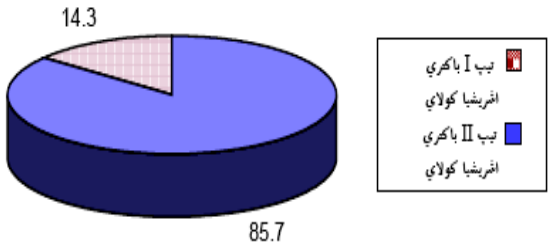
از تعداد ٢١ نمونه باکتری اشریشیاکولای جدا شده، ١٨ نمونه (٣٦ درصد) از نوع باکتری اشریشیا از نوع تیپیک (تیپ I) بوده و تعداد ٣ نمونه (٦ درصد) باکتری اشریشیاکولای از نوع غیر تیپیک (تیپ II) بودند (نمودار ٢).

### تعیین سویه ها و سروتایپینگ

پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی مانند: اوره آز، قدرت تخمیر TSI، هیدروژن سولفوره از TSI، سوربیتول و اکسیداز نتایج زیر به دست آمد: از مجموع ٢١ نمونه باکتری




**نمودار ١**: وضعیت آلودگی پنیر سنتی شهرستان کازرون به کلی فرم ها، کلی فرم با تعداد غیرمجاز، کلی فرم مدفوعی و اشریشیاکولای




**نمودار ٢**: وضعیت بیوتیپ های باکتری های اشریشیاکولای جدا شده از نمونه ها

اشریشیاکولای جدا شده تعداد ١٠ نمونه (معادل ٤٧/٥ درصد) از گروه سرولوژیکی Poly I (شامل گروه های سرولوژیکی $O_{111}$، $O_{55}$، $O_{26}$) بوده و تعداد ٦ نمونه (معادل ٢٨/٥ درصد از باکتری اشریشیاکولای جدا شده) از گروه های سرولوژیکی Poly III (شامل گروه های سرولوژیکی $O_{128}$، $O_{126}$، $O_{125}$، $O_{44}$) بوده و تعداد ٥ نمونه (معادل ٢٤ درصد از باکتری های اشریشیاکولای جدا شده از گروه سرولوژیکی Poly IV (شامل گروه های سرولوژیکی $O_{114}$ و $O_{20}$) بودند. در ضمن هیچ کدام از باکتری های اشریشیاکولای جدا شده از نوع Poly II (شامل گروه های سرولوژیکی $O_{127}$ و $O_{86}$) نبودند.

**بحث**

با توجه به نتایج آزمون های بیوشیمیایی، توانایی تخمیر قند لاکتوز، سوربیتول و قندهای TSI و منفی بودن آزمایش های اوره آز و هیدروژن سولفوره TSI؛ به احتمال زیاد تمامی باکتری های اشریشیاکولای جدا شده از سویه بیماری زای روده ای (E.P.E.C) بودند که این احتمال با انجام آزمایش های سروتایپینگ تأیید شد. در یک تحقیق که در شهرستان زنجان انجام گرفته است؛ مشخص شده است که ۷۷/۱ درصد نمونه های پنیر سنتی این شهرستان آلوده به باکتری اشریشیاکولای بودند (۱).

کنترل اشریشیاکولای بیماری زای روده ای در مواد غذایی از طریق کنترل کلی فرم ها عملی می شود. این کنترل به خصوص معطوف کنترل کلی فرم در پنیر می باشد. در طول ساخت پنیرهای نرم و نیمه نرم، از طریق تولید اسید اشریشیا کنترل می شود. در پنیرهای نرم رسیده در طول نمک زدن مقدار pH افزایش یافته و باعث رشد اشریشیاکولای می گردد، لذا از دوباره آلوده شدن پنیر در این مرحله باید خودداری نمود (۲).

آلودگی پنیر به میکروب های بیماری زا بعد از پاستوریزاسیون شیر ایجاد می شود، چون در حین پاستوریزاسیون کلیه میکروب های بیماری زا از جمله اشریشیاکولای از بین می رود، یا این که پاستوریزاسیون به شکل کامل انجام نمی شود.

در مورد پنیرهای سنتی احتمال دوم یعنی عدم پاستوریزاسیون کامل بیشتر است. در این صورت آلودگی اولیه شیر نقش مهمی در آلودگی پنیر بازی می کند. این آلودگی ممکن است از دام بیمار، دام حامل میکروب، محیط غیربهداشتی شیر دوشی، روش غلط و غیربهداشتی شیردوشی، دست آلوده شیردوش، ماشین شیر دوش آلوده، ظرف آلوده و یا حین حمل و نقل ایجاد شود. در صورت پاستوریزاسیون این شیر میکروب های بیماری زا از بین می‌روند. اما به خاطر تأثیر نامطلوب حرارت روی فاکتورهای انعقادی شیر، تهیه کنندگان سنتی پنیر عمدتا حرارت مناسب پاستوریزاسیون را به کار نمی برند.

در صورت پاستوریزاسیون شیر اولیه آلودگی پنیر در حین فرآوری و به صورت محیطی، از طریق افراد یا ظروف، یا بعد از تهیه و در حین حمل و نقل و توزیع ایجاد می شود. با توجه به ارزش غذایی پنیر و نقش عمده آن در سفره ایرانیان بهتر است به جای توصیه جلوگیری از تهیه و توزیع پنیرهای سنتی به آموزش تهیه کنندگان و توزیع کنندگان و انجام برنامه های آموزشی مبادرت کنیم.

این برنامه ها عمدتاً به اثر حرارت که نقش مهمی در از بین بردن میکروب های بیماری زا در شیر دارد و رعایت بهداشت شیردوشی که باعث کاهش میزان آلودگی شیر اولیه می شود تاکید نماییم که این کار در بالا بردن میزان انعقاد و قدرت تشکیل لخته مهم است. ضمناً رعایت بهداشت بعد از پاستوریزاسیون، حین فرآوری، حمل و نقل و توزیع هم به سادگی و با رعایت اصول بهداشتی قابل انجام است.

**تشکر و سپاسگزاری**

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون انجام شده است . از همکاری رئیس، معاونت پژوهشی و مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی این دانشگاه تشکر به عمل می آید.

**فهرست منابع**

۱- باطنی، ج. (۱۳۸۰). بررسی میزان آلودگی شیر و پنیر سنتی در حال عرضه به بروسلا و اشریشیاکولای در شهرستان زنجان، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان، شماره ۳۵.

۲- رضـویلر، و. (۱۳۷۸). میکروبهـای بیمـاری زا در مـواد غـذایی و اپیـدمیولوژی مـسمومیتهای غـذایی، انتـشارات دانشگاه تهران، صفحه ۸٤ تا صفحه ۹۵.

۳- کریم، گ. (۱۳۸۲). آزمون های میکروبـی مـواد غـذایی، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ چهارم، صفحه ۳ تا ۸٦.

٤- ملـک زاده، ف. (۱۳۷٤). میکـروب شناسـی بـرای دانشجویان پزشکی، زیست شناسـی و رشـته هـای وابـسته، انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، صفحه ۱٦۱ تـا صـفحه ۱۹۵.

۵- مؤسسه اسـتاندارد و تحقیقـات صـنعتی ایـران (۱۳۷٤). روش های عمـومی آزمـایش هـای میکروبیولـوژی، چـاپ هفتم، استاندارد شماره ۲۳۲۵.

٦- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۷۰). پنیر وویژگی ها، تجدیدنظر اول، چاپ چهارم، استاندارد شـماره ۲۳٤٤.

۷- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۷۹). شیر و فرآورده های آن، شمارش اشریـشیاکولای، روش بهتـرین تعداد احتمـالی اشریـشیاکولای در مـواد غـذایی اسـتاندارد شماره ۵۲۳٤.

۸- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۷۹). شیر و فرآورده هـای آن، شـمارش کلـی فـرم هـا در ۳۰ درجـه سلسیوس بدون تقویت سازی، چاپ اول، استاندارد شـماره ۱-٥٤۸٦.

۹- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۱). شیر و فرآورده های آن، شـمارش کلـی فـرم هـا، قـسمت دوم، روش بیشترین تعداد احتمالی در ۳۰ درجه سلسیوس، چاپ اول، استاندارد شماره ۲-٥٤۸٦.

۱۰- نجفی، م. نخچیان، ح. (۱۳۸۲). میکروبیولـوژی شـیر و فرآورده های لبنی، انتشارات پژوهش توس، صفحه ۹۲-۹۹.

11-Balous, A. , Duerden, B. (1998): Wilson's Micriobiology and Microbial Infection. vol. 1 and vol.2. 5

12-Janda, J.M. , Abbot, S.L. (1998): The Entrobacteria, lippincottraven. Philadelphia.

13-Mandell, G.L., Bennet, J.E., Dolin, R. (2000): Principles and practice of infectous diseases. Phileadelphia, PA: Churchill Livingstone,1986-9.

14-Murray, P.R., Barron, j. , Pfaller, M.A. (2003): Manual of Clinical Microbiology. American Societies of Microbiology Press U.S.A.