



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی



آزمایشگاه میکروب پایه

بررسی میکروبی شیر



آزمایش میکروبی شیر

- شیر محیط مناسبی برای رشد باکتری ها است و خیلی سریع آلوده می شود. شیر بطور طبیعی واجد انواعی از میکروارگانیزم ها می باشد.
- هنگامی که شیر از گاو سالم دوشیده می شود فاقد میکروب است ولی در حین عمل دوشیدن و انتقال آن به جایگاه مناسب انواع مختلفی از میکروب ها می توانند وارد آن شوند. برخی از میکروارگانیزم های شیر برای انسان مضر بوده و انواعی از آنها باعث تغییرات در ترکیبات شیر می شوند.

• چون شیر محیط مساعدی است و درصد افرادی که از آن استفاده می کنند زیاد است باید هر روز از نظر باکتریولوژیکی برای بالا بردن بهداشت جامعه مورد آزمایش قرار گیرد. برخی از میکروارگانیسمهای بدون ضرری که در شیر موجودند عبارتند از :

لاکتوباسیلوس لاکتیس ، برخی از انواع انتروباکتریاسه ، انواعی از باکتریهای مولد اسپور ، قارچها.

• این میکروارگانیسم ها می توانند شیر را فاسد کنند. برخی از باکتریهایی که گاهی در شیر وجود دارند و بیماریزا هستند عبارتند از :

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (مولد سل)، بروسلا ابورتوس (مولد بیماری تب مالت) و استرپتوکوکوس فکالیس (مولد چرک).

• برای رفع آلودگی شیر از روشهای پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون استفاده می شود.

روشهای پاستوریزاسیون

- 1 درجه حرارت شیر را بمدت ۲۰ دقیقه به ۶۳ تا ۶۶ درجه سانتیگراد رسانده و بسرعت به ۱۰ درجه می رسانند.
 - 2 درجه حرارت شیر را به مدت ۱۵ ثانیه به ۷۲ درجه سانتیگراد رسانده و بعد فوراً به ۱۰ درجه می رسانند.
- شیر پاستوریزه را بعد از تهیه با استفاده از متیلن بلو و با تست فسفاتاز برای بررسی کارایی عمل پاستوریزاسیون آزمایش می کنند.
 - روش استریلیزاسیون: برای اینکار شیر را ابتدا صاف کرده و سپس تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد حرارت می دهند بمدت حدود نیم ساعت. در این حالت شیر عاری از هر گونه میکروب می گردد. دقیق ترین روش استریلیزاسیون شیر با استفاده از امواج صوتی است.

آزمایش متیلن بلو:

- هر قدر تعداد باکتریهای شیر (مخمرهای لاکتیک ، باکتریهای غیر بیماریزا ، زیادتر باشد اکسیژن محلول در شیر زودتر مصرف می شود و متیلن بلو نیز سریعتر احیا می شود و هر قدر شیر حاوی تعداد کمتری باکتری باشد مانند شیرهای پاستوریزه ، عمل احیا دیرتر صورت می گیرد.
- رشد میکروارگانیسمها منجر به مصرف اکسیژن محیط و آزاد شدن مقداری هیدروژن می گردد. هیدروژن با رنگ آبی متیلن ترکیب شده و آن را احیا نموده و به لوکو متیلن بلو (بیرنگ) تبدیل می نماید. بطور کلی زمان احیا و بیرنگ شدن متیلن با تعداد میکروارگانیسمهای موجود در شیر نسبت عکس دارد.

روش آزمایش:

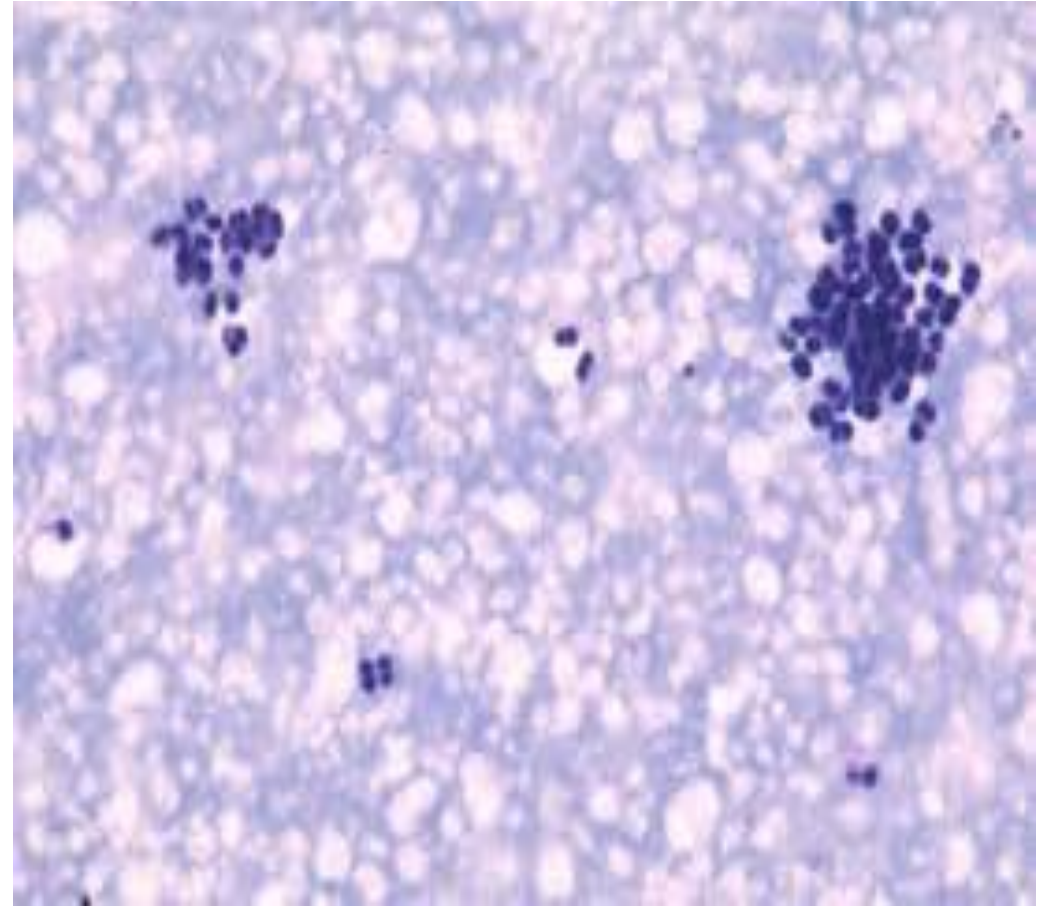
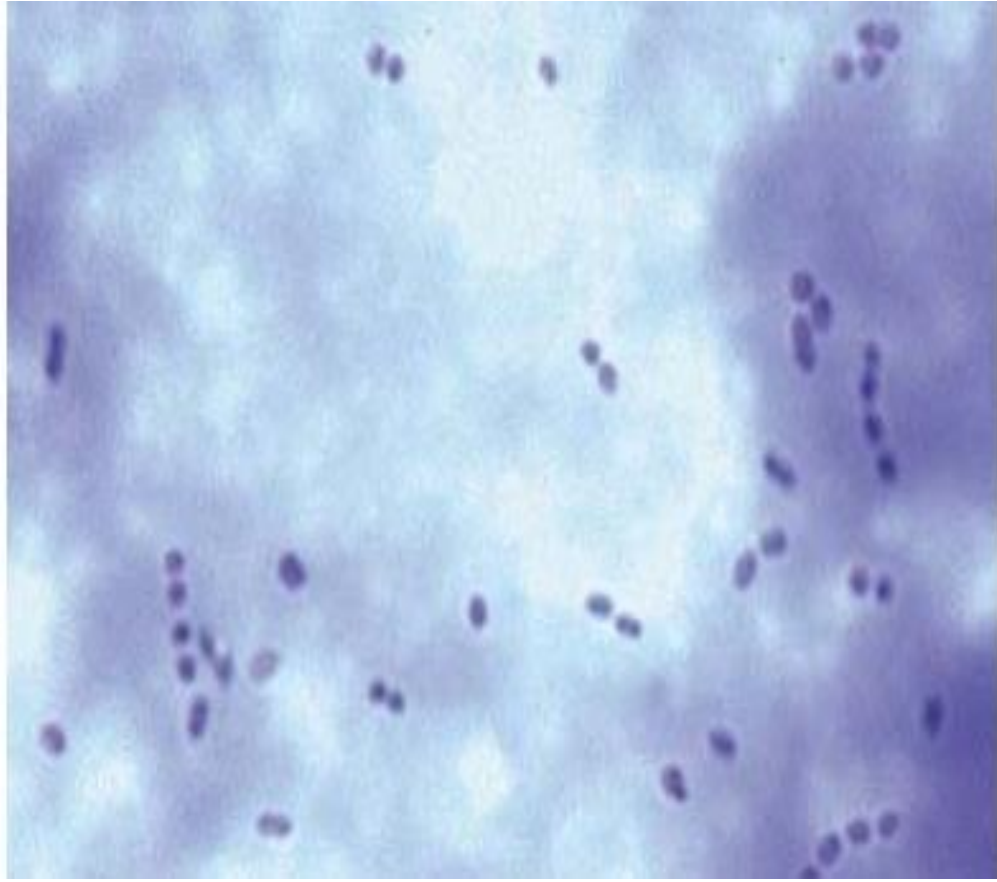
- 1 سه لوله آزمایش سترون شده انتخاب کنید.
 - 2 به لوله اول ۱۰ میلی لیتر شیر خام ، لوله دوم ۱۰ میلی لیتر شیر پاستوریزه و لوله سوم ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه نمایید.
 - 3 به هر یک از لوله ها ۲۵/۰ میلی لیتر متیلن بلو اضافه نموده و بهم بزنید.
 - 4 لوله ها را در گرمخانه ۳۷ درجه قرار دهید و زمان را یادداشت کنید.
 - 5 زمان بیرنگ شدن لوله ها را یادداشت نمایید. و اگر نمونه شیر پس از گذشت ۵/۵ ساعت (بین ۶ تا ۸ ساعت) بیرنگ نشود شیر مرغوب است و کمتر از نیم میلیون میکروارگانیسم در هر میلی لیتر شیر وجود دارد(شیر با کیفیت خوب با درجه ۱). و اگر نمونه شیر بین ۲ تا ۶ ساعت بیرنگ شود شیر مرغوب است و نشانه وجود ۰/۵ تا ۴ میلیون میکروارگانیسم در هر میلی لیتر آن است (شیر با کیفیت نسبتا خوب با درجه ۲). و اگر نمونه شیر بین ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت بیرنگ شود شیر نامرغوب است و واجد ۴ تا ۲۰ میلیون میکروارگانیسم در هر میلی لیتر است (کیفیت ضعیف شیر درجه ۳).
- اگر نمونه شیر کمتر از ۳۰ دقیقه بیرنگ شود شیر آلوده و دارای بیش از ۲۰ میلیون میکروارگانیسم در هر میلی لیتر است (شیر با کیفیت خیلی پایین با درجه ۴)

آزمایش فسفاتاز :

• آنزیم فسفاتاز در مراحل مختلف پاستوریزاسیون از بین می رود. اگر پس از پاستوریزاسیون آنزیم فسفاتاز در شیر موجود نباشد، شیر به خوبی پاستوریزه شده است.

آزمایش میکروسکوپی شیر:

• قطره کوچکی از شیر را روی لام گذاشته و گسترش داده و آنرا خشک کنید. برای کم شدن چربی روی لام آن را در گزلیل فرو برده و سپس در الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۵ تا ۳۰ ثانیه قرار دهید. لام را با آب شسته و با آبی متیلن باکتری‌ها را رنگ کنید سپس زیر میکروسکوپ با لنز ۱۰۰ و روغن ایمرسیون باکتری‌های موجود در شیر را که شامل استرپتوکوک‌ها، لاکتوباسیلوسها و برخی از انواع دیگر است مورد مطالعه قرار دهید.



شمارش باکترهای موجود در شیر (Colony count)

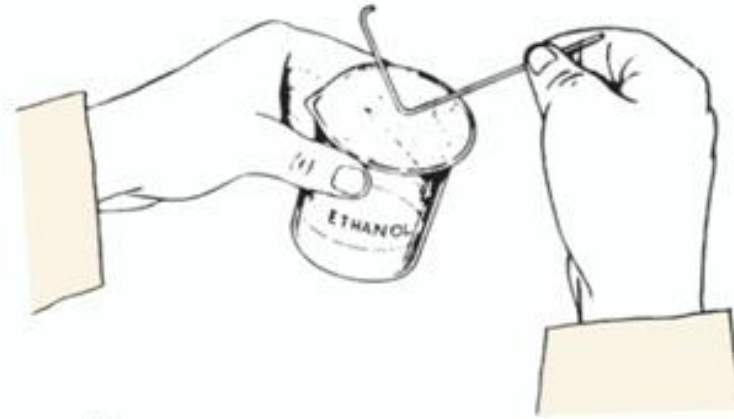
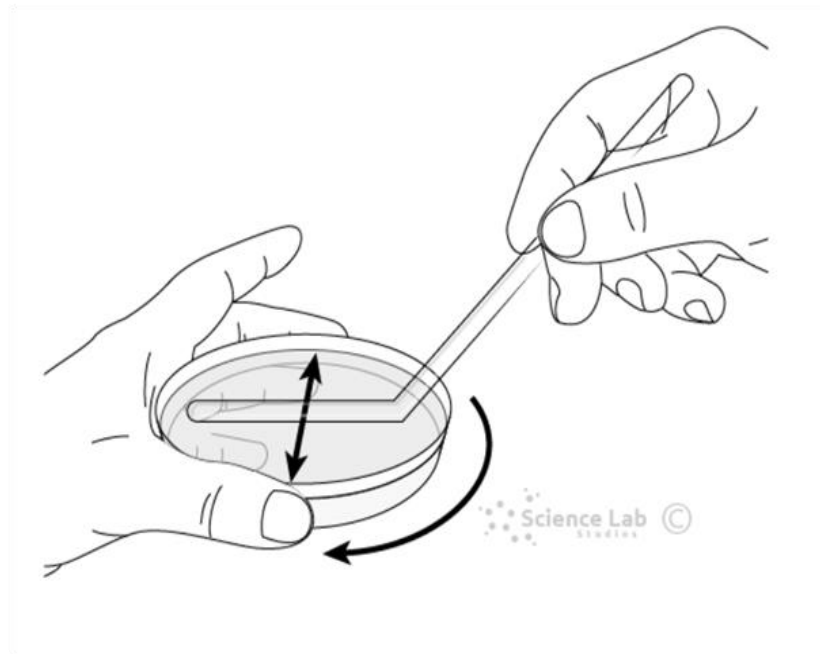
مواد و وسایل لازم:

- نمونه شیر خام یا پاستوریزه ، پیت استریل، محیط کشت تریپتوکیس گلوکز اکستراکت آگار (TGEA)، لوله های حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل

روش کار:

ابتدا چند رقت مختلف از شیر تهیه کرده و سپس از رقت‌های بالاتر شمارش را انجام دهید. به این صورت که بوسیله پیپت استریل ۱ میلی لیتر از شیر را در کنار شعله به یک لوله آب مقطر استریل انتقال داده و رقت یک دهم را تهیه می‌کنیم و سپس رقت‌های بعدی را تهیه می‌کنیم. از این رقت‌ها بمیزان ۰/۱ میلی لیتر با پیپت استریل در کنار شعله به پلبت حاوی محیط کشت منتقل نموده و سپس با میله شیشه‌ای سر کج استریل شده در الکل آنرا روی سطح پلبت بطور یکنواخت پخش می‌کنیم (اسپرید پلنت متد). پلنت‌ها را در اتوو ۳۷ درجه بمدت ۲۴ ساعت انکوبه می‌کنیم و پس از این مدت نتایج را بررسی کنید. پلنت‌هایی که تعداد باکتریها در آنها بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی است می‌توانید شمارش کنید و از طریق فرمول زیر تعداد باکتریها را در ۱ میلی لیتر شیر محاسبه کرده و نهایتاً از پاسخها میانگین تهیه کنید.

- تعداد کل باکتریهای موجود در ۱ میلی لیتر شیر = تعداد کلنیهای شمارش شده × ضریب رفت × ضریب حجم
- بعد از تهیه میانگین از نتایج در مورد شیر خام، اگر تا 10^5 باکتری در هر میلی لیتر شیر موجود باشد مجاز است، کلی فرم‌ها تا ۱۰ باکتری در هر میلی لیتر شیر مجازند و اشرشیا کلی باید صفر باشد.



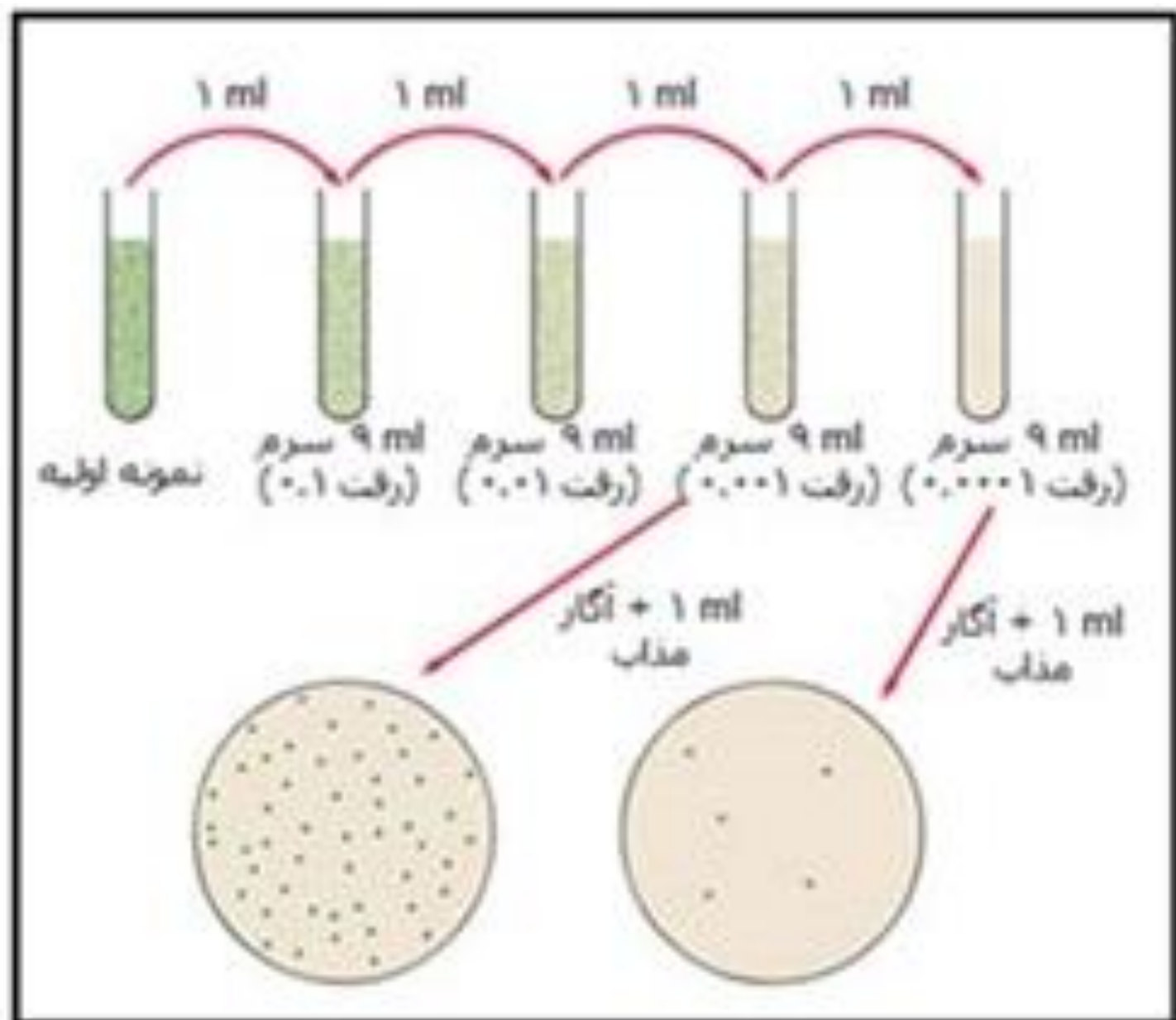
1 Spreading rod is dipped in ethanol for cleaning.



3 Organisms are spread evenly over surface of agar.



2 Rod is sterilized in Bunsen burner flame.





با سپاس فراوان از توجه شما