آلودگی کپکی شیر خام و فرآورده‌های آن: فراوانی، تنوع گونه‌ای و شناسایی منابع آلودگی

طاهره مشتاقی ملکی[۱]، شهرام حنیفیان[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹٤/۵/۱۳ پذیرش نهایی: ۹٤/۷/۱۵)

چکیده

هدف این مطالعه بررسی میزان شیوع و تنوع گونه‌های کپکی در شیر خام و فرآورده‌های آن و شناسایی منابع بالقوه آلودگی کپکی بود. برای این منظور، تعداد ۲٦۰ نمونه شامل ۸۰ نمونه شیرخام، ۱۰۰ نمونه از محصولات شیر (شامل شیر پاستوریزه، ماست، پنیر و دوغ) و ۸۰ نمونه از منابع محیطی (مواد افزودنی، ظروف بسته‌بندی، سطح تجهیزات، هوای سالن و ...) جمع‌آوری و از نظر وجود آلودگی کپکی و تنوع گونه‌ای کپک‌ها، با روش کشت و ارزیابی میکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج این مطالعه در مجموع فراوانی ۸۲/۳٪ آلودگی کپکی در کل نمونه‌ها به‌دست آمد. میزان آلودگی برای شیر خام ۹۷/۵٪، شیر پاستوریزه ۵۲٪، ماست ۷٦٪، دوغ ۵۲٪، پنیر ۵٦٪ و در نمونه‌های محیطی ۹٦/۲۵٪ برآورد گردید. تنوع جنس‌های کپکی در نمونه‌های مختلف شامل *آسپرژیلوس*، *ژئوتریکوم*، *پنی‌سیلیوم*، *موکور*، *آلترناریا*، *رایزوپوس*، *استمفیلیوم*، *کلادوسپوریوم* و *فوزاریوم* بود. بر اساس نتایج مطالعه، همبستگی معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) بین نوع آلودگی کپکی در شیر خام و فرآورده‌های آن و هم‌چنین بین این محصولات و منابع محیطی به‌دست آمد. با توجه به شیوع بالای آلودگی کپکی در شیر خام و منابع محیطی، به‌نظر می‌رسد در مواقعی فرایندهای حرارتی کفایت لازم را در غیرفعال نمودن کامل این آلودگی‌ها نداشته‌اند و در مواردی آلودگی به‌طور ثانویه اتفاق افتاده است. بنابراین اعمال دقیق ملاحظات بهداشتی جهت جلوگیری از آلودگی شیر خام در طی حمل و نقل و فرآوری می‌تواند به‌طور مؤثری در کاهش موارد آلودگی کپکی نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی کپکی، تنوع گونه‌ای، شیرخام، فرآورده‌های شیر، آلودگی محیطی

مقدمه

شیر مهم‌ترین منبع تأمین کلسیم و فسفر برای انسان است و به‌علت داشتن اسیدهای‌آمینه ضروری، جایگاه ویژه‌ای در تأمین پروتئین مورد نیاز بدن دارد. تحقیقات در مورد مصرف فرآورده‌های شیر نشان می‌دهد ارتباط نزدیکی بین مصرف این فرآورده‌ها و سطح سلامت افراد جامعه به لحاظ کارآیی، ضریب هوشی، میزان ابتلا به بیماری‌های عفونی و تنظیم فعالیت‌های متابولیکی وجود دارد (رنجبر و همکاران، ۱۳۸۹). یافته‌های اخیر نشان می‌دهند مصرف شیر و فرآورده‌های آن در کاهش فشار خون، افزایش چربی‌های مفید خون، جلوگیری از ابتلا به سرطان روده بزرگ و پیشگیری از پوکی استخوان مؤثر هستند (Walstra *et al.*, 2006). با توجه به نقش اساسی شیر و فرآورده‌های آن در تغذیه انسان، تأمین بهداشت و سلامت آن از اهمیت زیادی برخوردار است.

کپک‌ها ارگانیسم‌های یوکاریوتی (Eukaryotic)، هتروتروف (Heterotrophic)، هوازی و غیرمتحرک‌اند. مقدار pH بهینه برای رشد آن‌ها حدود ٤ تا ٦/٥ است، اما می‌توانند محیط‌های اسیدی و قلیایی (تغییرات pH بین ۲ تا ۹) را تحمل کنند. دمای ایده‌آل جهت رشد کپک‌ها ۲۰ الی ۳۰ درجه سلسیوس است اما برخی از گونه‌ها می‌توانند در ۵ درجه سلسیوس و حتی کمتر از آن هم رشد نمایند (Panelli, 2013). انواعی از کپک‌ها نظیر برخی از گونه‌های *پنی‌سیلیوم* در تهیه و رسیدن (Ripening) برخی از غذاها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مقابل، بسیاری دیگر از این میکروارگانیسم‌ها مولد فساد در مواد غذایی هستند و سبب تغییرات در طعم، رنگ، بو و ظاهر غذا می‌شوند. گروه دیگری از کپک‌ها مولد بیماری‌اند و در صورت ضعیف شدن سیستم ایمنی بدن می‌توانند عوارض شدیدی ایجاد نمایند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸٤). این عوارض ممکن است به‌صورت درگیری‌های جلدی، زیرجلدی و احشایی بروز پیدا کنند. به‌علاوه، انتشار اسپورهای قارچی در هوا و ورود آن‌ها از طریق استنشاق ممکن است سبب آلرژی و مشکلات تنفسی جدی به‌ویژه در افراد مبتلا به آسم گردد (نبوی، ۱۳۸۸؛ شادزی، ۱۳۹۱).

شیر خام پس از دوشش از طریق منابع محیطی (خاک، گرد و غبار، هوا و ...) به میکروب‌های مختلف و از آن جمله کپک‌ها آلوده می‌شود. وجود آلودگی بالا در شیر خام موجب عدم کفایت پاستوریزاسیون در از بین بردن کامل کپک‌ها شده و در صورت نگه‌داری طولانی مدت محصولات، فرصت رشد و تکثیر پیدا می‌کنند. میسلیوم‌های با دیواره ضخیم و اسپور برخی از گونه‌های کپکی با پاستوریزاسیون غیرفعال نمی‌شوند و در صورت مناسب بودن شرایط رشد از نظر حرارت و رطوبت، به‌سرعت در سطح مواد غذایی رشد می‌کنند و تعداد زیادی از آن‌ها ترکیبات سمی با اصطلاح عمومی مایکوتوکسین تولید می‌کنند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۸٤). فرآورده‌های تخمیری شیر نظیر ماست، پنیر و دوغ به‌علت فعالیت باکتری‌های لاکتیکی و دارا بودن اسیدیته بالا و نمک و هم‌چنین مدت زمان نگه‌داری نسبتاً طولانی شرایط لازم برای رشد کپک‌ها را فراهم می‌سازند (Jay, 2005). به‌علاوه، برخی از گونه‌های کپک در دمای کم (۱ الی ۵ درجه سلسیوس)، فعالیت آبی (*aw*) محدود (۰/۸۵) و غلظت‌های کم اکسیژن قادر به رشد هستند و موجب بروز فساد در غذاهایی

می‌شوند که از نقطه‌نظر عوامل داخلی و خارجی (Intrinsic and Extrinsic parameters) برای رشد باکتری‌ها مناسب نیستند. هم‌چنین، برخی از کپک‌ها در برابر مواد نگه‌دارنده نظیر سوربات مقاوم هستند. گونه شاخص در این خصوص اغلب به جنس *پنی‌سیلیوم* (*Penicillium*) تعلق دارد، با این حال جنس‌های دیگری از جمله *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*)، *ژئوتریکوم* (*Geotrichum*)، *کلادوسپوریوم* (*Cladosporium*)، *آلترناریا* (*Alternaria*) و *موکور* (*Mucor*) نیز در آلودگی این قبیل مواد غذایی دیده می‌شوند (Beuchat and Cousin, 2001).

رشد کپک‌ها با ایجاد تغییرات نامطلوب در طعم، بو و ظاهر مواد غذایی، آن‌ها را از چرخه مصرف خارج نموده و ضرر و زیان‌های اقتصادی سنگینی را به تولیدکنندگان مواد غذایی وارد می‌سازند. از سوی دیگر با توجه به بیماری‌زا بودن برخی از این کپک‌ها، موضوع از جنبه بهداشتی و سلامت عمومی نیز اهمیت پیدا می‌کند. لذا در این مطالعه میزان آلودگی و تنوع گونه‌های کپکی در شیر خام و برخی از فرآورده‌های آن در یکی از کارخانه‌های تولید کننده محصولات شیری در استان آذربایجان‌شرقی تعیین گردید. هم‌چنین به‌منظور شناسایی و کنترل راه‌های آلودگی کپکی در کارخانه، منابع بالقوه آلوده کننده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

- نحوه نمونه‌گیری

در مجموع ۲۶۰ نمونه شامل شیر خام، شیر پاستوریزه، ماست، پنیر و دوغ صنعتی به‌همراه نمونه‌هایی از منابع بالقوه آلودگی کپکی در محصولات لبنی از یکی از واحدهای تولید کننده محصولات شیر در استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری گردید (جدول ۱). نمونه‌های شیر خام به‌مقدار تقریبی ۱۰۰ میلی‌لیتر از مخازن حمل شیر خام در بخش دریافت شیر کارخانه و به‌صورت تصادفی نمونه‌گیری شد. به‌منظور ارزیابی ارتباط آلودگی بین شیر خام و فرآورده‌های آن، نمونه‌های مربوط به شیر پاستوریزه و محصولات تخمیری با هماهنگی مدیریت تولید کارخانه، یک تا دو روز بعد از نمونه‌گیری از شیرخام انجام گرفت که طی آن شیر خام فرآوری و به محصولات مختلف تبدیل می‌شد. نمونه‌های شیر پاستوریزه با سرنگ‌های استریل و به‌مقدار تقریبی ۱۵ میلی‌لیتر از داخل مخازن نگه‌داری شیر پاستوریزه جمع‌آوری گردید. نمونه‌گیری محصولات تخمیری (ماست، پنیر و دوغ) نیز از محصولات بسته‌بندی شده و با رعایت شرایط سترون صورت گرفت.

جدول (۱)- نوع و تعداد هر یک از نمونه‌ها برای پایش آلودگی کپکی

نمونه	شیر		محصولات تخمیری			منابع آلودگی			
	خام	پاستوریزه	پنیر	ماست	دوغ	سطوح	هوا	ظروف	افزودنی‌ها
تعداد	۸۰	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰

بخش‌های داخلی ظروف بسته‌بندی و هم‌چنین درپوش‌های آلومینیومی این ظروف با استفاده از سواب استریل آغشته به سرم فیزیولوژی نمونه‌گیری گردید. در مورد سطوح تجهیزات و دستگاه‌های فرآوری و بسته‌بندی و هم‌چنین سالن تولید و انبارهای نگه‌داری، با کمک سواب استریل مساحتی در ابعاد ۱۵ × ۱۵ سانتی‌متر نمونه‌برداری شد. برای ارزیابی هوای سالن پلیت‌های ۸ سانتی‌متری حاوی سابورود دکستروز آگار (مرک، آلمان) با درب باز به‌مدت ۳۰ دقیقه در ارتفاع تقریبی یک متر از کف سالن تولید و هم‌چنین در زیر هواکش‌ها قرار داده شدند (Hoekstra *et al.*, 1998). نمونه‌هایی که تحت عنوان «افزودنی» در این مطالعه از آن‌ها یاد شده است شامل ماده ضدکف (Anti-foaming agent)، ماده ضدچسبندگی (Anti-sticking agent)، رنت (مورد استفاده در پنیر فراپالایشی)، نمک (مورد استفاده در پنیر و دوغ) و سبزیجات معطر (مورد استفاده در دوغ) بودند که در طی فرایند و یا پس از تولید –در بسته‌بندی‌هایی کاغذی تحت عنوان ساشه– به برخی از محصولات اضافه می‌گردید. این نمونه‌ها در مقادیر تقریبی ۱۰ گرم/میلی‌لیتر نمونه‌گیری شد و به‌همراه سایر نمونه‌ها در جوار سرما و در همان روز به آزمایشگاه انتقال یافت.

– کشت و شمارش کپک‌ها

مقدار ۱۰ گرم/میلی‌لیتر از نمونه شیر خام و فرآورده‌های آن با ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل مخلوط و کاملاً همگن شد و سپس لوله‌های رقت ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ با سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردیدند. از هر رقت به‌صورت سطحی در محیط سابورود دکستروز آگار (pH = ۳/۵) کشت داده شد. نمونه‌های محیطی نیز پس از آماده‌سازی به‌طور مستقیم در محیط کشت شدند. محیط‌های کشت به‌مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و مورد شمارش قرار گرفتند. جهت فراهم نمودن امکان رشد برای کپک‌های آسیب‌دیده و انواع کند رشد، محیط‌های کشت برای ۳ هفته دیگر نگه‌داری و به‌طور هفتگی ارزیابی گردیدند (Beuchat and Cousin, 2001). نتایج به‌دست آمده با هدف بررسی رشد پرگنه‌های جدید، با یافته‌های اولیه مقایسه شدند.

– شناسایی جنس‌های کپکی

پرگنه‌های کپکی از نظر خصوصیات ظاهری ارزیابی و پرگنه‌های مختلف جهت شناسایی با روش‌های Stab culture و Slide culture کشت داده شدند. کشت‌های Slide و Stab در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. دوره گرمخانه‌گذاری برای کشت‌های Slide در حدود ۳ تا ۵ روز (و در صورت نیاز تا ظهور پرگنه کپک) و برای کشت‌های Stab مدت ۱ تا ۲ هفته (و در صورت لزوم تا ٤ هفته) در نظر گرفته شد. خصوصیات ماکروسکوپی کپک‌ها از جمله اندازه، بافت، رنگ سطح و زیر پرگنه به‌صورت چشمی و ویژگی‌های میکروسکوپی – متعاقب رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل‌بلو– با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰ و ٤۰) ارزیابی گردیدند (Harrigan, 1998).

– تجزیه و تحلیل آماری

یافته‌های مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۷) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. پس از انجام آمار توصیفی بر روی داده‌های مطالعه، برای بررسی همبستگی بین نوع آلودگی کپکی (جنس کپک) شیر خام و محصولات آن و هم‌چنین با منابع

محیطی از آزمون مربع کای (Chi-Square) استفاده شد. تفاوت جمعیت کپک بین فرآورده‌های تخمیری با آزمون T مستقل (Independent Samples T-Test) مقایسه گردید.

یافته‌ها

در جدول (۲) میزان و درصد فراوانی آلودگی کپکی در نمونه‌های شیر خام، محصولات شیر و نمونه‌های محیطی نشان داده شده است. مطابق این جدول درصد آلودگی کپکی در شیر خام و منابع محیطی از سایر نمونه‌ها بیشتر بود.

جدول (۲)- میزان و درصد فراوانی آلودگی کپکی در نمونه‌های مختلف

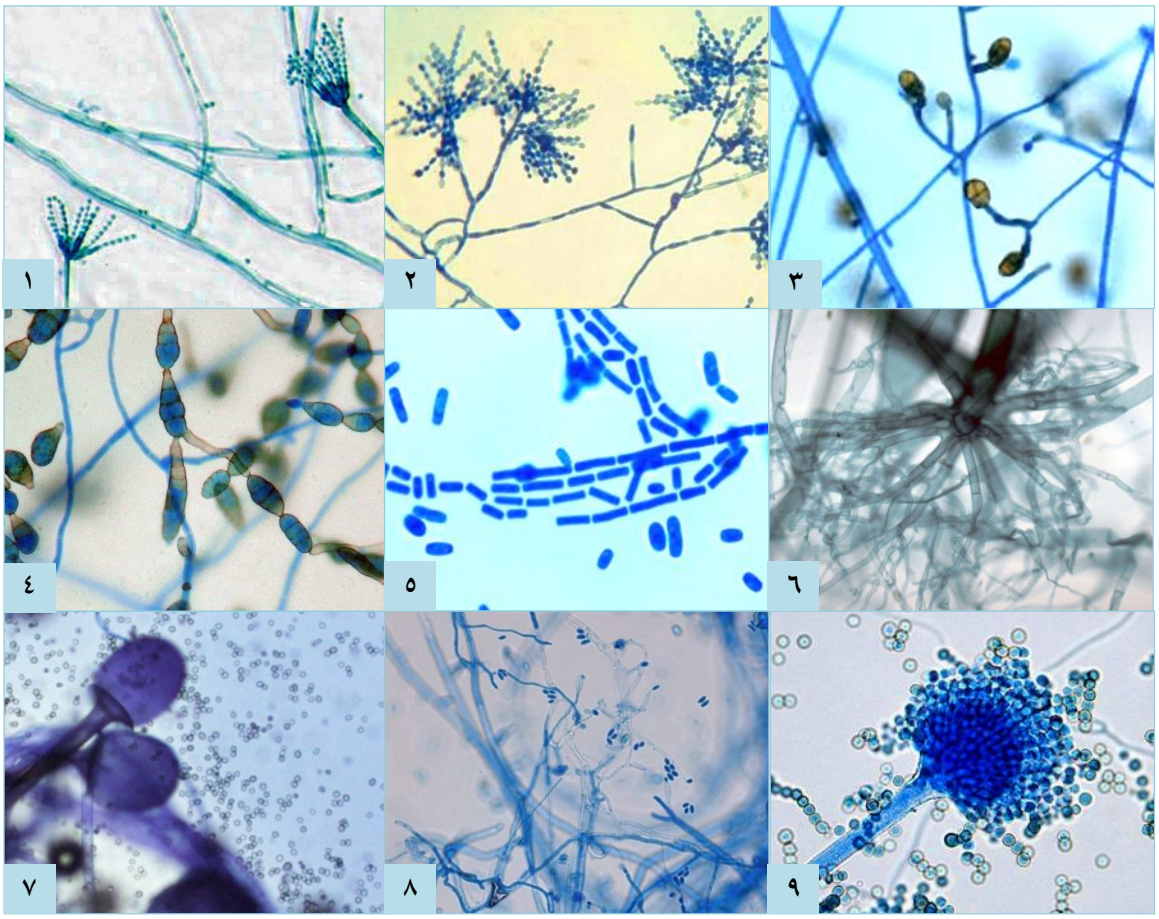
نمونه	تعداد نمونه	تعداد (درصد) آلودگی
شیر خام	۸۰	۷۸ (۹۷/۵)
شیر پاستوریزه	۲۵	۱۳ (۵۲)
ماست	۲۵	۱۹ (۷٦)
دوغ	۲۵	۱۳ (۵۲)
پنیر	۲۵	۱٤ (٥٦)
منابع محیطی	۸۰	۷۷ (۹٦/۲٥)
کل	۲٦۰	۲۱٤ (۸۲/۳)

نتایج مربوط به جمعیت کپک‌ها در فرآورده‌های تخمیری در جدول (۳) نشان داده شده است. بر اساس این یافته‌ها، میانگین تعداد کپک و درصد نمونه‌های با تعداد کپک بیش از حد مجاز تعیین شده توسط استاندارد ملی ایران (استاندارد ملی ایران، ۲٤۰٦)، در بین نمونه‌های مختلف تخمیری تفاوت معنی‌داری نداشت.

جدول (۳)- دامنه و میانگین جمعیت کپک در فرآورده‌های تخمیری آلوده و مقایسه آن‌ها با حد مجاز استاندارد ملی ایران

نمونه	جمعیت کپک (تعداد در هرگرم/میلی‌لیتر)			درصد موارد بالاتر از حد مجاز
	دامنه	میانگین	حد مجاز	
ماست	۱۸۰ – ۱۹	۱٤۸	۱۰۰	۳٦/۸
پنیر	۲۵۰ – ٤	۱۲۷	۱۰	٤۰
دوغ	۳٤۰ – ۲۲	۲٦۲	۱۰۰	۲۹/٤
کل	۳٤۰ – ٤	۱۷۹	–	۳٥/٤

در بررسی ۲٦۰ نمونه مختلف، ۹ جنس کپک مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۱). در بررسی اخیر جنس‌های مختلف کپک از نمونه‌های متفاوت به‌دست آمد. بر اساس این نتایج، به‌غیر از شیر خام در سایر نمونه‌ها جنس *آسپرژیلوس* بالاترین درصد فراوانی را نشان داد و جنس‌های *ژئوتریکوم*، *پنی‌سیلیوم*، *موکور*، *آلترناریا*، *رایزوپوس* (*Rhizopus*)، *استمفیلیوم* (*Stemphylium*)، *کلادوسپوریوم* و *فوزاریوم* (*Fusarium*) با نسبت کمتر یافت شدند. در مجموع *آسپرژیلوس* با ۷۰/۳۸ درصد بالاترین درصد فراوانی را داشت (جدول ٤).



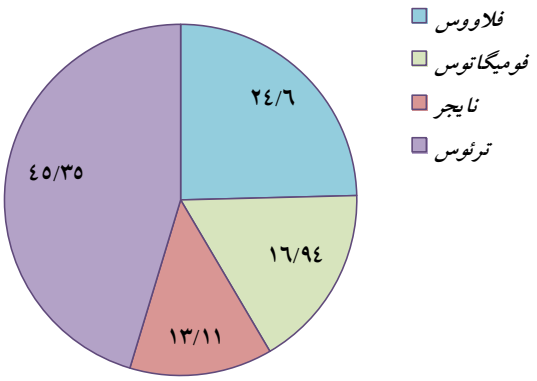
شکل (۱)- نمای میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰ و ٤۰) از جنس‌های کپک جدا شده از نمونه‌های شیر خام، فرآورده‌های شیر و منابع محیطی؛ (۱): پنی‌سیلیوم، (۲): *کلادوسپوریوم*، (۳): *استمفیلیوم*، (٤): *آلترناریا*، (۵): *ژئوتریکوم*، (٦): *رایزوپوس*، (۷): *موکور*، (۸): *فوزاریوم* و (۹): *آسپرژیلوس*

تحلیل آماری (Chi-Square) جنس‌های کپک جداسازی شده از نمونه‌های شیر خام و محصولات آن بیانگر وجود ارتباط معنی‌دار (p<۰/۰۱) بین این نمونه‌ها بود. این ارتباط بین محصولات شیر و منابع محیطی نیز کاملاً معنی‌دار (p<۰/۰۱) برآورد گردید.

جدول (٤)- فراوانی جنس‌های کپک در نمونه‌های مختلف

نمونه	جنس کپک	تعداد (درصد)
شیرخام	*ژئوتریکوم*	۷٤ (۹۲/۵)
	آسپرژیلوس	۵۳ (٦٦/۲۵)
	پنی‌سیلیوم	۲۲ (۲۷/۵)
	موکور	٦ (۷/۵)
	فوزاریوم	۲ (۲/۵)
شیر پاستوریزه	*آسپرژیلوس*	۱۳ (۵۲)
	فوزاریوم	۲ (۸)
ماست	*آسپرژیلوس*	۱٦ (٦٤)
	پنی‌سیلیوم	۵ (۲۰)
	موکور	۱ (٤)
	استمفیلیوم	۱ (٤)
دوغ	*آسپرژیلوس*	۱۲ (٤۸)
	پنی‌سیلیوم	۳ (۱۲)
پنیر	*آسپرژیلوس*	۱۲ (٤۸)
	پنی‌سیلیوم	۵ (۲۰)
	کلادوسپوریوم	۳ (۱۲)
	رایزوپوس	۱ (٤)
منابع محیطی	*آسپرژیلوس*	۷۷ (۹٦/۲۵)
	پنی‌سیلیوم	۲۱ (۲٦/۲۵)
	آلترناریا	٤ (۵)
	موکور	۳ (۳/۷۵)
	کلادوسپوریوم	۲ (۲/۵)
	استمفیلیوم	۲ (۲/۵)
کل	*آسپرژیلوس*	۱۸۳ (۷۰/۳۸)
	ژئوتریکوم	۷٤ (۲۸/٤٦)
	پنی‌سیلیوم	۵٦ (۲۱/۵۳)
	موکور	۱۰ (۳/۸٤)
	آلترناریا	٤ (۱/۵۳)
	کلادوسپوریوم	۵ (۱/۹۲)
	فوزاریوم	٤ (۱/۵۳)
	استمفیلیوم	۳ (۱/۱۵)
	رایزوپوس	۱ (۰/۳۸)

در این مطالعه گونه‌های مختلف جنس *آسپرژیلوس* از طریق ارزیابی ماکروسکوپیک و میکروسکوپیک مورد شناسایی افتراقی قرار گرفتند. در شکل (۲) درصد فراوانی و تنوع گونه‌ای *آسپرژیلوس* نشان داده شده است.



نمودار (۱)- درصد فراوانی گونه‌های *آسپرژیلوس* در نمونه‌های مختلف

بحث و نتیجه‌گیری

شیر و بسیاری از فرآورده‌های آن محیط مناسبی برای رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها و از آن جمله کپک‌ها می‌باشند. فرآورده‌های تخمیری شیر نظیر ماست، پنیر و دوغ به‌علت فعالیت باکتری‌های لاکتیکی و دارا بودن اسیدیته بالا و نمک محیط مناسبی برای فعالیت باکتری‌ها نیستند. در مقابل کپک‌ها به‌دلیل تحمل زیاد نسبت به عوامل بازدارنده رشد، به‌خوبی در چنین فرآورده‌هایی رشد می‌کنند. در نتیجه، فساد کپکی از معضلات صنایع شیر و به‌ویژه محصولات تخمیری محسوب می‌شود.

در این بررسی ۸۲/۳ درصد از کل نمونه‌ها آلوده به کپک بودند. بیشترین میزان آلودگی کپکی در شیرهای خام (۹۷/۵ درصد) و منابع محیطی (۹٦/۲٥ درصد) به‌دست آمد. در حالی که فرآورده‌های مختلف درصد آلودگی نسبتاً کمتری (٥۲ تا ۷٦ درصد) نشان دادند. جمعیت کپک در فرآورده‌های تخمیری به‌طور میانگین ۱۷۹ واحد پرگنه در هر گرم/میلی‌لیتر تعیین گردید. مقایسه این یافته‌ها با حد مجاز تعیین شده توسط استاندارد ملی (استاندارد ملی ایران، ۲٤۰٦) نشان داد، ۳٥/٤ درصد نمونه‌ها جمعیت کپکی بیش از حد مجاز داشتند. در مطالعه سالاری و همکاران (۱۳۸٥) تعداد ۱۹۸ نمونه شیر و فرآورده‌های آن (شیر، ماست، خامه، پنیر و بستنی) در منطقه یزد مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج شمارش کپک و مخمر نشان‌دهنده آلودگی بیش از حد مجاز در ۱۱/۸ درصد از نمونه‌ها بود. در بین نمونه‌های مختلف، پنیر پایین‌ترین کیفیت میکروبی و بستنی بالاترین کیفیت را داشتند. در تحقیق فلاحی و مدنی (۱۳۹۳) بر روی ۲۰۰ نمونه از فرآورده‌های شیر (پنیر، دوغ، ماست، کشک و خامه) تولید شده در

اصفهان، ۱٦/۵ درصد نمونه‌ها تعداد کپک بیش از حد استاندارد داشتند. مقایسه درصد نمونه‌های غیرمجاز در بررسی اخیر بیانگر وجود اختلاف ۲ و ۳ برابری میزان این نمونه‌ها به‌ترتیب نسبت به مطالعات انجام یافته در اصفهان و یزد می‌باشد. به‌نظر می‌رسد تفاوت در شرایط اقلیمی از مهم‌ترین دلایل اختلاف میزان و سطح آلودگی باشد. به این معنی که متوسط دما در منطقه آذربایجان در قیاس با بخش‌های مرکزی و جنوبی ایران کمتر است؛ به‌علاوه رطوبت نسبی هوا نیز از میزان بالاتری برخوردار می‌باشد. این عوامل رشد و تکثیر کپک‌ها را تسهیل نموده و در نتیجه پراکندگی آن‌ها در محیط افزایش پیدا می‌کند. این آلودگی‌های محیطی در طی مراحل مختلف از جمله به‌هنگام شیردوشی و هم‌چنین فرآوری، موجب آلودگی شیر و فرآورده‌های آن می‌شوند.

در این بررسی، جنس‌های متنوعی از کپک‌ها در نمونه‌های آزمایش شده یافت گردید؛ با این توضیح که میزان فراوانی کپک‌ها از ۰/۳۸ درصد برای *رایزوپوس* تا ۷۰/۳۸ درصد در مورد *آسپرژیلوس* متغیر بود. جنس‌های *ژئوتریکوم*، *پنی‌سیلیوم*، *موکور*، *آلترناریا*، *استمفیلیوم*، *کلادوسپوریوم* و *فوزاریوم* فراوانی حدواسطی داشتند. دلاون و همکاران تنوع کپکی در شیر گاو، بز و میش را در فرانسه بررسی نمودند. طبق یافته‌های مطالعه ۲۷ گونه قارچی شناسایی شد که شیر گاو بالاترین تنوع قارچی را با ۱۵ گونه و پس از آن شیر میش با ٦ گونه و شیر بز با ٤ گونه قرار داشتند (Delavenne *et al.*, 2011). در تحقیق دیگری لاووی و همکاران نمونه‌های شیر خام را از ۱۹ دامداری در استان کبک کانادا جمع‌آوری و آزمایش نمودند. نتایج نشان داد ٦۷ درصد نمونه‌ها به مخمر و ۳۳ درصد به کپک آلوده بودند (Lavoie *et al.*, 2012).

آلودگی‌های کپکی در فرآورده‌های غیرپاستوریزه شیر بسیار معمول و حتی اجتناب‌ناپذیر است و در فرآورده‌هایی نظیر پنیرهای سنتی با تعداد و تنوع زیاد یافت می‌گردد. اردوغان و همکاران با مطالعه بر روی ٦۹ نمونه پنیر در ترکیه، کپک‌های متنوعی جداسازی نمودند. این کپک‌ها مشتمل بر ٦۹/۳ درصد *پنی‌سیلیوم*، ۱٤/۳ درصد *ژئوتریکوم*، ۷/۷ درصد *کرایزوسپوریوم* (Chrysosporium)، ۵/۵ درصد *موکور* و ۳/۳ درصد *رایزوپوس* بودند. در تمامی نمونه‌های آزمایش‌شده گونه غالب *پنی‌سیلیوم* گزارش گردید (Erdogan *et al.*, 2001). همین افراد در مطالعه دیگری از ۱۲ نمونه پنیر آبی تولوم (Blue mouldy Tulum cheese) تعداد ۱٦ جدایه به‌دست آوردند که ۱۲ مورد از آن‌ها *پنی‌سیلیوم* و ٤ مورد *ژئوتریکوم* بود. تمامی گونه‌های *پنی‌سیلیوم* جدا شده در این مطالعه توانایی تولید مایکوتوکسین را داشتند (Erdogan *et al.*, 2003). در بررسی‌های مشابه دیگری جنس‌های مختلف کپک از محصولات شیر جداسازی گردید که غالباً از نوع *پنی‌سیلیوم* بودند (Lund *et al.*, 1995; Hayaloglu, 2007). در مطالعه اخیر، به‌رغم این‌که نمونه‌های پنیر فراپالایشی از شیر حرارت دیده (۷۲ درجه سلسیوس و ۱۵ ثانیه و سپس ۷۸ درجه به مدت ۱ دقیقه) تهیه شده بودند، درصد بالایی (٥٦ درصد) از آلودگی کپکی ردیابی شد که ٤۰ درصد آن بیش از حد مجاز بود. جنس‌های کپکی موجود در نمونه‌های پنیر از تنوع بالایی نیز برخوردار بودند و برخلاف مطالعات دیگر، *آسپرژیلوس* جنس غالب را تشکیل می‌داد.

طبق یافته‌های این مطالعه، در نمونه‌های محیطی طیف گسترده‌تری از جنس‌های کپکی جداسازی و شناسایی گردید. نکته جالب توجه وجود درصد بالایی از آلودگی کپکی در ترکیبات و مواد افزودنی مجاز بود. برای مثال حضور کپک در تمامی نمونه‌های اخذ شده از ماده ضدکف و ضدچسبندگی مورد استفاده در تهیه پنیر فراپالایشی اثبات گردید و مهم‌تر از آن وجود آلودگی کپکی در پودر رنت بود که در تکرارهای مختلف از این نمونه و حتی در بسته‌بندی‌های رنت که برای اولین بار مورد استفاده قرار می‌گرفت، ردیابی گردید. این قبیل آلودگی‌های ثانویه در کنار آلودگی بالای سطوح و هوای سالن تولید و انبار نگه‌داری، می‌تواند منابع عمده‌ای از آلودگی کپکی در فرآورده‌های شیر به حساب آیند. این آلودگی‌ها در حین تهیه، فرآوری و بسته‌بندی وارد محصولات تخمیری شده و در دوره نگه‌داری نسبتاً طولانی این فرآورده‌ها، فرصت رشد پیدا می‌کنند. وجود همبستگی معنی‌دار ($p<$ ۰/۰۱) بین جنس‌های کپکی ردیابی شده در شیرخام با محصولات آن و هم‌چنین وجود همبستگی مشابه بین نوع آلودگی در منابع محیطی با محصولات شیر، ارتباط آلودگی کپکی فرآورده‌های تخمیری را با شیرخام و منابع محیطی نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای که با هدف شناسایی نوع آلودگی‌های کپکی در کارگاه‌های تولید و نگه‌داری پنیر در آلمان انجام گرفت، نتایج مشابهی به‌دست آمد. در بررسی مزبور *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس* فلور قارچی غالب را تشکیل می‌دادند. علاوه بر این، جنس‌های دیگری نظیر *ژئوتریکوم*، *کلادوسپوریوم* و گونه *یوروتیوم* (*Eurotium*) – فرم جنسی *آسپرژیلوس* و به‌ویژه *آسپرژیلوس گلاکوس* (*A. glaucus*)– نیز جداسازی گردید (Hoekstra *et al.*, 1998).

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان‌دهنده وجود دو منبع عمده آلودگی اولیه و ثانویه برای محصولات شیر است. وجود جمعیت بالای کپک در شیر خام و به‌ویژه احتمال حضور فرم اسکلروتیوم (Sclerotium) کپک‌ها که توده‌ای متشکل از میسیلیوم متراکم هستند، مقاومت حرارتی کپک را به‌طور چشم‌گیر افزایش داده و موجب عدم کفایت فرایندهای حرارتی نظیر پاستوریزاسیون و جوش می‌گردد. از سوی دیگر، عدم رعایت شرایط بهداشتی در حین تولید و بسته‌بندی موجب آلوده شدن ثانویه محصولات به انواع کپک‌ها می‌گردد. از آن‌جایی که هوا متداول‌ترین راه انتقال و انتشار کپک‌هاست، لذا افزایش کیفیت هوای سالن تولید با به‌کارگیری صافی‌ها و محدود نمودن جریان هوای ورودی به سالن به هوایی که از این صافی‌های عبور می‌کند، می‌تواند در کاهش آلودگی کپکی موثر باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب پایاننامه کارشناسی‌ارشد و با استفاده از امکانات آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی دانشکده‌های کشاورزی و دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز و حمایت مالی کارخانه شیر پاستوریزه پگاه آذربایجان‌شرقی انجام گرفت.

منابع

- رنجبر، سمیرا؛ نوری، میترا و نظری، راضیه (۱۳۸۹). بررسی آفلاتوکسین M1 شیر و ارتباط آن با فلور قارچی خوراک دام مصرفی در استان مرکزی. مجله علمی پژوهشی سلول و بافت، سال ۱، شماره ۱، صفحات: ۱۸-۹.
- سالاری، محمد حسین؛ شریفی، محمدرضا؛ گلزاری، سیدمحمد؛ صدرآبادی، علی‌اصغر و کفیلیان، محمدحسین (۱۳۸۵). بررسی آلودگی میکروبی شیر و فرآورده‌های آن در استان یزد. مجله دانشگاه بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، سال ٤، شماره ۱، صفحات: ٤۳-۳۷.
- شادزی، شهلا (۱۳۹۱). قارچ‌شناسی پزشکی. چاپ چهاردهم، انتشارات جهاد دانشگاهی واحد اصفهان، صفحات: ۳٤-۳۲.
- مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، (۱۳۷۲). میکروبیولوژی شیر و فرآورده‌های آن- ویژگی‌ها. استاندارد ملی ایران شماره ۲٤۰٦، تجدید نظر دوم.
- مرتضوی، سیدعلی؛ کاشانی‌نژاد، مهدی و ضیاالحق، حمیدرضا (۱۳۸٤). میکروبیولوژی مواد غذایی. (ترجمه). تألیف: فریزیر، ویلیام و وستهوف، دنیس، چاپ چهارم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات: ۳٦-۳۳.
- نبوی، محمد؛ قربانی، راهب؛ بمانیان، محمدحسن؛ رضایی، مرضیه و نبوی، مرجان (۱۳۸۸). بررسی شیوع آلرژی به کپک‌های معلق در هوا در بیماران مبتلا به رینیت آلرژیک مراجعه کننده به کلینیک آلرژی شهر سمنان. مجله علوم پزشکی سمنان، سال ۱۱، شماره ۱، صفحات: ۳۲-۲۷.
- Beuchat, L.R. and Cousin, M.A. (2001). Yeasts and Molds, In: Pouch Downes, F. and Ito, K. (Editors), Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3th Edition, American Public Health Association, Washington DC, pp. 209–215.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.L., Barbier, G., and Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. International Journal of Food Microbiology, 151(2): 247–251.
- Erdogan, A., Gurses, M., Turkoglu, H. and Sert, S. (2001). The determination of mold flora of some Turkish cheese types. Pakistan Journal of Biological Sciences, 4: 884–885.
- Erdogan, A., Gurses, M. and Sert, S. (2003). Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheese produced in Turkey. International Journal of Food Microbiology, 85(1): 83–85.
- Harrigan, W.F. (1998). Laboratory Methods in Food Microbiology, 3th Edition, Academic Press, pp. 349–375.
- Hayaloglu, A.A. (2007). Microbial quality and presence of molds in Kuflu cheese. International Journal of Food Microbiology, 115(3): 376–380.
- Hoekstra, E.S., Van der Horst, M.I., Samson, R.A., Stark, J., and Van Rijn, F.T.J. (1998). Survey of the fungal flora in Dutch cheese factories and warehouses. Journal of Food Mycology, 1: 13–22.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (1993). Microbiology of milk and its products features. Iranian National Standard No. 2406, second revised. [in Persian]
- Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology, 7th Edition, Springer, pp. 38–56.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D. and Labrie S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheese of the province of Quebec. Dairy Science and Technology, 92: 455–468.

- Mortazavi, S.A., Kashani Nejad, M. and Ziaalhag, H.R. (2005). Food Microbiology. (Translation). Author: Frazier, William and Vesthof, Dennis, 4th Edition, published by University of Mashhad: 36-33. [in Persian]
- Nabavi, M., Ghorbani, R., Bemanian, M.H., Rezaie, M. and Nabavi, M. (2009). Prevalence of mold allergy in patients with allergic rhinitis referred to Semnan clinic of allergy . koomesh. 11(1): 27-32. [in Persian]
- Panelli, S., Brambati, E., Bonacina, C. and Feligini, M. (2013). Diversity of fungal flora in raw milk from the Italian Alps in relation to pasture altitude. SpringerPlus, 2: 405.
- Ranjbar, S., Noori, M. and Nazari, R. (2010). Study of milk aflatoxin M1 and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province, Journal of Cell & Tissue, 1(1): 9-18. [in Persian]
- Salari, M.H. Sharyfi, M.R. Golzari, M. Sadrabadi, A.A. and Kafilian H. (2005). Study of Bacterial Contamination of Milk and Milk Products in Yazd Province, Journal of School of Public Health and Institute of Public Health Research, 4(1): 43-37. [in Persian]
- Shadzi, SH. (2012). Medical Mycology. 14th Edition, Publication of SID unit, Pages: 34-32. [in Persian]
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. and Geurts, T.J. (2006). Dairy Science and Technology, 2nd Edition, Taylor & Francis Group LLC, pp. 19–83.

Molds contamination of raw milk and dairy products: Occurrence, diversity and contamination source

Moshtaghi Maleki, T.[1], Hanifian, S.[2*]

1- M.Sc Graduate in Microbiology, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran
2- Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Ira
[*]Corresponding author email: hanifian@iaut.ac.ir
(Received: 2015/8/4 Accepted: 2015/10/7)

Abstract

This study aimed to assess the occurrence and diversity of mold species in raw milk and its products along with the identification of potential contamination sources. For this reason, a total of 260 samples consisting of 80 raw milk, 100 dairy products (i.e., pasteurized milk, yoghurt, cheese and buttermilk) and 80 environmental (i.e. ingredients, packaging materials, surface of processing equipments and air) specimens were collected. Using culture assay and microscopic observation, the occurrence as well as the diversity of mold species was investigated. According to the results, 82.3% of the samples were identified as positive for mold contamination. The percentage of mold contamination for raw milk was estimated as 97.5%. In the case of pasteurized milk, yoghurt, buttermilk, cheese and environmental samples, it was determined as 52%, 76%, 52%, 56% and 96.25%, respectively. Mold diversity among various samples consisted of *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Stemphylium*, *Cladosporium*, and *Fusarium*. Results revealed a significant ($p < 0.01$) correlation between kind of mold species isolated from raw milk and dairy products. Similarly, a correlation was observed between dairy products and environmental sources. Regarding the high occurrence of mold contamination in raw milk and environmental sources, it seems that in some instances heat treatment was not effective enough to inactivate all molds; whereas in some other cases, cross contamination may have resulted in mold contamination. Therefore, it is crucial to maintain hygienic conditions during raw milk handling as well as processing steps. These practices could efficiently reduce the occurrence of mold contaminations in dairy products.

Key words: Mold occurrence, Diversity, Raw milk, Dairy products, Contamination sources