جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ارزیابی روش احیای متیلن بلو در تعیین کیفیت باکتریایی شیر خام گاو

دکتر سید شهرام شکرفروش[1] دکتر دبیر رضایی[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ، دوره ۵۵ ، شماره ۱ ، ۳۸-۳۳، (۱۳۷۹)

یکی از آزمایشهایی که به منظور ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر خام صورت می‌گیرد، آزمایش احیای متیلن بلو است. اساس این آزمایش احیای متیلن بلوی افزوده شده به شیر ، در اثر فعالیت متابولیکی باکتریهای آن و بی‌رنگ شدن متیلن‌بلو می‌باشد. به‌منظور بررسی میزان همبستگی نتایج این آزمایش و همچنین تأثیر بعضی متغیرهای دیگر شیر با تعداد باکتریهای شمارش شده شیر به روش استاندارد شمارش پلیت (Standard Plate Count - SPC) ، در نیمه دوم سال ۱۳۷۷ از شیرهای دریافتی کارخانه شیر پاستوریزه پاک پی‌شهر کرد به‌صورت تصادفی ۱۱۲ نمونه برداشته شد و دما ، وزن مخصوص ، اسیدیته ، تعداد سلولهای سوماتیک ، مدت زمان احیای متیلن‌بلو (Methylene Blue Reduction Time) ، (MBRT) و تعداد باکتریهای شیر به روش SPC اندازه‌گیری شدند. ضریب همبستگی (r) بین Log_{10} SPC و MBRT معادل ۰/۴۱ - و بین Log_{10} SPC و تعداد سلولهای سوماتیک ۰/۲۸ بود. همبستگی بین Log_{10} SPC با وزن مخصوص (p = ۰/۰۷۲) ، دمای شیر در هنگام دریافت (p = ۰/۲۳۵) و اسیدیته (p = ۰/۷۴۵) در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود. این تحقیق نشان داد که برای ارزیابی کیفیت بهداشتی شیر خام گاو نمی‌توان از متغیرهای مذکور استفاده نمود. همچنین با توجه به ضعیف بودن ضریب همبستگی بین Log_{10} SPC و MBRT ، با استفاده از روش MBRT نمی‌توان ارزیابی مناسبی از کیفیت باکتریایی شیر خام گاو به‌دست آورد. لذا توصیه می‌شود که به جای استفاده از روش MBRT از روشهایی که تعداد باکتریهای موجود در شیر را شمارش می‌کنند از جمله روش SPC ، Spiral plating ، Plate loop و Flow cytometry استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی : احیای متیلن‌بلو ، ردوکتاز ، کیفیت باکتریایی شیر ، روش استاندارد شمارش پلیت .

کارخانه‌های شیر و لبنیات برای تولید محصول مناسب باید ماده اولیه مناسب یعنی شیر سالم و با کیفیت مطلوب ، در اختیار داشته باشند. لذا در محل دریافت شیر اقدام به نمونه‌گیری از شیرهای خریداری شده نموده و تعدادی آزمایش جهت کنترل کیفیت شیر انجام می‌دهند. کنترل شیرهای دریافتی علاوه بر اهمیت اقتصادی و تکنولوژیک دارای اهمیت بهداشتی نیز می‌باشد.

از آزمایشهای مهمی که بر روی شیرهای دریافتی صورت می‌گیرد، ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر می‌باشد. بدین منظور آزمایشهای مختلفی ابداع شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند. هر روشی مزایا و معایب خاص خود را دارا می‌باشد. یکی از این آزمایشها که در سال ۱۹۱۲ ابداع شده و سالها در بسیاری از کشورهای دنیا مورد استفاده قرار می‌گرفت، آزمایش احیای رنگها از جمله احیای متیلن بلو یا آزمایش ردوکتاز (Reductase) می‌باشد.

در سال ۱۹۱۲ برای اولین‌بار بارتل و اورلاجنسن (Barthel and Orla - Jensen) نشان دادند که از خاصیت احیای متیلن‌بلو می‌توان به‌عنوان یک شاخص برای تعیین کیفیت میکروبی استفاده نمود (۶).

اکثر میکروارگانیزمهای شیر از اکسیژن برای رشد خود استفاده می‌کنند. آنها در پروسه تنفس خود از اکسیژن مولکولی به‌عنوان یک گیرنده الکترون استفاده نموده و آب تولید می‌کنند. در صورتی که غلظت اکسیژن به حد کافی کاهش یابد بعضی باکتریها از ترکیبات دیگری به‌عنوان گیرنده الکترون استفاده می‌کنند. متیلن‌بلو و رزازورین دو ترکیب الکترون گیرنده هستند و در اثر جذب الکترون احیای شده و تغییر رنگ می‌دهند. متیلن‌بلو وقتی احیا می‌شود بی‌رنگ می‌شود و رزازورین که آبی ارغوانی است در اثر احیا شدن صورتی رنگ و سپس بی‌رنگ می‌شود (۵).

یکی از روشهایی که به منظور ارزیابی کیفیت میکروبی شیر خام در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد تستهای احیا می‌باشند. در این روشها فعالیت احیاکنندگی میکروارگانیزمها که توسط آنزیمهای مختلف دهیدروژناز (Dehydrogenases) که قادرند هیدروژن را از ترکیبات مختلف به یک پذیرنده بیولوژیک (Biological acceptor) منتقل کنند - صورت می‌گیرد ارزیابی می‌شود. پذیرنده‌های بیولوژیک مورد استفاده در این تستها رنگهایی می‌باشند که در اثر احیا شدن تغییر رنگ می‌دهند. شدت تغییر رنگ متناسب با میزان احیا شدن آن بوده و میزان احیا شدن رنگ متناسب با غلظت و یا فعالیت آنزیمهای دهیدروژناز باکتریهای موجود در شیر می‌باشد و در واقع از تغییر رنگ به‌عنوان یک شاخص برای تعیین تعداد میکروارگانیزمهای شیر استفاده می‌شود. استفاده از این تستها از سال ۱۹۳۰ متداول شد (۸) و در بسیاری از نقاط دنیا از آن برای ارزیابی کیفیت میکروبی شیر و به‌عنوان یکی از فاکتورهای تعیین قیمت شیر استفاده می‌شود (۶).

دلیل استفاده از این تستها بجای روشهای کشت میکروبی عبارتند از : نیاز به وسایل و تجهیزات اندک ، سریع بودن، ساده بودن روش کار و قابلیت انجام آزمایش به‌طور همزمان روی تعداد زیادی نمونه (۵ و ۹).

تستهای احیای رنگ در مواقعی کاربرد دارد که باکتریهای غیر سرماگرا (Non Psychrotrophic) - در شیر ، غالب باشند. اگر باکتریهای سرمادوست در شیر غالب باشند و یا در حالتی که تعداد باکتریهای شیر کمتر از یکصد تا دویست هزار در میلی‌لیتر باشد این تستها کارآیی نداشته و در این مواقع استفاده از روش استاندارد شمارش پلیت (Standard Plate Count - SPC) توصیه می‌شود (۸).

یکی از معایب روش مدت زمان احیای متیلن‌بلو (Methylene Blue Reduction Time - MBRT) این است که اطلاعاتی در خصوص نوع میکروارگانیزمهای آلوده کننده شیر نمی‌دهد. بعلاوه به‌دلیل اینکه شیر حاوی باکتریهای متنوعی از نظر گونه ، مرحله رشد و لذا قدرت احیاکنندگی متفاوتی می‌باشد، مدت زمان احیا شدن متیلن‌بلو همواره رابطه‌ای قوی با تعداد میکروارگانیزمهای شیر ندارد و به همین دلیل مخالفتهایی در جهت کارآیی این روش برای درجه‌بندی شیر وجود دارد و به‌طورکلی کارآیی این تست کم می‌باشد (۹).

علی‌رغم اینکه به دلیل عدم کارآیی مناسب تست MBRT ، استفاده از این تست از سه دهه قبل در بسیاری از کشورهای صنعتی جهان کنار گذاشته شده است در بسیاری از کشورهای دنیا از جمله ایران کماکان از این تست به منظور ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر خام استفاده می‌شود. و از آن به عنوان یکی از فاکتورهای تعیین قیمت شیر استفاده می‌شود (کارخانه‌های تحت پوشش سازمان صنایع شیر ایران تا اسفندماه سال ۱۳۷۷ از این آزمایش استفاده می‌نمودند و براساس نتایج آن به ازاء هر لیتر شیر تا ۵۰ ریال به عنوان جایزه بهداشتی به دامدار پرداخت می‌شد و از ابتدای سال ۱۳۷۸ روش SPC جهت

۱) گروه آموزشی بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران .
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهر کرد - ایران .

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی کیفیت بهداشتی شیر و مبنای پرداخت بهای آن درنظر گرفته شد. امّاکماکان در بسیاری ازکارگاههای بزرگ ،کارخانه‌های وابسته به بخش خصوصی و مراکز جمع‌آوری شیر از روش MBRT استفاده می‌شود).

نظر به اینکه در بررسیهای مقدماتی صورت گرفته رابطه دقیقی بین نتایج این آزمایش و تعداد باکتریهای شیر به‌دست نیامد تحقیق حاضر طراحی و به مرحله اجرا گذاشته شد. هدف اصلی این تحقیق بررسی میزان همبستگی بین MBRT و تعداد باکتریهای شیر خام شمارش شده توسط روش SPC بود. بعلاوه دیگر عواملی که احتمال داده می‌شد با کیفیت باکتریایی شیر ارتباط داشته باشند و بتوان با استفاده از آنها و با بهره‌گیری از معادله رگرسیون چند فاکتوری (Multifactorial regression) پیشگویی (Prediction) دقیقی از وضعیت باکتریایی شیر خام انجام داد، اندازه‌گیری شدند. این عوامل عبارت بودند از : وزن مخصوص شیر، اسیدیته شیر ، تعداد سلولهای سوماتیک شیر و دمای شیر در هنگام دریافت.

مواد و روش کار

در نیمه دوم سال ۱۳۷۷ به مدت ۶ ماه تعداد ۱۱۲ نمونه از تانکرهای شیر خام گاو تحویل شده به کارخانه شیر پاستوریزه پاک پی‌شهر کرد اخذ شد. نمونه‌ها به‌طور تصادفی انتخاب و از هر مخزن شیر ارسالی پس از بهم زدن و یکنواخت نمودن، نیم لیتر برداشت می‌شد.

نمونه‌ها از زمان نمونه‌برداری تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند و آزمایشهای مربوطه در همان روز روی نمونه‌ها صورت می‌گرفت. آزمایشهای انجام شده روی نمونه‌ها عبارت بودند از :

۱ - اندازه‌گیری دمای شیر : دمای شیر بلافاصله پس از نمونه‌برداری با استفاده از دماسنج جیوه‌ای با حساسیت ۰/۱ درجه سانتیگراد اندازه‌گیری می‌شد.

۲ - وزن مخصوص شیر : وزن مخصوص شیر با استفاده از ترمولاکتودانسیمتر (Thermolactodensimeter) و در دمای حدود ۲۰ درجه سانتیگراد تعیین و براساس دمای ۲۰ درجه سانتیگراد تصحیح می‌شد (۳).

۳ - اسیدیته شیر : اسیدیته شیر با استفاده از سود ۰/۱ نرمال استاندارد شده و معرف فنل فتالئین اندازه‌گیری و برحسب درجه دورنیک محاسبه می‌گردید (۳).

۴ - شمارش سلولهای سوماتیک شیر : شمارش سلولهای سوماتیک شیر به طریقه شمارش مستقیم میکروسکوپی (Direct microscopic count - DMC) و به روش برید (Breed) و با رنگ‌آمیزی گیمسا انجام شد (۳).

۵ - MBRT : مدت زمان احیای متیلن‌بلو براساس روش ذکر شده در منبع شماره ۳ انجام شد. پس از قرار دادن نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و تا زمان برطرف شدن رنگ آبی، هر ۱۵ دقیقه یک بار نمونه‌ها چک می‌شدند.

۶ - SPC : شمارش باکتریهای شیر به روش استاندارد ذکر شده در منبع شماره ۳ و در محیط Nutrient agar انجام گرفت.

در این تحقیق تعداد باکتریهای شمارش شده شیر به روش SPC به‌عنوان شاخص کیفیت باکتریایی شیر درنظر گرفته شد و جهت ارزیابی عوامل دیگری که احتمال استفاده از آنها به‌عنوان شاخص کیفیت میکروبی شیر داده می‌شد، از متغیر مذکور به‌عنوان معیار استفاده شد.

برای بررسی ارتباط متغیرهای مختلف کمّی اندازه‌گیری شده در شیر شامل وزن مخصوص ، اسیدیته ، دمای شیر در هنگام دریافت و تعداد سلولهای سوماتیک (به‌عنوان متغیرهای غیر وابسته) با SPC به‌عنوان متغیر کمّی وابسته از آزمون همبستگی پیرسون (Pearson correlation coefficient) استفاده شد. برای بررسی ارتباط MBRT به‌عنوان متغیر کمّی وابسته و SPC به‌عنوان متغیر کمّی غیر وابسته از آزمون همبستگی پیرسون و برای بررسی ارتباط درجه‌بندی کیفیت شیر براساس MBRT به‌عنوان متغیر رتبه‌ای وابسته و درجه‌بندی کیفیت شیر براساس SPC به‌عنوان متغیر غیر وابسته از آزمون همبستگی رتبه‌ای اسپرمن (Spearman rank correlation coefficient) استفاده شد. لازم به ذکر است که از آزمون آماری پیرسون برای بررسی ارتباط متغیرهای کمّی و از آزمون اسپرمن برای بیان ارتباط بین دو خصوصیت ترتیبی (یا یکی ترتیبی و دیگری عددی) استفاده می‌شود (۲).

نتایج

خلاصه نتایج آزمایشهای انجام شده روی ۱۱۲ نمونه شیر اخذ شده از شیرهای دریافتی کارخانه شیر پاستوریزه پاک پی‌شهر کرد در جدول ۱ و ضریب همبستگی (Correlation coefficient = r) , ضریب تعیین (Coefficient of determination = R^2) و مقدار P آن در جدول ۲ آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۲ نیز نشان داده شده است، وزن مخصوص شیر ، اسیدیته و دمای شیر در هنگام دریافت ارتباط معنی‌داری با Log_{10} SPC ندارد ($p > ۰/۰۵$). لگاریتم تعداد سلولهای سوماتیک به‌طور معنی‌داری با SPC و Log_{10} SPC ارتباط دارد ($p < ۰/۰۱$). اما این ارتباط ضعیف بوده و ضریب تعیین آن به‌ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۸ می‌باشد. MBRT ارتباط معنی‌داری با SPC ندارد ($P < ۰/۲$) . ولی با Log_{10} SPC ارتباط معنی‌داری دارد ($P < ۰/۰۱$) ، اما این ارتباط ضعیف بوده و ضریب تعیین آن ۰/۱۷ می‌باشد. این همبستگی در نمودار ۱ نشان داده شده است.

کارخانه‌های شیر پاستوریزه تحت پوشش سازمان صنایع شیر کشور براساس MBRT شیرهای مورد آزمایش را به چهار دسته تقسیم‌بندی می‌کنند. این مدت برای شیر درجه یک بیش از ۴ ساعت ، برای شیر درجه دو ۴ - ۲/۵ ساعت ، درجه سه ۲/۵ - ۱/۵ ساعت و درجه چهار کمتر از ۱/۵ ساعت می‌باشد. بر این اساس شیرهای مورد آزمایش به چهار گروه دسته‌بندی شدند و میزان همبستگی آنها با SPC و Log_{10} SPC بررسی شد. این ارتباط نیز ضعیف بوده و ضریب تعیین آن ۰/۲۶ می‌باشد. این همبستگی در نمودار ۲ نشان داده شده است.

علاوه بر درجه‌بندی شیر براساس MBRT ، کارخانه‌ها شیر پاستوریزه کشور براساس جدیدترین دستورالعمل، شیر را از نظر کیفیت باکتریایی و براساس SPC به پنج گروه تقسیم‌بندی می‌کنند :

شیر درجه یک $< 5 \times 10^5$ CFU / ml ، شیر درجه دو $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ CFU / ml ، شیر درجه سه $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ CFU / ml، شیر درجه چهار $2 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CFU / ml و شیر درجه پنج $> 5 \times 10^6$ CFU / ml . نمونه‌های مورد آزمایش بر این اساس نیز درجه‌بندی شدند و ضریب همبستگی بین گروه‌های مختلف آن باگروه‌های مختلف شیر درجه‌بندی شده براساس MBRT محاسبه شد که در نمودار ۳ نشان داده شده است. ضریب همبستگی و ضریب تعیین بین این دو به‌ترتیب ۰/۴۴ و ۰/۱۹ به‌دست آمد. این میزان همبستگی بین درجه‌بندی شیر براساس MBRT و درجه‌بندی شیر براساس SPC بسیار ضعیف می‌باشد. برای مثال شیرهایی که براساس MBRT درجه یک تشخیص داده شده‌اند براساس SPC جزء شیرهای درجه یک ، درجه سه ، درجه چهار و درجه پنج می‌باشند و یا شیرهایی که براساس نتایج SPC درجه پنج تشخیص داده شده‌اند (تعداد باکتریهای آنها بیش از 5×10^6 CFU/ml بوده است)، براساس آزمایش MBRT جزء شیرهای درجه یک ، دو ، سه و چهار درجه‌بندی شده‌اند. لذا درجه‌بندی شیر براساس MBRT معیار مناسبی برای تعیین کیفیت باکتریایی شیر نمی‌باشد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱ - خلاصه نتایج حاصل از آزمایشهای مختلف صورت گرفته روی ۱۱۲ نمونه شیر

نام آزمایش	تعداد نمونه	Mean ± S. D.
وزن‌مخصوص‌شیر	۱۰۳	۱/۰۳۱ ± ۰/۰۰۱۴
اسیدیته شیر (درجه دورنیک)	۱۱۱	۱۴/۵۳ ±۱/۲۳
لگاریتم تعداد سلولهای سوماتیک	۱۰۸	۵/۸۶ ± ۰/۳۰
دمای شیر در هنگام دریافت (°C)	۱۱۰	۱۹/۹۳ ± ۷/۹۱
MBRT (دقیقه)	۱۰۹	۱۲۶/۱۹ ± ۹۶/۴۸
Log_{10} SPC	۱۱۰	۶/۱۳ ± ۱/۳۳

جدول ۲ - ضریب همبستگی (r) و ضریب تعیین (R^2) متغیرهای مختلف بررسی شده در شیر با SPC و Log_{10} SPC

متغیرها	تعداد نمونه	SPC			Log_{10} SPC		
		r	R^2	p values	r	R^2	p values
وزن مخصوص شیر	۱۰۳	- ۰/۲۱	۰/۰۴	۰/۰۳۳	- ۰/۱۸	۰/۰۳	۰/۰۷۲
اسیدیته (درجه دورنیک)	۱۱۰	- ۰/۰۵	۰/۰۰	۰/۵۷۷	- ۰/۰۳	۰/۰۰	۰/۷۴۵
لگاریتم تعداد سلولهای سوماتیک	۱۰۷	۰/۳۳	۰/۱۱	۰/۰۰۰	۰/۲۸	۰/۰۸	۰/۰۰۳
دمای شیر در هنگام دریافت (°C)	۱۰۹	۰/۰۷	۰/۰۱	۰/۴۵۱	- ۰/۱۱	۰/۰۱	۰/۲۳۵
MBRT (دقیقه)	۱۰۸	- ۰/۱۰	۰/۰۱	۰/۲۸۹	- ۰/۴۱	۰/۱۷	۰/۰۰۰
درجه‌بندی شیر براساس MBRT	۱۰۸	۰/۵۱	۰/۲۶	۰/۰۰۰	۰/۵۱	۰/۲۶	۰/۰۰۰

بحث

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است وزن مخصوص ، اسیدیته و دمای شیر در هنگام دریافت ارتباط معنی‌داری با Log_{10} SPC نداشته ($P > ۰/۰۵$) و از این متغیرها نمی‌توان جهت ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر خام استفاده نمود.

هر چند که اسیدیته شیر یکی از فاکتورهای مهم تعیین تازگی یا ماندگی شیر است و اهمیت زیادی در کیفیت فرآورده‌های مختلفی که از شیر به‌دست می‌آیند دارد، اما از این فاکتور نمی‌توان به‌عنوان یک شاخص تعیین کیفیت میکروبی شیر خام استفاده نمود. عدم ارتباط میزان اسیدیته شیر با تعداد باکتریهای آن به‌دلیل تنوع گونه‌های باکتریایی موجود در شیر و تفاوت در توانایی آنها برای تولید اسید می‌باشد.

در این تحقیق ارتباط معنی‌داری بین دمای شیر در هنگام دریافت و کیفیت باکتریایی شیر به‌دست نیامد ($p > ۰/۲$) براساس گزارش FAO نیز دمای شیر در زمان دریافت ارتباطی با کیفیت باکتریایی آن ندارد (۶).

لگاریتم تعداد سلولهای سوماتیک شیر به‌طور معنی‌داری با SPC و Log_{10} SPC ارتباط دارد ($P < ۰/۰۱$) اما این ارتباط ضعیف بوده و ضریب تعیین آن به‌ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۸ می‌باشد. هر چند که تعداد سلولهای سوماتیک موجود در شیر نیز یکی از شاخصهای کیفیت شیر می‌باشد، و از آن به‌عنوان یک شاخص مهم جهت بررسی سلامت غده پستان و شیر تولید شده توسط دام استفاده می‌شود، اما از این متغیر نمی‌توان به‌عنوان یک شاخص کیفیت باکتریایی شیر استفاده نمود.

در این تحقیق ضریب همبستگی بین MBRT با Log_{10} SPC - ۰/۴۱ به‌دست آمد. این مقدار همبستگی ضعیف بوده و از آن نمی‌توان به‌عنوان شاخص کیفیت باکتریایی شیر استفاده نمود. با توجه به اینکه ضریب تعیین مربوطه ۰/۱۷ می‌باشد، فقط ۱۷ درصد تغییرات مقادیر تعداد باکتریهای شیر براساس SPC با MBRT در ارتباط است. لذا براساس مقادیر MBRT و با استفاده از معادله رگرسیون خطی ($y = a + bx$) و یا نمودار رگرسیون نمی‌توان پیشگویی (Predication) قویی در خصوص تعداد باکتریهای شیر انجام داد.

در تحقیق مشابهی که در سال ۱۳۷۷ توسط قفلگر قاسمی در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صورت گرفت، ضریب تعیین بین MBRT و SPC ۰/۲۳ به‌دست آمد (۴).

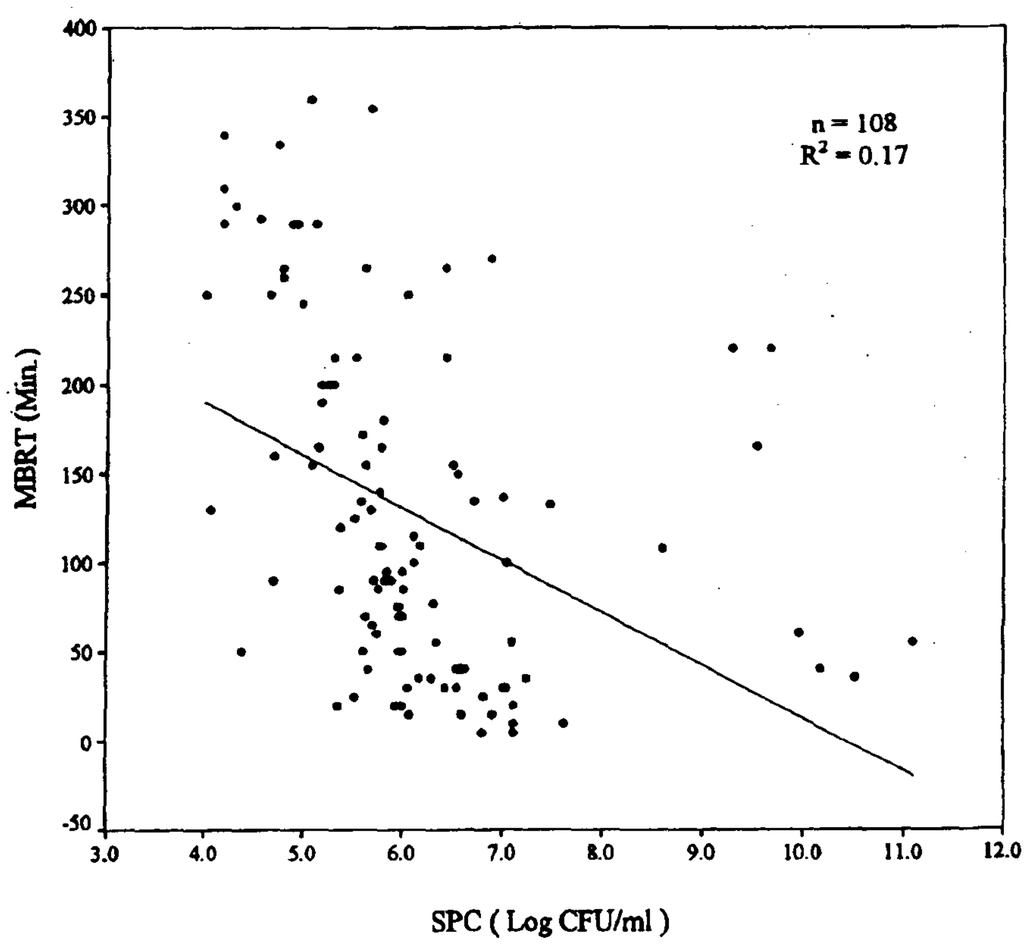
میزان اکسیژن مصرفی در شیر و میزان احیا شدن رنگها شاخصی برای تعداد میکروارگانیزمهای شیر می‌باشد اما باکتریهای سرمادوست و مقاوم به‌گرما (Thermoduric) در مقایسه با دیگر باکتریهای موجود در شیر توانایی کمی در احیاء رنگها دارند. نتایج حاصل از این تست متناسب با تعداد میکروارگانیزمهای موجود در شیر نیست. بلکه صرفاً به منظور دسته‌بندی شیر قابل استفاده است. همبستگی نتایج حاصل از این تست در شیرهای با کیفیت بالا با نتایج شمارش باکتریها ضعیف می‌باشد (۴). همبستگی ضعیفی بین نتایج حاصل از این تست و تعداد باکتریهای شیر که با روش شمارش کلونیها به‌دست می‌آید وجود دارد (۶).

عدم همبستگی بین MBRT و تعداد باکتریهای شیر تخمین زده شده توسط روش SPC ممکن است به‌دلایل زیر باشد :

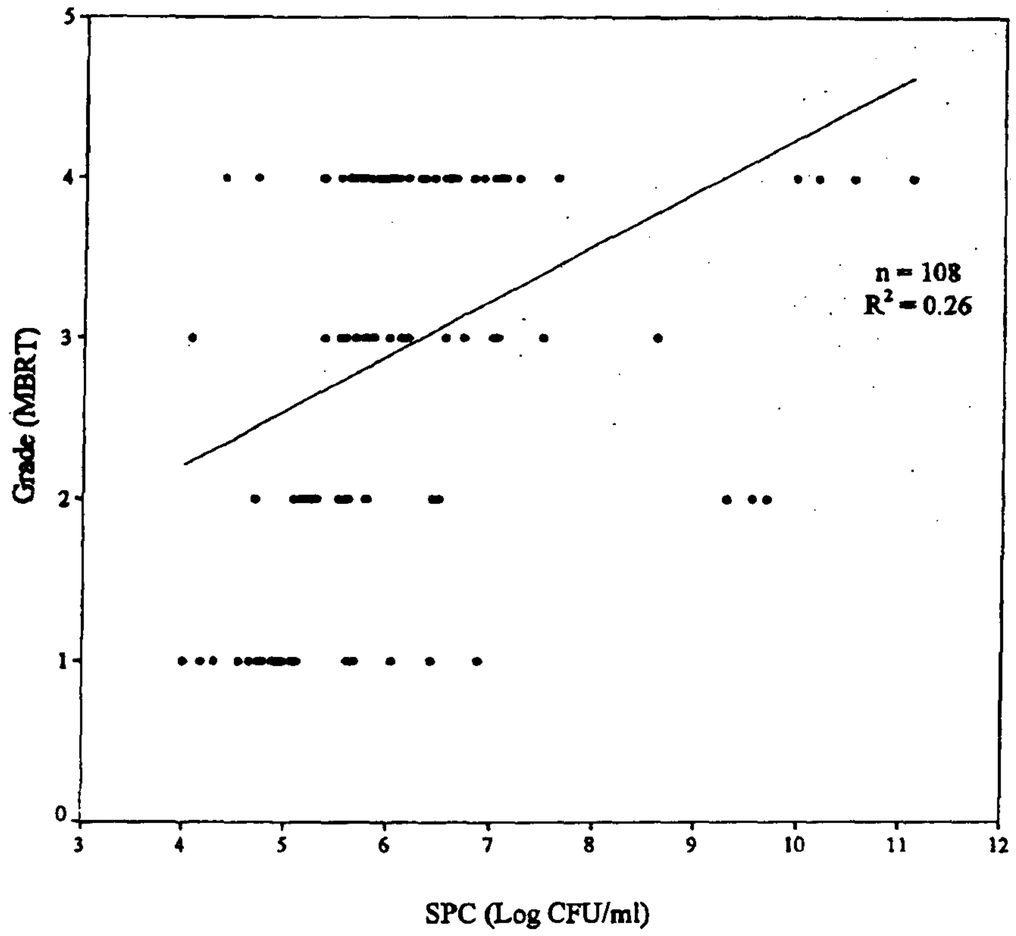
۱ - تفاوت قدرت احیاکنندگی گونه‌های مختلف باکتریها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مثال بیشتر باکتریهای مقاوم به‌گرما فعالیت احیاکنندگی کمتری نسبت به دیگر باکتریهای متداول موجود در شیر دارند و لذا این تست جهت تشخیص آنها کارآیی لازم را ندارد (۹).

۲ - ناتوانی بعضی از باکتریهای شیر در احیای متیلن‌بلو به‌دلیل عدم توانایی تکثیر و تزاید در شیر و یا دمای انکوباسیون (۹).

۳ - تفاوت باکتریها در نسبتی از آنها که همراه گلبولهای چربی به سطح شیر آمده



نمودار ۱ - همبستگی و خط رگرسیون بین MBRT و لگاریتم SPC



نمودار ۲ - همبستگی و خط رگرسیون بین درجه‌بندی شیر براساس MBRT و لگاریتم SPC

و در لایه چربی روی شیر قرار می‌گیرند (۹).

۴ - در آزمایش SPC یک توده باکتری (Clump) تشکیل یک کلونی را می‌دهند، در حالی که در آزمایش احیای رنگها، میزان احیای‌کنندگی آن متناسب با تعداد باکتریهای آن می‌باشد (۹).

۵ - وجود ترکیبات مهارکننده رشد باکتریها مثل آنتی‌بیوتیکها در شیر (۹). در تحقیق حاضر به منظور بررسی وجود آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های شیر مورد آزمایش با استفاده از روش چهار پلیت (Four Plate Test) (۱) نمونه‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند و از ۱۱۲ نمونه شیر ۷ مورد (۶/۲۵ درصد) آلوده به آنتی‌بیوتیک تشخیص داده شدند.

۶ - وجود سلولهای سوماتیک در شیر احتمالاً موجب کاهش اکسیژن محلول در شیر شده و در نتیجه در مدت زمان احیای متیلن‌بلو تأثیر دارد (۱۱). در تحقیق حاضر همبستگی بین این دو متغیر از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > ۰/۲$).

۷ - وجود آغوز ، شیر گاوهای ورم پستانی و شیر گاوهایی که مدت زیادی از زایش آنها گذشته است موجب کوتاه شدن زمان احیای متیلن‌بلو می‌شود (۱۱).

USDA آمریکا استفاده از تست احیای متیلن‌بلو را به‌دلیل همبستگی ضعیف آن با دیگر تستهای ارزیابی تعداد باکتریهای شیر ، به‌عنوان یک آزمایش استاندارد برای ارزیابی کیفیت میکروبی شیر توصیه نمی‌نماید (۹).

تست احیای رنگها از جمله احیای متیلن‌بلو حساسیت کافی جهت دسته‌بندی دقیق (Fine Grading) شیر از نظر کیفیت میکروبی را ندارد و صرفاً براساس نتایج حاصل از این تستها می‌توان شیر را به دو دسته قابل قبول و غیر قابل قبول دسته‌بندی نمود (۶).

تست احیای رنگ ارزشی در ارزیابی کیفیت بهداشتی شیرهایی که ۱۵ - ۱۰ ساعت از دوشیده شدن آنها گذشته و یا شیرهایی که از زمان دوشش تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شده‌اند ندارد (۶).

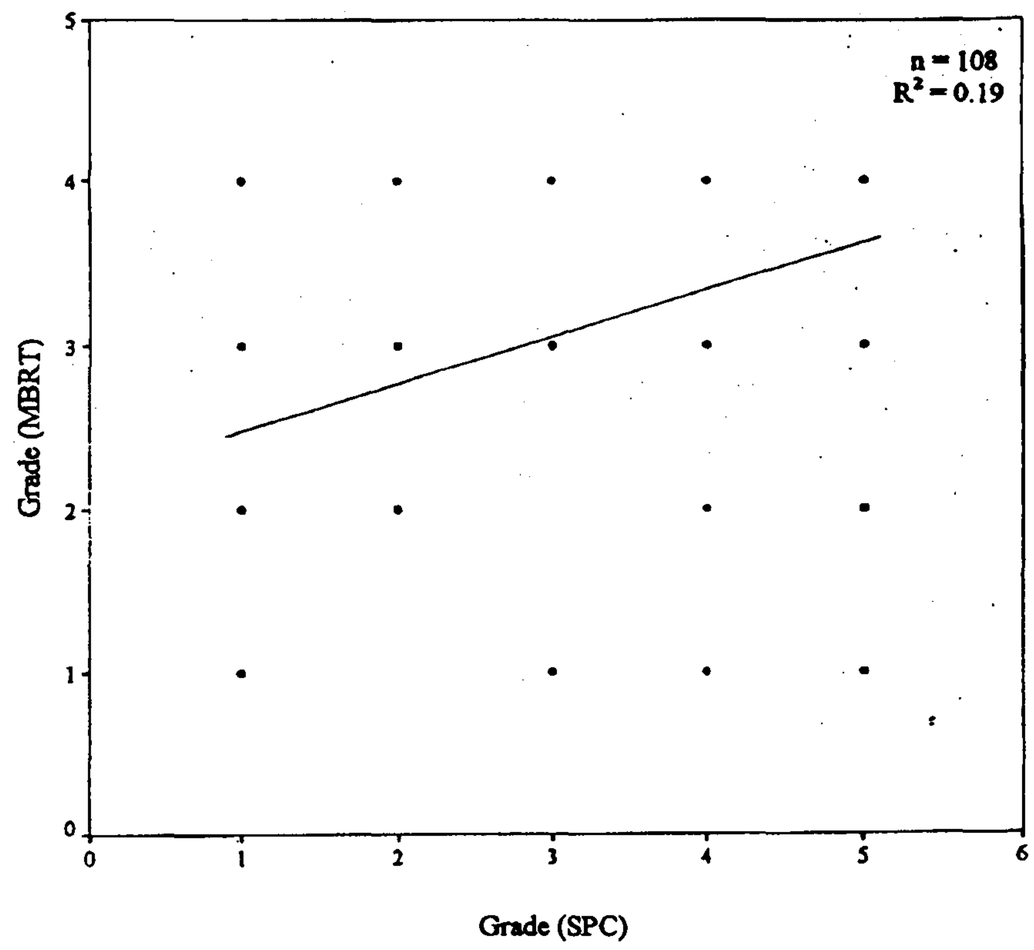
گارسیا و همکاران (Garcia et al 1994) در تحقیقی که به منظور کارآیی آزمونهای احیای رنگ جهت ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر خام میش بدون نگهداری قبلی در یخچال انجام دادند، ضریب همبستگی بالایی را بین نتایج حاصل از تست احیاء متیلن‌بلو و تعداد باکتریهای مزوفیل شیر به‌دست آوردند ($r = ۰/۷۷$) اما ضریب همبستگی بین تست مذکور و تعداد کلی‌فرمها ۰/۰۲ - ، استافیلوکوکوس ۰/۲۳ - ، انتروکوکوس ۰/۴۳ - ، انتروباکتریاسه ۰/۴۹ - و باکتریهای مقاوم به گرما ۰/۳۷ - بود (۷).

محققین زیادی گزارش کرده‌اند که تستهای احیای رنگها به شدت تحت تأثیر باکتریهای مولد اسید لاکتیک (Lactic acid bacteria) (۱۰ و ۱۲) و دیگر میکروارگانیزمهای مولد اسید هستند (۱۲).

در تست احیای متیلن‌بلو ، انکوباسیون نمونه‌ها در دمای $۳۷^\circ C$ شرایط نامناسبی را جهت رشد و تزاید باکتریهای سرمادوست موجود در شیر ایجاد می‌کند و در این دما فعالیت متابولیکی آنها به شدت کاهش می‌یابد. در صورت استفاده از دمای $۳۰^\circ C$ به جای $۳۷^\circ C$ فعالیت این دسته از باکتریها بیشتر شده و ضریب همبستگی بین تعداد باکتریهای سرمادوست موجود در شیر با مدت زمان احیای متیلن‌بلو بیشتر می‌شود، اما به دلیل کاهش فعالیت باکتریهای مزوفیل، ضریب همبستگی این تست با تعداد کل باکتریهای شیر ضعیف‌تر می‌شود (۷).

رینمر و همکاران (Reinheimer et al 1988) نشان دادند در صورتی‌که قبل از انجام آزمایش احیای متیلن‌بلو روی شیر خام گاو ، آنرا برای مدت ۴۸ ساعت در دمای $۵^\circ C$ نگهدای کنند ضریب همبستگی بین MBRT و تعداد باکتریهای شیر بسیار ضعیف خواهد شد (۱۳).

ارزش تست احیای متیلن‌بلو جهت ارزیابی کیفیت میکروبی شیرهایی که از زمان دوشش تا موقع آزمایش در یخچال نگهداری می‌شود محدود می‌باشد.



نمودار ۳ – همبستگی و خط رگرسیون بین درجه‌بندی شیر براساس MBRT و درجه‌بندی شیر براساس SPC

برای انجام تست احیای متیلن‌بلو در شیر خام باید ابتدا شیر در دمای ۲۱°C - ۱۷ به‌مدت ۱۶/۵ تا ۲۴ ساعت نگهداری شود، سپس مورد آزمایش قرار گیرد (۱۴).

در بسیاری از کشورها از سال ۱۹۷۲ روشهای Oval Tube و Plate loop method جایگزین روشهای احیای رنگ ، شمارش مستقیم میکروسکوپی (Direct microscopic count = DMC) و SPC شده است. نتایج روشهای Oval Tube و Plate loop method بسیار قابل اعتمادتر از نتایج احیای رنگ و DMC بوده و نسبت به روش SPC نیز سرعت عمل بیشتر و هزینه کمتری دارند. روش Plate Loop از سال ۱۹۷۰ در آمریکا به‌عنوان یک روش مناسب جهت درجه‌بندی شیر مورد پذیرش قرار گرفته است (۵).

در آلمان بجای استفاده از تستهای احیای رنگ از اندازه‌گیری مقدار پیروات (Pyrovate) به عنوان یکی از ترکیبات متابولیکی میکروارگانیزمها استفاده می‌شود و یکی از فاکتورهای تعیین قیمت شیر سیصد هزار گله گاو شیری این کشور این آزمایش می‌باشد که هر ماه دو بار انجام می‌شود (۸).

پیشنهادات

۱ - با توجه به عدم ارتباط معنی‌دار و یا همبستگی ضعیف بین دمای شیر در زمان دریافت، اسیدیته شیر ، تعداد سلولهای سوماتیک شیر و MBRT با تعداد باکتریهای شیر ، توصیه می‌شود از عوامل مذکور جهت ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر خام استفاده نشود.

۲ - برای ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر خام از روش SPC استفاده شود و جهت افزایش دقت و سرعت کار از دستگاههای اتوماتیکی که بدین منظور طراحی و ساخته شده‌اند از جمله روش Plate Loop استفاده شود.

۳ - در صورت استفاده از دستگاههای اتوماتیک باکتری‌شمار و یا روشهای دیگر، توصیه می‌شود قبلاً میزان همبستگی نتایج آنها با نتایج SPC بررسی و در صورت وجود همبستگی قوی از آنها استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از مدیریت محترم کارخانه شیر پاستوریزه پاک پی شهر کرد و کارشناسان و پرسنل محترم آزمایشگاه آن کارخانه که در انجام این تحقیق صمیمانه همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. حسین‌خان ناظر ، ع. شکرفروش، ش . قانعی ، ک. استفاده از روش FPT جهت تعیین باقیمانده آنتی‌بیوتیک در لاشه گوسفند، فصلنامه پژوهش و سازندگی شماره ۲۶ ، صفحات ۱۸۳ - ۱۸۰ ، (۱۳۷۴).

۲. سرافراز، ع . ا ، و غفارزادگان ، ک. آمار پزشکی : پایه و بالینی، ترجمه، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، (۱۳۷۶).

۳. فرخنده ، ع. روشهای آزمایش شیر و فرآورده‌های آن، جلد اول، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران، (۱۳۷۰).

۴. قفلگر قاسمی ، م . مقایسه کارآیی روشهای آزمایش احیاء بلودومتیلن در کنترل کیفیت بهداشتی شیر خام ، پایان‌نامه دوره دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۱۳، (۱۳۷۷).

5. Campbell, J. R. and Marshall, R. T. The science of providing milk for man. Mc Graw, Hill Publication, (1975).

6. FAO Payment for milk on quality, FAO, Rome, Italy, (1972).

7. Garcia - Armesto, R., Prieto, M., Otero, A., Encinas, J., Garcia - Lopez, L. and Moreno, B. Assesment of the microbiological quality of raw ewes milk by rapid colorimetric methods, Netherlands Milk and Dairy, J. 48, 99 - 110, (1994).

8. Gravert, H. O. Dairy cattle production (World animal science, C : 3), Elsevier science Publisher, (1987).

9. Hausler, W. J. Standard methods for the examination of dairy products. 13 th ed. American Public Health Association, (1974).

10. Kroll, R. G. Dye reduction and other colorimetric methods for the assesment of microbial contamination, In : Rapid methods in food microbiology. Progress in industrial microbiology vol. 26 . M. R. Adams and C. F. A. Hope. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, NL. (1989).

11. Lampert, L. M. Modern dairy products. Chemical publishing company, Inc. New York, (1970).

12. Luck, H. Bacteriological quality tests for bulk - cooled milk Dairy Sci. Abst. 34, 101 - 122, (1972).

13. Reinheimer, J. A., Zalazar, C. A. Bargagna, M. L. Demkow, M. R. and Ramanzin, M. G. Use of methylene blue reduction test for evaluation of bulk cooled milk bacterial quality. SciencaTec. Latt. 39, 102 - 111, (1988).

14. Robinson, R. K. Dairy Microbiology , Volume 1. the microbiology of milk. 2 th ed. Elsevier Applied Science. London, (1990).

Use of methylene blue reduction test for evaluation of the bacterial quality of raw cow milk

Shekarforoush, S.S.[1] , Rezaie, D.[2]

[1]*Department of Food Hygiene, School of Veterinary, Medicine, Shiraz University, Shiraz - Iran.* [2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Azad university, Shahr-e - Kourd - Iran.*

The methylene blue reduction method measures bacterial density in milk in term of the time interval required, after starting incubation, for a dye - milk mixture with a characteristic blue color to become white. The principle of the test is based on a shift of the redox potential of the milk due to metabolic action of bacteria present. As the potential falls, the methylene blue is decolorized. This method is used to grade raw milk, especially for manufacturing purposes. The small amount of equipment and materials and the simplicity of the method are the most important advantages of this test. In this study methylene blue reduction test and standard plate count were compared using 112 samples of raw milk obtained from bulk milk, at the time of receipt, during fall and winter, 1998. Samples were also examined for their acidity, leukocyte count, temperature at the time of receipt and specific gravity, all of which used for evaluating the microbiological quality of raw milk. Correlation cofficient between Log_{10} standard plate count with methelye blue reduction time and Leukocyte count were low ($r = 0.41$ and 0.28 respectively) No significant correlation was observed between Log_{10} SPC with the tests of specific gravity ($p = 0.072$) temperature at the time of receipt ($p = 0.235$) and e acidity ($p = 0.745$). This study shows that none of these tests are valuable for assessing bacterial quality of raw milk, and they cannot result in improved coefficient of determiantion (R^2) in multifactorial regression equation. It is concluded that the methylene blue reduction test is an unsuitable test for assesment of bacterial quality of raw cow milk and it should be replaced with other methods which enumerate microorganisms in milk, such as spiral palting system, plate loop method or flow cytometry.

key words : Methylene blue reduction test, Standard plate count, Bacterial quality, Cow milk.