

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

دکتر سید شهرام شکر فروش^۱ دکتر دبیر رضایی^۲

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

متیلن بلو و رزازورین دو ترکیب الکترون گیرنده هستند و در اثر جذب الکترون احیای شده و تغییر رنگ می دهند. متیلن بلو وقتی احیا می شود بی رنگ می شود و رزازورین که آبی ارغوانی است در اثر احیا شدن صورتی رنگ و سپس بی رنگ می شود (۵).

یکی از روشهایی که به منظور ارزیابی کیفیت میکروبی شیر خام در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد تستهای احیا می باشند. در این روشها فعالیت احیاکنندگی میکروارگانیسمها که توسط آنزیمهای مختلف دهیدروژناز (Dehydrogenases) که قادرند هیدروژن را از ترکیبات مختلف به یک پذیرنده بیولوژیک (Biological acceptor) منتقل کنند - صورت می گیرد ارزیابی می شود. پذیرنده های بیولوژیک مورد استفاده در این تستها رنگهایی می باشند که در اثر احیا شدن تغییر رنگ می دهند. 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 می باشد و در واقع از تغییر رنگ به عنوان یک شاخص برای تعیین تعداد میکروارگانیسمهای شیر استفاده می شود. استفاده از این تستها از سال ۱۹۳۰ متداول شد (۸) و در بسیاری از نقاط دنیا از آن برای ارزیابی کیفیت میکروبی شیر و به عنوان یکی از فاکتورهای تعیین قیمت شیر استفاده می شود (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 به طور 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 سرما دوست در شیر غالب باشند و یا در حالتی که تعداد باکتریهای شیر کمتر از یکصد تا دویست هزار در میلی لیتر باشد این تستها کارایی نداشته و در این مواقع استفاده از روش استاندارد شمارش پلیت (Standard Plate Count - SPC) توصیه می شود (۸).

یکی از معایب روش مدت زمان احیای متیلن بلو (Methylene Blue Reduction Time - MBRT) این است که اطلاعاتی در خصوص نوع میکروارگانیسمهای آلوده کننده شیر نمی دهد. بعلاوه به دلیل اینکه شیر حاوی باکتریهای متنوعی از نظر گونه، مرحله رشد و لذا قدرت احیاکنندگی متفاوتی می باشد، مدت زمان احیا شدن متیلن بلو همواره رابطه ای قوی با تعداد میکروارگانیسمهای شیر ندارد و به همین دلیل مخالفتهایی در جهت کارایی این روش برای درجه بندی شیر وجود دارد و به طور کلی کارایی این تست کم می باشد (۹).

علی رغم اینکه به دلیل عدم کارایی 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 می شود. و از آن به عنوان یکی از فاکتورهای تعیین قیمت شیر استفاده می شود (کارخانه های تحت پوشش سازمان صنایع شیر ایران تا اسفندماه سال ۱۳۷۷ از این آزمایش استفاده می نمودند و براساس نتایج آن به ازاء هر لیتر شیر تا ۵۰ ریال به عنوان جایزه بهداشتی به دامدار پرداخت می شد و از ابتدای سال ۱۳۷۸ روش SPC جهت

یکی از آزمایشهایی که به منظور ارزیابی کیفیت باکتریایی شیر خام صورت می گیرد، آزمایش احیای متیلن بلو است. اساس این آزمایش احیای متیلن بلوی افزوده شده به شیر، در اثر فعالیت متابولیکی باکتریهای آن و بی رنگ شدن متیلن بلو می باشد. به منظور 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 پی شهر کرد به صورت تصادفی ۱۱۲ نمونه برداشته شد و دما، وزن مخصوص، اسیدیته، تعداد سلولهای سوماتیک، مدت زمان احیای متیلن بلو (Methylene Blue Reduction Time - MBRT) و تعداد باکتریهای شیر به روش SPC اندازه گیری 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 معنی دار نبود. این تحقیق نشان داد که برای ارزیابی کیفیت بهداشتی شیر خام گاو نمی توان از متغیرهای مذکور استفاده نمود. همچنین با توجه به ضعیف بودن ضریب همبستگی بین \log_{10} SPC و MBRT، با استفاده از روش MBRT نمی توان ارزیابی مناسبی از کیفیت باکتریایی شیر خام گاو به دست آورد. لذا توصیه می شود که به جای استفاده از روش MBRT از روشهایی که تعداد باکتریهای موجود در شیر را شمارش می کنند از جمله روش SPC، Spiral plating، Plate loop و Flow cytometry استفاده نمود.

واژه های کلیدی: احیای متیلن بلو، ردوکتاز، کیفیت باکتریایی شیر، روش استاندارد شمارش پلیت.

کارخانه های 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 نمونه گیری از شیرهای خریداری شده نموده و تعدادی آزمایش جهت کنترل کیفیت شیر انجام می دهند. کنترل شیرهای دریافتی علاوه بر اهمیت اقتصادی و تکنولوژیک دارای اهمیت بهداشتی نیز می باشد.

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

در سال ۱۹۱۲ برای اولین بار بارتل و اورلاجنسن (Barthel and Orla Jensen) نشان دادند که از خاصیت احیای متیلن بلو می توان به عنوان یک شاخص برای تعیین کیفیت میکروبی استفاده نمود (۶).

اکثر میکروارگانیسمهای شیر از اکسیژن برای رشد خود استفاده می کنند. آنها در پروسه تنفس خود از اکسیژن مولکولی به عنوان یک گیرنده الکترون استفاده نموده و آب تولید می کنند. در صورتی که غلظت اکسیژن به حد کافی کاهش یابد بعضی باکتریها از ترکیبات دیگری به عنوان گیرنده الکترون استفاده می کنند.

۱) گروه آموزشی بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز - ایران.

۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد - ایران.



کیفیت شیر براساس MBRT به عنوان متغیر رتبه‌ای وابسته و درجه‌بندی کیفیت شیر براساس SPC به عنوان 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 کمی 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 پی شهر کرد در جدول ۱ و ضریب همبستگی ($r = \text{Correlation coefficient}$)، ضریب تعیین ($R^2 = \text{Coefficient of determination}$) 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 ($p > 0/05$). لگاریتم تعداد سلولهای سوماتیک به‌طور معنی‌داری با SPC و Log_{10} ارتباط دارد ($p < 0/01$). اما این ارتباط ضعیف بوده و ضریب تعیین آن به ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۸ می‌باشد. MBRT ارتباط معنی‌داری با SPC ندارد ($P < 0/2$). ولی با Log_{10} SPC ارتباط معنی‌داری دارد ($P < 0/01$)، 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} 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 5×10^5 CFU / ml <، شیر درجه دو 1×10^6 - 5×10^5 CFU / ml، شیر درجه سه 2×10^6 - 1×10^6 CFU / ml، شیر درجه چهار 5×10^6 - 2×10^6 CFU / ml و شیر درجه پنج 5×10^6 >. نمونه‌های مورد آزمایش بر این اساس نیز درجه‌بندی شدند و ضریب همبستگی بین گروه‌های مختلف آن با گروه‌های مختلف شیر درجه‌بندی شده براساس MBRT محاسبه شد که در نمودار ۳ نشان داده شده است. ضریب همبستگی و ضریب تعیین بین این دو به ترتیب ۰/۴۴ و ۰/۱۹ به دست 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 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.

بررسی کیفیت بهداشتی شیر و مبنای پرداخت بهای آن در نظر گرفته شد. اما کماکان در بسیاری از کارگاه‌های 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 به دست 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. علاوه 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 پی شهر 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 فتالین اندازه‌گیری و برحسب درجه دورنیک محاسبه می‌گردید (۳).
- ۴- شمارش سلولهای سوماتیک شیر: شمارش سلولهای سوماتیک شیر به طریق شمارش مستقیم میکروسکوپی (Direct microscopic count - DMC) و به روش برید (Breed) و با رنگ‌آمیزی گیمسا انجام شد (۲).
- ۵- MBRT: مدت زمان احیای متیلن بلو 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 به عنوان شاخص کیفیت باکتریایی شیر در نظر گرفته شد و جهت ارزیابی عوامل دیگری که احتمال استفاده از آنها به عنوان شاخص کیفیت میکروبی شیر داده می‌شد، از متغیر مذکور به عنوان معیار استفاده شد.

برای بررسی ارتباط متغیرهای مختلف کمی اندازه‌گیری شده در شیر شامل وزن مخصوص، اسیدیته، دمای شیر در هنگام دریافت و تعداد سلولهای سوماتیک (به عنوان متغیرهای غیر وابسته) با SPC به عنوان متغیر کمی وابسته از آزمون همبستگی پیرسون (Pearson correlation coefficient) استفاده شد. برای بررسی ارتباط MBRT به عنوان متغیر کمی وابسته و SPC به عنوان متغیر کمی غیر وابسته از آزمون همبستگی پیرسون و برای بررسی ارتباط درجه‌بندی



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

نام آزمایش	تعداد نمونه	Mean ± S. D.
وزن مخصوص شیر	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 (R²) متغیرهای مختلف بررسی شده در شیر با SPC و Log₁₀ SPC

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

بحث

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است وزن مخصوص، اسیدیته و دمای شیر در هنگام دریافت ارتباط معنی داری با Log₁₀ SPC نداشته (P > ۰/۰۵) و از این متغیرها نمی توان 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 فرآورده های مختلفی که از شیر به دست می آیند دارد، اما از این فاکتور نمی توان به عنوان یک شاخص تعیین کیفیت میکروبی شیر خام استفاده نمود. عدم ارتباط میزان اسیدیته شیر با تعداد باکتریهای آن به دلیل تنوع گونه های باکتریایی موجود در شیر و تفاوت در توانایی آنها برای تولید اسید می باشد.

در این تحقیق ارتباط معنی داری بین دمای شیر در هنگام دریافت و کیفیت باکتریایی شیر به دست 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 به طور معنی داری با SPC و Log₁₀ SPC ارتباط دارد (P < ۰/۰۱) اما این ارتباط ضعیف بوده و ضریب تعیین آن به ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۸ می باشد. هر چند که تعداد سلولهای سوماتیک موجود در شیر نیز یکی از شاخصهای کیفیت شیر می باشد، و از آن به عنوان یک شاخص مهم جهت بررسی سلامت غده پستان و شیر تولید شده توسط دام استفاده می شود، اما از این متغیر نمی توان به عنوان یک شاخص کیفیت باکتریایی شیر استفاده نمود.

در این تحقیق ضریب همبستگی بین MBRT با SPC Log₁₀ ۰/۴۱ - به دست آمد. این مقدار همبستگی ضعیف بوده و از آن نمی توان به عنوان شاخص کیفیت باکتریایی شیر استفاده نمود. با توجه به اینکه ضریب تعیین مربوطه

۰/۱۷ می باشد، 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 نمی توان پیشگویی (Predication) قوی 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 به دست آمد (۴).

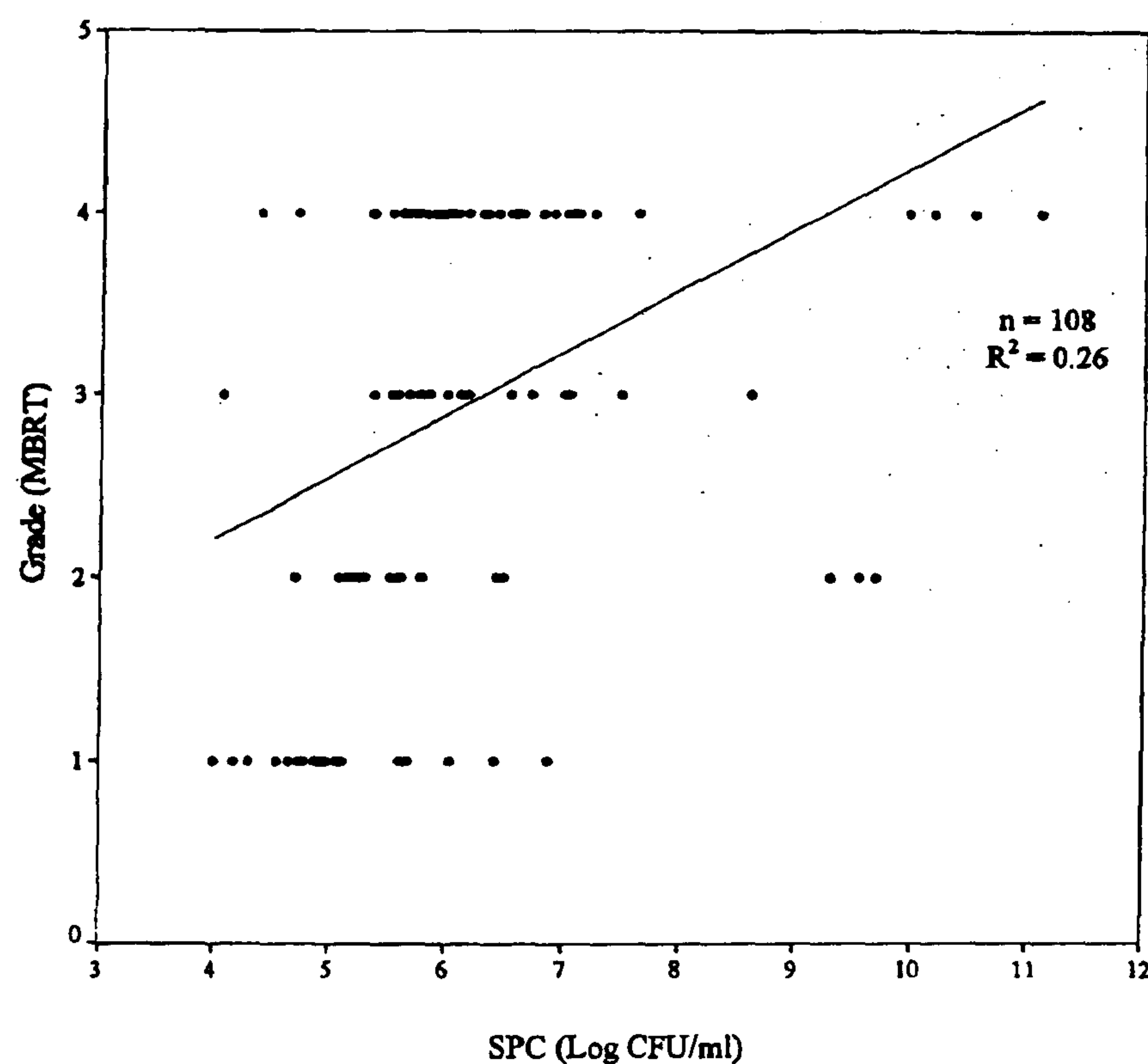
میزان اکسیژن مصرفی در شیر و میزان احیا شدن رنگها شاخصی برای تعداد میکروارگانیزمهای شیر می باشد اما باکتریهای سرمادوست و مقاوم به گرما (Thermotolerant) در مقایسه با دیگر باکتریهای موجود در شیر توانایی کمی در احیاء رنگها دارند. نتایج حاصل از این تست متناسب با تعداد میکروارگانیزمهای موجود در شیر نیست. بلکه صرفاً به منظور دسته بندی شیر قابل استفاده است. همبستگی نتایج حاصل از این تست در شیرهای با کیفیت بالا با نتایج شمارش باکتریها ضعیف می باشد (۴). همبستگی ضعیفی بین نتایج حاصل از این تست و تعداد باکتریهای شیر که با روش شمارش کلونیهها به دست می آید وجود دارد (۶). عدم همبستگی بین MBRT و تعداد باکتریهای شیر تخمین زده شده توسط روش SPC ممکن است به دلایل زیر باشد:

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

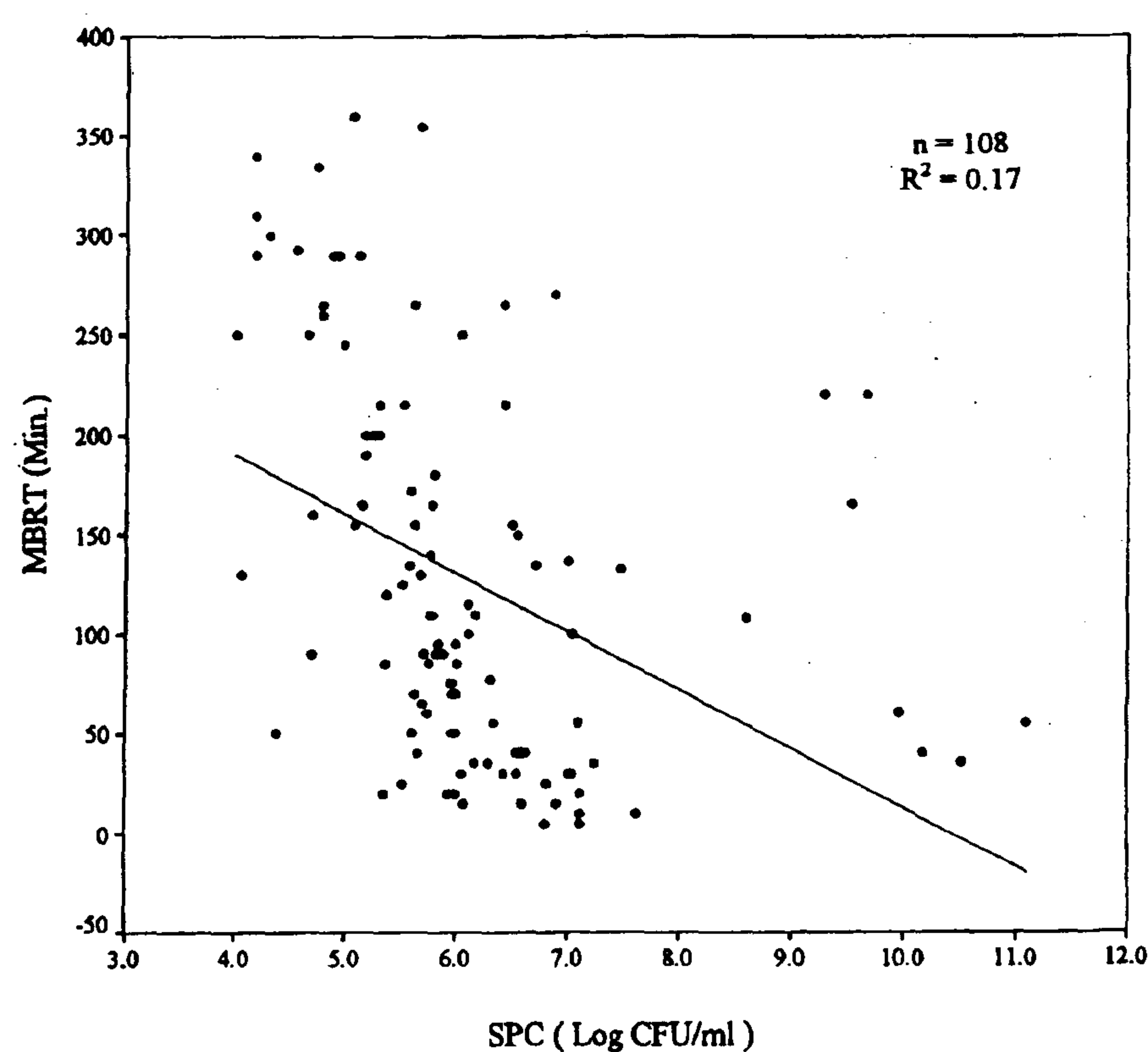
۲ - ناتوانی بعضی از باکتریهای شیر در احیای متیلن بلو به دلیل عدم توانایی تکثیر و تزايد در شیر و یا دمای انکوباسیون (۹).

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





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



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

گارسیا و همکاران (Garcia et al 1994) در تحقیقی که به منظور کارایی 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 متیلن بلو و تعداد باکتریهای مزوفیل شیر به دست آوردند ($r = 0.77$) اما ضریب همبستگی بین تست مذکور و تعداد کلی فرمها $0.02 -$ ، استافیلوکوکوس $0.23 -$ ، انتروکوکوس $0.43 -$ ، انتروباکتریاسه $0.49 -$ و باکتریهای مقاوم به گرما $0.37 -$ بود (۷).

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

در تست احیای متیلن بلو، انکوباسیون نمونه ها در دمای $37^{\circ}C$ شرایط نامناسبی را جهت رشد و تزیاید باکتریهای سرمادوست موجود در شیر ایجاد می کند و در این دما فعالیت متابولیکی آنها به شدت کاهش می یابد. در صورت استفاده از دمای $30^{\circ}C$ به جای $37^{\circ}C$ فعالیت این دسته از باکتریها بیشتر شده و ضریب همبستگی بین تعداد باکتریهای سرمادوست موجود در شیر با مدت زمان احیای متیلن بلو بیشتر می شود، اما به دلیل کاهش فعالیت باکتریهای مزوفیل، ضریب همبستگی این تست با تعداد کل باکتریهای شیر ضعیف تر می شود (۷).

رینمر و همکاران (Reinheimer et al 1988) نشان دادند در صورتی که قبل از انجام آزمایش احیای متیلن بلو روی شیر خام گاو، آنرا برای مدت ۴۸ ساعت در دمای $5^{\circ}C$ نگهداری کنند ضریب همبستگی بین MBRT و تعداد باکتریهای شیر بسیار ضعیف خواهد شد (۱۳).

ارزش تست احیای متیلن بلو جهت ارزیابی کیفیت میکروبی شیرهایی که از زمان دوشش تا موقع آزمایش در یخچال نگهداری می شود محدود می باشد.

و در لایه چربی روی شیر قرار می گیرند (۹).
۴- در آزمایش SPC یک توده باکتری (Clump) تشکیل یک کلونی را می دهند، در حالی که در آزمایش احیای رنگها، میزان احیای کنندگی آن متناسب با تعداد باکتریهای آن می باشد (۹).

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

۶- وجود سلولهای سوماتیک در شیر احتمالاً موجب کاهش اکسیژن محلول در شیر شده و در نتیجه در مدت زمان احیای متیلن بلو تأثیر دارد (۱۱). در تحقیق حاضر همبستگی بین این دو متغیر از نظر آماری معنی دار نبود ($p > 0.2$).

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

USDA آمریکا استفاده از تست احیای متیلن بلو را به دلیل همبستگی ضعیف آن با دیگر تستهای ارزیابی تعداد باکتریهای شیر، به عنوان یک آزمایش استاندارد برای ارزیابی کیفیت میکروبی شیر توصیه نمی نماید (۹).

تست احیای رنگها از جمله احیای متیلن بلو حساسیت کافی جهت دسته بندی دقیق (Fine Grading) شیر از نظر کیفیت میکروبی را ندارد و صرفاً براساس نتایج حاصل از این تستها می توان شیر را به دو دسته قابل قبول و غیر قابل قبول دسته بندی 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 شده اند ندارد (۶).



Oval نتایج روشهای SPC و (Direct microscopic count = DMC) شده است. نتایج روشهای 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 به عنوان یک روش مناسب جهت درجه بندی شیر مورد پذیرش قرار گرفته است (۵).

در آلمان بجای استفاده از تستهای احیای رنگ از اندازه گیری مقدار پیرووات (Pyroval) به عنوان یکی از ترکیبات متابولیکی میکروارگانیسمها استفاده می شود و یکی از فاکتورهای تعیین قیمت شیر سیصد هزار گله گاوشیری این کشور این آزمایش می باشد که هر ماه دو بار انجام می شود (۸).

پیشنهادات

۱- با توجه به عدم ارتباط معنی دار و یا همبستگی ضعیف بین دمای شیر در زمان دریافت، اسیدیته شیر، تعداد سلولهای سوماتیک شیر و MBRT با تعداد باکتریهای شیر، توصیه می شود 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 شده اند از جمله روش Plate Loop استفاده شود.

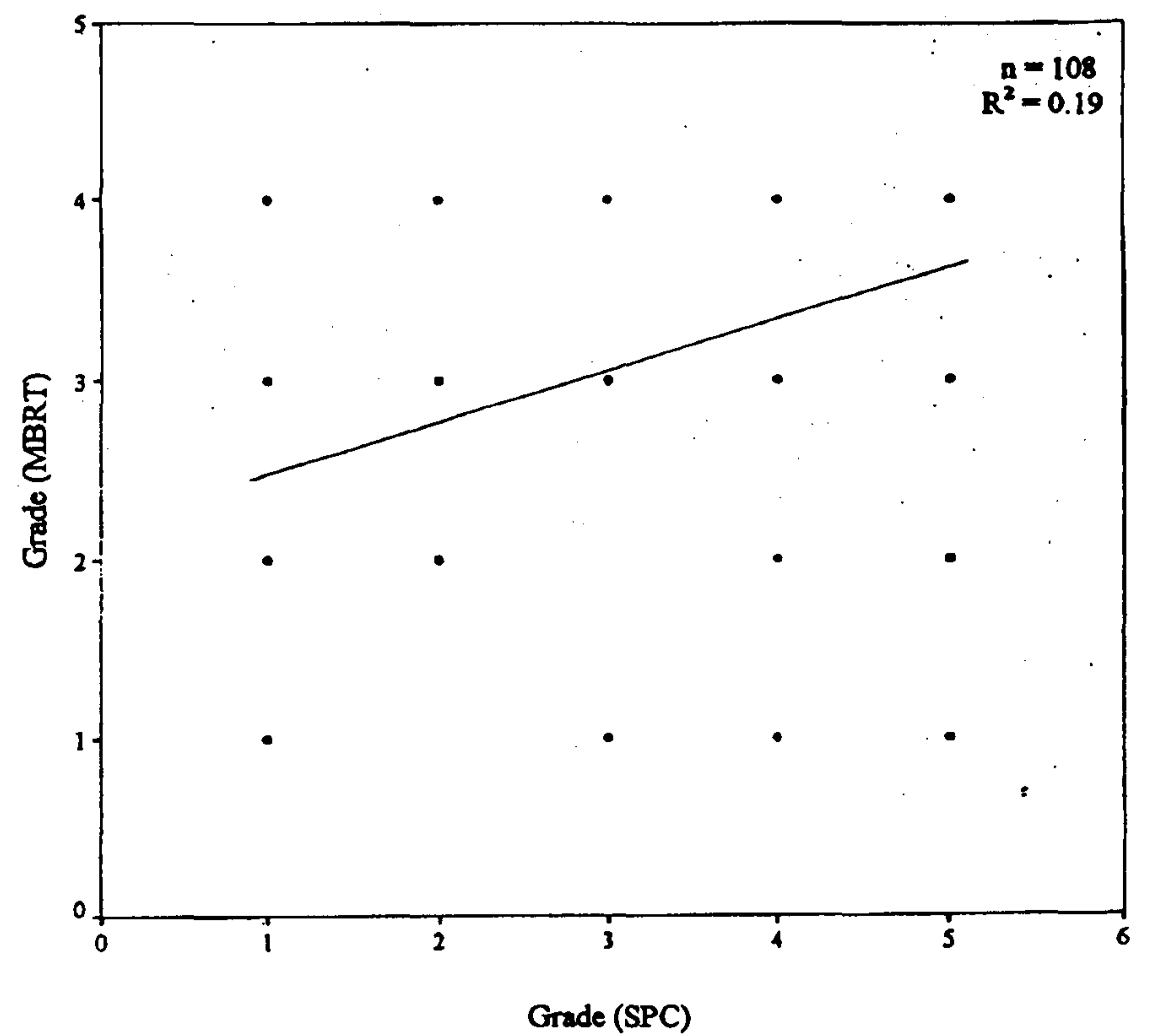
۳- در صورت استفاده از دستگاههای اتوماتیک باکتری شمار یا روشهای دیگر، توصیه می شود قبلاً میزان همبستگی نتایج آنها با نتایج SPC بررسی و در صورت وجود همبستگی قوی از آنها استفاده شود.

تشکر و قدردانی

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

منابع

- حسین خان ناظر، ع. شکر فروش، ش. قانعی، ک. استفاده از روش FPT جهت تعیین باقیمانده آنتی بیوتیک در لاشه گوسفند، فصلنامه پژوهش و سازندگی شماره ۲۶، صفحات ۱۸۳ - ۱۸۰، (۱۳۷۴).
- سرافراز، ع. ۱، و غفارزادگان، ک. آمار پزشکی: پایه و بالینی، ترجمه، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، (۱۳۷۶).
- فرخنده، ع. روشهای آزمایش شیر و فرآورده های آن، جلد اول، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه تهران، (۱۳۷۰).
- قفلگر قاسمی، م. مقایسه کارایی روشهای آزمایش احیاء بلودومتیلن در کنترل کیفیت بهداشتی شیر خام، پایان نامه دوره دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۱۳، (۱۳۷۷).
- Campbell, J. R. and Marshall, R. T. The science of providing milk for man. Mc Graw, Hill Publication, (1975).
- FAO Payment for milk on quality, FAO, Rome, Italy, (1972).
- 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).



نمودار ۳ - همبستگی و خط رگرسیون بین درجه بندی شیر براساس MBRT و درجه بندی شیر براساس SPC

برای انجام تست احیای متیلن بلو در شیر خام باید ابتدا شیر در دمای 21°C - 17°C به مدت $16/5$ تا 24 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

- Gravert, H. O. Dairy cattle production (World animal science, C : 3), Elsevier science Publisher, (1987).
- Hausler, W. J. Standard methods for the examination of dairy products. 13 th ed. American Public Health Association, (1974).
- 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).
- Lampert, L. M. Modern dairy products. Chemical publishing company, Inc. New York, (1970).
- Luck, H. Bacteriological quality tests for bulk - cooled milk Dairy Sci. Abst. 34, 101 - 122, (1972).
- 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 coefficient between Log_{10} standard plate count with methylene 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 determination (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.

