

## بررسی مقایسه‌ای تأثیر مواد شیمیایی و تخمیر طبیعی بر روی کیفیت میکروبی و آنتی بادی IgG آغوز گاو به منظور افزایش ماندگاری آن

شراره ستوده<sup>۱</sup> محمد ربانی خوراسگانی<sup>۲\*</sup> زهرا اعتمادی<sup>۲</sup> سید حمید زرکش اصفهانی<sup>۲</sup>

۱) دانش آموخته میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

(دریافت مقاله: ۲ دی ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۲ فروردین ماه ۱۳۹۷)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** آغوز گاوی اولین شیر ترشح شده پس از تولد گوساله می‌باشد و ماده‌ای بسیار مغذی سرشار از فاکتورهای ایمنی‌بخش، فاکتورهای ضد میکروبی، فاکتورهای رشد و ترمیم بافت می‌باشد. با توجه به ضرورت بهره مندی از آغوز و نیز فواید ارزشمند آن برای گوساله، نگهداری و ذخیره آغوز همواره مورد توجه بوده است. آلودگی میکروبی آغوز موجب تداخل در جذب آنتی‌بادی‌های موجود در آغوز می‌شود. هدف: بررسی اثر نگهدارنده‌های شیمیایی و تخمیر طبیعی جهت ذخیره سازی آغوز به منظور حفظ کیفیت آن می‌باشد. روش کار: برای انجام این تحقیق آغوز حاصل از شیردوشی اولیه بعد از زایمان، از ۵ گاو نژاد هلشتاین به‌طور مجزا جمع‌آوری شد. نمونه‌ها فوراً به آزمایشگاه منتقل شدند و آزمایشات میکروبی بر روی نمونه‌های آغوز تازه انجام شد. سپس نمونه‌های آغوز بعد از انجام تیمار با اسید پروپیونیک، اسید فرمیک، سوربات پتاسیم و روش تخمیر طبیعی در روزهای ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ذخیره سازی از نظر باکتری‌های شاخص شامل بار میکروبی کل و اشرشیا کلی، کلی فرم و کپک ومخمر مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از انجام آزمون میکروبی از نمونه کلستروم تازه (شاهد) و نمونه‌های تیمار شده در پایان روز ۳۰ Whey تهیه شد و آزمون SRID به‌منظور سنجش آنتی‌بادی IgG در نمونه شاهد و نمونه‌های تیمار شده انجام شد. نتایج: سوربات پتاسیم نقشی در کاهش باکتری‌های اشرشیا کلی و کلی فرم نداشت اما مانع افزایش تعداد آن‌ها در طی ۳۰ روز نگهداری گردیده است. اسید فرمیک و اسید پروپیونیک موجب کاهش باکتری اشرشیا کلی و کلی فرم ( $p < 0.05$ ) شدند. همچنین این دو اسید به علت ماهیت اسیدی موجب رشد بیش از حد کپک و مخمر در مقایسه با سوربات پتاسیم شدند. اما سه تیمار یاد شده نقشی در کاهش بار میکروبی کل ( $p > 0.05$ ) نداشته‌اند. تخمیر طبیعی نیز فقط در کاهش اشرشیا کلی و کلی فرم نقش داشته است و در مقایسه با تیمارهای دیگر بار میکروبی کل از روز بعد از تیمار افزایش بسیار شدیدی داشته است. در بین تیمارها، سوربات پتاسیم و اسید فرمیک در حفظ کیفیت بهداشتی آغوز نقش مؤثرتری داشته‌اند. همچنین نتایج حاصل از سنجش آنتی بادی IgG نشان دهنده آن است که نقش سوربات پتاسیم نسبت به دو اسید آلی و تخمیر طبیعی در کاهش میزان آنتی بادی IgG معنی‌دار نبوده است ( $p > 0.05$ ) و اثر حفاظتی بهتری داشته است. نتیجه‌گیری نهایی: سوربات پتاسیم و اسید فرمیک نسبت به اسید پروپیونیک و تخمیر طبیعی نقش بهتری در حفظ خواص و کیفیت آغوز برای نگهداری کوتاه مدت جهت تغذیه گوساله داشته است.

**واژه‌های کلیدی:** آغوز گاو، آلودگی میکروبی، اسید فرمیک، اسید پروپیونیک، سوربات پتاسیم، آنتی بادی IgG

### مقدمه

زایمان  $43/5 \text{ kg}$  کلستروم تولید می‌کند که از این مقدار فقط بخشی طی روز اول بعد از تولد به مصرف گوساله می‌رسد؛ بنابراین قسمتی از آن اضافی خواهد بود (۱۳). آنتی بادی‌های موجود در آغوز از جمله IgG به عنوان آنتی بادی غالب نقش مهمی در ایمنی اکتسابی گوساله بعد از زایمان ایفا می‌کند. اما با توجه به غنی بودن کلستروم رشد سریع میکروارگانیزم‌ها موجب کاهش جذب آنتی‌بادی‌های آغوز می‌شود (۳). از جمله باکتری‌های آلوده کننده در آغوز می‌توان به باکتری‌هایی مانند مایکوباکتریوم اویوم، مایکوباکتریوم پاراتوبر کلوزیس، سالمونلا، مایکوپلاسما، لیستریا مونوسیتوجنز، کمپیلوباکتر ژرونی، مایکوباکتریوم بویس، اشرشیا کلی، کلی فرم‌های مدفوعی و استافیلوکوکوس اورئوس اشاره نمود. این عوامل بیماری‌زا علاوه بر ایجاد بیماری در انسان و حیوان، در جذب آنتی‌بادی در روده کوچک به هنگام مصرف آغوز اختلال ایجاد می‌کنند. علل ایجاد این اختلال ناشی از رقابت بین باکتری و ایمنوگلوبولین برای اتصال به پذیرنده‌های سلول‌های اپیتلیال روده و یا اتصال فیزیکی ایمنوگلوبولین به

آغوز مایعی غلیظ و زرد رنگ است که از غدد شیری پستانداران بلافاصله در طی ۲۴ تا ۷۲ ساعت اولیه بعد از زایمان تولید می‌شود و موجب رشد و حفظ نوزاد گونه‌های پستانداران در مقابل عوامل بیماری‌زای مختلف می‌شود. آغوز (کلستروم) از لحاظ غذایی بسیار غنی است و شامل مقدار قابل ملاحظه‌ای از عوامل رشد، عوامل ضد میکروبی (لاکتوفرین)، مواد تنظیم کننده سیستم ایمنی بدن (کلسترونین و پلی‌پپتیدهای غنی از پرولین) و ویتامین‌ها (A, E, B12) می‌باشد (۱۵). بیشترین اهمیت آغوز به خاطر داشتن فاکتورهای ایمنی و آنتی‌بادی‌ها به مقدار فراوان می‌باشد (۸، ۹). در گاو آنتی‌بادی‌ها قادر به عبور از جفت نمی‌باشند و بنابراین آنتی‌بادی‌ها فقط از طریق آغوز به گوساله انتقال می‌یابند (۱۰). امروزه در صنعت پرورش گاوهای شیری تولید مقدار زیاد کلستروم بعد از زایمان یکی از مشکلات به شمار می‌آید. بر طبق گزارشات موجود هر گاو شیری به طور متوسط بعد از



**شمارش اشرشیاکلی و کلی فرمها:** شمارش اشرشیا کلی (محیطهای کشت) (Q-LAB, UK) EC broth، lauryl sulphate broth، Tryptone water و کلی فرمها (Q-LAB, UK) (BGB broth) با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی (MPN) مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۳۴ و ۵۴۸۶-۲ انجام شد.

**شمارش کپک ومخمر:** شمارش کپک و مخمر با استفاده از روش پورپلیت در محیط کشت (Q-LAB, UK) YGC مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۵۴ انجام شد.

**سنجش آنتی بادی IgG:** برای سنجش غلظت آنتی بادی IgG از Whey استفاده می شود تا کارآین به عنوان عامل مزاحم حذف شود. به منظور بررسی محتوی آنتی بادی IgG از تست آگار ژل ایمونودیفیوژن (SRID) استفاده شد. در این روش از کیت SRID آماده وطراحی شده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد. پلیت آماده شامل آگارز با غلظت مشخص و مقدار مشخصی از آنتی بادی ضد IgG گاوی می باشد. در این پلیت چاهک هایی با فاصله تقریبی ۲ cm از یکدیگر تعبیه شده است. نمونه های استاندارد با دوتکرار و نمونه های Whey مربوط به هر تیمار با رقت ۱:۵۰ و هر کدام به مقدار ۱۰ میکرولیتر به ترتیب در چاهک ها ریخته شد. سپس پلیت ها در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و قطر دایره رسوبی ناشی از تشکیل کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی (R) مورد اندازه گیری قرار گرفت و مقدار R۲ محاسبه شد. نمودار استاندارد بر اساس مقادیر R۲ نمونه های استاندارد و غلظت آن ها با استفاده از برنامه آماری Excel ترسیم شد و معادله خط آن به دست آمد. سپس مقادیر غلظت آنتی بادی IgG در نمونه های آغوز با مشخص بودن R۲ در فرمول معادله خط به دست آمده از نمودار استاندارد قرار داده شد و غلظت آنتی بادی نمونه ها بر حسب mg/ml تعیین شد. سپس مقادیر به دست آمده در عکس رقت (۵۰) تأثیر داده شد تا مقادیر واقعی آنتی بادی در نمونه ها مشخص شود.

**آنالیز آماری:** اطلاعات به دست آمده توسط برنامه Excel بایگانی و دسته بندی شد. با توجه به پراکندگی زیاد داده های میکروبی به منظور نرمال کردن داده ها تبدیل لگاریتمی بر روی این داده ها انجام شد و سپس برای بررسی اثرات تیمارهای مختلف بر روی تغییرات میکروبی و تأثیر تیمارها بر محتوی آنتی بادی IgG از نرم افزار SPSS۱۷ استفاده شد. آنالیز آماری مقایسه دوتایی میانگین های تغییرات میکروبی در روزهای مختلف یک تیمار با توجه به یکسان بودن نمونه در روزهای مختلف از آزمون Paired Samples T test، نرم افزار SPSS ۱۷/۰ و سطح معنی داری  $p < 0/05$  استفاده شد. آنالیز آماری مقایسه میانگین های تغییرات میکروبی بین هر تیمار با آغوز تازه با توجه به منشاء یکسان نمونه آغوز تازه و آغوز تیمار شده با استفاده از آزمون Paired Samples T test، نرم افزار SPSS ۱۷/۰ و سطح معنی داری  $p < 0/05$  انجام شد. آنالیز آماری مقایسه میانگین های تغییرات میکروبی در بین تیمارها با استفاده از آزمون General Liner Model با Repeated Measures، نرم افزار SPSS ۱۷/۰ و سطح

باکتری های بیماریزا در لومن روده می باشد. بدین ترتیب آلودگی میکروبی آغوز در جذب آنتی بادی های موجود در آن تداخل ایجاد خواهد کرد (۱۸). استفاده از مواد شیمیایی و نگهدارنده ها یکی از راه های کنترل تخمیر نامطلوب آغوز است که در افزایش پذیرش آغوز توسط گوساله نقش دارد. با توجه به اهمیت رشد نامطلوب باکتری ها در کاهش جذب آنتی بادی موجود در آغوز، لذا جهت تغذیه گوساله با آغوز اضافی استفاده از روشی مناسب و ساده جهت نگهداری آغوز اضافی ضروری به نظر می رسد. هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر اسیدهای آلی شامل اسید پروپیونیک و اسید فرمیک، نگهدارنده سوربات پتاسیم و تخمیر طبیعی در جلوگیری از رشد شاخص های میکروبی و محافظت از آنتی بادی IgG برای ذخیره سازی کلاستروم اضافی در یک دوره یک ماهه جهت تغذیه گوساله بوده است.

## مواد و روش کار

**تهیه آغوز:** آغوز حاصل از شیر دوشی اولیه بعد از زایمان ۵ گاو نژاد هلشتاین از دامداری صنعتی واقع در یزد به طور مجزا و در ظرف های استریل جمع آوری شد و تحت شرایط مناسب دمایی و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. بعد از انتقال نمونه آغوز به آزمایشگاه، نمونه در حجم های ۲۵۰ ml توسط مزور استریل در ۴ ارلن استریل تقسیم بندی شد. تیمارها و تعداد تکرار: در این آزمایش چهار تیمار و در هر تیمار هم پنج تکرار وجود داشت

آغوز تازه (شاهد)

آغوز با اسید پروپیونیک ۰/۳٪ وزنی

آغوز با اسید فرمیک ۰/۳٪ وزنی

آغوز با سوربات پتاسیم ۰/۳٪ وزنی

آغوز با تخمیر طبیعی

**آزمون های میکروبی:** نمونه آغوز تازه از لحاظ شاخص های میکروبی شامل بار میکروبی کل، اشرشیا کلی، باکتری های کلی فرم، کپک ومخمر مورد آزمون قرار گرفت. بعد از انجام تیمارهای ذکر شده کلاستروم تازه جهت تخمیر طبیعی در دمای ثابت ۳۰ °C نگهداری شد و کلاستروم های تیمار شده جهت تخمیر کنترل شده در دمای یخچال نگهداری شد. سپس در طی روزهای ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بعد از تیمار، هر کدام از نمونه ها از لحاظ شاخص های میکروبی مورد آزمون قرار گرفتند تا روند رشد آن ها در طی ۳۰ روز پس از تیمار بررسی شود. برای آزمون میکروبی ابتدا در آزمایشگاه رقت های مختلف از آغوز مطابق با استاندارد ملی ایران شماره (۵-۸۹۲۳) تهیه شد.

**شمارش بار میکروبی کل:** شمارش بار میکروبی کل با استفاده از محیط کشت (Q-LAB, UK) plate count skim milk agar و به روش پورپلیت انجام شد و پس از ۳ روز گرمخانه گذاری در ۳۰ °C طبق استاندارد ملی ایران شماره ۵۴۸۴ شمارش گردید.



جدول ۱. نتایج شاخص‌های میکروبی در ۵ نمونه آغوز تازه فاقد تیمار (بر حسب cfu/ml log<sub>10</sub>) و غلظت آنتی بادی IgG (بر حسب mg/ml): TC. شمارش بار میکروبی کل: EC. اشرشیا کلی: CC. کلی فرم: MY: کپک و مخمر.

نمونه	پارامتر میکروبی	TC	EC	CC	MY	IgG
نمونه ۱	۵/۶۹	۷/۴۴	۷/۸۷	۲/۰۰	۶/۷۰	
نمونه ۲	۶/۹۰	۲/۰۴	۲/۹۰	۲/۴۷	۶۵/۶۳	
نمونه ۳	۵/۷۷	۷/۴۳	۷/۶۹	۷/۹۰	۶/۷۵	
نمونه ۴	۵/۹۲	۷/۳۰	۷/۸۴	۷/۶۹	۵۴/۷۲	
نمونه ۵	۴/۴۳	۲/۰۴	۲/۶۰	۲/۳۰	۵۸/۲۰	
میانگین	۵/۷۴	۷/۶۵	۲/۱۸	۲/۰۷	۶۰/۳۵	

فرم و اشرشیا کلی شده است و سپس به دلیل بالا رفتن اسیدپتیه آغوز به دلیل تخمیر نامطلوب موجب کاهش معنی‌دار این باکتری‌ها گردیده است ( $p < 0.05$ ). نمودار میانگین تغییرات شاخص‌های اشرشیاکلی و کلی فرم در طی ۳۰ روز در تیمارهای مختلف به ترتیب در تصویر ۲ و ۳ آورده شده است.

**مقایسه بین میانگین کپک و مخمر در روزهای مختلف تیمارهای مختلف:** نتایج نشان می‌دهد تا روز ۲۰ پس از تیمار سوربات پتاسیم افزایش معنی‌دار در تعداد کپک و مخمر مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ) در حالی که از روز بیستم تا سی ام کپک و مخمر شروع به افزایش معنی‌دار نمودند که در مقایسه با سایر تیمارها این افزایش آهسته تر بوده است. شاخص کپک و مخمر در نمونه‌های تیمار شده با اسید پروپیونیک و اسید فرمیک در روزهای مختلف به تدریج افزایش یافته است در حالیکه در تخمیر طبیعی این افزایش به صورت صعودی در روز اول پس از تیمار مشاهده شده است ( $p < 0.05$ ) و این افزایش تا روز ۲۰ پس از تیمار ادامه داشته است و بعد از آن کاهش معنی‌دار در تعداد کپک و مخمر مشاهده شده است. نمودار میانگین تغییرات شاخص کپک و مخمر در طی ۳۰ روز در تیمارهای مختلف در تصویر ۴ آورده شده است.

**مقایسه بین میانگین شاخص‌های میکروبی در روز ۱ و ۳۰ هر تیمار با میانگین‌های شاخص‌های میکروبی آغوز تازه:** مقایسه بین میانگین شاخص‌های میکروبی در روز ۱ و ۳۰ هر تیمار با میانگین شاخص‌های میکروبی اشرشیاکلی، کلی فرم، بار میکروبی کل و کپک و مخمر به تفکیک در جدول ۳ آورده شده است.

**شاخص میکروبی اشرشیاکلی:** در مقایسه با آغوز تازه، سوربات پتاسیم مانع از افزایش تعداد اشرشیاکلی در طی ۳۰ روز بوده است ( $p > 0.05$ ) و تیمار با اسید فرمیک و اسید پروپیونیک موجب کاهش معنی‌دار اشرشیاکلی در طی ۳۰ روز گردیده است ( $p < 0.05$ ). در تخمیر طبیعی در طی روز اول افزایش معنی‌دار در تعداد اشرشیاکلی نسبت به آغوز تازه دیده شد، اما در طی ۳۰ روز نگهداری این تعداد به علت افزایش زیاد اسیدپتیه در حدی کاهش یافته که کمتر از تعداد آن در آغوز تازه گردیده است ( $p < 0.05$ )

**شاخص میکروبی کلی فرم:** تیمار با سوربات پتاسیم هیچ تأثیری در

معنی‌داری  $p < 0.05$  انجام شد. جهت مقایسه بین تیمارها از روش LSD استفاده گردید. به علت وابستگی بین نوع تیمار و زمان پس از تیمار با شاخص‌های آلودگی مورد ارزیابی، از این روش استفاده گردید. آنالیز آماری مقایسه دوتایی بین آغوز فاقد تیمار با هر کدام از آغوزهای تیمار شده در مقدار آنتی بادی IgG به روش Paired Samples T test و مقایسه بین تیمارها با یکدیگر با استفاده از one way ANOVA با روش LSD نرم افزار SPSS ۱۷/۰ انجام شد.

## نتایج

**نتایج آمار توصیفی آغوز تازه فاقد تیمار:** نتایج مربوط به ارزیابی کیفیت میکروبی ۵ نمونه آغوز تازه از لحاظ شاخص‌های اشرشیاکلی، کلی فرم، کپک و مخمر، شمارش میکروبی کل و همچنین غلظت آنتی بادی IgG در جدول ۱ ارائه شده است.

بررسی نمونه‌های آغوز تیمار شده از نظر فاکتورهای میکروبی مورد آزمون در طی روزهای ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از تیمار: نتایج حاصل از سنجش شاخص‌های میکروبی در نمونه‌های آغوز تیمار شده (سوربات پتاسیم ۰/۳٪، اسید پروپیونیک ۰/۳٪، اسید فرمیک ۰/۳٪، و تخمیر طبیعی) در روزهای ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بعد از تیمار در جدول ۲ ارائه شده است. در این جدول مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین، انحراف استاندارد (SD) مربوط به هر کدام از این شاخص‌ها در روزهای مختلف و همچنین تیمارهای مختلف بیان شده است.

**مقایسه بین میانگین‌های هر شاخص میکروبی در روزهای مختلف تیمارهای متفاوت (مقایسه بین میانگین بار میکروبی کل در روزهای مختلف تیمارهای متفاوت):** نتایج جدول ۲ نشان دهنده آن است که در تیمارهای اسید پروپیونیک، اسید فرمیک و سوربات پتاسیم بار میکروبی کل در طی سی روز به صورت تدریجی افزایش یافته است ( $p < 0.05$ )، در حالیکه تخمیر طبیعی در روز اول بعد از تیمار افزایش معنی‌داری را در بار میکروبی کل نشان می‌دهد و سپس در طی روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بعد از تیمار این افزایش ادامه داشته است ( $p < 0.05$ ) به گونه‌ای که در پایان روز ۳۰ بالاترین بار میکروبی مربوط به تیمار تخمیر طبیعی بوده است. نمودار میانگین تغییرات بار میکروبی در طی ۳۰ روز در تیمارهای مختلف در تصویر ۱ آورده شده است.

**مقایسه بین میانگین اشرشیاکلی و کلی فرم در روزهای مختلف تیمارهای متفاوت:** نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که نگهدارنده سوربات پتاسیم در طی ۳۰ روز ذخیره سازی کلستروم مانع از افزایش معنی‌دار باکتری‌های کلی فرم و اشرشیاکلی شده است ( $p > 0.05$ ). اسیدهای آلی فرمیک و پروپیونیک علاوه بر ممانعت از افزایش این باکتری‌ها در کاهش آن‌ها نیز در طی سی روز نقش داشته اند ( $p < 0.05$ ). در حالیکه تخمیر طبیعی تا روز ۱۰ پس از تیمار موجب افزایش معنی‌دار باکتری‌های کلی



جدول ۲. میانگین شاخصهای میکروبی بر حسب (cfu/ml log<sub>10</sub>) در نمونه‌های کلمستروم تیمار شده (سوربات پتاسیم ۰/۳٪، اسید فرمیک ۰/۳٪، اسید پروپیونیک ۰/۳٪ و تخمیر طبیعی در طی روزهای ۲۰، ۱۰، ۳۰ و بعد از تیمار و میانگین غلظت آنتی بادی بر حسب IgG (mg/ml) بعد از روز ۳۰. حروف غیرهمنام در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ در بین میانگین روزهای مختلف هر شاخص میکروبی مربوط به یک تیمار می‌باشد. مقادیر حداکثر و حداقل در زیر میانگین در پرانتز آورده شده است. TC: شمارش بار میکروبی کل، EC: اشرشیا کلی، CC: کلی فرم، MY: کپک و مخمر، ND: Not Detected، \* : انحراف استاندارد (SD).

شاخص و روز بعد از تیمار			نوع تیمار کلمستروم		
	تخمیر طبیعی	اسید پروپیونیک ۰/۳٪	اسید فرمیک ۰/۳٪	سوربات پتاسیم ۰/۳٪	
EC روز ۱	۵/۶۴±۰/۴۸ <sup>a</sup> (۵/۰۴-۶/۱۸)	۲/۱۸±۰/۶۲ <sup>a</sup> (۱/۳۶-۳/۰۴)	۱/۴۳±۰/۵۶ <sup>a</sup> (۰/۰۶-۲/۰۴)	۱/۲۸±۰/۲۸ <sup>a</sup> (ND-۲/۸۸)	
EC روز ۱۰	۶/۴±۰/۵۶ (۶/۰۴-۷/۳۲)	۰/۹۹±۰/۷۷ <sup>b</sup> (۰/۳۶-۲/۳۰)	۱/۱۹±۰/۴۳ <sup>a</sup> (ND-۳/۶۶)	۱/۳۳±۰/۲۵ <sup>a</sup> (ND-۳/۳۸)	
EC روز ۲۰	۳/۲۸±۰/۱۰ <sup>c</sup> (۲/۰۴-۴/۸۷)	۰/۸۴±۰/۰۲ <sup>b</sup> (ND-۰/۶۷)	۰/۹۶۷±۰/۱۵ <sup>a</sup> (ND-۲/۹۶)	۱/۱۹±۰/۸۶ <sup>a</sup> (۰/۴۸-۲/۶۳)	
EC روز ۳۰	۰/۹۹±۰/۵۲ <sup>d</sup> (۰/۴۸-۱/۸۸)	۰/۴۳±۰/۶۹ <sup>b</sup> (ND-۱/۶۰)	۰/۳۹±۰/۴۳ <sup>b</sup> (ND-۱/۰۴)	۰/۹۷±۰/۸۷ (ND-۲/۳۰)	
CC روز ۱	۶/۱۹±۰/۶۵ <sup>a</sup> (۵/۳۰-۶/۸۶)	۲/۸۹±۰/۶۱ <sup>a</sup> (۲/۳۶-۳/۹۰)	۲/۵۴±۰/۴۸ <sup>a</sup> (۲/۰۰-۳/۳۰)	۲/۰۳±۰/۵۶ <sup>a</sup> (۱/۶۰-۳/۰۰)	
CC روز ۱۰	۶/۸۳±۰/۴۱ <sup>b</sup> (۶/۴۸-۷/۳۸)	۱/۷±۰/۴۳ <sup>b</sup> (۱/۳۰-۲/۳۰)	۲/۰۶±۰/۴۴ <sup>a</sup> (ND-۲/۰۴)	۱/۶۹±۰/۲۲ <sup>a</sup> (۰/۴۸-۳/۶۶)	
CC روز ۲۰	۳/۷۳±۰/۹۹ <sup>c</sup> (۲/۶۴-۴/۹۵)	۱/۴±۰/۳۷ <sup>c</sup> (۱/۰۰-۱/۹۵)	۱/۶۵±۰/۱۳ <sup>b</sup> (ND-۳/۱۸)	۱/۸۳±۰/۷۴ <sup>a</sup> (۰/۸۶-۲/۹۰)	
CC روز ۳۰	۱/۱۳±۰/۶۱ <sup>d</sup> (۰/۴۸-۲/۰۸)	۱/۸۹±۰/۳۲ <sup>bc</sup> (۱/۴۸-۲/۳۶)	۰/۹۵±۰/۵۲ <sup>b</sup> (ND-۱/۴۸)	۱/۴۷±۰/۹۶ <sup>a</sup> (ND-۲/۶۳)	
MY روز ۱	۵/۴۵±۰/۴۱ <sup>a</sup> (۵/۰۰-۶/۰۸)	۲/۷۴±۰/۳۴ <sup>a</sup> (۲/۳۰-۳/۰۸)	۲/۵۸±۰/۵۴ (۲/۰۰-۳/۴۸)	۲/۳۵±۰/۳۸ <sup>a</sup> (۲/۰۰-۳/۹۵)	
MY روز ۱۰	۶/۵۸±۰/۲۷ <sup>b</sup> (۶/۳۰-۶/۹۰)	۴/۳۶±۰/۵۲ <sup>b</sup> (۳/۷۰-۴/۹۵)	۴/۲۸±۰/۷۸ <sup>b</sup> (۳/۴۸-۵/۳۶)	۲/۴±۰/۲۶ <sup>a</sup> (۲/۱۸-۲/۷۰)	
MY روز ۲۰	۷/۷۳±۰/۲۷ <sup>c</sup> (۷/۳۸-۸/۴۸)	۵/۸۴±۰/۶۶ <sup>c</sup> (۶/۹۰-۶/۷۸)	۴/۸۳±۰/۸۷ <sup>c</sup> (۳/۹۵-۵/۹۵)	۳/۷۸±۰/۴۷ <sup>b</sup> (۳/۴۸-۳/۹۵)	
MY روز ۳۰	۵/۶۳±۰/۳۶ <sup>a</sup> (۵/۳۰-۶/۲۰)	۶/۴۴±۰/۴۵ <sup>c</sup> (۵/۷۰-۶/۷۸)	۵/۵۳±۰/۸۸ <sup>d</sup> (۴/۴۵-۶/۴۸)	۳/۲۷±۰/۵۸ <sup>b</sup> (۲/۷۸-۳/۷۷)	
TC روز ۱	۸/۸۱±۰/۷۲ <sup>a</sup> (۷/۹۲-۹/۹۳)	۵/۶۶±۰/۰۳ <sup>a</sup> (۴/۴۱-۶/۷۳)	۵/۳۳±۰/۷۸ <sup>a</sup> (۴/۴۶-۶/۴۱)	۵/۱۳±۰/۷۶ <sup>a</sup> (۴/۳۰-۶/۳۴)	
TC روز ۱۰	۹/۳±۰/۷۱ <sup>b</sup> (۸/۳۴-۱۰/۱۵)	۶/۷۳±۰/۸۳ <sup>b</sup> (۵/۹۵-۸/۰۰)	۵/۸۵±۰/۶۹ <sup>a</sup> (۵/۰۰-۶/۹۰)	۶/۱۱±۰/۴۶ <sup>b</sup> (۵/۷۰-۶/۸۵)	
TC روز ۲۰ (۵/۷۰-۶/۸۵)	۹/۵۹±۰/۲۷ <sup>c</sup> (۹/۳۰-۹/۹۵)	۷/۶۹±۰/۷۹ <sup>bc</sup> (۷/۰۰-۸/۹۴)	۶/۷۲±۰/۶۸ <sup>b</sup> (۶/۱۵-۷/۱۸)	۸/۱۳±۰/۵۹ <sup>c</sup> (۷/۶۲-۸/۸۵)	
TC روز ۳۰	۹/۵۳±۰/۲۶ <sup>d</sup> (۹/۲۰-۹/۹۰)	۸/۵±۰/۶۸ <sup>d</sup> (۷/۷۵-۹/۴۰)	۸/۵۴±۰/۶۹ <sup>c</sup> (۷/۷۸-۹/۵۱)	۹/۰۸±۰/۷۴ <sup>d</sup> (۷/۹۵-۹/۹۰)	
IgG روز ۳۰	۳/۷۵±۰/۶۷ (۲۵/۷۰-۴۷/۵۳)	۲/۹۷±۰/۸۷ (۲/۲۰-۳/۸۵)	۳/۰۵±۰/۵۴ (۲/۴۰-۳/۴۰)	۴/۲۷±۰/۴۴ (۳/۸۵-۶/۷۰)	

**شاخص کپک و مخمر:** در بین تیمارها فقط سوربات پتاسیم در مقایسه با آغوز تازه مانع از افزایش معنی دار کپک و مخمر شده است و فقط در روزهای پایان دوره ذخیره سازی مقدار کپک و مخمر به طور معنی دار افزایش یافت که در مقایسه با سه تیمار دیگر این افزایش ناچیز بوده است. **شاخص بار میکروبی کل:** همانگونه که در جدول ۳ نشان داده شده است هیچ کدام از تیمارها در جلوگیری از افزایش بار میکروبی نمونه‌های تیمار شده در طی ۳۰ روز نقشی نداشته اند و افزایش معنی دار در بار میکروبی کل مشاهده شده است ( $p < 0.05$ ).

مقایسه بین میانگین تیمارها با یکدیگر (مقایسه بین میانگین تیمارها

کاهش تعداد کلی فرم نداشته است اما از افزایش تعداد آن نیز ممانعت به عمل آورده است ( $p > 0.05$ ) در تیمار با اسید فرمیک و اسید پروپیونیک بین آغوز تازه و روز اول افزایش معنی دار در تعداد کلی فرم دیده شد و سپس تعداد آن کاهش یافت، به طوری در روز ۳۰ در مقایسه با آغوز تازه کاهش معنی داری در تعداد کلی فرم مشاهده شده است ( $p < 0.05$ ). در فرآیند تخمیر طبیعی در طی روز اول افزایش معنی دار در تعداد کلی فرم نسبت به آغوز تازه دیده شد، اما در طی ۳۰ روز نگهداری این تعداد به علت افزایش زیاد اسیدیته در حدی کاهش یافته که کمتر از تعداد آن در آغوز تازه گردیده است ( $p < 0.05$ ).



جدول ۳. مقایسه بین میانگین مقادیر شاخص‌های میکروبی روزهای ۱ و ۳۰ هر کلستروم تیمار شده با کلستروم تازه و غلظت آنتی بادی IgG در روز ۳۰ پس از تیمار با کلستروم تازه. حروف غیرهمنام در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ در بین میانگین کلستروم تازه با روزهای ۱ و ۳۰ هر تیمار می‌باشد. TC: شمارش بار میکروبی کل، EC: اشرشیا کلی، CC: کلی فرم، MY: کپک و مخمر.

شاخص‌های میکروبی	کلستروم تازه		تخمیر طبیعی		اسید پروپیونیک ۰/۳٪		اسید فرمیک ۰/۳٪		سوربات پتاسیم ۰/۳٪	
	روز ۱	روز ۳۰	روز ۱	روز ۳۰	روز ۱	روز ۳۰	روز ۱	روز ۳۰	روز ۱	روز ۳۰
TC	۵/۷۴ <sup>a</sup>	۸/۸۱ <sup>c</sup>	۹/۵۳ <sup>d</sup>	۵/۶۶ <sup>a</sup>	۸/۵۰ <sup>c</sup>	۵/۳۳ <sup>b</sup>	۸/۵۴ <sup>c</sup>	۵/۱۳ <sup>b</sup>	۹/۰۸ <sup>c</sup>	۵/۱۳ <sup>b</sup>
EC	۱/۶۵ <sup>a</sup>	۵/۶۴ <sup>c</sup>	۰/۹۹ <sup>b</sup>	۲/۱۸ <sup>a</sup>	۰/۴۱ <sup>b</sup>	۱/۴۳ <sup>a</sup>	۰/۳۹ <sup>b</sup>	۱/۲۸ <sup>a</sup>	۰/۹۷ <sup>a</sup>	۱/۲۸ <sup>a</sup>
CC	۲/۱۸ <sup>a</sup>	۶/۱۹ <sup>c</sup>	۷/۱۳ <sup>b</sup>	۲/۸۹ <sup>c</sup>	۷/۸۹ <sup>a</sup>	۲/۵۴ <sup>a</sup>	۰/۹۵ <sup>b</sup>	۲/۰۳ <sup>a</sup>	۷/۴۷ <sup>a</sup>	۲/۰۳ <sup>a</sup>
MY	۲/۰۷ <sup>a</sup>	۵/۴۵ <sup>c</sup>	۵/۶۳ <sup>c</sup>	۲/۷۴ <sup>b</sup>	۶/۲۴ <sup>c</sup>	۲/۵۸ <sup>b</sup>	۵/۵۳ <sup>c</sup>	۲/۳۵ <sup>a</sup>	۳/۴۸ <sup>b</sup>	۲/۳۵ <sup>a</sup>
IgG	۶۳/۳۵ <sup>a</sup>	-	۳۷/۵۳ <sup>c</sup>	-	۲۷/۹۷ <sup>c</sup>	-	۳۶/۰۵ <sup>b</sup>	-	۴۹/۲۷ <sup>a</sup>	-

جدول ۴. نتایج حاصل از آمار توصیفی مقدار آنتی بادی IgG در آغاز تازه و تیمار شده (مقادیر برحسب mg/ml است).

تیمار	حداقل	حداکثر	میانگین	انحراف معیار	تعداد نمونه
فاقد تیمار	۵۴/۷۰	۶۵/۷۰	۶۰/۴	۴/۱۵	۵
تخمیر طبیعی	۲۵/۷۰	۴۷/۳۶	۳۷/۵۳	۶/۹۷	۵
سوربات پتاسیم	۳۸/۵۶	۶۷/۷	۴۹/۲۷	۱۷/۴۴	۵
اسید پروپیونیک	۲۷/۲۰	۳۸/۵۶	۲۷/۹۷	۶/۸۷	۵
اسید فرمیک	۲۴/۷۰	۴۸/۲۰	۳۶/۰۵	۹/۵۴	۵

اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و تخمیر طبیعی موجب کاهش معنی دار مقدار آنتی بادی IgG شدند ( $p < 0/05$ ).

مقایسه بین میانگین‌های تیمارها با یکدیگر از نظر مقدار IgG: نتایج به دست آمده از مقایسه بین میانگین‌ها با یکدیگر، نشان دهنده آن است که تیمار سوربات پتاسیم کمترین تأثیر و اسید پروپیونیک بیشترین تأثیر منفی در مقدار آنتی بادی IgG داشته‌اند.

نتایج حاصل از این مقایسه حاکی از آن است که تیمارها به ترتیب زیر در کاهش مقدار آنتی بادی IgG نقش داشته‌اند.

سوربات پتاسیم < اسید فرمیک < تخمیر طبیعی ≤ اسید پروپیونیک

## بحث

آغوز گاوی اولین شیر تولید شده توسط غدد شیری در طی ۲۴ تا ۷۲ ساعت اولیه پس از زایمان می‌باشد. آغوز به عنوان غذای حیات-بخش در طی روزهای اول پس از تولد گوساله نقش مهمی در رشد جسمی و تکامل سیستم ایمنی بازی می‌کند (۱). این ماده مغذی علاوه برداشتن مقدار بالاتری از مواد مغذی و ایمنوگلوبولین‌ها نسبت به شیر گاو، شامل مقدار زیادی فاکتورهای رشد و مواد زیستی فعال و ضد میکروبی (لاکتوفرین، پروستاگلاندین، لاکتوپراکسیداز، لیزوزیم و...) می‌باشد (۷). اگرچه فاکتورهای ایمنی موجود در آغوز برای سلامتی بسیار مهم و ضروری هستند، اما آلودگی میکروبی آغوز ممکن است تأثیر منفی بر روی فواید آن داشته باشد. این عوامل بیماریزای علاوه بر ایجاد بیماری، در جذب آنتی بادی در روده کوچک به هنگام مصرف آغوز اختلال ایجاد می‌کنند. علل ایجاد

از نظر شاخص میکروبی اشرشیا کلی): نتایج حاصل از این مقایسه حاکی از آن است که تیمارها به ترتیب زیر در کاهش اشرشیا کلی نقش داشته‌اند.

اسید فرمیک < اسید پروپیونیک < سوربات پتاسیم < تخمیر طبیعی

مقایسه بین میانگین تیمارها از نظر شاخص میکروبی کلی فرم: نتایج حاصل از این مقایسه حاکی از آن است که تیمارها به ترتیب زیر در کاهش کلی فرم نقش داشته‌اند.

اسید فرمیک < تخمیر طبیعی < سوربات پتاسیم ≤ اسید پروپیونیک

مقایسه بین میانگین تیمارها از نظر شاخص کپک و مخمر: نتایج حاصل از این مقایسه حاکی از آن است که تیمارها به ترتیب زیر در کاهش کپک و مخمر نقش داشته‌اند.

سوربات پتاسیم < اسید فرمیک ≤ اسید پروپیونیک < تخمیر طبیعی

مقایسه بین میانگین تیمارها از نظر شاخص بار میکروبی کل: نتایج حاصل از این مقایسه حاکی از آن است که تیمارها به ترتیب زیر در کاهش بار میکروبی کل نقش داشته‌اند.

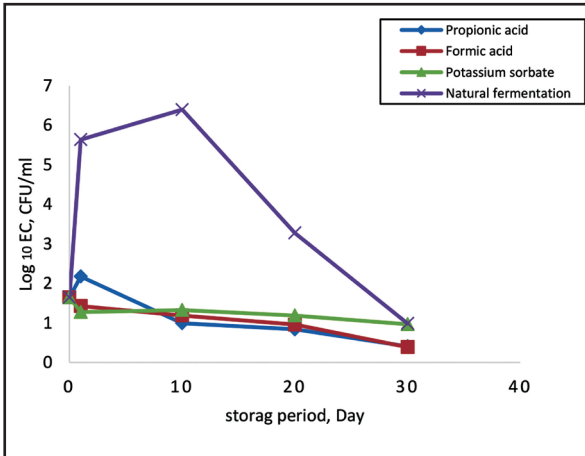
اسید فرمیک < اسید پروپیونیک < سوربات پتاسیم < تخمیر طبیعی

بررسی نتایج حاصل از مقایسه آنتی بادی IgG در نمونه‌های آغوز تازه و تیمار شده: نتایج اولیه حاصل از اندازه‌گیری IgG با استفاده از کیت SRID در نمونه آغوز فاقد تیمار و نمونه‌های آغوز تیمار شده بعد از ۳۰ روز از لحاظ آمار توصیفی مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین، انحراف معیار در جدول ۴ ارائه شده است

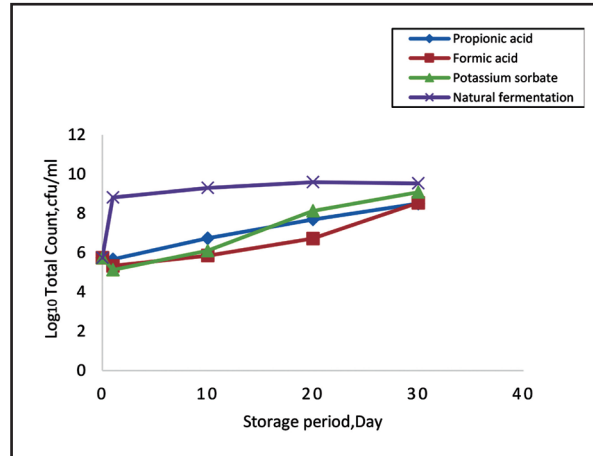
مقایسه بین میانگین‌های تیمارها با آغوز فاقد تیمار از نظر مقدار IgG: نتایج به دست آمده از مقایسه بین میانگین‌ها با آغوز فاقد تیمار، نشان دهنده آن است که به استثنای سوربات پتاسیم ( $p > 0/05$ ) بقیه تیمارها شامل



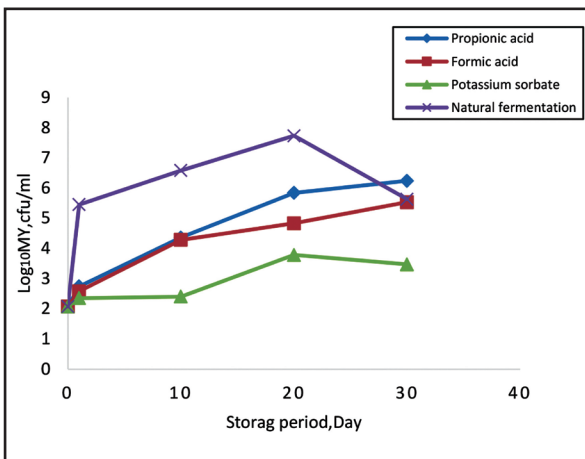




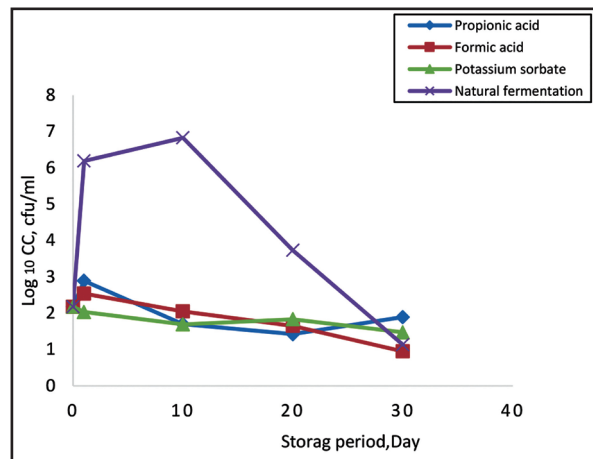
تصویر ۲. تأثیر تیمارها (اسید پروپیونیک ۰/۳٪، اسید فرمیک ۰/۳٪، سوربات پتاسیم ۰/۳٪ و تخمیر طبیعی بر روی میانگین شمارش اشرشیا کلی (log<sub>10</sub>) (EC) در طی روزهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از تیمار در مقایسه با کلستروم تازه.



تصویر ۱. تأثیر تیمارها (اسید پروپیونیک ۰/۳٪، اسید فرمیک ۰/۳٪، سوربات پتاسیم ۰/۳٪ و تخمیر طبیعی بر روی میانگین شمارش میکروبی کل (log<sub>10</sub>) در طی روزهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از تیمار در مقایسه با کلستروم تازه.



تصویر ۴. تأثیر تیمارها (اسید پروپیونیک ۰/۳٪، اسید فرمیک ۰/۳٪، سوربات پتاسیم ۰/۳٪ و تخمیر طبیعی بر روی میانگین شمارش کپک و مخمر (log<sub>10</sub>) (MY) در طی روزهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از تیمار در مقایسه با کلستروم تازه.



تصویر ۳. تأثیر تیمارها (اسید پروپیونیک ۰/۳٪، اسید فرمیک ۰/۳٪، سوربات پتاسیم ۰/۳٪ و تخمیر طبیعی بر روی میانگین شمارش کلی فرم (log<sub>10</sub>) (CC) در طی روزهای ۰، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ پس از تیمار در مقایسه با کلستروم تازه.

شاخص‌های میکروبی مهم و هم‌چنین تأثیر این روش‌ها بر محتوی آنتی‌بادی IgG، تعداد ۵ نمونه آغوز گاو از نژاد هلشتاین از دامداری صنعتی جمع‌آوری گردید و سپس نمونه‌ها بعد از انجام تیمار در طی روز ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ بعد از تیمار از لحاظ شاخص‌های میکروبی اشرشیاکلی، کلی‌فرم، بار میکروبی کل، کپک و مخمر، مورد آزمون میکروبی قرار گرفتند. سپس روند تغییرات میکروبی بین این روش‌ها با یکدیگر و با آغوز اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از ذخیره‌سازی آغوز با مواد شیمیایی اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و نگهدارنده سوربات پتاسیم نشان داد که سوربات پتاسیم نقشی در کاهش باکتری اشرشیاکلی و کلی‌فرم نداشته است، اما از افزایش تعداد آن نیز جلوگیری به عمل آورده است. اسید فرمیک و اسید پروپیونیک هر دو در طی ۳۰ روز در کاهش باکتری اشرشیاکلی نقش داشته‌اند و این به خاطر افزایش اسیدیته و کاهش pH و در نتیجه حساسیت باکتری اشرشیاکلی به pH پایین می‌باشد. به طور میانگین pH بین ۴ تا ۴/۵ بوده است. اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و سوربات پتاسیم نتوانسته‌اند از

این اختلال ناشی از رقابت بین باکتری و ایمنوگلوبولین برای اتصال به رسپتورهای سلول‌های اپیتلیال روده و یا اتصال فیزیکی ایمنوگلوبولین به باکتری‌های پاتوژن در لومن روده می‌باشد. بدین ترتیب آلودگی میکروبی آغوز در جذب آنتی‌بادی‌های موجود در آن تداخل ایجاد خواهد کرد (۱۷). باکتری‌های آلوده کننده آغوز با تولید پروتئازها موجب تقلیب شدن و از بین رفتن پروتئین‌های آغوز می‌شوند (۴). لذا توجه به آلودگی آغوز با توجه به اهمیت آن جهت تغذیه گوساله بسیار منطقی به نظر می‌رسد اما تحقیقات اندکی در رابطه با آلودگی میکروبی آغوز وجود دارد (۵). در صنعت پرورش گاوهای شیری تولید اضافی آغوز بعد از زایمان یکی از مشکلات به شمار می‌آید و بخش اندکی از آغوز تولید شده به مصرف گوساله می‌رسد. بنابراین باقیمانده آغوز به‌طور عمومی فاسد می‌شود (۱۳). امروزه جهت نگهداری آغوز به‌منظور ذخیره غذایی دام و یا تجاری سازی برای مصارف انسانی در مدت زمان کوتاه و یا طولانی، از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. در این تحقیق به منظور سنجش تأثیر روش‌های مختلف ذخیره‌سازی بر روی



آن را با جلوگیری از تکثیر میکروب‌ها حفظ نمود (۶). در فرآیند تخمیر طبیعی در ابتدا تا روز ۱۰ سیر صعودی در تعداد اشرشیا و کلی فرم وجود داشت، اما بعد از آن تا روز ۳۰ سیر نزولی در تعداد اشرشیا و کلی فرم وجود داشت به گونه‌ای که در پایان روز ۳۰ تعداد این باکتری‌ها به کمتر از حد اولیه قبل از تیمار رسیده بود. به نظر می‌رسد علت این پدیده کاهش pH و افزایش اسیدیته بوده باشد که به عنوان مشخصه منفی در رشد باکتری‌های روده‌ای محسوب می‌شود. بار میکروبی کل تا روز ۲۰ در فرآیند تخمیر طبیعی افزایش شدید داشته به گونه‌ای که تا حدود  $10^{10}$  -  $10^9$  باکتری در هر میلی لیتر مشاهده شد، ولی بعد از آن به مقدار بسیار کمی کاهش در بار میکروبی وجود داشت. در فرآیند تخمیر طبیعی به علت ایجاد محیط اسیدی افزایش در تعداد کپک و مخمر تا روز ۱۰ وجود داشت سپس این تعداد در محدوده  $10^5$  تا  $10^6$  ثابت شد. بنابراین تخمیر طبیعی فقط در کاهش اشرشیا کلی و کلی فرم بعد از گذشت زمان و به دلیل افزایش اسیدیته نقش داشت اما توانسته از کاهش بار میکروبی و کپک و مخمر جلوگیری کند (۱۲). از سوی دیگر در تحقیقی که از سوی Saalfeld و همکارانش در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت مشخص شد که تخمیر آغوز در شرایط بی‌هوازی بعد از ۱۴ روز پس از نگهداری کلستروم موجب از بین رفتن اشرشیا کلی شده است اما تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس افزایش یافت (۱۶). از سوی دیگر در این تحقیق به بررسی تأثیر تیمارها بر محتوی آنتی‌بادی IgG پرداخته شد و با مقایسه مقدار آنتی‌بادی IgG در آغوز فاقد تیمار و آغوزهای تیمار شده مشخص شد که فقط تیمار با ماده نگهدارنده سوربات پتاسیم تأثیر زیادی در کاهش و آسیب آنتی‌بادی IgG نداشت. اما مقایسه بین تیمارها نشان داد که اسید فرمیک نسبت به اسید پروپیونیک کمتر به ساختار آنتی‌بادی آسیب رسانده است. Schipper و همکارانش در سال ۱۹۸۱ به بررسی اثر تخمیر طبیعی، اسید فرمیک، اسید پروپیونیک بر روی غلظت آنتی‌بادی IgG پرداختند. نتایج حاصل از سنجش آنتی‌بادی نشان داد اسید فرمیک از روز ۲۸ به بعد موجب کاهش در غلظت ایمونوگلوبولین می‌گردد. در فرآیند تخمیر طبیعی در روزهای نخست کاهشی نسبتاً خفیف در آنتی‌بادی IgG دیده شد و سپس در مقدار ثابت باقی ماند، اما اسید پروپیونیک از همان ابتدا موجب کاهش آنتی‌بادی گردید و این گونه نتیجه‌گیری شد که تیمارها به ترتیب اسید فرمیک < تخمیر طبیعی < اسید پروپیونیک در حفظ آنتی‌بادی IgG مؤثر می‌باشند و این نتیجه با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (۱۸). هم‌چنین Mbutia و همکارانش در سال ۱۹۹۸ به بررسی اثر فرمالدهید و اسید فرمیک ۱٪ بر روی آنتی‌بادی IgG در آغوز گاو پس از ۴ هفته بعد از تیمار و مقایسه با نمونه تیمار نشده پرداختند. نتایج به دست آمده نشان داد که اسید فرمیک موجب کاهش نسبتاً زیاد در مقدار آنتی‌بادی IgG۱ و IgG۲ کمتر می‌شود ولی در نمونه تیمار شده با فرمالدهید به طور نسبی تغییری در آنتی‌بادی ایجاد نشد (۱۱). با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد برای نگهداری بهتر آغوز در مدت زمان طولانی

افزایش بار میکروبی آغوز جلوگیری کنند. اسید فرمیک و سوربات پتاسیم فقط در روزهای آغازین تا حدودی مانع افزایش بار میکروبی شدند. به علت ماهیت اسیدی اسید فرمیک و اسید پروپیونیک و هم‌چنین مساعد بودن رشد کپک و مخمر در شرایط اسیدی، تعداد کپک و مخمر افزایش معنی‌داری در آغوزهای تیمار شده با این دو ماده داشت. سوربات پتاسیم تا حد زیادی توانسته است از رشد کپک و مخمر جلوگیری کند. علاوه بر این تحقیق، Naserian در سال ۱۹۹۴ به بررسی نقش اسید پروپیونیک با درصد وزنی ۱٪ در محافظت از پروتئین‌های آغوز در طی ۳۰ روز نگهداری در دمای ثابت  $30^{\circ}\text{C}$  پرداخته است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده است اسید پروپیونیک در کنترل روند تخمیر و حفاظت از پروتئین‌های آغوز با جلوگیری از رشد باکتری‌ها و تجزیه پروتئین به مواد ازته غیر پروتئینی، نقش مؤثری داشته است. در این تحقیق pH در طی ۳۰ روز تیمار تقریباً برابر  $4/5$  -  $4$  ثابت بود و بنابراین اسید پروپیونیک توانسته است مانع از تخمیر نامطلوب آغوز در اثر رشد باکتری‌ها شود. در اثر تخمیر نامطلوب برخی از ترکیبات آغوز به صورت گاز از محیط خارج و باعث کاهش مواد جامد آغوز می‌شود (۱۳). در سال ۱۹۷۷ Muller and smallcomb نشان دادند که افزودن مواد شیمیایی مانند اسید پروپیونیک و اسید فرمیک (۱٪) از رشد کلی فرم در طی ۱۴ روز ذخیره‌سازی در دمای  $32^{\circ}\text{C}$  جلوگیری می‌کند (۱۴). در تحقیق دیگری که توسط Collings و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام شد به بررسی تأثیر اسید فرمیک در محافظت از آنتی‌بادی IgG و بار میکروبی نمونه آغوز گاو جهت تغذیه گوساله‌ها پرداخته شد که در این تحقیق گزارش شده است که اسید فرمیک در کاهش بار کلی میکروارگانیسم‌ها در آغوز تیمار شده نسبت به آغوز تیمار نشده در طی ۲۴ ساعت پس از نگهداری تأثیر داشته است. تعداد بار میکروبی در طی ۲۴ ساعت پس از نگهداری در آغوز تیمار نشده  $2 \times 10^8$  و در آغوز تیمار شده  $5/4 \times 10^2$  بوده است و تعداد کلی فرم در طی ۲۴ ساعت در آغوز تیمار نشده افزایش داشته در حالیکه در آغوز تیمار شده با اسید فرمیک بعد از ۲۴ ساعت کلی فرم مشاهده نشده است (۲) که با نتایج به دست آمده در این تحقیق، در روز اول بعد از تیمار مطابقت دارد. Thompson و همکارش در سال ۱۹۷۶ در طی تحقیقی نشان دادند افزودن اسید پروپیونیک می‌تواند موجب تأخیر در افزایش تعداد کلی فرم شود، اما فقط اسید پروپیونیک با درصد وزنی ۱ تا ۱/۵٪ می‌تواند به طور مؤثری در کاهش رشد باکتری‌های کلی فرم در طی ۲۸ روز تخمیر نقش داشته باشد در حالی که در این تحقیق اسید پروپیونیک با درصد وزنی ۰/۳٪ نیز در کاهش اشرشیا کلی و کلی فرم نقش داشته است. علاوه بر این نشان دادند که تعداد کپک بعد از ۱۰ روز از شروع تخمیر کاهش یافت، اما تعداد مخمر تا روز ۲۱ بعد از تخمیر نیز هم‌چنان به رشد خود ادامه داد (۱۹) که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. Kaya و همکاران در سال ۲۰۰۳ با بررسی افزودن اسید فرمیک به آغوز، به این نتیجه رسیدند که با اسیدی کردن آغوز بلافاصله بعد از دوشش و نگهداری آن در یخچال می‌توان ارزش تغذیه‌ای



## References

1. Berge, A.C.B., Besser, T.E., Moore, D.A., Sischo, W.M. (2009) Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves. *J Dairy Sci.* 92: 286-295.
2. Collings, LKM., Proudfoot, KL., Veira, DM. (2011) The effects of feeding untreated and formic acid-treated colostrum ad libitum on intake and immunoglobulin levels in dairy calves. *J Anim Sci.* 91: 55-59.
3. Elizondo-Salazar, J.A., Heinrichs, A.J. (2009) Feeding heat-treated colostrum or unheated colostrum with two different bacterial concentrations to neonatal dairy calves. *J Dairy Sci.* 92: 4565-4571.
4. Gapper, L., Copestake, D., Otter, D., Indyk, H. (2007) Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. *Anal Bioanal Chem.* 389: 93-109.
5. Houser, B.A., Donaldson, S.C., Kehoe, S.I., Heinrichs, A.J., Jayarao, B.M. (2008) A survey of bacteriological quality and the occurrence of *Salmonella* in raw bovine colostrum. *Foodborne Pathog Dis.* 5: 853-858.
6. Kaya, I., Uzmay, C., Uysal, H., Kaya, A. (2003) Utilization possibilities of surplus colostrum by acidification with formic acid in rearing calves i. changes in some characteristics of acidified colostrum stored at summer ambient temperatures or in a refrigerator. *Pak J Biol Sci.* 6: 1208-1213.
7. Kelly, D., Coutts, A.G. (2000) Early nutrition and development of immune functions in the neonate. *Proc Nutr Soc.* 59: 177-185.
8. Kelly, G.S. (2003). Bovine colostrum: A review of clinical uses. *Altern Med Rev.* 8: 378-394.
9. Korhonen, H., Marnila, P., Gill, H.S. (2000) Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr.* 84: S75-S80.
10. Lilius, E.M., Marnila, P. (2001). The role of colostrum antibodies in prevention of microbial infections. *Curr Opin Infect Dis.* 14: 295-300.
11. Mbuthia, E.W., Klobasa, F., Gachui, C.K., Abate, A. (1998) Effect of treatment with formaldehyde and formic acid on immunoglobulin

و حفظ کیفیت آن از نظر بهداشتی و آنتی بادی، استفاده از سوربات پتاسیم و اسید فرمیک بهتر از اسید پروپیونیک و تخمیر طبیعی می باشد، البته بررسی اثر ترکیبی سوربات پتاسیم و اسید فرمیک و درصد های متفاوت این مواد نیز می تواند به عنوان پیشنهاد ارائه شود که مستلزم انجام آزمایشات و بررسی های لازم می باشد

## تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان است. نویسندگان مقاله از دانشکده داروسازی دانشگاه اصفهان و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در به انجام رسانیدن این پژوهش همکاری فراوان نمودند تشکر و قدردانی می نمایند.

content of stored bovine colostrum. *Anim Feed Sci Technol.* 67: 291-298.

12. McGuirk, Sh. M., Collins, M. (2004) Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20: 593-603.
13. Naserian, A. (1994) In vitro evaluation of the effect of chemical protection to maintain colostrum. *J Pazhohesh and Sazandegi.* 24: 130-131.
14. Muller, L.D., Smallcomb, J. (1977). Laboratory evaluation of several chemicals for preservation of excess colostrum. *J Dairy Sci.* 60: 627-631.
15. Playford, R.J., Macdonald, C.E., Johnson, W.S. (2000) Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am J Clin Nutr.* 72: 5-14.
16. Saalfeld, M. H., Pereira, D. I. B., Silveira, K. R. K., Schramm, R., Valente, J. d. S. S., Borchardt, J. L., Gularte, M. A., Leite, F. P. L. (2013) Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Cienc. Rural.* 43: 1636-1641.
17. Schipper, I.A., Kotta, P., Fisher, G.R., Erickson, G.M. (1981). Immunoglobulin-G content in bovine colostrum Preserved by freezing, fermentation and chemical Preservatives. *Farm Research.* 39: 25-27.
18. Stewart, S., Godden, S., Bey, R., Rapnicki, P., Fetrow, J., Farnsworth, R., Scanlon, M., Arnold,





- Y., Clow, L., Mueller, K., Ferrouillet, C. (2005) Preventing bacterial contamination and Proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. *J Dairy Sci.* 88: 2571-2578.
19. Thompson, T.L., Marth, E.H. (1976) Changes in the microflora of bovine colostrum during natural fermentation. *J. Milk Food Technol.* 39: 27-35.



# Comparative Survey of the Effects of Chemical Preservatives and Natural Fermentation on Microbial Quality and IgG Antibodies in Order to Increase Shelf Life of Bovine Colostrum

Sotudeh, Sh.<sup>1</sup>, Rabbani Khorasgani, M.<sup>2\*</sup>, Etemadifar, Z.<sup>2</sup>, Zarkesh Esfahani, S.H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduated from Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received 23 December 2017, Accepted 11 April 2018)

## Abstract:

**BACKGROUND:** Colostrum is the first milk produced after birth and is particularly rich in immunoglobulins, growth factors and antimicrobial peptides. Therefore, maintenance and storage of bovine colostrum has always been considered due to benefits of colostrum for the calf. Microbial contamination of colostrum is a concern because it is thought that bacteria in colostrum may interfere with passive absorption of colostrum antibodies.

**OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the effects of chemical preservatives and natural fermentation on quality and storage of colostrum. **METHODS:** Colostrum from the first milking of five Holstein cows was stored separately. Then colostrum samples were studied at days 1, 10, 20, and 30 of storage after treatment. All samples underwent microbiological culture for total plate count and detection of *Escherichia coli*, Coliforms, mold and yeast. Then whey was provided from untreated and treated samples at the end of 30th day and SRID (single radial immune diffusion) test was performed for assaying IgG antibody. Then the effect of treatments on colostrum antibody level was studied. **RESULTS:** The results showed that potassium sorbate did not have a role in reducing *E.coli* and coliforms count. However, it has prevented an increase in *E.coli* and coliform count during 30 days. Formic acid and propionic acid reduced the number of *E. coli* and coliform ( $p < 0.05$ ). In addition, the two organic acids promoted the growth of mold and yeasts compared with potassium sorbate. Nonetheless, the mentioned three treatments did not have an important role in reducing total count ( $p > 0.05$ ). The natural fermentation contributed to the decline of *E. coli* and coliform count while total count increased one day after treatment compared with other treatments, however among the treatments, formic acid and potassium sorbate were more effective than propionic acid and natural fermentation treatment for maintaining hygienic quality of colostrum. The result of measuring IgG antibody indicated that potassium sorbate has had more protective effect than other treatments. **CONCLUSIONS:** The results exposed that potassium sorbate and formic acid are better than other treatments to maintain colostrum quality with regard to increasing shelf life of colostrum.

**Keyword:** Bovine colostrum, bacterial contamination, propionic acid, potassium sorbate, formic acid, IgG antibody

## Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Counts ( $\log_{10}$  cfu/ml) of the microbial groups and IgG concentration (mg/ml) in five raw Bovine colostrum.

**Table 2.** Mean Counts ( $\log_{10}$  cfu/ml) of the microbial groups in treated colostrum during different days after treatment and mean IgG concentration (mg/ml) after 30<sup>th</sup> days.

**Table 3.** Comparison between Counts ( $\log_{10}$  cfu/ml) of the microbial groups and IgG concentration (mg/ml) in raw colostrum with treated colostrum after 1 and 30 days of storage.

**Table 4.** The results of the descriptive statistics of IgG concentration in raw colostrum and treated colostrum (mg/ml).

**Figure 1.** Effect of storage method on mean  $\log_{10}$  TC (Total Count) in comparison with raw colostrum during 1, 10, 20 and 30 days after treatment.

**Figure 2.** Effect of storage method on mean  $\log_{10}$  EC (*E.coli*) in comparison with raw colostrum during 1, 10, 20 and 30 days after treatment.

**Figure 3.** Effect of storage method on mean  $\log_{10}$  CC (Coliform) in comparison with raw colostrum during 1, 10, 20 and 30 days after treatment.

**Figure 4.** Effect of storage method on mean  $\log_{10}$  MY (Mold and Yeast) in comparison with raw colostrum during 1, 10, 20 and 30 days after treatment.

\*Corresponding author's email: m.rabbani@biol.ui.ac.ir, Tel: 031-37932469, Fax: 031-37932456

