اثرات پرتوتابی گاما بر جمعیت باکتری‌های مفید آغوز گاو

پروین شورنگ*[۱]، مریم کاظمی[۲]، مهدی بهگر[۱]، فرحناز معتمدی سده[۱]

۱ پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، کرج، ایران

۲ شرکت کشاورزی فجر اصفهان ، نطنز، ایران

* مسئول مکاتبه. *Email: pshawrang@aeoi.org.ir*

چکیده:

از دزهای صفر، ۲، ٤ و ٦ کیلوگری پرتو گاما برای پاستوریزه کردن آغوز گاو استفاده شد و اثرات پرتوتابی بر جمعیت باکتری‌های مفید آغوز به روش کشت هوازی و بی هوازی و شمارش کلنی تعیین شد. داده‌های آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS آنالیز شد. شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های پرتوتابی شده با افزایش دز کاهش پیدا کرد ولی دز ٤ و ٦ کیلوگری قادر به حذف کلی باکتری‌ها نشد. جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا در دز ٦ کیلوگری به صفر رسید ($P<$ ۰/۰۵) و جمعیت باکتری‌های مفید لاکتوباسیل و بیفیدوباکتر به ترتیب ۸۲ و ۷۹ درصد کاهش پیدا کرد. درصد کاهش جمعیت در اثر پرتوتابی در باکتری‌های مفید کمتر از باکتری‌های بیماری‌زا بود.

کلمات کلیدی: *آغوز، پرتوتابی گاما، بیفیدوباکتریوم، لاکتوباسیل*

مقدمه :

آغوز در اوایل زندگی گو ساله منبع مغذی و در عین حال می‌تواند منبع انتقال آلودگی به گو ساله با شد. حضور آلودگی علاوه بر اثرات مستقیم بر سلامتی گوساله می‌تواند از طریق تداخل در جذب ایمنوگلوبولین‌های آغوز نیز به‌صورت غیرمستقیم برای سلامتی گوساله مضر باشد [۱].

پاستوریزه کردن آغوز راهی برای کاهش انتقال آلودگی از طریق آغوز به گوساله‌ها است که در بیشتر گاوداری‌ها از طریق حرارت دادن انجام می‌شود. تحقیقات نشان داده است که حرارت دادن علاوه بر این‌که سبب کاهش ۲۵ تا ۳۰ درصدی غلظت ایمونوگلوبولین‌های آغوز شده است، مقبولیت آغوز به‌وسیله گوساله‌ها را نیز کاهش داده است[۲]. پرتوتابی گاما یک فرآیند فیزیکی است که با توجه به مقدار دز، برخی یا همه باکتری‌ها را از بین می‌برد[۳]. لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم از جمله باکتری‌های مفید در آغوز است که تأثیرات زیادی بر سلامتی دام دارد که می‌توان به تغییر جمعیت باکتریایی روده، تحریک دستگاه ایمنی، درمان بیماری مرتبط با دستگاه گوارش مانند بیماری‌های تخریب روده بزرگ اشاره

کرد [٤]. بیفیدوباکترها و لاکتوباسیل‌ها مثل سایر باکتری‌ها می‌تواند تحت تأثیر پرتوتابی از بین برود. هدف مطالعه حاضر تعیین اثرات پرتوتابی گاما بر باکتری‌های مفید و بیماری‌زای آغوز گاو بود.

روش کار :

نمونه آغوز از گاوداری شرکت کشاورزی فجر اصفهان- هلدینگ کشاورزی و دامپروری پارس- بنیاد مستضعفان انقلاب ا سلامی واقع در نطنز ا صفهان جمع‌آوری شد. نمونه آغوز اولین دو شش گاوهای تازه زا شکم اول، دوم و سوم بود. نمونه‌های آغوز در چهار ظرف ۵۰۰ میلی لیتری شیشه‌ای اتوکلاو شده، ریخته شد. یکی از شیشه‌های آغوز به‌عنوان شاهد و سه شیشه دیگر جهت پرتوتابی به پژوهشکده کاربرد پرتوها (پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای؛ سازمان انرژی اتمی) ارسال و با دزهای ۲، ٤ و ٦ کیلوگری پرتوتابی شد.

برای شمارش کلی باکتری‌ها از محیط کشت Plate count agar ا ستفاده شد و محیط‌های کشت مورد ا ستفاده جهت شمارش باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس*، *اشریشیاکولای*، باکتری‌های مفید بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیل به‌ترتیب Baird parker agar + egg yolk، EMB Agar (Eosin Methylene Blue) و MRS agar (De Man, Rogosa and Sharpe agar) بود. محیط‌های کشت طبق توصیه شرکت سازنده (Merck) تهیه شد.

قبل از انجام کشت تمامی وسایل و مواد مورد استفاده برای رقیق سازی و کشت میکروبی اتوکلاو شد. برای تهیه رقت‌های مختلف از محلول ۰/۹ درصد NaCl (۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد. محلول تهیه شده در لوله‌های آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری به مقدار ٤/۵ میلی‌لیتر ریخته شد و پس از گذاشتن درپوش لوله‌ها، اتوکلاو شد و سپس برای رقیق‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه رقت‌های مختلف ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه آغوز به یکی از لوله‌ها ا ضافه و مخلوط و رقت ۱-۱۰ تهیه شد. از همین لوله ۰/۵ میلی‌لیتر به لوله بعد ا ضافه و رقت ۲-۱۰ تهیه شد. به‌همین ترتیب رقت‌های مختلف۳-۱۰، ۱۰-٤، ۱۰-۵، ۱۰-٦ برای انجام مرحله کشت آماده‌سازی شد. برای هر نمونه (شاهد، دز ۲، ٤ و٦ کیلوگری) ٦ لوله رقت تهیه شد.

کشت باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکولای* به صورت کشت سطحی و برای شمارش کلی باکتری به‌صورت Pour Plate انجام شد. کشت باکتری‌های مفید بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیل هر دو در محیط MRS و به صورت Pour Plate در دمای ۳۷ درجه به مدت ٤۸ ساعت انجام شد با این تفاوت که کشت بیفیدوباکتریوم به صورت بی‌هوازی و کشت لاکتوباسیل به‌صورت هوازی انجام شد.

ارزش D_{10}[1] شامل دزی از پرتو که تعداد باکتری‌ها را ۹۰ درصد جمعیت باکتری ها (یک سیکل لگاریتمی) کاهش دهد به وسیله معادله $D=(D_2 - D_1) / (\text{Log } N_1 - \text{Log } N_2)$ محاسبه شد. در این معادله N1 و N2 به ترتیب تعداد سلول‌های زنده

1 D_{10} value

در دزهای D1 و D2 است. بنابراین برای تعیین ارزش D10 ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Excel معادله خطی Y = aX + b برای هریک از باکتری‌ها به‌دست آمد. در این معادله Y لگاریتم عیار باکتری و X دز پرتوتابی است. پس از به‌دست آمدن معادله خطی، با فرض Y1=۱ و Y2=٤ مقادیر X1 و X2 محاسبه شد. در نهایت ارزش D10 از تقسیم تفاوت X1 و X2 بر ۳ (تفاوت Y1 و Y2) محاسبه شد. برای محاسبه دز مطلوب کاهش جمعیت باکتری تا میزان مورد نظر باید ارزش D_{10} در لگاریتم عیار اولیه باکتری ضرب شود که به آن دز پایندگی گفته می‌شود[۵] .

داده‌های آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از مدل آماری Yij = μ + Ti + eij تجزیه واریانس شد. در این مدل Yij صفت اندازه‌گیری شده، μ میانگین کل برای هر صفت، Ti اثر دز پرتوتابی و eij خطای آزمایشی است. تجزیه واریانس داده‌ها با رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها در سطح آماری ۵ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت [٦].

نتایج :

نتایج شمارش میکروبی آغوز قبل و بعد از پرتوتابی نشان داد که شمارش کلی باکتری‌ها در نمونه‌های پرتوتابی شده با افزایش دز کاهش پیدا کرد ولی دز ٤ و ٦ کیلوگری قادر به حذف کلی باکتری‌ها نشـــد. دز ٦ کیلوگری عیار باکتریایی آغوز را ۳۳ درصد کاهش داد (P< ۰/۰۵).

تغییر جمعیت باکتری *اشـــریشـــیا کولای* با افزایش دز پرتوتابی تا ٤ کیلوگری معنی دار نبود (P> ۰/۰۵) ولی در دز ٦ کیلوگری به صفر ر سید. تفاوت بین شمارش کلنی باکتری *ا ستافیلوکوکوس آرئوس* نمونه‌های پرتوتابی شده و نمونه شـاهد معنی دار بود (P< ۰/۰۵) ولی بین دزهای ۲ و ٤ کیلوگری تفاوت معنی دار مشـاهده نشـد (P> ۰/۰۵). در دز ٦ کیلوگری شمارش کلنی باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* به صفر رسید (P< ۰/۰۵).

معادله خطی تابعیت لگاریتم عیار باکتری از دز پرتوتابی برای باکتری *اشریشیا کولای* $y = -0.768x + 4.238$ با $R^2 = 0.991$ و برای باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* $y = -0.986x + 4.490$ با $R^2 = 0.985$ بود. مقادیر ارزش D_{10} برای باکتری *اشریشیا کولای* ۱/۳ کیلوگری و برای باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* ۱/۰ کیلوگری به دست آمد.

جدول شماره (۱) شمارش باکتری‌های بیماری‌زای آغوز قبل و بعد از پرتوتابی (log CFU/ml)

	شمارش کلی	*اشریشیا کولای*	*استافیلوکوکوس آرئوس*
شاهد	٦/۹۲[a]	۳/۱۲[a]	۳/۵۳[a]

دز ۲ کیلوگری	٦/۳۷^{b}	٤/۳۸^{a}	۳/٤۱^{a}
دز ٤ کیلوگری	٥/٤۳^{c}	۲/۷۳^{a}	۱/۳۹^{b}
دز ٦ کیلوگری	٤/٦۱^{d}	۰/۰۰^{b}	۰/۰۰^{c}
اشتباه معیار	۰/۲۳٤	۰/۷٤۳	۰/٤٦۱

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) است.

باکتری *اشریشیا کولای* یک باکتری گرم منفی با دیواره لیپوپلی ساکاریدی و باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* یک باکتری گرم مثبت با دیواره پپتیدوگلیکان است و نوع دیواره باکتری از نظر گرم مثبت و منفی بودن در دز پایندگی تأثیر دارد. دز پایندگی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است [۷].

عیار باکتریایی لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر تحت تأثیر پرتوتابی کاهش پیدا کرد. تفاوت معنی‌دار بین تیمار شاهد و دز ۲ کیلوگری وجود نداشت اما بین تیمارهای ٤ و ٦ کیلوگری و تیمار شاهد تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P< ۰/۰۵). با افزایش دز پرتوتابی تا ٦ کیلوگری جمعیت باکتری‌های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتر به ترتیب ۸۲ و ۷۹ درصد کاهش پیدا کرد. درصد کاهش جمعیت در اثر پرتوتابی در باکتری‌های مفید کمتر از باکتری‌های بیماری‌زا بود (P< ۰/۰۵).

جدول شماره (۲) شمارش باکتری‌های مفید آغوز قبل و بعد از پرتوتابی (log CFU/ml)

	لاکتوباسیلوس	بیفیدوباکتر
شاهد	٦/۹۳^{a}	٦/٥٦^{a}
دز ۲ کیلوگری	٦/۰۱^{ab}	٥/٦۸^{ab}
دز ٤ کیلوگری	٥/۱٦^{b}	٤/۹۲^{b}
دز ٦ کیلوگری	۱/۱۹^{c}	۱/۳۲^{c}
اشتباه معیار	۰/٥۸۸	۰/٥۸٥

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری :

طبق نتایج به‌دست آمده پرتوتابی آغوز با دز ٦ کیلوگری قادر به حذف آلودگی *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس آرئوس* است. این دز پرتوتابی قادر به حذف کامل باکتری‌های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتر نشد. درصد کاهش جمعیت در اثر پرتوتابی در باکتری‌های مفید کمتر از باکتری‌های بیماری‌زا بود. باکتری‌های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتر جزو باکتری‌های گرم مثبت باسیلی اسپوردار است که نسبت به باکتری‌های کوکسی و گرم منفی مقاوم‌تر هستند [٤].

مراجع :

1- McGuirk S. and M. Collins. 2004. Managing the production, storage and delivery of colostrum. Pages 593–603 in Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. Vol. 20. W.B. Saunders, New York, NY.
2- Green, L., S. Godden, and J. Feirtag. 2003. Effect of batch and high temperature-short time pasteurization on immunoglobulinGconcentrations in colostrum. Journal of Dairy Science. 86 (Suppl. 1):246.
3- FAO. 2003. General Standard for Irradiated Foods, CODEX STAN106-1983, Rev.1-2003, FAO/WHO, Rome.
4- Ciorba, M. A. 2012. A Gastroenterologist's Guide to Probiotics. Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association, 10(9): 960–968.
5- Motamedi Sedeh, F., Khorasani, A., Shafaee, K., Fatolahi, H., Arbabi, K. 2008. Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig, Indian J Microbiol. 48: 326-330.
6- SAS Institute Inc., 1990. Statistical Analysis System (SAS) User's Guide, SAS Institute, Cary, NC, USA.
7- Adu-Gyamfi A, *J Nketsia-Tabiri, R Boatin*. 2009. Determination of D10–values after gamma irradiation of single and mixed cultures of bacteria. Journal of Applied Science and Technology. Vol 14, No 1-2.