استفاده از پرتوتابی گاما به منظور حذف آلودگی‌های میکروبی مایع رقیق‌کننده اسپرم گاو

INC29-1376

مهدی بهگر[۱]، فرحناز معتمدی سده[۱]، پروین شورنگ[۱]، مریم رهبر[۲]، سید مرتضی موسوی[۱]، فاطمه امیری[۱]

۱. پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای
۲. شرکت نهاده‌های دامی جاهد

چکیده:

رقیق‌کننده اسپرم محیطی است شیمیایی که به منظور رقیق‌سازی و محافظت سلول‌های اسپرم در برابر شوک‌های مختلف در طول فرآوری و انجماد اسپرم استفاده می‌شود. در حال حاضر رقیق‌کننده‌های حاوی لیپوپروتئین‌های حیوانی و عمدتاً حاوی زرده تخم‌مرغ به دلیل سهولت تهیه و صرفه اقتصادی به‌صورت تجاری تولید و مورداستفاده قرار می‌گیرند. علی‌رغم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در رقیق‌کننده به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بسیاری از باکتری‌ها و همچنین وجود انواع آلودگی‌های قارچی و مخمر، رقیق‌کننده تولیدی به مدت طولانی قابلیت نگهداری ندارند. این پژوهش به منظور ارزیابی اثرات پرتوتابی گاما بر جمعیت میکروبی رقیق‌کننده اسپرم انجام شد. بدین منظور رقیق‌کننده حاوی ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و فاقد آنتی‌بیوتیک با دزهای ۲، ۴ و ۶ کیلوگری از پرتو گاما پرتوتابی شد. بررسی میکروبی رقیق‌کننده اسپرم نشان داد که علاوه بر آلودگی‌های قارچی و مخمر دارای آلودگی باکتریایی (Psedomonas spp، Micrococcus spp، Corynebactrium spp و Staphylococcus spp) نیز می‌باشد. نتایج نشان داد پرتوتابی گاما در دزهای ۶-۲ کیلوگری توانایی از بین بردن آلودگی‌های میکروبی را داشت.

کلید واژه‌ها: رقیق‌کننده اسپرم، پرتوتابی، زرده تخم‌مرغ، گاو.

Gamma irradiation to microbial decontamination of bovine semen extender

Mehdi Behgar, Farahnaz motamedi Sedeh, P. Shawrang, Maryam Rahbar, Sayed Morteza Moosavi, Fatemeh Amiri.

1. Nuclear Science & Technology Research Institute, P. O. Box: 31485–498, Karaj, Iran.
2. NDJ Company

Abstract:

Semen extender is a chemical medium that is used to dilute and protect sperm cells from various shocks during sperm processing and freezing. Currently, diluents containing animal lipoproteins and mainly containing egg yolks are commercially produced and used due to the ease of preparation and economic efficiency. Despite the use of antibiotics in the extender, due to antibiotic resistance in many bacteria and also the presence of various types of fungal and yeast contamination, the manufactured diluent cannot be stored for a long time. This research was conducted in order to evaluate the effects of gamma radiation on the microbial population of semen extender. Microbial examination of sperm diluent showed that in addition to fungal and yeast contamination, it also contains bacterial contamination (*Psedomonas spp*, *Micrococcus spp*, *Corynebactrium spp* and *Staphylococcus spp*). The results showed that gamma radiation in doses of 2-6 kg had the ability to eliminate microbial contamination of bovine semen extender.

Keywords: Semen extender, Irradiation, Egg yolk, Cow.

۱. مقدمه

انجماد اسپرم روشی مناسب برای نگهداری اسپرم به شمار می‌آید لیکن در طی فرآیند انجماد و یخ گشایی، سلول اسپرم با خطراتی مواجه بوده و مراحل اصلی شامل سردسازی، انجماد و یخ‌گشایی از نظر فراساختاری، عملکردی و بیوشیمیایی اثرات مضری روی آن دارد[۱]. به منظور جلوگیری از این اثرات نامطلوب در رقیق‌کننده‌های اسپرم از لیپوپروتئین‌های موجود در منابعی همچون زرده تخم‌مرغ، شیر و منابع گیاهی مثل شیره سویا و شیره نارگیل استفاده می‌کنند. این مواد با تأثیر بر غشاء سلولی، اسپرم را در برابر شوک سرما محافظت می‌کند. زرده به عنوان یک بافر اسموتیک با حضور در رقیق‌کننده قادر است تحمل اسپرم را به هر دو نوع محیط هایپرتونیک و هایپوتونیک افزایش دهد[۲]. با وجود این زرده تخم‌مرغ به‌طور طبیعی حاوی آلودگی‌های میکروبی است که می‌تواند از طریق رقیق‌کننده‌های باعث انتقال آن به اسپرم شود. این آلودگی‌ها نه تنها قادر به انتقال یک بیماری بوده بلکه میکروارگانیسم‌های موجود در آن‌ها با تولید سموم می‌تواند بر اسپرم تأثیر گذاشته و باعث مرگ آن‌ها شوند. آلودگی میکروبی نه تنها کیفیت خود اسپرم را کاهش می‌دهد بلکه می‌تواند بر وضعیت باروری اسپرم نیز تأثیرگذار باشد [۳]. باکتری‌ها برای استفاده از مواد مغذی و اکسیژن با اسپرم‌ها رقابت می‌کنند. میکروارگانیسم‌ها باروری اسپرم را مستقیماً با کاهش توانایی واکنش آکروزوم و کاهش تحرک اسپرم و به‌طور غیرمستقیم از طریق تولید گروه‌های اکسیژنی تحت تأثیر قرار می‌دهند [۴]. آلودگی‌های میکروبی متنوعی همانند *ای کولای*، *استرپتوکوکوس*، *استافیوکوکس*، *سودوموناس*، *سالمونلا*، *لیستریا*، *کامپیلوباکتر* و *مایکوپلاسما* می‌توانند از طریق زرده تخم‌مرغ، مایع رقیق‌کننده اسپرم را آلوده کنند [۵]. حالی که دز بالاتر ۱/۵ کیلوگری توانست باکتری را در محتویات تخم‌مرغ‌های دارای پوسته و تخم‌مرغ مایع حذف نماید. در این مطالعه هیچ تأثیر منفی‌ای بر روی رنگ زرده و تأثیرات دمایی پروتئین‌های سفیده در دزهای مورداستفاده نداشت [۶].

اثرات پرتوتابی گاما در دزهای ۰، ۲، ۳ یا ۳/۵ کیلوگری بر آلودگی *سالمونلا انتریتیدیس* تخم‌مرغ مایع، تخم‌مرغ منجمد، پودر سفیده و پودر تخم‌مرغ کامل مطالعه شده است. بالاترین دز پرتوتابی (۳/۵ کیلوگری) باعث کاهش ۵ لگاریتم این باکتری شد. در تمام دزها کاهش رنگ زرده در تخم‌مرغ مایع و جامد مشاهده شد [۷].

در سال‌های اخیر با توجه به کاهش ارزش ریال و ایجاد مشکلات عدیده در تهیه مواد موردنیاز برای تهیه محیط رقیق‌کننده و نگهدارنده اسپرم، شرکت‌های داخلی اقدام به تهیه فرمولاسیون رقیق‌کننده‌های مبتنی بر زرده تخم‌مرغ و تلاش در جهت قطع وابستگی به شرکت‌های خارجی تولیدکننده این محصولات نموده است. با وجود این از آنجا که بخش قابل‌توجهی از محیط رقیق‌کننده اسپرم دارای زرده تخم‌مرغ است، و استفاده از زرده تخم‌مرغ تازه به دلیل وجود آلودگی میکروبی باعث ایجاد مشکلاتی همانند کاهش زمان ماندگاری این محیط‌ها به مدت طولانی می‌شود. همچنین استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز به‌واسطه حضور برخی از میکروارگانیسم‌ها همانند قارچ‌ها و مخمرها؛ و همچنین مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد شده در باکتری‌ها همیشه کارگشا نمی‌باشد. لذا هدف از اجرای این پژوهش یافتن دزهای مناسب پرتوتابی گاما به منظور حذف آلودگی‌های میکروبی رقیق‌کننده اسپرم حاوی زرده تخم‌مرغ تولیدی بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱,۲ تهیه رقیق‌کننده اسپرم

در این تحقیق از رقیق‌کننده بر پایه تریس-زرده تخم‌مرغ استفاده شد. هر ۱۰۰ میلی‌لیتر این محلول حاوی ۲/۴۲ گرم تریس، ۱/۴۸ گرم اسیدسیتریک، ۱ گرم فروکتوز، ۶/۴ میلی‌لیتر گلیسرول، ۲۰ درصد زرده تخم‌مرغ و ۰/۱ درصد SDSاستفاده شد[۱]. به منظور بررسی تأثیر پرتوتابی بر فلور میکروبی رقیق‌کننده آنتی‌بیوتیک به رقیق‌کننده‌ها اضافه نشد.

۲,۲ پرتوتابی گاما

در این مطالعه از دزهای ۲، ۴ و ۶ کیلوگری از پرتوی گاما برای پرتوتابی رقیق‌کننده اسپرم استفاده شد. پرتوتابی زرده تخم‌مرغ با استفاده از دستگاه گاما سل مجهز به چشمه کبالت-۶۰ (پژوهشکده کاربرد پرتوها) انجام شد. به منظور انجام پرتوتابی مایع رقیق‌کننده به‌صورت تازه در شرکت نهاده‌های دامی جامد تهیه و در ظروف شیشه‌ای ۲۵ میلی‌لیتری و ۶۰

میلی‌لیتری ریخته شد به نحوی که تا حد امکان فضای خالی در بالای شیشه‌ها باقی نماند. سپس درب شیشه‌ها با استفاده از انبر مخصوص و درب‌های لاستیکی و درپوش‌های آلومینیومی پرس شد. سپس دزهای مورد نظر بر روی شیشه‌ها لیبل و جهت انجام عملیات پرتوتابی با استفاده از یخ به محل مورد نظر ارسال شد. به منظور اعمال شرایط یکسان نمونه‌های شاهد نیز همراه با تیمارها بر روی یخ قرار گفته و در شرایط یکسان قرار داشتند.

۳,۲ شناسایی و تعیین آلودگی‌های میکروبی زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده اسپرم

آلودگی‌های میکروبی زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده اسپرم شامل مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌های گرم منفی و مثبت قبل و بعد از پرتوتابی در دزهای مختلف تعیین شد[۸]. به منظور شمارش تعداد کلنی از روش رقت‌سازی نمونه‌ها استفاده شد. بدین منظور نمونه‌ها در محیط پپتون واتر در با ۱-، ۲- و ۳- رقت سازی شدند و در دو تکرار به‌صورت پور پلیت در محیط Plate count agar کشت شدند. سپس پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز قرار گرفت و پس از این مدت میزان رشد احتمالی باکتریایی موردبررسی قرار گرفت. کلیه مراحل کار در شرایط استریل در زیر هود لامینار و در کنار شعله انجام شد. برای شناسایی افتراقی باکتری‌های ایزوله شده از روش رنگ‌آمیزی گرم با استفاده از روش گرم استفاده شد. هنگامی‌که باکتری گرم ثبت و گرم منفی در محیط کشت شناسایی شد و در صورت شاهده بیش از یک نوع کلنی از روش واکشت کلنی‌ها با استفاده از سوآپ استریل به‌صورت کشت خطی بر روی محیط‌هایی همانند Blood Agar و Nutrient Agar برای جدایه‌سازی آن‌ها استفاده شد[۸]. برای شنایی باکتری‌ها تست‌های اکسیداز، گلوکز، لاکتوز، سیترات، سولفید هیدروژن، ایندول، ووگس پرسکوآر و اورزه‌آز با استفاده از دیسک‌های تشخیصی بر روی کلنی‌های تازه انجام شد (پادتن طب). تعیین فعالیت کاتالازی با استفاده از آب اکسیژنه ۳ درصد بر روی لام شیشه‌ای استفاده شد. برای تفریق بین کوکسی‌های گرم مثبت از تست کاتالاز، حساسیت به آنتی‌بیوتیک نووبیوسین (پادتن طب)، تست کوآگولاز بر روی پلاسمای خرگوش (جهان) و محیط کشت MSA استفاده شد. برای تعیین قابلیت حرکت باکتری‌های ایزوله شده از محیط کشت SIM و گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. برای تعیین فعالیت هیدرولیز ژلاتین در میکروارگانیسم‌های ایزوله شده و همچنین افتراق بین *سودوموناس‌ها* از *آلکالیژنازها* از محیط کشت حاوی پپتون، عصاره گوشت گوساله و ژلاتین و گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد[۹].

۳. نتایج و بحث

۱,۳ شناسایی جدایه‌های باکتریایی

در مجموع پنج ایزوله باکتریایی (علاوه بر قارچ و مخمر) از رقیق‌کننده شاهد (EX1 الی EX5) و سه ایزوله (EG1 الی EG3) از زرده تخم‌مرغ جدایه‌سازی رنگ‌آمیزی و از لحاظ مورفولوژیک و میکروسکوپی بررسی شدند. نتایج بررسی‌های شیمیایی بر روی ایزوله‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. ایزوله‌های EX1 و EX2 باکتری‌های باسیل گرم منفی با توجه به مثبت بودن تست اکسیداز، عدم تحرک، عدم هیدرولیز ژلاتین و سایر خصوصیات بیوشیمیایی *Psedomonas spp* شناسایی شدند (به‌غیر از *Pseudomonas aeruginsa* و *Pseudomonas fluorescens*). ایزوله EX3 باکتری کوکسی گرم مثبت و به‌واسطه آرایه چهارتایی *Micrococcus spp* شناسایی شدند. جدایه EX4 باسیل گرم مثبت بود و با توجه خصوصیات مورفولوژیکی، عدم تحرک، رشد در محیط هوازی، تست مثبت کاتالاز و سایر خصوصیات بیوشیمیایی *Corynebactrium spp.* تشخیص داده شد. ایزوله EX5 کوکسی‌های گرم مثبت با آرایش خوشه‌ای بودند و با توجه به حساسیت به آنتی‌بیوتیک نووبیوسین، عدم واکنش با پلاسمای خرگوش و تست ژلاتین منفی در دسته *Staphylococcus spp* غیر اورئوسی تشخیص داده شدند.

از میان باکتری‌های جدایه‌سازی شده از زرده تخم‌مرغ EG1 و EG2 با توجه به تظاهر اشکال متغیر و کروی-باسیل *Corynebactrium spp.* تشخیص داده شدند. جدایه EG3 نیز کوکسی‌های گرم مثبت با آرایش خوشه‌ای بودند و با

توجه به حساسیت به آنتی‌بیوتیک نووبیوسین، عدم واکنش با پلاسمای خرگوش و تست ژلاتین منفی در دسته *Staphylococcus spp* غیر اورئوسی تشخیص داده شدند.

جدول ۱ نتایج رنگ‌آمیزی، تست‌های بیوشیمیایی و تکمیلی بر کلنی‌های باکتری‌های ایزوله شده تخم‌مرغ و مایع رقیق‌کننده اسپرم

	رنگ‌آمیزی گرم	گلوکز	لاکتوز	ایندول	سیترات	ووگس-پروسکوئر	اوره‌آز	H_2S	کاتالاز	اکسیداز	ژلاتیناز	حرکت
EX1	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-
EX2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
EX3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
EX4	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
EX5	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Eg1	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Eg2	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Eg3	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

* باکتری‌های جدایه‌سازی شده از مایع رقیق‌کننده و زرده تخم‌مرغ به ترتیب با EX و EG نشان داده شده‌اند.

۱,۴ اثر پرتوتابی بر حذف میکروارگانیسم‌های رقیق‌کننده زرده

به دلیل آلودگی اندک مایع رقیق‌کننده اسپرم هیچ کلنی‌ای در کشت حاصل از رقت‌های مختلف نمونه‌های شاهد و پرتوتابی شده مشاهده نشد. در نتیجه امکان شمارش تعداد کلنی‌ها در گروه شاهد و پرتوتابی وجود نداشت. به همین دلیل به منظور شناسایی انواع آلودگی‌های میکروبی موجود در مایع رقیق‌کننده شاهد و پرتوتابی شده از محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) به عنوان محیط غنی کننده استفاده شد. تأثیر پرتوتابی گاما بر مایع رقیق‌کننده اسپرم در جدول ۲ نشان داده شده است. تلقیح نمونه شاهد (پرتوتابی نشده) در محیط غنی کننده منجر به ایجاد کدورت در رقیق‌کننده اسپرم شد و متعاقباً کشت آن‌ها در انواع محیط‌های کشت، رشد انواع میکروارگانیسم‌ها شامل مخمر، قارچ و انواع باکتری‌ها را نشان داد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که استفاده از دزهای ۲، ۴ و ۶ کیلوگری منجر به حذف کلیه آلودگی‌های میکروبی در مایع رقیق‌کننده شد.

جدول ۲ تأثیر پرتوتابی گاما بر حذف میکروارگانیسم‌های مختلف

	قارچ	مخمر	باکتریایی
رقیق‌کننده شاهد	+	+	+
رقیق‌کننده پرتوتابی شده (۲، ۴ و ۶ کیلوگری)	–	–	–

۴. بحث

۱,۴ آلودگی‌های میکروبی زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده اسپرم

در مطالعه حاضر *استافیلوکوکوس* جدا شده کوآگالاز منفی و غیر *اورئوسی* بود که یافته سایر محققین مبنی بر بیش‌ترین فراوانی یافت شده از استافیلوکوکوس‌های کوآگالاز منفی در تخم‌مرغ را تائید می‌کند[۱۰و۱۱]. در مطالعه‌ای درصد بالایی از آلودگی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوک اورئوس*، *استافیلوکوک اپی‌درمیدیس*، *استافیلوکوک ساپروتیفیکوس* و *کورینه‌باکتریوم پیوژنز*، بر روی پوسته تخم‌مرغ‌های بررسی شده در بازار گزارش شد[۱۲].

در مطالعه حاضر دو باکتری باسیل گرم مثبت جدا شده از زرده تخم‌مرغ گونه *کورینه‌باکتریوم* بودند که نتایج تست‌های بیوشیمایی مشابه‌ای داشتند، به‌جز توانایی تخمیر لاکتوز که در یکی از آن‌ها مثبت و در دیگری منفی بود. جدایه‌ای که توانایی تخمیر لاکتوز را داشت می‌تواند باکتری *تروپرلا پیوژنز* که حضور آن در محتویات تخم‌مرغ نیز گزارش شده است. در مطالعه‌ای آلودگی محتویات داخلی تخم‌مرغ با *کورینه‌باکتریوم پیوژنز* (در طبقه‌بندی جدید *تروپرلا پیوژنز نامیده می‌شود*) در ۲۴ درصد از تخم‌مرغ‌های بررسی شده گزارش شده است[۱۲]. در مرغان تخم‌گذار وجود باکتری *تروپرلا*

پیوژنز در ۲ درصد از زخم‌های بالشتک کف پا در دانمارک نیز گزارش شده است[۱۳]. در مطالعه‌ای بر روی ترکیب باکتریایی نمونه‌های مدفوع مرغان تخم‌گذار و جوجه‌های گوشتی با استفاده از شناسایی16S rRNA حضور این باکتری را در میان سایر باکتری‌ها نشان داد[۱۴]. لذا در مطالعه حاظر امکان حضور این باکتری در مدفوع و انتقال آن به زرده تخم‌مرغ به‌صورت افقی محتمل است. در مطالعه‌ای آلودگی *کورینه‌باکتریوم* پوسته تخم‌مرغ‌های عرضه‌شده در بازار ۲/۵۵ درصد از کل آلودگی‌های باکتریایی گزارش شده است[۱۵].

در مطالعه حاضر علاوه بر آلودگی گونه‌های *استافیلوکوکوس* و *کورینه باکترویم* (*تروپرلا*) در زرده تخم‌مرغ، آلودگی‌های قارچ، مخمر، *سودوموناس* و *میکروکوکوس* نیز در رقیق‌کننده شناسایی شد. همچنین هیچ آلودگی قارچ، مخمر، *سودوموناس* و *میکروکوکوس* در محتویات زرده تخم‌مرغ شناسایی نشد که یکی از دلایل آن می‌تواند بررسی تعداد اندک تخم‌مرغ (۴ عدد) به منظور تعیین آلودگی‌های زرده باشد که با توجه به فراوانی اندک این باکتری‌ها نتیجه به دست آمده مورد انتظار بود. در حالی که برای تهیه مایع رقیق‌کننده مورد مطالعه (۶ لیتر) از حدود ۲۰ الی ۲۵ عدد تخم‌مرغ استفاده شده بود. در مطالعه آلودگی پوسته و زرده تخم‌مرغ با باکتری *سودوموناس* به ترتیب ۴/۳۲ و ۶/۱۲ درصد گزارش شده است. آلودگی *سودوموناس* و *میکروکوکوس* ناشی از آلودگی‌های محیطی و گرد و غبار است و این باکتری‌ها علاوه بر اینکه جزو مهم‌ترین و فراوان‌ترین باکتری‌های موجود در محیط و غشاهای طبیعی می‌باشند، نسبت به شرایط بد محیطی نیز مقاومت بالایی دارند (به‌ویژه *سودوموناس*)، همچنین این باکتری‌ها دارای رشد ساده و سریع‌تری در مقایسه با سایر باکتری‌ها دارند. همچنین در این مطالعه فراوانی آلودگی میکروکوکوس و مخمر به ترتیب ۵/۷۳ و ۰/۶۴ درصد بود[۱۵].

دلیل آلودگی اندک زرده تخم‌مرغ مورد مطالعه در مطالعه حاظر می‌تواند سدهای فیزیکی (استفاده از تخم‌مرغ‌های یا پوسته سالم) و شیمیایی (لیزوزیم موجود در سفیده تخم‌مرغ) متعددی باشد که در جلوگیری از نفوذ باکتری‌ها نقش مهمی دارد و احتمال رسیدن آلودگی به زرده را به حداقل می‌رساند[۱۶]. از طرف دیگر برای نفوذ آلودگی از پوسته به محتویات تخم‌مرغ عامل زمان[۱۵] و دمای محیط نقش بسیار مهمی دارند که در مطالعه حاضر از تخم‌مرغ‌های تازه که زمان اندکی از زمان جمع‌آوری آن‌ها سپری و در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده بود، استفاده شد.

۲،۴ اثر پرتوتابی بر حذف میکروارگانیسم‌های رقیق‌کننده زرده

در مطالعه حاضر پرتوتابی گاما دزهای ۲، ۴ و ۶ کیلوگری منجر به حذف کلیه آلودگی‌های میکروبی در مایع رقیق‌کننده اسپرم شد. بیشتر مطالعات در خصوص حذف آلودگی میکروبی تخم‌مرغ با پرتوتابی معطوف به پاتوژن‌ها از خانواده بزرگ باکتری‌های گرم منفی انتروباکتریاسه می‌باشد. در مطالعه حاضر هیچ شواهدی از آلودگی باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه در زرده تخم‌مرغ و رقیق‌کننده اسپرم دیده نشد. غالباً این آلودگی از طریق انتقال عمودی از مرغ‌های آلوده به تخم‌مرغ اتفاق می‌افتد. اثرات پرتوتابی گاما در دزهای ۰، ۲، ۳ یا ۳/۵ کیلوگری بر آلودگی *سالمونلا انتریتیدیس* تخم‌مرغ مایع، تخم‌مرغ منجمد، پودر سفیده و پودر تخم‌مرغ کامل مطالعه شده است. بالاترین دز پرتوتابی (۳/۵ کیلوگری) باعث کاهش ۵ لگاریتم این باکتری شد. در تمام دزها کاهش رنگ زرده در تخم‌مرغ مایع و جامد مشاهده شد[۷].

در مطالعه‌ای تخم‌مرغ‌های پخته شده و استریل شده با پرتو گاما با تعداد $۱۰^{۶}$-$۱۰^{۷}$ واحد کلنی در گرم با باکتری‌های بیماری‌زا تلقیح شدند. تخم‌مرغ‌ها در دزهای ۱، ۲ و ۳ کیلوگری پرتوتابی و سپس در دمای ۱۰، ۲۰ یا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و آلودگی‌های میکروبی پس در زمان ۰، ۸ و ۲۴ ساعت بررسی شدند. پرتوی ۳ کیلوگری توانست آلودگی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا ایوانووی*، *سالمونلا تیفوموریوم* و *اشرشیا کولی* را از بین ببرد[۱۷].

۵. نتیجه‌گیری کلی

نتایج این آزمایش نشان داد که آلودگی‌های مخمر، قارچی و باکتریایی به‌ویژه *سودوموناس‌ها* و *میکروکوکوس‌ها*، علاوه بر فلور میکروبی موجود در تخم‌مرغ در زمان تهیه مایع رقیق‌کننده اسپرم در فرآیند تولید وارد آن می‌شود. اگرچه در زمان

تهیه آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و وسیع الطیف به منظور کنترل آلودگی‌های رقیق‌کننده استفاده می‌شود، با وجود این استفاده از آنتی‌بیوتیک تاثیری بر قارچ و مخمر ندارد. علاوه بر این بسیاری از باکتری‌ها به‌واسطه دارا بودن پلاسمید دارای خصوصیت مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیز هستند. در این آزمایش پرتوتابی در دز ۲ کیلوگری باعث حذف کلیه آلودگی‌های میکروبی رقیق‌کننده اسپرم شد.

۶. مراجع

1) Bailey, J.L., J.F. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. Journal of Andrology, 21: 7-1.
2) Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Animal Reproduction Science, 37:185-249.
3) Diemer, T., Weidner, W., Michelmann, H. W., Sciefer, H. G., Rovan, E. and Mayer, F. (1996). Influence of Escherichia coli on motility parameters of human spermatozoa in vitro. Int. J. Androl., 19 : 271 277.
4) Morrell, J. M. (2006). Update on semen technologies for animal breeding. Reprod. Domest. Anim., 41: 63-67.
5) Thibier, M. and Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for animal insemination. Anim. Reprod. Sci., 62: 233-251.
6) Serrano, L.E., Murano, E.A., Shenoy, K., Olson, D.G., (1997): D values of Salmonella enteritidis isolates and quality attributes of shell eggs and liquid whole eggs treated with irradiation. Poult. Sci. 76, 202–205.
7) Froehlich, A., (2004), Irradiation of liquid egg, frozen egg, yolk and white powder: reducing the population of Salmonella enteritidis and sensory and physicochemical aspects. Thesis (Doctor of Food Microbiology), Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
8) Khakpoor M, Bozorgnia M. 1390. A comparative study of bacterial agents in eggs, with or without eggshell's contamination that produced in Tabriz. Food Hygiene. 1 (2): 17-27. (In Persian)
9) Difco Laboratories. 2009. Difco & BBL manual: manual of microbiological culture media, 2nd ed, p 402–403. Becton Dickinson and Company, Sparks, MD.
10) Salihu, MD., Garba B., Isah, Y. (2015). Evaluation of microbial contents of table eggs at retail outlets in Sokoto metropolis, Nigeria. Sokoto Journal of Veterinary Sciences, 13 (1): 22-28.
11) Stepien-Pysniak, D, Marek, A., Rzedzicki, J. (2009). Occurrence of bacteria of the genus Staphylococcus in table eggs descended from different sources. Polish Journal of Veterinary Sciences 12(4):481-4
12) Pyzik, E., Marek, A. (2012) Characterization of bacteria of the genus Staphylococcus isolated from the eggs of Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Polish Journal of Veterinary Sciences, 15 (4): 767-772.
13) Heidemann Olsen, R., Christensen, H., Kabell, S., Bisgaard M. (2018) Characterization of prevalent bacterial pathogens associated with pododermatitis in table egg layers, Avian Pathology, 47:3, 281-285.
14) Videnska P, Rahman MM, Faldynova M, Babak V, Matulova ME, et al. (2014) Characterization of Egg Laying Hen and Broiler Fecal Microbiota in Poultry Farms in Croatia, Czech Republic, Hungary and Slovenia. PLoS ONE 9(10): e110076.
15) De Reu K, Heyndricky M, Grijspeerdt K, Rodenburg TB, Tuyttens F, Uyttendaele M, Debevere J, Herman L (2007): Estimation of the vertical and horizontal bacterial infection of hen´s table eggs. In: Proc. 18th European Symposium on the Quality of Poultry Meat and 12th European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products, Prague, Czech Republic, 46–47.
16) Svobodova, J., Tumova E. (2014). FACTORS AFFECTING MICROBIAL CONTAMINATION OF MARKET EGGS: A REVIEW. Scientia agriculturae bohemica, 45 (4): 226–237.
17) Jo, C., Lee, N.Y., Kang, H., Hong, S., Kim, Y., Kim, H.J., Byun, M.W., (2005). Radio-sensitivity of pathogens in inoculated prepared foods of animal origin. Food Microbiol. 22, 329–336.