مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۲، ۱۳۰-۱۲۵
Journal of Veterinary Research. 70,2: 125-130, 2015
Original Article

مطالعه و تعیین دز مطلوب غیرفعال سازی ویبریو پاراهمولیتیکوس در شرایط کشت تازه و لیوفیلیزه با استفاده از پرتو گاما

مرضیه حیدریه[۱] مهدی سلطانی[۱*] فرحناز معتمدی سده[۲] سعید رجبی فر[۲] محمدرضا احمدی[۱] غلامرضا شاه حسینی[۲]

۱) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران- ایران
۲) گروه پژوهشی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی پزشکی و صنعتی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای- ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ دی ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۶ اسفند ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: ویبریو پاراهمولیتیکوس یکی از عوامل مولد بروز بیماری ویبریوزیس در مزارع تکثیر و پرورش ماهیان و میگوها می‌باشدکه در صورت بروز شـرایط مسـاعد موجب تلفات قابل توجه می‌نماید. **هدف:** هدف از این مطالعه ارزیابی تأثیر پرتو گاما بر غیرفعال سـازی ویبریو پاراهمولیتیکوس در شرایط کشت تازه و لیوفیلیزه می‌باشد. **روش کار:** ویال‌های حاوی ۰/۵ mL سوسپانسیون باکتری با رقت $۱/۵\times۱۰^{۱۰}$ عدد سلول باکتری در میلی لیتر در حالت کشت تازه با دزهای KGY ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ و ۴ و ویال‌های باکتری لیوفیلیزه با دزهای KGY ۲، ۴، ۷ و ۸ پرتودهی گردیدند. سپس رفتار رشد باکتری‌های پرتودیده مورد ارزیابی قرار گرفتند. **نتایج:** نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که حداقل دز مطلوب برای غیرفعال سازی این باکتری به صورت کشت تازه و در حالت لیوفیلیزه با پرتو گاما به ترتیب KGY ۴ و ۱۰ برآورد شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتیجه این مطالعه نشان می‌دهد که غیر فعال سازی ویبریو پاراهمولیتیکوس در شرایط کشت تازه با میزان کمتر از نصف دز مورد نیاز برای غیر فعال سازی یان با پرتوگاما مورد نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پرتو گاما، میگو، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریوزیس

مقدمه

امروزه میگو یکی از مهمترین محصولات شـیلاتی نه تنها در دنیا بلکه در کشـورمان نیز می‌باشـد. صنعت پرورش میگو در کشور به ویژه در مناطق جنوبی از اهمیت اقتصادی خاصی برخورداراست زیرا نه تنها موجب تأمین پروتئین حیوانی سالم مورد نیاز می‌باشد بلکه به دلیل اشتغال زایی و ارزآوری از اهمیت قابل توجه‌ای برخوردار است. با این حال این صنعت با چالش‌های متعددی از جمله مباحث بروز بیماریهای باکتریایی مواجه می‌باشند؛ از جمله می‌توان به خسـارت ناشی از بروز بیماریهای باکتریایی جنس ویبریو اشاره نمود که موجب خسـارت قابل توجه به ویژه در شرایط استرس‌زا می‌گردند (۳،۱۰). این اجرام بیماریزا گرم منفی عمدتاً در مناطق ساحلی آرام با اکسیژن کم و غنی از مواد آلی سـاکن بوده و به عنوان بخشـی از فلور طبیعی انواع آبزیان از جمله میگوها محسوب می‌شوند (۳،۱۲). بسته به شرایط محیطی و اکولوژیکی مناطق مختلف، تنوع و فراوانی گونه‌های این جنس باکتریایی نیز می‌تواند متغیر باشد (۳،۱۲). ویبریو پاراهمولیتیکوس یکی از اجرام عامل بیماری ویبریوزیس و به عنوان یکی از پاتوژن‌های مشـترک بین آبزیان و انسـان بوده به طوری که در انسـان ایجاد گاستروآنتریت می‌نماید (۳). در صنعت میگو نیز ویبریوزیس یکـی از جدیدترین و مهمترین عفونت‌های باکتریایی در کارگاه‌های تکثیر و پرورش میگو بوده که می‌تواند خسـارات قابل توجهی را موجب شود.

طی مطالعه‌ای توسـط Chan و Hanna در سـال ۱۹۹۴ مهمترین گونه‌های عامل ویبریوزیـس در میگوی منودون ویبریو آجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس و انگوئیلاروم معرفی شده است (۴) و همچنین Nashi در سـال ۱۹۹۲ و Runngpan و Kitao در سـال ۱۹۹۱ گونه‌هـای آجینولیتیکـوس، پاراهمولیتیکوس و انگوئیـلاروم را به عنوان گونه‌های عمده عامل بیماری ویبریوزیس در میگوها گزارش نموده‌اند (۱۱). Soltani و همـکاران در سـال ۲۰۰۶ نیز عامل اصلی بروز بیمـاری ویبریوزیس در میگوهای مزارع پرورشی میگو بوشهر را ویبریو پاراهمولیتیکوس وهاروی جداسـازی شـده از همولنف و هپاتوپانکراس میگوها بیـان نمودند (۱۲). علیرغم رشد صنعت پرورش میگو در کشور هنوز در زمینه روش‌های کنترل و پیشـگیری از بروز این نوع بیماریها اقدامات گسـترده‌ای صورت نگرفته اسـت. لذا یافتن راه‌های پیشگیری با کارآیی بالا و مقرون به صرفه کمک شـایانی به اقتصاد این صنعت می‌نماید. امروزه کاربرد روش‌های هسته‌ای (پرتوهای یونسـاز) برای تولید واکسن‌های غیرفعال به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است، زیرا کمترین تأثیر سوء را بر خواص آنتی ژنیسیتی و در نتیجه ایمن‌زایی ذرات آنتی ژن می‌گذارد. پرتوهای یونساز دارای انرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشندگی شدید می‌باشند. به عنوان مثال اشعه گاما نوعی پرتوی با شدت خیلی زیاد و قدرت نفوذ بالا که با متلاشی سلول موجب تولید ایزوتوپ‌های رادیواکتیو نیز می‌شـود. لازم به ذکر اسـت که مهمترین ایزوتوپ مورد اسـتفاده کبالت ۶۰ می‌باشـد (۱). اولین مرحله در سـاخت و تولید رادیوواکسـن‌ها تعیین دز مناسـب غیرفعال سازی پاتوژن مربوطه اسـت. لذا بـا توجه به ضرورت یافتـن راه حل‌های پیش گیری از بـروز بیماری ویبریوزیس در مـزارع میگو، در این مطالعه تلاش شـده تا نسـبت به تعیین و مقایسـه دزهای غیرفعال سازی اشعه گاما علیه ویبریو پاراهمولیتیکوس اقدام شود تا زمینه‌ای برای مطالعات آتی ساخت واکسن

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۰۹۴، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: msoltani@ut.ac.ir

مربوطه فراهم شود.

مواد و روش کار

سویه ویبریو پارا\همولیتیکوس (شناسه ۱۷۸۰۲) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید. باکتری لیوفیلیزه به منظور تهیه یک سوسپانسیون یکنواخت در محیط مایع TSB حاوی ۳٪ NaCl حل گردیده و از سوسپانسیون حاصله در محیط‌های آگار مغذی و محیط کشت انتخابی TCBS کشت خطی داده شد و در ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردیدند. پس از مشاهده پرگنه‌های سبز رنگ بر روی محیط TCBS آزمایش‌های تائیدی بر طبق روش استاندارد جستجوی گونه‌های ویبریو ارایه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا انجام شد. پس از انجام آزمایشات فوق الذکر و تائید کشت خالص باکتری به منظور تولید انبوه باکتری مقدار ۵۰۰mL محیط استریل TSB حاوی ۳ ٪ NaCl تهیه و از پرگنه‌های خالص باکتری در آن کشت داده و سپس محیط کشت به مدت ۱۰-۸ ساعت در ۳۷ °C نگهداری گردید. پس از مشاهده کدورت و تهیه گسترش و رنگ آمیزی گرم و اطمینان از خلوص کشت حاصله نسبت به تعیین تعداد سلول زنده باکتری در میلی لیتر با استفاده از روش تهیه رقت و کلنی کانت اقدام گردید. برای تهیه ویال‌های لیوفیلیزه باکتری از سوسپانسیون تهیه شده به روش کشت سطحی در محیط آگار مغذی کشت داده شد و در ۳۷ °C به مدت ۱۰ ساعت نگهداری و سلول‌ها جمع‌آوری و پس از افزودن به محیط شیر پس چرخ (Skim milk) برای انجام عملیات لیوفیلیزه به انستیتو پاستور ایران منتقل گردیدند (۱۲،۳).

تعیین دز مؤثر غیرفعال سازی باکتری: از ویال‌های ۰/۵ mL لیوفیلیزه (ویال‌های شیشه‌ای فاقد اکسیژن در شرایط خلاء) و نیز ویال‌های ۵ سوسپانسیون کشت تازه باکتری برای تعیین دز مطلوب غیر فعال سازی باکتری با استفاده از اشعه گاما استفاده گردید. بدین ترتیب سوسپانسیون تازه باکتری با کشت در محیط TSB حاوی ۳ ٪ NaCl تهیه و با دور ۶۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ °C سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد رسوب حاصله (بدون مایع رویی) در محیط استریل TSB حاوی ۳ ٪ NaCl حل و مورد استفاده قرار گرفت. عملیات پرتودهی با دزهای KGY ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ (سوسپانسیون تازه باکتری) و KGY ۲، ۴، ۷ و۸ (باکتری لیوفیلیزه با) در گروه کشاورزی پژوهشکده کشاورزی، پزشکی و صنعتی هسته‌ای با دستگاه گاماسل (PX-۳۰ IssIedovapel) با نرخ دز ۰/۲۲ گری بر ثانیه و چشمه کبالت ۶۰ انجام گردید. پس از پرتودهی از هر کدام از ویال‌های لیوفیلیزه اشعه دیده در محیط TSB حاوی ۳ ٪ NaCl کشت داده و در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۰ ساعت نگهداری شد. به منظور تائید رشد و کدورت ایجاد شده در محیط کشت‌های مربوطه از سوسپانسیون‌های پرتو دیده روی محیط اختصاصی TCBS حاوی ۳٪ NaCl و محیط عمومی آگار مغذی کشت داده و همزمان با کشت از هر کدام از سوسپانسیون‌های اشعه دیده گسترش تهیه و رنگ آمیزی گرم به عمل آمد. همچنین بلافاصله از سوسپانسیون باکتری‌های پرتو دیده به صورت کشت تازه اقدام به تهیه رقت‌های مورد نظر نموده و از هر رقت در محیط آگار مغذی با ۳ ٪ NaCl کشت داده و محیط‌های مربوطه پس از کشت در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۰ ساعت نگهداری و سپس تعداد سلول باکتری (cfu/mL) برای هر دز پرتودهی تعیین گردید.

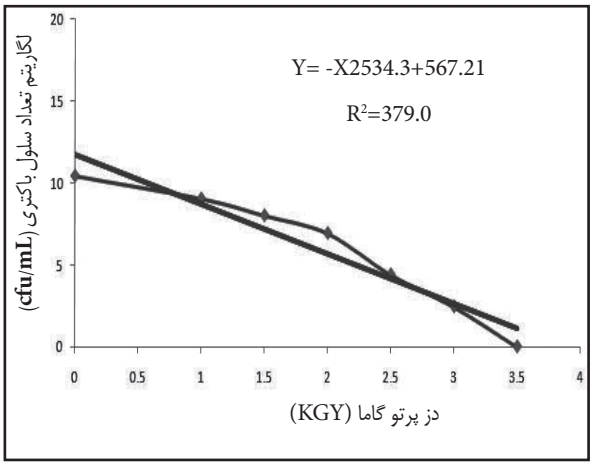
برای تعیین دز غیرفعال سازی پرتو بر سوسپانسیون کشت تازه باکتری براساس روش ارائه شده توسط Motamedi و همکاران در سال ۲۰۰۸ و معادله خط حاصله $Y = -۳/۴۳۵۲ + X\ ۱۲/۷۶۵$ که در آن میزان دز مورد نیاز غیرفعال سازی= X و رقت باکتری = Y می‌باشد. اگر $Y = ۱۰^{۲}$ در نظر گرفته شود میزان دز مورد نیاز برای غیرفعال سازی این رقت باکتری برابر با X=۳/۱۷ KGY است و همچنین اگر $Y = ۱۰^{۵}$ باشد میزان X=۲/۲۶ KGY به دست می‌آید. همچنین طبق معادله خط $Y=-۱/۳۹۹ + X\ ۱۱/۲۷$ اگر $Y=۱۰^{۲}$ در نظر گرفته شود میزان دز مورد نیاز به منظور غیرفعال سازی این رقت باکتری لیوفیلیزه برابر با X = ۶/۶۲ KGY است و همچنین اگر Y=۵۱۰ باشد میزان X = ۴/۴۸ KGY به دست می‌آید.

نتایج

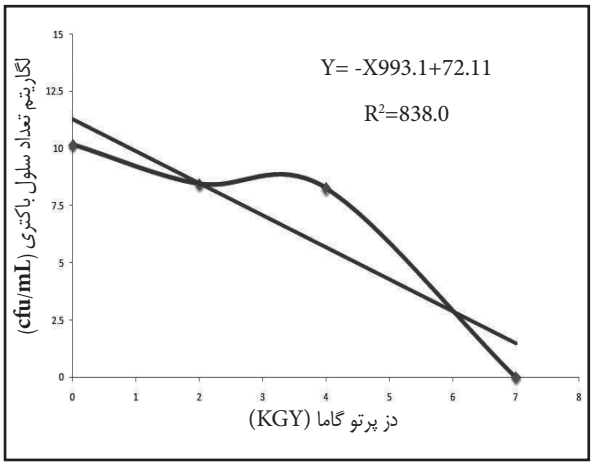
نتایج مربوط به تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما بر رفتار رشد ویبریوپارا\همولیتیکوس در جدول ۱ آمده است. به‌علاوه روند رشد باکتری در هر دو حالت تحت تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

براساس نتایج مذکور میانگین رشد سوسپانسیون کشت تازه باکتری در حضور دزهای KGY ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵ و ۴ به ترتیب $۱/۱ \times ۱۰^{۹}$، $۱/۰۳ \times ۱۰^{۸}$، $۸/۵ \times ۱۰^{۶}$، $۲/۵۳ \times ۱۰^{۴}$، $۲/۸ \times ۱۰^{۳}$، ۰×۱۰^{۱} و ۰×۱۰^{۱} و میانگین رشد باکتری در حالت لیوفیلیزه در حضور دزهای KGY ۲، ۴، ۷ و ۸ به ترتیب $۲/۸۲ \times ۱۰^{۸}$، $۱/۸۵ \times ۱۰^{۷}$، ۰×۱۰^{۱} و ۰×۱۰^{۱} که تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با نمونه کنترل با رقت $۱/۵ \times ۱۰^{۱۰}$ در سطح آماری $p>۰/۰۵$ نشان دادند (جدول ۱).

لذا به منظور کاهش رقت سوسپانسیون کشت تازه باکتری به میزان تقریباً قسه سیکل لگاریتمی یعنی از $۱۰^{۲}$ به $۱۰^{۵}$ نیاز به دز پرتودهی معادل ۰/۳ KGY می‌باشد. کاهش رقت باکتری لیوفیلیزه به میزان تقریباً سه سیکل لگاریتمی یعنی از $۱۰^{۲}$ به $۱۰^{۵}$ نیاز به دز پرتودهی معادل ۲/۹۴ KGY می‌باشد. بنابراین دزهای KGY ۰/۳ و ۰/۹۸ به ترتیب به منظور کاهش یک سیکل لگاریتمی باکتری به صورت کشت تازه و در حالت لیوفیلیزه مورد نیاز است. در نهایت می‌توان بیان نمود که $D_{۱۰}$ Value=۰/۳ و $D_{۱۰}$ Value=۰/۹۸ به ترتیب میزان دز مورد نیاز به منظور کاهش یک سیکل لگاریتمی باکتری ویبریو پارا\همولیتیکوس مذکور به صورت سوسپانسیون کشت تازه و لیوفیلیزه با پرتو گاما می‌باشد. با توجه به رقت اولیه باکتری که معادل



نمودار ۱. نمودار رفتار رشـد سوسپانسیون کشت تازه باکتری ویبریو پارا‌همولیتیکوس پرتودهی شده با دزهای مختلف پرتو گاما.



نمودار ۲. نمودار رفتار رشد باکتری لیوفیلیزه ویبریو پارا‌همولیتیکوس پرتودهی شده با دزهای مختلف پرتو گاما.

جدول ۱. رشـد ویبریوپارا‌همولیتکیوس (سوسپانسـیون کشـت تازه و لیوفیلیزه) تحت تأثیر دزهای مختلف پرتو گاما.(*) حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

۱[a] -کشت تازه باکتری								
دز پرتوتابی (KGy)	۰	۱	۱/۵	۲	۲/۵	۳	۳/۵	۴
تکرار ۱	$۱/۱\times ۱۰^{۱۰}$	$۱/۸\times ۱۰^{۹}$	$۱/۲۳\times ۱۰^{۸}$	۷×۱۰^{۶}	$۲/۷۳\times ۱۰^{۴}$	$۲/۵\times ۱۰^{۳}$	۰	۰
تکرار ۲	$۲/۱\times ۱۰^{۱۰}$	$۰/۸\times ۱۰^{۹}$	$۱/۱۳\times ۱۰^{۸}$	۹×۱۰^{۶}	$۲/۴۸\times ۱۰^{۴}$	$۳/۱\times ۱۰^{۳}$	۰	۰
تکرار ۳	$۱/۵\times ۱۰^{۱۰}$	$۰/۷\times ۱۰^{۹}$	$۰/۷۳\times ۱۰^{۸}$	$۹/۵\times ۱۰^{۶}$	$۲/۳۸\times ۱۰^{۴}$	$۲/۸\times ۱۰^{۳}$	۰	۰
میانگین	$۱/۵\times ۱۰^{۱۰}$	$۱/۱\times ۱۰^{۹}$	$۱/۰۳\times ۱۰^{۸}$	$۸/۵\times ۱۰^{۶}$	$۲/۵۳\times ۱۰^{۴}$	$۲/۸\times ۱۰^{۳}$	۰	۰
SD±log cfu	$۱۰/۱۵ \pm ۰/۱۴^{*g}$	$۹ \pm ۰/۲۲^{f}$	$۷/۹۹ \pm ۰/۱۲^{e}$	$۶/۹۲ \pm ۰/۰۷^{d}$	$۴/۳۹ \pm ۰/۰۳^{c}$	$۳/۴۴ \pm ۰/۰۴^{b}$	۰[a]	۰[a]
۱[b]-باکتری لیوفیلیزه								
دز پرتوتابی (KGy)	۰	۲	۴	۷	۸			
تکرار ۱	$۱/۱\times ۱۰^{۱۰}$	$۲/۸۴۶\times ۱۰^{۸}$	$۶/۲۳\times ۱۰^{۶}$	۰	۰			
تکرار ۲	$۱/۱\times ۱۰^{۱۰}$	$۲/۶۸۳\times ۱۰^{۸}$	$۵/۱۳\times ۱۰^{۶}$	۰	۰			
تکرار ۳	$۲/۴\times ۱۰^{۱۰}$	$۳/۰۳۹\times ۱۰^{۸}$	$۷/۲۲\times ۱۰^{۶}$	۰	۰			
میانگین	$۱/۵\times ۱۰^{۱۰}$	$۲/۸۲\times ۱۰^{۸}$	$۱/۸۵\times ۱۰^{۷}$	۰	۰			
SD±log cfu	$۱۰/۱۵ \pm ۰/۱۹^{*d}$	$۸/۴۵ \pm ۰/۰۲^{c}$	$۶/۷۸ \pm ۰/۰۷^{b}$	۰[a]	۰[a]			

$۱/۵\times ۱۰^{۱۰}$ در ۱mL دز پرتو گاما مورد نیاز برای غیرفعال سازی کامل باکتری به صورت کشت تازه در این بررسی برابر با ۳/۰۵ و در حالت لیوفیلیزه KGY ۹/۹۷ محاسبه گردید (۷).

بحث

نتایج به‌دسـت آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که به ترتیب دزهای KGY ۴ و ۱۰ پرتـو گامـا به عنـوان حداقل دز مطلوب بـرای غیرفعال سازی باکتری ویبریو پارا‌همولیتیکوس با رقت $۱/۵\times ۱۰^{۱۰}$ به صورت کشت تازه و لیوفیلیزه و در نهایت تولید آنتی ژن‌های سـلول کامل غیرفعال شده (رادیوآنتی ژن) مناسب شناخته شده است. در این زمینه مطالعات محدودی موجود می‌باشد. از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه انجام شده توسط Abdallah و همکاران در سـال ۲۰۰۹ اشـاره نمود کـه از پرتوی گاما با دز KGY ۰/۵ به منظور غیرفعال سـازی ویبریو پارا‌همولیتیکوس و ویبریو آلجینولیتیکوس به منظور اسـتریل نمودن مواد غذایی استفاده شده است. همچنین آنها متوجه شدند که پرتو گاما موجب ایجاد تغییر در پروتئین‌های دیواره خارجی باکتری‌های پرتودیده می‌گردد (۲). Song و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز به مقایسـه اثر پرتوی گاما و بیم الکترون برای اسـترلیزه کردن نوعی صدف دوکفه‌ای در سـه حالت نمک شـور، تخمیری و همراه ادویه پرداخته و متوجه کاهش رشد لیستریا منوسیتوژنز و استافیلو کو کوس آئوس و ویبریـو پارا‌همولیتیکوس با گذرانـدن دوره ۴ هفته‌ای در دمای $۴\ ^{o}C$ با دز KGY ۵ گردیدند و براساس میزان محاسبه شده $D_{۱۰}$ Value متوجه نافذتر بودن اثر پرتوی گاما نسبت به بیم الکترون گردیدند (۱۳).

علل متعددی برای تفسـیر نتیجه به‌دست آمده قابل تصور است که از آن جمله می‌توان به تأثیر فاکتورهایی مانند وجود و یا عدم وجود اکسیژن،

خشک و یا مرطوب بودن نمونه و غلظت باکتری مورد پرتودهی قرار گرفته اشاره نمود. اگر چه روش لیوفیلیزه نمودن یک روش مناسب برای نگهداری میکروارگانیسم‌ها با استفاده از انجماد و خشک کردن در خلاء می‌باشد، اما در این روش به علت وجود شـرایط خشـکی و عدم وجود اکسیژن مقاومت باکتری در برابر پرتودهی افزایش می‌یابد. این مسئله با گزارش‌های موجود برخی از محققین هم خوانی دارد. به طوری که در مطالعه انجام شده توسط Nedugova و همکاران در سـال ۱۹۸۴ نشـان دادند که انتروتوکسـین باکتـری ویبریو کلر\در حالت مایع با دز KGY۵۰-۷۰ و در حالت خشـک بـا دز KGY۱۵۰-۲۰۰ پرتو گاما کاملاً غیرفعـال می‌گردد. نتیجه مطالعه مذکور بیانگر این موضوع می‌باشد که انتروتوکسین باکتری در حالت خشک (لیوفیلیزه) نسـبت به حالت مایع از مقاومت بالاتری برخوردار می‌باشد (۹). در مطالعه حاضر نیـز می‌توان یکی از علت‌های افزایش دز پرتودهی برای غیرفعال سـازی باکتری ویبریو را خشک بودن باکتری در حالت لیوفیلیزه نسـبت به کشت تازه ذکر نمود. در بررسی انجام شـده توسط Vassilia و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی نمونه گوشت خوک آلوده شده با رقت‌های ۳۱۰g/cfu و ۶۱۰ باکتری سـالمونلا \ینتریتیدیس در بسته بندی با شرایط خـلاء به ترتیب دزهـای KGY ۲/۵ و ۴/۷ به عنـوان حداقل دز غیرفعال سازی پس از یک ماه نگهداری در دمای $4\,^{o}C$ بدون ایجاد هیچ گونه تغییر ارگانولپتیکی و بیوشیمیایی در گوشت شناخته شد (۱۴). در حالیکه Gumus و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثر پرتو گاما را بر گوشت گوساله فرآوری و آلوده شده به سه سوش باکتری \استافیلو کو کوس \آئوس، سالمونلا تیفوموریوم و \شرشیا\کلای با رقت ۶۱۰g/cfu بررسی و گزارش نمودند که دز KGY ۴/۵ بدون نگهداری گوشت در دمای $4\pm1\,^{o}C$ سه سوش مذکور را کاملاً از بین می‌برد (۵). بنابراین برخی از فاکتورهای دیگر مانند رقت باکتری نیز در تعیین حداقل دز غیرفعال سازی تأثیر بسزایی دارد.

قابل توجه اسـت که کاربرد مواد شیمیایی مختلف به منظور غیرفعال سازی باکتری‌ها بسیار متداول است. اما از آنجایی که در استفاده از این مواد به جا ماندن باقیمانده در محصول نهایی و بعضاً مقاومت برخی پاتوژن‌ها در برابـر ماده غیرفعال کننده وجود دارد و همچنین سـمی بودن برخی از آنها موجب شد که محققین به دنبال روش‌های مطمئن تری باشند (۱،۱۱). لذا امروزه توجه به کاربرد روش‌های هسته‌ای (پرتوهای یونساز) برای غیرفعال سـازی ارگانیسم‌ها و در نهایت تولید واکسن‌های غیرفعال به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته اسـت. پرتوهای یونسـاز دارای انـرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشـندگی شـدید می‌باشند اما در هیچ شرایطی در محصول نهایی باقیمانده‌ای به جا نمی گذارند. همچنین امکان فرار ارگانیسم‌ها نیز در استفاده از این روش منفی می‌باشد (۱،۱۱). تنها اشکال استفاده از این روش اثر پرتوهای یون ساز از جمله پرتو گاما بر مولکول‌های آب موجود در محیط نگهدارنده ارگانیسـم می‌باشـد. اثر پرتو بر مولکول‌هـای آب موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد. بنابراین بهتر آن اسـت که برای حفظ خاصیت آنتی ژنسیتی ارگانیسم را به صورت پودر لیوفیلیزه و یا منجمد به کار برد. که با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه می‌توان بیان داشـت که دز غیرفعال سازی باکتری ویبریو پار\هموليتيكوس در حالت لیوفیلیزه نسبت به کشت تـازه باکتری افزایش یافته و حداقل دز غیرفعال سـازی باکتری با غلظت $1/5\times10^{10}$ عدد باکتری در میلی لیتر با پرتو گاما در حالت لیوفیلیزه ۱۰ و به صورت کشت تازه KGY ۴ می‌باشد. که با توجه به موارد فوق الذکر علیرغم مدت طولانی تر غیرفعال سازی باکتری، روش لیوفیلیزه بهتر از روش کشت تازه به منظور تهیه رادیوآنتی ژن باکتری می‌باشد. مطالعات آتی نیز به منظور ارزیابی مقایسه‌ای تأثیر این رادیوآنتی ژن‌ها و مقایسه آنها با آنتی ژن‌های غیرفعال شده به کمک روش‌های شیمیایی در حال انجام می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشـی دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه تهران و معاونت تحقیقات پژوهشی سـازمان انرژی اتمی انجام گرفته است.

References

1. Motamedi-sede, F., Khorasani, A.(2007) Production of Fuot and Mouth Disege Radio- Vacine Via Inactivation of Food and Mouth Virus. Report of Institute of Agricultural, Medical and Industral, Karaj, Iran. p.27.
2. Abdallah, F. B., Bakhrouf, A., Ayed, A., Kallel, H. (2009) Alterations of outer membrane proteins and virulence genes expression in gamma-irradiated *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*. Foodborne Pathog Dis. 10: 1171-1176.
3. Akhondzadeh Basti, A., Ebrahimzadeh Mousavi, H. A., Misaghi, A., Soltani, M., Esmaeili, H. (2007) The study of *Vibrio* SPP. in cultivated (*Paeneus indicus*) and marine (*Paeneus semisulcatus*) shrimp obtained from boushehr a southern province of Iran. J Vet Res (University of Tehran). 62: 307-310.
4. Chen, D., Hanna, P. J. (1994) Immunodetection of specific Vibrio bacteria attaching to tissues of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org. 20: 159-162.
5. Gomez, R., Takano, M., Sinskey, J. (1973) Characteristics of freeze-dried cells. Crtobiology. 19: 368-374.

6. Gumus, T., Demirci, A.S., Velioglu, H.M., Velioglu, S.D., Yilmaz, I., Sagdic, O. (2008) Application of gamma irradiation for inactivation of three pathogenic bacteria inoculated into meatballs. Radiat Phys Chem. 77: 1093- 1096.
7. 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.
8. Nashi, G., Nithimathachoke, C., Tungmadi, C., Arkariamoran, A., Prathanpipat, P., Ruamthaveesub, P. (1992) Vibrios and its Control in Pond Reared *Penaeus monodon* Diseases in Asian Aquaculture, Asian Fisheries Society. Kuala Lumpur, Malasia.
9. Nedugova, G.I., Rubtsov, I.V., Samoilenko, I.I. (1984) Effect of gamma radiation on the immunobiological and immunochemical properties of cholera exotoxin. I. Change in the biological activity of nonpurified cholera exotoxin as affected by ionizing radiation. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 2: 47-51.
10. Ruangpan, L., Kitao, T. (1991) Vibrio bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* fabricius. J Fish Dis. 14: 383-388.
11. Sharifi-Yazdi, M.K., Darghahi, H. (2006) Inactivation of pathogenic bacteria using pulsed UV light and its application in water disinfecion and quality control. Acta Med Iranica. 44: 305-308.
12. Soltani, M., Koholaki, s.h., Kiasumi, M. (2000) Isolation and identification of dominant *Vibrio specie*s in farmed prawn of Iran. J Vet Res (University of Tehran). 55: 32-36.
13. Song, H.P., Kima, B., Jung, S., Choe, J.H., Yun, H., Kim, Y.J., Jo, C. (2009) Effect of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into salted, seasoned, and fermented oyster. Food Sci Technol. 42: 1320-1324.
14. Vassilia, S., Spyros, K., Anthimia, B., Fotis, M., Konstantinos, S. (2009) Effects of gamma radiation on microbiological status, fatty acid composition, and color of vacuum-packaged cold-stored fresh pork meat. J Food Prot. 8: 556-563.

Optimum dose of gamma irradiation to inactivate *Vibrio paraheamolyticus* in fresh and freeze-dried

Heidarieh, M.[1], Soltani, M.[1*], Motamedi sedeh,F.[2], Rajabifar, S.[2], Ahmadi, M.R.[1], Shahhoseini, G.R.[2]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Agricultural, Medical and Industrial Research Institute (AMIRS-NSTRI), Karaj-Iran*

(Received 14 January 2015, Accepted 17 March 2015)

Abstract:

BACKGROUND: *Vibrio paraheamoloyticus* is one the causative agents of vibriosis with high mortality in farmed fish and shrimp and under predisposing conditions. **OBJECTIVES:** This study was aimed to assess the effect of gamma irradiation on the inactivation of *V. paraheamoloyticus* under fresh and freeze-dried conditions. **METHODS:** Vials of 0.5 ml fresh culture of the bacterial suspensions at $1.5*10^{10}$ cfu/ml were subjected to 1, 1.5,2, 2.5, 3 and 4 KGy. Also, vials of 0.5 ml freeze-dried culture of the bacterial suspensions at 1.5 x 1010 cfu/ml were subjected to 2, 4, 7 and 8 KGy. The bacterial growth behavior was then evaluated on fresh medium. **RESULTS:** The obtained results showed that the minimum doses of 4 and 10 KGy were sufficient for the inactivation of fresh and freeze-dried bacteria, respectively. **CONCLUSIONS:** The result of this study shows that inactivation of *V. paraheamolyicus* in fresh culture condition requires below half- dosage of gamma ray required for the inactivation of the freeze- dried of bacterial cells.

Keyword: gamma ray, shrimp, *Vibrio paraheamolyticus*, vibriosis

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Growth behaviour of *Vibrio parahaemolyticus* fresh culture exposed to different dosages of gama radiation.

Graph 2. Growth behaviour of lyophilized *Vibrio parahaemolyticus* exposed to different dosages of gama radiation.

Table 1. Growth behaviour of *Vibrio parahaemolyticus* fresh culture exposed to different dosages of gama radiation. (*) Different letters showing significant different of $p<0.05$.

***Corresponding author's email: msoltani@ut.ac.ir, Tel: 021-61117094, Fax: 021-66933222**