دراسة تاثير الحرارة والتبريد على جراثيم *Listeria monocytogenes* في الحليب

غازي موسى الخطيب ،محمد جويد علوان ونغم محمد الجبوري
وحدة الامراض المشتركة / كلية الطب البيطري /جامعة بغداد

الخلاصة

من اجل معرفة تاثير الحرارة على حيوية جرثومة *L.monocytogenes* في الحليب الملوث ،تم اذابة 40غم من مسحوق الحليب التجاري في 400مل من الماء بعد غليانه وتبريده ثم وزع محلول الحليب بالتساوي في 40 انبوبة اختبار معقمة سعة الواحدة 10مل.

اضيف لكل انبوبة 0.5مل من العلق الجرثومي الذي يحتوي على $10^9 \times 1$cfu جراثيم *L.monocytogenes* وحضنت جميع الانابيب الملوثة بدرجة 37م° لمدة 24ساعة . قسمت الانابيب بعد ذلك الى 6مجاميع احتوت الاولى والثانية على 10انابيب لكل مجموعة ,احتوت كل مجموعة من المجاميع الباقية على 5 انابيب غطست المجموعة الاولى في حمام مائي درجته الحرارية ثابته على 63م°لمدة 30دقيقة وغطست نماذج المجموعة الثانية في حمام مائي درجته الحرارية ثابته على 72م°ولفترات زمنية مختلفة امتدت من 1-5.5 دقيقة وكذلك غطست نماذج المجموعتين الثالثة والرابعة في حمام مائي بدرجة حرارية ثابته على 72م° ولفترة 6دقائق وتم اجراء الزرع الجرثومي من جميع نماذج الحليب الملوث مباشرة بعد التعامل الحراري وذلك باستخدام وسط اكار الدم ،حفظت نماذج المجموعة الاولى في الثلاجة وبدرجة حرارة4م° لفترة من 1-2 يوما وحفظت نماذج المجموعتين الثالثة والخامسة بدرجة حرارة 4م ونماذج المجموعتين الرابعة والسادسة في المجمدة وبدرجة حرارة – 18م لفترات 1,2,3,7.12 يوما وتم اجراء الزرع الجرثومي لجميع نماذج الدراسة بعد الفترات الزمنية المثبتة لكل مجموعة بعد التعامل الحراري او الحفظ بالتبريد وباستخدام وسط اكارالدم وحضنها بدرجة حرارة 37م مدة 24ساعة.

بينت النتائج بان جراثيم *Listeria monoctogenes* لم تعزل من اي نموذج حليب بعد تعرضها الى درجة 63م لمدة 30دقيقة بعد التعامل الحراري مباشرة الا انها عزلت من (3)نماذج حليب في اليوم الثاني من حفظ تلك النماذج بدرجة حرارة 4م , كذلك لوحظ وجود زرع جرثوميفي جميع نماذج المجموعة الثانية بعد تعرضها لدرجة حرارة 72م ولفترات زمنة من 1-5.5 دقيقة بينما لوحظ عدم وجود زرع جرثومي من نماذج المجموعتين الثالثة والرابعة بعد التعامل الحراري مباشرة وظهور نمو جراثيم *Listeria monoctogenes* ابتدءا من اليوم الاول والثاني في بعض نماذج المجموعة

الثالثة بعد حفظها بدرجة حرارة 4م وفي اليوم الثالث لنماذج المجموعة الرابعة بعد حفظها بدرجة – 18م كذلك لوحظ بان جراثيم *L.monocytogene*s عزلت من نماذج المجموعة الخامسة والسادسة بعد فترات مختلفة من حفظها بدرجة حرارة 4م و – 18م على التوالي. نستنتج من هذه الدراسة بان جرثومة *L.monocytogenes* تقاوم درجات الحرارة 63م و72 م و – 18م .

The Effect of Heat& Cold on The L.monocytogenes in the Milk

Ghazi M. Al-Khatib,Mohammed J.Alwan and Nagham M. Al-Jebouri
Zoonoses diseases Unit-College of VET.MED.-Baghdad University

SUMMARY

The influence of heat and cold on the *L.monocytogenes* in the milk
In order to know the thermal resistance of *L.monocytogenes*in the contaminated milk, 40gram of powder milk was dissolved in 400ml of heated water.The milk solution was sealed in 40 test tubes 10 ml in each one.these test tubes were divided into 6 groups ,10test tubes in each the 1^{st},2^{nd} group &5 test tubes in each the 3^{rd} ,4^{th} ,5^{th} ,6^{th} groups,then all the test tubes were inoculated with *L.monocytogenes* &incubation for 24hrs at 37c.the samples of the 1^{st} &2^{nd} group were dipped in awater bath at tempreture 63c for 30minute &72c for 1-5.5 minute respectively .also the samples of 3^{rd} &4^{th} groups were dipped in awater bath at 72c for 6minute. Test tubes of 1^{st} ,3^{rd} ,5^{th} groups were kept in 4c for variable times while samples of 4^{th} ,6^{th} group were exposured to - 18c for 12days. The results showed no bacterial isolates immediately after heat treatment in all the milk samples of 1^{st} .3^{rd} &4^{th} groups but some isolates were seen after enrichment at 4c&- 18c *L.monocytogenes* was isolate from all samples of 2^{nd} ,5^{th} &6^{th} groups. The results suugest that cold enrichment play role in repair the thermally injured cells of *L.monocytogenes*&these organisms surviveve thermal treatment.

المقدمة

تعد جرثومة *L.monocytogenes* من الجراثيم المهمة مرضيا وتسبب مرض Listeriosis الذي يعد من الامراض الغذائية المهمة(1). وان هذا المرض اخذ بالانتشار على شكل حالات منفردة او بشكل اوبئة بسبب انتشار الجرثومة في الطبيعة او بسبب التبادل التجاري للسلع الغذائية المصنعة وعمليات التخزين (2)حيث ان هذه الجرثومة لها القابلية على مقاومة عمليات تصنيع الاغذية والعيش والتكاثر في درجات الحرارة الواطئة (3) وان هنالك العديد من الاغذية المصنعة يتم تناولها بدون عمليات الطهي او التسخين مثل الاجبان والصوصج والحليب (4) وكذلك فان المجترات تصاب بهذه الجرثومة نتيجة تناولها الاغذية التي تعيش وتتكاثر بها جراثيم*L.monocytogenes* مثل Spoiled silage مما يؤدي الى حدوث الاوبئة في قطعان المجترات(5).

لذا تعد جرثومة *L.monocytogene*s احد المشاكل التي تواجهاا لصناعات الغذائية في العالم حيث اوضح (6)بان هذه الجراثيم عزلت من جميع انواع الاغذية المصنعة وفي كل مرحلة من مراحل الانتاج وتقاوم كل الظروف الطبيعية وتستطيع العيش في الغذاء لفترة طويلة.

ان مصادر تلوث الحليب اما ان تكون من الحيوانات المصابة بجراثيم *L.monocytogene*s او ملوثات بيئية كفضلات الابقار واعلاف الحيوانات والتربة وان الاجراءات السليمة للتخلص من تلوث الحليب هي عملية البسترة الا ان جرثومة*L.monocytogenes* لها القابلية على مقاومة درجة حرارة البسترة مما يجعل هذه الطريقة غير كفؤة لحماية الحليب من التلوث بها(7). لقد سجل (8) في امريكا 49حالة اصابة بمرض Listeriosis وكان مصدر الاصابة الحليب المبستر ,وفي كالفورنيا سجلت 86حالة اصابة بهذه الجرثومة خلال النصف الاول من عام 1985 توفي منهم 29 حالة وذلك بسبب تناول الجبن المصنع من الحليب الخام غير المبستر بصورة جيدة(9).

هنالك بعض الدراسات اشارت الى ان درجات الحرارة الواطئة تساعد على اصلاح خلية جرثومة *L.monocytogenes*بعد تعرضها الى درجات حرارية مختلفة (10) . ان هدف الدراسة الحالية هو معرفة تأثير الحرارة والتبريد على وجود جراثيم *L.monocytogene*s في الحليب.

المواد وطرائق العمل

العزلة الجرثومة

تم الحصول على جرثومة *L.monocytogenes* من وحدة الامراض المشتركة في كلية الطب البيطري وتم التاكد من خواصها الكيموحيوية حسب طريقة (11).

تحضير العزلة

زرعت العزلة على وسط مرق التربتكيز صويا (Trypticase soy broth) حيث حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المنتجة وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24ساعة وبعد ذلك تم عد الخلايا الحية المكونة للمستعمرات الجرثومية في الملتر الواحد وحسب طريقة (12) وكان العد الجرثومي 1×10^{9} cfu.

تصميم التجربة

1- تم اذابة 40غم من مسحوق الحليب التجاري في 400مل من الماء بعد غليانه وتبريده ثم وزع محلول الحليب بالتساوي في 40 انبوبة اختبار معقمة بالتساوي بمعدل 8مل لكل انبوبة.
2- اضيف لكل انبوبة اختبار 0.5 مل من العالق الجرثومي لجرثومة *L.monocytogenes* وحظنت جميع الانابيب الملوثة بدرجة حرارة 37م لمدة 24ساعة.
3- قسمت الانابيب بصورة عشوائية الى 6 مجاميع احتوت الاولى والثانية على 10 انابيب لكل منها وشملت المجاميع الثالثة والربعة والخامسة والسادسة على 5 انابيب لكل منها ,غطست المجموعة لاولى في حمام مائي بدرجةحرارة 63م لمدة 30 دقيقة وغطست نماذج المجموعة الثانية في حمام مائي ذي درجة حرارية ثابته على 72م لفترة من 1-5.5 دقيقة وكذلك غطست نماذج المجموعتين الثالثة والرابعة في حمام مائي بدرجة حرارية ثابته على 72م لفترة 6دقيقة .

تم اجراء الزرع الجرثومي من جميع المجاميع بعد التعامل الحرلري على وسط اكار الدم وبعد ذلك حفظت نماذج المجموعة الاولى بدرجة حرارة 4م في الثلاجة لمدة من يوم الى يومين وحفظت نماذج المجموعتين الثالثة والخامسة بدرجة حرارة 4م ونماذج المجموعتين الرابعةوالسادسة بدرجة حرارية – 18م لفترات (1,2,3,7,12) يوما بعد ذلك تم اجراء الزرع الجرثومي لجميع النماذج بعد فترات الحفظ سواء بالتبريد او التجميد وعلى نفس الوسط الزرعي والطريقة التي ذكرت اعلاه.

النتائج

اوضحت النتائج بان جراثيم *L.monocytogenes* لم تعزل من اي نموذج حليب بعد تعرضها الى درجة حرارة 63م لمدة 30دقيقة بعد التعامل الحراري مباشرة الانها عزلت من 3نماذج من الحليب في اليوم الثاني من حفظ تلك العينات بدرجة حرارية 4م (جدول:1) لوحظ وجود نمو جرثومي من جميع العينات التي تعرضت لدرجة حرارة 72م ولفترات من 1– 5.5 دقيقة كما يبين (جدول:2).

يبين(جدول:3) عدم وجود نمو لجراثيم *L.monocytogenes*من نماذج المجموعتين الثالثة والرابعة بعد التعامل الحراري مباشرة وظهور النمو الجرثومي بعد اليوم الاول والثاني من بعض نماذج المجموعة الثالثة ومن اليوم الثالث لبعض نماذج المجموعة الرابعة بعد حفظ نماذج هذه المجموعة بدرجة حرارة 4 و– 18 م على التوالى وكذلك ان جراثيم *L.monocytogenes* عزلت من جميع نماذج المجموعتين الخامسة والسادسة بعد فترات مختلفة من حفظها بدرجة حرارة 4 و– 18 م على التوالي .

جدول(1) فحص وجود عزلات جرثومة *L.monocytogenes*في عينات الحليب الملوث بعد معاملتها بدرجة 63م وحفظها بدرجة حرارة 4م لفترة يومين.

رقم النموذج	قبل التعامل الحراري	بعد التعامل الحراري مباشرة	الايام بعد الحفظ بدرجة حرارة 4م	
			1	2
1	+	–	–	+
2	+	–	–	–
3	+	–	–	–
4	+	–	–	+
5	+	–	–	–
6	+	–	–	–
7	+	–	–	+
8	+	–	–	–
9	+	–	–	–
10	+	–	–	–

+يوجد نمو

–لايوجد نمو

جدول (2): تاثير درجة حرارة 72م على نمو جراثيم *L.monocytogenes* ولفترات زمنية مختلفة

رقم النموذج	النمو الجرثومي قبل التعامل الحراري	الفترة/ دقيقة	النمو الجرثومي بعد المعاملة
1	+	1	+
2	+	1.5	+
3	+	2	+
4	+	2.5	+
5	+	3	+
6	+	3.5	+
7	+	4	+
8	+	4.5	+
9	+	5	+
10	+	5.5	+

+يوجد نمو

جدول(3) : يوضح نمو جراثيم *L.monocytogenes* بعد معاملة نماذج الحليب في درجة حرارة 72م لمدة 6دقائق وحفظها بدرجة 4و- 18م ولفترات زمنية مختلفة

درجةحرارة الحفظ	رقم النموذج	النموقبل التعامل الحراري	النموبعدالتعامل الحراري	الحفظ بالايام				
				1	2	3	7	12
4م	1	+	–					
	2	+	–	–	–	–	–	–
	3	+	–	+	+	+	+	+
	4	+	–	–	+	+	+	+
	5	+	–	–	–	–	–	–
18- م	1	+	–	–	–	+	+	+
	2	+	–	–	–	–	–	–
	3	+	–	–	–	–	–	–
	4	+	–	–	–	–	–	–
	5	+	–	–	–	–	–	–

+يوجد نمو

– لايوجد نمو

جدول(4): يبين العزلات الجرثومية من نماذج الحليب الملوث بجراثيم *L.monocytogenes*بعد فترات مختلفة من حفظها بدرجة حرارة 4و- 18 م

درجةحرارة الحفظ	رقم النموذج	الحفظ بالايام				
		1	2	3	7	12
4م	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
18 - م	1	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+

+يوجد نمو

المناقشة

بينت الدراسة الحالية بان معاملة نماذج الحليب الملوثة بجراثيم*L.monocytogenes*بدرجة حرارة 63م ولفترة 30دقيقة لم تؤدي الى قتل جميع الجراثيم حيث ان هذه الجراثيمظهرت للنمو من جديد في 3نماذج من الحليب المعالج بالحرارة في اليوم الثاني من حفظها بدرجة حرارة 4م وتوافقت هذه النتيجة مع ما ذكر من قبل (13) حيث عزل جراثيم *L.monocytogenes*من 46.6%من نماذج الحليب الملوثة بهذه الجراثيم بعد تعرضها الى درجة حرارة 69م وحفظ تلك العينات بدرجة حرارة 4م لفترات مختلفة وفسر هذه النتيجة بان هنالك اعداد قليلة من الجراثيم تقاوم الحرارةاو ان حفظ هذه الجراثيم بدرجة حرارة 4م يساعد على اعادة اصلاح الخلايا الجرثومية المحطمة بالحرارة ,كما تمكن (14) من عزل جراثيم *L.monocytogenes*من الجبن المصنوع من الحليب المبستر بعد 48 ساعة من خزن الجبن بدرجة حرارة 3م بالرغم من تعرض الجبن خلال احدى مراحل التصنيع لدرجة حرارة 57.2 م لفترة 30دقيقة .اوضحت النتائج ايضا بان جراثيم*L.monocytogenes* تقاوم حرارة 72 ولفترة 1- 5.5 دقيقة ان هذه النتيجة مغايرة لنتائج (15) التي اشارت الى ان جراثيم *L.monocytogenes* تعيش في الحليب بعد معاملته بدرجة حرارة 71.7م لفترة 15 ثانية فقط وكذلك لما اشارالية(16) من ان جراثيم *L.monocytogenes*

تقاوم درجات الحرارة 52و 68م لفترات زمنية متفاوته الاانها لا تستطيع مقاومة درجة حرارة 73م لفترة 15 ثانية. لقد تمكن (17) من عزل جراثيم *L.monocytogenes*من الحليب المبستر مما يشير الى قابلية هذه الجراثيم على مقاومة البسترة والتكاثر في الحليب المبستر وبين كذلك (18) بان جراثيم *L.monocytogenes*تستطيع العيش في الحليب المعقم بعد تلوثه بهذه الجراثيم ومعاملته بدرجات حرارية 72و 82و 92م لفترة 10دقائق.

اشارت نتائج الدراسة ايضا الى ان معاملة نماذج الحليب الملوثة بجراثيم *L.monocytogenes*بدرجة حرارة 72م ولفترة 6دقيقة لاتجعل الحليب خاليا من هذه الجراثيم حيث لوحظ اعادة نموها في بعض النماذج ابتداءا من اليوم الاول او الثاني من حفظها بدرجة حرارة 4م وكذلك في اليوم الثالث من حفظها بدرجة – 18م وهذه النتيجة تدعم الاعتقاد بان للتبريد دور في اعادة اصلاح خلية جرثومة *L.monocytogenes*من بعد تحطمها بالحرارة.

لقد لاحظ (19) ان تشعيع لحوم الدواجن الملوثة بجراثيم *L.monocytogenes* باستخدام اشعة كاما kGy2.5 اظهر كفاءة عالية في منع نمو هذه الجراثيم عند حفظ اللحوم بدرجة حرارة 4م لفترة 7ايام ولكن بعد تلك الفترة من الخزن بدأ عزل الجرثومة من اللحوم المخزونه مع زيادة العد الجرثومي في الايام اللاحقة من الخزن واستنتجا بان خلايا جراثيم *L.monocytogenes*منالمحطمة تصلح نفسها بدرجة حرارة 4م ,لقد بينت الدراسة الحالية عدم تاثر جراثيم *L.monocytoge*nesمنفي الحليب الملوث بها عند حفظه بدرجة حرارة 4و– 18 م ولفترة 12يوما.

ان نتائج الدراسة الحاليةتقاربت من واختلفت مع العديد من الدراسات السابقة التي تطرقت الى تاثير الحرارة على *جراثيم*L.monocytogenes وان تلك الدراسات السابقة ايضا اختلفت فيما بينها ولربما يرجع السبب الى الاختلاف في طرق ووسائل التسخين والعتر الجرثومية المستخدمة وطريقة الفحص الجرثومي من نماذج الحليب المعامل بالحرارة وكذلك الطرق المستخدمة للكشف عن هذه الجراثيم بعد التعامل الحراري (20) .

نستنتج من هذه الدراسة بان جراثيم *L.monocytogenes* يمكن ان تقاوم عملية البسترة وان درجات الحرارة الوطئة لربما تساعد على اعادة اصلاح خلايا الجرثومة المحطمة بالحرارة وبالتالي يمكن ان تتكاثر في الحليب المبستر بعد حفظه في الثلاجة ويكون الحليب مصدرا للاصابة.

المصادر

1-Schlech WF.Foodborn Listeriosis.Clin.Infect.Dis.2001;31:770-775.

2- Schlech WF.Epidemilogy &clinical manifestation of *L.monocytogenes* infection in:Gram-positive pathogens.(ed).Fischetti,V.A.and *et al* Ammerican society for Microbiology ,Washington,D.C.2000:pp:473-479.

3-Rocourt J,Jacquet CH.&Bille J. Humen Listeriosis,1991-1992. WHO/FUN/FOS/97.1.1997;World Health Organization ,Geneva,Switzerland
4-Farber JM.and Peterkin P.*L.monocytogenes*,afod=borne pathogen. Microbiol. Rev. 1991;55:476-511.
5-Wesley IV. Listeriosis in animals.In E.T.Ryser and Marth EH.(ed)Listeria.Listeriosis and food safety.2nd ed. Marcel Dehher Inc.New york .N.Y.1999;pp:39-73.
6-Rocourt J,Jacquet CH.&Bille J.Foodborn Listeriosis.In:Document WHO /HPP / FOS .World Health Organization, Geneva.1997;pp:67-72.
7-Communical disease report 85/26.Public health laboratory service.Atlanta USA.1998.
8- Fleming DW,Cochi SL,MacDonald KL,and Reingold AL. Pasteurized milk as avehicle of infection in an outbreak o Listeriosis .N.Eng.J.Med.1985;312:404-407.
9- Lemaire O,Cerf O,and Audurier A.Heat resistance of *Listeria monoctogenes* .Acta Microbiol.Hunga.1989;36:281-284.
10- Farber JM,Hugher A,Holley R,and Brown B.Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in Sausage meat.Acta Microbiol. Hunga.1989;36: 273-275.
11-Ralovich B.Listeriosis research .present situation and perspective. Akadeimiai, Kiado, Budapest.1984.
12- Miles AA,Misra SS,and Irwin JO. The estimation of bactericidal power of blood .J.Hyg.1984;38:.732-749.
13-Fernandez SJ. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* .Acta .Microbiology Hung. 1989;36: 277-280.
14- Ryser ET.and Marth EH.Listeria. Listeriosis and food safety 2nd ed .Marcel Dekker Inc.New york .1999.
15- Bradshaw JG,Peeler JT,Corwin JJ ,and Twedt RM.J.food prodect.1985;48: 743.
16- Casadei MA, Esteves DE,Harrison ST,and GAZE je.Heat resistance of Listeria monocytogenes in diary products as affected by the growth medium .J. Appl.Microbiol. 1998;84:234-239.
17- Ahrabi SS,Erguven S.and Gunalp A.Detection of Listeria in raw and pasteurized milk. Cent.Eur.J. Public Health .1998;6:254-255.
18- Donnelly CW,and Briggs EH. New food- born pathogens of public health significance . J. food protect.1986;49: 944-946.
19- Gursel B,and Gurkan GC. Effect of gamma irradiation on the survival of *L.monocytogenes* and growth at refrigeration temperature in poultry and red meat .poultry Science .1997;76:601-1664.
20- Donkervoet J.In Gray ML.(ed):proceeding of the second symposim on Listeriosis. Montana state College, BOZEMAN.1962;PP: 133-139.