------ مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص64-69، 2006 ------

بعض الجوانب الفسلجية لجرثومة *Listeria monocytogenes* المعزولة من حالات مرضية مختلفة

ميادة احمد الطائي　　　　اميرة محمود الراوي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/3/20 ؛ تاريخ القبول 2005/8/15)

الملخص

تم اجراء عدد من الاختبارات لدراسة الخواص الفسلجية لعزلات جرثومة *L.monocytogenes* بواقع 22 عزلة من مسحات عنق رحمية ومشيمة لنساء لديهن حالات اجهاض وولادة مبكرة وعينات سائل النخاع الشوكي لحديثي الولادة مشكوك باصابتهم بالتهاب السحايا توزعت بين17 عزلة عنق رحمية و 3 عزلات مشيمية و 2 عزلة من سائل النخاع الشوكي حيث كانت جميع العزلات لها القابلية على النمو بوجود ملح الطعام بتركيز 6.5 % و 10 % كما نمت جميعها في حرارة 4°م و 37°م و45°م فضلاً عن ذلك اختبر تاثير وجود عدد من المركبات الكيمياوية على قابلية الجرثومة على النمو حيث لوحظ ان جميع العزلات كان لها القابلية على النمو بوجود تتريت البوتاسيوم بتركيز 0.1 % ونمت جميعها ايضاً بوجود أزايد الصوديوم بتركيز 0.02 و 0.05 % فيما لم تنمو جميعها بوجود سيانيد البوتاسيوم بتركيزي 3.75 و 5.0 % كذلك ظهر ان جميع العزلات كانت لها القابلية على النمو واختزال مركبي تيليورات البوتاسيوم والتترازوليوم بالتراكيز (0.1 و 0.5 %) و (0.01 و 0.1 %) للمادتين على التوالي .

Some Physiological Aspects of *Listeria monocytogenes* Isolated from Differint Clinical Cases

Mayyada A. Al-Taee　　　　**Amera M. Al-Rawi**
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The physiological aspects of the bacterium *Listeria monocytogenes* were studied on the isolates of the bacterium isolated from placental and cervical swabs collected from

women with abortions and preterm labours and from Cerebro-Spinal Fluid (CSF) of neonates suspectedly infected with meningitis.

The results revealed that all isolates have the ability to grow at different temperatures 4 , 37 and 45 °C and tolerate two different concentrations of salt 6.5 % and 10 % . The effect of different concentration of chemicals on its growth were also tested. The isolates showed ability to grow in 0.1 % KNO_2 , 0.02 , 0.05 % of sodium azide but failed to grow in (3.75 , 5.0 %) of KCN. As well as all isolates were able to grow and reduce potassium tellurite and tetrazolium chloride with concentrations 0.1 , 0.5 % and 0.01 , 0.1 % respectively.

المقدمة

تنتشر جراثيم *L.monocytogenes* بصورة واسعة في البيئات الريفية لذلك تعد من اهم ملوثات المواد الغذائية الخام المستخدمة في تصنيع الاغذية الجاهزة كالحليب ومشتقاته كما انها من ملوثات الفواكه والخضراوات الطازجة ، إذ تمتلك الجرثومة وسائل حماية جيدة تمكنها من مقاومة تقنيات حماية الغــذاء منها القابلية على تحمل تراكيز ملحية عالية ومستوى اس هيدروجيني عالٍ والاكثر من ذلك تستطيع البقاء والتكــاثر فــي درجــات حــرارة منخفــضة تــصل الــى 4 ْم (Marinsek and Grebenc, 2002; McLauchlin et al., 1990) .

حيث تستطيع هذه الجراثيم النمو بمدى حراري يتراوح مــابين 3-45 ْم بظــروف هوائيــة او لاهوائية اختيارية . قد تبقى هذه الكائنات على قيد الحياة بعد بسترة الحليب عند 61.7 ْم لمدة 35 دقيقــة لكنها تموت عند درجة حرارة 71.7 ْم لمدة 15 ثانية (منظمة الصحة العالمية، 1988) . تعد هذه الجراثيم مقاومة للملوحة Halotolerant لكنها غير مقاومة للحموضة حيث تستطيع النموعند أس هيدروجيني 9.6 ولاتستطيع النمو عند أس هيدروجيني أقــل مــن 6.0 (Vazquez – Boland et al., 200; Janda and Abbott, 1999) . تمتلك القابلية على النمو واختزال مادة Potassium Tellurite وتظهر مــستعمراتها سوداء على وسط Tryptose agar الحاوي على هذه المادة (Gray et al., 1948) . كما أنها تختزل مادة 2,3,5, triphenyl tetrazolium chloride وتنتج الـــ Formazan فتظهر مستعمراتها حمراء اللون عند نموها على الاوساط الحاوية على التترازوليوم (Feresu and Jones, 1988) .

ومن اجل لفت الانتباه لاهمية هذه الجرثومة لكونها من الجراثيم التي تنتقل عن طريق الغذاء فضلاً عــن عدم اعطائها الاهمية الكافية في دراستنا المحلية من جوانب عدة منها فسلجتها لذا جاءت هذه الدراسة كي تسلط الضوء على بعض الجوانب الفسلجية لها .

المواد وطرائق العمل

درست بعض الجوانب الفسلجية لـــ 22 عزلة لجرثومة *L.monocytogenes* المشخصة من قبل الباحثين ابراهيم والراوي (2005) . حيث اجريت الاختبارات المتضمنة قابلية العزلات على النمو فــي

درجات حرارية مختلفة تم تلقيح انابيب وسط الدم الاساس السائل (الخالي من الدم) Blood Base Broth بالمستعمرات الفتية وحضنت في درجات حرارة :

4 ْم لمدة تصل الى 21 يوماً حيث يتم فحص النمو يومياً .

37 ْم لمدة 24 ساعة .

45 ْم لمدة 7 أيام مع فحص النمو يومياً (Feresu and Jones, 1988).

ولاختبار تحمل عزلات الجرثومة للملوحة استخدم وسط المرق المغذي N.Broth والمضاف لـه كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 6.5 % و10 % لقـح كـل تركيـز بحملـة لـوب مـن مسـتعمرة *L.monocytogenes* وحضنت في درجة 37 ْم لمدة 24 – 48 ساعة . ثم لوحظ تحمل الجرثومة لهذين التركيزين من كلوريد الصوديوم (Feresu and Jones, 1988) .

كما تم اختبار قابلية الجرثومة على النمو بوجود بعض المركبات الكيمياوية فـي الوسـط مثـل KNO_2 , KCN, Sodium azide (Feresu and Jones, 1988) .

ولاختبار نموها بوجود ازايد الصوديوم تم تخطيط اطباق الوسط المتكونة من اكار الدم الاسـاس (الخالي من الدم) والمضاف له ازايد الصوديوم بتركيزين 0.02% و0.05% والمعقم بالموصدة، حضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م لمدة 24–48 ساعة ثم لوحظ النمو .

ولاختبار نموها في KCN لقحت اطباق اكار الدم الاساس الحاوي على KCN بتركيـزين 3.75 % و 5.0% وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 ْم لمدة 24–48 ساعة ثم لوحظ وجود النمو .

اما لاختبار النمو بوجود KNO_2 فقد أستخدم وسط الدم الاسـاس السـائل Blood Base Broth الحاوي على KNO_2 بتركيز 0.01% ولقح بالمستعمرة الفتية وحضنت في درجة حـرارة 37 م لمـدة 24–48 ساعة ثم لوحظت عكورة النمو .

ولاختبار قابلية العزلات على اختزال مادتي تيليورات البوتاسيوم و التترازوليوم لقحـت اطبـاق وسط اكار الدم الاساس Blood agar base الحاوي على مادة تيليورات البوتاسيوم بتركيز 0.1 % و 0.5 % بالمستعمرات الفتية للجرثومة ثم لوحظ نموها وإختزالها لهذه المادة بظهور مستعمراتها سوداء علـى الوسط بعد التحضين في درجة حرارة 37 ْم لمدة 24–48 ساعة كما لوحظ نمو الجرثومة واختزالها لمادة التترازوليوم بظهور مستعمراتها حمـراء علـى الوسـط الحـاوي عليهـا نتيجـة اختزالهـا وإنتـاج مركـب Formazan الاحمراللـون بعـد التحضـين بدرجـة 37 ْم لمـدة 24–48 سـاعة (Wilson et al., 1983 ; Feresu and Jones, 1988).

النتائج والمناقشة

اختبرت قابلية جراثيم *L.monocytogenes* على النمو بتراكيز ملحية مختلفة حيث اجري اختبـار نموها في تركيزين من NaCl كما ورد في المواد وطرائق العمل ولوحظ ان جميع عزلات الجرثومة لها القابلية على النمـو بتركيـز 6.5 % و 10 % مـن NaCl وتوضـح الصـورة (1) نمـو جرثومـة

L.monocytogenes بتركيز 10 % من NaCl وجاءت نتائجنا متفقة مع ما ذكره الباحث Cole وجماعته عام (1990) حول قدرة هذه الجرثومة على النمو في ظروف عالية الازموزية ، كما وان الباحث Koneman وجماعته عام (1997) اكدوا على قابلية جرثومة *L.monocytogenes* على النمو بوجود 6.5% من NaCl وعدت من الفحوصات التفريقية عن الجراثيم الاخرى.

وقد اشار الباحث Singleton عام (1997) الى قابلية جراثيم *L. monocytogenes* على النمو في تراكيز عالية من NaCl تصل الى 12 %.

الصورة 1 : نمو جرثومة *L. monocytogenes* بتركيز 10% من NaCl

تم التحري عن قدرة عزلات جرثومة *L. monocytogenes* على النمو في درجات حرارة مختلفة حيث لوحظ ان جميع العزلات كان لها القابلية على النمو في درجة حرارة 4 °م و 37 °م و 45 °م وهذه النتائج جاءت متفقة مع نتائج عدد من الباحثين منهم Koneman وجماعته عام (1997) الذين أكدوا ان النمو في درجة 4 °م يعد اختبارا تشخيصيا للجرثومة. وكذلك ذكر Collee وجماعته عام (1996) ان المدى الحراري للجرثومة يتراوح ما بين (2–43) °م.

كما اشار الباحثان Rosenow و Marth عام (1987) الى قابلية جرثومة *L. monocytogenes* على النمو في درجات حرارة متفاوتة تتدرج ما بين 4 °م الى 35 °م.

اختبرت قابلية الجرثومة على النمو بوجود بعض المركبات الكيمياوية مثل نتريت البوتاسيوم بتركيز 0.1 % وسيانيد البوتاسيوم بتركيزين 3.75 و 5.0 % وأزايد الصوديوم بتركيزين ايضا 0.02 و 0.05 % حسب ما جاء في المواد وطرائق العمل ولوحظ ان جميع العزلات كان لها القابلية على النمو بوجود نتريت البوتاسيوم ولم تستطيع عزلات الجرثومة النمو بوجود سيانيد البوتاسيوم بالتركيزين اعلاه لكون هذه المادة سامة ولكنها نمت بوجود أزايد الصوديوم بالتركيزين المختلفين وهذه النتائج جاءت متفقة

مع النتائج التي حصل عليها الباحثان Feresu و Jones عام (1988) مع وجود اختلاف في حالة عدم نمو الجرثومة في سيانيد البوتاسيوم فقد استخدما Potassium thiocyanate بـدلا مـن سـيانيد البوتاسـيوم واظهرت عزلات الجرثومة في دراستهم القدرة على النمو بوجود هذا المركب الكيمياوي.

ومن الجدير بالذكر ان جراثيم *L. monocytogenes* تمتلك القابلية على النمو بوجود العديـد مـن المركبات الكيمياوية ، إذ ذكر الباحث Schlyter وجماعته عام (1993) ان تركيز 30 ppm من نتريـت الصوديوم $NaNO_2$ لا يمكن ان يثبط نمو الجرثومة عند درجة حرارة 4 ^{o}م او حتى 25 ^{o}م فـي بعـض انواع منتجات اللحوم التركية ذات pH (6.2). اما الباحث Vignolo وجماعته عام (1998) فقد اشـاروا الى ان 800 ppm من النتريت يمكن ان يثبط نمو الجرثومة في منتجات لحم الخنزيـر، إلا ان النتريـت يمكن ان يثبط نمو الجرثومة في درجة حرارة الثلاجة بوجود بعض المثبطات الاخرى مثل ملح الطعام او Lactocin 705 وهذا ماذكره الباحثون (Vignolo et al., 1998; Fernandez et al., 1997) .

كما اظهرت جميع عزلات الجرثومة في دراستنا القابلية على النمو واختزال مركبـي تيليـورات البوتاسيوم PT والتترازوليوم TTC بالتراكيز (0.1 و0.5 %) و (0.01 و0.1 %) للمادتين على التوالي حيث اظهرت مستعمرات الجرثومة النامية على الوسط الحاوي على مادة PT بلون اسود لاختزالها لهـذه المادة وتكون معقداً اسوداً يترسب في الخلايا هو Metallic tellurium وهذا يوضح اضافة هـذه المـادة لمكونات وسط Tryptose agar لاستخدامه وسطاً اختيارياً لنمو جرثومة *L. monocytogenes* وهذا مـا أكده الباحثين (Feresu and Jones, 1988 ; Gray et al., 1950) .

فضلاً عن ذلك فان ظهور عزلات الجرثومة النامية على الوسط الحاوي على مـادة TTC بلـون احمر يؤكد اختزال الجرثومة لمادة التترازوليوم العديمة اللون وتحولها الى مركب Formazan ذي اللون الاحمر الذي يترسب في الخلية ويؤدي الى ظهور المستعمرات بلون احمر وهذا مطابق لما ذكره الباحثون (Feresu and Jones, 1988; Lennette et al., 1985) .

المصادر العربية

ابراهيم، ميادة احمـد و الـراوي، اميـرة محمـود، 2005. عـزل وتشـخيص جرثومـة *Listeria monocytogenes* من حالات سريرية مختلفة. مقبول للنشر في مجلة علوم الرافدين .

منظمة الصحة العالمية، 1988. داء اللستريا (*Listeriosis*) المنقول بالطعام . نشـرة منظمـة الصـحة العالمية. 66 : ص421-428.

المصادر الاجنبية

Cole, M., Jones, M. and Holyoak, C., 1990. The effect of pH, salt concentration, and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. 69: pp.63-72.

Collee, J.G., Franser, A.G., Marmion, B.P. and Sinmons A., 1996. Mackie and Maccartney Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill, Livingstone, London. pp.309-313.

Feresu, S.B. and Jones, D., 1988. Taxonomic studies on *Brochothrix, Erysipelothrix, Listeria* and a typical Lactobacilli. J.Gen. Microbiol. 134: pp.1165-1183 .

Fernandez, P.S., George, S.M., Sills, C.C. and Peck, M.W., 1997. Predictive model of the effect of Cp_2 , pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes* . Int. J. Food Microbiol. 37: pp.37-45 .

Gray , M.L. ; Stafseht , H.J. and a.Thorp , F. 1950. The use of potassium tellurite , sodium azide and acetic acid in a selective medium for the isolation of *Listeria monkcytogenes*. J. Bact. 59: pp.443-444.

Gray, M.L., Stafseht, H.J., Thorp, F. and Rily, W.F., 1948. A new technique for isolation of *Listerella* from bovine.J.Bact. 55 : pp.471-476 .

Janda, J.M and Aboott, S.L., 1999. Unusual food - borne Pathogens. *Listeria monocytogenes , Aeromonas , Plesiomonas* and *Edwardsiella* species. 19 : pp.553-582.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Winn, W.C., 1997. Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott–Raven publisher, Philadelphia, USA. pp.664-668, 1330.

Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. and ShaDomy, H.J., 1985. Manual of Clinical Microbiology. 4^{th} ed. . American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Marinsek, J. and Grebenc, S., 2002. *Listeria monocytogenes* in minced meat and thermally untreated meat products in Slovenia. Slov. Vet. Res. 39 : pp.131-136.

McLauchlin, J., Green wood, M.H. and Pini, P.N., 1990. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis Int. J. Food Microbiol. 10 : pp.255-262 .

Rosenow, E.M. and Marth, E.H., 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole, and chocolate milk and in whipping cream during incubation at 4 , 8, 13 , 12 and 35 C . J. Food Prot. 50: pp.452-459.

Schlyter, J.H., Glass, K.A., Loeffelholz, J., Degnan, A.J. and Luchansky, J.B., 1993. The effects of diacetate with nitrite, Lactate, or pediocin on the viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. Int. J. food Microbiol. 19: pp.271-281 .

Singleton, P., 1997. Bacteria in Biology , Biotechnology and Medicine. 4th ed. John Wiley and Sons Ltd., England. 264 p.

Vazquez – Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez – Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez – Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J., 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14 : pp.584-640.

Vignolo, G., Fadda, S., DeKairuz, M.N., Holgado, A.P.D. and Oliver, G., 1998. Effects of curing additives on the control of *Listeria monocytogenes* by Lactocin 705 in meat slurry . Food Microbiol. 15: pp.259-264 .

Wilson, G., Miles, A. and Parker, M.T., 1983. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 7 th. ed. Vol. 2. Edward Arnold Publishers, Ltd. pp.53-57.