تأثير كلوريد الصوديوم ودرجة الحرارة على بكتريا *Brucella melitensis* المعزولة من دم الانسان وحليب الاغنام

يونس علي يونس طارق زيد ابراهيم
قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل / العراق

الخلاصة

تم عزل بكتريا البروسيلا من الانسان وهو المضيف النهائي لهذه البكتريا، ومن الحليب الخام المصدر الرئيسي للاصابة. تم الحصول على عزلتين للبكتريا الأولى العزلة (١) عزلت من بين (٢٣) عينة دم اشخاص ظهرت عليهم اعراض حمى مالطا وأعطى مصلهم نتيجة موجبة في اختبار الروزبنكال، والثانية العزلة (٢) عزلت من (٣٧) عينة حليب جمعت من مناطق (محوير ومنارة شبك وبرطلة) حول مدينة الموصل من اغنام عانت الاجهاض وأعطت امصالها نتيجة موجبة في اختبار الروزبنكال. أجريت الاختبارات التشخيصية والمظهرية والبايوكيميائية على العزلتين فتبين ان كلتيهما تابعتان للنوع *Brucella melitensis*. تم القضاء على وجود كلتا العزلتين في الجبن الطري عند غمره في محلول ملحي من ملح الطعام بالتركيزين ٥ و ٧.٥ % وتخزينه في درجة حرارة ٤ ^{o}م، فلم يظهر نمو للعزلة (١) بعد مرور ١٣، ١١ يوم على التوالي، ولم يظهر أي نمو للعزلة (٢) بعد مرور ١٧، ١٣ يوماً على غمر الجبن بالمحلول الملحي ٥ و ٧.٥ % على التوالي بينما لم يظهر للتركيز ٢.٥ % أي تأثير على مقاومة كلتا العزلتين عند وجودهما في الجبن كما امكن القضاء على كلتا العزلتين في الجبن الطري عند معاملته بدرجة حرارة ٥٠ ^{o}م لمدة ٦٠ دقيقة ودرجة حرارة ٦٠ ^{o}م لمدة ٣٠ دقيقة، وبينت النتائج بان الاستخدام المشترك للغمر بالتراكيز الملحية ودرجات الحرارة المرتفعة في معاملة كلتا العزلتين في الجبن قد أعطى تأثيراً مثبطاً على مقاومة كلتا العزلتين في وقت قصير مقارنة باجراء كل معاملة على حدى، وظهر للتركيز ٢.٥ % تأثير على كلتا العزلتين في الجبن عند وجود عامل الحرارة فقد أدى استخدام درجة حرارة ٥٠ ^{o}م مع الغمر بتركيز ٢.٥ و ٥ و ٧.٥ % إلى قتل كلتا العزلتين بعد مرور ٢٠ و ٢٠ و ١٠ دقائق على التوالي، كما أدى استخدام حرارة ٦٠ ^{o}م مع غمر الجبن في نفس التراكيز إلى قتل كلتا العزلتين خلال فترة ١٠ و ١٠ و ٥ دقائق على التوالي.

المقدمة

ينتمي جنس البروسيلا إلى عائلة Brucellaceae والتي تتبع تحت القسم Proteobacteria α2 الذي يتصف بان افراده ذات معيشة تطفلية على النبات والحيوان (Gandara وآخرون ، ٢٠٠١ و Madigan وآخرون ، ٢٠٠٣) . ويضم جنس البروسيلا السبعة أنواع جميعها ممرضة للمضيف الأولي وهي الحيوانات اللبونة وقسم منها يصيب الانسان وقد صنفت وسميت الأنواع اعتماداً على المضيف الأولي الذي تسبب له الاصابة (Billard وآخرون، ٢٠٠٧) . الأنواع التابعة لجنس Brucella هي B. melitensis الذي يصيب الاغنام والماعز و B. abortus والذي يصيب الابقار والجاموس و B. suis يصيب الخنازير و B. canis يصيب الكلاب و B. ovis يصيب الاغنام وخاصة الاكباش و B. neotomae يصيب جرذان الخشب (Fernandez – Lago وآخرون، ٢٠٠١). فضلاً عن النوع B. maris الذي يصيب اللبائن البحرية (Bricker وآخرون، ٢٠٠٠). إن اصابة الانسان ببكتريا البروسيلا ينتج عنها مرض يسمى بحمى مالطا وهذا المرض ذو انتشار عالمي واسع جدا. ويعد من أهم مشاكل الصحة العامة التي شغلت المنظمات الدولية مثل منظمة الصحة العالمية (WHO) World Health Organization ومنظمة الغذاء والزراعة (FAO) Food and Agriculture Organization لما لهذا المرض تأثيرات شديدة على صحة الانسان (Soker وآخرون، ٢٠٠١) وينتشر المرض في مناطق عديدة من العالم وخاصة منطقة الشرق الاوسط ومن ضمنها منطقة الخليج العربي وتركيا وغرب الوطن العربي وينتشر أيضاً في شبه القارة الهندية والمكسيك وأمريكا الجنوبية وأجزاء من اوربا (Nimri، ٢٠٠٣) وقد أشار Abtahi وآخرون (٢٠٠٤) إلى تفاوت نسب الاصابة بشكل كبير بين المناطق المختلفة الموبوئة،

مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٩/٢/١١ وقبوله ٢٠٠٩/٦/٤

فهي تتراوح ما بين نسبة أقل من ٠.٠١ كما في الولايات المتحدة وبين ٢٠٠ لكل ١٠٠٠٠٠ شخص كما في سورية والاردن، وذكر Corbel (١٩٩٧) أن نسبة الاصابات الحادة في الكويت والسعودية وبيرو تكون أعلى بكثير من هذه النسب المذكورة. إن تباين نسب الاصابة في المناطق الموبوءة يعزى إلى تباين مستوى الخدمات الصحية والثقافية فضلا عن الاختلاف في العادات والتقاليد (Benenson، ١٩٩٥)، يعد النوع *B. melitensis* الاكثر انتشاراً من بين الأنواع الاخرى التابعة للجنس في مناطق عديدة من العالم (Center for Food security and Public health، ٢٠٠٣) ولكون المرض من الامراض المشتركة بين الانسان والحيوان (Zoonosis) فقد لوحظ ان انتشار المرض في الدول النامية يكون بنسبة اكبر والسبب يعود إلى الطرق البدائية في تربية المواشي واستخدام حليبها غير المبستر في صناعة الجبن والاحتكاك المباشر مع هذه الحيوانات اثناء حدوث الولادات وقلة الوعي الصحي (Shehata وآخرون، ٢٠٠١) , الهدف من هذا البحث هو معرفة تأثير غمر الجبن بكتريا البروسيلا نوع *B. melitensis* بالمحلول الملحي وكذلك تأثير المعاملة بدرجات الحرارية والمعاملة بكلا العاملين معا.

المواد البحث وطرائقه

الكائن المجهري : تم الحصول على عزلتين لبكتريا *Brucella melitensis* الأولى معزولة من دم انسان مصاب بحمى مالطا (عزلة ١) والثانية معزولة من حليب اغنام اصيبت بالاجهاض (عزلة ٢) معزولة على وسط اكار فاريل المحور وبحسب طريقة Alton وآخرون (١٩٨٨) و Collee و آخرون (١٩٩٦) . لقحت كل من العزلتين في وسط مرق البروسيلا وحضن على درجة حرارة ٣٧ ^{o}م لمدة ٤٨ ساعة للحصول على مزارع بكتيرية يمكن استخدامها لاحقا. للحصول على جبن ملقح ببكتريا البروسيلا.

تم اضافة المزارع السائلة لبكتريا البروسيلا إلى الحليب المبستر بنسبة ٢.٥ % تحت ظروف معقمة بعد بسترة حليب بقري وصنع الجبن الطري من هذا الحليب باستخدام المنفحة المجهزة من شركة Christoin Hanson وبحسب طريقة Kosikowiski (١٩٧٥)، قطع الجبن المحضر الحاوي على بكتريا البروسيلا تحت ظروف معقمة إلى قطع مكعبة طول ضلعها ٢ سم تمهيدا لاجراء المعاملات عليها وقدر عدد بكتريا البروسيلا فيها بعمل التخافيف بحسب طريقة كورجي (١٩٩١) والزرع من التخافيف الثلاثة الاخيرة بسحب ١ مل من التخفيف وزرعه على وسط اكار فاريل المحور والتحضين على درجة حرارة ٣٧ ^{o}م لمدة ٤٨ ساعة لمعرفة العدد الأولي في عينة الجبن المحضر ثم أجري عليها التجارب التالية:

تأثير الغمر بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم على بكتريا البروسيلا في الجبن: أخذت دوارق مخروطية سعة ١٠٠ مل تحتوي على ٥٠ مل من تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم ٠.٨٥ و ١ و ٢.٥ و ٥ و ٧.٥ % وعقمت الدوارق بالمؤصدة ثم وزع على كل دورق خمسة قطع جبن بوزن ١٠ غم للقطعة الواحدة الحاوية على بكتريا البروسيلا وأخذت عينة من كل دورق وأجري لها تخافيف وزرعت على أطباق حاوية على وسط آكارفاريل المحور لتقدير العدد الأولي لبكتريا البروسيلا ولغاية ١٣ يوماً ثم أعيدت الدوارق إلى الثلاجة وكررت عملية أخذ العينات والزرع كل ٢٤ ساعة لتقدير عدد بكتريا البروسيلا الحية.

تأثير درجة الحرارة على بكتريا البروسيلا في الجبن: أخذت دوارق مخروطية معقمة ووضع في كل دورق قطعة جبن تحت ظروف معقمة ونقلت بعد ذلك إلى حمام مائي ووضع في احد هذه الدوارق محرارا حيث اغمست بصلته إلى مركز قطعة الجبن وبعد وصول درجة حرارة مركز الجبن إلى الدرجة المطلوبة تم احتساب الوقت حيث سحب دورقين كل ١٠ دقائق وقدر عدد بكتريا البروسيلا في عينات الجبن بعمل التخافيف والزرع على أطباق حاوية على وسط آكارفاريل المحور.

تأثير درجة الحرارة والغمر بتراكيز ملحية مختلفة لكلوريد الصوديوم على بكتريا البروسيلا في الجبن: حضرت تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم ٢.٥ و ٥ و ٧.٥ % ووزعت المحاليل على دوارق سعة ١٠٠ مل وعقمت بالمؤصدة ثم وزعت على كل منها قطعة جبن حاوية على بكتريا البروسيلا ونقلت الدوارق إلى الحمام المائي ووضع محرار في احد هذه الدوارق وغمست بصلته في مركز قطعة الجبن لقياس درجة حرارة المركز بعد وصول درجة الحرارة إلى الدرجة المطلوبة تم احتساب وقت زمني فرفع دورقين من كل تركيز كل ١٠ دقائق ولمدة ٦٠ دقيقة. بعدها أخذت عينة من كل دورق معامل لتقدير عدد بكتريا البروسيلا في العينة بعمل التخافيف والزرع على الأطباق الحاوية على وسط آكارفاريل المحور واستخدم اختبار دنكن المتعدد المدى (١٩٥٥) في مقارنة النتائج.

النتائج والمناقشة

تأثير الغمر بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم على بكتريا البروسيلا في الجبن: يوضح الجدولين ١ و ٢ معاملة الجبن الحاوي على بكتريا البروسيلا عزلة ١ و ٢ بالغمر بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم ،فلوحظ ان معاملة الجبن بالغمر في محلول محلي بتركيز ٢.٥ % لم يعطِ نتائج ايجابية في القضاء على كلا العزلتين مقارنة مع معاملة السيطرة التي غمر الجبن فيها بمحلول ملحي بتركيز ٠.٨٥ % وهو تركيز المحلول الملحي الاعتيادي، في حين اثر الغمر بتركيز ملحي ٥ % على كلا العزلتين اذ يتبين من الجدول ١ ان معاملة الجبن بهذا التركيز قد قضى على وجود العزلة ١ بعد ١٣ يوماً من الخزن بينما كان تأثير الغمر بالتركيز ٧.٥ % أعلى حيث لم يظهر أي نمو للعزلة ١ بعد مرور ١١ يوماً من الخزن، ويبين الجدول ٢ ان الغمر بمحلول بالتركيزين ٥ % قد قضى على العزلة ٢ بعد ١٧ يوم من الخزن، مقابل ١٢ يوم عند المعاملة بمحلول ملحي بتركيز ٧.٥ %، وتوضح النتائج المبينة في الجدولين ان معاملة الجبن الحاوي على بكتريا البروسيلا بالغمر بمحلول ملحي بتركيز ٥ و ٧.٥ % قد أعطت نتائج ايجابية في القضاء على عزلتي بكتريا البروسيلا في الجبن. تختلف هذه النتائج مع ما جاء به Abdel-Hakiem وآخرون (١٩٩٤) والذي ذكر ان بكتريا *B. melitensis* استمرت حية في الجبن المضاف اليه ٥ و ٧.٥ % ملح كلوريد الصوديوم لمدة ٢٥ يوم من حفظ الجبن في الثلاجة، والسبب قد يعود إلى الاختلاف في طريقة المعاملة حيث قام الباحث باضافة الملح إلى الحليب قبل تحضير الجبن، وقد فسر ذلك لضعف تأثير طريقته على بكتريا B. melitensis بان الفعل المؤثر لكلوريد الصوديوم يكون كبيراً اذا ما تم له المجال بالانتشار في الوسط المضاف اليه. لاحظ من الجدولين ١ و ٢ ان تأثير كلوريد الصوديوم كان اكبر على كلا العزلتين، اذ غمر الجبن الحاوي على العزلتين ١ و٢ في محاليل كلوريد الصوديوم بتركيز ٥ و ٧.٥ % الذي وفر الوسط الملائم لظهور تأثير كلوريد الصوديوم على كلا العزلتين. فقد ذكر نفس الباحث ان تأثير كلوريد الصوديوم يكون اكبر على الاحياء المجهرية المرضية عند اذابته بالماء المقطر مقارنة مع اذابته في وسط كالحليب.

الجدول (١) : تأثير الغمر بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم على بكتريا البروسيلا العزلة (١) في الجبن CUF/غم.

الزمن (يوم)	كلوريد الصوديوم (%)			
	٠.٨٥	٢.٥	٥	٧.٥
صفر	١٢٣×١٠^{٥}*	١١٨×١٠^{٥}	١٢٩×١٠^{٥}	١٢٥×١٠^{٥}
١	١٢٤×١٠^{٥}	١١٥×١٠^{٥}	٦٧×١٠^{٥}	٤١×١٠^{٥}
٢	١٢٦×١٠^{٥}	١٠٩×١٠^{٥}	٢٨١×١٠^{٤}	٢١٩×١٠^{٤}
٣	١٢٠×١٠^{٥}	١١٧×١٠^{٥}	٢٠٠×١٠^{٤}	١٣٠×١٠^{٤}
٤	١٢٢×١٠^{٥}	١١٣×١٠^{٥}	١٧٠×١٠^{٤}	٨١×١٠^{٤}
٥	١٢٠×١٠^{٥}	٩٨×١٠^{٥}	١١٢×١٠^{٤}	٣١×١٠^{٤}
٦	١٢٤×١٠^{٥}	٨٨×١٠^{٥}	٢٤٣×١٠^{٣}	٢٥٦×١٠^{٣}
٧	١١٩×١٠^{٥}	٨٥×١٠^{٥}	١٧٥×١٠^{٣}	١٦٣×١٠^{٣}
٨	١١٦×١٠^{٥}	٨٦×١٠^{٥}	٨٧×١٠^{٣}	٧٥×١٠^{٣}
٩	١١٨×١٠^{٥}	٨٤×١٠^{٥}	٣٩×١٠^{٣}	١١٥×١٠^{٢}
١٠	١٢١×١٠^{٥}	٨٣×١٠^{٥}	١٢٨×١٠^{٢}	٧٥×١٠^{١}
١١	١١٦×١٠^{٥}	٨٥×١٠^{٥}	٦٦×١٠^{٢}	N.g**
١٢	١١٥×١٠^{٥}	٨٥×١٠^{٥}	٣٠×١٠^{١}	N.g
١٣	١٢٢×١٠^{٥}	٨١×١٠^{٥}	N.g	N.g

* القراءات بواقع مكررين لكل قراءة ** N.g : Non-growth

الجدول (٢) : تأثير الغمر بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم على بكتريا البروسيلا العزلة (٢) في الجبن CUF/غم.

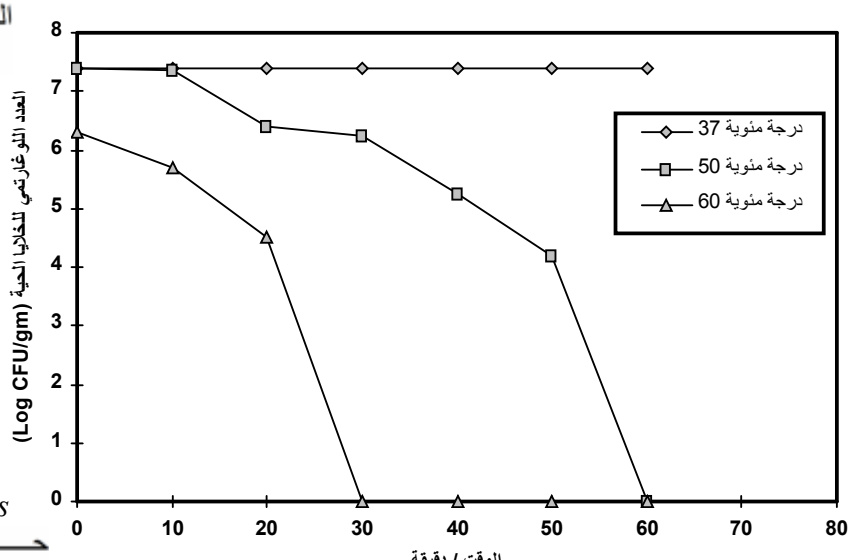
الزمن (يوم)	كلوريد الصوديوم (%) ٠.٨٥	٢.٥	٥	٧.٥
صفر	١٧٥×١٠^{٥} *	١٨٠×١٠^{٥}	١٦٤×١٠^{٥}	١٧١×١٠^{٥}
١	١٧٢×١٠^{٥}	١٧٨×١٠^{٥}	١٢٠×١٠^{٥}	٥٢×١٠^{٥}
٢	١٧٠×١٠^{٥}	١٦٨×١٠^{٥}	٨٤×١٠^{٥}	٢١١×١٠^{٤}
٣	١٧١×١٠^{٥}	١٦٧×١٠^{٥}	٣١×١٠^{٥}	١٣٠×١٠^{٤}
٤	١٧٥×١٠^{٥}	١٦٥×١٠^{٥}	١٨٤×١٠^{٤}	٩٦×١٠^{٤}
٥	١٧٣×١٠^{٥}	١٥٨×١٠^{٥}	١٦٢×١٠^{٤}	٤٣×١٠^{٤}
٦	١٧٣×١٠^{٥}	١٥٥×١٠^{٥}	١٤١×١٠^{٤}	٢٧٣×١٠^{٣}
٧	١٦٩×١٠^{٥}	١٥٠×١٠^{٥}	١١٣×١٠^{٤}	١٦١×١٠^{٣}
٨	١٦٥×١٠^{٥}	١٥٣×١٠^{٥}	٢٨×١٠^{٤}	٨٤×١٠^{٣}
٩	١٦٨×١٠^{٥}	١٤٨×١٠^{٥}	٦٧×١٠^{٤}	٣٢×١٠^{٣}
١٠	١٧٠×١٠^{٥}	١٤٨×١٠^{٥}	٢١١×١٠^{٣}	١١٢×١٠^{٢}
١١	١٦٦×١٠^{٥}	١٤٦×١٠^{٥}	١٧٦×١٠^{٣}	٥١×١٠^{٢}
١٢	١٦٧×١٠^{٥}	١٤٥×١٠^{٥}	١٠٠×١٠^{٣}	٩٧×١٠^{١}
١٣	١٦٤×١٠^{٥}	١٤٣×١٠^{٥}	٥٤×١٠^{٣}	N.g**
١٤	١٦٧×١٠^{٥}	١٤٢×١٠^{٥}	١٥٨×١٠^{٢}	N.g
١٥	١٦٠×١٠^{٥}	١٤٠×١٠^{٥}	٧١×١٠^{٢}	N.g
١٦	١٦١×١٠^{٥}	١٣٨×١٠^{٥}	٣٤×١٠^{١}	N.g
١٧	١٦٠×١٠^{٥}	١٣٥×١٠^{٥}	N.g	N.g

* القراءات بواقع مكررين لكل قراءة Non-growth : N.g **

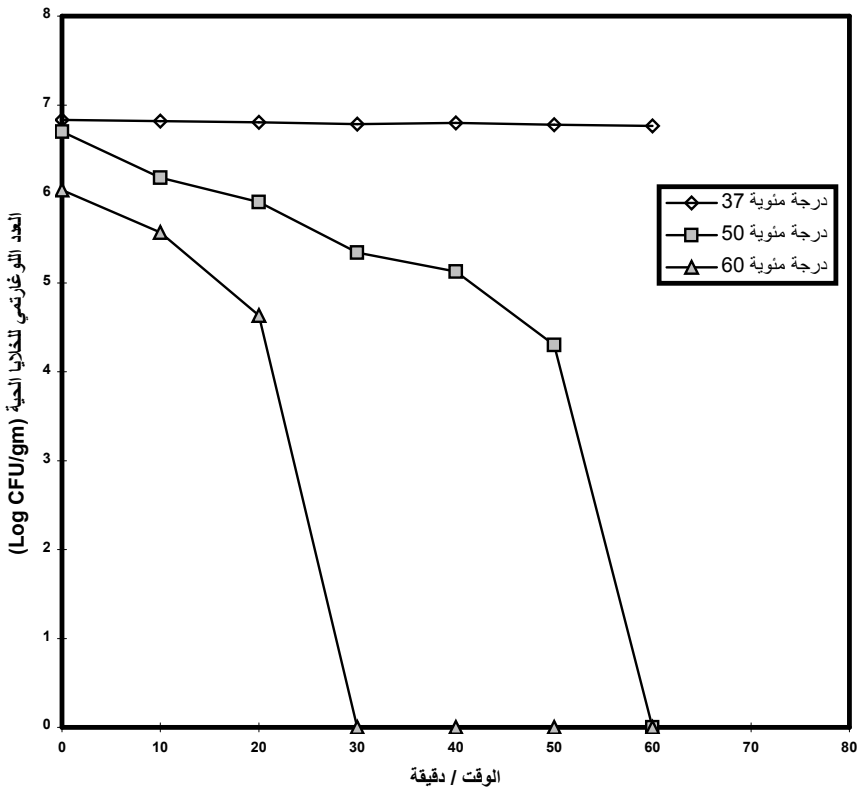
تأثير درجة الحرارة على بكتريا البروسيلا العزلة (١ و ٢) في الجبن: يوضح الشكل ١ تأثير درجة الحرارة على العزلة ١ في الجبن عند استخدام ثلاث معاملات حرارية مختلفة ٣٧ و ٥٠ و ٦٠ °م فعند معاملة الجبن بدرجة ٥٠°م هلكت البكتريا في فترة زمنية قدرها ٦٠ دقيقة، مقارنة بمعاملة السيطرة باستخدام درجة حرارة ٣٧ °م علماً بأن هذه الدرجة الحرارية هي المثلى لنمو هذه البكتريا، ويتضح أيضاً من الشكل ان استخدام درجة الحرارة ٦٠ °م قد اثر على العزلة ١ بدرجة اكبر اذ لم يظهر أي نمو للعزلة عند زمن ٣٠ دقيقة من بدء المعاملة.

يبين الشكل ٢ تأثير درجة الحرارة على العزلة ٢ في الجبن حيث حافظت بكتريا العزلة ٢ على عددها عند معاملة السيطرة بينما لم يظهر أي نمو للعزلة ٢ عند معاملتها بدرجة ٥٠ °م لمدة ٦٠ دقيقة، وقد سببت معاملتها بدرجة ٦٠ °م الهلاك في زمن قدره ٣٠ دقيقة، ويمكن الملاحظة من الشكلين ١، ٢ ان ارتفاع درجة الحرارة سبب انخفاض في عدد البكتريا فكلما كانت درجة حرارة المعاملة أعلى كان الوقت اللازم لقتل كلتا العزلتين أقل.

وبين John وآخرون (١٩٩٤) إن المدى الحراري الذي تستطيع البروسيلا النمو فيه هو ٢٠ -٤٠ م°، ودرجة الحرارة المثلى لها هي ٣٧ م°، وقد أشار Collee وآخرون (١٩٩٦) ان بكتريا البروسيلا تقتل المعاملة عند بدرجة ٦٠ م° لمدة ١٠ دقائق، وقد أشار Ayres وآخرون (١٩٨٠) ان بكتريا البروسيلا تقاوم لبضع ثواني عند معاملتها بدرجة حرارة ٦١ م°، وعند بكتريا *B. melitensis* معاملة بدرجة حرارة ٦٠، ٦٢، ٦٥، ٧٠، ٧٥، ٨٠ م° لم يظهر لها أي نمو بعد مرور ٣.٥ دقيقة و ١.٦ دقيقة و ٠.٥ دقيقة و ٢٢ ثانية و ١٢ ثانية و ٤ ثواني على التوالي (Johnson وآخرون، ١٩٩١). وان مقاومة بكتريا البروسيلا لدرجات الحرارة المرتفعة تتأثر بعدة عوامل منها كمية اللقاح، ودرجة الحرارة المستخدمة في المعاملة، والاس الهيدروجيني للوسط، ونوع الوسط، والتغذية، وفعالية الانزيمات المحللة، ووجود اشعة الشمس ووجود البكتريا الاخرى (Nicoletti، ١٩٨٠). لذا فعند ملاحظة النتائج المذكورة في الشكلين ١ و ٢ نجد ان وجود كلتا العزلتين في الجبن قد وفر لهما البعض من الحماية، اذ تطلب زيادة زمن المعاملة عند درجة حرارة ٦٠م° للقضاء على هذه البكتريا.



الشكل (1) تاثير درجة الحرارة على بكتريا البروسيلا للعزلة (1) في الجبن



الشكل (2) تاثير درجة الحرارة على بكتريا البروسيلا للعزلة (2) في الجبن

التأثير المشترك لكل من الحرارة والغمر بمحاليل كلوريد الصوديوم على بكتريا البروسيلا للعزلتين (١ و ٢) في الجبن: يوضح الجدول ٣ تأثير كل من الحرارة والغمر بالتراكيز الملحية على العزلة ١ في الجبن اذ يلاحظ ان استخدام درجة حرارة ٥٠°م مع تراكيز ملحية مختلفة كان له تأثير سلبي على وجود بكتريا البروسيلا في الجبن فاستخدامها مع الغمر بمحلول ملحي بتركيز ٢.٥ و ٥ % قد سبب هلاك البكتريا في مدة قدرها ٢٠ دقيقة بينما كان عدد البكتريا في عينة السيطرة عند استخدام محلول ملحي بتركيز ٠.٨٥ % ودرجة حرارة ٣٧°م عند نفس الفترة ٢٠ دقيقة ٦٤× ١٠ ^{٦} CFU/غم، وعند استخدام درجة الحرارة ٥٠ °م مع الغمر بمحلول ملحي بتركيز ٧.٥ % أدى إلى القضاء على البكتريا في مدة ١٠ دقائق، بينما كان عدد خلايا العزلة ١ عند نفس الفترة في عينة السيطرة ٧٠× ١٠ ^{٦} CFU/غم.

وفي حالة استخدام درجة حرارة ٦٠ °م مع الغمر في محاليل ملحية مختلفة ٢.٥ و ٥ % قد سبب هلاك العزلة ١ بعد مرور ١٠ دقائق، ولم يظهر أي نمو للعزلة ١ بعد مرور ٥ دقائق عند استخدام نفس الدرجة الحرارية مع غمر الجبن في محلول ملحي بتركيز ٧.٥% مقارنة مع عينة السيطرة التي كان فيها عدد البكتريا ٦١× ١٠ ^{٦} CFU/غم.

ويبين الجدول ٤ تأثير درجة الحرارة والغمر بالمحاليل الملحية على العزلة ٢، اذا لاحظ ان استخدام درجة الحرارة ٥٠ °م مع غمر الجبن بمحاليل ملحية بتركيز ٢.٥ و ٥ و ٧.٥% قد اثر معنوياً على العزلة ٢ فلم يظهر أي نمو للعزلة بعد مرور فترة ٢٠ دقيقة عند استخدام درجة حرارة ٥٠ °م والغمر بتركيز ملحي ٢.٥ و ٥ % ولم يظهر أي نمو عند زرع العينات المعاملة بنفس درجة الحرارة مع الغمر بمحلول بتركيز ٧.٥ % بعد مرور ١٠ دقائق على بدء المعاملة مقارنة مع عينة السيطرة التي كان فيها عدد الخلايا عند فترة ١٠ و ٢٠ دقيقة ١٧١ × ١٠ ^{٦} و ١٦٣ × ١٠ ^{٦} CFU/غم على التوالي، ويلاحظ أيضاً ان استخدام درجة الحرارة ٦٠ °م مع الغمر بمحلول ٢.٥ و ٥ % قد أدى إلى هلاك العزلة خلال ١٠ دقائق مقارنة مع عينة السيطرة التي ظهر فيها عدد الخلايا للعزلة (٢) ١٧١× ١٠ ^{٦} CFU/غم، وعند استخدام درجة الحرارة ٦٠ °م مع الغمر بمحلول ملحي بتركيز ٧.٥ % لم يظهر أي نمو للعزلة ٢ بعد مرور ٥ دقائق على بدء المعاملة مقارنة مع معاملة السيطرة التي كان عدد البكتريا فيها ١٥٨× ١٠ ^{٦} CFU/غم في نفس الفترة.

يلاحظ من الجدولين (٣ و ٤) ان الاستخدام المشترك لعاملي الحرارة والتراكيز الملحية قد أعطى نتائج مؤثرة أكثر على مقاومة كلتا العزلتين في الجبن مقارنة مع استخدام كل عامل بمفرده، ونلاحظ ان هنالك تأثيرا تازريا لعامل الحرارة والتركيز الملحي في التأثير على كلتا العزلتين وان الفعل التازري هذا ازداد في تأثيره على كلتا العزلتين بارتفاع احد هذين العاملين او كلاهما.

الجدول (٣) : تأثير درجة الحرارة والتراكيز الملحية على بكتريا البروسيلا العزلة (١) في الجبن (بكتريا/غم)

الوقت (دقيقة)	تركيز كلوريد الصوديوم (%)						المعاملة بدرجة ٣٧ م° وبتركيز ملح ٠.٨٥
	درجة حرارة ٥٠ م°			المعاملة بدرجة حرارة ٦٠ م°			
	٢.٥	٥	٧.٥	٢.٥	٥	٧.٥	
صفر	١٠×٨٩ ٤ * ز	١٠×٤٣ ٤ ز	١٠×٨٥ ٣ ز	١٠×٢٦٠ ٢ ز	١٠×٢٢١ ٢ ز	١٠×٣٣ ١ ز	١٠×٦٣ ٦ ب ج د
٥	١٠×٢٧٢ ٣ ز	١٠×٢٠١ ٣ ز	١٠×٣٣ ١ ز	١٠×٨٩ ١ ز	١٠×٣٥ ١ ز	N.g**	١٠×٦١ ٦ ج د هـ
١٠	١٠×٢٠٠ ٢ ز	١٠×١٠٠ ٣ ز	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٧٠ ٦ أ
١٥	١٠×٣٨ ٢ ز	١٠×٦٠ ١ ز	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٥٨ ٦ د هـ و
٢٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٦٤ ٦ أ ب ج
٢٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٦٠ ٦ ج د هـ
٣٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٥٣ ٦ و
٣٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٥٧ ٦ هـ و
٤٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٦٣ ٦ ب ج د
٤٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٦٠ ٦ ج د هـ
٥٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٦١ ٦ ج د هـ
٥٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٦٨ ٦ أ ب
٦٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×٦٧ ٦ أ ب

* القراءات بواقع مكررين لكل قراءة ** Non-growth : N.g

وعند مقارنة نتائج الجدولين ١ و ٢ مع الجدولين ٣ و٤ نلاحظ ان تأثير غمر الجبن بالمحاليل الملحية (٥ و ٧.٥ % قد ازداد تأثيره على كلتا العزلتين بارتفاع درجة الحرارة وقد قل الزمن اللازم للقضاء على البكتريا في الجبن، في حين ظهر للغمر بمحلول ملحي بتركيز ٢.٥% تأثيرا على كلتا العزلتين بوجود عامل الحرارة بعد ان كان تأثير هذا التركيز معدوما على كلتا العزلتين عند استخدامه بمفرده.

الجدول (٤) : تأثير درجة الحرارة والتراكيز الملحية على بكتريا البروسيلا العزلة (٢) في الجبن (بكتريا/غم)

الوقت (دقيقة)	تركيز كلوريد الصوديوم (%)						المعاملة بدرجة ٣٧ م° وبتركيز ملح ٠.٨٥
	درجة حرارة ٥٠ م°			المعاملة بدرجة حرارة ٦٠ م°			
	٢.٥	٥	٧.٥	٢.٥	٥	٧.٥	
صفر	١٠×١١٧ ٤* ي	١٠×٩٣ ٤ ي	١٠×٢٠٨ ٢ ي	١٠×١٨٠ ٢ ي	١٠×٥٠ ٢ ي	١٠×١٢٢ ١ ي	١٠×١٦٠ ٦ هـ و ز
٥	١٠×١٨٤ ٣ ي	١٠×٨٦ ٣ ي	١٠×٥١ ١ ي	١٠×٤٤ ١ ي	١٠×٣٤ ١ ي	N.g**	١٠×١٥٨ ٦ و ز ح
١٠	١٠×٦٥ ٢ ي	١٠×٤٠ ٢ ي	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٧١ ٦ أ ب
١٥	١٠×٣٩ ١ ي	١٠×٣٣ ١ ي	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٦٥ ٦ ج د هـ
٢٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٦٣ ٦ ج د هـ و
٢٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٦٧ ٦ ب ج د
٣٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٥٨ ٦ و ز ح
٣٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٦٤ ٦ ج د هـ
٤٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٥٧ ٦ ز ح
٤٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٦٢ ٦ د هـ و ز
٥٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٧٥ ٦ أ
٥٥	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٦٨ ٦ ب ج
٦٠	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	N.g	١٠×١٥٤ ٦ ح ط

* القراءات بواقع مكررين لكل قراءة ** Non-growth : N.g

ويلاحظ ان استخدام درجة الحرارة ٥٠ م° لوحدها قد أدى إلى قتل كلتا العزلتين الموجودتين في الجبن خلال ٦٠ دقيقة، في حين لو قارنا هذه النتيجة مع الجدولين ٣ و٤ نلاحظ ان الفترة اللازمة لقتل كلتا العزلتين عند نفس درجة الحرارة مع الغمر بالمحاليل الملحية بتركيز ٢.٥ و ٥ و ٧.٥ % كانت ٢٠ و ٢٠

و ١٠ دقائق على التوالي أي ان هنالك اختصارا في الوقت اللازم للقتل، وكذلك عند المقارنة باستخدام درجة الحرارة ٦٠ °م مع نفس التراكيز الملحية. فقد ذكر Abdel-Hakiem وآخرون (١٩٩٤) ان هنالك فرقا في الفترة اللازمة للقضاء على بكتريا البروسيلا الموجودة في الجبن الدمياطي المضاف اليه ٥ و ٧.٥ و ١٠ % ملح كلوريد الصوديوم عند حفظ الجبن في درجة حرارة الثلاجة وحفظه في درجة حرارة الغرفة ففي الأولى قاومت هذه البكتريا لمدة ٢٥ و ٢٥ و ٢٢ يوما على التوالي وفي الثانية قاومت هذه البكتريا لمدة ١٥ و ١٥ و ٨ ايام على التوالي. ويمكن ان نلاحظ ان الاستخدام المشترك لعاملي الحرارة والغمر بالمحاليل الملحية قد أدى إلى ظهور تأثير معنوي على البكتريا في وقت أقل مما لو استخدم كل عامل بمفرده وبالمقارنة مع عينة السيطرة، لذا استخدامها كطريقة فعالة في معاملة الجبن المحلي للقضاء على البكتريا البروسيلا فيه.

EFFECT OF SODIUM CHLORID AND TEMPERATURE ON ISOLATED *Brucella melitensis* FROM HUMAN BLOOD AND SHEEP MILK

Younis Ali Younis Tariq Zaid Ibraheem
Food Sci. and Biotech. Dept., College of Agric. And Foresty, Mosul Univ., Iraq.

ABSTRACT

Brucella melitensis was isolated from human which is the final host for this bacteria and from sheep milk, the main sourse of infection. Two isolates were obtained; isolate (1) from 23 blood speciemens taken from patients showed clinical findings of malta fever which their serum gave high agglutination titer in Rose Bengal Test, isolate (2) was isolated from 37 milk sample collected from (Mahweer, Manarat Shabbak and Bartillah) from sheep which suffered from abortion and their serum gave positive results with Rose Bengal Test. After the diagnostic biochemical tests, we found that these two isolates belonged to the species *B. melitensis*. Both isolates were cured in soft white cheese when flooded in a salt solution at concentrations 5 and 7.5 % and stored at 4 ^{o}C. No growth of isolate (1) was observed after 13, 11 days respectively, also no growth of isolate (2) was observed after 17, 13 days when flooded with a salt solution at concentrations 5 , 7.5 %, respectively , but there was no effect of the concentration 2.5 % on the resistant of both isolates in cheese. Both isolates were cured from soft white cheese when exposed to 50 ^{o}C for 60 minutes and 60 ^{o}C for 30 minutes. The study showed that the combination use of flooding with salt solution and high temperature in results treatment of both isolates in cheese has given an inhibitory effect on both isolates resistance in a short time when compared with the use of each factor alone. The concentration 2.5 % showed an effect on both isolates in cheese when combined with the temperature factor. The use of 50 ^{o}C with flooding with salt concentrations 2.5 , 5 , 7.5 % led to cure both isolates after 20 , 20, 10 minutes, respectively , and when 60 ^{o}C was used with the same concentrations above also led to cure both isolates at 10 , 10 , 5 minutes respectively.

المصادر

كورجي،سوسن حسن (١٩٩١) انتشار البروسيلا *Brucella* في الحليب والجبن الطري في منطقة بغداد، رسالة ماجستير، الجامعة المستنصرية، كلية العلوم.

Abdel-Hakiem, E. H. ; M. E. Hamdy and M. A. Shelaih (1994). Viability of *Brucella melitensis* in damietta cheese, Assiut Vet. Med. J. , 31 : 158-165.

Abtahi, H. ; A. H. Salmanian ; S. Rafati ; G. B. Nejad and Z. M. Hassan (2004). High level expression of recombinant ribosomal protein (L7 / L12) from

Brucella abortus and its reaction with infected human sera, Iran. Biomed. J., 8 : 13-18.

Alton, G. G. ; L. M. Jones ; R. D. Angus and J. M. Verger (1988).Techniques for the brucellosis laboratory, INRA. Paris.

Ayres, J. C. ; J. O. Mundt and W. E. Sandine (1980). Microbiology of foods, W. H. Freeman and Company.

Benenson, A. S. (1995). Control of communicable diseases manual,16th ed., American Public Health Association, Washington.

Billard ,E. ; J. Dornand and A. Gross (2007).*Brucella suis* Prevents Human Dendritic Cell Maturation and Antigen Presentation thrgh Regulation of Tumor Necrosis factor Alpha Secretion , Infect. Immun. , 75 : 4980 – 4989.

Bricker, B.; D. R. Ewalt ; A. MacMillan ; G. Foster and S. Brews (2000). Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mamals, J. Clin. Microbiol. , 38 : 1258-1262.

Center for food security and public health (2003). Brucellosis, 1-4 , http:// www. Pnas.org/cgi/doi.

Collee, J. G. ; A. G. Fraser ; B. P. Marmion and A. Simmons (1996).Practical medical microbiology, 14th ed. , Churchill Livingstone Inc. , New York.

Corbel, M. J. (1997). brucellosis : An overview, Emerg. Infect. Dis., 3 : 213 – 221.

Fernandez – Lago, L. ; F. J. Vallejo ; I. Trujillano and N. Vizcaino (2001). Flourescent whole-cell hybridization with 16S rRNA – targated oligonucleotide probes to identify *Brucella spp.* by flow cytometry, J. Clinical Microbiology, 38 : 2768-2771.

Gandara, B. ; A. L. Merino ; M. A. Rogel and E. M. Romero (2001). Limited genitic diversity of *Brucella spp.*, J. Clin. Microbiol. , 39 : 235 – 240.

John, G. H. ; N. R. Kreig ; H. A. Sneath ; J. T. Staley and S. J. Williams (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. , Williams and Wilkins, U. S. A.

Johnson, E. A. ; J. H. Nelson and M. E. Johnson (1991). To pasteurize or not to pasteuriz, UW Dairy Pipeline, 3 : 1-5.

Kosikowiski, F. (1975). Cheese and fermented milk foods, Edfwards Brother, Inc. Ann. Arbor, Michigan.

Madigan, M. T. ; J. M. Martinko and J. Parker (2003). Biology of microorganism, 10th ed. Pearson education, Inc.

Nicoletti, P. (1980). The epidemiology of bovine brucellosis, Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24 : 69-98.

Nimri, L. F. (2003). Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay, Bio Med Central, http://www.biomedcentral.com/147-2334/3/5.

Shehata, A. ; S. M. Adib and A. A. Al-Anzi (2001). Risk factor and clinical presentation of brucellosis in Al-Jahra hospital (1997 – 1999), Kuwait Med. J. , 33 : 44 – 47.

Soker, M. ; C. Devecioglu ; A. Yaramis ; S. Ipek ; M. N. Ozbek and H. Tuzuu (2001). Microangipathic hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute renal failure associated with acute brucellosis, International Pediatrics, 16 : 105 – 108.