تأثير بعض العوامل البيئية على بكتريا *Vibrio cholerae* و *Vibrio fluvialis* المعزولة من الأسماك المتداولة في الاسواق المحلية لمدينتي البصرة والناصرية *

خديجة صادق الحسيني[1] منال بادي التميمي[2] عذراء عودة الجبوري[2]
Khadeeja_jaffer@ yahoo.com
[1] قسم علوم الاغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق
[2] قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة ذي قار، العراق

المستخلص

تم عزل وتشخيص بكتيريا الضمات *Vibrio* spp. من الأسماك الطازجة والمجمدة وهي الصبور *Tenualosa ilisha* والكارب الفضي *Hypophthalmichthys molitrix* والبني *Barbus sharpeyi* والشانك *Acanthopagrus arabicus*، إذ جمعت 210 سمكة من أسواق محافظة البصرة وشملت (سوق البصرة الكبير والعشار والتنومة وخمسة ميل) بينما جمعت 150 سمكة من الكارب الفضي والبني والشانك من أسواق محافظة الناصرية وشملت (السوق الكبير وسوق هرج)، استمرت عملية جمع العينات للفترة من 2/ حزيران/2013 ولغاية 30/ تشرين الثاني/2013. جُلبت الأسماك إلى المختبر في حافظة مصنوعة من الفين مخلوطاً مع الثلج المجروش وأخذت العينات منها وزرعت مباشرة على الأوساط الزرعية (آلاكار المغذي، وأكار الدم، وأكار الماكونكي، والوسط الانتقائي (ثيوسلفات – سترات –السكروز الصفراوية الصلب TCBS) ثم حُضنت الأطباق هوائياً في درجة حرارة 37 م لمدة 18-24 ساعة. بعد فترة الحضن تم تشخيص 30 عزله من بكتيريا الضمات وشُخص الجنس بالاعتماد على شكل المستعمرات والخلايا تحت المجهر وفحص أنزيم الكاتليز، وأنزيم الاوكسيديز، وفحص الحركة بعدها شخصت الأنواع بالاعتماد على الفحوصات الكيموحيوية. واستعمل نظام API20E التوكيدي، اذ تم تشخيص نوعين من بكتيريا *Vibrio* هي*cholera* و*fluvialis* ولوحظ وجود هذه البكتريا في الأسماك الطازجة أكثر من وجودها في الأسماك المجمدة. تم دراسة قابلية العزلات على تحمل الحموضة، إذ إمتازت عزلات *V.cholera* و *V. fluvialis* بنسبة تحمل للحموضة تصل الى 100% عند أرقام هيدروجنية 5.0 و5.5 و6.0 و6.5 و7.0و7.5و8.0، بينما لوحظ أن نسبة تحمل الحموضة لبكتيريا *V. cholera* بلغت 60 % عند رقم هيدروجيني 4.5، في حين أن بكتيريا *V. fluvialis* كانت أكثر تحملاً وبنسبة تصل إلى 20% و50% عند رقم هيدروجيني 4.0 و4.5 على التوالي. وبينت الدراسة أن قابلية ضمات الكوليرا *V. cholera* على مقاومة الملوحة بلغت 60% و100% عند تركيز ملحي 6% و7% على التوالي، بينما لم تستطع العزلات النمو عند تراكيز ملحية 8% و9%. وكانت عزلات *V. fluvialis* مقاومة للملوحة وعند كافة التراكيز ولكن بنسب مختلفة بلغت 100% عند تركيز 6% و7% و40% عند تركيز 8%، بينما عند تركيز ملحي 9% كانت هناك عزلة واحدة مقاومة وبنسبة 20% وهي من ضمن العزلات المجمدة. وقد استطاعت كافة عزلات البكتيريا من مختلف المصادر النمو بدرجة حرارة 25 م و37 م وكذلك بدرجة حرارة الغرفة والتي كانت 15 م° وقت أجراء التجربة، الا ان بعض عزلات بكتريا الضمات استطاعت النمو بكثافة قليلة جداً على درجة حرارة 5 م ولم تستطع أي من هذه العزلات النمو في درجة حرارة - 20 م.

الكلمات المفتاحية: عزل وتشخيص بكتريا *Vibrio cholerae* و*Vibrio fluvialis*، البكتريا الضمية *Vibrio* spp.، الاسماك الطازجة والمجمدة.

*مستل من رسالة ماجستير للباحث الثالث.

المقدمة

تُمثل الثروة السمكية في الوقت الحاضر أحد محاور التنمية الاقتصادية والإجتماعية في العديد من دول العالم نظراً للدور الذي تلعبه في المساهمة في توفير الغذاء وزيادة الصادرات وتقليل الواردات والمحافظة على التنوع البيولوجي، كما تعد الثروة المائية إحدى مجالات التنمية الهامة والتي لا يقل دورها في إقتصاد الدول عن دور البترول فيما لو أستغلت استغلال علمي، بل قد تمتاز الأولى في أنها تتعامل مع عنصر دائم الاستمرار والتجدد لا ينضب، بعكس الثانية والتي تتعامل مع مادة احتياطها محدود، وبالتالي فهي معرضة للانقراض بعد فترة (برانية وآخرون، 1997).

تُعد انواع جنس *Vibrio* من البكتيريا السائدة والمصنفة كفلورا طبيعية تعيش في الأسماك، الأ أنها قد تكون ضارة للأسماك (ميكروب إنتهازي) لاسيما عند إختلال الجهاز المناعي لأي سبب من الإجهاد البيئي (Hameed,1993). فضلاً عن ان انواع هذا الجنس ممرضة للانسان وكون الاسماك احدى اهم طرائق نقلها (البنا، 2001).

وصفت بكتيريا الضمات بانها بكتيريا سالبة لصبغة كرام ذات شكل يشبه الضمة محبة للملوحة لاهوائية اختيارية وتمتلك سوط واحد في أحد أقطابها، وتكون موجبة لأختبار (الأوكسيديز والكاتاليز) وغير مكونة للأبواغ، وقد تتواجد بأشكال مختلفة عند تعرضها لظروف بيئية قاسية، قطرها0.5 مايكروميتر وطولها 1.4 -2.6 مايكروميتر، ولها القدرة على تخمير سكريات الكلوكوز والمانيتول والسكروز والمانوز والمالتوز والتريهالوز مع إنتاجها غاز وغير قادرة على تخمير الأرابينوز (Collee *et al*., 1996)، لها القابلية على النمو على أوساط زرعية إعتيادية وإنتخابية تحت ظروف هوائية ولا هوائية (Sleigh and Timbury,1994). وأن هذه البكتيريا تنمو بشكل جيد على وسط TCBS ومخمرة اللاكتوز مكونة مستعمرات صفراء اللون كبيرة مسطحة قطرها من 2-3 ملم بعد تحضينها لمدة 18-24 ساعة، ولها زمن جيل أقل من 30 دقيقة، أما درجة الحرارة المثلى لنموها فهي 37 م°ويمكنها النمو في مدى واسع من درجات الحرارة يتراوح من 16 م° إلى 42 م°وتتحمل درجات حرارة واطئة جداً تصل إلى- 20 م° (Johnston and Brown, 2002). وتحبذ النمو في pH قاعدي وتتحمل pH عالي يصل الى 10 ومنخفض يصل الى 4.5، إلا ان الرقم الهيدروجيني المثالي لنموها هو8.6، وهذه الصفة استعملت في أختبار أوساط العزل والتشخيص لهذه البكتيريا. يحفز نموها بإضافة 1% كلوريد الصوديوم، ويحتوي حامضها النووي على السايتوسين وعلى الكوانين بنسبة 50٪؛ ويتم عزلها من المياه وبراز الحيوانات وبراز الإنسان والصرف الصحي والمنتجات البحرية (Holt *et al*., 1994).

أما بكتيريا *V. fluvialis* فهي واحدة من جنس الضمات والذي يعود لعائلة Vibrionaceae، إذ ترجع إلى القسم الخامس حسب موسوعة Bergys *et al*., (2007) Furniss *et al*., (1977)، وتشترك في كون أفرادها ذات شكل عصوي منحني متحركة عن طريق اسواطها القطبية وهي محبة للملوحة وسالبة لصبغة كرام Dulcic *et al*., (1998)، ومن ضمن متطلباتها الاخرى احتياجها لملح كلوريد الصوديوم وكونها موجبة لأنزيم الأوكسيديز وإيجابية لفحص النترات، ولها قدرة على تخمر D-الجلوكوز والكربوهيدرات الأخرى مع إنتاج الحامض والغاز ولديها 50٪ من الكوانين مع السايتوسين في الحامض النووي؛ ويتم عزلها من المياه وبراز الحيوانات وبراز الإنسان ومن قنوات الصرف الصحي والمنتجات البحرية (Furniss *et al*., 1977).

وتهدف الدراسة الحالية الى:

1. عزل بكتيريا الكوليرا من الأسماك المأخوذة من الأسواق المحلية في محافظتي البصرة وذي قار، والتي تعد من المناطق الوبائية بالنسبة لضمات الكوليرا حسب تقارير وزارة الصحة.وتشخيصها وفق

الفحوصات المجهرية الكيموحيوية (فحص الأوكسيديز وفحص قابلية البكتريا على أنتاج الأندول وإختبار المثيل الأحمر وإختبار فوكس بروسكاور وإختبار قابلية البكتريا على استغلال السترات كمصدر وحيد للكربون وإختبار أنتاج أنزيم اليوريز وإختبار قابلية البكتريا على الحركة و تخمر سكر المانيتول وإختبار تخمر السكريات وإنتاج (CO_2 وH_2S) الخاصة بالكشف عن بكتيريا *V. cholera* و*V. fluvialis* التي عزلت وشخصت من الأسماك المدروسة.

2. تأكيد التشخيص باستعمال عدة APi20E التي تحتوي على 20 إختبار كيموحيوي والمعتمدة من قبل منظمة الصحة ألعالمية (WHO).
3. إختبار مدى قدرة البكتيريا على تحمل بعض الظروف البيئية وهي الحموضة والملوحة والحرارة.

المواد وطرائق البحث

1- جمع العينات:

جمعت 360 عينة من الاسماك، منها 210 عينة من أربعة أسواق من محافظة البصرة و150 عينة من اسواق محافظة الناصرية، للفترة الممتدة من 2/حزيران/2013 ولغاية 30/تشرين الثاني/2013، إذ جمعت عينات اسماك الصبور من أسواق محافظة البصرة كالأتي: 12 من سوق البصرة الكبير و16 من سوق العشار و20 من سوق التنومه و9 من سوق خمسة ميل، بينما جمعت اسماك الكارب الفضي كالأتي: 10 من سوق البصرة الكبير و13 من سوق العشار و8 من سوق التنومه و17من سوق خمسة ميل، في حين أن ما تم جمعه من عينات من اسماك الشانك هي 9 من سوق البصرة الكبيرو17 من سوق العشار و19 من سوق التنومه و10 من سوق خمسة ميل، وكانت العينات المجموعة من سمك البني 14 من سوق البصرة الكبير و8 من سوق العشار و19 من سوق التنومه و9 من سوق خمسة ميل.

أما من اسواق محافظة ذي قار فكان عدد عينات الاسماك 150 منها كالأتي: 15 سمكة من الكارب الفضي من سوق هرج و20 من السوق الكبير ومن أسماك الشانك كان عدد العينات 30 من سوق هرج و25 من السوق الكبير، ومن سمك البني25 من سوق هرج و35 من السوق الكبير.

ونُقلت عينات الأسماك محفوظة بالثلج إلى المختبر، وبعد تحضير العينة وضعت في ماء الببتون القاعدي المضاعف لغرض التنشيط ويكون الرقم الهيدروجيني 8 وحُضنت بدرجة حرارة 37م لمدة (8-6) ساعة (Collee *et al.*, 1996; Holt *et al.*, 1994). زرعت العينات مباشرة على الأوساط الزرعية (وسط آكار المغذي والدم والمكونكي وTCBS)، ثم حُضنت الأطباق هوائياً في درجة حرارة 37 م لمدة 18-24 ساعة، إذ لوحظت صفات وأشكال المستعمرات النامية بأجراء الفحص التشخيصي المجهري.

2- العزل والتشخيص:

نقلت العينات الى المختبر محفوظة بالثلج وبعد ان حضرت العينات وضعت في ماء الببتون القاعدي المضاعف بحيث ان الرقم الهيدروجيني 8.6 وحُضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 6-8 ساعة (Islam *et al.*, 1994; Elliot *et al.*, 2001) بعد ذلك تم أجراء الفحص التشخيصي المجهري. وزرعت مباشرة على الأوساط الزرعية (وسط آكارالمغذي وأكار الدم وأكار الماكونكي وTCBS)، ثم حضنت الأطباق هوائياً في درجة حرارة 37 م لمدة 18-24 ساعة، بعد فترة الحضن تم تشخيص 15 مستعمرة من بكتيريا الضمات.

3- الفحوصات المجهرية

نقل جزء من المستعمرات النقية النامية على وسط TCBS وبعمر 18-24 ساعة بوساطة عروة الناقل (Loop) إلى شريحة زجاجية ووضع عليها قطرة من الماء المقطر، ونشرت على مساحة من سطح الشريحة وتم تثبيتها وصبغت بصبغة كرام، بعدها تم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي للتمييز بين شكل الخلايا وايجابيتها وسلبيتها لصبغة كرام (Betty *et al.*, 2007).

4- الفحوصات الكيموحيوية

لاجل تشخيص العزلات أجريت الفحوصات الكيموحيوية التالية وحسب ما ذُكر في (Koneman *et al.*, 1992 ; Betty *et al.*, 2007) وكالاتي:-

أ- فحص الأوكسيديز

تم أجراء هذا الفحص بأخذ عينة من المزروع البكتيري النامي على وسط الاكار المغذي المحضر على أن تكون المستعمرات النامية بعمر 24 ساعة بوساطة عيدان خشبية معقمة على ورقة ترشيح مبللة بكاشف الأوكسيديز، ودل ظهور اللون البنفسجي على إيجابية الفحص.

ب- فحص قابلية البكتريا على إنتاج الأندول

اجري الفحص بتلقيح وسط ماء الببتون بالعزلات البكتيرية وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، بعد ذلك أضيفت قطرة من كاشف كوفاكس Kovac's reagent، والدليل على ايجابية الفحص هو ظهور حلقة حمراء.

ج- إختبار المثيل الأحمر

تم تلقيح وسط أحمر المثيل فوكس بروسكاور بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ثم أضيفت بعد ذلك 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر إلى الوسط ورجّ برفق حيث إن تغير لون الوسط إلى اللون الاحمر دليل على إيجابية الفحص.

د- إختبار فوكس بروسكاور

لقح وسط المثيل فوكس بروسكاور بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة، بعد ذلك تم إضافة 6 قطرات من الكاشف A وقطرتين من الكاشف B إلى النمو الحاصل في وسط MR-VP ومزج جيداً، أن ظهور اللون الوردي دليل على إيجابية الفحص.

ر- إختبار قابلية البكتريا على استغلال السترات كمصدر وحيد للكربون

تم أجراء هذا الفحص بنقل جزء من المزروع البكتيري النامي على وسط الاكار المغذي وبعمر 24 ساعة، بوساطة إبرة معقمة إلى وسط أكار سيمون ستريت المائل، وزرع بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة، أن تغير لون الوسط من اللون الاخضر إلى الأزرق هو دليل على إيجابية هذا الفحص.

ز- إختبار أنتاج أنزيم اليوريز

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على أكار اليوريا بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، وكان تغير لون الوسط إلى اللون الوردي دلالة على إنتاجية البكتريا لأنزيم اليوريز.

و- إختبار قابلية البكتريا على الحركة و تخمر سكر المانيتول

تم أجراء هذا الاختبار وذلك بنقل جزء من المزروع البكتيري النامي على وسط الآكار المغذي وبعمر 24 ساعة بوساطة إبرة معقمة إلى وسط اكار المانيتول شبه الصلب وزرع بطريقة الطعن وحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة. تغير لون الوسط إلى الأصفر وإنتشار النمو وظهوره بشكل تضبب حول منطقة الطعن يعطي ايجابية الفحص.

ي- إختبار تخمر السكريات وإنتاج CO_2 و H_2S

تم تلقيح وسط آكار كليكلر الحديد المائل Kliglers بالعزلات البكتيرية وذلك بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل وحضن بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، بعدها تم التحري عن وجود H_2S إذ يتكون راسب أسود في قعر الأنبوبة وCO_2 من خلال ظهور الفقاعات الغازية ويعدّ دليلاً على تحررCO_2، وتغير لون الوسط إلى اللون الأصفر دليل على تخمير سكر الكلوكوز واللاكتوز. وتم تأكيد التشخيص بإستعمال عدة API 20E التي تحتوي على 20 إختبار كيموحيوي والمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO).

3- إختبار قابلية البكتيريا على تحمل الحموضة

اجري إختبار تحمل الحامض بطريقة الانابيب وبإستعمال وسط الببتون وعلى النحو التالي:

1. تحضير العالق البكتيري

نقلت 4-5 مستعمرات نقية ومنفردة وحديثة بواسطة عروة نقل من سطح وسط الآكار المغذي الى 10 مل من وسط الببتون القاعدي وحُضنت عند درجة حرارة 37م ولمدة 18 ساعة للحصول على تركيز 10^8خلية مل$^{-1}$ إذ استعمل هذا العالق في المراحل اللاحقة من الإختبار.

2. تحضير وسط الببتون القاعدي ذي الرقم الهيدروجيني المختلف

حضر وسط الببتون بقيم مختلفة عن الرقم الهيدروجيني وباستعمال حامض الهيدروكلوريك، تراوحت مابين 3-9، إذ وضع 10 مل في كل انبوبة وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة بكتيرية وعُقمت هذه الأنابيب في المؤصدة.

3. إجراء الاختبار

نقل 0.1 مل من العالق البكتيري لكل عزلة بواسطة ماصة دقيقة الى الأنابيب الحاوية على وسط الببتون ذي الارقام الهيدروجينية المختلفة وبعدها حُضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، إذ أن مكان وجود العكورة دليل على النمو وعدم وجودها دليل على عدم النمو، أن الانابيب التي كانت رائقة تم نقل جزء منها الى وسط TCBS وMacConky للتاكد من عدم وجود النمو، كما تم تغيير الرقم الهيدروجيني للأنابيب سالبة النمو إلى 8 وحُضنت مرة اخرى بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة للتاكد من وجود النمو من عدمه.

4- اختبار قابلية البكتيريا على تحمل كلوريد الصوديوم:

تحضير العالق البكتيري:

نقلت 4-5 مستعمرات نقية ومنفردة وحديثة بواسطة عروة نقل من سطح وسط الآكار المغذي إلى 10 مل من وسط الببتون القاعدي وحُضنت على درجة حرارة 37م ولمدة 18 ساعة للحصول على تركيز 10^8خلية مل$^{-1}$ إذ استعمل هذا العالق في المراحل اللاحقة من الإختبار.

تحضير وسط الببتون القاعدي بتراكيز ملحية مختلفة:

حضرت تراكيز ملحية 6% و7% و8% و9%، ثم لقحت هذه الانابيب بـ 0.1 من العالق البكتيري المحضر وحُضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة بعدها تم قراءة النتائج بظهور أو عدم ظهور النمو (العكورة).

5 - إختبار تحمل بكتريا الضمات لدرجات الحرارة المختلفة:

تحضير العالق البكتيري:

نقلت 4-5 مستعمرات نقية ومنفردة وحديثة بواسطة عروة نقل من سطح وسط الآكار المغذي الى 10 مل من وسط الببتون القاعدي وحُضنت على درجة حرارة 37 م ولمدة 18 ساعة للحصول على تركيز 108خلية مل-1 إذ استعمل هذا العالق في المراحل اللاحقة من الإختبار.

4. تحضير وسط الببتون القاعدي:

حضر هذا الوسط حسب التعليمات المثبتة على العبوة من قبل الشركة المصنعة ويتم تحضيره بإضافة 10غم ببتون و10غم NaCl و10مل من NaOH القاعدي، وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة، ثم ترك في الحمام المائي ليبرد إلى درجة حرارة 45 م وصب في أنابيب معقمة وحُفظ في الثلاجة بدرجة 4 م^o لحين الاستعمال. صُب في أنابيب زجاجية محكمة الغلق وبواقع 10 مل لكل أنبوبة وبثلاث مكررات لكل عزلة.

5.اجراء الاختبار:

اضيف 0.1 مل من العالق البكتيري الى الوسط أعلاه بحيث أصبح لدينا 15 أنبوبة لكل عزلة (وهي حصيلة خمس درجات حرارية وثلاث مكررات) حُضنت هذه الأنابيب بدرجة حرارة 37 م و25 م و15 م و5 م و-20 م. وتركت الأنابيب لمدة 18 ساعة وبعدها تم ملاحظة العكورة، كما تم إعادة النماذج التي لم تظهر فيها العكورة (درجتي 5 م، -20 م) إلى حاضنة درجة حرارتها 37 م لمدة 18 ساعة للتاكد من وجود بكتريا حية من عدمه.

النتائج والمناقشة

خلال الدراسة الحالية تم عزل وتشخيص بكتيريا الضمات من أسماك الكارب الفضي والشانك والبني بهياتها الطازجة والمجمدة من اسواق محافظة الناصرية وبواقع 150 سمكة (الجدول 1) ، في حين جمعت أسماك الصبور والكارب الفضي والشانك والبني بهياتها الطازجة والمجمدة، وقد جمعت هذه العينات من أسواق محافظة البصرة وبواقع 210 سمكة (الجدول 2)، واستمرت عملية جمع العينات للمدة من 2/حزيران/2013 ولغاية 30/تشرين الثاني/2013.

الجدول 1. اعداد الأسماك المجموعة من اسواق محافظة الناصرية

نوع الاسماك	مصدر الاسماك	اعداد الاسماك		هيئة الاسماك
الكارب	السوق الكبير	20	10	طازج
			10	مجمد
	سوق هرج	15	8	طازج
			7	مجمد
الشانك	السوق الكبير	25	12	طازج
			13	مجمد
	سوق هرج	30	15	طازج
			15	مجمد
البني	السوق الكبير	35	18	طازج
			17	مجمد
	سوق هرج	25	13	طازج
			12	مجمد
المجموع		150		

الجدول2. اعداد الأسماك المجموعة من اسواق مدينة البصرة

نوع الاسماك	مصدر الاسماك	اعداد الاسماك		هيئة الاسماك
الصبور	سوق البصرة الكبير	12	6	طازج
			6	مجمد
	العشار	16	8	طازج
			8	مجمد
	التنومة	20	10	طازج
			10	مجمد
	خمسة ميل	9	5	طازج
			4	مجمد
الكارب الفضي	سوق البصرة الكبير	10	5	طازج
			5	مجمد
	العشار	13	7	طازج
			6	مجمد
	التنومة	8	4	طازج
			4	مجمد
	خمسة ميل	17	9	طازج
			8	مجمد
الشانك	سوق البصرة الكبير	9	5	طازج
			4	مجمد
	العشار	17	9	طازج
			8	مجمد
	التنومة	19	10	طازج
			9	مجمد
	خمسة ميل	10	5	طازج
			5	مجمد
البني	سوق البصرة الكبير	14	7	طازج
			7	مجمد
	العشار	8	4	طازج
			4	مجمد
	التنومة	19	10	طازج
			9	مجمد
	خمسة ميل	9	5	طازج
			4	مجمد
المجموع		210		

لوحظ من نتائج هذه الدراسة أن نسبة عزل ضمات الكوليرا بلغ 3.8 % وأن هذه النسبة تُعد قليلة لبكتيريا ضمات الكوليرا وقد يعزى السبب في ذلك إلى احتمال كون هذه البكتيريا في غير مواسم الوباء لذا فانها تتواجد بنسب بسيطة جداً في المياه وهذه النتيجة تتماشى مع نتائج (عباس، 2004) و (Chavez *et al.*, 2006) و(Yildiz and Schoolnik, 1999).

1- الفحوصات المجهرية

لوحظ ظهور المستعمرات البكتيرية بلون اصفر على وسط TCBS(1971) Lythgoe and Lythgoe كما ظهرت تلك المستعمرات تحت المجهر عصوية الشكل او ما يشبه الضمة وتمتلك سوطاً في احد أقطابها مما يعطيها صفة القدرة على الحركة.

2- الفحوصات الكيموحيوية

بينت الاختبارات الكيموحيوية ان هذه البكتريا أنتجت قاعدة / حامض في اختبار KIA، وأنها موجبة لإختبار الأوكسيديز وسالبة لإختبار الأندول وإختبار فوكس بروسكاور واليوريز، ومتحركة ومحللة للدم من نوع بيتا عند زرعها على آكار الدم (Collee *et al.*, 1996).

3- فحص API20E التوكيدي:

تم اختبار هذا التشخيص باستعمال عدة API20E لتأكيد تشخيص بكتيريا الضمات وكالآتي: 27 كانت بكتيريا *V. cholera* و 3 كانت بكتيريا *V. fluvialis*، والجدول 3 يمثل الاختبارات البايوكيميائية.

الجدول 3. الفحوصات البايوكيميائية باستعمال عدة API 20E

Test	Reaction Enzymes	Results
ADH	Arginine dihydrolase	+
ONP	G Beta - glactosides	+
LDC	Lysine decaboxylase	-
CIT	utilization Citrate	-
ODC	Ornithin decaboxylase	-
H2S	production H2S	-
URE	Urease	-
TDA	Tryptophane Deaminase	-
IND	Indole production	-
NP	Acetone production	-
GEL	Glatinase	+
GLN	Glucose- fermentation	+
INO	Inositol fermentation	-
SOR	Sorbitol fermentation	+
RHA	Rhamnose fermentation	-
SAC	Sucrose fermentation	+
MEL	Melibinose fermentation	+
AMY	Amydgalin fermentation	+
ARA	Arabinose fermentation	+

الجدول 4. توزيع وأعداد الأسماك المصابة في محافظة الناصرية

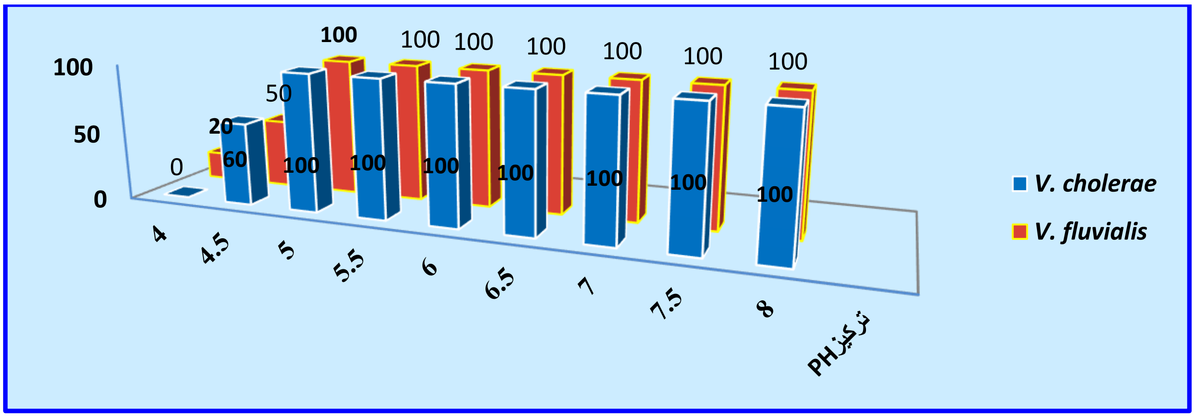
نوع الأسماك	مصدر الأسماك	إعداد الأسماك		هيئة الأسماك	عدد الأسماك المصابة	نوع الإصابة
الكارب	السوق الكبير	20	10	طازج	2	*V.cholerae*
			10	مجمد	0	-
	سوق هرج	15	8	طازج	1	*V.cholerae*
			7	مجمد	1	*V.cholerae*
الشانك	السوق الكبير	25	12	طازج	1	*V.cholerae*
			13	مجمد	0	-
	سوق هرج	30	15	طازج	1	*V.cholerae*
			15	مجمد	0	-
البني	السوق الكبير	35	18	طازج	0	-
			17	مجمد	0	-
	سوق هرج	25	13	طازج	1	*V.cholerae*
			12	مجمد	0	-

الجدول 5. توزيع وأعداد الأسماك المصابة في محافظة البصرة

نوع الأسماك	مصدر الأسماك	إعداد الأسماك		هيئة الأسماك	عدد الأسماك المصابة	نوع الإصابة
الصبور	سوق البصرة الكبير	12	6	طازج	3	*V.cholerae*
			6	مجمد	2	*V.cholerae*
	سوق العشار	16	8	طازج	0	-
			8	مجمد	0	-
	سوق التنومه	20	10	طازج	3	*V.cholerae*
			10	مجمد	0	-
	سوق خمسة ميل	9	5	طازج	1	*V.cholerae*
			4	مجمد	1	*V.cholerae*
الكارب	سوق البصرة الكبير	10	5	طازج	0	-
			5	مجمد	0	-
	سوق العشار	13	7	طازج	1	*V.cholerae*
			6	مجمد	1	*V.cholerae*
	سوق التنومه	8	4	طازج	1	*V.fluvialis*
			4	مجمد	0	-
	سوق خمسة ميل	17	9	طازج	3	*V.cholerae*
			8	مجمد	0	-
الشانك	سوق البصرة الكبير	9	5	طازج	1	*V.cholerae*
			4	مجمد	0	-
	سوق العشار	17	9	طازج	2	*V.cholerae*
			8	مجمد	0	-
	سوق التنومه	19	10	طازج	1	*V.fluvialis*
			9	مجمد	0	-
	سوق خمسة ميل	10	5	طازج	0	-
			5	مجمد	0	-
البني	سوق البصرة الكبير	14	7	طازج	0	-
			7	مجمد	1	*V.fluvialis*
	سوق العشار	18	4	طازج	0	-
			4	مجمد	0	-
	سوق التنومه	19	10	طازج	1	*V.cholerae*
			9	مجمد	0	-
	سوق خمسة ميل	9	5	طازج	1	*V.cholerae*
			4	مجمد	0	-

4- قابلية البكتيريا على تحمل الحموضة

لإختبار قابلية بكتيريا الضمات المعزولة في هذه الدراسة لتحمل حامضية البيئة أو الرقم الهيدروجيني، يتضح جلياً أن كلا النوعين بغض النظر عن مصادر العزل لم يستطع مقاومة رقم هيدروجيني أقل من 4.5 فيما عدا عزلة واحدة من عزلات *V. fluvialis* استطاعت النمو بصورة جيدة عند رقم هيدروجيني 4 وقاومت الحموضة بنسبة 20%، ويُعد الرقم الهيدروجيني 4.5 كخط شروع لتقدير قابلية تحمل بكتيريا الضمات للحموضة، إذ كانت نسبة تحمل الحموضة لبكتيريا *V.cholerae* و *V. fluvialis* 60% و50% على التوالي، في حين أن نسبة تحملها للحموضة كانت 100% عند pH مقداره (5.0، 5.5، 6.0، 6.5، 7.0، 8.0،7.5) وكما مبين في الشكل 1.

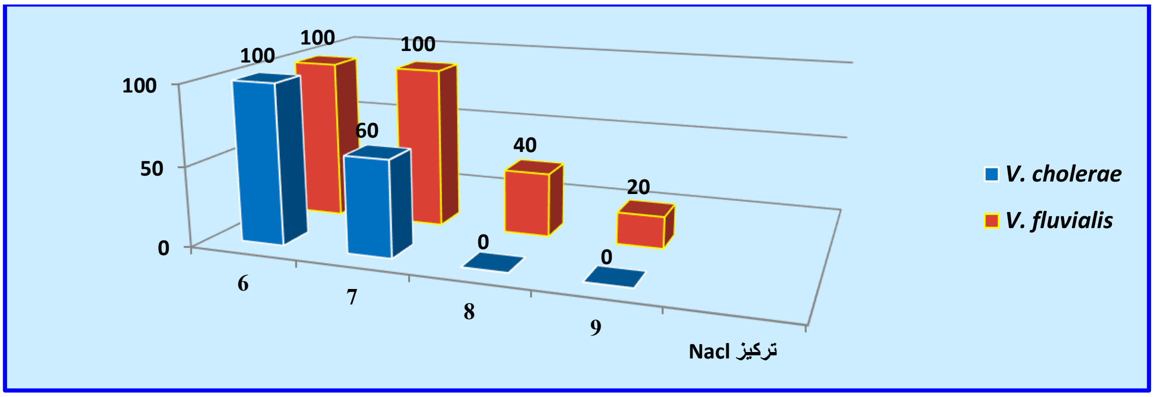


الشكل 1. قابلية الضمات *V. cholera* و*V. fluvialis* في تحمل الحموضة

إستنتج من الدراسة الحالية إن بكتيريا الضمات تمتلك مدى واسع من التحمل للتغيرات في الرقم الهيدروجيني وهذا ما اتفق مع دراسات أخرى (Islam *et al.*, 1994; Elliot *et al.*, 2001). كذلك دراسة أخرى تؤكد نمو الضمات عند رقم هيدروجيني عالي جداً بحدود 9.5-8.5 (Brooks *et al* ., 2007). كذلك في دراسة لعزلات بكتيريا *V. fluvialis* من نهر ديالى في محافظة كركوك، وجد الباحث انها نمت عند pH تراوح بين 5-10 (عباس، 2004). في حين ذكرت الفرطوسي (2002) أن الضمات نمت بصوره جيده عند pH = 4.5، كذلك في دراسات أخرى أثبتت أن لضمات الكوليرا القدرة على مقاومة الرقم الهيدروجيني 4 لامتلاكها جينات لتحمل الحموضة (gshB، Pnp) موجودة على الكروموسوم الكبير (Al-Ani *et al.*, 2000; Merrell and Camilli, 2002).

5. تحمل البكتيريا لتركيز مختلفة من كلوريد الصوديوم

بينت من الدراسة الحالية قابلية بكتيريا ضمات الكوليرا على مقاومة الملوحة ضمن تركيز 6% و7%، الا أن كافة العزلات لم تستطع النمو في درجة ملوحة 8% و9%. أما بكتيريا *V. fluvialis* فلوحظ من الشكل 2 قابليتها على مقاومة الملوحة في كل التراكيز المذكورة، فضلاً عن وجود عزلة واحدة استطاعت النمو على تركيز 9% من كلوريد الصوديوم وهذه العزلة تم اخذها من سمك البني المجمد من سوق البصرة الكبير. وقد اظهرت الدراسات أن *Vibrio* spp. لها قدرة على العيش والتواجد في تركيز 6% والسبب يرجع في تحملها للملوحة هو احتوائها على جينات tcpR لتحمل الملوحة (Collier *et al.*, 1998; Mashra *et al.*,2003; Janda *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1994). وبشكل عام فأن كافة العزلات بغض النظر عن مصدر العزل تمكنت من النمو على نسبة ملوحة 6% وتباينت نسب نموها على درجات الملوحة الأخرى 7 و8 و9 %. وهذا ما تطابق مع دراسة الصنهير (2004)، إذ وجد أنواع الضمات تنمو وتتحمل تراكيز ملحية هي 1 و3 و6 و10% كذلك وجد ان بعض عزلات *V. fluvialis* تستطيع النمو عند تركيز 11 و12%، وقد عزى السبب الى قابلية هذه الانواع من البكتيريا للتأقلم، إذ انه عزلها من اسماك نهرية تعيش في مياه عذبة. كذلك فان دراسات أخرى ذكرت قدرة *V. fluvialis* على تحمل تركيز 10% (Finegold and Martin, 1982; Lennette *et al.*, 1985).



الشكل 2. قابلية الضمات *V. cholera* و*V. fluvialis* في تحمل الملوحة

6. تأثير درجات الحرارة على نمو البكتيريا

استطاعت كافة عزلات البكتيريا من مختلف المصادر النمو بدرجة حرارة 25 م و37 م وكذلك بدرجة حرارة الغرفة والتي كانت 15 م° وقت أجراء التجربة. كما بين جدول 6 أن عزلات بكتيريا الضمات استطاعت النمو بكثافة قليلة جداً على درجة حرارة 5 م ولم تستطع أي من هذه العزلات النمو في درجة حرارة -20 م. أجريت هذه التجربة بإستعمال وسط زرعي سائل (ماء البيتون القاعدي)، وفي محاولة للتعرف على مدى تأثير درجات الحرارة الواطئة على حيوية وبقاء بكتيريا الضمات فقد تم نقل جزء من وسط النمو المزروع بالبكتيريا والمحضنة بدرجة حرارة 5 م و-20 م إلى الوسط الزرعي التخصصي الصلب TCBS وحُضنت بدرجة حرارة 37 م. من ناحية أخرى تم تحويل الأوساط الزرعية السائلة الملقحة ببكتيريا الضمات والمحضنة بدرجة 5 م و-20 م إلى درجة 37 م ولمدة 24 ساعة. ولوحظ من النتائج المبينة في الجدول أن كافة العزلات استطاعت النمو بدرجة 37 م بعد التحويل. كما استطاعت كافة العزلات المنقولة من 5 م من النمو على وسط TCBS عند حضنها بدرجة حرارة 37 م في حين لم تستطع العزلات الأخرى النمو على وسط TCBS بعد نقلها من درجة حرارة -20 م.

الجدول 6. تأثير درجات الحرارة المختلفة على نمو الضمات

ت	نوع العزلة	درجات الحرارة (م)					الحضن على 37 م°		زرع على TCBS	
		37	25	15	5	20-	5	20-	5	20-
1-	*V. cholerae*	+	+	+	_	_	+	+	+	_
2-	*V. fluvialis*	+	+	+	_	_	+	+	+	_

المصادر

البنا، عمرو عبد الرحمن. 2001. التسمم البكتيري والفطرية، مكتبة المعارف الحديثة. الاسكندرية، جمهورية مصر العربية. 108ص.

الصنيهر، أنور عيسى محمد. 2004. مدى إنتشار وأمراضية أنواع من الفيبريو في بعض الأسماك المستزرعة في المملكة العربية السعودية، اطروحة دكتوراه. كلية العلوم – جامعة الملك سعود. 103ص.

الفرطوسي، هناء فرحان. 2002. تحديد المحتوى الجيني ودراسة تأثير بعض العوامل الكيميائية والفيزياوية على ضمات الكوليرا *Vibrio cholerae* المعزولة محلياً. رسالة ماجستير. كلية العلوم - الجامعة المستنصرية. 145ص.

برانية، احمد عبد الوهاب، الجمل عبد الرحمن عبد اللطيف، عيسى محي سعيد، عثمان، محمد فتحي وصادق شريف شمس الدين. 1997. الاسس العلمية والعملية لتفريخ ورعاية الاسماك والقشريات في الوطن العربي – الجزء الثاني. الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة. 64 ص.

عباس، نجدت بهجت مهدي. 2004. عزل وتشخيص بكتريا *Vibrio fluvialis* من مياه نهر ديالى ودراسة تأثير بعض العوامل البيئية عليها. مجلة تكريت للعلوم الصرفة. المجلد (12) العدد (1): 223-225.

Al-Ani, Z. N.; N. H. Amer and S. Samera. 2000. Acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *J. Technical*. 9: 18.

Berge`s, L.; H. Rodriguez-Villalobos; A. Deplano and M. Struelens. 2007. Prospective evaluation of imipenem / EDTA combined disc and E-test for detection of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrobial Chemother*. 50: 812-813.

Betty, A. ; F. Daniel and S. Alice. 2007. Diagnostic Microbiology. (12th ed). China. 24: 1031p.

Brooks, F. ; S. Janet; C. Karen and A. Stephen. 2007. A Lange medical book of Medical Microbiology. 24th. The McGraw- Hill Companies, Inc. America: 263-269.

Chavez, D. C.; V. P. Sedas; E. O. Borunda, F. L. and F. L. Reynosa. 2006. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrence of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster- producing area of Veracruz Mexico Mar. *Pollut. Bull*. 3: 334-342.

Collee, J. G.; A. G. Fraser; B. P. Mermion and A. Simmons. 1996. Mackie and MacCatney. Practical Medical Microbiology. P.425. (14th ed.) Churchill Linvingstone Philadelphia.

Colleir, L. ; A. Balows and M. Sussman, 1998. Topley and Wilson`s Microbiology and Microbial Infections, (9th ed.) 2. Systematic Bacteriology. Arnold, Great Britain.

Dulcic, J., N. Skakelja; M. Kraljevic and P. Cetinic. 1998. On the fecundity of the Black Sea bream, *Spondyliosoma cantharus* (L.), from the Adriatic Sea (*Croatian coast*). *Scientia Marina*., 62(3): 289-294.

Elliot, E. l; C. A. Kaysnar and N. L. Tamplin. 2001.*Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Bacteriological Analytical Manual online. chapter-9 Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Finegold, S. M. and W. J. Martin. 1982. Diagnostic Microbiology. (6th ed.) Mosby Company.

Furniss, A. L.; J. V. Lee and T. J. Donovan. 1977. Group F, a new *Vibrio*? Lancet. 10: 565-566.

Hameed, A. S. S. 1993. A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. Aquaculture 117: 195-204.

Holt, J. G.; N. R. Krieg, P. H. Sneath and H. Bergy. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, (9th ed). Lippincott, Williams and Wilkins. East Lansing. Mich.

Islam, M . S. ; Hasan, M. K.; Miah, M. A.; M. Yunis ; K. Zaman and M. J. Albert. 1994. Isolalation of *Vibrio cholerae* O139 synonyin from aquatic environment in Bangladish: Application for disease transmission. *Appl. Invir. Micro.* 60: 1684-1686.

Janda, J. M; C. Powers; R. G. Bryant and S. L. Abbot. 1988. Current prespectives on the epidemiology and pathogensis of clinically significant *Vibrio* spp. *Clin. Micro .Rev.*, 1(3): 245- 267.

Johnston, M. D. and M. H. Brown. 2002. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio cholerae* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperature and studies on their sensitivity to heating and freezing. *Appl. Micro.* 92(6): 1066-1077.

Koneman, E. W.; S. D. Allen, W. M. Jawa and P. C. Sachreckeber. 1992. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. (4th ed.) J. B. Lippincott company. Philadelphia.

Lennette, E. H. ; A. Balows; W. J. Hausler and H. J. Shadomy. 1985. Manual of Clinical Microbiology, (4th ed.). American Society for Microbiology Washington, D. C.

Lythgoe, J. and G. Lythgoe. 1971. Fishes of the sea: The coasted water of the British Isles, Northern Europe and the Mediterranean, A photographic guide in colour. Blandford Press, London, England.

Merrell, D. S. and A. Camilli. 2002. Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. Current Opinion in Microbiology.5: 51-55.

Mishra, A.; R. Srivastava; C. Pruzzo and B. Srivastaval. 2003. Mutation in tcpR gene (VC 0832) of *Vibrio cholerae* O1 causes loss of tolerance to hight Osmolarity and affects colonization and virulence in infant mice. *J. Med. Microbiol.*, 52: 933-939.

Sleigh, J. D. and M. G. Timbury. 1994. pH- Regulated Gene and Survival at External pH-Cellular and Molecular BologyI (2nd ed.). P.1539 -1546. ASM. Press, Washington.

Iu, L.; A. S. Maramovich and A. L. Gintsburg, 2001. Strategies of adaptive changes in *Vibrio cholera* in natural water reservoirs. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 11: 20-25.

Wai, S. N.; Y. Mizunoe; A. Takade; S. Kawabata and S. lchiy. 1998. *Vibrio cholera* O1 strain TSI- 4- produces the exopolysaccharide Materials that Detect Morphology, Stress Resistance and Biofilm Formation. *Appl. Envi. Micro.*,64(10): 3648-3655.

Yildiz, F. H. and G. K. Schoolink. 1999. *Vibrio cholera* O1 Eltor: Identification of gene cluster required for the rugose colony type exopolysaccharid production, chlorine resistance Biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(7): 4028-4033.

EFFECT OF SOME ENVIRONMENTAL CONDITION *VIBRIO CHOLERAE* AND *VIBRIO FLUVIALIS* BACTERIA ISOLATING FROM FISH PROFFERED IN LOCAL MARKETS OF BASRAH AND NASIRIYAH CITY

Al- Hussainy Khadeeja S. [1] Asst. Prof. Al-Tememy Manal S. [2] AL-gboory Athra O. [3]

[1] Department of Food Science, Collage of Agriculture, University of Basrah, Basrah,Iraq
yahoo .com @ Khadeeja_jaffer
[2]. Department of Life Sciences, Collage of Sciences, University of Dhi Qar, Dhi Qar, Iraq
[3] Department of Life Science , Collage of Sciences, University of Dhi Qar, Dhi Qar, Iraq

ABSTRACT

There was isolating and identifying *Vibrios* bacteria that taken from fresh and frozen fish, such as Suoboor *Tenualosa ilisha*, Silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, Beni *Barbus sharpey* and Shanak *Acanthopagrus arabicus*, we collected 210 fish from Basrah markets (Big market in Basrah, Al-Ashar, Al- Tanoma and Khmsameel) while we collected 150 fish from Silver carp, Beni and Shanak from Nasiriyah market (Big market and Harj market) this collecting process of samples taken a period from 2-June to 30-November\2013. Fish bring to laboratory and the samples taken from it and planted directly on agricultural medians. (nutrient agar, blood agar, MacConkey agar and selective media (Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose Agar TCBS)) then the dishes were incubated aerobically at temperature 37C° for 18 – 24 hours. After the period of incubation, we identify 30 positive samples from *Vibrios* and this genus relianced to the shap of cultures and cell under microscope and by Catalase test

,Oxidase test and motion test afer that identifying the types relianced to biochemical tests and using certain API20E system, that indenting two kinds from *Vibrios* bacteria *Vibrio cholera* and *Vibrio fluvialis*. we confirmed that fresh fish including these bacteria more than frozen fish.*Vibrio cholera* and *Vibrio fluvialis* bacteria to be distinguished by percentage of durability of acidittoy reach to 100% at pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0, while we observed that the percentage of durability of acidity for *Vibrio cholera* bacteria reach to 60% at pH 4.5, but the *Vibrio fluvialis* bacteria was more resistant to acidity on 20% and 50% at pH 4.0 and 4.5 respectively.

The study showed the ability of *Vibrio cholera* bacteria to resistant for salinity was reach to percentages 60% and 100% at concentrations 6% and 7% respectively, but it didn't grow on concentrations 8% and 9%.

For the *Vibrio fluvialis* bacteria was resistant salinity in all concentrations but with different percentage reach to 100% at concentrations 6%, 7% and 40% at concentration 8%, but at concentration 9% there is only one sample had resistant on 20% which it as frozn sample. All isolation from different sources could growth in 25 and 37 C^{o} and in room temperature 15 C^{o} through worken in this experiment, but some isolation of *Vibrios* bacteria could growth with little density in 5 C^{o}, while it couldn't growth in -20 C^{o}.

key words: isolating *V.cholerae* and *V. fluvialis*, Vibrios bacteria, *Vibrio* spp., fresh and frozen fish and identifying.

*Part of Msc. thesis for the third researcher.