عزل وتشخيص بكتريا *Aeromonas hydrophila* من مياه نهر دجلة و دراسة قابليتها على انتاج البروتيز و الهيمولايسين

رشا محمد ساجت العكيلي استبرق محمد علي سلمان العبيدي ابتسام حمود ناصر
كلية العلوم–الجامعة المستنصرية
Eglegsh2000@yahoo.com

الخلاصة

جمعت 80 عينة مياه من مناطق مختلفة من نهر دجلة, تم عزل 25 عزلة (30%) تعود لبكتريا *Aeromonas hydrophila* وشخصت بأستعمال جهاز MiniApi32E اضافة الى الطرق الروتينية المعروفه، اختبرت قابليتها على انتاج البروتيز وذيفان الهيمولايسين. اظهرت النتائج ان جميع العزلات منتجة لانزيم البروتيز وذيفان الهيمولايسين نوع β .

الكلمات المفتاحية: نهر دجلة ، جنس *Aeromonas* ، hydrophila ، جهاز MiniApi32E.

Abstract

Eighty water samples were collected from different locations of Tigris river, 25 isolates (30%) were isolated and identified as *Aeromonas hydrophila* using MiniApi32 E ,in addition to traditional routine methods .Their abilities for production of protease and hemolysin were tested. The results showed that all isolates were produced the protease and β- hemolysin.
Keywords: Tigris river, *Aeromonas* , hydrophila, MiniApi32E.

المقدمة

أخذت مشكلة توفر المياه الصالحة للشرب في العراق من حيث الكم و النوع تتفاقم لاسباب كثيرة اهمها انخفاض منسوب المياه في نهري دجلة و الفرات و قلة جريانها , و أزدياد مصادر التلوث بسب الظروف الحالية و عدم الاهتمام بمعاملة مياة المجاري بالشكل الصحيح قبل أعادتها الى مجرى النهر , بالاضافة الى رمي الحيوانات النافقة فيها (النزال و اخرون ، 2009) . اذ تدخل الكائنات الدقيقة و منها البكتريا و الانواع المايكروبية الاخرى الى المياه مع فضلات الانسان او مع فضلات معامل الدباغة و الجلود و المجازر و صناعة الالبان و غيرها (عبد الرحمن و اخرون ،2009) .

لايعد وجود أنواع البكتريا في المياه هو مكمن خطورة و انما يتم التركيز فقط على البكتريا المرضية ومن اشهر الانواع المرضية الموجوده في نهر دجلة هو : *Escherichia coli* و *Enterobacter aerogenes* و *Sallmonella sp* و *Klebsiella sp* و *Shigelle sp* و *Pseudomonus sp* و *Aeromonas sp* و *Vibrio cholera* (Sharon *et al*. ,2009) .

بدأ الاهتمام ببكتريا *A. hydrophila* منذ عام 1962, اذ تعود هذه البكتريا لجنس *Aeromonas* و هو من اشهر اجناس عائلة *Aeromonadaceae* , و هي عصيات سالبة لصبغة كرام , و هي موجبة لكل من فحص الاوكسديز والكتاليز و سالبة لفحص اليوريز وسالبة لفحص السترنك (string test) الذي يفرق بينها و بين *Vibrio cholera* (Sharon *et al*.,2009)، تنتشر بصورة واسعة في الطبيعة لاسيما في البيئات المائية مثل الانهار ومياه الصرف الصحي وماء الشرب والبحيرات كذلك توجد في الاغذية البحرية كالاسماك والروبيان والفواكهة الطازجة(Yardimci and Aydin, 2011) .

تتواجد هذه البكتريا في الكائن الحي بشكل نبيت طبيعي لانها تعد من الممرضات الانتهازية لذا تصيب المسنين والاطفال والمرضى الذين يعانون من نقص مناعي، كما تسبب حالات مرضية عديدة منها التهاب

المعدة والامعاء Gastroenteritis وتجرثم الدم Bacteremia واسهال مائي وتلوث الجروح (Bhowmik *et al.*,2009) . وتمتلك العديد من عوامل الضراوة التي لها دور في احدث الاصابات في الانسان والحيوان , ومن هذه العوامل الهيمولايسين المعروف بأسم Aerolysins وانتاج الـ haemagglutinins و proteases وذيفانات الـ cytotonic و cytotoxic (Merino *et al.*,1999) .

نظرا لزيادة الحالات المسجلة لاصابة الاشخاص المتعاملين مع البيئات المائيه كالصيادين و غيرهم ببكتريا *A. hydrophila* (Bhowmik *et al.*,2009) , هدفت هذه الدراسة الى عزل و تشخيص هذه البكتريا من مياه نهر دجلة بأستخدام جهاز MiniApi32E بالاضافة للطرق الروتينية ودراسة قابليتهاعلى انتاج بعض من عوامل الضراوه كأنتاج انزيم البروتيز وذيفان الهيمولايسين

جمع العينات

تم جمعت 80 عينة من مياه نهر دجلة وعلى مسار النهر باتجاه الجنوب من 8 مناطق مختلفة (التاجي، مشروع ماء الكرامة، مدينة الطب، جسر السنك، معمل الزيوت، مصفى الدورة، الرستمية، جسر ديالى) ولمدة اربع أشهر من 1/2/2011 ولغاية 1/6/2011 جمعت العينات من عمق 30 سم عن بعد نصف متر تقريبا من ضفة النهر بأستخدام قناني زجاجية سعة 100 مل معقمة و محكمة الغلق و نقلت مباشرة الى المختبر لاجراء الفحوصات اللازمة.

عزل البكتريا من العينات المائية :

خلطت كل عينة ماء مع حجم مساوي من وسط ماء البيتون القاعدي المضاعف Doubal Alkaline pepton water (APW) المجهز من شركة Mast– U.K ثم حضنت عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة , اخذت قطرة من كل نموذج بعد انتهاء مدة الحضن ثم زرعت بطريقة التخطيط على وسط Ampicillin dextrin agar (ADA) المضاف له 1ml/1 litre من Ampicillin dextrin ووسط Thiosulphate–citrate–bile salts– sucrose (TCBS) اكارالمجهز من شركة Merk– Germany ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ، بعدها اخذت مستعمرة وزرعت على وسط Tryptic soy agar (TSA) المجهز من شركة Himedia–India لغرض التاكي (Holt *et al.*,1994) .

تشخيص العزلات

شخصت العزلات البكتيرية اعتمادا على الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests والمواصفات الزرعية للمستعمراتCultural properties على وسط ADA ووسط TCBSواكارماكونكي واكار الدم و الفحص المجهري Microscopical tests للخلايا البكتيرية (Bhowmik *et al.*, 2009).

تشخيص *A. hydrophila*

استخدم جهازMiniApi32E المجهز من قبل شركة Biomerieux الفرنسية, لزيادة تاكيد التشخيص، فقد استخدم نظام Rapid ID32E (Identification DES Enterobacteriaceae) و ID32GN (Identification DES Gram Negative) , اذ يتضمن هذا النظام 32 اختبارا كيموحيويا ، ويشخص البكتريا الى مستوى النوع (Species) , حيث تم عمل عالق العزلات البكترية المراد تشخيصها ومقارنته مع مكفرلاند رقم 0.5 اضيف 55 مايكروليتر من هذا العالق لـ 32 حفرة (wells) الموجودة ضمن شريط الفحص الخاص بالجهاز, ثم اضيفت قطرة من Mineral oil الى الحفر السبعة الاولى في الصف الاعلى لتهيئة

الظروف اللاهوائية اللازمة لهذه الاختبارات والمتضمنة GAT و LARL و URE و LDC و ODC و ADH و 5KG. اضيف قليل من الماء الى قاعدة العلبة الحاوية على الاشرطة لتوفيرالرطوبة وعدم جفاف العالق البكتيري المضاف الى الاختبارات وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة (لشريط ID32GN) . بعد انتهاء فترة الحضن تم اضافة كاشف الاندول قطرة واحدة قبل ادخال الشريط للجهاز لغرض قراءة النتائج . ولنفس الخطوات استعمل للشريط ID32 Rapid ماعدا ان قرائته بعد 6 ساعة من الحضن وكذلك اضيفت قطرة من الزيت (mineral oil) الى الاختبارات الـODC و LDC و URE، تم قراءة نتائج النوعين من الاشرطة الياً Automatic Reading حيث ظهرت النتائج على الشاشة المرافقة للجهاز من جنس ونوع (العكيلي و اخرون ,2012) .

الكشف عن قابلية العزلات على انتاج انزيم البروتيز

اختبرت قابلية العزلات على انتاج البروتيز بأستخدام وسط اكار حليب الفرز(Skim Milk Agar) وحسب ما ورد في (نادرو اخرون ، 2009) , أذ استخدم وسط مرق نقيع القلب و الدماغ Brain–heart) (infusion broth المجهز من شركة Rashmi Diagnostic – India لتنمية و تنشيط العزلات , و حضن الوسط عند درجة حرارة 37 ° م لمدة 24 ساعة بعدها نبذ المزروع بأستخدام النبذ المركزي المبرد بسرعة 6000 دورة/ دقيقة ثم اخذ 100 مايكروليتر من راشح كل عزلة و وضع في حفر مقاسة على وسط اكار حليب الفرز (حضر هذا الوسط بأضافة 5% من حليب فرز الى وسط الاكار المغذي Nutrient agar المجهز من شركة Himedia–India وحضن الوسط عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24ساعة .

الكشف عن قابلية العزلات على انتاج ذيفان الهيمولايسين:.

اختبرت قابلية العزلات على انتاج الهيمولايسين بأستخدام وسط اكار الدم Blood agar (الذي تم تحضيره بأضافة 7% من الدم الى وسط قاعدة اكار الدم Blood agar base المحضر حسب تعليمات الشركة Mast–U.K و المعقم و المبرد الى درجة حرارة 45 ° م و صب بعدها اطباق معقمة) وحسب ما ورد في (Fobes *et al.*,1998) . فقد اختبرت كل عزلة بنقل مستعمرة منها بعمر 24 ساعة من وسط اكار المغذي و نشرت على وسط اكار دم الانسان و حضنت لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 °م .

الكشف عن قابلية العزلات على انتاج انزيم الاوكسيديز :

اختبرت قابلية العزلات البكتيرية على انتاج انزيم الاوكسيديز , بنقل مستعمرة مفردة من كل منها و هي بعمر 24–18 ساعة من وسط TSA و الاكار المغذي بواسطة عود خشبي معقم الى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الاوكسيديز (Tetramethyl – p – phenylenediamine dihydrochloride) , تعد نتيجة التفاعل موجبة عندما يتحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق خلال 10 ثوان و هذا دليل على انتاج العزلة لانزيم الاوكسيد(Jawetz *et al.*, 2004) .

فحص السترنك (Sring test)

تم نقل مستعمرة من كل عزلة و هي بعمر 24–18 ساعة من وسط الاكار المغذي الى شريحة زجاجية ثم اضيفت بعض قطرات من محلول 0.5% Sodium deoxycholate مع التحريك بواسطة عود خشبي و بعدها سحب العود الى الاعلى ببطء , فأذا تكونت لزوجة عائدة لتحلل البكتريا هذه دلالة على ايجابية الفحص, العكس يعني ان نتيجة الفحص سالبة (Bhowmik *et al.* ,2009) .

تشخيص العزلات بقرص المركب الكيميائي O129

تم تحضير عالق بكتيري من كل عزلة بأخذ جزء من المزروع البكتيري النقي بعمر 24-18 ساعة و مقارنة هذا العالق مع مكفرلاند رقم 0.5 و اخذ 100 مايكروليتر من العالق و صب على وسط مولرهنتون Muller Hinton agar المجهز من شركة Rashmi Diagnostic – India و نشر بواسطة الـ swab معقمة ثم ترك ليجف لمدة 10 -15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة بعدها تم تثبيت قرص مركب 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine phosphate و الذي يرمز له O139 بتركيز 150µg/disc بواسطة ملقط معقم على سطح وسط مولرهنتون ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة , لوحظت النتيجة الموجة للفحص بنمو البكتريا بوجود قرص الـ O139 , اما تكون الهالة الشفافة حوله فتعني ان نتيجة الفحص سالبة ,اذ يعتمد هذا الفحص لتمييز جنس بكتريا *Vibrio cholera* التي تكون حساسه لهذا المركب بعكس بكتريا *Aeromonas hydrophila* التي تكون مقاومة له (Jawetz *et al.*,2004) .

النتائج والمناقشة

تضمنت الدراسة الحالية التحري عن وجود بكتريا *A. hydrophila* في البيئات المائية لمناطق مختلفة وعلى مسار نهر دجلة , اذ جمعت 80 عينة من ثمان مناطق مختلفة. شخصت عزلات الـ*A. hydrophil* اعتمادا على صفات مستعمراتها الزرعية و من خلال الزرع على الأوساط الزرعية التفريقية التي تضمنت وسط ADA و وسط اكار TCBSووسط اكارالماكونكي واكارالدم والتي من خلالها أمكن تثبيت الصفات الزرعية للمستعمرات والصفات المجهرية للخلايا البكتيرية الخاصة بها .

اظهرت نتائج جميع العزلات نمو واضح وعكورة في الوسط الزرعي APW بعد مرور 24 ساعة وعند نقل Loopful من النمو الى الاوساط الزرعية الاخرى المستخدمة وهي وسط ADA و وسط TCBS و وسط ماكونكي و وسط اكار الدم ووسط الاكار المغذي فحصت البكتريا زرعياً اعتماداًعلى صفات المستعمرات من شكل وحجم ولون وقوام، إذ تميزت مستعمرات البكتريا *A. hydrophila* على وسط TCBS بكونها دائرية، متوسطة الحجم، ملساء ، مسطحة، صفراء متألقة الى خضراء مزرقة ، و بسب قاعدية هذا الوسط واحتوائه على ملح كلوريد الصوديوم NaCl وأملاح الصفراء فهو يعمل على تثبيط معظم أنواع البكتريا عدا المحبه للملوحه وظهرت على وسط ADA بشكل مستعمرات صفراء وهذا يتوافق مع ماجاء في (Jawetz *et al.*, 2004), . اظهرت نتائج الفحص المجهري للعزلات كونها عصيات سالبة لصبغة غرام و هذا يتوافق مع ما جاء في (Bhowmik *et al.*,2009).

لغرض تاكيد فحوصات التشخيص الاولي للعزلات اجريت الاختبارات الكيموحيوية كما موضح في جدول (1) و وفق ما جاء في (Jawetz *et al.*, 2004) , اذ اظهرت جميع العزلات ايجابية لاختبار الأوكسيديز، كما انها أظهرت نتيجة سالبة لاختبارالسترنك (String test) وهذا يتوافق مع ما جاء في (Abbott *et al.*, 2003) . وعند نموها على وسط KIA المائل اظهرت نتيجة موجبة بظهورسطح المائل بلون احمر قاعدي والقعر بلون اصفر حامضي نتيجة قابلية العزلات على تخمير سكرالكلوكوزفقط الموجود في الوسط, مع عدم تكوين غاز H_2S بأستثناء عزلتين فقط وهذا يتوافق مع ماجاء في (Bhowmik *et al.*,2009). و عند زرع العزلات في وسط Nutrient broth بوجود ملح NaCl وبتراكيز (0% و1% و7% و8%) ولمدة اكثر من 7 ايام, أظهرت جميع العزلات نمو واضح وعكوره في كل من التركيزين 0% و1% وعدم المقدرة على تحمل كل من التركيزين 7% و8% و ذلك يتوافق مع

(NHS,2010). اختبرت حساسية العزلات تجاه المركب التشخيصي O129 وكانت جميع العزلات البكتيرية المعزولة من المياه مقاومة له وهذا يتوافق مع ما جاء في (Holt *et al.*,1994 and Jawetz *et al.*, 2004) .

التشخيص باستخدام الجهاز MiniApi 32 :

لغرض زيادة التأكد من تشخيص العزلات البكترية ولمعرفة النوع (Species) استخدم جهاز MiniApi32E المكمل لنتائج الاختبارات الكيموحيوية ،اذ أظهرت النتائج الواردة في الجدول (2) ان 25 عزلة مشخصة من مجموع 80 عينة ماء عائدة لبكتريا *A. hydrophila* أي ان نسبة 30% من العينات كانت حاوية على هذه البكتريا .

اختبرت قابلية عزلات بكتريا *A. hydrophila* على إنتاج البروتييز من خلال تحليل البروتين عند نقل راشح العزلات الى الحفر المعمولة على وسط الـ Skim Milk agar وحضنها عند درجة حرارة 37° م لمدة 24 ساعة، حيث أظهرت النتائج تكون هالة شفافة حول المستعمرات النامية على هذا الوسط دلالة على ان جميع العزلات قادرة على إنتاج البروتييز, و هذا يتوافق مع ما جاء في دراسة (نادرواخرون , 2009) . وكذلك تم الكشف عن قابلية هذه العزلات على إنتاج انزيم الهيمولايسين من خلال تحليل الدم عند تنميتها على وسط اكار الدم الاساس المضاف له 7% من دم الانسان وحضنها عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة، اذ أظهرت النتائج ان جميع العزلات قادرة على تحلل الدم بشكل كامل وظهور هالة شفافة حول المستعمرات لتشير بذلك على قابلية هذه العزلات على إنتاج انزيم الهيمولايسين نوع β .

أظهرت الدراسة ان جميع (100 %) عزلات بكتريا *A. hydrophila* قيد الدراسة و المعزولة من البيئة المائية كانت منتجة لعوامل الضراوة البروتيز و الهيمولايسن , بعكس ما جاءت به نتائج دراسة Bhowmik و جماعته (2009) التي بينت ان اكثر من 70% من عزلاته البيئية لا تملك عوامل الضراوة البروتيز و الهيمولايسين . و بذلك فأن هذه الدراسة تبين ان عزلات بكتريا *A. hydrophila* البيئية قيد الدراسة هي ممرضات كامنة الضراوة , قد يكون السبب هو مشاكل الصرف الصحي و اسباب عدم معاملة المياه قبل اعادتها لمجرى النهر(النزال واخرون , 2009) . لذا توصي الدراسة بأستمرار مراقبة مثل هذه المؤشرات للتلوث البكتيري نظرا لخطورتها على الصحة العامة , كما توصي الدراسة بأستخدام جهاز MiniApi 32 لاغراض تشخيص العزلات لما يوفره من جهد ووقت و دقة بالنتائج , لاسيما انه يشخص البكتريا الى مستوى النوع .

جدول (1): نتائج بعض الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بالعزلات قيد الدراسة

العزلات		اسم الاختبار							النمو في NaCl			
اشهر العزل	رقم العزلات *A. hydrophila*	اوكسيديز Oxidase	سترنك String	O 129 150µg/ disc	لون المستعمرات على وسط TCBS	نتيجة النمو على وسط KIA	انتاج البروتيز	انتاجβ هيمولا يسين	8%	7%	1%	0%
شباط	1	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	2	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	3	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	4	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
اذار	5	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	6	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	7	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	8	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	9	+	-	R	Blwish-green	A/K Gas+ H2S-	+	+	-	-	+	+
	10	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	11	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
نيسان	12	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	13	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	14	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	15	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	16	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
ايار	17	+	-	R	Blwish-green	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	18	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	19	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	20	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	21	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	22	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	23	+	-	R	YELLOW	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	24	+	-	R	Blwish-green	A/K Gas- H2S-	+	+	-	-	+	+
	25	+	-	R	YELLOW	A/K Gas+ H2S-	+	+	-	-	+	+

- **+ : positive result (نتيجة موجبة)**
- **- : negative result (نتيجة سالبة)**
- **R : resistance (مقاومة)**
- **KIA : Kligler iron agar (اكار كلكلر حديد)**
- **TCBS : Thiosulphate citrate bile salt source agar(اكار مصدر ثايوكبريتات سترات املاح الصفراء)**
- **A / B : alkaline slant / acid bottom تفاعل يظهر السطح قاعدي و القعر حامضي ((اصفر)) و ذلك بسبب تخمر سكر الكلوكوز فقط .**
- **Yellow : صفراء**
- **Blwish-green : خضراء مزرقة**

جدول (2) : نتائج فحوصات جهاز MiniApi32E لعزلات البكتريا قيد الدراسة

التسلسل	اسم الاختبار	رمز الاختبار	النتيجة	التسلسل	اسم الاختبار	رمز الاختبار	النتيجة
1	أورثنين ديكاربوكسيليز OrnithineDeCarboxylase	ODC	-	17	سكروز Saccharose	SAC	+
2	ارجنين دايهيدروليز ArginineDiHydrolase	ADH	-	18	L- ارابينوز(تحميض) L-Arabinose (Acidification)	LARA	+
3	لايسين ديكاربوكسيليز Lysine Decarboxylase	LDC	-	19	D- ارابيتول (تحميض) D-ArabitoL (Acidification)	DARL	-
4	يوريز Urease	URE	-	20	α - كلوكوسايديز α-Glucosidase	αGLU	-
5	L - ارابيتوز (تحميض) L-Arabitol (Acidification)	LARL	-	21	α - كالكتوسايديز α-Galactosidase	αGAL	-
6	كالكتيروناتي (تحميض) GAlacturonaTe (Acidification)	GAT	-	22	تريهالوز(تحميض) Trehalose (Acidification)	TRE	+
7	5- كيتوكلوكونيت (تحميض) 5KetoGluconate (Acidification)	5KG	-	23	رامينوز(تحميض) Rhamnose (Acidification)	RHA	-
8	لايبيز Lipase	LIP	+	24	انوسيتول (تحميض) Inositol (Acidification)	INO	-
9	احمر الفينول (تحميض) Phenol Red (Acidification)	PR	+	25	ادونيتول (تحميض) Adonitol (Acidification)	ADO	-
10	β- كلوكوسايديز β- Glucosidase	Bglu	+	26	بلاشينز E (تحميض) Palationse E (Acidification)	PLE	-
11	مانيتول (تحميض) Mannitol (Acidification)	MAN	+	27	β - كلوكيورونيز β-GlucUronidase	β-GUR	-
12	مالتوز (تحميض) Maltose (Acidification)	MAL	+	28	سيلوبايوز (تحميض) Cellobiose (Acidification)	CEL	+
13	اندول (انتاج) Indole (Production)	IND	+	29	سوربيتول (تحميض) Sorbatol (Acidification)	SOR	-
14	N - استيل - β- كلوكوزامينيديز N-Acetyl-β-Glucosaminidase	βNAG	+	30	α - مالتوسايديز (تحميض) α-Maltosidase	αMAL	+
15	β- كالكتوسايديز β-Galactosidase	βGAL	+	31	مالو Na Te MaloNaTe	MNT	-
16	كلوكوز (تحميض) Glucose (Acidification)	GLU	+	32	L-حامض الاسبارتك اريلاميديز L-Aspartic acid Arylamidase	AspA	-

المصادر

- العكيلي , رشا محمد ساجت و الدراغي , واثق عباس حتيت والثويني , امنه نعمة و باسم , أشواق (2012). عزل بكتريا *Vibrio cholera* من مياه نهر دجلة و تشخيصها بالطرق الحديثة و دراسة قابليتها على انتاج انزيم البروتيز و ذيفان الهيمولايسين , مجلة علوم المستنصرية , 23 (4) .
- النزال , احمد اسماعيل و حسين , أغاريد علي و خليل , ياسمين أسماعيل (2009) .عزل وتشخيص البكتريا المرضية من مياه الشرب في محافظة صلاح الدين بطريقة المرشحات الغشائية , مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ,3 (3) .
- عبد الرحمن , ابراهيم عبد الكريم و زيدان , تحسين علي و سعود , وهران منعم (2009) . دراسة بعض الملوثات البكتيرية في مياه نهر الفرات وبحيرتي الحبانية و الثرثار, مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ,3 (3) .
- نادر , محمد ابراهيم و اغوب, اليس كركور و عزيز, غانم منعم . (2009) . انتاج انزيم البروتيز من البكتريا المحلية *Aeromonas hydrophila* GMA1 المعزولة من مرضى مصابين بالاسهال . المجلة العراقية للتقانات الحياتية , 8 (1) .
- Abbott, S.L.; Cheung, W.K. and Janda, J.M. (2003). The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reaction, and phenotypic identification schemes. J. Clin. Microbiol. 41(6): 2348-2357.
- Bhowmik ,P.; Bag , P.K.; Hajra, T.K.; De, R.; Sarkar , P. and Ramamurthy, T.(2009) . Pathogenic potential of *Aeromonas hydrophila* isolated from surface waters in Kolkata, India .*J Med Microbiol* . 58 (12): 1549-1558
- Fobes, B. A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, AS. (1998). Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 10th (ed.). Mosby, Inc. USA. PP: 488-499.
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th (ed.). Williams & Wilkins, U.S.A.
- Jawetz; Melnick and Adelberg´s (2004). Medical Microbiology 23th (ed.). McGrow –Hill Companies, Printed in USA .
- Merino, S.; Aguilar, A.; Nogueras, M. M.; Regue, M.; Swift, S. & Tomas, J. M. (1999). Cloning, sequencing, and role of two phospholipases (A1 and C) from mesophilic *Aeromonas sp*. Serogroup O:34. Infect Immun 67, 4008–4013.
- NHS (2010) .Investigation of faecal specimens for Bacterial pathogens .National Standar Method /NSM ,BSOP ,30 (7) :1 – 33 .
- Sharon, O.; Bruce ,I.; Wayne, W. and Shery, W. (2009) . Drinking water: Bacteria, Dept. of Health and Human Services , University of Nebraska ,Lincolin.
- Yardimci, B. and Aydin, Y. (2011). Pathological finding of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ankara Üniv Vet Fak Derg, 58, 47-54.