عزل وتشخيص بكتيريا *Vibrio fluvialis* من مياه نهر ديالى ودراسة تأثير بعض العوامل البيئية عليها

نجدت بهجت مهدي

قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة كركوك–كركوك–جمهورية العراق

الكلمات الدالة: ملوحة ، حموضة ، الضمات

الملخص

تم التحري عن بكتيريا *V. fluvialis* في 40عينة مياه ماخوذة من نهر ديالى للفترة من الاول من اب ولغاية 30 من ايلول عام 2004 والتي تم تشخيصها بحسب الفحوصات المجهرية والزرعية والكيموحيوية انها تعود لبكتيريا *V.fluvialis* التي عزلت وشخصت لاول مرة في محافظة ديالى. بلغت نسبة العزلات في هذه العينات 5 % .كما اوضحت النتائج ان لهذه البكتيريا القدرة على تحمل الاس الهيدروجيني 10.0 بينما كانت اقل اس هيدروجيني هي 5.0، من جهة اخرى تم اختبار قدرة البكتيريا على تحمل تراكيزمختلفة لملح كلوريد الصوديوم فكان اعلى تركيز استطاعت ان تنمو فيه هذه البكتيريا هو 6% .

المقدمة

بكتيريا *Vibrio fluvialis* احد انواع جنس الضمات التي تعود الى عائلة (*Vibrionaceae*) التي ترجع الى القسم الخامس حسب تصنيف Bergys Manualوالتي تشترك في كون افرادها ذات شكل عصوي منحني وسالبة لصبغة كرام (1) .

شخصت البكتيريا لاول مرة في البحرين عام 1975وعزلت من مريض مصاب بالاسهال وسميت مبدئيا بمجموعة ضمات Fi (2) كما تم عزلها في بنغلادش من خروج الرضع والاطفال البالغين اذ بلغت عدد الحالات المسجلة اكثر من 500 حالة للفترة من اكتوبر 1976 لغاية نوفمبر 1977 وكانت نسبة اصابة 50% منهم في اطفال دون سن الخامسة من العمر والاعراض كانت في 100% اسهال و 97 % تقيؤ و 75% الام في البطن و 35% حمى كما وجدت كريات دم حمر في خروج 75% من الحالات .

وضعت البكتيريا ضمن(III) Heiberg group (3), كما تم عزلها من اصابات الجروح في هاواي عام 1977(4)، وفي فلوريدا عام 1977(5) .

وكذلك عزلت من المياه والرواسب البحرية في نيويورك من قبل Albertواخرون عام 1980 (6) وعزلت من خروج شخص مصاب بالاسهال نتيجة لتناوله المحار في الولايات المتحدة (7) .

وتبين حديثا ان وجود هذه البكتيريا تترافق مع التهاب المعي والقولون entercolits ، وان هذه المجموعة تعود الى جنس جديد من الضمات وتنتشر بشكل واسع في المياه البحرية والمويلحة المحيطة بعدة دول منها انكلترا والولايات المتحدة الامريكية وبنغلادش (2و8) `واشار و Furnissواخرون 1977الى ان بكتيريا *V.fluvialis* هي بكتيريا عصوية منحنية لها سوط قطبي، موجبة للاوكسيديز، سالبة لصبغة كرام،محبه للملوحة(9)، كما اوضح كل من Lee واخرون1981 و Nishibuchواخرون 1983 الى ان البكتيريا تظهر درجات مختلفة من التحلل الدموي نوع β وتنمو بشكل جيد على الوسط الزراعيTCBS (Thiosulfat Citrate Bile Sucrose ager (10,2) ومن الفحوص الكيموحيوية المهمة في التشخيص هي انها موجبة للارجينين ديهايدروليز وسالبة للايسين ديكاربوكسيليز.. وللاورنثين وغير منتجة للاندول والاسيتون ومخمرة للاكتوز والارابينوز والمانوز كما انها تخمر السكروز مكونة مستعمرات صفراء على وسط الـ TCBS (12,11,3,2) ولعدم وجود دراسة سابقة في القطر لعزل هذه البكتيريا من المياه كان الهدف من هذه الدراسة محاولة عزلها من مياه نهر ديالى لاول مرة فضلا عن دراسة تاثير بعض العوامل البيئية عليها .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات وتشخيصها

جمعت 40عينة من مياه نهر ديالى من مواقع مختلفة من منطقة قريبة من وسط النهر ومن عمق 5 سم من سطح الماء في قناني معقمة سعة 300 مللتر للفترة ما بين الاول من اب ولغاية الثلاثين من ايلول من عام 2004 ونقلت الى المختبر مباشرة وعزلت باخذ 20 مللتر من ماء النهر واضافة 20 مللتر من ماء الببيتون القاعدي المضاعف (Double strength alkaline pepton water) وبأس هايدروجيني 8.6 وتم حضنها في درجة حرارة 37م لمدة 18 ساعة(14,13) أجري التشخيص المجهري بأخذ جزء من مستعمرة بكتيرية حديثة نامية على وسط TCBSووضعها على شريحة زجاجية وصبغها بصبغة كرام .

اما التشخيص الكيموحياتي فقد اشتمل على فحوصات الـKIA (Kligler Iron Agar) واختبار الاوكسديز واختبار الاندول Indole test والحركة Motility واختبار اليورييز Ureas test واختبار Voges- Proskauer test واختبار تحلل الدم Haemolysis (14). تم تأكيد ألتشخيص باستخدام عدة التشخيص API 20E والتي تحوي 20 اختباراً كيموحيوياً والمعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO) .

اختبار قدرة العزلات البكتيرية على تحمل الحموضة

حضر العالق البكتيري من نقل 4-5 مستعمرات نقية حديثة من وسط TCBS الى 10 مل من وسط الببيتون القاعدي وحضنت في درجة حرارة (37)م لمدة 18 ساعة وتم تحضير وسط ماء الببيتون بتراكيز مختلفة من الاس الهيدروجيني من (5.5,4.5,4-….10.5) ووزعت في أنابيب زجاجية معقمة وبواقع10مللتر لكل أنبوبة وبمكررين لكل معاملة ثم لقح 0.1 مل من العالق البكتيري المحضر اعلاه وتركت أنبوبتين دون تلقيح كمعاملات مقارنة وحضنت في درجة حرارة(37) م لمدة 18 ساعة ثم اخذت نقلة وزرعت على TCBS (15) .

اختبار قدرة العزلات البكتيرية على تحمل الملوحة

حضر العالق البكتيري كما ورد اعلاه وتم تحضير ماء االبيبون القاعدي وبتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (2% ,3.0....8.0%) وبواقع مكررين لكل تركيز ولقحت بـ 0.1 مللتر من العالق البكتيري وتركت أنبوبتين دون تلقيح كمعاملات مقارنة وحضنت في درجة حرارة(37) م لمدة 18 ساعة واخذت نقلة منها وزرعت على TCBS للتأكد من حيويتها .

النتائج والمناقشة

ظهرت المستعمرات البكتيرية صفراء اللون على وسط الـ TCBS كما ظهرت مجهريا على شكل بكتريا عصوية الشكل منحنية سالبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات وبينت نتائج الفحوصات الكيموحياتية ان البكتريا انتجت قاعدة/حامض على وسط الـ KIA (Alkalin /Acid) ، موجبة لاختبار الاوكسديز وسالبة لاختبارات الاندول و فوكس بروس كاور واليورييز و متحركة ومحللة للدم من نوع β عند زرعها على وسط اكار الدم .

اظهرت نتائج اختبار API 20E ان البكتريا هي *Vibrio fluvialis* اعتمادا على نتائج الاختبارات الكيموحيويةوالمبينة في الجدول(1) وبذا تم اول تسجيل للبكتيريا في محافظة ديالى .

اما تحمل البكتيريا لمستويات مختلفة من الاس الهيدروجيني فان الجدول رقم (2) يوضح ان بكتيريا *V.fluvialis* المعزولة من نهر ديالى قاومت المديات الحامضية لمستوى اس هايدروجيني 5 صعودا الى أس هايدروجيني 10 ولم تستطع النمو في أس هايدروجيني اقل من 5 او اكثر من 10 .

جدول (1) : نتائج تشخيص بكتريا *Vibrio fluvialis* بنظام API 20E

Test	Reaction Enzymes	Results
ONPG	Beta - glactosides	+
ADH	Arginine dihydrolase	+
LDC	Lysine decaboxylase	-
ODC	Ornithine decaboxylase	-
CIT	Citrate utilization	-
H_2S	H_2S production	-
URE	Urease	-
TDA	Tryptophane deaminase	-
IND	Indol production	-
NP	Aceton prodution	-
GEL	Glatinase	+
GLN	Glucos- fermentation	+
INO	Inositol fermentation	-
SOR	Sorbitol fermentation	+
RHA	Rhamnose fermentation	-
SAC	Sucrose fermentation	+
MEL	Melibinose fermentation	+
AMY	Amydgalin fermentation	+
ARA	Arabinose fermentation	+

جدول(2): مدى تحمل بكتيريا *V.fluvialis* لمستويات مختلفة من الاس الهيدروجيني

مستويات الـ pH / العزلة	10.5	10	9	8	7	6	5.5	5	4.5	4
1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

(+) ظهور العكورة

(–) لا توجد عكورة

ان النتائج المبينه اعلاه تظهر اختلافا واضحا من نتائج الفرطوسي 2002 والتي درست تحمل *V.cholerae* لمستويات الاس الهيدروجيني المختلفة حيث اظهرت نتائجها بان بكتيريا *V.cholerae* المعزولة من مصادر سريرية قاومت اس هايدروجيني 4.5 وبنمو جيد(16) .وفي دراسة اخرى اثبت Al-Ani (١٧) ان بكتريا *V.cholerae* المعزولة من مصادر سريرية قاومت اس هيدروجيني 4 عند دراسته لـ 120عزله بكتيريه وقد يعود السبب في ذلك الى ان بكتيريا *V .fluvialis* لاتمتلك القدرة الجينيه على تحمل اس هايدروجيني واطى كما في بكتيريا *V.cholerae* التي اثبت بانها تمتلك نوعين من جينات تحمل الحموضة(Pnp و gshB) الواقعتين على الكروموسوم الكبير (18).

اما النتائج الموضحة في جدول (3) فتدل على ان بكتيريا *V.fluvialis* لها قدرة على مقاومة تركيز ملحي 6% ولم تستطيع مقاومة تراكيز اعلى من ذلك .

الجدول(3): تحمل بكتيريا *V.fluvialis* لمستويات مختلفة من الملوحة (كلوريد الصوديوم)

% كلوريد الصوديوم / العزلة	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	+	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-

(+) ظهور العكورة

(–) لا توجد عكورة

إنَ النتائج الموضحة في هذا الجدول بينت ان هذه البكتيريا ليست اقل كفاءة من *V.cholerae* المعزولة محليا في تحمل نسب عالية من الملوحة وقد يرجع السبب لاحتوائها على جينات تحمل الملوحة *tcpR* (19) وهذه النتائج تتطابق مع ماذكره Janda واخرون(20) .

References

1. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H. and Bergy. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.(1994). Lippincott, Williams & Wilkins, East Lansing. Mich.
2. Furniss, A.L; Lee, J.U. and Donovan, T.J. grouop –F .Anew Vibrio ¯? Lancet : 10 (1977) 73-94.
3. Hug ,M.I.; Alam A.MJ , Brenner D.J..Isolation of Vibrio – like group Ef-6, from patients with dirrhea . J. Clin .Microbiol. 11 (1980) 621- 624.
4. Seidler ,R.J; Allen , D.A.; Colwell, R.R., *et al*. Biochemical characteristics and virulence of environmental group f bacteria isolated in the United States . Appl. Environ Microbiol .40 (1980) 715- 720.
5. Klontz , K. C .and Desenclos J.C..Clinical and epidemiogical feature of sporadic infection with *Vibrio fluvialis* in florida , U.S.A J- Diarrhoeal Dis . Res .8 (1990) 24-26.
6. Albert , M.;Hossian , M.A.; Adam. K, *et al.* Afetal case associated with shigellosis and *Vibrio fluvialis* bacteria Diagn. Microbiol Infect . Dis . 14 (1991) 509- 510.
7. Hickman –Brenner , F.w, Brenner , D.J, Steiger A.G., *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furniss* isolated from stool sample of one patient , J.Clin.Microbiol. 20(1984) 125- 127.
8. Bellet , J.Klein B., Ateri ,M., *et al. Vibrio fluvialis* , an unusual pediatric enteric pathogen. Pediatr Emer. care .21 (1989) 237-238.
9. Collee.J.G.; Fraser, A.G.; Mermion, B.P. and Simmons, A. Mackie and MacCatney. Practical Medical Microbiology. P.425. (14th ed.). Churchill Linvingstone Philadelphia.(1996).
10. Nishibuchi, M., Seidler ,R.J., Medinm dependent production of extra cellular entrotoxins by non 01 *Vibrio cholerae* , *Vibrio mimicus* and *Vibrio fluvialis.* Appl. Environ. Microbiol. (1983) 228- 231.
11. Lee , J.V; Shread , P. , Furniss , A.L ;*et al*. Taxconomy and description of *Vibrio fluvialis* spnov(synonym Group.F- Vibrios Group EF-6) J. Clin . Microbiol .50 (1981) 73-94.
12. Kelly M. T ., Hickman- Brenner , F.W ., Farme, J.J. , Vibrio In : Balows A., Hausler , W.J., Herrmann , K. L ., Isenbery H. D ., shadomy ., H.J. (eds).Manual of Clinical Microbiology , 5th edn . American Society for Microbiology , Washing ton .. Ch.37 (1991) PP: 384-395.
13. Islam , M . S. , Hasan , M..K., Miah, M. A., Yunis ,M.,Zaman , K,. and Albert,. M.J., Isolalation of *Vibrio cholerae* 0139 synonyin from aquatic environment in Bangladish : Applicalion for disease transmission .Appl. Inviron. Microbiol.60 (1994) 1684-1686.
14. Elliot ,E.l; Kaysnar , C .A. and Tamplin ,N.L. *Vibrio cholerae* , *V.parahaemolyticus* , *V. vulnificus* and other *Vibrio* spp. Baeteriological Analytical Manual online . chapter-9 Center for Food Safety and Applied Nutrition (2001).
15. Woug, H.C; Peng,P.Y., Han,J; Chang, C. and Lan,S. Effect of Mild Acide treatmente on survival Enteropathogenicity and protein production in *Vibrio parahaemolyticus* .Infection and Immunity .66(1998):3066-3071.
١٦. الفرطوسي هناء فرحان عباس تحديد المحتوى الحيني ودراسة بعض العوامل الكيمائية والفيزيائيةعلى بكتيريا ضمات الكوليرا *Vibrio cholerae* المعزولة محليا رسالة ماجستر . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية (2002).
17. AL-Ani,Z. N; Amer, N.H,and Samera S. Acid tolerance of *Vibrio cholerae* .J.of Technical (2000) No. 918.
18. Merrell, D.S. and Camilli, A. Acid tolerance of gastro-intestinal pathogens. Current Opinion in Microbiology.5(2002) 51-55.
19. Mishra, A.; Srivastava, R.; Pruzzo, C. and Srivastaval, B. Mutation in *tcpR* gene (VC 0832) of *Vibrio cholerae* 01 causes loss of tolerance to hight Osmolarity and affects colonization and virulence in infant mice .J.Med. Microbiol . 52 (2003) 933-939.
20. Janda J.M; Powers ,C; Bryant , R.G. and Abbot, S.L. Current prespectives on the epidemiology and pathogensis of clinicaly significant *Vibrio* spp.Clin. .Microbiol .Rev., 1 (3) (1988) 245- 2670.

Isolation and Identification of *Vibrio fluvialis* from Diala river and study the effect of some environmental Factores on it

Najdat Bahjat Mahdi
Biology Dept., College of Science, Kirkuk University, Kirkuk, Iraq

Abstract

Fourty water samples were collected from Diala river from Ist of Augest till the end of september 2004. these samples were investigates for the presense of *Vibrio fluvialis* which identified according to the Micobiological, Cultural and Biochemical tests. These results indicate that 5% of the samples were bacteria *Vibrio fluvialis* which is isolated for the 1st time in Diala . The result shows that this bacteria has ability to tolerate minimum and maximum pH (5 and 10 respectively). This bacteria has also abilty to tolerate salinity 6% (NaCl).