مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 29 (1)، 35– 56 ،2016

عزل بعض انواع البكتريا وتشخيص من الروبيان *Metapenaeus affinis* و التعرف على الأنواع المنتجة للهستامين

قيثار رشيد مجيد[1] و طالب أحمد جايد[2] و صلاح ناجي عزيز الخيون[1]

1قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة، العراق

2 قسم الانتاج الحيواني،، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة، العراق

المستخلص: تم عزل أجناس وأنواع مختلفة للبكتريا من الروبيان *Metapenaeus affinis* والتي تم جلبها من منطقة الفاو في محافظة البصرة ، وتم تشخيص هذه العزلات بعد تنقيتها من خلال دراسة صفاتها المظهريةوإجراء الفحوصات الكيموحيوية وفحص الحركة والتصبيغ بصبغة كرام إضافة إلى استعمال انواع مختلفة من العدة API لتأكيد عملية تشخيص البكتريا. تم عزل خمسة وثلاثون عزلة بكتيرية من أجناس وأنواع البكتريا من الروبيان وتشخيصها وهي *Klebsiella pneumonia sub. pneumonia* و *Morganella morganii sub. Morganii,* و *Enterobacter aerogenes* و *Klebsiella oxytoca* و *Enterobacter cloacae* و *Proteus marina* و *Cronobacter sakazakii* و *Enterobacter taylorae* و *Proteus vulgaris* و *Proteus mirabilis* و *Citrobacter freundii* و *Citrobacter amalonaticus* و *Hafnia alvei* و *Escherichia coli* و *Serratia marcescens* و *Serratia fonticola* و *Vibrio vulnificus* و *Vibrio fischeri* و *Vibrio harveyi* و *Vibrio alginolyticus* و *Vibrio parahaernolyticus* و *Vibrio fluvialis* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fluorescens* و *Staphylococcus saprophyticus* و *Staphylococcus intermedius* و *Staphylococcus epidermidis* و *Bacillus pumilus* و *Bacillus licheniformis* و *Bacillus subtilis* و *Bacillus alvei* و *Aeromonas veronii* و *Aeromonas encheleia* و *Aeromonas sobria* و *Aeromonas schubertii*.و ان نتائج الكشف عن البكتريا المنتجة للهستامين والتي أجريت باستعمال الأوساط السائلة Trypticase Soy broth-Histidine (TSBH) و Histamine decarboxylase broth(H.D.B.) والأوساط الصلبة و Histamine decarboxylase agar (H.D.A.) أظهرت ان جميع البكتريا كانت منتجة للهستامين بنسب مختلفة ما عدا *Hafnia alvei* و *Aeromonas veronii* و *Aeromonas encheleia* و *Aeromonas sobria* و *Aeromonas schubertii* فقد كانت غير منتجة للهستامين .

كلمات دالة: عزل ، تشخيص بكتريا ، روبيان ، shrimp ، API ، هستامين.

المقدمة

أن الآلاف من الناس في كل عام يعانون من التسمم الغذائي بفضل الأطعمة والمشروبات الملوثة بالبكتريا

أو الفيروسات أو السموم وقد تظهر عليهم أعراض مثل ارتفاع درجة الحرارةو الإسهالو التقيؤ والاضطرابات في الجهاز الهضمي .وإن أكثر الأطعمة التي غالباً ما ترتبط بالتسمم الغذائي هي منتجات اللحوم والدواجن و الحليب غير المبستر ومنتجات الألبان و البيض والمحار غير المطبوخ والأسماك والرز[5 و 13و50] .

وتعد الأسماك و أسرع تلفاً من اللحوم الحمراء لارتفاع نسبة الرطوبة فيها واحتوائها على مركبات بروتينية وكربوهيدراتية فضلاً عن المعادن والأملاح ، ويمثل الرقم الهيدروجيني لها ظرفاً ملائماً لنمو العديد من الأحياء المجهرية التي تسبب إحداث تغييرات غير مرغوبة فيها بالإضافة إلى ليونة أنسجة السمك وتفككها ولكون دهن الأسماك أسرع تأكسداً من باقي أنواع اللحوم [1] .

وتعد القشريات من الحيوانات اللافقريات التي تفتقر إلى وجود هيكل عظمي داخلي، لكنها تتميز بوجود تركيب خارجي صلب يدعى بالهيكل الخارجي، والذي يوفر الحماية لأجسام القشريات ويستعمل مصطلح الروبيان للإشارة إلى بعض القشريات عشرية الارجل و الروبيان من الأغذية البحرية اللذيذة ويشكل عادة جزءا من كل وجبة تقليدية وقد زا داد الطلب على منتجاته في جميع أنحاء العالم [60]. وتمتلك الكائنات الحية ومنها البكتريا تبايناً كبيراً في إنتاج الهستامين بسبب وجود جينات معينة مسؤولة عن إنتاج الهستامين [56].

ويتم تشكيل الهستامين في الأسماك من بعض الكائنات الدقيقة القادرة على إنتاج إنزيم (HDC) Histamine decarboxylase و هذا الأنزيم الذي تنتجه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام على حد سواء يحفز تحويل الهستدين الحر إلى هستامين و الموجود بشكل طبيعي في مستويات عالية في عضلات بعض الأسماك [11و 23] .

تنتج الأمينات الحيوية مثل اليوتريسين والكادافيرين والتايرمين من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وسجلت الأبحاث العديد من الأنواع البكتيرية كمنتجات للهستامين *Morganella morganii* و *Morganella psychrotolerans* و *Photobacterium phosphoreum* و *Hafnia alvei* فضلاً عن الأغذية البحرية المتخمرة وجدت الأنواع البكتيرية *Staphylococcus* spp. بوصفها منتجات للهستامين ومع اختلاف الأنواع أو الأجناس فان قابلية تخليق الهستامين تعتمد بصورة كبيرة على نوع السلالة [64 ، 19 ، 23 ، 52] .

وإن الأسماك والمأكولات البحرية وكذلك منتجاتها هي من بين الأغذية الغنية بالبكتريا المنتجة للهستامين. إن تصنيع أو تخزين الأسماك غير الصحيح يعدان من العوامل الرئيسة التي تسهم في إنتاج الهستامين في الأسماك ،وإن إنتاج الهستامين يمكن أن يحدث أثناء عمليات التصنيع مثل التمليح Salting والتدخين Smoking والتجفيف Drying والتخمير Fermenting والتخليل Pickling وغيرها حتى يكون المنتج جاهزا للتسويق [9 ،48].

وذكر بعض الباحثين أن البكتريا المعزولة من الأسماك قسمت على مجموعتين مجموعة لا تنتج الهستامين مثل *Micrococcus* spp. و *Planococcus* spp. و *Aeromonas* spp. ومجموعة تنتج الهستامين من الهستدين وهي:

Morganella morganii و *Enterobacter aerogenes* و *Enterobacter cloacae* و *Klebsiella pneumonia* و *Vibrio parahaemolyticu* و *Vibrio alginolyticus* و *Vibrio anguillarum* و *Proteus vulgaris* وتم عزل بكتريا *Morganella morganii* المنتجة للهستامين المحبة للحرارة المعتدلة Mesophilic والمقاومة للبرودة psychrotolerant من مختلف الأطعمة البحرية وكانت البكتريا المسؤولة الرئيسة عن إنتاج الهستامين المعزولة من جميع الأسماك المحلية والمستوردة [39 ، 24] .

و هدفت الدراسة إلى معرفة المحتوى البكتيري للروبيان ودورها في إنتاج الهستامين و أحداث التسمم الغذائي وحالات الحساسية الناتجة من تناول الروبيان ، ولعدم وجود دراسات متناولة دور البكتريا المنتجة للهستامين والمعزولة من الروبيان ، فقد أجريت هذه الدراسة .

المواد وطرائق العمل

مصادر العينات

جمع 1 كغم لعينة الروبيان *Metapenaeus affinis* من منطقة الفاو في محافظة البصرة بواقع 3 مكررات. ووضعت العينات في أكياس بلاستيكية معقمة وحفظت في حاوية من الفلين تحتوي على قطع من الثلج والثلج المبروش ونقلت بعد ذلك إلى المختبر.

المواد المستعملة في العزل والتشخيص

استعمل العديد من الأوساط لغذائية مثل وسط (N.B) Nutrient broth ووسط(N.A) Nutrient Agar ووسط MacConkey ووسط Eosin Methylene Blue(EMB)ووسط استهلاك السترات Simmon's citrate agar medium ووسط مرق الدماغ-القلب Brain–Heart infusion broth ووسط فوكس بروسكلور ووسط المانيتول الصلب Mannitol salt agar medium ووسط الكشف عن السالمونيلا ووسط تحلل الجيلاتين ووسط تحلل الكازين ووسط تحلل النشا ووسط إنتاج الأندول ووسط اختزال النترات ووسط تخمير الكاربوهيدرات ووسط Cetremide Agar ووسط Thiosulfate citrate bile salts sucrose(TCBS) لتشخيص بكتريا *Vibrio* ووسط *Pseudomonas* selective ووسط اختبار أنزيم اليوريز Urease medium ووسط النمو بدون وجود NaCl وبوجود 5%،6%،7% و8% NaCl ووسط إنتاج الأمونيا من الأرجنين ووسط المثيل الأحمر ووسط أملاح الصفراء ووسط (MRS Broth) ووسط (MRS agar) ووسط الحليب الفرز Skim milk ووسط Mueller Hinton broth ووسط Ampicillin Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V) بالإضافة إلى ذلك استعمل العديد من العدد التشخيصية Identification Kit وذلك لتشخيص البكتريا على مستوى النوع وشملت: العدة API Hi 25 ™ Enterobacteriaceae. Identification Kit والعدة API HiVibrio.™ Identification Kit والعدة API HiStaph.™ Identification Kit والعدة API HiCarbohydrate ™ Identification Kit والعدة API HiAermonas ™ Identification Kit وكلها مجهزة من شركة Himedia الهندية.

الأوساط الزرعية المستعملة في الكشف عن الهستامين في البكتريا

استعملت ألأوساط السائلة Trypticase Soy broth-Histidine (TSBH) و Histamine decarboxylase broth(H.D.B.) والأوساط الصلبة Histamine decarboxylase agar (H.D.A.) لغرض تحديد البكتريا المنتجة للهستامين وضبط الرقم الهيدروجيني للوسط على 5.3 وتم تعقيم الأوساط بالمؤصدة على درجة حرارة 121 م وضغط 15 باوند.انج$^{-2}$ ولمدة 15 دقيقة واعتمدت هذه الطريقة على حدوث التغير اللوني في الأوساط.

عزل البكتريا وتشخيصها

تم نقل 10 غم من العينة المهروسة للروبيان إلى دوارق معقمة حاوية على 90 مل من محلول التخفيف الفسيولوجي المعقم وتم المزج جيداً للحصول على عينات متماثلة ومتجانسة بوساطة خلاط كهربائي تم تعقيمه مسبقاً بكحول الأيثانول 70% ثم اخذ 1 مل من كل عينة وعمل منها سلسلة التخافيف العشرية الأخرى لغاية 10^{-9} ، ثم زرع 1 مل من التخافيف 10^{-7} و 10^{-8} و 10^{-9} بعمل ثلاثة مكررات لها وزرعت على في الأوساط الغذائية المختلفة في إطباق بتري معقمة وحضنت الأوساط في الحاضنة عند درجة حرارة 37 م لمدة 48-72 ساعة في ظروف هوائية ولا هوائية. بعدها تم تنقية المستعمرات البكتيرية بأخذ مستعمرة من نوع من المستعمرات البكتيرية المختلفة مظهرياً بالشكل واللون والحجم، وشخصت البكتريا بإجراء الفحوصات المظهرية وهي فحص شكل المستعمرات وشكل البكتريا من خلال تصبيغ كرام وفحص حركة البكتريا وقد تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية الأخرى [8].

تنقية العزلات

لقحت الأوساط الزرعية الانتقائية المختلفة بوساطة الناقل الحلقي من العزلات المنتخبة من الغربلة الأولية وبعمر 24 ساعة لإجراء الغربلة وذلك بعمل تخطيط للمستعمرات البكتيرية في منتصف سطح الوسط تخطيطاً منتظماً وحضنت الإطباق عند درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة في ظروف هوائية ولا هوائية وكررت العملية السابقة الذكر 3 مرات وذلك بغية الحصول على مستعمرات منفردة نقية لإجراء الفحوصات التشخيصية لتلك العزلات.

الاختبارات التشخيصية للعزلات البكتيرية

الفحوصات المظهرية Morphological tests

وشملت هذه الفحوصات شكل ولون وحجم النستعمرات ، والفحوصات المجهرية التي شملت: فحص أشكال البكتريا واختبار الحركة Motility test وفحص تكوين البوغ الداخلي Endospore forming [33].

الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

وشملت الاختبارات التالية

اختبار الكاتليز واختبار إنتاج الغاز من الكلوكوز واختبار تخمر الكاربوهيدرات واختبار الفوكاس بروسكاور واختبار تحلل الكازين واختبار تحلل النشا واختبار الاوكسيديز و اختبار إنتاج الامونيا من الارجنين واختبار اختزال النترات إلى نتريت واختبار تحلل الجيلاتين واختبار إنتاج الأندول واختبار استهلاك السترات واختبار إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين واختبار إنزيم اليوريز واختبار المثيل الأحمر واختبار تحلل الأسكولين و تأثير درجة حرارة

الحضن في نمو البكتريا و النمو في ظروف لا هوائية [33 و20 و 35 و7].

التشخيص التأكيدي باستعمال -APIE - Identification by using of Analytic profile Index E

أعيد تعليق نظام API من خلال إضافة كمية مناسبة من الوسط السائل أو الصلب الخاص بنوع البكتريا والذي سبق وان لقح بالعزلة البكتيرية المراد دراستها ، وبعد حضن الشريط لمدة 24 – 48 ساعة بحرارة 37م، دونت النتائج وتم تفسيرها بالاعتماد على Analytical Profile Index واتبعت الطريقة نفسها لنظم تشخيص API مع اختلاف نظم التشخيص حسب نوع النظام الخاص بالبكتريا .

وتم إجراء هذا الاختبار بتلقيح 5 مل من المحلول الفسلجي بمستعمرات نقية من البكتريا المراد اختبارها ثم مزج المعلق البكتيري جيداً إذ لقحت حجرات شريط API بالمعلق الجرثومي المحضر وحضنت عند درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة مع متابعة وجود النمو من عدمه ثم بعدها أضيفت الكواشف الخاصة بها في ضوء ظهور النتائج حددت نوع البكتريا قيد التشخيص بالرجوع إلى العدة الخاصة بها والمجهزة من شركة Himedia الهندية. وقد تم حساب أعداد البكتريا والنسبة المئوية لتردد العزلات المعزولة من عينات الروبيان حسب قانون:

$$\text{النسبة المئوية لتردد العزلات} = \frac{\text{عدد العزلات للنوع}}{\text{العدد الكلي للعزلات}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج وجود أجناس وأنواع مختلفة من البكتريا فقد شملت 35 عزلة بكتيرية توزعت كما يلي : أربعة أنواع عائدة للجنس *Bacillus* (*B. pumilus* و *B. licheniformis* و *B. subtilis* و *B. alvei*) ونوعان عائدان للجنس *Pseudomonas* *P. aeruginosa* و *P. fluorescens* وثلاثة أنواع تعود للجنس *Staphylococcus* (*S. saprophyticus* و *S. intermedius* و *S. epidermidis*) وأربعة أنواع عائدة للجنس *Aeromonas* (*A. veronii* و *A. encheleia* و *A. sobria* و *A. schubertii*) وخمسة أنواع عائدة للجنس *Vibrio* (*V. alginolyticus* و *V. vulnificus* و *V. fischeri* و *V. parahaernolyticus* و *V. fluvialis*) وستة عشر نوعاً عائدة للعائلة المعوية Entrobecteriaceae وقد شملت نوعين عائدين للجنس *Citrobacter* (*C. freundii* و *C. amalonaticus*) وثلاثة أنواع عائدة للجنس *Enterobacter* (*E. cloacae* و *E. aerogenes* و *E. taylorae*) وبكتريا ونوع *Cronobacter sakazakii* وثلاثة أنواع عائدة للجنس *Proteus* (*P. marina* و *P. vulgaris* و *P. mirabilis*) ونوعان عائدان للجنس *Serratia* (*S. marcescens* و *S. fonticola*) ونوعان عائدة للجنس *Klebsiella* (*K. pneumonia sub. pneumonia* و *K. oxytoca*)، بالإضافة إلى بكتريا *Escherichia coli* وبكتريا *Morganella morganii sub. morganii* وبكتريا *Hafnia alvei*.

جدول (1): الاختبارات التشخيصية للعزلات المحلية لبكتريا *Bacillus* spp.

الفحوصات / البكتريا	8 pH	5.5 pH	النمو 7% ملح	النمو 5 % ملح	إنتاج الغاز	اختبار الفوكاس	اختزال النترات	إنتاج الكاتليز	إنتاج الأوكسيديز	الفينايل الأنين	إنتاج الأندول	استهلاك سترات	تحلل الجيلاتين	تحلل الكازين	النمو لا هوائياً	تكوين السبور	الحركة
B. subtilis	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	D	+	-	+	+
B. liheniformis	+	+	+	+	D	+	+	+	+	-	-	+	D	+	+	+	+
B. pumilus	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
B. alvei	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-		+	+	+	+
تخمـــــر السكريات																	
الفحوصات / البكتريا	رافينوز	الزايلوز	مانيتول	فركتوز	مالتوز	اريبنوز	كالالاكتوز	سكروز	لاكتوز	انيولين	سليابويز	سوربيتول	سوربوز	دكسترين	تريهالوز	مليبيوز	مانوز	الكلوكوز
B. subtilis	_	+	+	+	+	+	-	+	_	+	+	+	_	+	+	_	+	+
B. liheniformis	_	+	+	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	_	+	+
B. pumilus	+	+	+	+	+	+	-	+	_	_	D	_	_	+	D	_	-	+
B. alvei	_	-	+	+	+	-	+	+	_	+	+	+	_	+	+	_	+	+

+ : موجب - : سالب D : ضعيف

والجداول (1-9) توضح جميع الأختبارات الكيموحيوية للبكتريا الموجودة في الروبيان، فالجدول (1) يوضح الاختبارات التشخيصية لأنواع جنس *Bacillus* spp. ويتضح من الجدول إن جميع العزلات كانت عصوية الشكل موجبة لصبغة كرام ومكونة للأبواغ وكانت النتائج متفقة مع بعض الدراسات [8، 35، 21].

و اتفقت النتـــائج مع Barman *et al.* [6] و Narasimhan *et al.*[49] بعزلهم بكتريا *Bacillus subtilis* من الروبيان Blacktiger shrimp (*Penaeus monodon*) . وقد تمكن Setia and Suharjono [53] بعزله لبكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* من الروبيان. ويشير الجدول (2) إلى أهم الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Pseudomonas* spp.

جدول (2): الفحوصات التشخيصية لبكتريا *Pseudomonas* spp.

الفحوصات / العزلات	فحص المثيل ريد	النمو في وسط cetrimide	فحص فوكاس بروسكاور	اختزال النترات	الاندول	إزالة الكاربوكسيل اللايسين	النمو على درجة 42	بوريز	انتاج غازالهيدروجين	الاسكولين	زايلوز	سوربيتول	تريهالوز	لاكتوز	سيلوبيوز	ميليبيوز	مالتوز	سكروز	مانيتول	مانوز	فركتوز	L-اريبنوز	D-كلوكوز	كالاكتوز	الرافينوز	تحلل الجيلاتين	تحلل الكازين	رهمنوز	إنتاج الغاز من الكلوكوز
P.aeruginosa	_	+	_	+	_	_	+	D	_	+	+	_	D	_	+	_	_	_	+	_	+	_	D	+	_	+	+	_	_
P. fluorescens	+	D	_	D	_	D	_	_	_	_	_	+	+	_	D	D	D	-	D	_	+	+	+	+	_	D	D	_	D

+ : موجب - : سالب D : ضعيف

وقد بينت النتائج أن المستعمرات النامية على وسط *Pseudomonas* selective تميزت بأنها كبيرة الحجم ومستعمراتها لزجة لماعة وأظهرت لوناً أخضر مزرقاً أما عند تنميتها على وسط .N.A فكان لونها أخضر واضح لأنها تمتاز بإنتاج أنواع من الصبغات مثل صبغة البايوسيانين. وكانت عزلات بكتريا *Pseudomonas* سالبة لصبغة كرام ومتحركة سالبة لإنتاج الغاز من سكر الكلوكوز وسالبة لسكر السكروز واللاكتوز والكالاكتوز ولأختبارات النشأ والمثيل الأحمر والأندول والفوكاس بروسكاور وموجبة لفحوصات الكاتليز والسترات وتخمير الكلوكوز والزايلوز وتنمو بدرجة حرارة 4 م [41] .

واستعمل الوسط Cetremide Agar في الكشف عن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* التي عملت ثلاثة مكررات لكل عينة بعد إجراء التخافيف المناسبة وقد زرعت على إطباق محتوية على الوسط السابقة الذكر وحضنت على درجة حرارة 37 °م [25 ،22 ، 12].

اتفقت النتائج مع Dempsay and Kitting [21] و Jiqiu *et al*., [36] بتشخيص بكتريا *Pseudomonas* ssp. من الروبيان البحري. وقد اتفقت النتائج مع Narasimhan *et al*. [49] بتشخيص بكتريا *P.aeruginosa* من أنسجة عضلات الروبيان *Penaeus monodon* .

أما نتائج عزل بكتريا *Staphylococcus* spp. من الروبيان جدول (3) فقد أظهرت أن جميع العزلات قد أعطت نتيجة موجبة على الوسط الانتقائي الصلب (وسط المانيتول) وخرت سكر المانيتول وكذلك على وسط الاكار المغذي وقد ظهرت مستعمرات دائرية ملساء محدبة قليلاً. واظهر الفحص المجهري للمستعمرات خلايا كروية موجبة لصبغة كرام متجمعة بشكل عناقيد أو أزواج أو سلاسل قصيرة وغير متحركة، أما نتائج الاختبارات الكيموحيوية فقد كانت جميعها موجبة للكتاليز وسالبة لاختبار الاوكسيديز.

وتم إخضاع العزلات البكتيرية إلى العدة API HiStaph.™ Identification Kit وقد أظهرت نتائج التشخيص تطابقاً كاملاً مع نتائج الاختبارات الكيموحيوية السابقة الذكر لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية والتي شملت فحص تخمر الكاربوهيدرات وفحوصات أنزيمية أخرى وقد تباينت نتائج هذه الفحوصات بين الأنواع المختلفة والتابعة لجنس *Staphylococcus* spp. من حيث قابليتها التخميرية للكاربوهيدرات ويوضح الجدول (3) نتائج تشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بنظام API HiStaph.™ Identification Kit هذا قد اتفقت جميع النتائج مع Collee *et al*. [17] و De Vos *et al*. [20].

جدول (3): تشخيص بكتريا *Staphylococcus* spp. المعزولة من الروبيان بأستعمال نظام API HiStaph.™ Identification Kit.

الفحوصات / العزلات	فحص المثيل ريد	Haemolysis	فحص فوكاس بروسكاور	اختزال النترات	الاندول	Alkaline phosphatase	Coagulase	يوريز	الارجنين	ONPG	تريهالوز	لاكتوز	ميليبوز	مالتوز	سكروز	مانيتول	مانوز	فركتوز	L-ارابينوز	كالكتوز	رافينوز	تحلل الجيلاتين	زايلوز	كتاليز	D-كلوكوز
S. saprophyticus	+	_	+	+	_	_	_	+	_	D	+	_	D	+	+	+	D	+	_	+	_	D	_	+	_
S.epidermidis	D	D	D	_	_	+	-	+	_	_	_	D	_	+	+	_	_	D	_	D	_	_	_	+	+
S.intermedius	D	+	_	+	_	+	+	+	_	_	+	_	D	+	+	+	+	+	_	D	_	D	_	+	+

+ : موجب – : سالب D : ضعيف

اتفقت النتائج مع Gonçalves *et al*., [29] و Hamid and Hajar [31] بعزلهم بكتريا *Staphylococcus* spp. من الروبيان .

توصلت الدراسة إلى عزل وتشخيص بكتريا *Aeromonas* spp. وكانت مستعمراتها صفراء اللون ترتفع قليلاً عن سطح الوسط (ADA-V) . هذا وقد بينت الاختبارات الكيموحيوية قدرتها الخميرية وقابليتها على سحب جذر الكاربوكسيل من الحامض الاميني اللايسين. وتمكنت من النمو بوجود 3% و6% كلوريد الصوديوم على التوالي كما بينت النتائج إن جميع العزلات المتحصل عليها كانت سالبة لصبغة كرام وكل العزلات كانت متحركة .

وقدوجد من خلال نتائج الاختبارات وبالاعتماد على عدة التشخيص API HiAermonas.™ dentification Kit وجود أنواع لهذه البكتريا في عينات الروبيان وكانت هذه الأنواع هي *Aeromonas veronii* و *Aeromonas schubertii* و *Aeromonas encheleia* و *Aeromonas sobria*

وقد شخصت العزلات البكتيرية اعتماداً على كل من Holt *et al*., [35] و Lee *et al.,* [33] و[27] Forbes *et al.,* و[46] Martin-Carnahan and Joseph و[20] De Vos *et al.,* و [3] Aberoum and Jooyandeh إضافة إلى نظام التشخيص API كما في الجدولين (4) و (5).

واتفقت النتائج مع Chasanah *et al.* [14] الذي استطاع عزل ثلاثة أنواع من البكتريا مطابقة لما وجد في الدراسة الحالية وهي *Aeromonas schubertii* و *Aeromonas veronii* و *Aeromonas sobria* من الروبيان. وتوصلت الدراسة إلى عزل ستة أنواع من بكتريا *Vibrio* spp. وذلك بتنمية تخافيف العينات على وسط TCBS وهو وسط انتخابي تفريقي لا تنمو عليه سوى بكتريا *Vibrio* spp. التي تظهر مستعمرات صفراء اللون او خضراء، بعدها تم تصبيغ البكتريا بصبغه كرام وكانت جميع العزلات سالبة لصبغه كرام وأظهر أن شكل خلايا البكتريا كانت على شكل ضمات صغيره وجميعها متحركة كما بينت النتائج إن جميع العزلات كانت موجبة لفحص الأوكسيديز.

جدول (4): الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Aeromonas* المعزولة من الروبيان باستعمال النظام التشخيصي API HiAermonas.™ Identification Kit.

الاختبارات / العزلات	تكوين غاز H_2S	فحص فوكاس بروسكاور	β-hemolysis	اختبار المثيل ريد	إزالة الامين من Phenylalanine	DNase	Hemolysis	KCN	إزالة مجموعة الكاربوكسيل من Lysine	إزالة مجموعة الكاربوكسيل من Ornithine	تحلل الجيلاتين	اليوريز	اختزال النترات	الاندول	الاكسيديز	الكتاليز	الارجنين	كلوكوز	استهلاك السترات	انتاج الغاز من الكلوكوز
A. schubertii	_	_	+	+	D	+	β	_	+	_	+	D	+	_	+	+	+	+	+	_
A. veronii	_	+	+	+	D	+	β	D	_	+	D	_	+	+	+	+	+	+	+	+
A. encheleia	_	_	D	+	+	+	_	_	_	_	+	D	+	+	+	+	+	+	_	D
A. sobria	-	D	D	D	_	_	β	D	D	_	+	_	+	+	+	+	D	+	+	+

+ : موجب - : سالب D : ضعيف

جدول (5) الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Aeromonas* المعزولة من الروبيان باستعمال النظام التشخيصي API HiAermonas.™ Identification Kit

السكريات	*A. sobria*	*A. encheleia*	*A.veronii*	*A.schubertii*
لاكتوز	-	D	D	-
زايلوز	+	+	D	-
مالتوز	+	+	+	+
فركتوز	D	_	+	+
كالاكتوز	+	+	+	+
رافينوز	-	-	-	-
تريهالوز	+	+	D	+
ميليبايوز	-	D	-	-
سكروز	D	+	+	-
L-ارابينوز	-	-	-	-
مانوز	-	+	D	-
الانيولين	-	+	-	-
صوديوم كلوكونات	-	+	-	-
كليسيرول	+	+	+	-
سالاسين	-	+	+	-
كلوكوز امين	D	+	D	_
اينوسيتول	-	D	-	-
سوربيتول	-	D	-	-
مانيتول	+	+	+	-
رايبوز	+	+	-	-
رهمانوز	-	+	-	-
سيلوبيوز	D	D	D	-
melezitose	D	-	-	-
الاسكولين	-	+	+	-

+ : موجب – : سالب D : ضعيف

جدول (6): الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Vibrio* spp. المعزولة من الروبيان.

الفحوصات / العزلات	اختبار المثيل ريد	فحص فركاس بروسكاور	اختزال النترات	اختبار الاندول	تحلل النشا	ازالة مجموعة الكاربوكسيل من Ornithine	β-galactosidase (ONPG)	ازالة مجموعة الكاربوكسيل من Lysine	النمو في 8% NaCl	النمو في 6% NaCl	النمو في 3% NaCl	النمو في 0% NaCl	النمو عند 40 C	النمو عند 4 C	تحلل اليوريز	استهلاك السترات	تحلل الارجنين	تحلل الجيلاتين	اختبار الكتالاز
V. parahaernolyticus	-	-	+	+	-	+	-	+	-	D	+	D	-	D	D	D	-	+	+
V. fluvialis	D	-	+	D	+	-	-	-	-	D	+	-	D	+	+	+	+	D	D
V. Fischeri	+	+	D	+	+	-	-	-	-	-	D	-	+	+	-	D	-	+	+
V. harveyi	D	-	+	+	+	-	D	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	D
V. alginolyticus	+	+	+	D	-	-	-	D	-	-	D	D	D	+	D	+	-	D	D
V. vulnificus	+	-	+	-	D	D	-	+	-	D	+	-	+	-	D	+	-	+	+

+ : موجب – : سالب D : ضعيف

جدول (7): التخمرات السكريات لبكتريا *Vibrio* spp. المعزولة من الروبيان.

العزلات / السكريات	*V.vulnificus*	*V.alginolyticus*	*V.harveyi*	*V.fischeri*	*V.fluvialis*	*V.parahaernolyticus*
D - كلوكوز	+	+	-	-	+	+
لاكتوز	D	+	-	+	D	D
مالتوز	+	+	+	+	+	+
سكروز	-	+	D	-	+	-
L-رابينوز	-	-	D	-	+	D
سالسين	+	-	-	-	-	-
أنيسيتول	-	D	D	-	D	-
سوربيتول	D	D	_	-	+	-
مانيتول	D	+	D	+	+	+
سيلوبوز	+	-	-	+	-	-

+ : موجب – : سالب D : ضعيف

ثم شخصت البكتريا بأستعمال نظام عده التشخيص API HiVibrio.™ Identification Kit لتحديد نوع بكتريا *Vibrio* spp. ودلت على وجود أنواع عديدة منها في عينات الأسماك والروبيان، وتم تشخيص الأنواع طبقاً لما ذكره Gonzalez *et al.,* [30] و De Vos *et al.* [20] وكما موضحة في الجدول (6–7).

وقد اتفقت النتائج مع Tanasomwang *et al.* [57] بعزله بكتريا *Vibrio paraheamolyticuc* و *Vibrio fluvialis* و *Vibrio alginolyticus* و *Vibrio harveyi* و *Vibrio* spp. من الروبيان. في حين أستطاع Gomez-Gil *et al.* [28] من عزل أكثر من ثمانية أنواع من *Vibrio* spp. من الروبيان. لم يتم في هذه الدراسة تشـــــــــخيص بكتريا *Vibrio cholera* بعكس ما وجـده Narasimhan *et al.*

[49] بعزله لهذه البكتريا من أنسجة عضلات الروبيان *Penaeus monodon*. وقد اتفقت النتـــائج مع Wendy and Wei [63] و Vincy *et al.,* [61] بتشخيصهم *Vibrio alginolyticus* من الروبيان *Litopenaeus vannamei*. وبينت نتائج الدراسة وجود ثمانية أجناس من بكتريا العائلة المعوية Enterobacteriaceae في الروبيان والمذكورة في جدولين (8 و9) فقد تم تشخيص الأجناس والأنواع المختلفة من البكتريا المعوية باستعمال العدة API Hi 25 ™ Enterobacteriaceae. Identification Kit وشخص نوعان للجنس *Citrobacter* هما *C.amalonaticus* و *C. freundii* بينما شخصت ثلاثة أنواع تعود إلى الجنس *Enterobacter* هما *E.cloacae* و*E.aerogenes* و *E.taylorae* كما وجد نوع يعود الى *Cronobacter sakazakii* وشخصت عزلات تعود إلى النوع *Hafnia alvai* إما جنس*Proteus* فقد شخص نوعان هما *P.mirabilis* و*P.vulgaris* ووجد من خلال النتائج إن بكتريا *Proteus* كانت سالبة لاختبار سكر المليباويز وسالبة لأختبار الأوكسيديز وتحلل البكتين واختبار ONPG production وسالبة لتخمر سكر المانوز وسكر الأونوسيتول والمانيتول و D-arabitol وadonitol و erythritol وموجبة لإختبارات ألأنزيم المزيل للأمين من ألأورثنين Ornithine deaminase والأنزيم المزيل للأمين من الفينايل ألانين Phenylalanine deaminase والنمو على السيانيد البوتاسيوم وإنتاج الغاز من الكلوكوز وأختزال النترات وموجبة لإنتاج غاز H_2S وتسييل الجيلاتين وإنتاج اللايبيز وضعيفة في استهلاك السترات وتحلل اليوريا بينما كانت بكتريا *Morganella morganii sub. morganii* سالبة الأختبارات التي ذكرت في أعلاه بالإضافة إلى استهلاك السترات وموجبة لتخمير سكر المانوز واختبار اليوريز وحسب [4 ،9 ، 20] كما في الجدولين (8 و9).

وقد اتفقت النتائج مع Narasimhan *et al.*,[49] بعزله *Enterobacter aerogens* و *Escherichia coli* من أنسجة عضلات الروبيان *Penaeus monodon* .

واتفقت النتائج أيضاً مع Wauters *et al.*, [62] وذلك بعزله *Enterobacter aerogenes* و *Klebsiella pneumoniae* باستعمال API 25 Ent. systems. وقـــد اتفقت النـــــتائج مع Gonçalves *et al.*, [29] بعزله وتشخيصه لبكتريا *E.coli* من الروبيان. ويُعد وجود العائلة المعوية في الأسماك هو مؤشر للتلوث بمياه الصرف الصحي وهناك سلالات منEnterobacteraceae قد تسبب الإسهال وهي يمكن ان تسبب في تلف مجموعة واسعة من الأغذية بالإضافة إلى اعطاء النكهات والرائحة غير المرغوبة فيها نتيجة لعمل إنزيمات البكتريا على البروتينات والدهون في الأغذية [23]. أما ما يخص تردد ظهور أنواع البكتريا المعزولة من الروبيان فقد أشارت النتائج إلى إن بكتريا *Pseudomonas fluorescens* كانت الأكثر تردداً في الظهور من بقية الأنواع جدول (10).

جدول (8): يوضح الاختبارات التشخيصية الكيموحيوية للعائلة المعوية المعزولة محلياً من عينات الروبيان بأستعمال العدة API Hi 25 ™ Enterobacteriaceae. Identification Kit

الأختبارات / العزلات	فحص فوكاس بروسكاور	اختبار المثيل ريد	ازالة الامين من الفينيل الانين	اختبار اليوريز	TDA	انتاج غاز H_2	KCN	ازالة الكاربوكسيل من Lysine	ازالة الكاربوكسيل Ornithine	تحلل الجيلاتين	الحركة	اختزال النترات	الاندول	الكاتليز	الاوكسيديز
E. coli	-	+	D	-	-	-	D	+	-	-	-	+	+	+	-
C. amalonaticus	+	-	-	D	D	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
C. freundii	_	+	-	D	D	+	+	-	D	-	+	+	D	+	-
E.cloacae	+	-	-	-	-	-	D	-	+	-	+	+	+	-	-
Cronobacter sakazakii	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
E.taylorae	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	D	-
E.aerogenes	+	-	-	-	-	-	+	+	+	D	+	+	_	+	-
H.alvai	-	D	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	D	+	-
P. mirabilis	-	+	+	D	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
P. vulgaris	-	+	+	D	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
P.marina	-	+	+	D	D	+	D	D	+	+	+	+	+	D	-
S. fonticola	-	+	D	-	-	-	D	+	+	D	+	+	-	D	D
S.marcescens	D	+	D	-	-	-	D	+	+	D	+	+	-	D	D
K. oxytoca	+	D	D	+	-	-	+	D	+	D	D	+	+	+	-
K. pneumonia sub. pneumonia	+	-	D	+	-	-	+	D	+	D	+	+	_	+	-
M.morganii sub. morganii	-	+	-	+	+	+	D	-	D	-	+	+	+	D	-

+ : موجب - : سالب D : ضعيف

جدول (9): اختبارات تخمر السكريات للعائلة المعوية المعزولة محلياً من عينات الروبيان بأستعمال العدة API Hi 25 ™ Enterobacteriaceae. Identification Kit

الاختبارات / العزلات	*Proteus vulgaris*	*Proteus mirabilis*	*Hafnia alvai*	*Enterobacter taylorae*	*Cronobacter sakazakii*	*Enterobacter Cloacae*	*Enterobacter agglomerans*	*Citrobacter freundii*	*Escherichia coli*	*Enterobacter aerogenes*	*Morganella morganii sub. morganii*	*Klebsiella pneumonia*	*Klebsiella oxytoca*	*Serratia marcescens*	*Serratia fonticola*	*Citrobacter amalonaticus*
D - كلوكوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D
لاكتوز	-	-	-	-	+	+	D	D	-	+	-	+	+	-	-	+
زايلوز	+	+	+	+	+	+	D	+	+	+	-	+	+	-	-	+
مالتوز	+	-	-	-	-	+	D	+	+	+	-	+	+	-	-	+
فركتوز		-	-	+	+	+	-	+	D	D	-	+	+	-	-	-
كالكتوز	-	-	-	-	+	+	+	+		+	-	+	+	D	D	+
رافينوز	-	-	-	D	+	+	D	D	D	+	-	+	+	+	+	-
تريهالوز	+	D	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ميليبيوز	-	D	-	-	+	+	D	D	-	+	-	+	+	-	+	D
سكروز	+	-	-	-	+	+	+	+	D	+	-	+	+	+	+	D
L- ارابينوز	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
مانوز	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	D	D	D	-	+	+
سالاسين	D	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	D	D
اينوسيتول	-	-	-	-	+		-	-	D	D	-	D	-	-	D	-
سوربيتول	-	-	-	-	-	+	D	+	D	D	-	-	-	D	+	+
مانيتول	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	D	+
ادونيتول	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+	-	+	+	-	+	-
رايبوز	-	-	-	-	-	+	+	-	D	D	+	+	-	D	D	-
رهمانوز	-	-	+	-	+	+	D	+	+	+	-	+	+	-	-	+
سيليبايوز	-	-	-	+	+	+	D	D	-	+	-	+	+	-	-	+
ONPG	-	D	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
الاسكولين	D	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
D- ارابينوز	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+			+
استهلاك السترات	D	D	D	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
مالونات	-	-	-	+	-	-	D	D	-	+	-	+	+	D	-	-

+ : موجب - : سالب D : ضعيف

الكشف الابتدائي عن البكتريا المنتجة للهستامين في الأوساط ألسائلة والصلبة

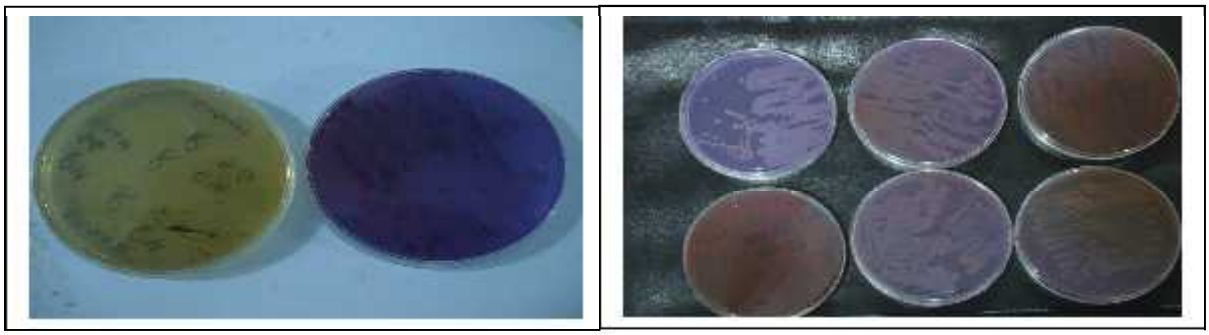
تم إخضاع العزلات البكتيرية المحلية إلى عملية غربلة للتعرف على مقدرتها على إنتاج الهستامين اعتماداً على تغير لون الوسط إلى اللون البنفسجي حول المستعمرات النامية على الوسط H.C.M كما في الشكل (3). أعطت نتائج النمو للبكتريا المعزولة من الروبيان في الأوساط ألسائلة والصلبة (TSBHA و TSBH، H.C.B) تغيراً لونياً في الأوساط دلالة على أنتاج الهستامين بسبب قيام البكتريا في أنتاج ألأنزيم النازع للكاربوكسيل من الهستدين وتحويله إلى الهستامين الذي بدوره غير لون الصبغة للأوساط الزرعية ألسائلة والصلبة بسبب تغير قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط (من الحامضية إلى القاعدية) وتغير اللون من الأخضر الى اللون البنفسجي بسبب وجود صبغة البروموكريسول البنفسجية Bromocresol purple بعد مدة الحضن في ظروف مناسبة من درجة حرارة وغيرها . ففي الأوساط ألصلبة ظهرت هالة بنفسجية حول المستعمرات البكتيرية النامية. وقد بينت النتائج وجود بكتريا قوية في إنتاج الهستامين في وسط إنتاج الهستامين الصلب وبكتريا أخرى كانت ضعيفة الإنتاج في نفس الوسط، كما وجدت أيضاً بكتريا أخرى سالبة الإنتاج أي أنها لا تمتلك أنزيم Histamine decarboxylase (H.D.C.) وليس لها دور في أنتاج الهستامين كما في الجدول (11)و الشكل (3).

وقد أجري هذا الاختبار باستعمال الوسطين السائلين TSBH وH.C.B المحتويين على صبغة البروموكريسول ألأرجوانية bromocresol purple وبعد مدة الحضن لوحظ تغير لون الأوساط السائلة بصورة واضحة الى اللون البنفسجي للبكتريا المنتجة لأنزيم Histamine decarboxylase(HDC) وعدم تغيره للبكتريا غير المنتجة للهستامين كما في الشكل (4) وبينت النتائج أيضاً تباين العزلات في إنتاجيتها للأنزيم من خلال تباين كثافة لون الأوساط ألسائلة خلال مدة ألحضن كما ظهر في الجدول (11).

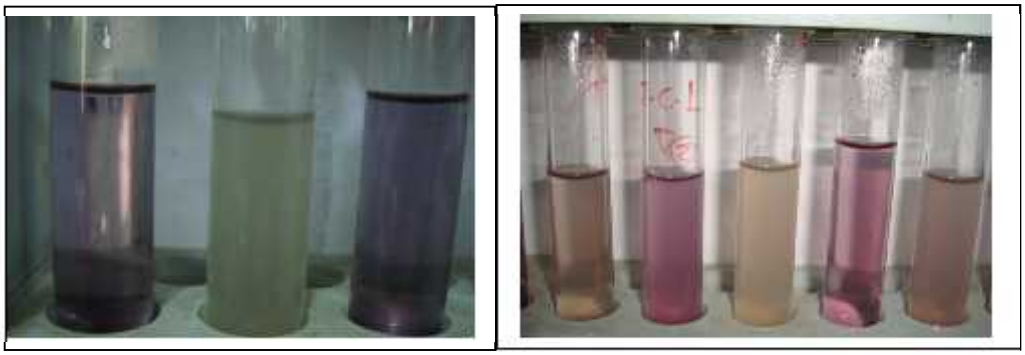
وقد بينت النتائج السابقة إن جميع العزلات قد تباينت في قدرتها على إنتاج الأنزيم بدرجات متفاوتة وهذا ما بينه الجدول (11). كما بينت النتائج أيضاً وجود بعض الأنواع البكتيرية التي أعطت نتيجة سالبة للفحص في الوسط السائل والصلب ولكنها في الحقيقة يمكنها إن تنتج الهستامين من تحلل الهستدين وذلك قد يعود إلى إن الرقم الهيدروجيني للوسط لا يلائم البكتريا مما يسبب عدم نموها في الوسط ومن أمثلتها بكتريا *Hafnia alvei* [10]. وقد أكد López-Sabater *et al.* [45] إن بكتريا *Klebsiella oxytoca* و *Klebsiella pneumoniae* قد أنتجتا الهستامين في الوسط السائل TSBH.و اتفقت النتائج مع ما وجده [32] Hala´sz *et al.*, إن هنالك أجناس تابعة للعائلة Enterobacteriaceae تنتج مستويات عالية من الهستامين وهذا ما ذكره أيضاً [51] Roig-Sague´s *et al.*, إن بكتريا*Entrobacter*

جدول (10): أنواع البكتريا المعزولة من الروبيان *Metapenaeus affinis* وترددداتها ونسبتها المئوية.

الروبيان					
اسم البكتريا	تردد البكتريا	النسبة المئوية%	اسم البكتريا	تردد البكتريا	النسبة المئوية%
Cronobacter sakazakii	4	5.63	*A. veronii*	1	1.40
E.cloacae	3	4.22	*A. schubertii*	1	1.40
E.aerogenes	2	2.81	*A. encheleia*	2	2.81
E.taylorae	2	2.81	*A. sobria*	2	2.81
P. vulgaris	1	1.40	*V. vulnificus*	2	2.81
P. marina	4	5.63	*V. fischeri*	1	1.40
P. mirabilis	2	2.81	*V. alginolyticus*	1	1.40
S. aprophyticus	1	1.40	*V. parahaernolyticus*	2	2.81
S. epidermidis	1	1.40	*V. fluvialis*	2	2.81
S. intermedius	2	2.81	*S. fonticola*	3	4.22
C.amalonaticus	2	2.81	*S. marcescens*	2	2.81
C. freundii	2	2.81	*B. alvei*	2	2.81
E. coli	2	2.81	*B. licheniformis*	2	2.81
H. alvei	2	2.81	*B.pumilus*	2	2.81
M. morganii sub. morganii	2	2.81	*B.subtilis*	1	1.40
P .aeruginosa	3	4.22	*K. oxytoca*	2	2.81
P . fluorescens	5	7.04	*K.pneumonia*	2	2.81
V. harveyi	1	1.40			



شكل (3): اختبار قدره العزلات المحلية المعزولة على إنتاج الهستامين بأستعمال الوسط الصلب.



شكل (4): يوضح كفاءة العزلات المحلية لبكتريا الاولية في انتاج الهستامين في الوسط السائل.

جدول (11): اختبار البكتريا المعزولة لإنتاج الهستامين على أوساط أنتاج الهستامين الصلبة والسائلة.

اسم البكتريا	نتيجة موجبة	اسم البكتريا	نتيجة ضعيفة	اسم البكتريا	نتيجة سالبة
K. pneumonia sub. pneumonia	++	*S. intermedius*	+	*A. schubertii*	_
K. oxytoca	++	*E. coli*	+	*A. veronii*	-
E. cloacae	++	*Serratia marcescens*	+	*A. encheleia*	-
P. marina	++	*Serratia fonticola*	+	*A. sobria*	-
V. alginolyticus	++	*P. fluorescens*	+	*H. alvei*	-
C. sakazakii	++	*P. aeruginosa*	+		
E.taylorae	++	*B. subtilis*	+		
P. vulgaris	++	*B. Licheniformis*	+		
P. mirabilis	++	*B. alvei*	+		
C. freundii	++	*B. Pumilus*	+		
C. amalonaticus	++	*S. aprophyticus*	+		
V. vulnificus	++	*S. epidermidis*	+		
V. harveyi	++				
V. fischeri	++				
V. parahaernolyticus	++				
V. fluvialis	++				
E.aerogenes	++				
M. morganii sub. morganii	++				

Enterobacter aerogenes و *Klebsiella oxytoca* كانت منتجة للهستامين. أكد Tiecco *et al*. [58] أن بكتريا *Staphylococcus* كانت منتجة للهستامين، في حين ذكر Silla - Santos [54] إن 76% من عزلات بكتريا *Staphylococcus* وخاصة النوع *Staphylococcus xylosus*. كما بين [55] Straub *et al*., و Montel [47] إن بكتريا *Staphylococcus* كانت منتجة للهستامين وللأنواع *Staphylococcus carnosus* و *Staphylococcus piscifermentans* . كما وجد López-Sabater *et al*., [44] إن بكتريا *Staphylococcus* كانت أيضاً منتجة للهستامين وللأنواع *Staphylococcus plymuthica* و *Staphylococcus fonticola* . وقد أظهرت نتائج الدراسة ان بكتريا *S. intermedius* و *S. aprophyticus* و *S. epidermidis* قد انتجت الهستامين ولكن بصورة ضعيفة جدول (11). وذكر Roig-Sague´s *et al*., [51] أن بكتريا *E.coli* تنتج الهستامين وأكد Silla-Santos [54] بأن بكتريا *Morganella morganii* هي مسؤولة عن تراكم الأمينات الحيوية وبخاصة الهستامين. وقد اتفقت النتائج مع Lehane and Olley [43] و Jorgensen *et al*. [37] من أن بكتريا *Pseudomonas* كانت منتجة بشكل كبير للأمينات الحيوية ومن ضمنها الهستامين في الأسماك كذلك ذكر Cundell *et al*. [18] أن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* كانت منتجة للهستامين من الهستدين.

وقد وجد إن معظم البكتريا المكونة للهستامين محبة للدرجات الحرارية المعتدلة لذلك فأن الأمينات الحيوية وخاصة الهستامين يزداد في الدرجات الحرارية التي تتراوح بين 15- 20°م [2 ،43 ،26].

وقد اتفقت النتائج أيضاً مع Wauters *et al*., [62] الذي وجد إن بكتريا *Enterobacter aerogenes* و *Morganella morganii* قد أعطت نتيجة موجبة لإنتاج الهستامين. اتفقت النتـــــــائج مع ما بيـــنه Korashy and Farag [39] أن بكتريا *Aeromonas* spp. لا تنتج الهستامين في حين كانت *Morganella morganii* و *Enterobacter aerogenes* و *Enterobacter cloacae* و *Klebsiella pneumoniae* و *Vibrio parahaemolyticus* و *Vibrio alginolyticus* و *Proteus vulgaris* منتجة للهستامين. وقد وجد Koohdar *et al*., [38] إن العينات التي تحتوي على أنواع وإعداد مختلفة من البكتريا التي تعود إلى عائلة Enterobacteriaceae والمنتجة للهستامين قد أعطت نسب هستامين عالية فيها. واتفقت النتائج مع Tsai *et al*., [59] الذي وجد إن جنس *Bacillus* وخاصة بكتريا *Bacillus coagulans* كانت منتجة بصورة ضعيفة للهستامين في منتجات الأسماك لمدينة تايوان.

كذلك اتفقت النتائج مع Chen *et al*., [15] الذي وجد إن بكتريا *Klebsiella variicola* و *Serratia marcescens* و *Enterobacter* spp. المعزولة من منتجات سمك التونة أنتجت الهستامين بصورة ضعيفة في الوسط السائل الحاوي على الهستدين TSBH.

اتفقت النتائج مع Kung *et al*., [40] بعد إن قام بعزل بكتريا *Enterobacter aerogenes* و *Bacillus pumilus* و *Bacillus megaterium* و *Serratia marcescens* و *Klebsiella oxytoca* و *Klebsiella pneumonia* من منتجات التونة وكلها كانت منتجة للهستامين في وسط TSBH.

وقد ذكر Chen *et al*., [16] إن بكتريا *Bacillus subtilis* كانت ضعيفة لأنتاج الهستامين في وسط إنتاج الهستامين السائل لذلك فليس لها دور أساسي في تجمع الهستامين وتراكمه في سمك Marlin fillets وهذا قد يعود عدم نموها بصورة جيدة في هذه الأوساط أو بسبب عمليه التجميد التي تؤثر في نموها.

ووجد Musih *et al*., [48] إن 47 عزلة بكتيرية معزولة من روبيان نوع *belacan* منها *Pseudomonas* و *Moraxella* و *Bacillus* *Acinetobacter* و *Aeromonas* و و *Proteus* و *Arthrobacter* و *Lactobacillus* و *Klebsiella* و *Enterobacter* و *Staphylococcus* و *Micrococcus* وأن العزلات *Morganella* و *Pseudomonas* و *Micrococci* قد أعطت نتيجة موجبة على وسط انتاج الهستامين.

اون استعمال طر ائق الأوساط الزرعية للكشف عن البكتريا المنتجة للهستامين التي تعتمد على التغير في الرقم الهيدروجيني فأن انخفاضه في الأوساط الزرعية يؤثر على نمو بعض الأحياء المجهرية المنتجة للهستامين مثل بكتريا*Photobacterium damselae* و *Hafnia alvei* والتي لا تنمو بصورة جيدة في ذلك الرقم الهيدروجيني وإن رفعه يمكن إن يؤثر في فشل

الاختبار وأكد عدد من الباحثين إن تغير حموضة الوسط ممكن إن يكون بسبب التمثيل الغذائي لبعض الأحياء المجهرية التي لا تنتج الأمينات الحيوية مما يؤدي إلى إعطاء نتيجة خاطئة للاختبار [10].

المصادر

1– الطائي، منير عبود جاسم (1987). تكنولوجيا اللحوم والأسماك، مطبعة جامعة البصرة. 420ص.

2-Ababouch, L.; Afilal, M.E.; Benabdeljelil, H. and Busta, F.F. (1991). Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28C) and in ice. Int. J. Food. Sci. Technol., 26 (3): 297-306.

3-Aberoum, A. and Jooyandeh, H. (2010). A Review on Occurrence and Characterization of the *Aeromonas* Species from Marine Fishes World .J. Fish Mar. Sci., 2 (6): 519-523.

4- Actis, L. A.; Smoot, J. C.; Barancin, C. E. and Findlay, R. H. (1999). Comparison of differential plating media and two chromatography techniques for the detection of histamine production in bacteria. J. Microbiol. Methods, 39: 79-90.

5- Andrade, S. C. S.; Mársico, E. T.; Franco, R. M.; Godoy, R. L. O.; Pacheco, S.; Queiroz, M. F. and Guimarães, C. F. M. (2012). Shelf life of chilled and whole sardines evaluated by physical-chemical, bacteriological and sensory. Ciênci a. Rural, 42: 1901-1907.

6-Barman, P.; Banerjee, A.; Bandyopadhyay, P. ; Mondal, K.C and Das Mohapatra, P.K. (2011). Isolation, identification and molecular characterization of potential. probiotic bacterium, *Bacillus subtilis* PPP 13 from *Penaeus monodon*. Research Article, Biotechnol. Bioinf. Bioeng., 1(4): 473-482.

7- Barrow, G. C. and Feltham, R.K. A. (2003). Cowan and Steel's manual for identification of medical bacteria. 3rd ed. U.K. Cambridge Univ. press.

8-Benson, H. J. (2001). Microbiological application: Laboratory manual in general microbiology. 8th ed. The McGrow – Hill Companies.

9- Bjornsdottir, K. (2009). Detection and Control of Histamine-Producing Bacteria in Fish, PhD. North Carolina State University. 222 pp.

10- Björnsdóttir-Butler, K. and Green, D.P. (2010). Detection Of Histamine-Producing Bacteria. In Fish global aquaculture advocate . October, 2010 .

11- Bjornsdottir-Butler, K.; Bolton, G. E.; Jaykus, L. A.; McClellan-Green, P.D. and Green, D.P. (2010). Development of molecular-based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. Int. J. Food Microbiol., 139(3): 161-167.

12-Brenner, D. J.; Krieg, N.R. and Staley, J.T. (2009). Bergeys manual of systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol. 2. The Proteobacteria, Part A. Introductory Essays, U.S.A.

13-Cardozo, M.; Lima, K.S.C.; França, T. C. C. and Lima, A. L. S. (2013). Aminas biogênicas: Um problema de saúde pública. Revista Virtual de Química, 5: 149-168.

14- Chasanah, E.; Patantis, G.; Zilda, D.S.; Ali, M. and Risjani, Y. (2011). Purification and characterization of *Aeromonas* media Klu 11.16 chitosanase isolated from shrimp waste. J. Coas. Develop., 15(1): 104-113 .

15- Chen, H.C; Kung, H.F.; Chen, W.C.; Lin, W .F.; Hwang, D.F.; Lee, Y. C. and Tsai, Y.H. (2008). Determination of histamine and histamine-forming bacteria in tuna dumpling implicated in a food-borne poisoning. Food Chemis., 106 : 612-618 .

16-Chen, H.C; Lee, Y.C.; Lin, C.M.; Hwang, D. F. and Tsai, Y.H. (2010). Determination of histamine and bacterial isolation in marlin fillets (*Makaira nigrican*s) implicated in a food borne poisoning. J. Food Safety, 30(3): 699-710 .

17- Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, P.B and Simmons, A. (1996). Practical medical microbiology. 4th ed., Longman Singapore publisher Ltd., Singapore. 293pp.

18- Cundell, D. R.; Devalia, J.L.; Wilks, M.; Tabaqchali, S. and Davies, R. J. (1991). Histidine decarboxylases from bacteria that colonise the human respiratory tract. J. Med. Microbiol., 35: 363-366.

19- Dalgaard, P.; Emborg, J.; Kjølby, A.; Sørensen, N.D. and Ballin, N.Z. (2008). Histamine and biogenic amines formation and importance in seafood. In: Børresen, T. (Ed.). Improving seafood products for the consumer, Wood head Publishing Ltd., Cambridge, Pp. 292-324.

20-De Vos, P.; Garrity, G. M.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K.-H. and Whitman, W B. (2009). Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Second Edition Volume Three. Springer Dordrecht Heidelberg New York. 1450 pp .

21- Dempsay, A. C. and Kitting , C. L. (1987). Characteristics of bacteria isolated from penaeid shrimp. Crustacea, 52(1): 90-94.

22- Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (2006). The prokaryotes, A handbook on the biology of bacteria. 3rd ed. Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass Singapore.1193 pp.

23- EFSA (2011). Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Journal, 9(10): 2393.

24- Emborg, J. ; Dalgaard, P. and Ahrens, P. (2006). *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine producing bacterium isolated from various seafoods. Int. J. System. Evoluti. Microbiol., 56: 2473-2479.

25- Fegan, M.; Paul F. P.; Hayward, A. C.; Davis, H. G. and Fuerst, J. A. (1990). Phenotypic conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, J. Clin. Microbiol., 28(6): 1143-1146 .

26- Flick, G.J.; Oria, M.P. and Douglas, L. (2001). Potential hazards in cold-smoked fish: biogenic amines. J. Food Sci., 66(7): 1088-1099.

27-Forbes, B.A.; Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. (2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th International Edition. By Mosby. An affiliate of Elsevier Inc.

28-Gomez-Gil, B.; Tron-Maye´n, L.; Roque, A.; Turnbull, J.F.; Valerie Inglis, V. and Guerra-Flores, A.L. (1998). Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. Aquacult., 163: 1-9.

29-Goncalves,F.A.; Neto, M.A.; Bezerra, J.N.S. ; Macrae, A.; de Sousa, O. V.; Fonteles-Filho, A.A. and Vieira, R. H. S. F. (2008). Antibacterial activity of guava, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 50(1): 11-15.

30-Gonza´lez, S.F.; Krug, M. J.; Nielsen, M.E.; Santos, Y. and Call, D. R. (2004). Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. J. Clin. Microbiol., 42(4): 1414-1419.

31-Hajar, S. and Hamid, T. H. T. A. (2013). Isolation of lactic acid bacteria strain *Staphylococcus piscifermentans* from Malaysian traditional fermented shrimp cincaluk. Int. Food Research. J., 20(1): 125-129.

32-Hala´sz, A.; Bara´th, A.; Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by micro-organisms in food. Trends Food Sci. Technol., 5: 42-48.

33-Harley, J. P. and Prescott, L.M. (2002). Laboratory Exercises in microbiology. 5th ed. The McGraw-Hill companies, 449 pp.

34-Health protection Agency (2007). Identification of *Bacillus* species. National Standard method. BSOP, 9(2): 1-15.

35-Holt, J. G.; Kreig, N. R.; Sneath, P.H.A.; Stanly, J.T. and Williams, S.T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Baltimore. Williams & Wilkins.

36- Jiqiu,L.; Beiping, T. and Kangsen, M. (2011). Isolation and identification of bacterium from marine shrimp digestive tract: a new degrader of starch and protein. J. Ocean Univ. China, (Ocean. Coast. Sea Res.) 10(3): 287-292.

37-Jorgensen, L.V.; Huss, H.H. and Dalgaard, P. (2000). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. J. Appl. Microbiol., 89: 920-934.

38-Koohdar, V.A.; Razavilar, V.; Motalebi, A.A.; Mosakhani, F.; Valinassab, T. (2011). Isolation and Identification of Histamine-forming bacteria in frozen Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Iran. J. Fisher. Sci.,10(4): 678-688 .

39-Korashy, N.T. and Farag, H.E. (2005). Histamine and histamine producing bacteria in some local and imported fish and their public health Significance. Res. J. Agricult. Biologi. Sci., 1(4): 329-336.

40-Kung, H.F.; Lee, Y.C; Huang, Y.R.; Lin, W.F.; Lin, C.M.; Chen, W. C. and Tsai, Y. H. (2010). Biogenic amines content, histamine-forming bacteria, and adulteration of pork and poultry in tuna dumpling products. Food Contr., 21: 977-982.

41- Lau, G.W.; Hassett, D.J.; Ran, H. and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Molecul. Medi.,10(12): 599-606.

42- Lee , S. ; Kim, S.; Oh, Y. and Lee, Y. (2003). Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Rainbow Trout in Korea. J. Microbiol., 38(1): 1-7.

43-Lehane, L. and Olley, J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. Int. J. Food Microbiol., 58: 1-37.

44-López-Sabater, E.I.; Rodríguez-Jerez, J. J.; Hernández-Herrero, M. and Mora -Ventura, M . T . (1996). Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. Int. J. Food Microbiol., 28: 411-418

45- López-Sabater,E. I.;Rodríguez-Jerez, J . J. ; Roig-Sagues, A. X . and Mora - Ventura, M. T. (1994). Bacteriological quality of tuna fish (*Thunnus thynnus*) destined for canning. Effect of tuna handling on presence of histidine decarboxylase bacteria and histamine level. J. Food Protect., 57: 318-323.

46- Martin-Carnahan,A. and Joseph, S.W. (2005). Aeromonadaceae In: Brenner, D.J.; Krieg, N.R.; Staley, J.T.; Garrity, G.M. (Eds.). Bergey's manual of systematic Bacteriolog, , The Proteobacteria, Part B. Vol. 2. 2nd ed. Springer-Verlag, New York. Pp: 556-578.

47- Montel, M. C.; Masson, F. and Talon, R. (1999). Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. Sci. des Alimen.,19: 247-254.

48- Musih, C.; Mohtar, S.H. and Alias, R. (2012). Screening of histamine producing Bacteria associated with food-borne Intoxication in 'Belacan' International Annual Symposium on Sustainability Science and Management. 09th-11th July 2012, Terengganu, Malaysia.

49- Narasimhan , N. ; Ravimanickam, T.; Sukumaran, M.; Ravichelvan, R.; Ravichandran, R. and Madhavan, D. (2013). Pathogenic bacteria isolated from tiger prawn *Penaeus monodon* in shrimp culture ponds at east coast of Thanjavur District Tamil Nadu, India. Int. J. Res. Biologi. Sci., 3(2): 98-101.

50-Rodrigues, B. L.; Álvares, T. S.; Costa, M.P.; Sampaio, G. S. L.; Lázaro, De La Torre, C. A.; Mársico, E. T. and Conte-Júnior, C.A. (2013). Concentration of biogenic amines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) preserved in ice and its relationship with physicochemical parameters of quality. J. Aquacult. Res. Develop., 4 (3): 174-177.

51-Roig-Sague´s, A.X.; Herna´ndez Herrero, M.; Lo´pez-Sabater, E.I.; Rodriguez-Jerez, J.J. and Mora-Ventura, M. T. (1996). Histidine decarboxylase activity of bacteria

58-Tiecco, G.; Tantillo, G.; Francioso, E.; Paparella, A. and De Natale, G. (1986). Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogene in insaccati nel corso della stagionatura. Industr. Aliment., 5: 209-213.

59-Tsai, Y.H.; Lin, C.Y.; Chien, L.T.; Lee, T.M.; Wei, C.I. and Hwang, D.F. (2006). Histamine contents of fermented fish production Taiwan and isolation of histamine-forming bacteria. Food Chem., 98: 64-70.

60-VanHook, A.M. and Patel, N.H. (2008). Crustaceans. Curr. Biol., 18 (13): R547- R550.

61-Vincy, V.; Shoba, M.V; Viveka, S.; Vijaya, T.M. and Rani, G. J.B. (2014). Isolation and characterization of chitinase from bacteria of shrimp pond. Eur. J. Experim. Biol., 4 (3): 78-82.

62- Wauters, G.; Avesani, V.; Charlier, J.; Janssens, M. and Delme´e, M. (2004). Histidine decarboxylase in *Enterobacteriaceae* Revisited. J. Clin. Microbiol., 42 (12): 5923-5924.

63-Wei, L.S. and Wendy, W. (2012). Characterization of *Vibrio alginolyticus* isolated from white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with emphasis on its antibiogram and heavy metal resistance pattern. Veterinarski Arhiv., 82 (2): 221-227.

64-Yatsunami, K. and Echigo, T. (1991). Isolation of salt tolerant histamine-forming bacteria from commercial rice-bran pickle sardine. Bull. Jap. Soci. Scient. Fisher., 57: 1723-1728.

isolated from raw and ripened Salsichon, a Spanish cured sausage. J. Food Protect., 59: 516-520.

52- Satomi, M.; Furushita, M.; Oikawa, H. and Yano, Y. (2011). Diversity of plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus* spp. isolated from Japanese fish sauce. Int. J. Food Microbiol., 148: 60-65.

53-Setia, I. N. and Suharjono (2015). Chitinolytic Assay and Identification of Bacteria isolated from shrimp waste based on 16S rDNA sequences. Advan. Microbiol., 5: 541-548.

54- Silla-Santos, M.H. (1998). Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. Int. J. Food Microbiol., 39: 227-230.

55-Straub, B.W.; Kicherer, M.; Schilcher, S. M. and Hammes, W.P. (1995). The formation of biogenic amines by fermentation organisms. Zeitschrift fu¨r Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 201: 79-82.

56-Takahashi, H.; Kimura, B.; Yoshikawa, M. and Fujii, T. (2003). Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. Appl. Environ. Microbiol., 69 (5): 2568-2579.

57-Tanasomwang, V.; Nakai, T.; Nishimura, Y. and Muroga, K. (1998). Vibrio inhabiting Marine bacteria isolated from tiger shrimp hatchery. Fish Pathol., 33(5): 459-466.

Isolatation and Identification of some Types Bacteria from Shrimp (*Metapenaeus affinis*) and Detection of Histamine Producing from its

Kithar R. Majeed[1], Talib A. Jaayid[2] and Salah N.A. Al-Khaeun[1]

1Department of Food Science, College of Agriculture, Basrah University, Basrah, Iraq
2 Department of Animal production, College of Agriculture, Basrah University, Basrah, Iraq

e-mail: salahnaji70@gmail.com

Abstract: Genera and species of bacteria was isolated and identified from various of Shrimp *Metapenaeus affinis* , which have been brought from region of FAO in the province of Basrah, All samples were examined for the occurrence of bacteria and were identified according to growth characteristics , morphological, and microscopic examinations in addition to biochemical tests and API Identification Kit . Thirty fife isolates of bacteria were found in shrimp and as a follow: *Klebsiella pneumonia sub. pneumonia*, *Klebsiella oxytoca, Morganella morganii sub. Morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Cronobacter sakazakii* , *Enterobacter taylorae*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus* , *Proteus marina*, *Proteus vulgaris* , *Proteus mirabilis*, *Hafnia alvei*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Serratia fonticola,Vibrio vulnificus, Vibrio harveyi , Vibrio fischeri,Vibrio parahaernolyticus* ,*Vibrio fluvialis, Vibrio alginolyticus, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus intermedius, Staphylococcus epidermidis, Bacillus pumilus, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis*,*Bacillus alvei , Aeromonas veronii* , *Aeromonas sobria*, *Aeromonas encheleia* and *Aeromonas schubertii* . The results of determination of histamine which produced from bacteria by using Trypticase Soy broth-Histidine (TSBH), Histamine decarboxylase broth(H.D.B.) and Histamine decarboxylase agar (H.D.A.) showed that all isolated bacteria were histamine producing with various levels expect *Hafnia alvei, Aeromonas schubertii, Aeromonas veronii, Aeromonas encheleia* and *Aeromonas sobria* were not produce histamine.

Key words: Isolation , Bacteria , identification, shrimp , API ,Histamine .

***A part of Ph . D. Thesis for third researcher .**