انتاج إنزيم الهيمولايسين Hemolysin من العزلة المحلية لبكتريا *Vibrio cholerae* المعزولة من مرضى مصابين بالإسهال

***محمد ابراهيم نادر **مثنى عبد القادر صالح المهداوي *ايناس يوسف**
*فرع التقنية الأحيائية – معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا
** قسم علوم الحياة – كلية العلوم جامعة ديالى

تاريخ استلام البحث: 2010/9/20 - **تاريخ قبول النشر:** 2011/11/20

الخلاصة

شخصت 26 عزلة بكترية تعود لبكتريا الكوليرا *V cholerae* المعزولة من أشخاص مصابين بالإسهال، اختبرت قابلية العزلات لإنتاج إذزيم الهيمولايسين Hemolysin. أظهرت النتائج المتحصل عليها من الغربلة شبة الكمية على وسط اكار الدم المغذي المضاف له 7% من دم الأنسان، إن جميع العزلات لها القابلية على إنتاج إنزيم الهيمولايسين، وباعتماد مقايسة الحالة الدموية Hymolytic assay ظهر ان العزلة المحلية AMK6 هي الأكفأ في إنتاج الهيمولايسين.

حددت الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الهيمولايسين باستخدام الوسط الغذائي مرق نشيع القلب والدماغ الحاوي على 3% كليسرول والملقح بـ 2% من اللقاح البكتيري بتركيز $3x10^8$ cell / ml عند رقم هيدروجيني 8 و بدرجة حرارة35م° في حاضنة هزازة بسرعة 120 rpm لمدة 24 ساعة.

Abstract

Diagnosed 26 isolate of *vibrio cholera* was isolated from clinical sources responsible of causing diarrhea. All isolates showed high productivity of hemolysin by different efficiency. Semi quantitative screening on a selective solid medium (blood ager additive 7% blood) showed that all isolates have the ability to produce hemolysin as indicated by the formation of clear zone around the colonies.

The selected isolate characterized as *Vibrio cholera* AMK6 based on its high production of enzyme and used in the present study. The optimum conditions for hemolysin production by submerged cultures (brain heart infusion containing 3%Glycerol) with an inoculums size of $3x10^8$ CFU at an initial pH of 8 with shaking incubation at 35°C, 150 cycle/min for 24 hours.

Vibrio cholera , hemolysin production

المقدمة

الكوليرا من أهم الأمراض الخطيرة المنتشرة بشكل واسع في أنحاء العالم وخاصة الدول النامية. يسبب الوفاة لإعداد كبيرة من المصابين سنويا وخاصة في حالات الإصابة الشديدة وغير المعالجة. إذ تعتمد ا قابلية بكتريا الكوليرا على إحداث الإصابة إلى وجود العديد من العوامل الإضافية التي تميزها عن البكتريا غير المرضية وتدعى بعوامل الضراوة Virulence Factor، التي يوجد بعضها ضمن التركيب الخلوي وبعضها الأخر يفرز إلى خارج الخلية مثل الإنزيمات والذيفانات المختلفة، هذه العوامل قد تكون نوعية أو مشتركة لعدد من البكتريا المختلفة. كما انه من النادر أن يعمل أي عامل من عوامل الضراوة بشكل منفرد أو مستقل عن البكتريا نفسها، أما الذيفانات البكتيرية فتعد من عوامل الضراوة الأهم لقدرة أنواع عديدة منها على إحداث المرض بشكل ذاتي مباشر [1].

تمتلك بكتريا الكوليرا العديد من عوامل الضراوة التي تؤهلها للإصابات المعوية و إحداث المرض، منها قابليتها على الالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء الدقيقة، و إنتاجها للعديد من الذيفانات الداخلية Endotoxins و الذيفانات الخارجية Exotoxins و التي تتضمن أنواع عديدة أهمها الذيفانات المعوية Enterotoxins المتمثلة بذيفان الكوليرا Cholera toxin(Choleragen) و الذي يعد من أهم عوامل ضراوة بكتريا الكوليرا، و كذلك ذيفانات Cytotoxin و Hemolysin، إضافة لأنواع أخرى من الذيفانات [2]

يلعب الهيمولايسين، الذي يعد من الذيفانات الخارج خلوية Exotoxins، دورا" واضحا" في إحداث الإمراضيه من خلال تأثيره على أغشية الخلايا وتحللها عن طريق إحداث الثقوب فيها، من أهم هذه الخلايا هي خلايا الدم الحمراء Erythrocyte للإنسان وللحيوان [3]. لهذه الذيفانات فعاليات حيوية إضافة للفعالية التحليلية للدم activity Hemolytic من أهمها Enterotoxicity و Cardiotoxicity [4]. نظرا لتفشي مرض الكوليرا في بلدنا هدفت هذه الدراسة إلى التحري عن إنتاج إنزيم الهيمولايسين من بكتريا الكوليرا، وتحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الهيمولايسين والذي يلعب دورا" مهما" في إحداث الإمراضية.

المواد وطرائق العمل

مصادر العزلات

تم الحصول على 26عزلة من بكتريا Vibrio cholerae من مختبر الصحة المركزي مشخصة تشخيص اولي. أعيد تشخيص العزلات البكتيرية اعتمادا على تصنيف Bergey's الوارد في Holt *et al* [5] وفقا" للطرائق المستخدمة من قبل منظمة الصحة العالمية [6]. وبالاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية في التشخيص.

التحري عن قابلية الضمات لإنتاج الهيمولايسين

اختبتر 26 عزلة من بكتريا الكوليرا لتحديد العزلة الأكفاء في قابلية إنتاج إنزيم الهيمولايسين عن طريق الغربلة.

الغربلة شبه الكمية للعزلات

تمت غربلت العزلات البكترية للتحري عن قابليتها في إنتاج الهيمولايسين بنقل جزء من مستعمراتها النامية على وسط الاكار المغذي إلى إطباق حاوية على وسط الدم باستخدام عود خشبي Stick، ثم حضنت لمدة (24) ساعة بدرجة حرارة (37 م°) تحت ظروف هوائية، وبعد انتهاء مدة الحضن لوحظ ظهور مناطق تحلل الدم حول المستعمرات النامية بحيث كان التحلل واضحاً ومن يوع بيتا (β_hemolysin)، إذ يدل ذلك على قابلية هذه البكتريا على تحلل خلايا الدم الحمراء لإنتاجها إنزيم الهيمولايسين و قيست أقطار التحلل حول المستعمرات النامية.

تقدير فعالية الانزيم

عملت مقايسة الحالة الدموية لكل نموذج لتحديد العزلات الأكثر إنتاجاً للهيمولايسين باستخدام عالق خلايا الدم الحمراء للإنسان. وحسب الطريقة المتبعة من قبل الكرخي [7].

تقدير فعالية إنزيم الهيمولايسين

اعتمدت طريقة Namdari و Bottone [8] لتقدير فعالية الإنزيم بأضافة 1 مليلتر من عالق كريات الدم الحمر إلى 0.5 مليلتر من المستخلص (مزروع خلايا بكتريا الكوليرا النامية في وسط نقيع القلب والدماغ بدرجة 37 م°)، وحضن في درجة حرارة 37م° مدة 60 دقيقة، ثم قرئت بجهاز المطياف الضوئي وبطول موجي 544 نانومتر لقياس الخلايا المتحللة من كريات الدم الحمر. حضر المحلول الكفء (Blank) بإضافة عالق كريات الدم الحمر مع 0.5 مليلتر من محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS)، وسجلت الفعالية التحللية (Haemolytic unit) على إنها الحد الأدنى من النموذج اللازم لإنتاج 50% من التحلل.

تحديد العزلة البكتيرية الأكفأ إنتاجا" للهيمولايسين

بالاعتماد على الغربلة الشبة الكمية وعلى مقايسة الحالة الدموية تم اختيار العزلة الأكثر إنتاجا" لإنريم الهيمولايسين اذ أظهرت اعلى فعالية نوعية مقارنة ببقية العزلات.

تحديد الوسط الزرعي الأمثل لإنتاج الهيمولايسين

اختبرت كفاءة العزلة المختارة في إنتاج الهيمولايسين وذلك باستعمال ستة أوساط زرعيه وهي وسط المرق المغذي، وسط مرق نقيع القلب و الدماغ، وسط إنتاج الهيمولايسين Minimal media (MM)، وسط إنتاج الهيمولايسين (MGmedia)، وسط MM +Blood(1%) و وسط MG + Blood(1%).

حضرت الأوساط الزراعية السابقة بحجم 100 مليلتر في دوارق مخروطية سعة 250 مليلتر، ثم لقحت الدوارق بحجم 2 مليلتر من اللقاح البكتيري بتركيز $3x10^8$ cell/ml وحضنت الدوارق بالحاضنة بدرجة حرارة 37م° لمدة 24ساعة، ثم نبذ المزروع بسرعة (7000 دورة/دقيقة) لمدة 15 دقيقة، جمع رائق كل عزلة في أنبوبة اختبار معقمة لتقدير فعالية الإنزيم.

تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الهيمولايسين

استخدم وسط مرق نقيع القلب والدماغ للإنتاج، حضر الوسط بأرقام هيدروجينية متدرجة (6- 6.5- 7-7.5- 8- 8.5) لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الهيمولايسين.

تحديد زمن الحضن الأمثل لإنتاج الهيمولايسين

لقح وسط مرق نقع القلب والدماغ ذو رقم هيدروجيني 8 بنسبة 2% من اللقاح البكتيري بتركيز $3x10^8$ cell/ml وحضنت الأوساط بالحاضنة بدرجة حرارة 37م° لمدة (24-48-72) ساعة، ثم نبذ المزروع بسرعة (7000 دورة/دقيقة) لمدة 15 دقيقة، جمع رائق كل عزلة في أنبوبة اختبار معقمة لتقدير فعالية الإنزيم.

تحديد مصدر الكاربون الامثل لإنتاج إنزيم الهيمولايسين

اختبرت كفاءة المصادر الكربونية (Glucose-Sucrose-Dextrose-Maltose-Glycerol)_بتركيز 3% لإنتاج إنزيم الهيمولايسين. لقح وسط مرق نقع القلب والدماغ ذو رقم هيدروجيني 8 بنسبة 2% من اللقاح البكتيري بتركيز $3x10^8$ cell/ml وحضنت الأوساط بالحاضنة بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة، ثم نبذ المزروع بسرعة (7000 دورة / دقيقة) لمدة 15 دقيقة، جمع رائق كل عزلة في أنبوبة اختبار معقمة لتقدير فعالية الإنزيم

تحديد التركيز الامثل للمصدر الكاربوني

اختبرت تراكيز مختلفة من الكليسرول في وسط الإنتاج تضمنت (0.5-1-1.5-2-2.5-3)% لتحديد أي منها الأمثل لإنتاج الإنزيم.

تحديد المصدر النتروجيني الامثل لإنتاج الهيمولايسين

اختبرت اربع مصادر للنتروجين تضمنت (Pepton-Trypton-Urea-NH3) و بتركيز 3% لإنتأج إنزيم الهيمولايسين.

تحديد التركيز الامثل للمصدر النتروجيني

اختبرت تراكيز مختلفة من البيتون في وسط الإنتاج تضمنت (0.5-1-1.5-2-2.5-3)% لتحديد تاثيرها في إنتاج الهيمولايسين

تعيين درجة الحرارة المثلى لإنتاج الهيمولايسين

حضن وسط الإنتاج الملقح بالعزلة المنتجة لإنزيم الهيمولايسين بدرجات حرارة مختلفة تضمنت (25-30-35-37-40-45) لتحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج الهيمولايسين.

تاثير التهوية في انتاج الهيمولايسين

لقح دورقان مخروطيان حاويان على وسط الإنتاج بالعزلة المنتجة لإنزيم الهيمولايسين ثم حضنت بدرجة حرارة 37م°، الأول في حاضنة هزازة (Shaking incubator) بسرعة 120rpm ، والثاني بحاضنة غير متحركة Stationary incubator لتحديد تاثير التهوية في إنتاج الهيمولايسين.

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

تم الحصول على 26 عزلة بكتيرية من مختبر الصحة المركزي مشخصة اوليا" عنى انها ضمات الكوليرا *Vibrio cholerea*، أعيد تشخيص العزلات للتأكيد اعتمادا" على تصنيف Bergey's الوارد في [2] و الطرائق المستخدمة من قبل منظمة العالمية و استخدام نظام Api E 20 للعائلة المعوية.

التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الهيمولايسين

اختبرت قابلية جميع العزلات البكتيرية الـ26 على إنتاج إنزيم الهيمولايسين بتنميتها على أطباق حاوية على أكار الدم الأساس المضاف له 7% دم بشري و حضنها بدرجة حرارة 37م° لمده 24 ساعة. أظهرت جميع العزلات قابلية على تحلل الدم بشكل كامل متمثلا بظهور هالة شفافة حول المستعمرات دلالة على قابلية هذه العزلات على إنتاج إنزيم الهيمولايسين من نوع بيتا. كانت نتائج قطر المنطقة الشفافة التي أحدثتها هذه العزلات كما موضحة في الجدول(1).

الجدول(1) اقطار التحلل التي احدثها إنزيم الهيمولايسين

رقم العزلة ورمزها	قطر منطقة التحلل (mm)
AMK 1	1
AMK 2	1
AMK 3	2
AMK 4	3
AMK 5	3
AMK 6	6
AMK 7	1
AMK 8	1
AMK 9	2
AMK 10	1
AMK 11	2
AMK 12	4
AMK 13	5
AMK 14	4
AMK 15	3
AMK 16	2
AMK 17	5
AMK 18	4
AMK 19	2
AMK 20	3
AMK 21	6
AMK 22	6
AMK 23	4
AMK 24	6
AMK 25	5
AMK 26	6

اختيار العزلة الأكثر إنتاجا" للهيمولايسين

بالاعتماد على الغربلة شبة الكمية وعلى مقايسة الحالة الدموية يتم اختيار العزلة الأكثر إنتاجا" لإنزيم الهيمولايسين، وهي العزلة AMK6 اذ أظهرت اعلى فعالية مقارنة ببقية العزلات الأخرى وكانت الفعالية 640 وحدة/مليلدر (الجدول 2).

تعيين الظروف المثلى لإنتاج الهيمولايسين

تم تعيين الظروف المثلى لإنتاج الهيمولايسين من خلال اختيار متطلبات النمو التالية:

جدول(2) فعالية الهيمولايسين المنتج من العزلات باستخدام مقايسة الحالة الدموية

رقم العزلة ورمزها	الفعالية (وحدة/مليلترا)
AMK 1	80
AMK 2	80
AMK 3	80
AMK 4	160
AMK 5	320
AMK 6	640
AMK 7	80
AMK 8	80
AMK 9	160
AMK 10	80
AMK 11	80
AMK 12	320
AMK 13	320
AMK 14	320
AMK 15	160
AMK 16	80
AMK 17	160
AMK 18	160
AMK 19	80
AMK 20	160
AMK 21	640
AMK 22	320
AMK 23	160
AMK 24	320
AMK 25	320
AMK 26	320

اختيار الوسط الزرعي الامثل لإنتاج الإنزيم

اختيرت أربع أوساط زرعيه مختلفة في محتوياتها من المصادر الكربونية والنتروجينية لتحدد الوسط الزرعي الأمثل لإنتاج الهيمولايسين من العزلة رقم AMK6 لبكتريا *V. cholerae* . بينت النتائج الموضحة في الشكل(1) إن الوسط الزرعي مرق نقيع القلب والدماغ يعطي أعلى إنتاجية لإنزيم الهيمولايسين اذ بلغت قيمة الفعالية 640 وحدة/مليلتر وهو الوسط الأمثل للإنتاج، ثم يليه وسط.Minimi Media المضاف له 1%من دم بشري وبفعالية قدرها 80 وحدة /مليلتر في حين انخفضت إنتاجية الإنزيم في الأوساط (MG+1%Blood; MM; Nutrient broth)، إذ بلغت الفعالية 40 وحدة/مليلتر.

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم

بينت اختبارات قدرة العزلة رقم AMK6 على إنتاج إنزيم الهيمولايسين باستخدام وسط نمو بقيم أرقام هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (6-9) إن أعلى فعالية لإنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية AMK6 بلغت 640 وحدة/مليلتر عند الرقم الهيدروجيني 8. و تلاشت فعالية الأنزيم عند ارتفاع قيمة الأس الهيدروجيني في وسط النمو إلى 8.5 و 9 حيث بلغت الفعالية 0 وحدة/مليلتر. في حين كانت الفعالية 320 وحدة/مليلتر عند قيم الأس الهيدروجينية 7 و 7.5 و انخفضت الفعالية مع انحفاض قيمة الأس الهيدروجيني اذ وصلت الى 160 وحدة/مليلتر عند الأس الهيدروجيني 6 و6.5 ، كما موضح في الشكل (2)

مدة الحضن

اختبرت إنتاجية إنزيم الهيمولايسين من قبل العزلة رقم AMK6 و في مدد زمنية مختلفة تراوحت بين 24-72 ساعة كما مبين في الشكل (3). و أظهرت النتائج إن مدة الحضن المثلى لإنتاج الإنزيم كانت بعد 24 ساعة من الحضن إذ بلغت قيمة الفعالية 640 وحد/مليلتر، و ربما يرجع السبب إلى إن إنزيم الهيمولايسين يعد من مواد الايض الأولي التي تنتج وتفرز في الطور اللوغارتمي المتأخر. لذا تكون أعلى فعالية للإنتاج بعد 24 ساعة و بزيادة فترة الحضن يتعرض الإنزيم للتحلل من خلال فعالية إنزيم البروتيز الذي يفرز في نهاية الطور اللوغارتمي و بداية طور الثبوت من النمو، كما مسجل في بكتريا الـ *A.hydrophila*. [9]، وهذا ما أشارت إليه الدراسات التي قام بها بعض الباحثون و التي أوضحت إن مدة الحضن المثلى هي 20 ساعة [10,11].

مصدر الكاربون والتركيز الأمثل للإنتاج

تؤثر مكونات الوسط الزرعي في نمو و تكاثر الكائن ألمجهري و قدرته على إنتاج الأنزيمات، إذ درس تأثير إضافة المصادر الكربونية المختلفة (الكلوكوز ،السكروز ،الدكستروز ،المالتوز والكليسرول) كمصادر وحيدة للكربون في الوسط ألزرعي. و أظهرت النتائج إن الوسط ألزرعي المحتوي على الكليسرول كان الأفضل في إنتاج الهيمولايسين، وكما موضح في الشكل (4)، اذ بلغت الفعالية 2560 وحدة/مليلتر. وانخفضت الإنتاجية عند استخدام مصادر الكربون الأخرى، التي تشمل الدكستروز ، السكروز، المالتوز و الكلوكوز و بفعالية قدرها 1280 ،640، 640 و320 وحدة/مليلتر على التوالي.

لغرض تثبيت التركيز الأمثل للمصدر الكربوني (الكليسرول) انتخبت التراكيز الآتية 0.5 و1 و1.5 و2و2.5و3% وأظهرت النتائج المبينة في الشكل (5) حصول زيادة تدريجية في إنتاجية إنزيم الهمولايسين منع زيادة تركيز الكليسرول، اذ سجلت أعلى فعالية تحليلية للإنزيم والتي بلغت 2560 وحدة /مليلتر عند قيمة 2.5 و3 %. وبذلك اعتبر التركيز2.5% من الكليسرول التركيز الأمثل لإنتاج إنزيم الهيمولايسين.

مصدر النتروجين والتركيز الامثل للإنتاج

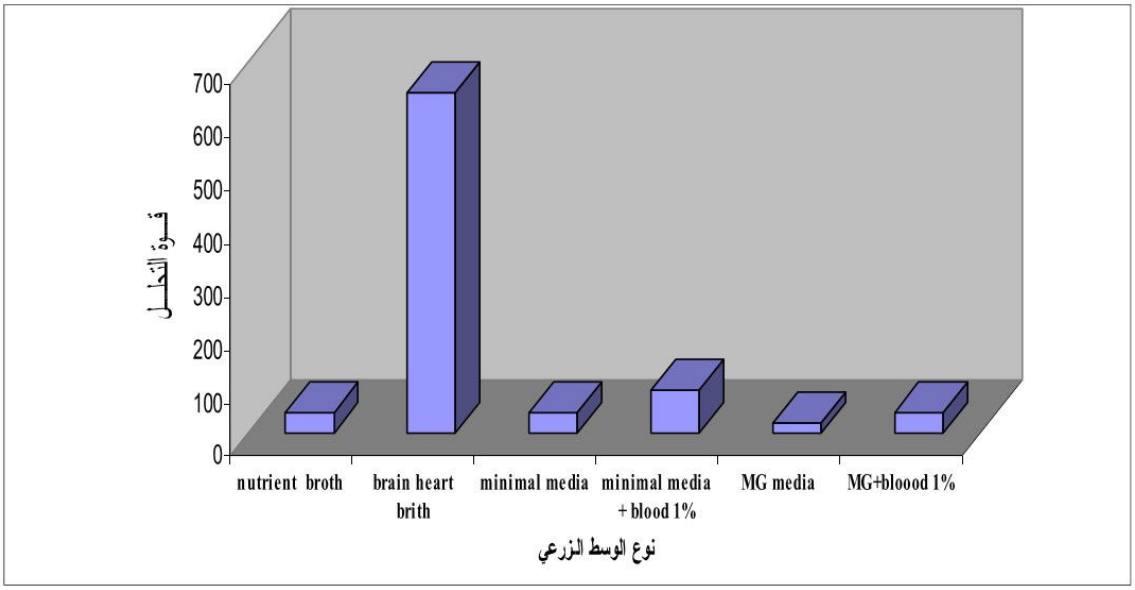
درس تأثير المصادر النتروجينية المختلفة (ببتون، تربتون، يوريا و امونيا) في إنتاج الهيمولايسين من العزلة رقم AMK6 لبكتريا الكوليرا بتركيز 3% لكل منها. و قد بينت النتائج الواردة في الشكل (6) إن أعلى فعالية للهيمولايسين و بلغت 2560 وحدة/مليلتر كانت في الوسط المحتوي على الببتون اذ اعتبر مصدر النتروجيني الأمثل للإنتاج، بينما كانت الفعالية للهيمولايسين عند استخدام اليوريا و التربتون و الامونيا هي 1280 ، 640 ، 320 وحدة/مليلتر على التوالي.
لغرض تثبيت التركيز الأمثل للمصدر النتروجيني (الببتون) انتخبت التراكيز الأتية 0.5 و1و1.5و2و2.5و3% و أظهرت النتائج المبينة في الشكل (7) حصول زيادة تدريجية في إنتاج الهيمولايسين عند زيادة في تركيز الببتون اذ سجلت النتائج فعالية قدرها 640 وحدة /مليلتر عند الراكيز 0.5 و 1 % من الببتون و فعالية قدرها 1280 وحدة/ملدلتر عند التركيز 2% كما ان اعلى قيمة للفعالية قد سجلت عند التراكيز 2و2.5و3% و التي بلغت 2560 وحدة /مليلتر و اعتبر التركيز 2% التركيز الأمثل لإنتاج الهيمولايسين.

الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم

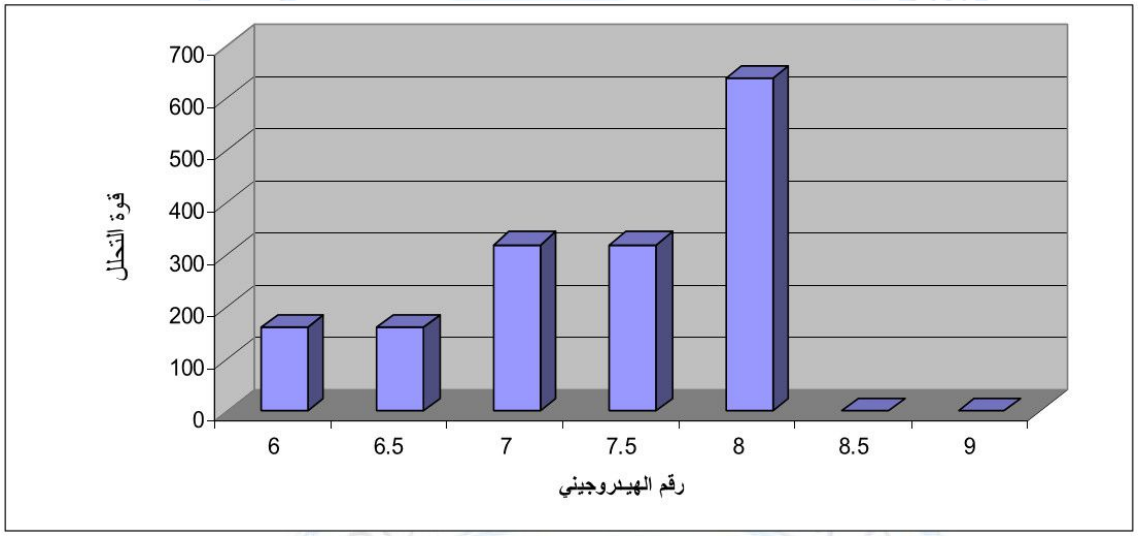
نميت العزلة رقم AMK6 من بكتريا الكوليرا بدرجات حرارة مختلفة بين 25-45 م° لإنتاج إنزيم الهيمولايسين و أشارت النتائج المبينة في الشكل (8) حصول زيادة تدريجية في إنتاج الهيمولايسين عند زيادة درجات الحرارة إلى حد معين ثم تعود لتنخفض الإنتاجية، فقد بلغت فعالية الهيمولايسين 320 و1280 وحدة/مليلتر عند درجة حرارة 25 و30م° على التوالي. وان أعلى إنتاجية لإنزيم الهيمولايسين كانت عند درجات الحرارة 35 و37م° إذ بلغت قيمة الفعالية 2560 وحدة/مليلتر، ثم عادت لتنخفض الإنتاجية عند درجات الحرارة 40-45م° لتصل الفعالية إلى 80 و0 وحدة/مليلتر على التوالي.

تأثير التهوية في إنتاج الهيمولايسين

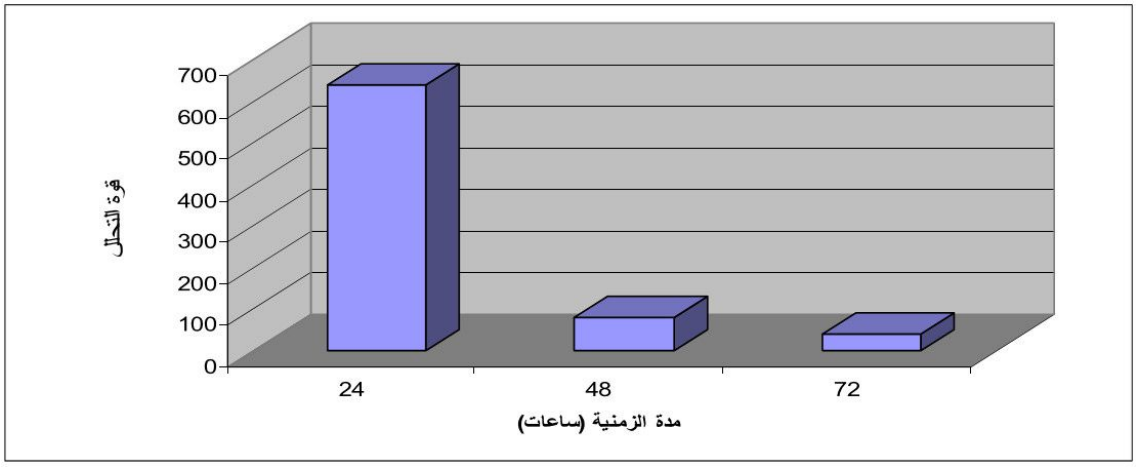
بينت هذه الدراسة تاثير التهوية و التحريك في إنتاج إنزيم الهيمولايسين فقد أظهرت النتائج كما في الشكل (9) زيادة إنتاج إنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية AMK6 باستخدام التحريك بسرعة 120 دورة/دقيقة، إذ بلغت الفعالية 5120 وحدة/مليلتر في حين كانت الفعالية عند الثبات 2560 وحدة/ مليلتر.



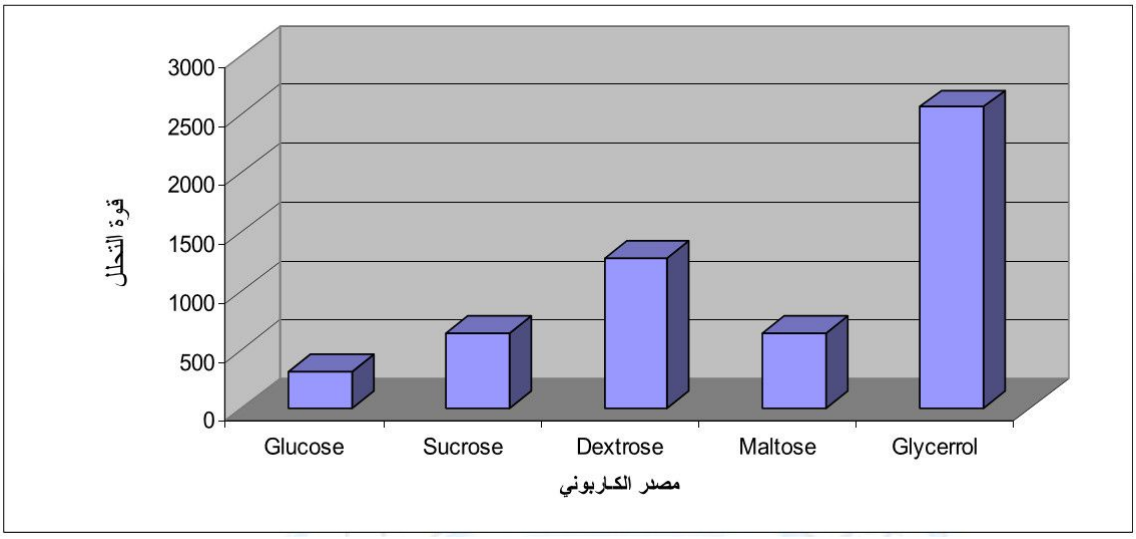
الشكل(1) تحديد الوسط الزرعي الأمثل لإنتاج إنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية لبكتريا الكوليرا AMK6



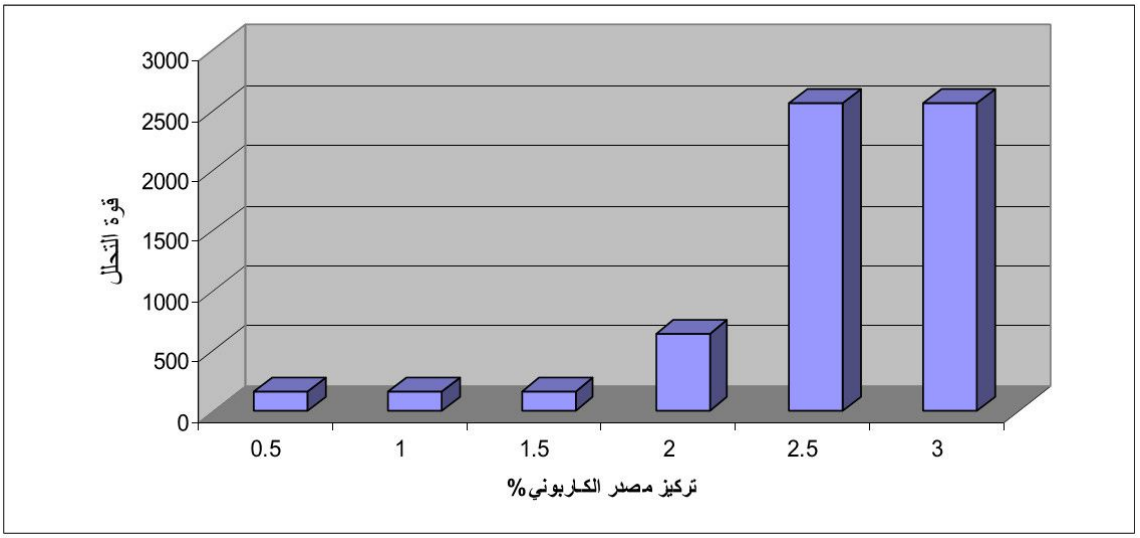
الشكل رقم (2) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم الهيمولايسين.



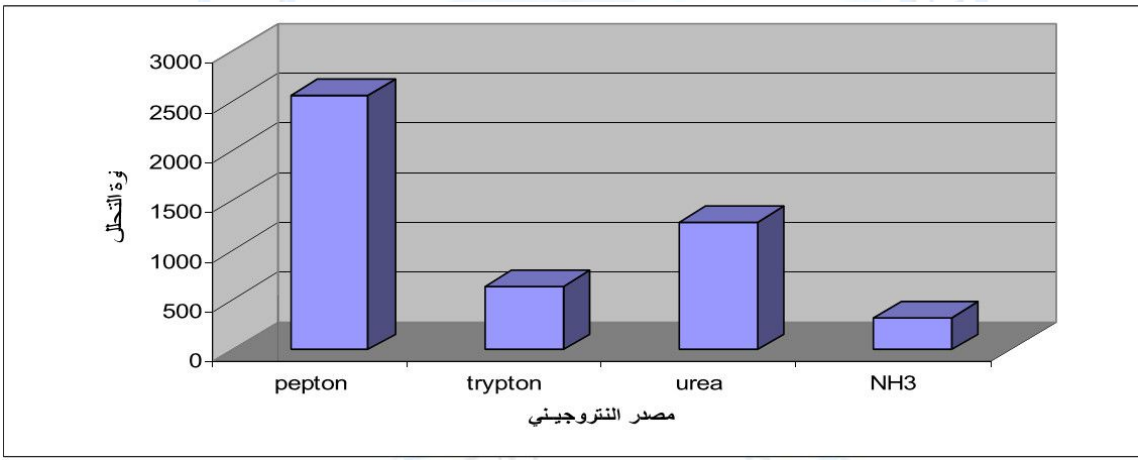
الشكل (3) مدة الحضن المثلى لإنتاج الهيمولايسين



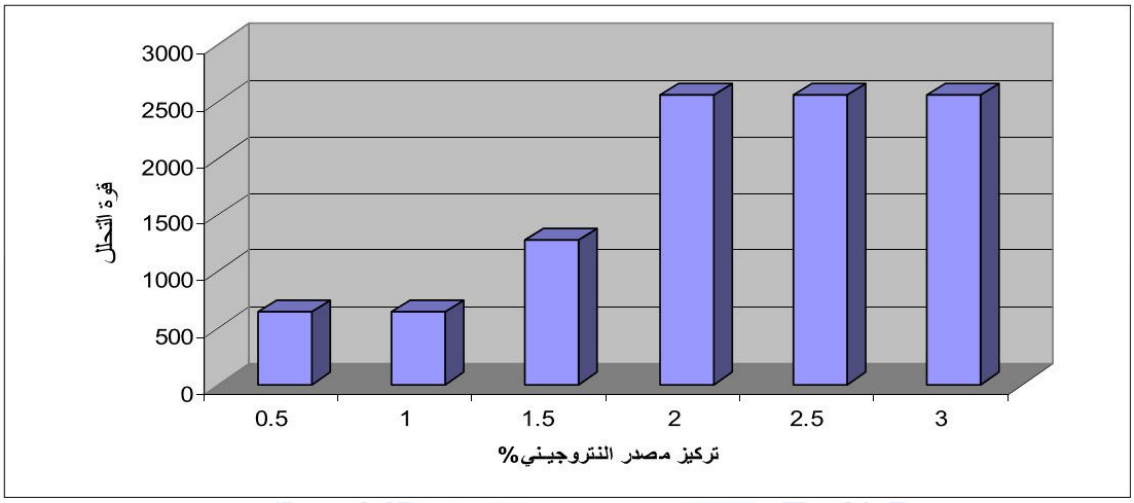
الشكل (4) تأثير المصادر الكربونية المختلفة في إنتاج إنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية لبكتريا الكوليرا AMK6



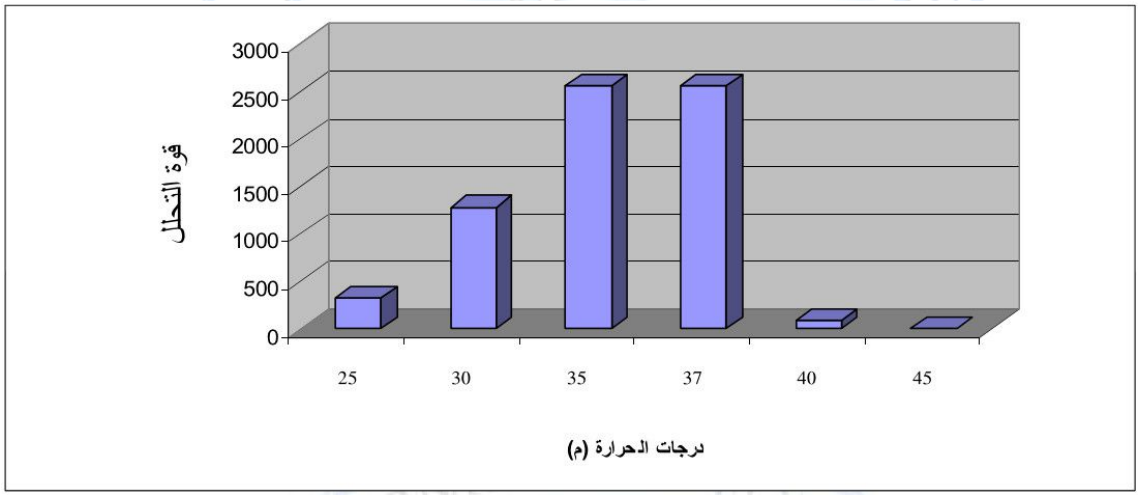
الشكل (5) تأثير التراكيز المختلفة للكليسرول كمصدر كربوني في إنتاج إنزيم الهيمولايسين



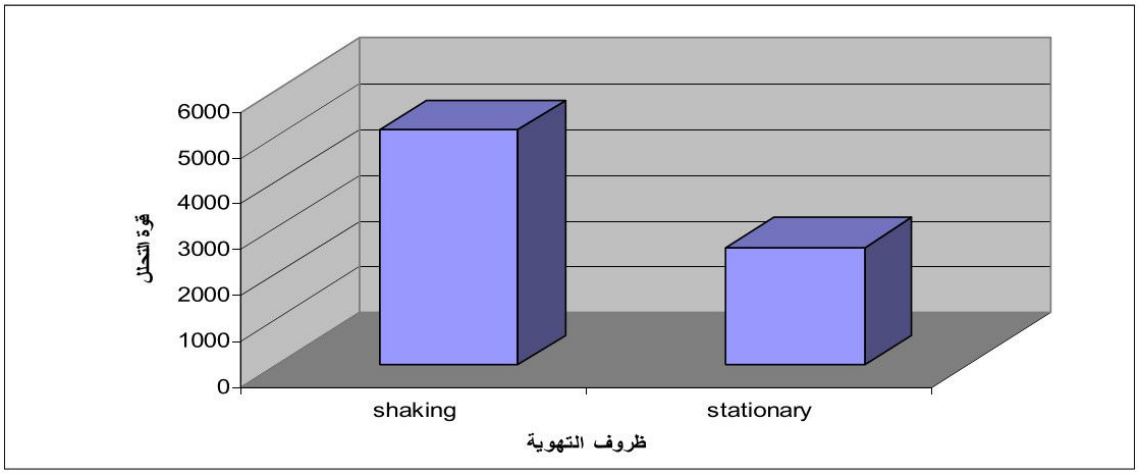
الشكل (6) تأثير المصادر النتروجينية المختلفة في إنتاج إنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية لبكتريا الكوليرا AMK6



الشكل (7) تأثير تراكيز مختلفة من الببتون في إنتاج إنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية لبكتريا الكوليرا AMK6



الشكل (8) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية لبكتريا الكوليرا AMK6



الشكل (9) تأثير التهوية في إنتاج إنزيم الهيمولايسين من العزلة المحلية لبكتريا الكوليرا AMK6

المصادر

1. الزعاك، علي عبد الرحمن (1994). البيولوجي الجزيئي لضراوة البكتريا. مطبعة القبس. بغداد_ العراق.
2. نادر، محمد ابراهيم. (2009). دراسة تأثير السمي للإنزيم البروتيز المنقى من عزلة محلية لبكتريا *Vibrio cholerae* باستخدام الحيوانات المختبرية. معهد الهندسة الوراثية و التقنيات الاحيائية. جامعة بغداد.
3. Tomita, T. and Kamio, Y. (1997). Molecular Biology of pore-forming cytolysine from *Staphylococcus aureus*, alpha and gamma-hemolysin and leukocidin. Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol 61 (4) : 565.
4. Takahashi, Y.; Sato, Y. ; Shiomi , V. V.; Cantraelli, T. (2000). Mechanisms of chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in human colonic tissue and a human intestinal epithelial cell line. J. Med.Microbiol. (49) : 801 – 810.
5. 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. PP: 190-91,254-255.
6. World Health Organization. (1997). Guide lines for cholera control. WHO Regional. Office for the Eastern Mediterranean

7. الكرخي، كفاح أحمد جاسم. (2001) . عزل وتشخيص السلالات النمطية وغير النمطية لبكتريا *V.cholerae* من المرضى وحساسيتها للمضادات الحيوية. رسالة ماجستير. كلية العلوم.الجامعة المستنصرية.

8. Namdari, H., and E. J. Bottone. 1990. Microbiologic evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. J. Clin. Microbiol. 28:837-840
9. Oreilly , T.and Day ,D.F. (1983). Effect of cultural conditions on protease production by Aeromonas hydrophila .Appl.Environ. Microbiol.Vol 45 (3) :1132-1135.
10. Honda,T.and Finkelstein,A.R.(1979).Purification and Characterization of a Hemolyin Produced by *Vibrio cholera* Biotype El Tor :Another Toxic Substance Produced by Cholera Vibrios.J. Infection and Immunity.Vol 26(3):1020-1027.
11. Yamamoto,K.;Ichinose, Y.;Naksone,N.;Tanabe ,M. ;Nagahama,M.;Sakurai,J.and Iwanaga, M. (1986) .Identity of Hemolysins Produced by *Vibrio cholera* Non-o1 and V .cholerae O1,Biotype El Tor . J.Infection and Immunity .Vol51(3):927-931.