تحديد الظروف المثلى لإنتاج البروتيز من البكتريا البيئية المحلية *Aeromonas hydrophila* المعزولة من المياه السطحية لنهر دجلة في بغداد

رشا محمد ساجت العكيلي

الجامعة المستنصرية /كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الملخص:

تم عزل 30 عزلة محلية لبكتريا *Aeromonas hydrophila* من 80 عينة ماء اختبرت قابلية العزلات على انتاج انزيم البروتيزباستخدام وسط حليب الفرز Skim milk agarوتميزت العزلات بقابليتها المختلفة على انتاج الانزيم وذلك بتكوينها منطقة شفافة حول المستعمرة وأنتخبت العزلة *Aeromonas hydrophila* A30 لكونها الاغزر انتاجا للانزيم من بقية العزلات . حددت الظروف المثلى لانتاج الانزيم وكان وسط التربتون السائل هو الوسط الامثل للانتاج وعند الأس الهيدروجيني 7.5 بعد 24 ساعة من الحضن بدرجة حرارة 35 م .

المقدمة :

اخذت مشكلة توفر المياه الصالحة للشرب في العراق تتفاقم من حيث الكم والنوع لأسباب كثيرة منها انخفاض منسوب المياه في نهري دجله والفرات وقلة جريانهما , وازدياد مصادر التلوث بسبب الظروف الحالية وعدم الاهتمام بمعاملة مياه المجاري بالشكل الصحيح قبل اعادتها الى مجرى النهر فضلا عن رمي الحيوانات الميته فيها (النزال, واخرون 2009). اذ تدخل الكائنات الدقيقة ومنها البكتريا والاحياء المجهرية الاخرى الى المياه مع فضلات الانسان او مع فضلات معامل الدباغة والجلود والمجازر وصناعة الالبان وغيرها(عبد الرحمن, واخرون ,2009) ان وجود انواع البكتريا في المياه لا يعد مكمن خطورة وانما يتم التركيز فقط على البكتريا المرضية ومن اشهر الانواع المرضية الموجودة في نهر دجلة هو : *Escherichia coli* و *Enterbacter aerogenes* و *Sallmonella* sp و *Klebsiella* sp و *Pseudomonus* sp و *Shigelle* sp و *Aeromonas* sp و *Vibrio cholera* (Sharon,et,2009). *تكون بكتريا Aeromonas* بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام ،متحركة بوساطة سوط قطبي وغير مكونة للسبورات وسالبة لفحص اليوريز urease negative ان جنس *Aeromonas* كان في السابق مع (*Vibrio and Plesiomonas*) من عائلة

Vibrionaceae بعدها وضع في عائلة مستقلة وجديدة Aeromonadaceae (Holt واخرون، 1994) , يفرق بين Aeromonas hydrophila و Vibrio cholerae بفحص string test التي تكون *Aeromonas hydrophila* سالبة والاخيرة موجبة لهذا الفحص,كذلك تكون مقاومة لقرص O/129 (2,4-diamino-6-7-diisopropylpteridine) والـ *Vibrio* حساسة لهذا القرص , موجبة لفحصي الاوكسديز Oxidase والكتاليز catalase ، توجد أربعة عشر نوعاً من *Aeromonas* فقط خمسة تكون من النوع الممرض الى الانسان وتشمل: *Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae ,Aeromonas veronii, Aeromonas jandaei and Aeromonas schubertii* (Santos,et,1999).

Aeromonas hydrophila تنتشر بصورة واسعة في الطبيعة ولاسيما في البيئات المائية مثل الانهار ومياه الصرف الصحي وماء الشرب والبحيرات(Kuhn واخرون، 1997؛ Villari واخرون، 2003), كذلك توجد في الاغذية البحرية كالأسماك والروبيان والفواكهة الطازجة (Brandi واخرون، 1999؛ Eaton واخرون، 2005). تسبب بكتريا *Aeromonas hydrophila* حالات مرضية عديدة منها التهاب المعدة والامعاء Gastroenteritis وتجرثم الدم Bacteremia واسهال مائي watery diarrhea وأنتان الدم Septicemia وتلوث الجروح (Murray واخرون، 2000؛ Bhowmik، واخرون، 2009). تمتلك العديد من عوامل الضراوة التي لها دور في احداث الاصابات في الانسان والحيوان: ومن هذه العوامل الهيمولايسين المعروف بأسم Aerolysins وانتاج Sidrophore وانزيم البروتيز proteases , وتتركز أهمية البروتيز في عملية تنظيم ايض البروتينات داخل الخلايا وفي توليد انزيمات وهرمونات وببتيدات فعالة حيويا من مركبات أولية غير فعالة,يعد انزيم البروتيز proteases من الانزيمات الخارج خلوية لبكتريا *Aeromonas hydrophila* والذي يلعب دورا مهما في امراضية البكتريا اذ يقوم بالغزو والتمركز والسيطرة والتغلب على مناعة الجسم (Merino واخرون، 1999) . تهدف الدراسة الى الحصول على عزلة محلية من بكتريا *Aeromonas hydrophila* كفوءة في انتاج البروتيز وتحديد الظروف المثلى لانتاجية الانزيم .

المواد وطرائق العمل :

جمع العينات :

تم جمع (80) عينة ماء في قناني نظيفة سعة 500 مللتر من مناطق مختلفة على نهر دجلة في مدينة بغداد(Bhowmik واخرون، 2009).

عزل البكتريا *Aeromonas hydrophila* من العينات المائية:.

تم استعمال ورق الترشح ذات حجم µmO.45 للعينات المائية لترشيحها وبعدها وضعت ورقة الترشح على اطباق حاوية وسط Ampicillin dextrin agar مضاف اليه Supplement (مكمل) Ampicillin dextrinبحجم 1مللتر/ 1لتر وحضنت بدرجة حرارة 35م لمدة 24 ساعة (Eaton واخرون، 2005).

تشخيص العزلات:

يالاعتماد غلى الفحوصات المظهرية والزرعية والبايوكيميائية تم تشخيص العزلات البكتيرية لــ *Aeromonas hydrophila* واستعمال المضاد التشخيصي O129 لاختبار حساسية العزلات ضده واستعمال نظام Api 20 E لتاكيد التشخيص (Holt واخرون، 1994).

اختبار قابلية العزلات المحلية لبكتريا *A. hydrophila* لانتاج البروتيز :.

اختبرت قابلية العزلات المحلية لبكتريا *Aeromonas hydrophila* في انتاج البروتييز عن طريق تلقيحها على وسط Skim milk agar المحضر تبعا للطريقة الموصوفة من قبل (نادر, واخرون,2009) , وحضن الوسط بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة , أختيرت العزلات الكفوءة التي أعطت اعلى نسبة تحلل في الوسط بظهور هالة شفافة حول الحفر.

تقدير فعالية البروتيز

استعمل الكازائين بنسبة 1% مادة التفاعل لتقدير الفعالية الانزيمية (المستخلص الانزيمي الخام) (Brock واخرون، 1982).

تعيين الظروف المثلى لانتاج انزيم البروتيز :ــ

1- تحديد الوسط الزرعي الامثل لانتاج انزيم البروتيز :

حضرت الاوساط الثلاثة الاولى اعتمادا على الطريقة الموصوفة من قبل كل مصدر الخاص بها:

أ- وسط الكازائين السائل Casein broth (حسن,1996) .

ب-التربتون السائل Tryptone broth (Weihua واخرون، 2003).

ت-البيتون السائل pepton broth (Kloos واخرون، 1974).

ث- وسط نقيع القلب heart infusion broth

ج-وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain – heart infusion broth

ح-وسط المرق المغذي Nutrient broth

استعملت دوارق بحجم 250 مللتر لتحضير الاوساط الثلاثة الاخيرة وفقا لتعليمات الشركة المجهزة ولقح 50 مللتر لكل من الاوساط المذكورة اعلاه بلقاح 1% وبعدد 10^8خلية/مللترمن

النمو البكتيري وحضنت الاوساط بدرجة 37م لمدة 24 ساعة بالحاضنة الهزازة بعدها استعمل جهازالنبذ المركزي المبرد لنبذ الاوساط (6000 دورة/ دقيقة) لمدة 15 دقيقة ثم جمع رائق كل عزلة في انبوبة اختبار وقدرت الفعالية الانزيمية.

2- تحديد الأس الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيم البروتيز:

حضر وسط التربتون السائل Tryptone broth بأسس هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (4-9) وبفارق نصف درجة من وسط الى اخر ،ولقح بالعزلة المنتجة لتحديد الأس الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم .

3–تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج البروتيز:–

حضن التربتون السائل Tryptone broth الملقح بالعزلة المنتجة بدرجات حرارة مختلفة شملت (50,45,40,35,30,25) م بفارق 5 درجات حرارية مئوية من وسط لآخر لتحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم البروتيز.

4–تحديد مدة الحضن المثلى لانتاج الانزيم :–

حضن وسط التربتون السائل Tryptone broth الملقح بالعزلة المنتجة لفترات زمنية مختلفة تراوحت بين(12- 72)ساعة.

النتائج والمناقشة :

تم الحصول على30 عزلة *Aeromonashydrophila* من 80 عينة ماء وكانت نسبة العزل (37.5%) ,في حين اشار Bhowmik واخرون (2009) الى ان نسبة العزل لبكتريا *Aeromonas hydrophila*(25%), بينما نادر واخرون (2009) فكانت نسبة العزل (6%), شخصت البكتريا اعتمادا على صفاتها الزرعية والمجهرية للخلايا البكتيرية وكانت عصيات سالبة لصبغة كرام (Brock واخرون، 1982). إذ تميزت مستعمرات بكتريا *Aeromonas hydrophila* على وسط Ampicillin dextrin agar بظهور مستعمرات صفراء براقة . لغرض زيادة التأكد من تشخيص العزلات ولمعرفة النوع (Species) استعمل نظام Api-20 E system المكمل لنتائج الاختبارات الكيموحيوية.

استعمل وسط حليب الفرز Skim milk agar لتنمية العزلات البكتيرية عليه لفحص قدرتها على انتاج انزيم البروتيز من خلال تحليل البروتين في هذا الوسط بظهور الهالة الشفافة حول مستعمراتها.لوجظ ان جميع العزلات لها القدرة على انتاج الانزيم لكن باقطار تحلل متباينة للبروتين التي أحدثها الانزيم على وسط Skim milk agar وكما موضح في(الجدول 1) والتي تراوحت بين(15-32) مليمتر .ان سبب الاختلاف في انتاج البروتيز من العزلات

البكتيرية*Aeromonas hydrophila* يمكن ان يعود الى التباين الوراثي للجينات المسؤولة عن انتاج البروتيز في هذه العزلات (سعود واخرون,2009) .

وهذا يتفق مع ما وجده كل من نادر واخرين (2009) وسعود واخرين (2009) تم اعتماد العزلة A30 في تحديد الظروف المثلى لانتاج البروتيزلانها تميزت بقطر تحلل للبروتين اكبر

الجدول(1) اقطار مناطق التثبيط لعزلات بكتريا *Aeromonas hydrophila* المنتجة لانزيم البروتيز

رمز العزلة	قطرالهالة المتكونة(مليمتر)	رمز العزلة	قطرالهالة المتكونة(مليمتر)	رمز العزلة	قطرالهالة المتكونة(مليمتر)
A 1	29	A11	20	A21	17
A 2	21	A 12	17	A22	15
A 3	15	A13	17	A23	18
A4	22	A14	25	A24	19
A 5	18	**A15**	30	**A25**	23
A 6	15	**A16**	18	**A26**	20
A7	20	**A17**	29	**A27**	25
A 8	29	**A18**	15	**A28**	18
A9	25	**A19**	20	**A29**	16
A10	16	**A20**	22	**A30**	32

تحديد الظروف المثلى لانتاج البروتيز :

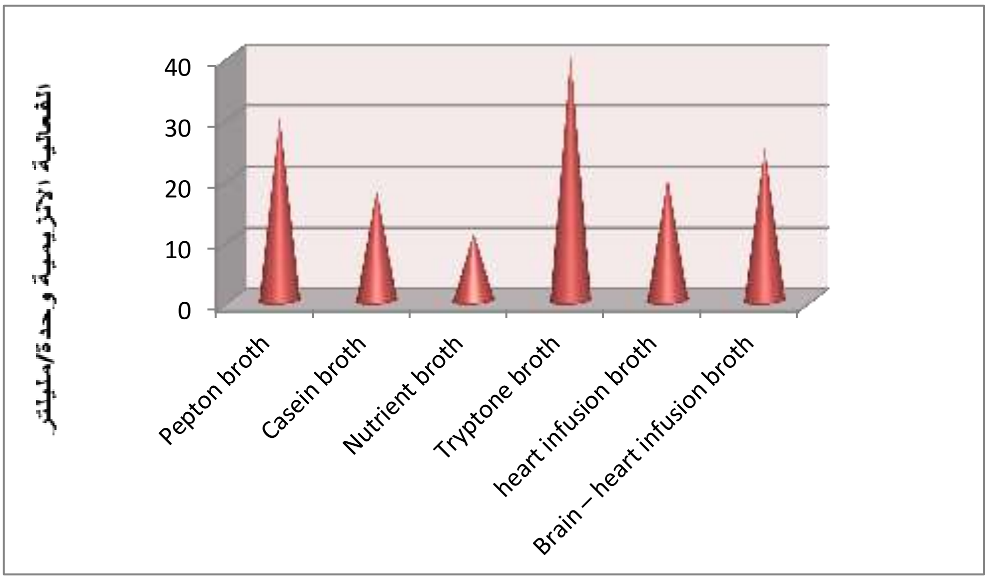
1- إختيار الوسط الامثل لانتاج البروتيز:

استعملت اوساط زرعية مختلفة لانتاج البروتيز من العزلة المحلية المنتخبة .A30A. hydrophila اذ كانت هذه الاوساط متباينة من حيث المصادر الكاربونية والنتروجينية الموجودة في مكوناتها .تبين النتائج في الشكل (1) ان وسط التربتون السائل tryptone broth كان الوسط الامثل لانتاج الانزيم ، فقد ظهرت نتائج فحص الانتاجية للانزيم من قبل العزلة A30هي الاعلى وكانت قيمة الفعالية الانزيمية (40)وحدة/ مللتر اما وسط Nutrient broth فقد كانت نتائج الفعالية الانزيمية في هذا الوسط هي الاقل حيث بلغت (11) وحدة/ مللتر . اما الوسط Pepton broth ووسطBrain – heart infusion broth ووسط heart infusion broth و وسط Casein broth فكانت نتائج فحص الانتاجية الانزيمية هي (30) وحدة/ مليلتر و(25) وحدة/ مللتر و(20) وحدة/ مللتر و (18) وحدة/ مللتر على التوالي .

ان انخفاض انتاجية البروتيز في الاوساط الزرعية الاخرى يمكن ان يكون بسبب اختلاف مكونات تلك الاوساط وطبيعتها وما تحتوبه من مصادر متنوعه من المواد النتروجينية والكاربونية القادرة على تحفيز انتاج البروتيز من العزلة البكتيرية ولكون المصادر النتروجينية المعقدة تكون مصدرا للأحماض الامينية الحرة والبيبتيدات الصغيرة وبتراكيز مختلفة تبعا لدرجة

تعقيد المصدر النتروجيني كما تؤثر تراكيز الاحماض الامينية في انتاج البروتيز , فالتراكيز العالية أو الواطئة لهذه الاحماض قد تحفز على انتاجية جيدة للبروتيز(سعود واخرون,2009).

استعمل نادر وآخرون (2009) وسط Wehiuaالوسط الامثل لانتاج البروتيز من بكتريا Aeromonas hydrophila بينما في دراسة آخرى كان مرق الببتون السائل هو الافضل لانتاج البروتيز من بكتريا Staphylococcus aureus(سعود واخرون,2009).

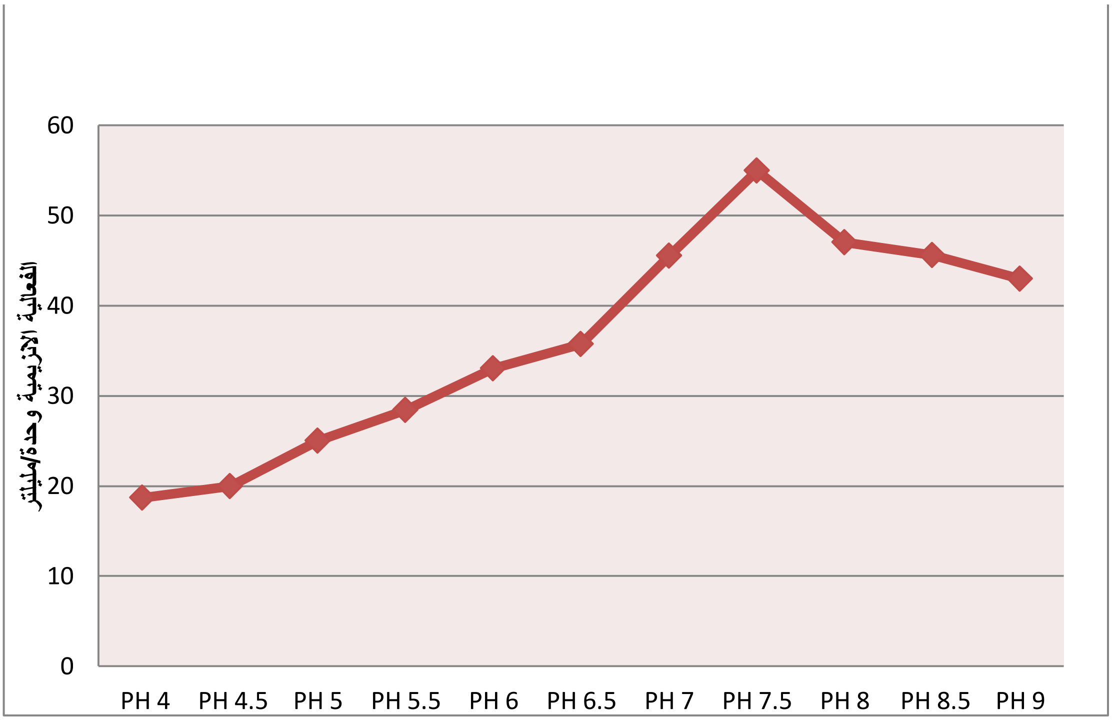


الشكل (1) تاثير الوسط الزرعي في انتاج البروتيز من لعزلة A30 *A.hydrophila*

2- تحديد الأس الهيدروجيني الامثل لانتاج البروتيز :

أختبرت قابلية العزلة *A. hydrophila* A30على انتاج البروتيز باستعمال وسط التربتون السائل Tryptone broth الامثل للانتاج بأسس هيدروجينية مختلفة تراوحت بين 9-4(الشكل2).وأظهرت النتائج انخفاض انتاج الانزيم عند الاوساط الغذائية ذات الأسس الهيدروجينية الحامضية, وازدادت تدريجيا عند رفع الأسس الهيدروجينية نحو القاعدية حيث كانت الفعالية الانزيمية في الوسط الحامضي ذي الاس الهيدروجيني 4 هي (18.7) وحدة/ مللتر بينما كانت في الوسط القاعدي عند الاس الهيدروجيني 7.5 هي (55) وحدة/ مللتر وعند زيادة القاعدية للوسط الزرعي انخفضت الفعالية الانزيمية عند الاس اليهروجيني 9 اذ اصبحت(43) وحدة/ مللتر . تتاثر ذائبية وتأيين وانتقال المواد الغذائية بالاس الهيدروجيني والذي يؤثر على انتاج الانزيمات وهذا التاثير ينعكس على الكائن الحي وانتاجه للانزيمات (Bull و 1976Bushnell)

أشار كل من O'Reilly واخرين (1983) و Weihua و Chengping (2003) الى ان الاس الهيدروجيني الامثل لانتاج انزيم البروتيز من بكتريا *A.hydrophila* هو (6.9 و7 و7.5) على التوالي .

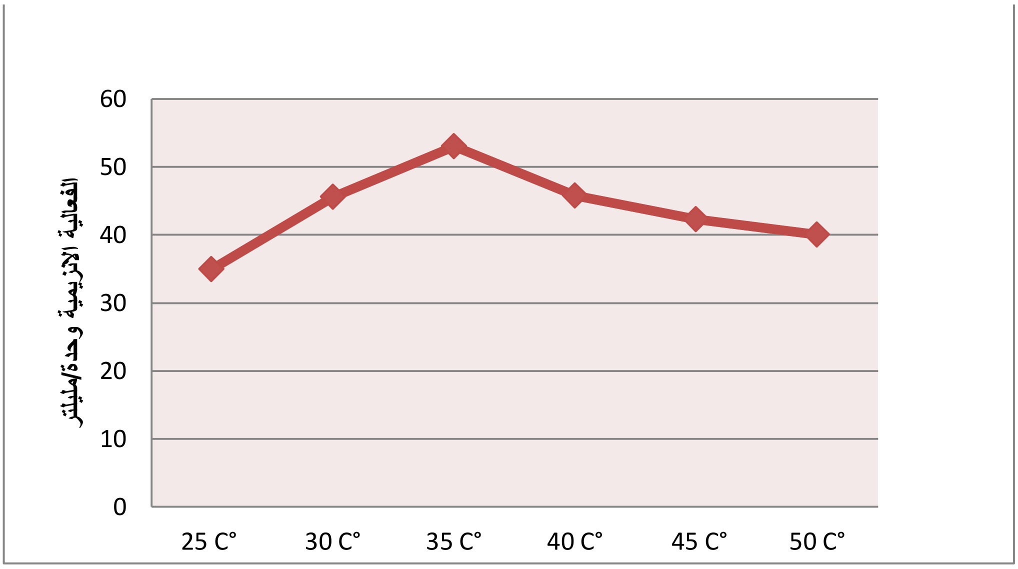


الشكل (2) تاثير الأس الهيدروجيني في انتاج البروتيز من بكتريا A30 *A.hydrophila*

تحديد درجة الحرارة المثلى لانتاج البروتيز :

درس تاثير درجات الحرارة في انتاج انزيم البروتيز من *بكتريا A. hydrophila* بمديات مختلفة (25-45) م , ظهرت النتائج وكما موضح في الشكل (3) في درجة حرارة 25 م انخفض انتاج الانزيم اذ اعطت العزلة A30*A. hydrophila* فعالية انزيمية (35) وحدة/مللتر, بينما ازداد انتاج الانزيم عند درجة حرارة 35 م وبلغت الفعالية الانزيمية اقصاها (53) وحدة/مللتر, وعند زيادة درجة الحرارة عن 35 م انخفضت الفعالية الانزيمية وبهذا فأن درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم البروتيز كانت 35 م . ان لدرجة الحرارة تاثير مهم في انتاج الانزيم من الاحياء المجهرية من خلال تاثيرة في حركة الجزيات وسرعة التفاعل الانزيمي في الخلايا و ذائبية الاوكسجين بالوسط الغذائي وينعكس ذلك سلبا أو ايجابيا في انتاج الانزيم (Bull و Bushnell، 1967).

وجدWeihua واخرون (2003) ان درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم البروتيز من بكتريا .A hydrophila هي 28م , بينما وجد نادر واخرون (2003) ان بكتريا Staphylococcus aureus. كانت درجة الحرارة المثلى لانتاج انزيم البروتيز هي 35 م .



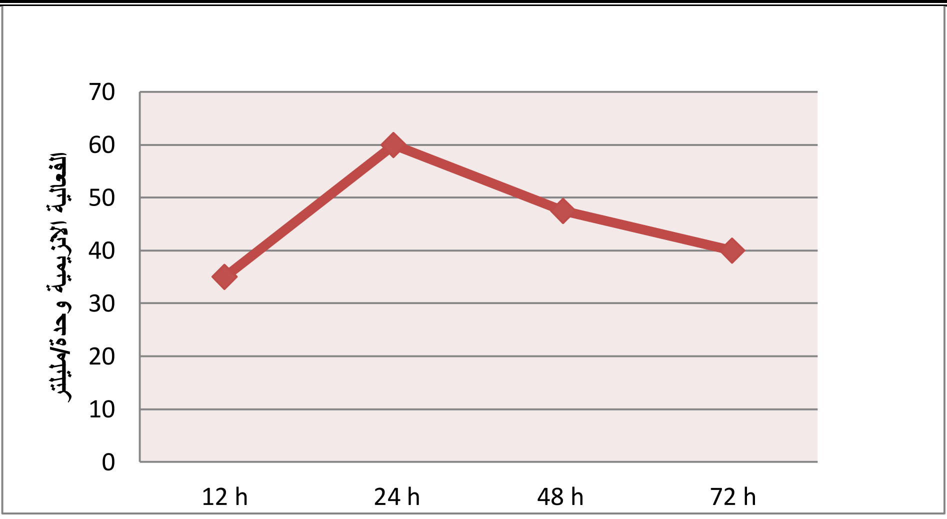
درجة الحرارة (م)

الشكل (3) تاثير درجة الحرارة في انتاج البروتيز من بكتريا *A.hydrophila* A30

تحديد مدة الحضن المثلى لانتاج البروتيز

تمت متابعة انتاج انزيم البروتيز من العزلة *A. hydrophila* A30 في مدد زمنية مختلفة ,وبينت النتائج الموضحة في الشكل (4) ان انتاج الانزيم كان منخفضا بعد مرور 12 ساعة اذ كانت الفعالية الانزيمية (35)وحدة/مليلتر , و لوحظ زيادة في انتاج الانزيم عند الاستمرار بمدة الحضن وكان اعلى انتاجية بعد مرور 24 ساعة فقد بلغت الفعالية الانزيمية (60) وحدة/مللتر, انخفض انتاج الانزيم عند اعادة حضن العزلات لمدة 48 ساعة , وهذا الانخفاض بالفعالية الانزيمية عند زيادة ساعات الحضن يكون بسبب ظاهرة الزحام نتيجة لزيادة اعداد الخلايا وحدوث الهضم الذاتي للانزيم وبالتالي نفاد للمادة الغذائية من وسط النمو ودخول الخلايا طور الثبات وبعدها طور الموت وبذلك تتحلل الخلايا وهذا التحلل ينتج منه مركبات لها تاثير على الفعالية الانزيمية (Bull و Bushnell، 1967؛ Lazazzera، 2000).

ذكر Riddle واخرون (1981) بان بكتريا A. hydrophila كان اقصى انتاجها للبروتيز بعد مرور 48 ساعة من مدة الحضن , في حين وجد سعود واخرون (2009)ان بكتريا Staphylococcus aureus كان اعلى انتاج لها بعد انقضاء 24 ساعة من الحضن كما حدث انخفاض في الانتاج انزيم البروتيز من هذه البكتريا بعد 48 و72 ساعة من الحضن .



الشكل (4) تأثير مدة الحضن في انتاج البروتيز من العزلة A30 *A.hydrophila*

المصادر:

1- النزال ، احمد اسماعيل وحسين ، اغاريد علي وخليل ، ياسمين اسماعيل (2009) . عزل وتشخيص البكتريا المرضية من مياه الشرب في محافظة صلاح الدين بطريقة المرشحات الغشائية ، مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ،المجلد 3، العدد 3 : (1-6).

2- حسن ، شذى سلمان.(1996). انتاج وتنقية وتوصيف البروتييز القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمر المواد الصلبة .اطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة بغداد

3- سعود،اسماء محمد وعزيز،غازي منعم والخفاجي،زهرة محمود.(2009). تحديد الظروف المثلى لانتاج البروتيز من بكتريا AG10 *Staphylococcus aureus* المعزولة محليا . المجلة العراقية للتقانات الحياتية ،المجلد 8 ، العدد 1: 10-26 .

4- عبد الرحمن ، ابراهيم عبد الكريم وزيدان ، تحسين علي وسعود ، وهران منعم (2009) . دراسة بعض الملوثات البكتيرية في مياه نهر الفرات وبحيرتي الحبانية والثرثار، مجلة مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة ، المجلد 3، العدد 3 : (45-57).

5- نادر،محمد ابراهيم و كريكور، اغوب اليس ومنعم ، عزيز غانم . (2009) . انتاج انزيم البروتيز من البكتريا المحلية GMA1 *Aeromonas hydrophila* المعزولة من مرضى مصابين بالاسهال . المجلة العراقية للتقانات الحياتية،المجلد 8 ، العدد 1 :142-155.

6- 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): 2348 – 2357.

7- Brandi, G.; Sisti, M.; Giardini, F.; Schiavano, G. and Albano, A. (1999). Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp. in different type of water. Lett. Appl. Microbiol. 29(4): 211-215.

8- Bull, A. I. and Bushnell, M.E. (1976). Environmental control of fungal growth. In : The filamental Fungi. (eds. Smith, J.E. and Berry, D.E.) Vol. 2, PP. 1-26. Edward Arnold, London

9- Brock,F.M.;Forsberg ,C.V. and Buchanan,S.G.(1982).proteolytic activity of rumen microorganisms and effect of proteinase inhibitors .J.Appl. Environ.Microbiol .44:561 – 569.
10- Eaton,A. ; Greenberg ,A.E. ;Rice ,E.W. and Clesceri ,L.S. (2005) .Stander method for the examination of water and wastewater .21 ed
11- 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: 190-191
12- Kloos,W.E.;Tornabene,T.G.and Schleifer,K.H.(1974).Isolation and characterization of micrococci from human skin including two species : *microccus lyla* and *Micrococcus kristlnae .Inter.J.Syst.Bacteriol*.,24:79-101.
13- Kuhn, I.; Allestam, G.; Huys,G.; Janssen, P.; Kersters, K.; Krovacek, K. and Stenstrom, T. (1997). Diversity, persistence and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. Appl. Environ. Microbiol. 63(7): 2708-2715.
14- Lazazzera,B.A.(2000) . Quorum sensing and starvation . Signals for entry into the stationary phase . Curropin Microbiol . 3 :177 – 182 .
15- 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.
16- Murray, P. R. ;Baron, E. ;PFaller, M. A.;Tenovor, F.C. and Yolke, R. H. (2000) . Manual of clinical Microbiology (7th ed .) ASM press , Washington Unite State of America . pp. 304.
17- O'Reilly,T. and Day, D. F. (1983). Effect of cultural conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila* .Appl.Environ.Microbiol ., 45 (3): 1132-1135.
18- - Riddle,L.M.;Graham,T.E. and Mborskl,R.I. (1981). Medium for the accumulation of extracellular hemolysin and protease by *Aeromonas hydrophila Infect. Immum* . 33:728-733.
19- Santos, J. A.; Gonzalez, C. J.; Otero, A. and Garcia-Lopez, M. (1999). Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. Appl. Environ. Microbiol. 65(12): 5612-5614.
20- Sharon ,O.;Bruce,I.;Wayne,W. and Shery, W. (2009) . Drinking water : Bacteria ,Dept. of Health and Human Services , University of Nebraska ,Lincolin.
21- - Villari, P.; Crispino, M.; Montuori, P. and Boccia, S. (2003). Mole- cular typing of *Aeromonas* isolates in natural mineral waters. Appl. Environ. Microbiol. 69(1): 697-701.
22- Weihua,C.and Chengping,P.(2003).Purification of protease from *Aeromonas* and using as immunization facter .J.of Nanjing Agricultural University,3:2594-2597.

DETERMINATION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR PROTEASE PRODUCTION FROM LOCALLY ENVIROMENTAL BACTERIA *Aeromonas hydrophila* ISOLATED FROM SURFACE WATERS FOR TIGRES RIVER IN BAGHDAD

Rasha Mohamed sajet AL-Oqaili
Department of biology, Collage of science, Mustansiryah University, P.O. box 14022,

Abstract

Thirty local isolates locally of *Aeromonas hydrophila* were isolated from (80) water samples and tested for protease enzyme production by using skim milk agar . All isolates were able to develop clear zone around the colonis and select of *Aeromonas hydrophila* A30 as the most efficient producer.Optimization studies revealed that tryptone broth was the best at initial (pH 7.5) ,at 35 °C for 24 hrs .