------مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 4، ص11-34، 2013------

التصنيف العددي لعائلة Micrococcaceae

صفاء عبد الهادي الموسوي **إسراء غانم السماك**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 7 / 10 /2012 ؛ تاريخ القبول 18 / 2 / 2013)

الملخص

جمعت 400 عينة من مصادرها المختلفة (جلد الاشخاص الطبيعيين، مرضى السكري، مرضى الثلاسيميا، التدرن، الحروق، الترب والهواء) للمدة من آب 2011 إلى شباط 2012. عزلت 124 عزلة تابعة للاجناس Micrococcus, Citrococcus, Kocuria وشخصت العزلات إلى مستوى النوع وصنفت اعتماداً على 90 صفة من الصفات الشكلية، الكيموحيوية، الفسلجية والجزيئية.

بلغت أعلى نسبة عزل للنوع *Micrococcus luteus* بنسبة 49.2% ثم النوع *M.lylae* بنسبة 16.1% يليه النوع *Kocuria varians* بنسبة 8.9% ثم النوعان *M.antarcticus* و*M.endophyticus* بنسبة 8% لكل منهما ثم النوع *K.rhizophila* بنسبة 4.8% ، والنوع *K. kristinae* بنسبة 2.4% وتم الحصول على عزلتين للنوع *Citrococcus* spp. وبنسبة 1.6% وعزلة للنوع *K.polaris* وبنسبة 0.8%.

استخدم التصنيف العددي بطريقة التحليل العنقودي Cluster analysis وبمقارنة ست طرائق كان أفضلها طريقة الربط للمجاور الأبعد وحددت النسبة المئوية للتشابه بين العزلات باستخدام معامل التشابه البسيط Simple Matching Coefficients(Ssm) اذ توزعت العزلات في سبعة عناقيد رئيسة G, F, E, D, C, B, A و 19 عنقوداً ثانوياً.

وقع النوع *M.luteus* ضمن العنقود الرئيس A والعناقيد الثانوية C1, C2, C3, C4, B1, B3, B4 في حين وقع النوع *Citrococcus* spp. ضمن العناقيد الثانوية B2, B5 وضم العنقود C5 عزلات تابعة للنوع *K.rhizophila*، تعنقدت العزلات التابعة للنوع *K.varians* ضمن العنقود الثانوي C6 وضم العنقود C7 عزلات تابعة للنوع *M.antarcticus* واشتمل العنقود الرئيس D افراد النوع *K.kristinae* والعنقود E ضم عزلات تابعة للنوع *M.endophyticus* في حين ضم العنقود الرئيس F عزلات تابعة للنوع *M.lylae*, وأخيراً العنقود الرئيس G والذي ضم عزلة واحدة تابعة للنوع *K.polaris* .

انتخبت 12 عزلة ممثلة لأغلب العناقيد في المخطط الهرمي الشجري، فصلت الأحماض الدهنية الخلوية وتم تحليلها بجهاز الـCas Liguid Chromatography (GLC) وأظهرت ثلاث عزلات منتخبة من عدة

عناقيد للنوع *M.luteus* الاحماض الدهنية نفسها وبنسب مختلفة، وظهر تغاير بوجـود وتركيـز الاحمـاض الدهنية بين الانواع المعزولة والذي كان له دور كبير في تاكيد تشخيصها ولاسيما النـوع *M.lylae* القريـب الشبه من النوع *M.luteus* كذلك كان له دور في تميز جنس Citrococcus عن جنسي الـ Micrococcus وKocuria ولم يظهر الحامضان الدهنيان Stearic وValeric في جميع العزلات التي تـم تحليلهـا بجهـاز الـ GLC وهذا كان له دور في تأكيد تشخيص أفراد جنس الـ Micrococcus وتميزها عـن جـنس الـ Staphylococcus.

الكلمات الدالة: التصنيف العددي، Micrococcus، Citrococcus، Kocuria.

Numerical Taxonomy of Micrococcaceae

Saffaa A. Al-Musawy **Essra G. Al-Sammak**

Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

Four hundred samples were collected from various sources (healthy skin of human, diabetics, thalassemic, turbculosis patients and soil, air samples) for the period from August 2011 to February 2012. One hundred twenty four isolates belonging to *Micrococcus* spp., *Citrococcus* spp., *Kocuria* spp. were identified to species level and classified depending on 90 morphological, Biochemical, Physiological and Molecular characteristics.

The highest rate of isolation was 49.2% which belonged to the species *Micrococcus luteus* and then 16.1% to *M.lylae*, followed by 8.9% to *Kocuria varians* and 8% to both of *M.antarcticus*, *M.endophyticus*, *K.rhizophila* 4.8%, *K.kristinae* 2.4%, two isolates of *Citrococcus* spp. 1.6% and one isolate of *K.polaris* 0.8%. Numerical classification by cluster analysis was carried out and six methods of clustering were compared of which the farthest neighbor linkage method proved to be the most convenient.

The percentage of similarity between the isolates determined using simple matching coefficient (Ssm), so the isolates were grouped into seven main clusters A, B, C, D, E, F,G, and 19 sub clusters. The first main cluster A and the sub clusters B4, B3, B1, C4, C3, C2, C1 included isolates of the species *M.luteus*, the sub clusters B2, B5 included isolates of the genus *Citrococcus* spp. and the sub cluster C5 included isolates of the species *K.rhizophila*, the sub clusters C6 included isolates of the species *K.varians*, the sub cluster C7 included isolates of the species *M.antarcticus*, the main cluster D included isolates which belonged to the species *K.kristinae*, the main cluster E included isolates belonged to the species *M.endophyticus*, the main cluster F included isolates belonging to the speices *M.lylae*, the last cluster G included one isolate belonging to the species *K.polaris*.

Twelve isolates selected from most clusters in hierarchical dendrogram for separation of cellular fatty acids using Gas Liquid Chromatography (GLC) showed that 3 isolates

belonging to species *M.luteus* had the same fatty acid at different concentrations, although they belong to different clusters, also there is heterogencity in present and concentration of fatty acid between the species and this had a major role in the diagnosis of the species *M.lylae* from *M.luteus* also have a role in distinguished Citrococcus from the genera Micrococcus and Kocuria, the fatty acid stearic and valeric were absent in all isolates analyzed by GLC which have a role in confirming diagnosis of members of the genus Micrococcus and distinguishing them from the genus Staphylococcus.

Keywords: Numerical taxonomy, Micrococcus, Citrococcus, Kocuria.

المقدمة

أحتـل أفـراد جـنس الـ Micrococcus مكانـة مهمـة فـي البيئـة، وفـي تأثيرهـا علـى حياة واقتصاد الانسان فـي مجـالات عديـدة كتحليلهـا لأغلـب المركبـات المعقـدة وذلـك لقـدرتها علـى انتـاج العديـد مـن الانزيمـات التـي لهـا دور كبيـر فـي تحطـيم المركبـات البترولية والشمع والزيوت والمبيدات الحشرية والكايتين (Emtizai *et al.*, 2005). تعد هذه البكتريـا مـن مجاميع البكتريا الموجبة لصبغة كرام خلاياها كروية الشكل تترتب بشكل ثنائيات، رباعيـات، ثمانيـات، أو بشكل عناقيد غير منتظمة بقطر 0.5-3.5 مايكروميتر غير متحركة، هوائية إجبارية، مـستعمراتها مختلفـة الألوان على الأكار المغذي الاعتيادي الحاوي على 5.5% ملح الطعام وعلى أكار الدم بعد التحـضين فـي درجـة حـرارة 37 م لمـدة 24-48 سـاعة (Atlas, 1995; Holt *et al.*, 1994) محتواها عالي من GC وبنسبة 65-75% مول (Kaprelyants *et al.*,1994).

تتواجد بصورة طبيعية على جلد الثدييات ومنها الإنسان والمواشي والخيول وكذلك في التربة والهواء والغبار والماء العذب والمالح ومنتجات الألبان والبيرة كما أن بعض أنواعها المنتشرة في الهواء لها القـدرة على إحداث حالة التحسس لدى الأشخاص ولاسيما في المناطق الرطبة والمغلقـة وتـسبب عـدة إصـابات ممرضة كإصابات الجلد والتقرحات وتجرثم الدم التهاب السحايا خاصة لدى المثبطـين مناعيـا او ضـعيفي المناعة (Kocure *et al.*, 2006). كما اظهـر افـراد جـنس Micrococcus كـذلك تـشابه كبيـرا مـع جـنس Arthrobacter , Nesterenkonia, Renibacterium, Citrococcus, Stomatococcus, Kocuria (*A.agilis*) Kytococcus, Dermacoccus, Planococcus, و Staphylococcus (Winn *et al.*, 2006).

تحتوي البكتريا بعض الاحماض الدهنية الفريدة والتي لاتوجد في الخلايا حقيقيـة النـواة وأن مـصدر الاحماض الدهنية في الخلايا البكتيرية هو الدهن الاولي في الاغشية الخلوية ومثـال علـى ذلـك الـدهون المفسفرة أو دهون الغشاء الخارجي Lipopolysaccharide (LPS) في البكتريـا الـسالبة لـصبغة كـرام وحامض Lipoteichoic في البكتريا الموجبة لصبغة كرام، وعادة ما يكون طول السلسلة للأحماض الدهنيـة

في الاغشية الخلوية البكتيرية من 9-20 ذرة كاربون أما الاحماض الدهنية الأكثر من 20 ذرة كاربون مثـل Mycolic acid أو Isoprenoidquinones يتواجدان في بعض الخلايا البكتيريـة (Sasser, 1990) تختلـف الاحماض الدهنية في الخلايا البكتيرية ليس فقط بوجودها أو غيابها بل في أنواعها، توزيعها، وكميتها ضمن المجموعات البكتيرية، فالأحماض الدهنية المتفرعة تسود في البكتريا الموجبـة لـصبغة كـرام فـي حـين الاحماض الدهنية القصيرة تتواجد في البكتريا الـسالبة لـصبغة كـرام وفـي الأغلـب فـي طبقـة الـ Lipopolysaccharide (Sauer *et al*., 2008).

نظـرا للتـشابه الكبيـر بـين افـراد جـنس الــ Micrococcus والعديـد مـن الاجنـاس جاءت الدراسة لتحقيق الاهداف الآتية:

1. عزل وتشخيص افراد جنس الـ Micrococcus من مصادر سريرية وبيئية وتفريقهـا عـن بقيـة الاجناس البكتيرية المشابه له بالاعتماد على الصفات المظهرية والجزيئية.
2. تصنيفها عددياً ومقارنة عدة طرق للتعنقد و ايجاد جداول تشخيصية ثابتة ومقبولة.
3. فصل الاحماض الدهنية من الاغشية الخلوية للأنواع المعزولـة باسـتخدام تقنيـة كروماتوكرافيـا الغازالسائل Gas Liquid Chromatography (GLC) واستخدامه كصفة تفريقية.

المواد وطرائق العمل

جمعت (400) عينة من مصادرها المختلفة: التربة، الهواء، مـسحات مـن منطقـة الجلـد الطبيعـي للأشخاص الطبيعيين ومسحات من الجلد السليم والمصاب لمرضى السكري والتدرن والثلاسيما والحروق.

الإنسان: جمعت المسحات من الذراع، الفخذ، الوجنة، الجبين، الإبط، باستخدام ماسحة قطنية Swab. وضعت في الوسط الناقل المعقم Stuart's Medium ثم زرعت على وسط الأكار المغذي الاعتيادي Nutrient Agar الحاوي على 5.5% ملح الطعام وحضنت الاوساط في ظروف هوائية وفي درجة حرارة 37 م ولمدة 24-48 ساعة.

التربة: جمعت عينات ترب لمناطق مختلفة ومتباعدة من محافظة نينـوى وشـملت تـرب حـدائق منزليـة ومستشفيات وترب مصنع البلاستك وعلى عمق 2-5 سم وزرعت بطريقة الصب على وسط الاكـار المغذي الاعتيادي الحاوي على 5.5% ملح الطعام وحضنت في درجة حـرارة 37 م ولمـدة 24-48 ساعة في ظروف هوائية.

الهواء: عرضت أطباق أكار الدم والأكار المغذي الاعتيادي الحاوية على 5.5% ملح الطعـام لمـدة نـصف ساعة في أجواء مناطق مختلفة (مستشفيات، مختبرات، مناطق عامة) وحضنت هوائيا تحت الظروف المثالية.

الاختبارات الشكلية: تمت ملاحظة ألوان وصفات المستعمرات النامية على وسط الأكار المغذي الاعتيادي الحاوي على 5.5% ملح الطعام (Santhini *et al.*, 2009).

الاختبارات المجهرية: صبغة كرام للتأكد من أنها موجبة للصبغة فضلاً عن شكل وترتيب الخلايا (Winn *et al.*, 2006).

الاختبارات الكيموحيوية :1- زرعت العزلات على وسط أكار الدم الحاوي على 5.5% ملح الطعام لدراسة إشكال وألوان المستعمرات وقدرتها على تحليل دم الإنسان وسرعة نموها ولتمييز جنس Micrococcus عن Citrococcus إذ يظهر الأخير بشكل مستعمرات مجعدة وخشنة (Kezeli *et al.*, 2009) 2 - إنتاج انزيم سايتوكروم اوكسديز (Macfaddin, 1985) 3- إنتاج أنزيم الكتاليز (Atlas *et al.*, 1995) 4 - استخدام المضادين الحيويين (Furazolidone) FX100M/disc و(B10u) Bacitracin لتمييز جنس Micrococcus عن جنس Staphylococcus (Winn *et al.*, 2006). 5 - النمو في المرق المغذي المجهز من شركة Oxoid لمعرفة شكل الخلايا ودورة النمو. 6- استهلاك الكاربوهيدرات استخدم وسط أكار الفينول الأحمر المضاف إليه بعد التعقيم 1% من كل نوع من السكريات: مالتوز، فركتوز، مانوز، زايلوز، سكروز، دكستروز، سوربيتول، كليسيرول، كلوكوز، لاكتوز، ساليسين، مانيتول، ارابينوز، كلاكتوز، نشا. (ما عدا السالسين أضيف بمقدار 0.5%) المعقم لمدة 5 دقائق في المؤصدة تحت الظروف المثالية حضنت الأطباق الملقحة في درجة حرارة 37 م ولمدة 18-24 ساعة (Collee *et al.*,1996). 7- تحليل الاسكولين (Winn *et al.*, 2006; Cowan, 1977). 8- تحليل النشا (Macfaddin, 1985). 9 - اختبار المثيل الأحمر. 10- اختزال النترات. 11- تحلل الجلاتين. 12- الحركة (Macfaddin, 1985; Cruickshank *et al.*, 1974) .13- استهلاك السترات (Atlase *et al.*,1995). 14 - استهلاك اليوريا (Harley and Prescott, 1996). 15- استهلاك المالونيت (Winn *et al.*, 2006 ; Macfaddin, 1985). 16- استهلاك تيليورايت البوتاسيوم (Frei *et al.*,1995). 17- تحليل الأحماض الأمينة: حضر بإضافة 4 غم لكل نوع من أنواع الأحماض الأمينية الآتية: الكلايسين، ألنين، ميثوين، سيرين، فالين، كلوتامين، ارجنين واللايسين لكل 100 سم3 من وسط الأكار المغذي الاعتيادي (Webster McGinley, 1997) 18- تحليل الكازائين (Lennette *et al.*,1985). 19- اختبار إنتاج غاز كبريتد الهايدروجين H2S وثنائي اوكسيد الكاربون Co_2 باستخدام وسط ثلاثي السكر والحديد (Koneman *et al.*,1997).20- إنتاج أنزيمات الضراوة: تم التحري عن إنزيم Lecithinase و البروتيز Protease و اللايبيز Lipase باستخدام وسط أكار صفار البيض Egg Yolk Agar (Lennette *et al.*, 1985) اختبار CAMP (Koneman *et al.*,1997) تحلل دم الانسان (Winn *et al.*, 2006).21 - القدرة على النمو في الاوساط الآتية: الوسط الحاوي على سيانيد البوتاسيوم (Macfaddin,1985) تراكيز مختلفة من ملح الطعام NaCl حضرت تراكيز مختلفة من ملح الطعام بإضافة المحلول الملحي المذاب إلى وسط الأكار المغذي الاعتيادي وكالاتي: 3.5-5.5-7.5-9.5-11.5-13.5-15.5 %

(Harley and Prescott,1996). وسط اكار المانيتول Manitol Salt Agar والحاوي على ملح الطعام بتركيز 7.5%. وسط Thioglycolate Agar وسط Eusin methylene blue وسط MacConkey Agar المجهزة من شركة Oxoid. 22 - الحساسية للمضادات الحيوية: استخدمت المضادات الحيوية والمجهزة من شركة Oxoid لقحت العزلات على وسط Mullar Hinton Agar وحضنت هوائيا في درجة حـرارة 37 م ولمـدة 18-24 ساعة اعتماداً على الطريقة المتبعة من قبل منظمة الصحة العالمية (Vandepitte *et al*., 2003).

التصنيف العددي:

استخدم التصنيف العددي لتفريق الاجناس المعزولة: Micrococcus, Citrococcus, Kocuria، وتميز الانواع التابعة لها، وبإتباع نظام التحليل العنقودي وبطريقة الربط المنفرد للمجاور الأبعد وكما يأتي:

1- مصفوفة البيانات Data Matrix: تتألف المصفوفة من عدد (m=90) من المتغيرات للصفات الـشكلية والفسلجية والكيمياحياتية لعدد من العزلات (n=124) من الاجناس والأنواع المعزولة. نظمت المصفوفة على اساس الارقام الثنائية لتمثيل حالة وجود الصفة (+ او 1) وحالة عدم وجود الصفة (- او 0) الخاصة بالعزلة الواحدة.

2- مصفوفة التشابه Similarity Matrix: تمثل هذه المصفوفة ذات الرتبة (m×n) حيث تم مقارنة ازواج الانواع ببعضها لكل الصفات المستخدمة في التحليل العددي وباستخدام معامل التشابه البسيط.

3- التحليل العنقودي Cluster analysis: استخدم في هذه الدراسة نظام التصنيف المقدم من قبل (Austin and Priest, 1986) وهو عبارة عن تكوين عناقيد اكبر نتيجة دمج العناصر بأحد طرق الربط، وفي دراستنا استخدمت جميع الطرق، وكان أفضلها طريقة الربط للمجاور الأبعد لان جميع العـزلات متـشابهة بدرجـة كبيرة.

تمييز أسترات الأحماض الدهنية باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الغاز السائل

Cas Liguid Chromatography GLC

يعد تحليل الأحماض الدهنية وتحديدها من الطرق المهمة في تشخيص معظم انواع الاحياء المجهريـة عدا الفيروسات (Brooks *et al*., 1990 ; Lambert and Moss, 1983)، تم تحليل الأحماض الدهنية الحـرة بجهاز GLC عن طريق استرة الدهون القطبية للغشاء البلازمي او دهون الكيتون، تم تهيئة العينـة للقيـاس بجهاز الـ GLC المجهز من شركة Hewlett Packard من نوع Packard Model 438A اعتمـادا علـى طريقة (Miller,1982). قورنت أوقات احتباس أسترات الأحماض الدهنية للعينـات مـع أوقـات احتبـاس أسترات الأحماض الدهنية القياسية وباستخدام عمود الفصل بقطر 1/8 انج وبطول 3 متر وباستخدام كاشـف شعلة التأين (FID)Film Ionization Detector فصلت الأحماض الدهنية بين درجـة حـرارة 120-300 م وذلك برفعها 10 درجات/ دقيقة باستخدام غاز الهليوم بسرعة 30 سم^3/دقيقة وغـاز الهيـدروجين بـسرعة 30سم^3/ دقيقة (Shaw, 1974).

النتائج و المناقشة

تم الحصول على 180 عزلة في العزل الاولي انتخبت منها 124 عزلة تابعة للأجناس Micrococcus و Kocuria وCitrococcus تم الاعتماد على العديد من الصفات لتميزها عن الأجناس المشابهة وكما موضح في الجدول (1) اذ شخص جنس الـ Micrococcus أولا بالاعتماد على أن أفـراده موجبـة للأوكـسيديز وحساسـة للمضاد الحيوي الـ Bacitracin ومقاومة لمضـاد Furazolidone وتتحمـل النمـو بتركيـ ـز 5.5-15.5% ملح الطعام وتنمو في درجة حرارة 37 م، غير متحركة ولا تمـر بـدورة النمـو العـصوية الكروية (Winn *et al*., 2006).

اعتمد على قدرة العزلات للنمو بتركيز 5.5% ملح الطعام في وسـط العـزل الأولـي لتميـز جـنس Micrococcus عن جنس Rothia و Stomatococcus و Planococcus حيث أن أفرادهم لا يمتلكون قدرة على النمو بهذا التركيز (Collins *et al*., 2000).

ولتميز جنس الـ Kocuria لم يتم الاعتماد على اختبار الاوكسديز كصفة قطعية حيـث تظهـر أفـراد جنس Kocuria تغايراً لهذا الاختبار وأنها تمتلك أنواع موجبة وأخرى سالبة لاختبـار الاوكـسيديز وتمتـاز بكونها موجبة للكتاليز واعتمد على اختبار الحـساسية للمـضاد الحيـوي Bacitracin ومقاومتهـا لمـضاد Furazolidone لتميزها عن جنس Staphylococcus وتميزت عن جنس Micrococcus بكونهـا لا تنمـو بتركيز9.5% NaCl فضلاً عـن العديـد مـن الاختبـارات التـي أجريـت لاحقـا لتأكيـد تشخيـصها (Reddy *et al*., 2003). فـضلاً عـن أن أفـراد الـ Staphylococcus سـالبة لاختبـار الاوكـسيديز (Winn *et al*., 2006 ; Kloos *et al*., 1998a). وتميزت أفراد جـنس Citrococcus بكـون مـستعمراتها مجعدة وخشنة على أكار الدم بعد التحضين لمدة 24-48 ساعة بدرجـة حـرارة 37 م وبظـروف هوائيـة (Kezeli *et al*., 2009 ; السماك، 2006).

ظهر تباين في الأجناس المعزولة اعتماداً على مناطق العزل وكما موضح في الجدول (2) ومن أكثـر الأجناس المعزولة والشائعة هو جنس Micrococcus والذي ضم أكثر الأنواع الشائعة التواجـد علـى جلـد الإنسان ثم جنس Kocuria وأقلها جنس Citrococcus أما أكثر الأنواع المعزولـة كـان النـوع *M.luteus* بنسبة 49.2% يليه النوع *M.lylae* بنسبة 16.1% ثـم النـوع *K.varians* بنـسبة 8.9% يليـه النوعـان *M.antarcticus* و*M.endophyticus* بنسبة 8% لكلا منهما ثم النوع *K.rhizophila* بنـسبة 4.8% ويليـه النوع *K.kristinae* بنسبة 2.4% وأقلها النوع *K.polaris* بنـسبة 0.8 %مـن المجمـوع الكلـي للعينـات (Kocure *et al*., 2006; Boudewijns *et al*., 2005; Liu *et al*., 2000)، وهـذا مـشابه لدراسـة العـالم Savini وآخرون عـام 2010، اذ عـزل النـوع *M.luteus* بنـسبة 95% ثـم 33% *M.lylae* والنـوع *M.antarcticus* بنسبة 28% كما سجلت أعلى نسبة عزل من منطقة الذراع يليها الإبط ثم الفخذ ثـم الوجـه وهذا ما وضحته دراسة (Kovacs *et al*., 1999).

الجدول 1: الاختبارات المستخدمة لتميز جنس Micrococcus عن الاجناس المشابهه له

الاجناس البكتيرية	اختبار الكتاليز	اختبار الاوكسيديز	فترة التحضين	درجة حرارة التحضين 37 م	الوان المستعمرات على وسط الاكار المغذي الحاوي على 5.5% NaCl	شكل المستعمرات على وسط اكار الدم	تركيز الـ NaCl% في الوسط الزرعي				الحركة	دورة النمو Rod-coccus cycle	المقاومة للـ Furazolidone (100mg)	الحساسية للـ Bacitracin (10u)
							0	5.5	9.5	15.5				
Micrococcus	+	- +	48-24	+	اصفر،ابيض،حليبي	ملساء	+	+	+	+	-	-	+	+
Staphylococcus	+	-	48-24	+	اصفر،ابيض،حليبي	ملساء	+	+	+	-	-	-	-	-
Kocuria	+	- +	48-24	+	اصفر،ابيض،حليبي	ملساء	+	+	-	-	-	-	+	+
Rothia	+	+	48-24	+	ابيض	ملساء	+	-	-	-	-	-	+	+
***Arthrobacter**	+	+	48-24	+	احمر	ملساء	+	~	~	~	+	+	~	~
Citrococcus	+	+	48-24	+	اصفر	مجعدة	+	+	-	-	-	-	+	+
Stomatococcus	+	-	48-24	+	ابيض	ملساء	+	-	-	-	-	-	~	~
Nesterenkonia▪	+	- +	48-24	+	اصفر	ملساء	-	+	-	-	-	-	~	~
Renibacterium◦	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~	~
Planococcus	+	-	48-24	+	اصفر، برتقالي	ملساء	+	-	-	-	-	-	-	-
Dermacoccus•	+	+	5ايام	-	برتقالي	ملساء	+	-	-	-	-	+	~	~
Kytococcus•	+	-	72- 92	+	اصفر،ابيض	ملساء	+	+	+	+	-	-	~	~

* عدا النوع *Arthrobacter agilis* متحرك

~ لم يجرى هذا الاختبار - سالبة للاختبار + موجبة للاختبار - + متغايرة

▪ لم تعزل لانها لاتنمو بدون NaCl ◦ لم تعزل لاختلاف مصدر العزل • لم تعزل لاحتياجها فترة تحضين طويلة

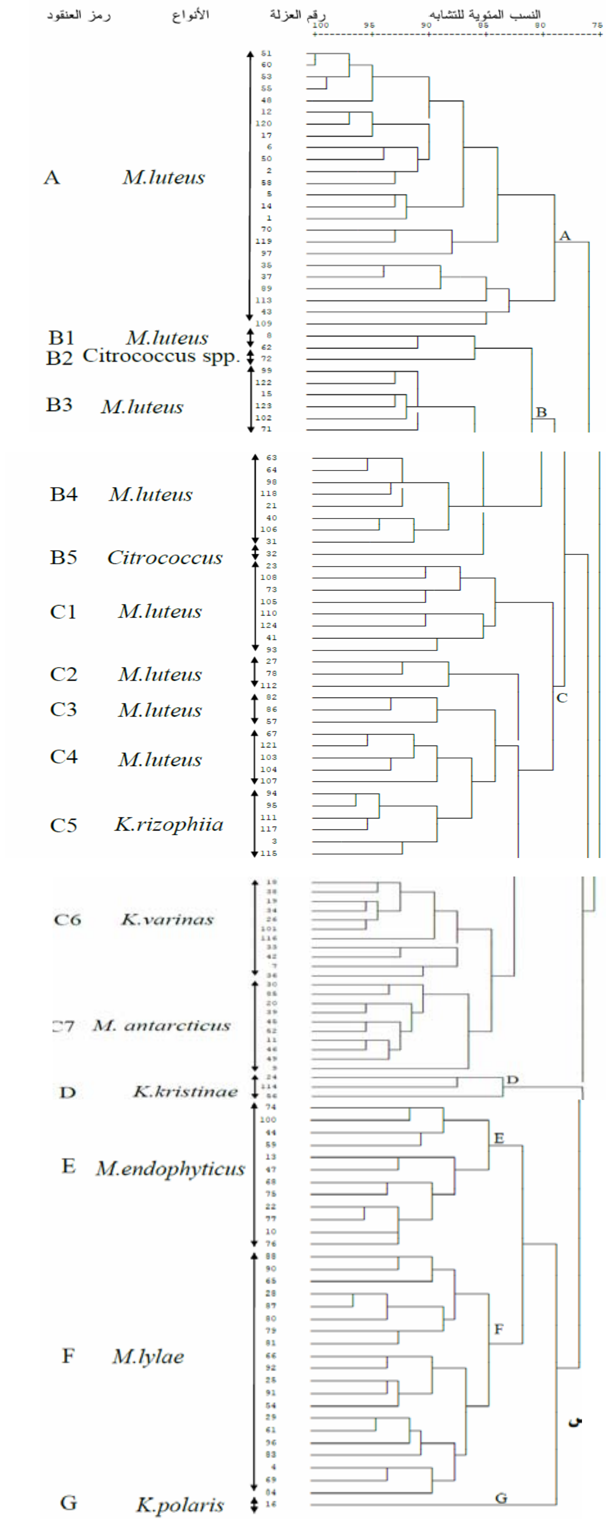
الجدول 2: أنواع البكتريا المعزولة من عينات سريرية وبيئية حسب الجنس والعمر قيد الدراسة

الفئات العمرية (السنة)	الجنس	عدد العينات	عدد العزلات المنتخبة	مصدر العزل	نوع العينة	عدد ونسب الأنواع البكتيرية المعزولة									
						الأنواع	*M.luteus*	*M.lylae*	*M.antarcticus*	*M.endophyticus*	*K.varians*	*K.rhizophila*	*K.kristinae*	*K.polaris*	*Citrococcus spp.*
5-20	ذكور	20	0	مرضى الثلاسيميا	منطقة الإعطاء المتقرحة	العدد	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	إناث	5	0			النسبة%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21-35	ذكور	0	0	الأشخاص الطبيعيين	الذراع	العدد	22	4	2	4	2	1	1	-	1
	إناث	25	37			النسبة%	59.4	10.8	5.4	10.8	5.4	2.7	2.7	-	2.7
	ذكور	0	0		الفخذ	العدد	5	2	-	-	-	-	-	-	1
	إناث	25	8			النسبة%	62.5	25	-	-	-	-	-	-	12.5
	ذكور	0	0		الإبط	العدد	2	-	1	2	4	-	1	-	-
	إناث	25	10			النسبة%	20	-	10	20	40	-	10	-	-
	ذكور	0	0		الوجه	العدد	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	إناث	25	1			النسبة%	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	ذكور	20	12	مرضى السكري	منطقة سليمة (الذراع)	العدد	9	10	1	2	4	2	1	-	-
	إناث	30	17			النسبة%	31.1	34.4	3.4	6.9	13.8	6.9	3.4	-	-
	ذكور	13	8	مرضى الثلاسيميا	منطقة الإعطاء المتقرحة	العدد	5	2	3	2	-	-	-	-	-
	إناث	12	4			النسبة%	41.7	16.7	25	16.7	-	-	-	-	-
	ذكور	0	0	مرضى السل	منطقة سليمة (الذراع)	العدد	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	إناث	20	1			النسبة%	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	ذكور	25	1	الحروق	منطقة الحرق	العدد	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	إناث	0	0			النسبة%	100	-	-	-	-	-	-	-	-
36-50	ذكور	10	2	مرضى السكري	منطقة مصابة (التقرحات)	العدد	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	إناث	15	6			النسبة%	100	-	-	-	-	-	-	-	-
	------	35	4	التربة	ترب زراعية	العدد	3	-	1	-	-	-	-	-	-
						النسبة%	75	-	25	-	-	-	-	-	-
	------	25	3		ترب مصنع البلاستك	العدد	1	1	1	-	-	-	-	-	-
						النسبة%	33.3	33.3	33.33	-	-	-	-	-	-
	------	35	10	الهواء	اجواء مختلفة	العدد	3	1	1	-	1	3	-	-	-
						النسبة%	30	10	10	-	10	30	-	10	-
المجموع		400	124			العدد	61	20	10	10	11	6	3	1	2
						النسبة %	49.2	16.1	8	8	8.9	4.8	2.4	0.8	1.6

التحليل العددي

قورنت ست طرائق للتعنقد وتم الحصول على ست مخططات واتضح ان أفضل الطرائق هي طريقة الربط للمجاور الأبعد تليها الربط المنفرد للمجاور الأقرب ومن ثم طريقة الربط باستخدام المعدل المـوزون واقلها أهمية طريقة الربط المركزي واستبعدت طريقتي ورد والوسيط. اعتمدنا على طريقة الربط باسـتخدام الربط للمجاور الأبعد وتأكيد العناقيد بالمقارنة مع طريقتي الربط للمجاور الأقرب وطريقة الـربط بالمعـدل الموزون.

قسم المخطط الشجري الى (7) عناقيد رئيسة (G, F, E, D, C, B, A) والتي قـسمت بـدورها إلـى عناقيد ثانوية كما موضح بالمخطط الهرمي الشجري الشكل (1) والجدول (3)، يتميز التصنيف العددي عـن غيره من التصانيف بإلغاء الصفة أو الاختبار من العملية التصنيفية عندما تكون كل العزلات قيـد الدراسـة موجبة أو سالبة لها لعدم تأثيرها في العملية التصنيفية وهي تذكر كصفة مميزة للمجموعة مثل قابليتها علـى الاصطباغ بصبغة كرام وحركتها حيث إن كل العزلات موجبة للصبغة غير متحركة وغير محللة للجلاتـين وكازائين الحليب والكلايسين وموجبة للكتاليز، خلاياه كروية تترتب بشكل رباعيات أو ثمانيات ولا تنتج غاز Co_2 وH_2S كما موضح في الجدول (4). لم يعتمد على اختبار الاوكسديز كـصفة قطعيـة وأساسـية فـي التعريف بين جنسي Micrococcus وKocuria في الدراسة الحالية اذ أظهرت العزلات تبايناً واضحاً وكبيراً في نتيجة الاختبار لذلك تم إعادة الاختبار أكثر مـن مـرة وأخـذت النتيجـة الأقـرب والأكثـر تكـراراً (Jeffries, 1969).



الشكل 1: المخطط الهرمي الشجري للأنواع التابعة للأجنـاس Micrococcus, Citrococcus, Kocuria باستخدام التحليل العنقودي وطريقة الربط للمجاور الابعد ومعامل التشابه البسيط Ssm

الجدول 3 : النسب المئوية لتشابه الانواع والأجناس ضمن العناقيد الرئيسة والثانوية ومصادر عزلها حسب المخطط الشجري الشكل (1)

ت	رمز العنقود	عدد العزلات	الأنواع	النسبة المئوية للتشابه %	مصدر العزل
1	**A**	23	*M.luteus*	%78	أشخاص طبيعيين (الذراع) تـدرن، سـكري، ثلاسيميا، تربة
2	**B**				
	B1	2	*M.luteus*	%90	اشخاص طبيعيين (الذراع)، هواء
	B2	1	*Citrococcus* spp.	%85	اشخاص طبيعيين (الفخذ)
	B3	6	*M.luteus*	%90	اشخاص طبيعيين (الذراع، الإبـط، الوجـه)، الحروق
	B4	8	*M.luteus*	%88	ذراع، فخذ، سكري، هواء
	B5	1	*Citrococcus* spp.	%85	الذراع
3	**C**				
	C1	8	*M.luteus*	%84	ذراع، سكري، تربة بلاستيك، هواء
	C2	3	*M.luteus*	%87	ثلاسيميا، سكري
	C3	3	*M.luteus*	%90	ذراع، تربة
	C4	5	*M.luteus*	%90	ذراع، إبط، تربة، ثلاسيميا
	C5	6	*K.rhizophila*	%90	الذراع، سكري، هواء
	C6	11	*K.varians*	%88	ذراع،ابط، سكري، هواء، إبط
	C7	10	*M.antarcticus*	%86	ذراع، سكري، هواء، تربة، ثلاسيميا
4	**D**	3	*K.kristinae*	%83	ذراع، أبط، سكري
5	**E**	12	*M.endophyticus*	%84	ذراع، أبط، فخذ، سكري، ثلاسيميا
6	**F**	20	*M.lylae*	%84	ذراع، فخذ، ذراع مرضى السكري، هـواء، ثلاسيميا، تربة، معمل البلاستيك
7	**G**	1	*K.polaris*	%79	هواء

الجدول 4: العناقيد التي تم الحصول عليها من الشجرة التصنيفية الشكل (1) والنسب المئوية لإظهار الصفات

رمز العنقود		A	B1	B2	B3	B4	B5	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	D	E	F	G
النوع		*M.luteus*	*M.luteus*	*Citrococcus spp.*	*M.luteus*	*M.luteus*	*Citrococcus spp.*	*M.luteus*	*M.luteus*	*M.luteus*	*M.luteus*	*K.rhizophila*	*K.varians*	*M.antarcticus*	*K.kristinae*	*M.endophyticus*	*M. lylae*	*K.polaris*
عددالعزلات		24	2	1	6	8	1	8	3	3	5	6	11	10	3	12	20	1
نسبة الارتباط %		78	90	85	90	88	85	84	87	91	90	90	88	86	83	84	84	79
الاختبارات		النسب المئوية للصفات																
ألوان المستعمرات على إكار المغذي NaCl%5.5	اصفر غامق	33.3	0	0	0	50	0	50	100	0	0	66.6	18.1	20	0	16.6	0	0
	اصفر فاتح	87	50	100	83.3	100	0	100	100	66.6	100	100	81.8	90	0	91.6	0	0
	حليبي مصفر	12.5	50	0	16.6	0	100	0	0	33.3	0	0	18.1	10	66.6	0	15	0
	حليبي مبيض	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	33.3	0	85	0
	برتقالي	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
إحجامها	صغيرة	66.6	50	0	33.3	25	0	75	100	100	60	16.6	100	90	66.6	83.1	50	100
	كبيرة	58.3	50	100	66.6	75	100	25	0	0	60	100	9	0	0	8.33	50	0
سطح المستعمرة	ملساء	95.8	100	0	83.3	37.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	خشنة	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
القوام	جافه	4.16	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.6	50	0
	لزجة	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	50	100
شكل الخلايا	ثنائي	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	رباعي	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	ثماني	12.5	0	0	0	25	0	25	0	0	0	66.6	18.1	10	33.3	41.5	25	0
حجم الخلايا	صغيرة	83.3	100	100	100	75	100	75	33.3	33.3	60	83.3	90	90	66.6	100	35	100
	متوسطة	16.6	0	0	0	0	0	25	66.6	66.6	40	16.6	10	10	66.6	0	75	0
إنتاج أنزيم	الاوكسيديز	70	100	100	100	87.5	100	87.5	83.3	100	100	0	9	100	100	83.3	90	100
	الكتاليز	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	اليوريز	12.5	0	0	16.6	25	0	12.5	0	0	0	0	100	10	100	8.33	15	0
انتاج انزيمات الضراوة	البروتيز	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	9	0	33.3	0	0	100
	اللسيثينيز	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	اللايبيز	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	اختبارCAMP	12.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	100	0	0	0
	تحلل دم الانسان	8.33	50	100	83.3	75	100	0	0	33.3	20	0	9	20	33.3	0	20	0
أكسدة السكريات	كلوكوز	33.3	0	0	16.6	0	0	0	0	0	20	0	36.3	20	33.3	33.3	5	100
	لاكتوز	4.16	0	0	0	0	0	12.5	0	0	0	0	27	10	100	16.6	0	0
	مانوز	8.3	0	100	0	0	0	12.5	0	0	20	0	27	10	66.6	25	0	0
	الزايلوز	0	0	0	0	0	0	0	66.6	0	0	33.3	9	0	0	0	0	0
	كليسيرول	16.6	0	100	0	0	0	0	33.3	0	0	0	27	20	33.3	25	0	100
	فركتوز	25	0	0	0	0	0	0	33.3	0	0	33.3	36.3	0	66.6	25	5	0
	سوربيتول	16.6	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	100	25	5	0
	سكروز	12.5	0	0	0	12.5	0	0	33.3	66.6	0	0	0	0	33.3	33.3	0	100
	دكستروز	37.5	0	100	0	25	0	12.5	0	66.6	20	33.3	9	0	100	87.3	0	0
	نشا	4.16	0	100	0	0	0	12.5	0	0	20	16.6	0	0	100	16.6	5	0
	كالاكتوز	16.6	0	0	0	12.5	0	0	0	0	0	0	9	0	6.66	33.3	0	0
	اربينوز	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	.66	83.3	0	0
	مانيتول	12.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	8.33	0	0
	ساليسين	8.33	0	0	0	0	0	0	0	33.3	20	0	18.1	0	66.6	6.66	5	0
	دكسترين	0	0	0	0	12.5	0	0	0	33.3	0	50	9	0	0	0	0	0
اختزال	النترات	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	0	100
تحليل	النشا	8.33	0	0	0	12.5	0	12.5	33.3	0	0	100	90	100	0	8.33	0	0
	الاسكولين	8.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	66.6	0	0	0
	الجلاتين	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
النمو على وسط	سيانيد البوتاسيوم	0	0	0	0	12.5	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	100	0
	سيمون ستريت أكار	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	25	100
	الثايوكلايكوليت	16.6	0	0	16.6	62.5	0	50	100	33.3	60	100	0	0	0	41.5	10	0
	الايوسين	16.6	50	0	50	25	100	12.5	66.6	66.6	40	50	27	20	66.6	41.5	70	100
	الماكونكي	100	50	100	83.3	100	100	100	100	66.6	100	100	81.8	90	100	83.1	70	100
	NACL 0%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	3.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	5.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	7.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	9.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	0	100	100	0
	11.5	100	100	10	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	0	100	100	0
	13.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	0	100	100	0
	15.5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	0	100	100	0
النمو على وسط ثلاثي السكر والحديد	A/A	4.16	0	0	33.3	12.5	0	25	0	0	40	60	27	0	66.6	8.33	20	0
	A/K	16.6	50	0	16.6	12.5	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	10	0
	K/A	8.33	33	100	0	0	100	12.5	0	0	0	10	0	0	0	8.33	5	0
إنتاج غاز	H_2S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	CO_2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
دورة النمو في الوسط السائل		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
استهلاك الاحماض الامينية	الارجنين	100	100	0	100	100	0	100	100	100	100	16.6	0	0	90	0	0	33.3
	كلايسين	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	النين	12.5	0	0	66.6	12.5	100	12.5	0	0	0	16.6	0	90	0	33.3	100	0
	ميثيونين	12.5	50	0	50	62.5	0	25	0	0	20	16.6	27	10	33.3	16.6	15	0
	سيرين	4.16	0	0	0	0	0	12.5	66.6	0	20	0	9	20	33.3	8.33	0	0
	فالين	4.16	0	0	0	25	0	12.5	0	0	0	0	0	10	33.3	25	0	0
	كلوتامين	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0
	لايسين	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
استهلاك	الستريت	12.5	50	0	16.6	12.5	0	37.5	100	33.3	60	60	100	60	66.6	5	95	100
	المالونيت	16.6	0	0	0	25	100	12.5	0	66.6	0	100	0	0	0	8.33	10	0
	تليورايت البوتاسيوم	100	0	0	50	62.5	100	87.5	100	100	100	83.3	81.8	90	100	41.5	0	100
اختبارالمثيل الاحمر		37.5	0	0	0	50	0	12.5	100	0	0	33.3	27	20	66.6	41.6	35	100
الحركه		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

G	F	E	D	C7	C6	C5	C4	C3	C2	C1	B5	B4	B3	B2	B1	A	رمز العنقود	
K.polaris	*M. lylae*	*M.endophyticus*	*K.kristinae*	*M.antarcticus*	*K.varians*	*K.rhizophila*	*M.luteus*	*M.luteus*	*M.luteus*	*M.luteus*	*Citrococcus spp.*	*M.luteus*	*M.luteus*	*Citrococcus spp.*	*M.luteus*	*M.luteus*	النوع	
100	75 M10	91.6	66.6	30 M10	10	0	M16.6	0	100	0	M25	0	M12.5	83.3 M16.6	100	M25	Piperecilin 100mg/disc	
M100	95	91.6 M8.3	M33.3	60 M20	M72.7	100	83.3 M16.6	100	100	100	50 M25	0	87.5 M12.5	83.3 .16 M6	100	50 M41.6	Tetracycline30mg/disc	
M100	M100	M83.3	M33.3	M90	81.8	M100	83.3 M16.6	M100	M75	M25	M75	0	M100	M100	M100	M83.3	Ceftazidime30mcg/disc	
100	M100	91.6	100	100	90.9	100	100	80 M20	100	100	75 25M	100	100	100	100	m58.333.3	Tobramycin10mg	
100	100	100	100	100	100	100	100	80	100	100	100	100	100	100	100	M95.84.16	Nitrofurantoin300mg/disc	
100	95	100	66.6	100	100	0	100	100	M75	100	75 M12.5	100	100	M83.3	100	M83.38.3	Carbenicillin100mcg/disc	
0	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100	12.5	0	100	50 M50	50	83.3	Penicillin10u/disc	
0	100	100	100	100	90.9	100	100	80	100	75	25	100	100	66.6	0	100	Cefoperazone30mcg/disc	الحساسية للمضادات الحيوية
0	80 M50	25 M8.3	33.3 M33.3	60 M10	100	0	66.6 M16.6	100	100	25	62.5 M12.5	100	87.5 M12.5	83.3	50	M16.68.33	Cefotaxime30m/disc g	
0	90 M10	100	100	100	100	100	83.3 M16.6	80	100	100	100	100	100	100	0	100	Nitrofurantoin300mcg/disc	
0	100	100	100	100	27.2	100	100	100	100	100	25	100	100	66.6 M33.3	100	M91.68.33	Erythromycin15mcg/disc	
M100	5 M55	M83.3 16.6	M66.6	20 80 M	M72	M100	100	M100	M100	25	25 M50	M100	50 M50	M100	50	50 M33.3	Chloramphenicol30mg/disc	
0	95	M83.3	M66.6	100	90.9	M100	83.3 M16.6	M80	75	M75	M100	0	100	M100	50	M58.3	Cephalothin30mg/disc	
M100	0	M8.3	M33.3	0	M10	0	0	M20	M25	0	0	100	0	0	0	M4.1	Amikacin10mcg/disc	
M100	M100	M100	M100	100M	M90.9	M100	M83.6	M100	M100	M100	M100	M100	M100	M100	50	100	Azithromycin15mg/disc	

100%: موجبة للاختبار أو حساسة للمضاد الحيوي 0%: سالبة للاختبار أو مقاومة للمضاد الحيوي M: متوسطة الحساسية للمضاد الحيوي

العنقود الرئيس A : ضم أفراد تعود الى النوع *M.luteus* لها القدرة على تحليـل دم الإنـسان لا تـستهلك الكلايسين والالنين، تم عزل هذا النوع من جميع مناطق العزل قيد الدراسة (Jones *et al*., 1995)

العناقيد الثانوية C4, C3, C2, C1B1B4, B3, : تضم أفراد النوع *M.luteus* والمعزولـة مـن الإنـسان والهواء والتربة هذه العناقيد تشابه صفات أفراد العنقود A وقد أظهرت اختلافات طفيفـة بالنـسب المئويـة للاختبارات وفصلت ليس بسبب الاختلاف بالصفات لكن الغاية منه لتوضيح وسهولة التعامـل مـع العناقيـد وصفاتها وكذلك بسبب وجود عناقيد تابعة لجنس Citrococcus ضمن عناقيد جنس Micrococcus.

العنقود الثـانوي B2: ضم عزلة *Citrococcus* spp. واحدة وقد ظهر هذا الجنس ضمن الشجرة التـصنيفية وبشكل خاص ضمن العنقود الذي يضم النوع *M.luteus* وذلك بسبب التشابه الكبير بين الجنسين ماعـدا ان افراد جنس Citrococcus تظهر مستعمراتها بلون اصفر وذات سطح خشن ومجعد على وسط اكـار الـدم ولكنها قد تفقد هذه الصفة عند تكرار الزرع وبذلك تشبه جنس الـ Micrococcus لذا تحتاج لدراسات علـى مستوى جزيئي لتشخيصها (Kezeli *et al*., 2009) اوجدت دراسة الباحث Dastager وجماعته عـام 2010 اعتمادا على تسلسلات الـ 16srRNA لإيجاد العلاقة بين سلالات Micrococcus وCitrococcus تعنقـدها عند مستوى تشابه 87% ضمن المخطط الشجري وفي دراستنا تعنقدت عند مستوى تشابه 85%.

العنقود الثـانوي B5: ضم عزلة واحدة تعود لجنس *Citrococcus* spp. وهو مشابه للعنقـود الثـانوي B2 وظهرت في عنقودين مختلفين وذلك للاختلاف في بعض الصفات حيث إنها تتميز بكونهـا تحلـل الالنـين والارجنين والميثيونين وتنمو على وسط الايوسين ولها القدرة على استهلاك تليورايت البوتاسيوم وقد يكونان نوعين مختلفين.

العنقود الثانوي C5: ضم أفراد تعود للنوع *K.rhizophila* ذات مستعمرات كبيرة مرتفعة، صفراء فاتحـة، سالبة للاوكسديز وموجبة للكتاليز وتنمو على وسط الثايوكلايكوليت، ولا تنتج إنـزيم اللايبيـز والاـسيثينيز والبروتيز، سالبة لاختزال النترات واليوريز ولا تحلل الاسكولين وتحلل النشا لا تنتج حـامض مـن سـكر الكلوكوز والمانوز والكليسيرول والسكروز والكلاكتوز.

العنقود الثانوي C6: ضم أفراد النوع *K.varians* والمتميزة بأن خلاياه صغيرة الحجـم تتواجـد بـشكل ثنائيات و رباعيات لا تتواجد بشكل ثمانيات مستعمراتها صغيرة الحجم مسطحة ملساء جميع أفراده لها القدرة على تحليل الاسكولين، متغايرة بألوانها من صفراء غامقة إلى حليبي مصفر(Reddy *et al.*, 2003) وسـالبة للاوكسديز وموجبة للكتاليز (Li *et al.*, 2006).

العنقود الثانوي C7: ضم أفراد النوع *M.antarcticus* والمتميزة بكون خلاياه صغيرة الحجم تترتب بشكل ثنائيات ورباعيات ولا تتواجد بشكل ثمانيات، مستعمراتها صغيرة الحجم صفراء او كريميه لزجة مـسطحة ولا تنمو على وسط الثايوكلايكوليت وتنمو على وسط الايوسين وبوجود 15.5% ملح الطعام كما موضح في الصورة (1) وبذلك تميزت عن الانواع التابعة الى جنس Kocuria والتي تنمو بتركيز 7.5% ملح الطعـام ولا تستطيع النمو بتركيز 15.5% ملح الطعام وان الانواع التي تستطيع النمو بهذا التركيز تفقد الوانها وتميل للون الاصفر الفاتح والابيض كما موضح في الصورة (2)، موجبة للاوكسديز والكتاليز، ليس لها القدرة على إنتاج أنزيم اللايبيز واللسيثينيز والبروتيز، موجبة لاختزال النترات وسالبة لليـوريز ولا تحلـل الاسـكولين وتحلل النشا، لا تنتج حامض من سكر الارابينوز والمانيتول والكلوكوز واللاكتوز والمـانوز والكليـسيرول (Qudiz *et al.*, 2004).

العنقود الرئيس D: ضم افراد النوع *K.kristinae* خلايا صغيرة ومتوسطة الحجم وفيها عـزلات ترتبـت بشكل ثماني، مستعمراتها صغيرة ونصفها كبيرة الحجم ملساء بلـون حليبـي مبـيض أو حليبـي مـصفر (Savini*et al.*, 2010) جميع عزلاتها موجبة لاختبار CAMP كذلك تتميز بكونها موجبة لاختبار الاوكسديز والكتاليز وقد أظهرت تشابهاً كبيراً في الصفات مع بقية أفراد جنس Micrococcus حيث انها تمتلك عزلات تنتج إنزيم البروتيز ولا تنتج أنزيم اللسيثينيز واللايبيز سالبة لاختزال النترات وموجبة لإنتاج انزيم اليـوريز ولا تنتج حامض من المانيتول والدكسترين والزايلوز (Winn *et al.*, 2006) ولا تستهلك الستريت والمالونيت لا تنمو على وسط سيانيد البوتاسيوم وتنمو على وسط الماكونكي والايوسين، تستهلك تليورايـت البوتاسـيوم ولوحظ ظهور النوع ضمن عناقيد الجنس Micrococcus وذلك سبب التشابه الكبير بالصفات وقد كانت سابقا

تعود إلى جنس الـ Micrococcus لكن حديثا صنفت بالاعتماد على نسبة CG و 16srRNA ونقلـت إلـى أفراد جنس الـ Kocuria (Young *et al*., 2010).

العنقود الرئيس E: ضم أفراد النوع *M.endophyticus* مستعمراتها متباينة الحجم بين الصغيرة والمتوسطة ملساء صفراء اللون مرتفعة وبعض عزلاتها تكون مستعمراتها مـسطحة ولا تـستهلك الـسترات، موجبـة للاوكسيديز والكتاليز وقد أظهرت دراستنا أن أفراد هذا النوع لا تستطيع إنتاج إنـزيم اللايبيـز واللاسيثينيز والبروتيـــز، موجبـــة لاختـــزال النتـــرات ســـالبة لليـــوريز ولا تحلـــل الاســـكولين والنـــشا (Koch and Stackebrandt, 1995).

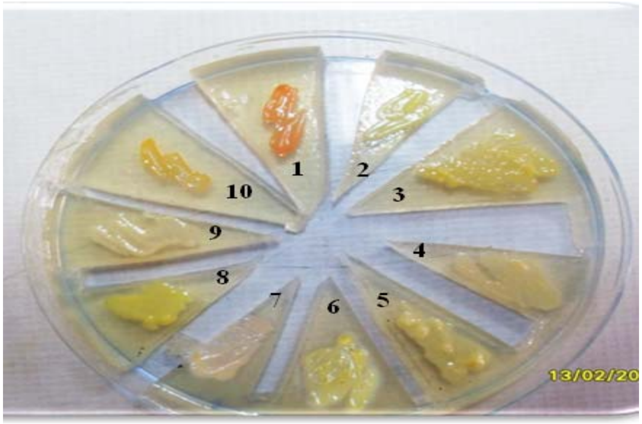
العنقود الرئيس F: عزلت إفراد النوع *M.lylae* من الانسان والبيئة (Kovacs *et al*., 1999) رغم صـعوبة تفريق افراد النوع *M.lylae* عن افراد النوع *M.luteus* اعتماداً على الاختبارات التشخيصية المعتمدة بـسبب التشابه الكبير بين أفراد النوعين فيما عدا ألوان المستعمرات حيث تظهر مستعمرات النوع *M.luteus* بلون اصفر أما *M.lylae* بلون ابيض (Winn *et al*., 2006) أما من خلال دراستنا فقد ظهرت مستعمراته بلـون حليبي مصفر إلى حليبي مبيض كذلك اختلفت بصفاتها الانزيمية وفي دراستنا انفصلت في عنقـود منفـصل تماماً، ان انفصال العنقود الرئيس F الذي يضم إفراد النوع *M.lylae* عن العناقيد الثانويـة A, B1, B3, B4, C1, C2, C3, C4 والتي تضم إفراد النوع *M.luteus* يعود الى الاختلافات ببعض الصفات منها عدم قدرتها على إنتاج أنزيم اللايبيز واللسيثينيز والبروتيز لاتستهلك الارجنين والسيرين وهذه صفات قطعية لتميز النوع عن الأنواع الأخرى، لا تنتج حامض من جميع السكريات قيد الدراسة عدا عزلات قليلة جدا تنتج حامض من الكلوكوز والفركتوز والسالسين، تنمو بوجود سيانيد البوتاسيوم، لا تنمو بوجود مادة تليورايـت البوتاسـيوم وتنمو في 15.5% ملح الطعام، كما موضح في الجدول (4).

العنقود الرئيس G: ضم أفراد النوع *K.polaris* خلايا صغيرة تترتب بشكل ثنائيات ورباعيات ولا تتواجد بشكل ثمانيات مستعمراته برتقالية لزجة موجبه للاوكسيديز والكتاليز لا تنمو على وسط الايوسين ولا تستهلك الأحماض الامينية قيد الدراسة أكثر الدراسات تظهر أنها لا تتحمل درجة حرارة 30 م وتكون محبة للبـرودة وأشار الباحث Savini وآخرون عام 2010 بأنها تمتلك سلالات تنمو في درجة 5-42 م وهـذا يتفـق مـع دراستنا حيث أنها تتشابه في أغلب صفاتها مع جنس الـ Micrococcus ولاسيما النوع *M.antarcticus* من ناحية شكل المستعمرات ولكنها اختلفت بأنها تمتلك القدرة على اختزال النترات وإنتاج أنزيم البروتيز ولاتنتج أنزيم اللسيثينيز واللايبيز سالبة لتحلل النشا والاسكولين واليوريز لا تنتج حامض من جميع الـسكريات ، ولا تستهلك الأحماض الامينية قيد الدراسة ولا تتحمل النمو في 7.5% ملح الطعام، تنمو على وسط المـاكونكي ولاتنمو على وسط الايوسين و تستهلك تليورايت البوتاسيوم، ولا تستهلك المالونيت.

إن توزيع جنس Kocuria في عناقيد ثانوية ضمن عناقيد جنس Micrococcus وقريبة منها مطابق لما أشار إليه Tang و Gillevet عام 2003 باستخدام تقنيات التصنيف الكيميائي والتصنيف المظهري والتقنيات

الجزيئية والوراثية حيث حصل على مخطط شجري هرمي يضع أفراد جـنس Micrococcus فـي عنقـود منفصل ومجاور لعنقود جنس Kocuria وهذا ما ظهر أيضاً في دراسة الباحـث Becker وآخـرون عـام 2002 اعتماداً على نتائج 16sr DNA وتركيب ألأحماض الدهنية وغيرها من الطرق الجزيئيـة والكيميائيـة وحصل على مخطط شجري يضع أفراد جنس Kocuria في عنقود مجاور لإفراد جنس Micrococcus.

في ما يلي مخطط تشخيصي لتميز الاجناس والأنواع المعزولة اعتمادا على نتائج الدراسة كما موضح فـي الشكل (2).



الصورة 1: قدرة الانواع المعزولة قيد الدراسة على النمو بتركيز 7.5% ملح الطعام

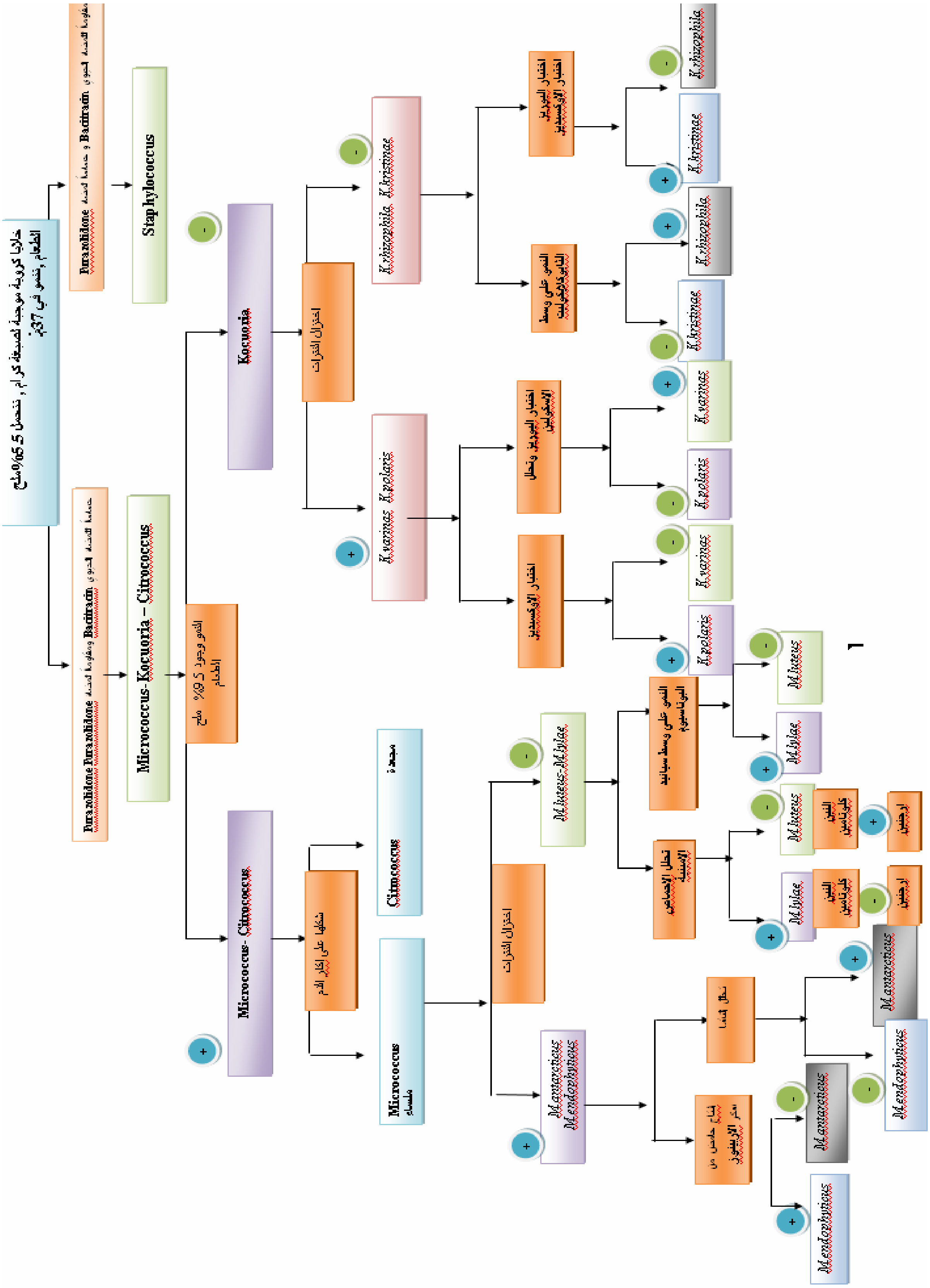
M.antarcticus **-5*****K.kristinae*** **- 4*****K.varians*** **-3*****K.rhizophila*** **- 2*****K.polaris*** **-1**

Citrococcus **spp. -10** ***M.luteus*** **- 9*****M.endophyticus*** **-8*****M.lylae*** **-7*****M.luteus*** **- 6**

الصورة 2: عدم قدرة افراد جنس Kocuria على النمو في 15.5% ملح الطعام، فقدان الوان المستعمرات كلما زاد تركيز ملح الطعام

M.antarcticus **- 5** ***K.kristinae*** **- 4** ***K.varians*** **- 3** ***K.rhizophila*** **- 2*****K.polaris*** **-1**

Citrococcus **spp. -10** ***M.luteus*** **-9*****M.endophyticus*** **-8*****M.lylae*** **- 7*****M.luteus*** **-6**



الشكل 2: مخطط تشخيصي للأنواع المعزولة قيد الدراسة

فصل الأحماض الدهنية بجهاز الكروماتوكرافيا الغاز- السائل (GLC)

انتخبت 12 عزلة ممثلة لأغلب العناقيد ضمن المخطط الشجري والمشخصة على مستوى النـوع وتـم إجراء تحليل دهون الغشاء مقارنة بالدهون القياسية حيث أظهرت 3 عزلات للنوع *M.luteus* المأخوذة مـن عناقيد مختلفة نفس الأحماض الدهنية مع اختلاف في التركيز كما موضح في الجدول (5) والذي قد يعود إلى أنها سلالات مختلفة للنوع نفسه وذلك لأن الأحماض الدهنية تستخدم بنجاح في تصنيف وتشخيص البكتريـا على مستوى الجنس والنوع وتحت النوع (Giacomini *et al.*, 2005) لأنها صفة وراثية مستقرة ومحفوظـة بشكل كبير ضمن المجموعة التصنيفية الواحدة (Bertone *et al*., 1996). حيث اختلف النوع *Citrococcu*s spp. عن النوعين *M.luteus*, *M.antarcticus* بغياب الحامض الدهني Oleic acid وامتلاكهـا الحـامض الدهني Capric وعن *M.lylae* بوجود الحامض الدهني Caprilic وأخذ من العنقود F عزلتين تابعة للنـوع *M.lylae* ولوحظ أنها تمتلك الأحماض الدهنية Heptanoic و Palmatic و Lenoleic و Butyric وبـذلك تختلف عن *M.luteus* بغياب Oleic وعن الـ *M.antaracticus* و *M.endophyticus* بغياب الـ Capric ووجود الـ Lenoleic بذلك فان تحليل الأحماض الدهنية ميز بين النوعين *M.luteus* و *M.lylae* حيـث أن المصادر المعتمدة في التشخيص لا تميز بين هذين النوعين إلا بألوان المستعمرات ولكن من خـلال إجـراء التحليل العددي للعزلات وقع هذان النوعان في عنقودين منفصلين على الرغم من أنهـا تتـشابه بالـصفات التشخيصية الأساسية (Welch, 1991). أخيراً أخذ من العنقود G عزلة تعود للنوع *K.polaris* لوحظ أنهـا تمتلك الأحماض الدهنية Capric و Heptanoic و Palmatic و Lenoleic و Oleic بذلك تم التمييـز بـين الانواع وكذلك تأكيد تشخيص التداخل ضمن العناقيد (Durham and Kloos, 1978).

كذلك أسهم تحليل الدهون بتأكيد الاختلافات بين جنس Staphylococcus و جنس Micrococcus بعدم امتلاك الأخير للحامضين الدهنيين Valeric acid و Stearic acid واللذان لم يظهرا في كل العينـات قيـد الدراسة مع وجودهما ضمن الأحماض الدهنية القياسية بذلك فأن تحليل الحامض الدهني الخلـوي للبكتريـا باسـتخدام هـذه التقنيـة يكـون مفيـد جـداً للتـشخيص الـدقيق للكـائن الممـرض (Welch, 1991; Athalye *et al*., 1985)

الجدول 5: نوع الأحماض الدهنية وتركيزها في العزلات المنتخبة

ت	نوع العزلة	رقم العزلة	رمز العنقود	نوع الحامض الدهني	زمن احتباس العينة	زمن احتباس الحامض الدهني القياسي	تركيز الحامض الدهني في العينة
1	*M.luteus*	55	A	Heptanoic acid	7.837	7.58	0.0789
				Palmitic acid	11.995	11.24	0.068
				Linoleic acid	12.49	12.64	0.1557
				Oleic acid	12.725	12.78	0.0341
				Butyric acid	15.85	15.75	0.1532
2	*Citrococcus* spp.	72	B2	Capric acid	5.467	5.49	0.0037
				Heptanoic acid	7.796	7.58	0.0081
				Palmitic acid	11.44	11.24	0.0031
				Linoleic acid	12.49	12.64	0.0025
				Butyric acid	15.78	15.75	0.0078
3	*M.luteus*	71	B3	Heptanoic acid	7.46	7.58	0.0008
				Palmitic acid	11.508	11.24	0.0026
				Linoleic acid	12.608	12.64	0.0007
				Oleic acid	12.944	12.78	0.0077
				Butyric acid	15.94	15.75	0.0035
4	*M.luteus*	112	C2	Heptanoic acid	7.19	7.58	0.0036
				Palmitic acid	11.42	11.24	0.0023
				Linoleic acid	12.53	12.64	0.0043
				Oleic acid	12.384	12.78	0.0056
				Butyric acid	15.95	15.75	0.0043
5	*K.rhizophila*	95	C5	Capric acid	5.54	5.49	0.0076
				Heptanoic acid	7.788	7.58	0.0023
				Palmitic acid	11.47	11.24	0.0045
				Linoleic acid	12.47	12.64	0.0062
				Oleic acid	12.942	12.78	0.0026
				Butyric acid	15.502	15.75	0.1278
6	*K.varians*	101	C6	Heptanoic acid	7.367	7.58	0.0002
				Palmitic acid	11.467	11.24	0.0016
				Linoleic acid	12.525	12.64	0.0045
7	*M.antarcticus*	46	C7	Capric acid	5.55	5.49	0.001
				Heptanoic acid	7.608	7.58	0.0006
				Palmitic acid	11.96	11.24	0.0014
				Butyric acid	15.768	15.75	0.0051
8	*K.kristinae*	114	D	Heptanoic acid	7.65	7.58	0.001
				Palmitic acid	11.34	11.24	0.0006
				Linoleic acid	12.58	12.64	0.0012
				Oleic acid	12.85	15.75	0.002
9	*M.endophyticus*	77	E	Capric acid	5.83	5.49	0.0031
				Heptanoic acid	7.87	7.58	0.0022
				Palmitic acid	11.96	11.24	0.0028
10	*M. lylae*	92	F	Heptanoic acid	7.763	7.58	0.0095
				Palmitic acid	11.443	11.24	0.0024
				Linoleic acid	12.4	12.64	0.0034
				Butyric acid	15.6	15.75	0.0001
11	*M.lylae*	66	F	Heptanoic acid	7.49	7.58	0.0011
				Palmitic acid	11.55	11.24	0.0066
				Linoleic acid	12.63	12.64	0.007
				Butyric acid	15.81	15.75	0.0075
12	*K.polaris*	16	G	Capric acid	5.03	5.49	0.0002
				Heptanoic acid	7.73	7.58	0.0005
				Palmitic acid	11.35	11.24	0.0002
				Linoleic acid	12.53	12.64	0.0013
				Oleic acid	12.90	12.78	0.0035

المصادر العربية

السماك، إسراء غانم (2006). دراسة تصنيفية لمجموعة البكتريا الخيطيـة. أطروحـة دكتـوراه، جامعـة الموصل، الموصل، العراق.

المصادر الأجنبية

Athalye, M.; Noble, W.C.; Minnikin, D.E. (1985). Analysis of cellular fatty acids by gas chromatography as a tool in the identification of medically important coryneform bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, **58**, 507-512.

Atlas, R.M. (1995). " Principles of Microbiology". Von Hoffmann press, Mosby-year book. Inc. U.S.A., pp. 664-685.

Atlas, R.M.; Parks, L.C.; Brown, A.E. (1995)." Laboratory Manual of Experimental Microbiology". Mosby-year book, Inc. U. S. A., pp. 94-198.

Austin, B.; Priest, F. (1986). "Modern Bacterial Taxonomy". Billing and Sons Ltd. Worcstor U. K., pp.14-48.

Becker, K.; Schumann, P.; Wulenweber, J.; Schulte, M.; Weil, H.P.; Stackebrandt, E.; Peters, G.; Von Eiff, C. (2002). *Kytococcus schroeler*. sp. nov., anovel gram-positive actinobacterium isolated from ahuman clinical source. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 1609-1614.

Bertone, S.; Giacomini, M.; Ruggiero, C.; Piccarolo, C.; Calegari, L. (1996). Automated systems for identification of heterotrophic marine bacteria on the basis of their fatty acid composition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2122-2132.

Boudewijns, M.; Vandeven, J.; Verhaegen, J.2+(2005). Vitek 2 antomated identification system and *Kocuria kristinae*. *J. Clin. Microbiol.*, **11**, 5832.

Brooks, J.B.; Daneshvar, M.I.; Haberberger, R.L.; Mikhail, I.A. (1990). Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by frequency-pulsed electron-capture gas-liquid chromatography detection of carboxylic acids in cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 989-997.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P.; Simmons, A. (1996). "Mackie and McCarthey Practical Medical Microbiology". 14th ed. Longman Singapore Publishers, Ltd. Singapore., pp. 343-359.

Collins, M.D.; Huston, R.A.; Baverud, V.; Falsen, E. (2000). Characterization of a Rothia – like organism from a mouse: description of *Rothia nasimurium* sp. nov. and reclassification of *Stomatococcus mucilaginosus* as *Rothia mucilaginosa* combi., nov. *Int . J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**,1247-1251.

Cowan, S.T. (1977). " Cowan and Steels Manual for Identification of Medical Bacteria". 2nd ed. Cambridge University Press. Cambridge, London., pp. 57-67.

Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmon, B.A.; Swan, R.H. (1974)." Medical Microbiology". Churchill Livingston, London, pp. 176-177.

Dastager, S.G.; Deepa, C.K.; Pandey, A. (2010). Promoting *Micrococcus* sp. N11-0909 and its interaction with cowpea. Author version: *Plant physiol. Biochem.*, **48**(12), 987-992.

Durham, D.R.; Kloos, W.E. (1978). Comparative study of the total cellular fatty acids of Staphylococcus species of human origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**, 223-228.

Emtiazi, G.; Shakarami, H.; Nahvi, I.; Mirdamadian, S.H. (2005). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* spp. and transformed *Escherichia coli*. *African. J. Biotech*., **4**(2), 172-176.

Frei, J.; Heuck, C.C.; Risen, W.; Mang, H.; Hill, P.G.; Nageh, M.M.; Poller, L. (1995). " Production of Basic Diagnostic Laboratory Reagent" . WHO, Egypt. pp. 1-280.

Giacomini, M.; Bertone, S.; Canevasoumetz, F.; Ruggiero, C. (2005). An Advanced approach based on artificial neural networks to identify environmental bacteria. *Int. J. Computational Intelligence,* **1**, 2.

Harley, J.P.; Prescott, L.M. (1996). " Microbiology". 3rd ed., McGraw Hill Companies, U.S.A. 141 p.

Holt, J.G.; Krig, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Willium, S.T. (1994). " Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology". 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore., pp. 605-703.

Jeffries, L. (1969). Menaquinone in the classification of Micrococcaceae with observation on the application of lysozyme and novobiocin sensitivity tests. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **19**, 183-187.

Jones, J.; Hoerle, D.; Stethscope, R. (1995). Apotential vector of infection. *Ann. Emerg. Med*., **26**, 296-299.

Kaprelyants, A.S.; Mukamolova, G.V.; Kell, D.B. (1994) Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin lysis and by resuscitation in cell-free spent medium at high dilution. *FEMS. Microbiol. Lett*., **115**, 347-352.

Kezeli, C.; Larussa, J.; Benderm, J.; Schellenberg, K.; Burger, N.; Rigney, D.; Jones, D.; Wilson, H. (2009). Characterization of eight gram-positive, yellow-pigment bacteria with a description of *Citrococcus barcroftii* spp. nov. from the white mountains .NS ASM Spring.

Kloos, W.E.; Ballard, D.N.; George, C.G.; Webster, J.A.; Hubner, R.J.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; Fiedler, F.; Schubert, K. (1998a). Delimiting the genus Staphylococcus through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equipercicus* sp. nov., and *Macrococcus bovicus* sp. no. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*., **48**, 859–877.

Koch, C.; Stackebrandt, E. (1995). Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali – cohen 1889) to Arthrobacter as *Arthrobacter agilis*. *Int. J. Syst. Bacteriol*., **45**, 837- 839.

Kocure, M.; Kloos, W.E.; Schleifer, K.H. (2006). The Micrococcus. *Prokaryotes*., **3**, 691-971.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Jr, W.C.W. (1997). " Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology". 5th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia., pp. 121-1395.

Kovacs, G.; Burghardt, J.; Pradella, S.; Schumsnn, P.; Strackebrandt, E.; Marialigeti, K. (1999). *Kocuria plustris* spp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (Typha an-gustifolia)., *Int. J. Syst. Bacteriol*., **49**,167-173.

Lambert, M.; Moss, C.W. (1983). Comparison of the effects of acid and base hydrolysis on hydroxy and cyclopropane fatty acids in bacteria. *J. Clin. Microbiol*., **18**,1370-1377.

Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J.; Shadomy, H.J. (1985)." Manual of Clinical Microbiology". 4th ed. American Society for Microbiology. Washington., pp. 1004-1083.

Li, W.J.; Zhan, Y.Q.; Schnmann, P.; Chen, H.H.; Hozzein, W.N.; Tian, X.P.; Xu, L.H.; Jiang, C.L. (2006). *Kocuria aegyptia* sp. nov. anovel actinobacterium isolated from a saline, alkaline desert soil in Egypt. *Int. Syst. Evol. Microbiol*.,**56**,733-737.

Liu, H.; Xu, Y.; Ma, Y.; Zhou, P. (2000). Characterization of *Micrococcus antarcticus* spp. nov., from antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., **50**, 715-719.

Macfaddin, J.F. (1985)." Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria". 2nd ed., Williams and Wilkins, Waverly press, Inc. Baltimore, London., pp. 18-85.

Miller, L.T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol*., **16**, 584-586.

Qudiz, R.J.; Widlitz, A.; Backmann, X. J.; Camanga, D.; Alfire, J.; Brundage, B.H.; Barst, R.J. (2004). Micrococcus-associated central venous catheter infection in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*., **126**, 90-94.

Reddy, G.S.; Prakash, J.S.; Prabahar, V.; Matsnmoto, G.I.; Stackebrandt, E.; Shivaji, S. (2003). *Kocuria polaris* sp. nov., an orange – pigment psychrophilic bacterium isolated from an antractive cyanobacterium mat sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., **53**, 183-187.

Santhini, K.; Myla, J.; Sajani, S.; Usharani, G. (2009). Screening of *Micrococcus* spp. from oil contaminated soil with reference to bioremediation. *Botany Research International*., **2**(4), 248-252.

Sasser, M. (1990). Identification of bacteria through fatty acid analysis In Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands," Methods in phytobacteriology". Akademiai Kiado, Budapest. pp.199-204.

Sauer, S.W.; Okun, J.G.; Hoffmann, G.F.; Koelker, S.; Morath, M.A. (2008). Impact of short- medium-chain organic acids, cylcarnitines, and acyl-CoAson mitochondrial energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*., **1777**(10), 1276-82.

Savini, V.; Catavitello, C.; Masciarelli, G.; Astolfi, D.; Balbinot, A.; Bianco A.; Febbo, F.; D`Amario, G.; D` Antonio, D. (2010). Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus Kocuria. *J . Med. Microbiol*., **59**, 1395-1402.

Shaw, N. (1974). Lipid composition as a guide to the classification of bacteria. *Adv. Appl. Microbiol*., **17**, 63-108.

Tang, J.S.; Gillevet, P.M. (2003). Reclassification of ATCC 9341 from *Micrococcus luteus* to *Kocuria rhizophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., **53**, 995-997.

Vandepitte, J.; Verhae, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P.; Heuck, C.C.(2003). " Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology". 2nd ed. World Health Organization Geneva, Switzerland., pp. 20-23.

Webster, G.F.; McGinley, K.J. (1997). Use of Litmus milk agar for presumptive identification of cutaneous Propionibacteria. *J. Clin. Microbiol*., **5**, 661-662.

Welch, D.F.(1991). Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Reviews*.,**4**(4), 422-438

Winn, W.C.; Allen.; S.D.J.; Janda, W.U.; Koneman, E.W.; Procop, G.W.; Schreckenbenberger, P.C.; Woods, G.L. (2006). " Koneman's Color Atlas and Text

Book of Diagnostic Microbiology". 6th ed., Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A. pp. 643-661.

Young, M.; Artsatbanov, V.; Beller, H.R.; Chandra, G.; Chater, K.F.; Dover, L.G.; Greenblatt, C.L. (2010). Genome sequence of the Fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living Actinobacterium. *J. Bacteriol*. **3**(192), 841-860.