التشخيص الجزيئي لعزلات النوع *Streptomyces rochei* ودراسة قدرتها على إنتاج مضادات حيوية ضد عزلات النوعين *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية (*)

م.م. نادية حسين الحيالي أ.د. إسراء غانم السماك

جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

(قدم للنشر في ٢٠١٩/٧/١٨ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/٨/١٨)

ملخص البحث: جمعت 50 عينة تربة ملوثة وغير ملوثة بالهيدروكاربونات ، عزلت منها 6 عزلات تابعة للنوع *Streptomyces rochei* وبنسبة 8% من الترب الملوثة و 6% من الترب غير الملوثة بالهيدروكاربونات ، شخصت العزلات أعتماداً على دراسة تتابع 16s rDNA بالمقارنة مع العزلات القياسية ضمن موقع المركز الوطني لمعلومات التقانات الحياتية NCBI ، أخذت 28 مسحة من حالات الجروح عزل منها النوع *Staphylococcus aureus* وبنسبة 35.7% وكذلك النوع *Pseudomonas aeruginosa* وبنسبة 100% من عدد 2 من حالات الحروق .

الكلمات المفتاحية : *Streptomyces rochei* ، 16s rDNA ، المضادات الحيوية.

Molecular Diagnosis of *Streptomyces rochei* Isolates and Study their Ability to Produce Antibiotics Against Multidrug Resistance *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract: Fifty soil samples were collected from contaminated and non-polluted with hydrocarbons.Six isolates belongs to *Streptomyces rochei* were were diagnosed, Eight percent of polluted soil and 6% from unpolluted soil. Isolates were diagnosed depending on the study of 16s rDNA compared to standerd isolates within the National Center Biotechnology Information site. 28 smears of wounds were isolated includ *Staphylococcus aureus* with (35.7%) and *Pseudomonas aeruginosa* (100%) of a 2 cases of burns.

(*)مستل من اطروحة الدكتوراه الموسومة بـ(انتاج المواد الحيوية الفعالة سطحيا من انواع تابعة لجنس *Streptomyces* المعزولة من الترب الملوثة بالهيدروكاربونات) للطالبة نادية حسين الحيالي، باشراف د. اسراء غانم السماك.

المقدمة

جنس Streptomyces يمثل الجنس الاكبر ضمن البكتريا الخيطية والجنس النموذجي لعائلة Streptomycetaceae (Hong *et al*.,2009) يتميز افراده بكونها بكتريا خيطية موجبة لصبغة كرام، هوائية، غير مقاومة للحامض، متغايرة التغذية، لها القدرة على النمو في بيئات مختلفة، موجبة للكتاليز، تختزل النترات الى نتريت وتحلل الادنين ،الاسكيولين والكازائين والنشا(Smaoui *et al*.,2011)، مكونة للسبورات المتكونة من تجزأ الخيوط حيث ينقسم الخيط بمستوى واحد ليشكل سلاسل من السبورات غير المتحركة من (3-50) سبور مع سطح املس او شوكي او خيوط تشبه الشعر (Maleki *et al*.,2013; Dehnad *et al*.,2010; Prescot *et al*.,2005). الجدار الخلوي يحتوي على الببتيدوكلايكان مع كميات كبيرة من حامض L-DAP ولا يحتوي على حامض المايكولك Holt *et al*.,1994)). تتميز بقابليتها على انتاج رائحة مميزة تشبه رائحة الارض الرطبة وذلك لانتاجها مركبات طيارة تدعى geosmin (Jüttner and Watson,2007) . تنتج العديد من الصبغات المسوولة عن اعطاء لون للغزل الارضي والهوائي (Flärdh and Buttner,2009).تم تميز اكثر من 500 نوع تابع لهذا الجنس واكثر من 3000 سلالة مما ادى الى أرباك المصنفين في ايجاد جداول تشخيصية لها Schrader (and Blevins,2001) .جنس Streptomyces معروف بكونه مصدر غني للمضادات الحيوية حيث تشكل 75% من المضادات المنتجة طبيعياً في العالم Mohanraj and Sekar,2013)).

النوع *Streptomyces rochei* ، عزل لاول مرة من التربة في روسيا، له القدرة على أنتاج العديد من مركبات الايض الثانوية منها borrelidin ، butyrolactat A ، butyrolactat B ، uricase ومضاد Streptothricin، يتميز هذا النوع بفعالية مضادة للفطريات المؤذية للنباتات منها فطر Fusarium وAlternaria (EL-Hussein *et al*., 2014) . محب للحرارة المتوسطة ،البيئة القاعدية ومتحمل للملوحة بدرجة متوسطة ، موجب

لاختزال النترات ،أستهلاك السترات ،الكتاليز و تحليل الجلاتين ، يتميز بفعاليته المضادة للبكتريا الموجبة والسالبة والفطريات (Reddy *et al*., 2011). يتميز النوع بقابليته على إنتاج المضاد الحيوي Streptothricin (Anukool *et al*.,2004).

المواد وطرائق العمل:

جمعت العينات لعزل أفراد جنس Streptomyces: جمعت 50 عينة من ترب لمناطق مختلفة ومتباعدة والتي شملت ترب ملوثة بالمخلفات الصناعية منها ترب مناطق المولدات الاهلية وترب مصافي النفط في القيارة وترب غير ملوثة والتي شملت ترب حدائق عامة ومنزلية ، وعلى عمق حوالي (2-5) سم. حضرت تخافيف من هذه العينات بأخذ 1غم تربة /9 سم^3 ماء مقطر معقم ، مزجت بجهاز الخلط (vortex-mixed) لمدة 100 ثانية للحصول على أعداد الخلايا /سم^3 ثم إجراء تخافيف عشرية متتالية وصولاً الى التخفيف (10^{-4}) . ثم أخذ (1) سم^3 من التخفيف 10^{-3} ،10^{-4} ووزعت بطريقة الصب على وسط Starch Casein Agar ، حضنت الاطباق لمدة 7-10 أيام وفي درجة حرارة 37 م^o وفي ظروف هوائية (Gebreyohannes *et al*., 2013).

العينات المرضية لعزل الجنسين Staphylococcus و Pseudomonas

شملت العينات المأخوذة من الأنسان على مسحات من الجلد للمصابين بالحروق والجروح.

تم أخذ 30 مسحة من الجلد للمصابين بالحروق والجروح بأستخدام ماسحة قطنية وضعت في الوسط الناقل pepton water المضاف له 6 % من كلوريد الصوديوم ثم زرعت العينات على وسط الأكار المغذي لعزل Pseudomonas و أكار ملح المانتول Manitol Salt Agar لعزل Staphylococcus و Oxacillin Resistance Screening Agar Base (ORSAB) لعزل Staphylococcus المقاومة للمثيسيلين وحضنت الاطباق في ظروف هوائية وفي درجة حرارة 37م^o ولمدة 24 ساعة.

الصفات المظهرية لبكتريا Streptomyces

تم دراسة الصفات المظهرية والكيمو حيوية لبكتريا الستربتومايسس بالاعتماد على :-

Wiliams ; Locci ,1989; Holt *et al*.,1994) Lechevalier and ; *et al*.,1989 (Kutzner, 1981 ; Lechevalier,1981،)

الصفات الشكلية: أستخدمت الاوساط (وسط الأكار المغذي ، وسط أكار النشا–كازائين ، وسط الستربتومايسس أكار) حضر مكررين من كل وسط زرعي لكل عينة ، ثم زرعت هذه الاطباق بأستخدام عروة معدنية معقمة ، حضنت جميع الاطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 7-14 يوم بعدها تم تحديد الصفات المظهرية المتمثلة بشكل ولون المستعمرة،والصبغات الذائبة الخارجية وإنتاج الرائحة

- لتحديد شكل الغزل الهوائي والارضي تم التنمية بأستخدام الزرع على الشريحة.

- تقنية الزرع على الشريحة Slide culture Technique

- أجري لملاحظة شكل كل من الغزل الهوائي والارضي للبكتريا الخيطية Streptomyces

- 1- أخذت قطعة مربعة بمساحة (1) سم3 او مستطيلة، بسمك (1-2) ملمتر من أكار النشا والكازائين SCA المعقم والمصبوب في الاطباق ، ووضعت بطريقة معقمة على سطح شريحة زجاجية معقمة داخل طبق فارغ معقم.

- 2-لقحت قطعة الأكار من الطرفين المتقابلين بطريقة الوخز.

- 3- وضع فوقها غطاء الشريحة النظيفة والمعقم.

- 4- حضنت الشريحة الحاوية على قطعة الأكار الملقحة في الطبق المعقم،ورطب بأضافة ماء الى أسفل الطبق ورفعت الشريحة، حضنت مزرعة الشريحة في درجة حرارة (37) م° لمدة (7-10) أيام.

- 5- فحصت الشريحة بالمجهر الضوئي بالعدسة الصغرى بقوة (X4) ومن ثم (X10) و X40 (Holt *et al*., 1994) ; (Collins,*et al*., 1988).

الاختبارات الكيموحيوية والفسلجية لجنس الستربتومايسس:

أجريت الاختبارات التالية :–

تحليل النشا، أستهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون ،أستهلاك الكاربوهيدرات باستخدام وسط أكار الفينول الاساس ،

الكشف عن أنزيم الكتاليز ، إنتاج أنزيم اللسيثينيز Lecethinase والأنزيم المحلل للبروتينات Protenase والانزيم المحلل للدهون Lipase ،الكشف عن تحليل النشا ، تحليل التايروسين والكشف عن أنزيم اليوريز(Macfaddin,1985 ; Fingold and Martin,1982).

التشخيص الجزيئي الخاص ببكتريا *Streptomyces rochei* و *Staphylococcus aureus*

عزل الدنا البكتيري بأستخدام ثلاث طرق

1-عزل الدنا البكتيري بأستخدام DNA Extraction Kit المجهز من شركة Promega

2- عزل الدنا البكتيري بأستخدام طريقة Colony PCR المحورة:

1- تم أخذ مستعمرة فتية وأضافتها الى eppendrof tube معقمة تحتوي على 50 مايكروليتر من ماء مقطر غير مؤين معقم.

2- حضنت في درجة حرارة 30م لمدة 3 دقائق.

3- وضعت الانبوبة في المبلمر الحراري المتسلسل Thermal cycler في درجة حرارة 95 م لمدة 15 دقيقة.

4-أجري طرد مركزي بسرعة 13000 دورة/ دقيقة وفي درجة حرارة 4 م ولمدة 15 دقيقة .

5- أهمل الراسب وجمع الراشح (Bodour *et al.*,2003).

3- عزل الدنا البكتيري بأستخدام المايكروويف Microwave method

1- بوساطة عروة معقمة تم أخذ حملة من المستعمرة البكتيرية ونقل الى أنبوبة eppendrof tube معقمة تحتوي على 50 مايكروليتر من Tris-EDTA buffer.

2- وضعت العينات لمدة 50 ثانية في فرن المايكروويف وعلى اعلى درجة حرارة full power.

3- تركت العينة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ومن ثم أجري طرد مركزي بسرعة 10000 دورة /دقيقة وفي درجة حرارة 4 م ولمدة 5 دقائق.

4-نقلت الطبقة المائية الحاوية على الدنا المستخلص الى أنبوبة نظيفة ومن ثم تم حفظها الى حين الاستخدام في درجة حرارة 20- م (Cotârlet *et al*.,2010).

عدة عمل ال PCR للتحري عن مورث 16s rDNA

1- البوادئ

للتحري عن موروث 16s rDNA استخدم في هذه الدراسة بوادئ عامة Universal Primers والمجهزة من شركة Promega بهيئة مجفدة Lophilized form ، ولتحضير محلول العمل تم إذابة البادئ في ماء مقطر معقم لنحصل على تركيز 10 بيكومول/ ميكروليتر. البادئ المستخدم في هذه الدراسة موضح في الجدول الأتي:

الجدول (1) تسلسل البادئ المستخدم في هذه الدراسة

المصدر	حجم الناتج bp	البادئ	5′→3′	أسم المورث المستخدم
(Cotârlet *et al*.,2010)	1350	27 Upstream	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16s rDNA
(Lane,1991)		1392 Downstream	GACGGGCGGTGTGTAC	

2- محلول Green Master Mix

المحلول مجهز من شركة Promega بتركيز 2x والمكون من : المحلول المنظم لعمل أنزيم البلمرة PCR buffer والنيوكليوتيدات منقوصة الاوكسجين dNTPs وأنزيم بلمرة الدنا Taq DNA polymerase.

3- الدليل الحجمي DNA ladder 100bp

المحلول مجهز من شركةPromega وهو دليل قياسي من الدنا مقطع الى 11 قطعة ذات أوزان جزيئية معلومة تتراوح بين (100-1500) زوج قاعدي.

4- صبغة التحميل Blue/Orange 6X

الصبغة مجهزة كمحلول خزين Stock solution من شركة Promega تستخدم لتحميل عينات الدنا على هلام الأكاروز.

5- Nuclease Free Water

ماء مقطر معقم مجهز من شركة Promega يستخدم لإذابة البوادئ ولأضافته الى مزيج التفاعل.

العدة المستخدمة في الهجرة الكهربائية للدنا على الهلام

الهجرة الكهربائية للدنا في هلام الأكاروز:

1- المحلول الدارئ TBE buffer 10X

حضر المحلول بأضافة	غم/سم^3
Tris-base	10.8 غم
Boric acid	5.5 غم
Na_2EDTA	7.44 غم
D.W	70سم^3

ضبط الأس الهيدروجيني عند 7.8 بعدها كمل الحجم الى 100 سم^3 بالماء المقطر لنحصل على التركيز 10X.

2- المحلول الدارئ TBE buffer 1X

لتحضير المحلول الدارئ 1X أخذ 10 سم^3 من TBE buffer 10X وأضيف الى 90 سم^3 من الماء المقطر.

3- دارئ التحميل Loading buffer

الدارئ مجهز كمحلول خزين Stock solution من شركة Promiga والمتمثل بصبغة Blue/ Orange بقوة 6X إذ تحتوي هذه الصبغة على صبغة Bromophenol blue بتركيز 0.03% ومادة Xylene cyanol FF بتركيز 0.03% وصبغة Orange G بتركيز 0.4% ، 10 ملي مولر من Tris-HCL (pH 7.5) و 50 ملي مولر من مادة EDTA .

4 – محلول صبغة Diamond ™ Nucleic Acid Dye

الصبغة مجهزة كمحلول خزين Stock solution من شركة Promega تستخدم لتصبيغ هلام الأكاروز ، إذ تم أخذ

10 مايكروليتر من الصبغة وأضيفت الى 100 مل من TBE buffer.

2: طريقة الترحيل الكهربائي :

تم الكشف عن الدنا الجيني و ناتج تفاعلات PCR بأستخدام الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis وكما يلي:

1- حضر الأكاروز بتركيز (1%) بأذابة 0.5 غم من الاكاروز في 50 سم^3 من محلول يتكون من 5 سم^3 محلول TBE buffer 10X و 45 سم^3 ماء مقطر ، وذلك للكشف عن الدنا الجيني ، في حين حضر الاكاروز بتركيز (2%) للكشف عن عينات الدنا المتضاعف بأستخدام PCR وتمت الاذابة عن طريق الغليان بأستخدام جهاز التحريك المغناطيسي Magnetic stirrer ثم برد المحلول الى 55م° .

2- تم تركيب قالب الهلام Gel tray ثم وضع المشط comb لصنع الحفر wells المستخدمة لتحميل عينات الدنا .

3- سكب الاكاروز بعناية في القالب مع ملاحظة تجنب تكون فقاعات هوائية أثناء صب الهلام والتي يجب إزالتها إن وجدت بوساطة قضيب زجاجي نظيف وترك الهلام إلى أن يتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة وبعدها رفع المشط بهدوء من الهلام.

4- وضع القالب مع الهلام في الحوض ثم سكب دارئ التحميل TBE buffer 1X في الحوض ، إذ غطى سطح الهلام.

5-أضيف 3 مايكروليتر من دارئ التحميل إلى 5 مايكروليتر من نماذج الدنا ثم حمل بعناية في الحفر.

6- شغل مجهز القدرة Power Supply وضبط عند 50 فولت لمدة 80 دقيقة .

7- تم تصبيغ هلام الأكاروز بغمره بصبغة Diamond ™ Nucleic Acid .

8- فحص الهلام المصبغ في غرفة مظلمة ، وذلك بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه على جهاز الاشعة فوق البنفسجية U.V وصور الهلام بأستخدام كاميرا رقمية .

9- قدر الحجم الجزيئ لقطع الدنا بمقارنة موقع الحزمة وسمكها مع الدليل الحجمي القياسي DNA ladder (Sambrook and Russell,2001).

تفاعلات PCR للتحري عن موروث 16s rDNA

حضر المزيج الرئيسي بحجم (25) مايكروليتر لجميع العينات والذي يحتوي على المكونات التالية، وذلك بمزج (12.5) مايكروليتر من Green Master Mix ، و (1) مايكروليتر من كل بادئ Primers أمامي وخلفي ، و (4) مايكروليتر من DNA template المستخلص بتركيز (50) نانوغرام /مايكروليتر ، و (6.5) مايكروليتر من Nuclease free water في أنبوبة eppendrof tube سعة (0.2) سم^3 ، مزجت مكونات التفاعل جيدا وذلك بعمل تدوير spin لمدة (10) ثواني بجهاز الطرد المركزي المبرد ثم أدخلت الانابيب بعد ذلك في جهاز المبلمر الحراري المتسلسل Thermocycler بحذر وعناية لانجاز التضاعف وبأستعمال البرنامج الأتي :

1 Cycle	94°C	5	Min
	94°C	30	Sec
30 Cycle	55°C	1	Min
	72°C	1	Min
1 Cycle	72°C	5	Min

(Cotârlet *et al*., 2010).

تم الكشف عن الدنا المتضاعف بأخذ (8) مايكروليتر من مزيج التفاعل المتضاعف ووضعه في حفر هلام الاكاروز كما أخذ (5) مايكروليتر من الدليل الحجمي DNA ladder مع مزجه (1) مايكروليتر من صبغة التحميل ووضعه في بداية حفر هلام الاكاروز المحضر بتركيز (2%) ، تم ترحيل العينات بجهاز الترحيل الكهربائي بفولطية (50) لمدة 80 دقيقة ، ومن ثم فحص الهلام بعد تصبيغه بصبغة Diamond ^{TM} Nucleic Acid لمدة 45 دقيقة بأستخدام الأشعة فوق البنفسجية للتحري عن وجود موروث 16s rDNA عند موقع 1350 زوج قاعدي.

تحديد تتابعات القواعد النتروجينية لمورث 16s rDNA

Sequences for 16s rDNA gene

تم أرسال نواتج تضخيم ال PCR مع البادئ الامامي والخلفي الى مختبر وهج الدنا في محافظة بغداد ومن ثم الى مختبر Microgene في كوريا حيث جرى تحديد تتابعات القواعد النيتروجية للمورث 16s rDNA، ثم حللت النتائج بأستخدام برنامج Basic Local Alignment Search Tool

(BLAST) والمتوفر في المركز الوطني لمعلومات التقانات الحياتية National Center Biotechnology Information (NCBI) وعلى الموقع (http://www.ncbi.nlm.nih.gor) .

التحري عن قدرة النوع *Streptomyces rochei* على إنتاج المضادات الحيوية :-

لقحت العزلات المراد دراسة قدرتها على إنتاج مضاد حيوي بشكل خط مستقيم وسط طبق مولر–هنتون أكار، حضنت في درجة حرارة (37)م° لمدة (2-3) أيام وبعد التاكد من ظهور النمو بشكل غزير زرعت البكتريا المراد أختبار حساسيتها للمضاد المنتج بشكل خطوط متعامدة على خط التلقيح الاولي وسط الطبق ومن كلتا الجهتين ، وحضنت تحت نفس الظروف ولمدة (24) ساعة (Kumar *et al*., 2012).

الحساسية للمضادات الحيوية

لقحت العزلة 19 *Streptomyces rochei* على وسط Muller Hinton agar ودرست حساسيتها للمضادات الاتية: Oxacillin ، Tetracyclin 10 Mg ، 5Mg ، Penicillin10Mg، Erythromycin10Mg ، Nalidixic acid ، Gentamicin 10Mg،30Mg ، Chloramphenicol 30Mg و Ceftriaxone 30Mg (Winn *et al*.,2006)

إستخلاص المضاد الحيوي

تم تنمية البكتريا في وسط Glycerol Yeast Extract broth وحضنت في حاضنة هزازة في درجة حرارة (37) م° وسرعة دوران 150 دورة/ دقيقة وتحت ظروف هوائية ولمدة 7 أيام. أخذت المزرعة السائلة وأجري لها طرد مركزي بسرعة 10000دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق، أخذ الراشح ومزج مع نفس الكمية من ethyl acetate (حجم:حجم) ، مزجت جيداً لمدة 10 دقائق ،فصلت طبقة ethyl acetate الحاوية على المضادات الحيوية عن الطبقة المائية بأستخدام قمع الفصل separating funnel ،أخذت الطبقة العليا الحاوية على المضادات الحيوية وبخرت بوساطة جهاز التبخير ومن ثم جففت العينة عند درجة حرارة 40 م° ،تم

الحصول على مادة جافة حفظت في الثلاجة لحين الاستخدام (Jose *et al.*,2013).

أختبار الفعالية المضادة للمايكروبات Antimicrobial activity

أخذت أقراص ورق ترشيح معقمة وغمرت في محلول DMSO معقم ومن ثم غمرت في المستخلص بوساطة ملقط معقم ثم وضعت على سطح الطبق الحاوي على وسط مولر هنتون الملقح بالنوع *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية ، وذلك بغمر ماسحة قطنية في المرق المغذي الملقح ببكتريا الاختبار وبعمر 18 ساعة وبتركيز ($1.5*10^8$) خلية/سم ^{3} مقارنة مع أنابيب ماكفرلاند و من ثم زرعت بطريقة المسح ، حضنت الاطباق في درجة (37) م°لمدة 24 ساعة ومن ثم قيس قطر منطقة التثبيط Gebreyohannes (*et al.*,2013).

تشخيص المضاد الحيوي بأستخدام Thin Layer chromatography

لفصل المضاد الحيوي أستخدمت صفائح الكروماتوكرافيا من نوع Silica gel ذات الابعاد 20 سم *20 سم ، إذ تم تنشيطها في الفرن لمدة ساعة عند درجة حرارة 100 م ، ثم مزج المستخلص مع المذيب ethyle acetate حملت عينات المستخلص على الصفيحة بأستخدام أنابيب شعرية وعلى بعد 1 سم من اسفل الصفيحة ، تركت العينة لتجف بأستخدام مجفف الشعر أو لتجف في درجة حرارة الغرفة. ثم بعد ذلك نقلت بعناية الى حوض الفصل الخاص والحاوي على محلول الفصل الاول المكون من Sharon *et* 9 ethyle acetate : 1 hexane (*al.*,2013) ، ومحلول الفصل الثاني المكون من 6 ethyl acetate: 4 methanol (Attimarad *et al.*, 2012) ، بعد ذلك وضع غطاء الحاوية وتركت في درجة حرارة الغرفة ، ترك محلول الفصل للصعود الى أعلى بمقدار 1 سم قبل نهاية لوح الفصل، بعد ذلك رفعت الصفيحة وتركت لتجف، تم أستخدام ألاشعة فوق البنفسجية UV لأظهار بقع المضاد الحيوي (Sharma and Manhas,2019) . تم حساب معدل مسافة الجريان Rate flow (RF) لجميع البقع المفصولة وفق القانون الاتي:

معدل الجريان = المسافة التي تقطعها المادة/ المسافة التي يقطعها المذيب (Kato and Maeda,1974).

النتائج والمناقشة

العزل

جمعت 80 عينة من مصادرها المختلفة، 50 من ترب مختلفة منها ترب ملوثة بالهايدروكاربونات وترب حدائق منزلية وعامة لعزل النوع البكتيري *Streptomyces rochei* التابع لجنس Streptomyces و30 عينة من الانسان (الجلد) لغرض عزل المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، يوضح الجدول(2) نسبة عزل النوع *Streptomyces rochei* من الترب الملوثة بالهيدروكاربونات 8% والترب غير الملوثة 6% ، إذ تعد من البكتريا الاساسية للتربة لكنها تحتاج فترات تحضين طويلة (Karthik *et al.*,2010) تمتاز الانواع التابعة لجنس Streptomyces بصعوبة العزل والتشخيص وهذا ما أشار اليه الباحث Holt وجماعته (1994) في موسوعة بيركي المقررة من صعوبة التعامل مع أفراد البكتريا الخيطية. إضافة الى ذلك أمتازت البكتريا Streptomyces ببطء نموها على الاوساط الزرعية حيث تحتاج 7-14 يوم للنمو مما أدى الى أنتشار الانواع السريعة النمو حيث فقدت بعض العزلات وكذلك تتميز بظاهرة تعدد الالوان للمستعمرات حيث يتغير لون المستعمرات مما يؤدي الى الشك والارباك في معرفة النوع المعزول (السماك و عبدالله ،2009).

بينما كانت نسبة عزل الزوائف من الحروق 100% إذ تنمو بسرعة على العديد من الاوساط الزرعية، والمكورات العنقودية من الجروح كانت بنسبة 35.7%.

الجدول (2) نسب البكتريا المعزولة من عينات بيئية وسريرية

نوع العينة	عدد العينات	عدد العزلات	نسبة العزل %	البكتريا المعزولة
التربة	25 ترب ملوثة	2	8	*Streptomyces rochei*
	25 ترب غير ملوثة	4	16	
الجروح	28 مسحة	10	35.7	Staphylococcus
الحروق	2	2	100	Pseudomonas

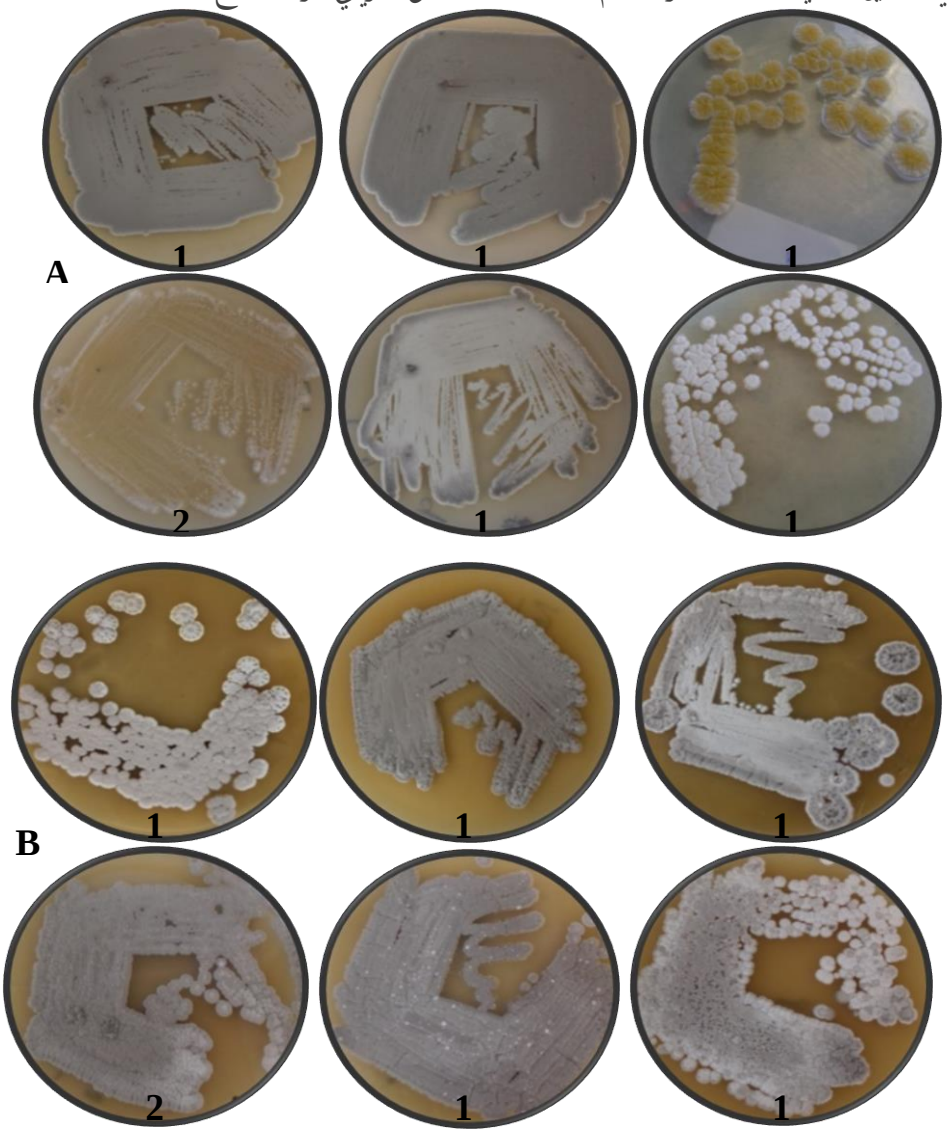
أعتمدت الصفات الشكلية للمستعمرات والخلايا والالتصاق على الوسط الغذائي وإنتاج الرائحة في العزل الاولي للمستعمرات التي يشك أنها تعود الى جنس Streptomyces. أختير منها 6 عزلات تابعة للنوع *Streptomyces rochei* بعد إجراء التشخيص الجيني باستخدام 16s rDNA . أفضل طريقة لاستخلاص DNA هي بأستخدام عدة الاستخلاص الجاهزة ، أذ أن طريقة Colony PCR المحورة وكذلك طريقة استخدام المايكرويف لم تكن كفوءة في الحصول على الدنا الكروموسومي ، وهذا ما أشار اليه الباحث Cotârlet وجماعته سنة 2010 ، إذ بين أن هذه الطريقة تستخدم مع جنس الستربتومايسس المتكيف للعيش في البيئات الباردة لصعوبة تكسير الجدار الخلوي.

الصفات المظهرية : اظهرت النتائج وكما مبين في الجدول (3) تباين في الوان الغزل الهوائي بين المخملي الابيض والرصاصي والاصفر تبعاً للوسط الزرعي وحسب مدة التحضين وتباينت الوان الغزل الارضي بين الاصفر والبني وكما موضح في الصورة (1) وهذا يعود لاختلاف مكونات الاوساط الزرعية المختلفة ، وتتفق هذه النتائج مع ما أشارت اليه السماك (2006) من تغير الوان الغزل الارضي والهوائي تبعاً للوسط الزرعي الناميه فيه. إن أختلاف الوان الغزل الارضي والهوائي يعود الى أختلاف قدرة بكتريا Streptomyces على أستهلاك المصادر الكاربونية والناتروجينية والاملاح الموجودة في الاوساط الزرعية المختلفة (Williams *et al*.,1989; Kutzner,1981)

وصفت العزلة فسلجياً من خلال عدد من الاختبارات الكيموحيوية كما موضح في الجدول (3) . إذ تمكن النوع *Streptomyces rochei* من تحليل التايروسين ودم الانسان والنشا والجلاتين وإنتاج أنزيم الكاتليز والبروتييز واللايبيز واللسيثينيز وأستهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون.

الجدول (3): الاختبارات الكيموحيوية والشكلية لعزلات النوع *Streptomyces rochei*

رمز السلالة	النوع	تحليل التايروسين	تحليل النشا	تحليل الجلاتين	أنتاج أنزيم الكتاليز	إنتاج انزيم اليوريز	تحليل دم الانسان	أستهلاك السترات	إنتاج اللايبيز	إنتاج البروتييز	إنتاج انزيم السيليليز	الغزل الهوائي			الغزل الارضي	شكل الغزل الهوائي
												وسط النشا-كازائين	وسط Streptomyces	وسط الاكار المغذي		
1	*Streptomyces rochei*	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+	أصفر	رصاصي مبيض	أبيض	أصفر	حلزوني
12	*Streptomyces rochei*	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	رصاصي مبيض	رصاصي	أبيض	أصفر شاحب الى بني	حلزوني
13	*Streptomyces rochei*	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	بني شاحب	بني فاتح	أبيض	أصفر الى بني	متعرج
14	*Streptomyces rochei*	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	أبيض	رصاصي مبيض	عسلي	أصفر	متعرج
19	*Streptomyces rochei*	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	أصفر، رصاصي مبيض	رصاصي	أبيض مخملي	أصفر	حلزوني
27	*Streptomyces rochei*	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	أبيض	رصاصي مبيض	عسلي	أصفر	حلزوني

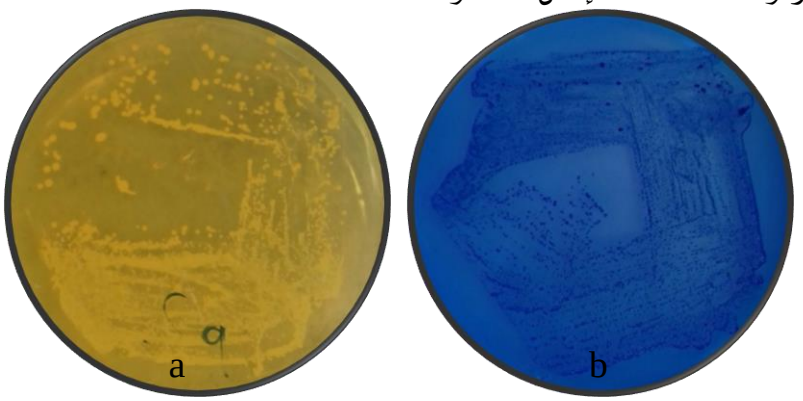


الصورة (١): شكل المستعمرات لعزلات النوع *Streptomyces rochei*

A: شكل المستعمرات على وسط آكار الكازائين – النشا

B: شكل المستعمرات على وسط آكار Streptomyces

أعتمد على بعض الصفات الشكلية والاختبارات الكيموحيوية في تشخيص النوعين *Staphylococus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* إضافة الى تشخيص أربع عزلات جزيئياً للنوع *Staphylococus aureus* وهي 1 ، 6 ، 7 و 9 بأستخدام 16s rDNA . ظهرت خلايا النوع *Staphylococus aureus* تحت المجهر بهيئة عناقيد موجبة لصبغة كرام ، محللة للدم تحلل كامل ، موجبة لاختبار الكتاليز ، مخمرة لسكرالمانتول ، كما استخدم وسط خاص لعزل النوع المقاوم للمضادات وهو ORSAB ، إذ ان هذا الوسط يحتوي على صبغة aniline blue لاظهار القدرة على تخمر سكر المانتول ،إضافة الى احتواء الوسط على نوعين من المضادات oxacillin وpolymixin B مع وجود ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 5.5% يعمل على أختزال الكائنات الاخرى وبقاء النوع المقاوم للمضادات الحيوية MRSA ، إذ ظهرت المستعمرات بلون أزرق على وسط ORSAB وبلون أصفر على وسط اكار المانتول نتيجة لتخمر سكر المانتول (Simor *et*al., 2001) وكما موضح في الصورة (٢)



الصورة (2) لون مستعمرات النوع *Staphylococcus aureus* على وسط أكار المانتول وORSAB

a- لون المستعمرات أصفر على وسط أكار المانتول

b- لون المستعمرات أزرق على وسط ORSAB

بينما ظهرت خلايا النوع *Pseudomonas aeruginosa* تحت المجهر بشكل عصوي سالب لصبغة كرام ، محللة للدم تحللاً كامل ، منتجة لصبغة البايوسيانين ورائحة كريهة تشبة رائحة الفاكهة المتعفنة إذ إستخدمت هذه الصفة في التشخيص الاولي للنوع .

إن مقاومة النوع *Staphylococcus aureus* لمضادات البيتا لاكتام يعود الى قدرة النوع على إنتاج بروتين penicillin–binding protein2a (PBP2a) والمشفر من قبل الجين *mec* A الواقع على عناصر جينية متحركة Mobile gene element (MGE) والتي لها ألفة واطئة لمضادات البيتا لاكتام. في السنوات الاخيرة ظهر النوع مقاوم للعديد من المضادات منها مضادات الماكروليد، الامينوكلايكوسايد ، الببتيدات السكرية quinolones والتتراسايكلينات وذلك لأن جينات المقاومة تكون محمولة على البلازميدات والجينات القافزة transposons والتي يمكن أن تنتقل بين الانواع وبين البكتريا الاخرى الموجبة لصبغة كرام (Akpakaa *et al*.,2017). بينما مقاومة النوع *Pseudomonas aeruginosa* تعود الى أمتلاكها لانظمة الضخ للعديد من المضادات الحيوية ،أضافة الى أمتلاكها للبلازميدات المسؤولة عن المقاومة، كما أن الطفرة أيضاً لها دور في المقاومة ، يتميز النوع بمقاومتة لمضادات البيتا لاكتام لامتلاكه لانزيم pencillinase (Lister *et al*., 2009) . وكما موضح في الجدول (4) .

الجدول (4) أختبار الحساسية والمقاومة للمضادات الحيوية للنوعين *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*

Gentamicin (CN) 10	Nalidixic acid (NA) 30	Tetracyclin (TE)10	Carbencillin (PY) 25	Erythromycin (E) 10	Oxacillin (OX) 5	Vancomycin (VA) 30	كائنات الاختبار	رقم العزلة
S	R	R	R	R	R	S	*Staph.aureus* 1	1
R	R	R	R	R	R	M	*Staph.aureus* 6	2
S	R	R	R	R	R	S	*Staph.aureus* 7	3
M	R	R	R	R	R	S	*Staph.aureus* 9	4
R	R	R	R	R	R	M	*Staph.aureus* 10	5
R	R	S	R	R	R	S	*Staph.aureus* 17	6
R	R	R	R	R	R	R	*P.aeruginosa* 1	7
R	R	R	R	R	R	R	*P.aeruginosa* 2	8

R:Resistant M:Moderate S:Sensitive

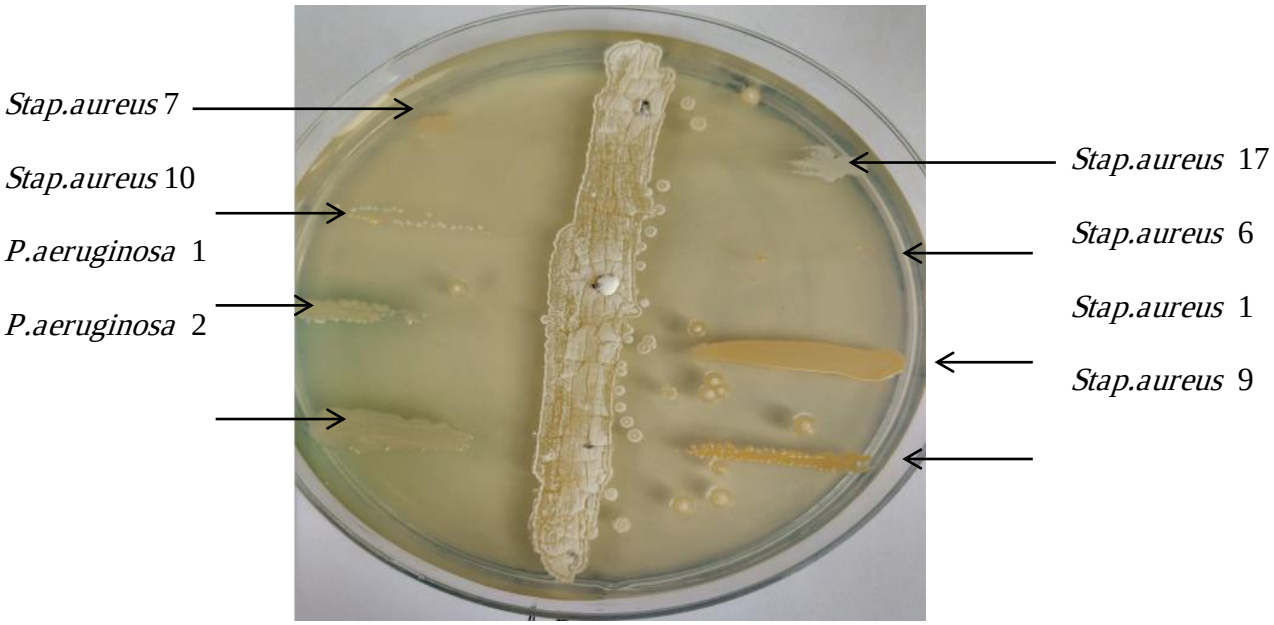
قدرة النوع *Streptomyces rochei* على إنتاج مضادات حيوية :

أظهر النوع *Streptomyces rochei* قدرة على إنتاج مضاد حيوي ضد عدد من السلالات التابعة للبكتريا الموجبة *Staphylococcus aureus* والبكتريا السالبة لصبغة كرام *Pseudomonas aeruginosa* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية والتي أظهرت تأثيرات مختلفة كما موضح في الجدول (5) لتشخيص المضاد المنتج .

أختيرت عزلة واحدة تابعة للنوع *Streptomyces rochei* وهي 19 التي أعطت أعلى تأثير في الانواع قيد الدراسة وكما موضح في الصورة (3) لغرض عزل المضادات الحيوية.

الجدول (5) الفعالية المضادة لعزلات النوع *Streptomyces rochei* ضد عزلات النوعين *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas aeruginosa*

رقم العزلة	*Staph. aureus* 1	*Staph. aureus* 6	*Staph. aureus* 7	*Staph. aureus* 9	*Staph. aureus* 10	*Staph. aureus* 17	*P.aeruginosa* 1	*P.aeruginosa* 2
Streptomyces rochei 1	–	–	+	–	–	++	–	+
S.rochei 12	–	–	+	–	+	+++	–	–
S.rochei 13	–	–	–	–	+++	–	–	–
S.rochei 14	+++	+++	++	–	+++	+++	–	–
S.rochei 19	+	+++	+++	+	+	+++	+++	++
S.rochei 27	+++	–	+	+++	+++	+++	+	+



الصورة (3) الفعالية المضادة للعزلة *Streptomyces rochei* 19 ضد العزلات التابعة للنوعين *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas aeruginosa*

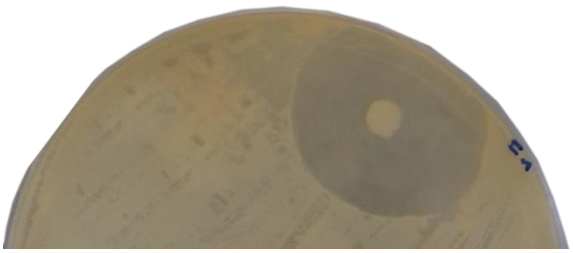
كما أظهرت العزلة مقاومة لكافة المضادات المستخدمة قيد الدراسة ماعدا حساسيتها للمضاد الحيوي Erythromycin ، و هذا ماأشار اليه فيصل وأخرون سنة (2009) من تباين مقاومة جنس Streptomyces للمضادات الحيوية وكما موضح في الجدول (٦) .

الجدول (6) أختبارمقاومة المضادات الحيوية للعزلة 19 *Streptomyces rochei*

رقم العزلة	كائنات الاختبار	Vancomycin (VA) 30	Oxacillin (OX)5	Erythromycin (E) 10	pencillin (P) 10	Teteacyclin (TE)10	Nalidixic acid (NA) 30	Gentamicin (CN) 10	Chloramphenicol (C) 30	Ceftriaxone (CRO) 30
19	*Streptomyces rochei*	R	R	S	R	R	R	R	R	R

R:Resistant S:Sensitive

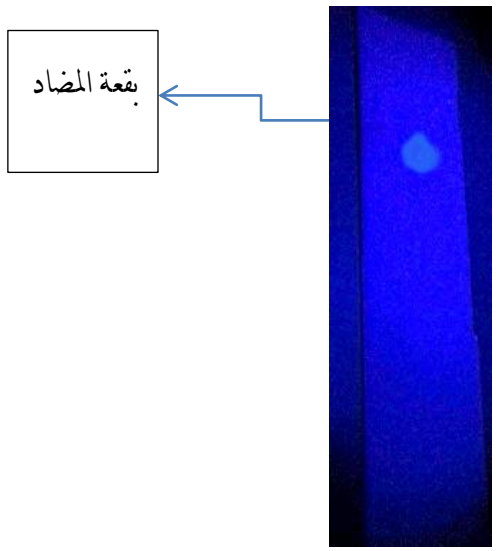
فصل المضاد الحيوي أعتمادا على Jose وأخرون (2013) بأستخدام ethyle acetate إذ تواجد المضاد الحيوي في الطبقة العليا وظهر بعد التجفيف بهيئة مادة صمغية لزجة والذي أظهر تأثيرفي العزلات قيد البحث .أستخدمت طريقة الانتشار بالاقراص للتحري عن الفعالية التثبيطية للمضاد المستخلص من العزلة 19*Streptomyces rochei* ضد النوعين *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* ، أظهر المستخلص فعالية تثبيطية عالية ضد النوع *Staphylococcus aureus* وبقطر 30 ملم وكما موضح في الصورة (4) .



الصورة (4) تأثير المضاد المستخلص على النوع *Staphylococcus auerus*

وتأثير أقل على النوع *Pseudomonas aeruginosa* ربما يعود السبب في ذلك الى أن المضاد المستخلص من النوع ضيق المدى إذ يؤثر على عدد محدود من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام. أنطلاقاً من الحقيقة العلمية كون البكتريا المنتجة للمضاد الحيوي تكون مقاومة له (Waksman,1967)، وأعتمادا على قيمة ال R_f للمضاد المستخلص مقارنة بمضادات البيتا لاكتام والتي أظهرت معدل جريان مماثلة لمعدل جريان للمضاد المستخلص وهي 0.85 عندما كان محلول الفصل ethyle acetate: methanol وتغيرت قيمة معدل الجريان الى 0.9 عندما كان محلول الفصل ethyl acetate: hexan وهذا مطابق لما جاء به كل من Hancu وجماعته سنة (2013) ولكن بأستخدام نظام مذيب مختلف قليلاً وهو 60 butanol:20 water :20 acetic acid مما يدل على أن المضاد المنتج يعود لمجموعة البيتا لاكتام.

تم الحصول على بقعة واحدة عند فصل المضاد بأستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة والتي ظهرت متألقة تحت الاشعة فوق البنفسجية كما موضح في الصورة (5) .



الصورة (5) مناطق انفصال المضاد الحيوي بكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة

المصادر

السماك ، إسراء غانم و عبدالله ، باسمة أحمد .(2009) . التصنيف العددي بالتحليل العنقودي لانواع جنس Streptomyces . المؤتمر العلمي الاول لكلية علوم الحياة. جامعة الموصل/ العراق.

السماك، إسراء غانم.(2006). دراسة تصنيفية لمجموعة البكتريا الخيطية. كلية العلوم ، جامعة الموصل. أطروحة دكتوراه.

فيصل، ريان مازن ؛ احمد، خالد دحام و السماك، إسراء غانم.(2009) . تعيين مواقع المورثات المنتجة للمضادات الحيوية في جرثومة .*Streptomyces* spp . مجلة علوم الرافدين ، المجلد 20 ، العدد 1 ، ص 11-22.

Akpakaa,P.E.; Roberts, R. and Monecke, S.(2017). Molecular characterization of antimicrobial resistance genes against *Staphylococcus aureus* isolates from Trinidad and Tobago. *Journal of Infection and Public Health*.,10:316-323.

Anukool, U. ; Gaze, W. H. and Wellington, E. M. H. (2004). In situ monitoring of streptothricin production by *Streptomyces rochei* F20 in soil and rhizosphere . *Applied and Environmental Microbiology*.,70 (9) p. 2222-2228.

Attimarad, S. L. ; Ediga. L. G. ; Karigar, A. A. ; Karadi, R. ; Chandrashekhar, N.and Shivanna, C. (2012). Screening, isolation and purification of antibacterial agents from marine actinomycetes. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(12):394-402.

Bodour, A. A. ; Drees, K. P. and Mair, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant- producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology.* , 69(6) :3280-3287.

Collins,C.H.; Yates, M.D. and Uttley, H.C.(1988). Presumptive identification of nocardias in a clinical laboratory. *Journal of Applied Bacteriology*.,65:55-59.

Cotârlet, M. ; Bahrim, G. ; Negoita, T. and Stougaard, P. (2010). Comparative study of establishing the

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. , 3(6):426-435.

Hancu, G. ; Simon, B. ; Kelemen, H. ; Rusu, A. ; Mircia, E. and Gyresi, A. (2013). Thin layer chromatographic analysis of beta-lactam antibiotics. *Advanced pharmaceutical Bulletin.* , 3(2) : 367-371.

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

Hong, K. ; Gao, A. ; Xie, Q. ; Gao, H. ; Zhuang, L. ; Yu, H. and Mand Ruan, J. (2009). Actinomycetes for marine drug discovery isolation from Mangrove soils and plants in china microbiological research. *Marine Drugs.* , 7(1), 24-44.

Jose, P. A. ; Sivakala, K. K. and Jabakumar, S. R. (2013). Formulation and statistical optimization of culture medium for improved production of antimicrobial compound by *Streptomyces* sp. JAJ06. *International Journal of Microbiology*.Hindawi Publishing Corporation.

Jüttner, F. and Watson, S. (2007). Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied and* effciency of some methods for chromosomal DNA extraction from cold adapted Streptomycetes. *Romanian Biotechnological Letters*. , 15(4): 5482-5486.

Dehnad, A. ; Parsa Yeganeh, L. ; Bakhshi, R. and Mokhtarzadeh, A. (2010). Investigation antibacterial activity of Streptomycetes isolates from soil samples, West of Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 4(16), 1685-1693.

El-Hussein, A. A. ; Alhesan, R. E. M. ; Abdelwahab, S. A. and EL-Sidding, M. A. (2014). Isolation and identification of *Streptomyces rochei* : strain active against phytopathogenic fungi. *British Microbiology Research Journal*. 4(10):1057-1068.

Finegold, S. M. and Martin, W. J. . (1982). Diagnostic Microbiology. 6th ed. C. V. Mosby Company. , St. Toronto. London. , p. 657.

Flärdh, K. and Buttner, M. J. (2009). Streptomyces morphogenetics : dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nature Reviews Microbiology. , 7:36-49.

Gebreyohannes, G. ; Moges, F. ; Sahile, S. and Raja, N. (2013). Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of lake Tana, Ethiopia.

Wiley chichester, New York.pp.115-176.

Lechevalier, H.A. and Lechevalier, P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: (Starr, M.P.; Stolp,H.; Truper, H.G.; Balows, A. and Schlegal, H.G. eds.).The Prokaryotes: A handbook on habitat, isolation and identification of bacteria. Springer - Verlag,Berlin.pp.1915-1922.

Lister,P.D.; Wolter,D.J. and Hanson, N.D.(2009).Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* :clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*., 22 (4): 582 - 610.

Locci, R. (1989). Streptomyces and related genera. Bergeys manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkns Company. 2344-2508.

Macfaddin, J. F. (1985). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. , Williams and Wilkins, Waverly press, Inc. Batimore, London. , p. 346.

Maleki, H. , Dehnad, A. , Hanifian, S. and Khani, S. (2013). Isolation and molecular identification of *Streptomyces* spp. with antibacterial *Environmental Microbiology*. , 73(14), 4395-4406.

Karthik, L. ; Kumar, G. and Rao, K. V. (2010). Comparison of methods and screening of biosurfactant producing marine Actinobacteria isolated from Nicobar marine sediment. *Overactive Bladder Journal*. , 2 (1) :34-38.

Kato, M. and Maeda, J. (1974). Isolation and biochemical activities of trehalose-6- monomycolate of Mycobacterium tuberculosis. *Infection and Immunity*. , 9: 8-14.

Kumar, P. ; Preetam Raj, J. ; Duraipandiyan, V. and Ignacimuthu, S. (2012). Antibacterial activity of some actinomycetes from Tamil Nadn, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. , 2(12) : 936-943.

Kutzner, H. J. (1981). The family Streptomycetaceae. In :(Starr, M. P. ; Stolp, H. ; Truper, H. G. ; Balows, A. and Schlegal, H. G. eds.). The Prokaryotes : A handbook on habitat, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin. pp. 2028-2089.

Lane, D.J. (1991).16S/23S rRNA sequencing, nucleic acid techniques in bacterial systematic. Edited by Stackebrandt,E and Goodfellow, M.

Sharma, M. and Manhas, R. K. (2019). Purification and characterization of actinomycins from Streptimyces strain M7 active against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant Enterococcus. *Sharma and Mahnas BMC Microbiology*. 19(44):3-14.

Sharon, F. B. ; Kalidass, S. and Daniel, R. R. (2013). Qualitative analysis of antimicrobial compound by high performance thin layer chromatography method. *Asian Journal of Pharmacy and Clinical Research* ., 6(4):117-20.

Simor, A. ; Goodfellow, J. ; Louie, L. and Louie, M. (2001). Evaluation of a new medium, oxacillin resistance screening agar base, for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*., 39(9) : p. 3422.

Smaoui, S. ; Mathieu, F. ; Fguira, L. ; Merlina, G. and Mellouli, L. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an Oasis in Tunis. *Archives of Biological Sciences. , Belgrade*, 63(4), 1047-1056.

Waksman, S. A. (1967). The Actinomycetes A Summary of activity from northwest of Iran. *BioImpacts*, 3(3), 129-134.

Mohanraj, G. and Sekar, T. (2013). Isolation and screening of actinomycetes from marine sediments for their potential to produce antimicrobials *International Journal of Life Science and Pharma Research.* , 2(3), 115-126.

Prescott, L.M;Harley,J.P. and Klein, D.A. (2005). Microbiology.6th ed., McGraw-Hill Companies, Inc. pp. 531-532.

Reddy, N. G. ; Ramakrishna, D. P. N. and Raja-Gopal, S. V. (2011). A morphological, physiological and biochemical studies of marine *Streptomyces rochei* (MTCC10109) showing antagonistic activity against microorganisms. *Asian Journal of Biological science*s. , 4:1-14.

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning. 3rd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Protocols, Cold Spring Harbor, New York.

Schrader, K. and Blevins, W. T. (2001). Effectts of carbon source, phosphorus concentration, and several micronutrients on biomass and geosmin production by *Streptomyces halstedi*. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology.* , 26:241-247.

Current Knowledge. Roland Press Company. USA. pp. 194-247.

Williams, S. T. ; Goodfellow, M. and Alderson, G, (1989). Genus Streptomyces, Waksman and Henrici 1943. In :(Williams, S. T. ; Sharpe, M. E. and Holt, J. G. eds) . Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins Co. , Baltimore. 4: 2452 -2492.

Winn, W. C. ; Allen, S. D, J.; Janda, W. U. ; Koneman, E. W. ; Procop, G. W. ; Schreckenbergers, P. C. and Woods, G. L. (2006). Koneman' s color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 6th ed. , Lippincott Williams and Wilkins, U. S. A.