

TAXONOMIA NUMERICA DE BACTERIAS AISLADAS DEL QUESO DE CABRA APLICANDO MEDIOS SELECTIVOS

Bernardo Prado Alderete¹, Marcia Arancibia¹
Mónica Fuentes¹, Miguel Zazópolos¹ y Ana Del Moral²

1. Laboratorio de Microbiología. Universidad Técnica Federico
Santa María. Sede Viña del Mar. Chile.

2. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada. España.

Palabras clave : Taxonomía numérica, queso de cabra, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus*.

Key words: Numerical taxonomy, goat cheese, *Enterobacteraceae*, *Streptococcus*.

RESUMEN

Mediante medios selectivos se aislaron 105 cepas bacterianas desde quesos de cabra, adquiridos en mercados locales de la ciudad de Valparaíso (Chile). Todas las cepas bacterianas junto a 4 de referencia, fueron examinadas para 54 características fenotípicas, incluyendo pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis numérico, utilizando el coeficiente de apareamiento simple Ssm. y la técnica de agrupación UPGMA.

A un nivel de semejanza de un 80% las cepas se agruparon en 8 fenones, representando a miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (7) y uno al género *Streptococcus*.

SUMMARY

[Numerical taxonomy study of bacteria isolated from goat cheese applying selective culture media.]

A total of 105 bacterial strains isolated from goat cheese, obtained in markets of Valparaíso (Chile), were examined for 53 phenotypic characters including morphological, physiological and biochemical tests, applying selective culture media and four reference strains. The results obtained were subjected to numerical analysis using the simple marching (Ssm) and unweighted pair group method of association (UPGMA). At the 80% similarity level the strains were grouped in eight phenons, representing members of the *Enterobacteriaceae* family (7) and one of the genus *Streptococcus*.

INTRODUCCION

Es un hecho bien conocido que la carga bacteriana inicial de la leche de cabra, determina el posterior grado de contaminación del queso. Podemos comprender la importancia social que tiene el caprino, si consideramos que su explotación es una actividad de subsistencia de muchas familias de la IV Región (Figura 1), que dependen fundamentalmente de la venta de este queso.

El punto común de relación, en Chile (Camacho & Sierra, 1988) y otros países de Latinoamérica (Fernández et al. 1982), es la evidente falta de control sanitario del producto que se expende a la población.

Según Furtado (1980) cuando el material de ordeña no se ha higienizado, la leche recién extraída puede

presentar recuentos bacterianos superiores a 2×10^6 microorganismos por ml. Esta cifra aumenta logarítmicamente cuando la ordeña se efectúa en un corral sucio, o el animal y la persona que ordeña no mantienen normas de higiene. La fabricación del queso de cabra, se inicia utilizando leche obtenida bajo estas condiciones.

A esto hay que agregar la posterior manipulación que sufre el producto durante su traslado hasta el lugar de venta al aire libre y expuesto por ende al ataque de insectos atraídos por su aroma.

La calidad sanitaria insuficiente del queso de cabra (Camacho & Sierra, 1988) ha sido la causa de diversas gastroenteritis por el consumo del producto, las cuales aumentan en la zona central de nuestro país en la época primavera-verano.

Considerando el impacto que puede tener en salud pública el expendio de queso de cabra en los mercados de

la ciudad de Valparaíso, se presenta un estudio preliminar de la distribución taxonómica de algunos grupos de microorganismos en este alimento, mediante el empleo de medios selectivos.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de muestras

Se analizaron muestras de queso de cabra obtenidas en dos mercados de la ciudad de Valparaíso (Chile), Mercado Puerto y Cardonal, entre los meses de Agosto de 1991 y Enero de 1992. Las técnicas de recolección de muestras corresponden a los métodos estándar para muestreo de leche y productos lácteos, recomendados por la Federación Internacional de Lechería (FIL), descritas previamente por Pinto & Houbraken (1976). El traslado de las muestras desde los mercados al laboratorio se hizo en bolsas plásticas mantenidas a temperatura de refrigeración, analizándose dentro de las tres primeras horas después de su obtención.

Análisis microbiológico

Se tomaron submuestras representativas de 5 gramos del producto, se diluyeron en 45 ml de solución de Ringer al 0,1% y se homogenizaron. Luego se prepararon diluciones decimales sucesivas hasta 10^{-4} y se sometieron al análisis microbiológico sembrando en medios selectivos para: coliformes totales y fecales, estreptococos fecales y *Salmonella*. Todo esto siguiendo las metodologías de la Asociación Americana de Salud Pública (APHA, 1960).

Cepas de referencia

Cuatro cepas de referencia provenientes del Instituto de Salud Pública de Chile, fueron incluidas en este estudio: *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Medio de Mantenimiento

Las cepas aisladas de los medios selectivos fueron purificadas y posteriormente mantenidas en agar nutritivo inclinado (Difco) hasta su posterior identificación.

Caracterización de las cepas aisladas

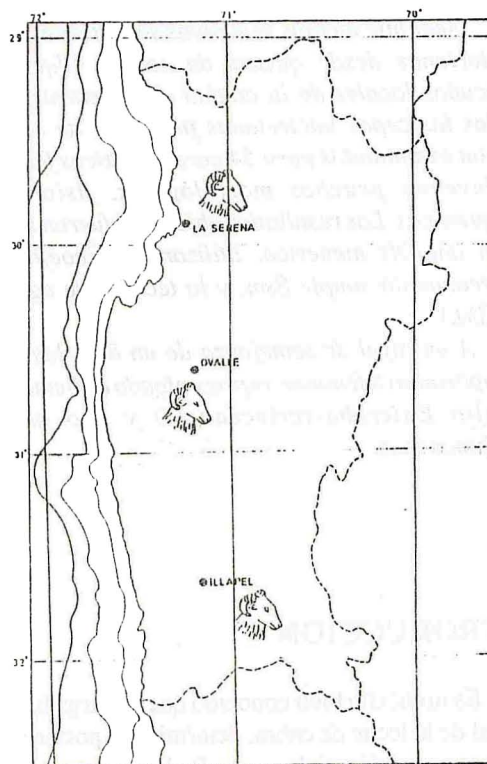
Un total de 53 caracteres fenotípicos fueron determinados para cada cepa bacteriana aislada, entre las que se incluyen pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Tabla 1). Los detalles de los procedimientos utilizados, pueden consultarse en los trabajos de Quesada et al. 1983; Márquez et al. 1987.

Análisis numérico

Para la realización del análisis numérico se seleccionaron un total de 46 caracteres.

Figura 1

Mapa de la IV Región. Sector de mayor producción de queso de cabra.



Los caracteres positivos y negativos fueron codificados como 1 y 0 respectivamente. La similitud entre las cepas bacterianas se obtuvo con el coeficiente de apareamiento simple Ssm. (Sokal & Michener, 1958) y el agrupamiento con el método UPGMA (Sneath & Sokal, 1973). El test de error se obtuvo al examinar 10 cepas en duplicado (Sneath & Johnson, 1972).

TABLA 1
Frecuencia de características positivas en los 9 Fenones, expresadas como porcentaje del total de resultados de cada grupo para los test realizados.

FENON	A	B	C	D	E	F	G	H
Nº DE CEPAS	4	46	6	2	3	11	4	18
Gram positivas	0	0	0	0	0	0	0	100
Gram negativas	100	100	100	100	100	100	100	0
Forma bacilar	100	100	100	100	100	100	100	0
Forma cacacea	0	0	0	0	0	0	0	100
Catalasa	100	100	100	100	100	100	100	0
Movilidad	100	100	100	100	100	100	100	0
CRECIMIENTO EN NaCl %								
3	100	99	100	100	100	100	75	100
5	100	99	83	100	100	100	50	88
10	0	0	0	0	100	46	0	0
15	0	0	0	0	33	46	0	0
Crecim. a 42°C	50	91	83	100	0	66	100	88
O/F glucosa	100	94	100	100	100	64	75	100
Gas de T.S.I.	100	100	50	100	66	0	0	0
H ₂ S de T.S.I.	0	7	83	100	0	0	0	0
PRODUCCION DE ACIDOS DE :								
Glucosa	100	100	100	100	100	80	25	100
Lactosa	75	98	100	0	66	100	25	100
Sacarosa	100	85	83	0	66	100	75	100
Manitol	100	100	100	100	100	100	75	91
Inulina	25	11	0	0	0	27	0	91
Glicerol	75	76	16	100	66	73	0	18
Sorbitol	100	98	83	100	100	72	100	86
Arabinosa	100	100	100	100	100	100	75	91
Dulcitol	25	48	33	100	100	0	0	0
Adonitol	0	26	16	100	33	0	0	46
Myo-Inositol	0	20	0	100	33	0	0	18
Maltosa	100	98	100	100	100	100	100	100
Xilosa	100	96	100	100	100	91	0	73
Manosa	100	100	100	100	100	100	75	100
Trealosa	75	100	100	100	100	100	100	100
Malonato	50	28	16	0	66	73	0	0
Crec.en MacConkey	100	96	83	0	66	82	78	0
Gas de MacConkey	100	94	83	0	66	27	0	0
Reduc.de Nitratos	100	96	100	100	100	72	100	0
Hemólisis	0	2	16	0	0	0	100	0
HIDROLISIS DE LA								
Gelatina	0	0	50	0	100	0	0	0
Almidón	25	35	83	0	0	9	25	0
Esculina	100	63	50	0	100	100	100	100
Urea	0	0	100	0	100	0	0	0
Indol	0	96	50	0	0	50	0	0
Voges Prokauer	100	0	0	0	100	0	0	0
Rojo de metilo	0	91	100	100	66	100	100	100
Citrato de Simmons	100	0	100	0	100	0	0	0
Arginina dehidrolasa	25	4	0	50	0	18	0	0
Ornitina descarboxilasa	75	74	33	100	100	27	0	0
Lisina descarboxilasa	50	96	0	100	100	27	0	0
H ₂ S de LIA	0	13	50	100	0	0	0	0
Fermentación del manitol	75	100	100	100	100	91	0	18

Todas las cepas fueron capaces de crecer a 0% de NaCl. Crecen bien a pH 6 a 10, son coagulasa y oxidasa negativas, no hidrolizan el DNA.

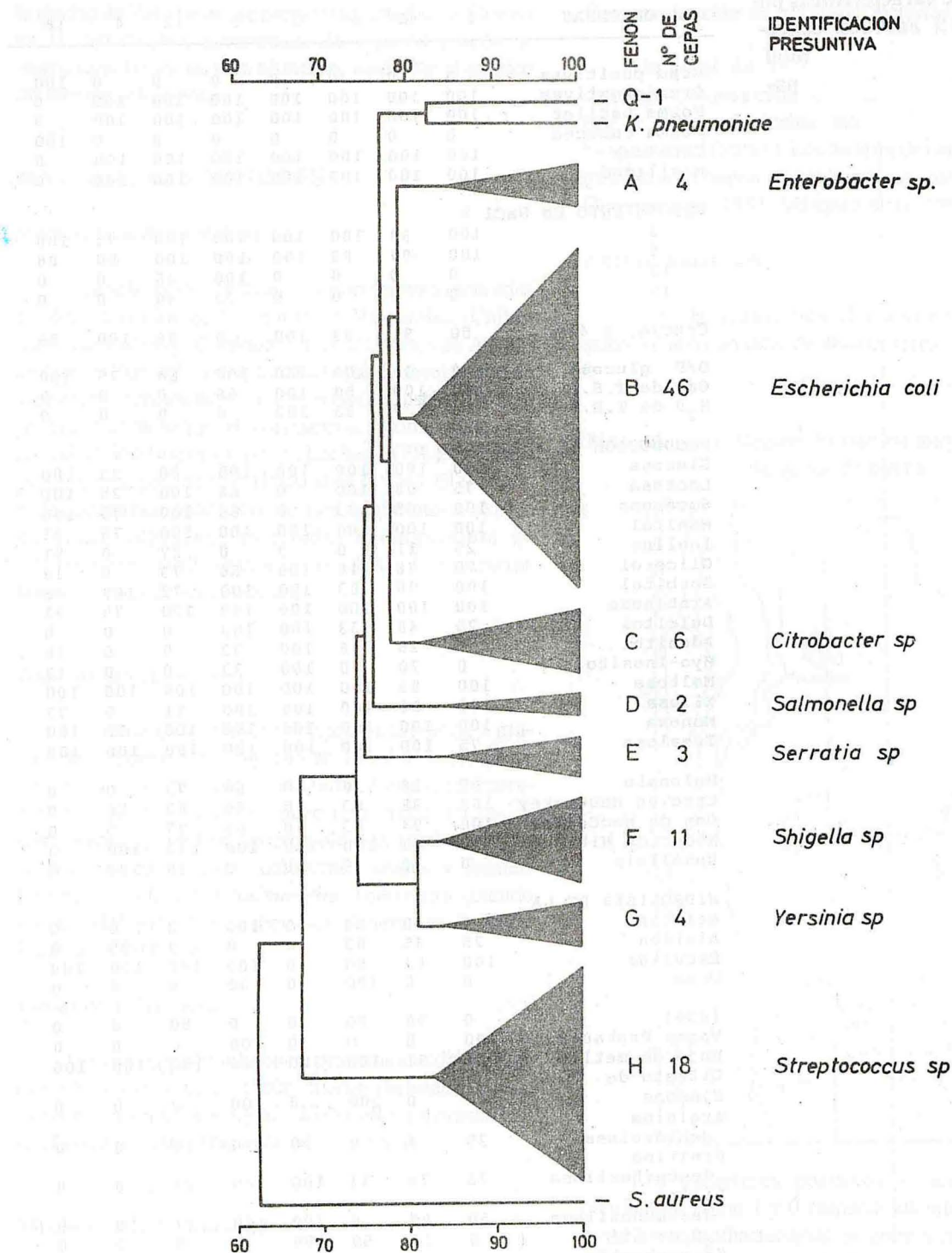


Figura 2

Dendrograma simplificado del agrupamiento de las 105 cepas dentro de 8 fenones, basado en el coeficiente de Ssm y la técnica de agrupamiento UPGMA, en medios selectivos y con 4 cepas de referencia.

El análisis computacional se realizó aplicando el programa MINT (Rohlf, 1985), de taxonomía numérica, usando un computador Eclipse Modelo MV/10.000 del Centro de Cálculo de la Universidad de Granada, España.

RESULTADOS

Utilizando el coeficiente de Ssm. y la técnica de agrupación UPGM, todas las cepas, excepto una, la Q-1 quedaron agrupadas en 8 fenones a un nivel de semejanza del 80%. Dos de las cepas de referencia incluidas en el estudio, no quedaron agrupadas en ningún fenón (Fig. 2). El valor de la correlación cofenética estimada fue de 0.78574 para el coeficiente de Ssm y la técnica de agrupación UPGMA. El test de error estimado fue de 1%.

Todas las cepas fueron capaces de crecer a 0% de cloruro de sodio, se desarrollaron bien a un amplio rango de pH (6-10). Son coagulasa y oxidasa negativas y son capaces de hidrolizar el DNA.

La Tabla 1 resume las características fenotípicas de las cepas incluida en cada fenón. Los caracteres más significativos de cada fenón se basan en que cada test aplicado fue en un 80% positivo o negativo en las cepas estudiadas, las cuales se describen a continuación.

FENON A

Constituido por 4 cepas relacionadas a un nivel de semejanza del 84%. Todas son bacterias gram negativas de forma bacilar, catalasa positiva, móviles y oxidasa negativas. Crecen bien a concentraciones del 3 y 5% de NaCl, pero no al 10 y 15%. Fermentan y producen ácido de la glucosa, producen gas en el medio TSI, pero no H₂S, son capaces de producir ácidos a partir de: sacarosa, manitol, sorbitol, arabinosa, maltosa, xilosa y manosa, pero no de adonitol y myo-inositol. Reducen los nitratos y crecen en agar MacConkey, hidrolizan la esculina pero no la urea ni la gelatina, son hemolisina negativas, indol y rojo de metilo negativas, producen acetilmetil carbinol y utilizan el citrato como única fuente de carbono, no producen H₂S de LIA. De acuerdo con sus características estas cepas pueden incluirse en el género *Enterobacter*.

FENON B

Reune al mayor número de cepas del estudio, con un nivel de semejanza del 81%. Bacilos gram negativos, móviles y catalasa positivos, se desarrollan bien a un rango de 3-5% de NaCl, crecen a 42°C, fermentan y producen ácido y gas de la glucosa. Son capaces de producir ácidos a partir de: lactosa, sacarosa, manitol,

sorbitol, arabinosa, maltosa, xilosa, manosa y trehalosa, no hidrolizan la urea ni la gelatina, crecen y producen gas en caldo MacConkey, reducen los nitratos. Son indol y rojo de metilo positivos, pero negativos en la producción de acetilmetil carbinol y utilización del citrato. Descarboxilan la lisina y fermentan el manitol. La cepa de referencia *Escherichia coli* ha quedado incluida en este fenón

FENON C

Comprende a 6 microorganismos unidos a un nivel de semejanza del 82%. Son bacterias gram negativas de forma bacilar, catalasa y movilidad positivas, crecen en NaCl al 3-5%, pero no al 10 y 15%. Crecen a 43°C, fermentando la glucosa y produciendo H₂S de TSI. Son capaces de producir ácidos a partir de: glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, arabinosa, maltosa, xilosa, manosa y trehalosa, pero no de inulina ni myo-inositol. Son ureasa positivos, crecen y producen gas en caldo MacConkey, reducen los nitratos e hidrolizan el almidón. Son negativos para la prueba del Voges Proskauer, citrato y rojo de metilo positivos, arginina dehidrolasa negativos, no descarboxilan la lisina y fermentan el manitol. Por sus características generales este fenón puede incluirse dentro del género *Citrobacter*.

FENON D

Este grupo incluye a 2 cepas unidas a un nivel de semejanza de 84%. Bacilos gram negativos, móviles, catalasa positivos y oxidasa negativos, crecen en NaCl a 3 - 5% y a una temperatura de 42°C. Fermentan la glucosa, producen gas y H₂S de TSI, son capaces de producir ácidos de la mayor parte de los azúcares ensayados excepto de lactosa, sacarosa e inulina. Crecen en medio MacConkey y reducen los nitratos; hemólisis, ureasa y utilización del malonato negativos. No producen gas en caldo MacConkey, no hidrolizan la gelatina, almidón ni esculina. Indol, citrato y Voges Proskauer negativos. Son rojo de metilo positivos, descarboxilan la lisina y la ornitina, producen H₂S en el medio LIA y fermentan el manitol. La cepa de colección de cultivo *Salmonella typhi* ha quedado incluida en este fenón.

FENON E

Las tres cepas que forman este fenón se encuentran relacionadas en un 85% de similitud. Son bacterias gram negativas de forma bacilar, móviles, oxidasa negativas y catalasas positivas. Crecen en NaCl a concentraciones de 0 a 10%, no crecen a 42°C, fermentan la glucosa y no

producen H₂S de TSI. Son capaces de producir ácidos a partir de: glucosa, manitol, sorbitol, arabinosa, dulcitol, maltosa, xilosa, manosa y trehalosa, pero no de la inulina. Ureasa positivos, reducen los nitratos y no son hemolíticas, hidrolizan la gelatina y esculina pero no el almidón. No producen indol, son Voges Proskauer y citrato positivos. Arginina dehidrolasa negativas, ornitina y lisina descarboxilasa positivas, no producen H₂S de LIA, fermentan el manitol. De acuerdo con sus características generales estas cepas pueden incluirse en el género *Serratia*.

FENON F

Microorganismos gram negativos reunidos a un nivel de semejanza de 84%. Son de forma bacilar, móviles, catalasa positivos y oxidasa negativos. No producen gas ni H₂S de TSI, producen ácidos a partir de: glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, arabinosa, maltosa, xilosa, manosa y trehalosa, pero no de dulcitol, adonitol y myo-inositol. Ureasa negativos, crecen en medio MacConkey, no son hemolíticos, hidrolizan la esculina, pero no la gelatina. Son Voges Proskauer y citratos negativos, rojo de metilo positivos, ornitina descarboxilasa positiva. No producen H₂S de LIA, fermentan el manitol. Estas bacterias por sus características pueden incluirse en el género *Shigella*.

FENON G

Este grupo incluye a cuatro cepas de bacilos gram negativos, catalasa positivos, móviles y oxidasa negativos. Crecen a 42°C, no producen gas ni H₂S de TSI, producen ácidos a partir de: sorbitol, maltosa y trehalosa, pero no de inulina, glicerol, dulcitol, adonitol, myo-inositol ni xilosa. Malonato y ureasa negativos, no producen gas en caldo MacConkey, hemolisina y nitrato positivos, hidrolizan la esculina, pero no la gelatina. Son rojo de metilo positivos, indol, citrato y Voges Proskauer negativos. No producen H₂S de LIA, son lisina descarboxilasa negativas, ni fermentan el manitol. Las cepas agrupadas en este fenón pueden incluirse en el género *Yersinia*.

FENON H

Es el segundo grupo más numeroso del presente estudio, incluye 18 cepas unidas a un nivel de semejanza del 83%. Son cocos gram positivos, catalasa, movilidad y oxidasa negativos. Crecen a 42°C, fermentan la glucosa y no producen gas ni H₂S en medio TSI. Originan ácidos a partir de: glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol,

arabinosa, maltosa, manosa y trehalosa, pero no de dulcitol. No reducen los nitratos, son ureasas y hemolisina negativos. No crecen en medio MacConkey, hidrolizan la esculina, pero no la gelatina ni el almidón. Son negativos para indol, Voges Proskauer, citrato, arginina de hidrolasa, lisina descarboxilasa y producción de H₂S en medio LIA. Son rojo de metilo positivos. De acuerdo con sus características estas cepas quedan incluidas en el género *Streptococcus*.

DISCUSION

Al analizar los resultados obtenidos apreciamos una clara diferenciación de grupos taxonómicos encontrados en este tipo de queso. La familia *Enterobacteriaceae* (fenones A, B, C, D y E) y otro grupo representado por el género *Streptococcus* (fenón H), corresponden al mayor número de bacterias encontradas. (Fig. 2). De acuerdo con la reglamentación sanitaria de los alimentos (1982), *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*, no deben estar presentes por ser la causa de severas gastroenteritis.

La determinación de algunos o todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como indicadores de las condiciones sanitarias de los alimentos, ha merecido la atención de un número cada vez mayor de investigadores en este rubro. En nuestro caso, el presente estudio concuerda con los resultados de Camacho & Sierra (1988), Furtado (1980) y Fernández et al. (1982), quienes encontraron en gran número la presencia de miembros de las Enterobacterias en leche de procedencia rural, con la cual posteriormente se elabora el queso de cabra. Predominante es la presencia del coliforme fecal *Escherichia coli* (fenón B), lo cual indica la mala calidad sanitaria del alimento, que de acuerdo a la reglamentación del Servicio Nacional de Salud impediría su distribución al público. La presencia de *Escherichia coli* (indicador de contaminación), se relaciona con la presencia de *Salmonella* (fenón D) aunque no en un número elevado, pero debe considerarse en el momento que alcance una dosis infectante. Más aun, teniendo presente que el queso, es expuesto al sol, situación que le otorga una temperatura adecuada para la multiplicación de los patógenos, que encuentran en este habitat un excelente medio de cultivo. Destacamos que *Salmonella* es muy sensible a los cambios de pH, lo cual podría limitar su crecimiento, debido a situaciones ecológicas (sucesiones microbianas, competencia, etc.) que se presentan en este alimento durante su maduración (Fernández et al., 1982). No obstante, este microorganismo nos alerta en cuanto a constituir una posible fuente de contagio de fiebre

tifoidea, la cual aumenta en forma alarmante en la Región Metropolitana y V, en períodos de verano, debido al consumo de alimentos contaminados.

El otro grupo que merece atención dentro de la Enterobacterias es el género *Shigella*, representado en este trabajo por el fenón F y que es segundo en predominancia numérica en el grupo de la familia *Enterobacteriaceae* (Fig. 2). Maurelli & Sansonetti (1988) señalan, que la shigellosis o disentería bacilar se presenta en localidades donde las condiciones de sanidad e higiene son precarias, siendo los niños los afectados en mayor número por esta enfermedad entérica. La presencia de *Shigella* en los alimentos, siempre está correlacionada con la de *Escherichia coli* enteropatógena, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio. Otro patógeno aislado fue *Yersinia* (fenón G), siendo en la actualidad un agente importante que causa gastroenteritis. Se aísla de animales, leche y otros subproductos. La presencia de *Citrobacter* (fenón C), *Serratia* (fenón E) y *Enterobacter* (fenón A), sugiere también su procedencia del tracto intestinal del hombre y animales homotermos. Aunque no está bien esclarecido, estos organismos también pueden causar trastornos intestinales y son considerados dentro de los índices de calidad higiénica de los alimentos

(Jay, 1984).

Otro fenón de importancia sanitaria se encuentra representado por el género *Streptococcus* (fenón H), el cuales es considerado también, como indicador de las condiciones higiénicas de los alimentos. Al igual que los coliformes, sus integrantes son originariamente de origen fecal, estando *Enterococcus faecalis* (= *Streptococcus faecalis*) más relacionado con el intestino humano y de los animales (Bartley & Slanetz, 1960).

Linden et al, (1926) fueron los primeros en descubrir la toxinfeción alimentaria por *Streptococcus* investigando dos brotes debidos al consumo de queso. Encontraron que este microorganismo es el predominante en estos casos, pudiendo comprobar el mismo patrón de transmisión por alimento que en la fiebre tifoidea.

Los resultados obtenidos de la taxonomía numérica aplicando medios selectivos de aislamiento, nos sugiere que es necesario realizar un estudio más acabado de la microbiota total del queso, aplicando medios no selectivos para poder así obtener un mayor espectro de microorganismos totales del producto. De todas maneras destacamos, que deben tomarse mayores medidas de higiene y de control sanitario, dada la alta carga microbiana de este producto que se expende en los mercados muestreados.

REFERENCIAS

- 1.- APHA. Asociación Americana de Salud Pública. (1960). Standard methods for the examination of dairy products. Microbiological and Chemical. New York, N.Y.
- 2.- Bartley, C.H. & Slanetz, L.W. (1960). Types and sanitary significance of fecal streptococci isolated from feces, sewage and water. A.J. Pub. Health. 50: 1545-1552.
- 3.- Beccovier, H. & Mollaret, H. H. (1984). Genus *Yersinia*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Krieg, N.R. & Holt, J.G. (Ed.). William and Wilkins. Baltimore.
- 4.- Camacho, L. & Sierra, C. (1988). Diagnóstico sanitario y tecnológico del proceso artesanal del queso de cabra en Chile. Arch. Lat. Amer. Nutric. Vol. XXXVIII pp. 938-944.
- 5.- Fernández, E.E., Castillo, A.A. & Viteche, R.T. (1982). Destino de *Salmonella* artificialmente inoculada en la leche durante la elaboración de quesos frescos no pasteurizados. Rev. Lat-amer. Microbiol. 24: 235-240.
- 6.- Furtado, M. (1980). Fabricação de queijo de leite de cabra. Sao Paulo, Ed. Nobel.
- 7.- Grimont, P.A.D. & Grimont, F. (1984). Genus *Serratia*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Krieg, N.R. & Holt J.G. (Ed.) William and Wilkins. Baltimore.
- 8.- Jay, J. M. (1984). Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- 9.- Linden, B. A., Turner, W.B. & Thom, C. (1926). Food poisoning from a *Streptococcus* in cheese. Pub. Health. Repts. 41: 1647-1652.
- 10.- Marquez, M.C., Ventosa, A. & Ruiz-Berraquero, F. (1987). A taxonomic study of heterotrophic halophilic and non-halophilic bacteria from a Solar Saltern. J. of Gen. Microbiol. 133:45-56.
- 11.- Maurelli, A.T. & Sansonetti, P. J. (1988). Genetic determinants of *Shigella* pathogenicity. Ann. Rev. Microbiol. 42: 127-150.
- 12.- Pinto, C. & Houbraken, A. (1976). Métodos de análisis químico de leche y productos Lácteos. Santiago (FAO).
- 13.- Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Varela, F., Megias, L. & Ramos-Cormenzana, A. (1983). Numerical taxonomy of

- moderately halophilic gram-negative bacteria from hypersaline soils. *J. of Gen. Microbiol.* 129: 2649-2657.
- 14.- **Reglamento Sanitario de los Alimentos.** (1982). Ministerio de Salud Pública, Santiago, Chile.
- 15.- **Richard, C.** (1984). Genus *Enterobacter*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. Krieg, N. R. & Holt, J. G. (Ed.). William and Wilkins. Baltimore.
- 16.- **Rohlf, F. J.** (1985). Numerical taxonomy system of multivariate statistical programs. State University of New York. Stony Brook.
- 17.- **Rowe, B. & Gross, R.** (1984). Genus *Shigella*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I, Krieg, N.R. & Holt, J. G. (Ed.). William and Wilkins. Baltimore.
- 18.- **Sakazaki, R.** (1984). Genus *Citrobacter*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I. Krieg, N. R. & Holt, J. G. (Ed.). William and Wilkins. Baltimore.
- 19.- **Sneath, P.H.A. & Johnson, R.** (1972). The influence on numerical taxonomic similarities of errors in microbiological test. *J. Gen. Microbiol.* 72: 377-392.
- 20.- ----- & **Sokal, R.R.** (1973). Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. San Francisco, W.A.H. Freeman.
- 21.- **Sokal, R. R. & Michener, C. D.** (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: 1409 -1438.