



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**COMPARACIÓN DE ESTRATEGÍAS
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
MIEMBROS DEL GÉNERO *Serratia***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO
ACADÉMICO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

LUCIANO HERNÁNDEZ GOMÉZ

Tutor: DRA. MARÍA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ

MÉXICO, D. F.

Enero 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMPARACIÓN DE ESTRATEGÍAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MIEMBROS DEL GÉNERO *Serratia*

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Nuñez Valdez en el laboratorio de Manejo Integrado de Plagas. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Maria Eugenia Nuñez Valdez
Dra. Biserka Sveshtarova Perkarkova
Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM
Facultad de Química, UNAM
Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la tutoría del M en C. Alfredo Echegaray Alemán (Finado), del Laboratorio de Microbiología Experimental del Departamento de Biología. Facultad de Química, UNAM; quién me asesoró en el inicio de mi Maestría.

Dedico este trabajo:

A mi esposa María de Lourdes por su apoyo, compañía y por ser parte de mis sueños e ilusiones.

A mis hijos María Fernanda y Luciano de Jesús con cariño y mucho amor.

A mi Mamá Margarita porque me enseñó a luchar hasta el final.

Agradecimientos:

Agradezco especialmente a la Dra. María Eugenia Nuñez Valdez y al Dr. Javier Villalobos por su apoyo en la realización de este trabajo, principalmente por brindarme su amistad y confianza durante todo este tiempo.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por su apoyo y amistad en la revisión y realización de algunos aspectos teóricos de este trabajo.

A los integrantes del jurado: Dra. María Eugenia Nuñez Valdez, Dr. Gonzalo Castillo Rojas, Dra. Biserka Sveshtarova Perkarkova, Dra. Yolanda López Vidal y Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, por sus apreciables comentarios y su valioso tiempo que ocuparon para la mejora de este trabajo.

Al Dr. Rodolfo Pastelín Palacios Jefe del departamento de Biología de la facultad de Química UNAM, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Francisco Quiñones Jefe del laboratorio de Microbiología Clínica del INER, por su apoyo técnico en la realización de pruebas bioquímicas con el Sistema ARIS.

A la Dra. Yolanda López Vidal Jefe del departamento de Microbiología y Parasitología de la facultad de Medicina UNAM, por su apoyo en la realización de pruebas bioquímicas con el sistema Microscan.

A María Antonieta Silva Chávez y Laura Ramírez Mauricio del CEPARIO de la facultad de Química, por su apoyo y amistad que brindaron durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Esther Aguilar Cárdenas por sus valiosos comentarios para la mejora de este trabajo.

A la M en C Rosa María Ramírez Gama por sus valiosos comentarios para la mejora de este trabajo.

A la QFB Consuelo Ontiveros del laboratorio de Microbiología Clínica del INCMNSZ, por haber obsequiado la cepa de *S. marcescens* ATCC 8100.

INDICE GENERAL

	Página
RECONOCIMIENTOS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iv
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
ABREVIATURAS	viii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades.	1
Género <i>Serratia</i> .	5
Nicho ecológico del género <i>Serratia</i> .	8
Plagas.	10
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo general.	15
Objetivos particulares.	15
MATERIAL Y MÉTODO	16
Cepas utilizadas.	16

Método de identificación bacteriana.	17
Pruebas bioquímicas.	17
Métodos semi-automatizados de identificación bacteriana.	17
Comparación de las secuencias del gen <i>16S RNAr</i> del género <i>Serratia</i> .	18
Comparación de los métodos de amplificación.	19
Extracción de ADN.	19
Amplificación del espacio intergénico por PCR.	19
Determinación de parentesco.	20
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS	50
BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

La tipificación bacteriana de manera tradicional o por métodos automatizados se realiza mediante la respuesta metabólica a diversos sustratos; tales como, utilización de hidratos de carbono, asimilaciones de diferentes fuentes de carbono, descarboxilaciones o desaminación de aminoácidos, etc. Actualmente el uso de la taxonomía molecular permite hacer relaciones filogenéticas de género y especie, mediante el análisis de diversos genes o regiones genéticas tales como el *RNAr 16S*, de los espacios intergénicos del RNA ribosomal, análisis del gen RNA de transferencia, el gen para RNA polimerasa III, así como otras señales de reconocimiento requeridas para el proceso de transcripción. El objetivo del presente trabajo fue comparar diferentes estrategias metodológicas para la identificación de miembros del género *Serratia*. Se caracterizaron quince cepas del género *Serratia* y seis de diferentes géneros, para comparar las cepas fueron sometidas a pruebas bioquímicas convencionales y a 2 métodos semiautomatizados (Microscan y Sensititre); se realizó la extracción de DNA para todas las cepas estudiadas y se realizó la amplificación del espacio intergénico por PCR. Se llevó a cabo la comparación de las secuencias del gen *RNA ribosomal 16S* de los diferentes miembros del género *Serratia* obtenidos del banco de genes y secuencias NCBI. De las 21 cepas bacterianas sometidas a pruebas bioquímicas, el método estándar identificó correctamente a 20/21 (95%) de las cepas; el sistema Microscan, identificó correctamente sólo 12/21 (57%) y el método Sensititre a 11/21 (52%) de las cepas estudiadas, siendo principalmente cepas del género *Serratia* las no identificadas. La amplificación del espacio intergénico 16S-23S mostró la presencia de polimorfismo genético en las 21 cepas estudiadas, pudiendo hacer una adecuada discriminación en la identificación de los miembros del género *Serratia*. El análisis de las secuencias del *RNAr 16S* de 23 miembros del género *Serratia* y 3 de otros géneros, mostró que el porcentaje de parentesco con respecto a *S. entomophila* fue de 99.9% para *S. ficaria*, de 95.9 al 98.7% para las otras especies y de 94.2% para *E. coli*. Se concluye que, el método de identificación bioquímica convencional es más adecuado para la identificación de los miembros del género *Serratia* en comparación con los métodos semiautomatizados. La PCR utilizando los iniciadores indicados para la amplificación del espacio intergénico 16S-23S mostró una correcta diferenciación de las cepas estudiadas, permitiendo así, una buena discriminación entre las diferentes especies estudiadas para su tipificación. El análisis de las secuencias de nucleótidos del gen *RNAr 16S*, no permitió agrupar a las diferentes especies analizadas, debido al parentesco tan cerrado entre ellas.

SUMMARY

Bacterial identification in a traditional way done by automated methods is carried out by the metabolic answer to diverse substrates; such as, use of carbohydrate, assimilations of different carbon sources, decarboxylation or desamination of amino acids, etc. At the moment the molecular taxonomy allows to make relationships of gender phylogenetics and species, by analyzing some as genes the *16S rRNA*, the intergenetic spaces of the ribosomal RNA, carrying regulated regions, transfer RNA, RNA polimerasa III gene and other recognition signs required for the transcription process. The aim of the present study was to compare different methodologic strategies for the identification of members of the *Serratia* genus. Fifteen strains of the *Serratia* genus and six of different genus were studied, which were subjected to conventional biochemical tests and 2 automated methods (Microscan and Sensititre); chromosomal DNA was extracted from each strains by phenol method and used for the amplification of the intergenetic spaces by PCR. Comparison of the sequences of the *16S ribosomal RNA* gene of the different members of the *Serratia* genus obtained from gene bank. Was done from the 21 bacterial strains subjected to biochemical tests, the standard method identified correctly at 20/21 (95%) of the strains; the Microscan system, correctly only identify 12/21 (57%) and the Sensititre system at 11/21 (52%) of the studied strains; strains of the *Serratia* genus were the main group not identified. The amplification of the intergenetic spaces 16S-23S showed the presence of genetic polimorfism in the 21 studied strains, being able to make an appropriate discrimination in the identification of the members of the *Serratia* genus. The analysis of the sequences of the *16S rRNA* of 23 members of the *Serratia* genus and 3 other genus, showed that the similarity regarding to *S. entomophila* was of 99.9% for *S. ficaria*, 95.9 to 98.7% for the other species and of 94.2% *E. coli*. In conclusion, the biochemical identification by conventional methods is better for the identification of the members of the *Serratia* genus, in comparison to the semi-automated methods. The amplification of the intergenetic spaces 16S-23S by PCR showed a good differentiation of the studied strains, allowing, a better discrimination between the different studied *Serratia* species. Analysis of the nucleotide sequences of *16S rRNA* gene, did not allow clustering the different *Serratia* species of the study, because of the relationship so closed among them.

ABREVIATURAS

ACE	Acetato
ADO	Adonitol
ARA	Arabinosa
ARG	Arginina descarboxilasa
CIT	Citrato de Simon's
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Presencia de Deoxirribonucleasa
Eae13048	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048
EaeL3	<i>E. aerogenes</i> L3
EaeLT	<i>E. aerogenes</i> LT
Eco25922	<i>E. coli</i> ATCC 25922
ESC	Hidrólisis de Esculina
FAD	Fenilalanina deaminasa
GEL	Hidrólisis de la Gelatina
GLU	Glucosa
H ₂ S	Producción de Ácido sulfhídrico
IND	Producción de Indol
INO	Inositol
ISR	Espacio intergénico
ITA	Crecimiento en Itaconato
Kpn10031	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031
LAC	Lactosa
LIS	Lisina descarboxilasa
MAL	Malonato
MEL	Melibiosa
MOV	Movilidad
NIT	Reducción de Nitratos a nitritos
ONPG	Orto-nitrofenil-galactosidasa
ORN	Ornitina descarboxilasa
OXI	Presencia de citocromo oxidasa
pADAP	Plásmido asociado a la enfermedad ambarina
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
RAF	Rafinosa
RHA	Ramnosa
RM	Rojo de Metilo
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
RNAsa III	Polimerasa III del ácido ribonucleico
RNAt	Ácido ribonucleico de transferencia
SAC	Sacarosa
SetA1M02	<i>S. entomophila</i> A1M02
SetUC7	<i>S. entomophila</i> UC7
SetUC9	<i>S. entomophila</i> UC9

Sfc33105	<i>S. ficaria</i> ATCC 33105
Sfo29844	<i>S. fonticola</i> ATCC 29844
Sgr35478	<i>S. grimesii</i> ATCC 35478
Sh1A	Unidades proteicas hemolítica A
Sh1B	Unidades proteicas hemolítica B
Slq27592	<i>S. liquefaciens</i> ATCC 27592
Smc50a	<i>S. marcescens</i> 50a
Smc8100	<i>S. marcescens</i> ATCC 8100
Smc83a	<i>S. marcescens</i> 83a
Smc94	<i>S. marcescens</i> 94
Smc97b	<i>S. marcescens</i> 97b
SmcFHs48	<i>S. marcescens</i> FHS48
SmcMAC	<i>S. marcescens</i> MAC
Sod33077	<i>S. odorifera</i> ATCC 33077
SOR	Sorbitol
Spl15928	<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928
SptAgR142	<i>S. proteamaculans</i> AgR142
Srb27593	<i>S. rubidea</i> ATCC 27593
SspMor4	<i>Serratia sp</i> MOR4.1
TAL	Crecimiento en Talio-Capriolato
TAR	Tartrato
TRE	Trealosa
URE	Hidrólisis de Urea
UV	Luz ultra violeta
VchV074	<i>V. cholerae</i> V074 No O1
VP	Voges-Proskauer

INDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Larva de escarabajo comúnmente llamada “gallinas ciegas” o nixticuil.	10
Figura 2. Árbol filogenético (Dendrograma) de las 21 cepas estudiadas, obtenido de las pruebas bioquímicas con el programa estadístico SPSS versión 11.0	29
Figura 3. Sitios polimorficos en el gen <i>16S RNAr</i> de las diferentes especies de <i>Serratia</i> y otros generos.	30
Figura 4. Análisis filogenético del gen <i>16S RNAr</i> de las 26 secuencias de nucleótidos de las especies de <i>Serratia</i> y otros géneros, obtenidas del banco de genes (NCBI).	33
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico <i>16S-23S RNAr</i> , de las cepas de <i>Serratia</i> y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Ibrahimos.	34
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico <i>16S-23S RNAr</i> , de las cepas de <i>Serratia</i> y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Jensen.	35
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico <i>16S-23S RNAr</i> , de las cepas de <i>Serratia</i> y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Jensen.	36
Figura 8. Esquema de Polimorfismo genético generado por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico <i>16S-23S RNAr</i> , de las cepas de <i>Serratia</i> y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Jensen.	37
Figura 9. Árbol filogenético (Dendrograma) del polimorfismo genético obtenido a partir de los productos de PCR para la amplificación de ISR del <i>16S RNAr</i> con los iniciadores propuestos por Jensen <i>et al</i> para las 21 cepas estudiadas, conseguido con el programa estadístico SPSS versión 11.0.	41
Figura 10. Árbol filogenético (Dendrograma) del polimorfismo genético obtenido a partir de los productos de PCR para la amplificación de ISRs del <i>16S RNAr</i> con los iniciadores propuestos por Jensen <i>et al</i> para 7 cepas de <i>S. marcescens</i> y una cepa de <i>Serratia sp</i> , conseguido con el programa estadístico SPSS versión 11.0.	42

INDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas por el método convencional para los 21 cultivos bacterianos en estudio.	26
Tabla 2. Comparación de los métodos automatizados y el convencional en la identificación de las especies del género <i>Serratia</i> .	27
Tabla 3. Promedio de asociación entre los grupos de acuerdo a la correlación de Pearson con las pruebas bioquímicas de las 21 cepas estudiadas.	28
Tabla 4. Numero de bandas para cada peso molecular, obtenidos en los productos de PCR para la amplificación de espacio intergénico entre el <i>16S-23S RNAr</i> con los iniciadores propuestos por Jensen <i>et al</i> para las 21 cepas estudiadas.	39
TABLA 5. Relación de acercamiento entre los grupos de acuerdo a la correlación de Pearson del polimorfismo genético obtenidos de los productos de PCR para la amplificación de ISR entre el <i>16S-23S RNAr</i> con los iniciadores propuestos por Jensen <i>et al</i> para las 21 cepas estudiadas.	40

INTRODUCCIÓN

Generalidades

Los sistemas de identificación o de clasificación de microorganismos presentan una variedad de métodos, que se basan en la observación y manifestación de características morfológicas, metabólicas y genéticas, donde los microorganismos se caracterizan de acuerdo a similitudes o parentescos pertenecientes a grupos microbianos previamente establecidos (Lim, 1998).

En la actualidad existen esquemas de clasificación muy variados y complejos, pero ninguno es completamente satisfactorio para todos los microorganismos, porque además de que las bacterias se reproducen y crecen en tasas altas, el intercambio de material genético que se da entre ellas, permite modificaciones constantes, que trae como consecuencia cambios estructurales, metabólicos y/o genéticos en los microorganismos. Muchas veces tales cambios no son fácilmente incorporados dentro de la mayoría de los sistemas de clasificación; sin embargo, pueden ser adaptables a esquemas que contemplen la divergencia evolutiva (Woese, 1987; Lim, 1998).

La identificación o clasificación de microorganismos se basa principalmente en sus características físicas y químicas como su capacidad tintorial, presencia de recubrimientos externos como la cápsula, número de flagelos y la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el genoma bacteriano. Dichas enzimas pueden ser detectadas a través del uso de medios de cultivo con sustratos especiales, donde se incorpora un sistema de detección que indica la actividad enzimática producida por el metabolismo bacteriano. De esta manera los resultados obtenidos en los sustratos empleados determinan de acuerdo a los tabuladores la identificación de una especie particular dentro de un género específico (Koneman, *et al.*, 1999; Mac Faddin, 1993).

La preparación de estos sustratos y el uso de métodos para la interpretación de los resultados suele ser tardado y costoso. De ahí que en la actualidad el uso de los sistemas semi-automatizados de identificación microbiana en los laboratorios de microbiología venga en aumento. Estos sistemas consisten de una serie de tubos miniaturizados y/o placas con multi-compartimientos que contienen

sustratos individuales, así como el uso de tiras o discos de papel impregnados con sustrato deshidratado. Todos estos métodos incluyen un sistema de identificación que previamente fue seleccionado y aprobado para su uso específico (Richard, *et al.*, 1991).

Las ventajas que ofrecen estos sistemas son tiempos reducidos de reacción de hasta cuatro horas de incubación, sistemas mecánicos o automatizados para la inoculación de placas, lectura e interpretación automática de resultados, porcentajes de tipificación, identificación extendida a otros posibles grupos de microorganismos y miniaturización de los sustratos. Las desventajas que pueden presentar estos sistemas son el costo elevado, necesidad de entrenamiento del personal, utilización de pruebas adicionales para la diferenciación y personal de apoyo para mantenimiento de los equipos (Richard, *et al.*, 1991; Koneman, *et al.*, 1999).

En ocasiones la diferenciación de algún microorganismo por el sistema de identificación convencional basado en las reacciones metabólicas de los microorganismos es imposible, debido a las similitudes en el metabolismo con otras especies bacterianas, por lo que es necesario utilizar nuevas estrategias tecnológicas que ayuden en la diferenciación. En la actualidad una de estas metodologías que se usa con mayor frecuencia en la caracterización de microorganismos es la amplificación de ácidos nucleicos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta metodología se describe como un método para la construcción de identidades de organismos a partir de pequeñas cantidades de material genético, el cual amplifica diminutos sitios o locus y hace copias de éste para su estudio (Jensen, *et al.*, 1993; Woese, 1987).

Algunos autores indican que con la taxonomía molecular es posible establecer relaciones filogenéticas de género y especie en base a el locus del RNA ribosomal (RNAr). También se indica que el RNAr se emplea principalmente para establecer relaciones evolutivas de organismos procariontes y eucariontes, así como la identificación bacteriana a nivel de género y especie (Jensen, *et al.*, 1993; Woese, 1987).

El RNAr es una unidad genética altamente conservada en sus tres diferentes moléculas, donde la más pequeña es el 5S con aproximadamente 125 nucleótidos, seguida del 16S con cerca de

1,500 nucleótidos y el 23S que cuenta con aproximadamente 2,900 nucleótidos (Lim, 1998; Jensen, *et al.*, 1993; Woese, 1987).

El locus de RNAr contiene genes de RNA de transferencia (RNAt), así como largas y complejas regiones regulatorias y regiones de espacios intergénicos (ISR). Estos ISR están localizados entre los genes de un operón bacteriano que contiene genes de RNAt y algunas secuencias blanco para RNAsa III y otras señales de reconocimiento requeridas para el proceso de transcripción (Antón, *et al.*, 1998).

El número de operones de RNAr en bacterias varía entre uno y once, frecuentemente en múltiples operones puede estar presente el mismo tipo de ISR, los cuales, en general poseen una estructura secundaria y genes de RNAt, pero en algunos casos los ISRs presentan secuencias extensas y variaciones en sus tamaños. Este polimorfismo ha sido descrito en los diferentes locis del RNAr del mismo cromosoma bacteriano y en diferentes cepas bacterianas (García, *et al.*, 1996 y 1996b; Chun, *et al.*, 1999).

Los ISRs, especialmente aquellos localizados entre los genes 16S y 23S, presentan mayor variación genética que las regiones que codifican para el RNAr. Debido a que el DNAr 16S presenta menor variabilidad que los ISRs en los géneros bacterianos que no permiten diferenciar especies con un alto porcentaje de homología en la secuencia del DNAr 16S el análisis del polimorfismo de los ISR podría discriminar a las diferentes especies bacterianas. Además de que los hace útiles como cronómetros moleculares para medir filogenia de corto plazo. (García, *et al.*, 1996b).

Jensen, *et al.* en 1993 disertaron un juego de iniciadores y desarrollaron las condiciones para realizar la técnica de PCR que amplifica las regiones de los ISR, que se encuentran entre los genes 16S y 23S del RNAr de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. La amplificación de estos ISRs permite observar un polimorfismo génico, que ayuda al reconocimiento del género y especie bacteriana debida a una diversidad en las variaciones en número y tipo de secuencias del RNAr y de los ISRs en el genoma bacteriano.

Para comparar especies microbianas se pueden emplear caracteres que evidencien una historia evolutiva compartida, o bien para establecer las relaciones de hermandad entre las especies. Asumiendo que determinadas similitudes reflejan el parentesco entre ellas. Los coeficientes de parentesco o de similitud son utilizadas para determinar las similitudes o parentescos entre dos o más organismos (Elios, *et al*, 2005; Lim, 1998) estos se definen a continuación:

a) Coeficiente de parentesco: la base de este método es el porcentaje de características que son comunes a dos organismos cuando se comparan (esto es características presentes o ausentes en los organismos comparados).

$$\text{Coeficiente de parentesco: } a+d / a+b+c+d$$

En donde,

a: Número de características presentes en ambos organismos.

b: Número de características presentes en organismo 1 y ausentes en organismo 2.

c: Número de características ausentes en organismo 1 y presentes en organismo 2.

d: Número de características ausentes en ambos organismos.

b) Coeficiente de similitud: la base de este método es determinar el porcentaje de características que están presentes en ambos organismos y no se consideran las características ausentes

$$\text{Coeficiente de similitud: } a / a+b+c$$

En donde,

a: Número de características presentes en ambos organismos.

b: Número de características presentes en organismo 1 y ausentes en organismo 2.

c: Número de características ausentes en organismo 1 y presentes en organismo 2.

Estos coeficientes se utilizan indiscriminadamente según convenga al investigador, lo que dará como resultado una hipótesis filogenética o agrupación jerárquica (Dendrograma o Cladograma) que ofrece un mayor grado de precisión para determinar el parentesco entre grupos (Lim, 1998; Nixon, 2001).

Género *Serratia*

En 1823 Bizio denominó *Serratia marcescens* al microorganismo que producía un pigmento rojo en la polenta (masa blanda elaborada con harina de maíz, agua, sal, leche, canela y otros ingredientes); en 1848 Ehrenberg asignó el nombre de *Monas prodigiosa* a una bacteria móvil aislada de manchas rojas en alimentos; Schmidt y Weis en 1902 llamaron a la misma *Coccobacterium*; Fortineau en 1905 le dió el nombre de *Erythrobacillus*. Finalmente, Breed y Breed en 1924 junto con los editores del Manual Bergey's de determinación bacteriológica prefirieron el nombre de *Serratia marcescens* al microorganismo móvil con pigmento rojo (Breed, *et al*, 1957; Grimont, *et al*, 1981).

Abbott, en 1999 clasifica al género *Serratia* como miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, dentro de la tribu *Klebsiellae*, que comprende diez especies bacterianas, aunque sólo se consideran ocho, ya que a *S. liquefaciens*, *S. proteamaculans* y *S. grymessii* han sido agrupadas en el complejo *S. liquefaciens*. La especie más estudiada del género es *S. marcescens*, así como otras especies del mismo que presentan similitudes con los géneros *Klebsiella* y *Enterobacter* (Abbott, en 1999).

Las cepas de *S. marcescens* y el complejo *S. liquefaciens* (*S. liquefaciens*, *S. proteamaculans* y *S. grimesii*) han sido frecuentemente reportadas en infecciones nosocomiales, además de ser la causa de la mayoría de los problemas infecciosos en humanos causados por *Serratia* (Stock, 2003). A excepción de *S. entomophila*, todas las otras han sido asociadas a infecciones en humanos (Farmer III, 1999).

Por otra parte algunas especies del género *Serratia* han sido asociadas a infecciones en insectos, principalmente *S. marcescens* (Grimont, *et al*, 1981).

S. entomophila y *S. proteamaculans* han sido reportada como el agente causal de la enfermedad ambarina en larvas de *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabacidae) la cual es plaga importante en los pastizales de Nueva Zelanda (Grkovic, *et al.*, 1995). *S. entomophila* se ha empleado para desarrollar un insecticida comercial en ese país (Jonson, *et al.*, 2001).

En México se ha iniciado la búsqueda de bacterias entomopatógenas del género *Serratia*, para ser utilizados en programas de manejo integrado de “gallina ciega” (Nuñez-Valdez, *et al.*, 2003b). Estas son larvas del género *Phylophaga* y *Anomala* (Coleoptera: Scarabaeidae) que se alimentan de las raíces de numerosos cultivos, causando de esta manera cuantiosas pérdidas. La identificación precisa de la especie de *Serratia* causante de la enfermedad es de gran importancia por el uso potencial de estos microorganismos en el campo (Nuñez, *et al.*, 2003b). No obstante para el uso de esta biotecnología se debe comprobar que los microorganismos a emplear como agentes de control biológico son inocuos para el hombre, animales y otros organismos benéficos para los cultivos y por lo tanto, que no sean una amenaza para el medio ambiente o la salud humana (NSTC, 1995).

Identificación del Género *Serratia*

Como todas las enterobacterias, el género *Serratia* comprende microorganismos del tipo cocobacilos o bacilos gramnegativos que van de 0.3-1.0 μm de ancho y 0.6-6.0 μm de largo; son no esporulados, móviles, protótrofos (no requieren factores de crecimiento), crecen en agar Mac Conkey, son mesófilos capaces de desarrollarse a temperaturas de 28 a 37° C, quimioheterótrofos, anaerobios facultativos, fermentadores de la glucosa y otros hidratos de carbono, producen gas, son catalasa positivo, oxidasa negativo y reducen los nitratos a nitritos. Además, este género tiene algunas cepas que producen pigmento y otras producen compuestos aromáticos, con aroma a verduras o pescado en descomposición (Abbott, 1999; Grimont, *et al.*, 1981; Holt, 1994; Kelly, 1985).

Para Michael T. Kelly (Kelly, 1985) y Grimont (Grimont, *et al*, 1981) exponen esquemas de identificación basados en la tipificación tradicional en la que determinan la respuesta metabólica a diversos sustratos. En estos la mayoría de los miembros del género *Serratia* se caracterizan por expresar reacciones negativas a arginina descarboxilasa, producción de ácido sulfídrico (H₂S), fenilalanina deaminasa (FAD) y ureasa, una reacción positiva a citrato de Simon's, a la reacción de orto-nitrofenil-galactosidasa (ONPG), a la fermentación de glucosa, manitol y trealosa. Presenta también enzimas extracelulares hidrolíticas como la deoxirribonucleasa (DNAsa) y una proteasa de gelatina.

Los cultivos del género *Serratia* como *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymutica* y *S. rubidae* pueden producir un olor similar a pescado en descomposición que se atribuye a la producción de trimetilamina y amoníaco. Por otro lado, *S. odorifera*, *S. ficaria* y *S. rubidae* pueden producir un aroma similar a verduras crudas debido a la aparición de 2-metoxi-3-isopropilpirazina (Krieg, 1984).

La producción de pigmento es característica peculiar de *S. marcescens*, ya que esta especie puede desarrollar dos tipos de pigmentos; un pigmento rojo conocido como prodigiocina y uno rosa conocido como pirimina. La prodigiocina (2-metil-3-amil-6-metoxi-5 (2-pirril)-2,2'-dipirrimetano) es un pigmento no difusible, insoluble al agua, adherido a la pared celular de los microorganismos que la producen, por lo que las colonias formadas por éstos son de color rojo. Este pigmento además de ser producido por *S. marcescens* puede ser producido, aunque en menor frecuencia, por *S. liquefaciens*, *S. plymutica* y *S. rubidae*. La pirimina (ácido-L2-(2-piridil)-pirrolina-5-carboxílico) es un pigmento difusible y soluble en agua, lo que le da un aspecto de color rosa al medio mientras que las colonias producidas son blancas (Krieg, 1984).

También se ha descrito un pigmento amarillo (ácido-2-hidroxi-5carboximetil-muconico) que es difusible producido por *S. marcescens*, implicado en el metabolismo de compuestos aromáticos (Trias, *et al.*, 1988).

Por otra parte, *S. marcescens* puede producir hemolisinas las cuales no son excretadas al medio, sino que se quedan asociadas a la pared celular. Las hemolisinas están formadas por dos

unidades proteicas Sh1A y Sh1B, donde la primera es la unidad activa o hemolítica y actúa integrándose en la membrana de los eritrocitos formando canales o poros hidrofílicos que provocan lisis osmótica; la segunda, actúa como unidad activadora de Sh1A, ya que esta primero se secreta como una proteína inactiva y es activada por medio de un cambio conformacional iniciado por la unión de la segunda unidad Sh1B a Sh1A (Walter, *et al.*, 2004).

Nicho ecológico del género *Serratia*

Serratia ficaria se identificó por primera vez en 1979, como parte importante del ecosistema de los árboles de higo. También se ha recuperado a partir de muestras clínicas, relacionándose con infecciones biliares, empiemas de vesícula biliar y sepsis, sobre todo en habitantes de áreas donde se cultivan árboles de higo (Stock, 2003; Bandenoch, 2002).

Serratia fonticola se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza y puede ser aislada de muestras de agua dulce, suelo, aguas residuales, moluscos, aves y muestras clínicas provenientes de heridas en la piel, llagas y tracto respiratorio (Bollet, 1991; Stock, 2003).

Serratia odorifera fue descrita por primera vez en 1978 por Grimont; su reservorio natural es desconocido pero se ha podido aislar ocasionalmente de alimentos de origen vegetal, plantas y muestras clínicas donde se puede relacionar como causa de enfermedad (Stock 2003, Grimont, *et al.*, 1978). Esta especie incluye dos variedades que son: a) *Serratia odorifera* biogrupo 1 descrito por Cook y López en 1998 como patógeno invasivo en brotes epidemiológicos provocando una alta morbi-mortalidad en neonatos y pacientes en condiciones inmunodeprimidas y b) *Serratia odorifera* biogrupo 2, cuyas infecciones son realmente raras (Stock, 2003; Cook, 1998; Chmel, 1988). Esta diferencia en las dos variedades podría sugerir la presencia de elementos móviles o islas de patogenicidad (Gal-Mor, *et al.*, 2006).

Serratia plymuthica ha sido frecuentemente asociada con plantas y aislado de la rizosfera del trigo, avena, pepino, maíz, aceite de colza y papa. También ha sido aislada del agua y de algunos mamíferos pequeños. En clínica es considerado un patógeno importante, siendo que produce una

gran variedad de infecciones que incluyen osteomielitis, peritonitis, neumonía, sepsis e infecciones en piel como llagas (Stock, 2003; Berg, 2000).

Serratia rubidaea se encuentra predominantemente en plantas y en particular en el fruto de *Cocos nucifera*, por lo que las infecciones en humanos relacionadas con esta especie están asociadas al consumo de cocos y ensaladas de vegetales ya que en varios estudios se ha observado un alto grado de contaminación por esta especie. La consecuencia más frecuente es la sepsis en pacientes externos y hospitalizados (Stock, 2003; Rojo, 1996).

Serratia marcescens esta implicada en una gran variedad de infecciones que incluyen el tracto respiratorio y el tracto urinario, infecciones de meninges, peritonitis, en heridas, quemaduras entre otras. Además este microorganismo es considerado uno de los principales causantes de infecciones a nivel nosocomial (Abbott, 1999; Holt, 1994).

Serratia entomophila es causante de la enfermedad ambarina en las larvas de *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae), insecto plaga importante en los pastizales de Nueva Zelanda. La enfermedad fue descrita por Trought y cols. con el aislamiento de *S. entomophila*, la cual subsecuentemente fue desarrollada como un agente para control biológico para *C. Zealandica* la infección es altamente específica para las larvas de escarabajos de Nueva Zelanda (Hurst *et al.*, 2000; Trought, *et al.*, 1982).

La enfermedad ambarina es un proceso que comienza con la adherencia y propagación de *S. entomophila* en el intestino de la larva, donde puede permanecer por periodos prolongados de hasta tres meses; posteriormente, invade el hemocele causando así la muerte de la larva infectada (Hurst, *et al.*, 2000; Giddens, *et al.*, 2000). La sintomatología se manifiesta con una inhibición en la alimentación, decrecimiento brusco de enzimas digestivas y un aspecto de color ámbar a las larvas infectadas (Hurst, *et al.*, 2000).

La enfermedad ambarina aparentemente esta codificada por un plásmido de 115 Kb denominado plásmido asociado a la enfermedad ambarina (pADAP). Este plásmido puede ser transferido experimentalmente por conjugación a otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*

tales como *E. agglomerans*, *E. coli*, *Klebsiella sp*, así como a otras especies del género *Serratia* (*S. marcescens*, *S. proteamaculans* y *S. liquefaciens*), por lo que este plásmido le confiere patogenicidad a la bacteria portadora contra las larvas de los pastizales (Glare, *et al.*, 1993). Los genes asociados a la inhibición de la alimentación se encuentran en una región de 16.9 Kb del plásmido, la cual codifica para los genes *sepA*, *sepB* y *sepC* estos genes son requeridos para la virulencia, ya que, los productos de estos genes son similares a los componentes de la toxina producida por *Photorhabdus luminescens* (Hurst, *et al.*, 2000).

S. entomophila se ha desarrollado comercialmente como bioinsecticida en contra de la plaga de pastos en Nueva Zelanda. Una característica de esta especie es que no se le ha relacionado con infecciones en humanos (Grimont, *et al.*, 1988; O’Callaghan, *et al.*, 1993).

Plagas de insectos

Ciertas plagas, están constituidas por poblaciones de insectos que afectan a los cultivos agrícolas. El control de insectos plaga mediante el uso de agentes biológicos ha avanzado rápidamente. Se ha estimado que mundialmente el 42% de las pérdidas agrícolas se deben al ataque de insectos. Una encuesta aplicada en México a 40 localidades del Estado de Morelos reveló que en un año el muestreado promedio del 32% de productos agrícolas se perdió por el efecto nocivo de la “gallina ciega” (figura 1) lo que equivale a 50 de 150 toneladas de maíz producidas en 92 hectáreas (Villalobos, *et al.*, 2001; Rodríguez, *et al.*, 2005).



Figura 1. Larva de escarabajo comúnmente llamada “gallinas ciegas” o nixticuil. (<http://ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/MaizeSP.htm#1.%20Gusanos>)

El control de plagas por medio de bioinsecticidas es una tendencia de gran interés en agricultura, debido a su naturaleza no tóxica a otros seres vivos (especificidad), facilidad de manejo, bajo costo y el no haber desarrollo de resistencia por parte de la plaga, de esta manera convierten al entomopatógeno en una alternativa importante en la lucha por la protección de los cultivos y a la vez del medio ambiente (Asociación de ingenieros agronomos, 2006; FAO, 2005). Entre los microorganismos más importantes usados como bioinsecticidas se encuentra a: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii*, *Entomophthora sp.*, y *Bacillus thuringiensis*. Cada uno de ellos actúa sobre poblaciones de organismos indeseables, manteniéndolos por debajo de los umbrales de daño biológicos y económicos (FAO, 2005).

Las investigaciones sobre bioinsecticidas en México se han enfocado básicamente en el estudio de *Bacillus thuringiensis*, mientras que el grupo de investigación del Dr. Villalobos y la Dra. Ma. Eugenia Núñez del Centro de Desarrollo e Investigaciones Agropecuarias en la Universidad del Estado de Morelos, México, estudian el control biológico de la gallina ciega [*Phyllophaga sp.*: Coleoptera: *Melolonthidae*], que es la causante de cuantiosas pérdidas en los cultivos de maíz. Este grupo de investigación ha observado los mismos síntomas de la enfermedad amarillina en larvas de *Phyllophaga* obtenidas de los estados de Tamaulipas, Jalisco y Morelos, por lo que sus estudios están basados en la búsqueda de entomopatógenos de larvas enfermas procedentes de estos estados. Todos los microorganismos aislados de las larvas enfermas fueron identificados, de estos algunos pertenecen al género *Serratia*, mismos que han sido utilizados en bioensayos para la reproducción de la enfermedad en larvas de *Phyllophaga* (Rodríguez, *et al.*, 2005).

Un aspecto importante para estas investigaciones es la tipificación correcta del microorganismo, antes de ser usado en los campos de cultivo como control biológico de las poblaciones de larvas. Ya que, si bien es cierto como lo mencionan algunos investigadores que en general las poblaciones pueden ser reguladas por parásitos o enfermedades infecciosas, también sugieren que las poblaciones de invertebrados pueden ser ajustadas más fácilmente por enfermedades infecciosas y parasitarias, a diferencia de las poblaciones de vertebrados que cuentan con un sistema inmune más especializado (NSTC, 1995). Aunque los vertebrados cuenten con un sistema inmune muy eficiente pueden surgir problemas con los agentes infecciosos o parásitos puestos en el medio ambiente, usados en la regulación de poblaciones de plagas, ya que muchos

agentes infecciosos cuentan con factores de virulencia que pueden evadir el sistema inmune y de esta forma infectar al humano directa o indirectamente (NSTC, 1995).

Por tal razón es necesario hacer una identificación precisa del o los microorganismos a usar como bioinsecticida. Dichos microorganismos no deben ser patógenos para otros animales incluyendo al hombre y organismos beneficiosos para los cultivos, especialmente cuando se trata de introducir microorganismos ajenos a los campos agrícolas.

El empleo del género *Serratia* como bioinsecticida es un caso muy especial, ya que la mayoría de sus especies se han relacionado con enfermedades en humanos. Por ejemplo *S. marcescens* se ha aislado de infecciones nosocomiales y se considera de gran importancia por su patogeneicidad, así como por su multiresistencia a antibióticos, esta última característica también la presenta el grupo *S. liquefaciens*. (Volkow, *et al.*, 1993). Otras especies aisladas en los laboratorios clínicos como agentes infecciosos son *S. fonticola*, *S. rubidaea*, *S. odorifera*. La única especie de este género que no se ha relacionado con enfermedades en humanos es *S. enthomophila* (Nelly, 1985; Bollet, *et al.*, 1991; Farmer III, 1999; Rojo, *et al.*, 1996; Chmel, 1988). Estos aspectos hacen difícil el uso de *Serratia* en el campo, además de su ubicuidad en los diferentes habitats que ocupan como es suelo, agua, vegetales, insectos y humanos hospitalizados permite que estos microorganismos puedan ser aislados fácilmente (Grimont, *et al.*, 1981).

JUSTIFICACIÓN

El uso de los diferentes sistemas de identificación para la diferenciación de las especies del género *Serratia* se ha hecho de manera general con el método clásico por medio de la respuesta a diversos sustratos y, actualmente, por métodos moleculares como la secuenciación de gen *RNA ribosomal 16S (RNAr 16S)*. Uno de los problemas con el método clásico es la diferencia metabólica entre las cepas que en ocasiones es muy similar en tanto que otras es variable; respecto al método molecular la secuenciación del *RNAr 16S* entre las diferentes especies tiene altos porcentajes de similitud e incluso puede dar lugar a confusiones a nivel de género. Lo anterior hace necesaria la búsqueda de métodos alternativos que conduzcan a una mejor discriminación entre las diferentes especies y que sean fáciles de realizar.

Una adecuada tipificación de los microorganismos es necesaria si se requieren para ser utilizados como biorreguladores. En este estudio se realizó una comparación de diferentes métodos de discriminación entre especies para seleccionar el más sencillo y eficiente para el género *Serratia*. Para poder utilizar a *S. entomophila* como un controlador de plagas por “gallina ciega”, la cual es devastadora en diversos cultivos de consumo humano.

HIPOTESIS

El análisis de las diferentes especies bacterianas del género *Serratia* utilizando diferentes estrategias metodológicas nos permitirá comparar y seleccionar el mejor método de identificación y discriminación para este género.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar, comparar y seleccionar diferentes estrategias para la identificación de miembros del género *Serratia*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificación de miembros del género *Serratia* por medio de pruebas bioquímicas convencionales.
2. Comparación de dos micrométodos Sistema Aris y Microscan de identificación bacteriana con los miembros del género *Serratia*.
3. Comparación de las secuencias del gen *16S RNA ribosomal* de los diferentes miembros del género *Serratia* obtenidos del GenBank.
4. Comparación de dos métodos de amplificación por PCR de espacios intergénicos del operón ribosomal a partir del DNA extraído de los cultivos del género *Serratia*.

MATERIAL Y METODOS

Cepas utilizadas. Se estudiaron 21 cepas puras, 15 pertenecían al género *Serratia*, de estas, 3 correspondían a la especie *S. entomophila* de las cuales una es la cepa de *S. entomophila* A1MO2 que es una cepa silvestre patógena para las larvas, con Pili positivo y adherencia positiva; *S. entomophila* UC7 que es una cepa mutada a partir del tipo silvestre A1MO2 que tiene como características no ser patógena, además de presentar resistencia a la ampicilina y kanamicina, y *S. entomophila* UC9 que es una cepa mutada a partir del tipo silvestre A1MO2 que tiene como característica ser patógena para las larvas, presentar resistencia a la ampicilina, tener Pili positivo y adherencia positiva, estos cultivos fueron proporcionadas para el presente estudio por la Dra. Núñez de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (FCA-UAEM). Tres cepas de *S. marcescens* fueron obtenidas de diversas fuentes, la cepa de *S. marcescens* MAC fue aislada a partir de una “Gallina Ciega” enferma, la cual fue proporcionada por la Dra. Núñez, la cepa de *S. marcescens* ATCC 8100 fue proporcionada por el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, “Salvador Zubirán” (DI-INCMNSZ) y la cepa *S. marcescens* FHS-48 fue proporcionada por el Cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (C-FQ, UNAM); ocho cepas tipo de este género de diferentes especies fueron obtenidas: *S. proteamaculans* AgR142, *S. liquefaciens* ATCC 27592, *S. rubidea* ATCC 27593, *S. odorifera* ATCC 33077, *S. grimesii* ATCC 35478, *S. ficaria* ATCC 33105, *S. plymuthica* ATCC 15928 y *S. fonticola* ATCC 29844. Todas estas cepas fueron proporcionadas para el presente estudio por la Dra. Núñez; así mismo se estudio un cultivo de *Serratia sp* MOR4.1 con un alto potencial de infección contra “gallina ciega” aislada y proporcionada por la Dra. Núñez. Se estudiaron también una cepa de *E. aerogenes* ATCC 13048 donada por el DI-INCMNSZ y dos cepas de *E. aerogenes* L3 y LT aislados de “Gallina Ciega” enfermas. Ambas cepas tienen potencial infeccioso hacia estos insectos y fueron donadas por la Dra. Núñez; una cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 donada por el C-FQ, UNAM, una cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 donada por el DI-INCMNSZ y una cepa de *Vibrio cholerae* V074 No O1 donada por el Dr. Eslava de la Facultad de Medicina, UNAM.

Métodos de identificación bacteriana

Pruebas bioquímicas. Los medios para las pruebas bioquímicas se prepararon de acuerdo a las instrucciones del proveedor o en su caso de acuerdo a las instrucciones de preparación de medios de cultivo en el capítulo 121 del Manual de Microbiología Clínica (Nash y Krenz, 1999). Para la fermentación de hidratos de carbono se emplearon los siguientes sustratos: Adonitol (ADO); Sacarosa (SAC); Arabinosa (ARA); Sorbitol (SOR); Glucosa (GLU); Trealosa (TRE); Inositol (INO); Lactosa (LAC); Melibiosa (MEL); Rafinosa (RAF); Rhamnosa (RHA). Para la asimilación de sustratos, se emplearon: Malonato (MAL); Acetato (ACE); Tartrato (TAR); Citrato de Simon's (CIT). Para las reacciones de descarboxilación de aminoácidos: Lisina (LIS); Ornitina (ORN) y Arginina (ARG). Para la desaminación de aminoácidos se empleó la Fenilalanina (FDA). Otras pruebas: Reducción de Nitratos a nitritos (NIT); Hidrólisis de la Gelatina (GEL); O-Nitrofenil- β -D-Galactopyranoside (ONPG); Deoxidorribonucleasa (DNAse); Hidrólisis de Urea (URE); Hidrólisis de Esculina (ESC), Rojo de Metilo (RM); Voges-Proskauer (VP); Producción de Sulfhídrico (H_2S); Crecimiento en Talio-Capriolato (TAL); Producción de Indol (IND); Crecimiento en Itaconato (ITA); Movilidad (MOV), Presencia de citocromo oxidasa (OXI). Todos los sustratos fueron inoculados con las 21 cepas y se incubaron a 37° C por 24 horas y se revisaron a las 24 y 48 horas. Las interpretaciones se hicieron de acuerdo al Manual de pruebas bioquímicas de Mac Fadin y del Manual de Determinación Bacteriológica BERGEY'S novena Edición (Holt, et al., 1994; Mac Fadin, 1993).

Métodos semi-automatizados de identificación bacteriana. Se emplearon los métodos automatizados comerciales MicroScan (AUTOSCAN-4, DADE) y Sensititre Sistema ARIS versión 2.0, para ambos métodos se siguieron las instrucciones del proveedor. Brevemente, se preparó una suspensión microbiana de 0.5 en la escala de Mac Farland con cada uno de los 21 cultivos y se inocularon los paneles bioquímicos con dispensadores automáticos y se incubaron a 35° C por 24 y 48 horas, tiempo en el que se pusieron los paneles en los lectores automatizados de cada uno de los sistemas, los cuales hacen la lectura e interpretación de las reacciones obtenidas de acuerdo a su programación.

El sistema Microscan presenta los siguientes sustratos: Adonitol (ADO); Sacarosa (SAC); Arabinosa (ARA); Sorbitol (SOR); Glucosa (GLU); Inositol (INO); Melibiosa (MEL); Rafinosa (RAF); Rhamnosa (RHA); Malonato (MAL); Acetato (ACE); Tartrato (TAR); Citrato de Simon's (CIT); descarboxilación de Lisina (LIS); Ornitina (ORN) y Arginina (ARG), desaminación de Triptofano (TDA), reducción de nitratos (NIT); O-Nitrofenil- β -D-Galactopyranoside (ONPG); Hidrólisis de Urea (URE); Hidrólisis de Esculina (ESC), Voges-Proskauer (VP); Producción de Sulfhídrico (SUL); Producción de Indol (IND).

El sistema Sensititre (Aris) presenta los siguientes sustratos: Sacarosa (SAC); Arabinosa (ARA); Sorbitol (SOR); Trealosa (TRE); Inositol (INO); Rafinosa (RAF); Xilosa (XIL); Maltosa (MALT); Fructosa (FRU); Manitol (MAN); Arabitol (ARAB); Celobiosa (CEL); Malonato (MAL); Citrato de Simon's (CIT), Descarboxilación de Lisina (LIS); Ornitina (ORN); Arginina (ARG); Desaminación de Fenilalanina (FDA); Hidrólisis de Urea (URE); Hidrólisis de Esculina (ESC); Lisina 7 Metil Couramin Amida (FR1); 4-Metil Umbeliferone Fosfato (FR3); 4-Metil Umbeliferone α D-Glucopiranosidasa (FR4); Prolina 7-Metil Coumarin Amida (FR5); 4-Metil Umbeliferone α D-Galactopinosidasa (FR6); Gamaglutamin-7-Metil Coumarin Amida (FR7); 4-Metil Umbeliferone Bis-Fosfato (FR8); 4-Metil Umbeliferone β -D-Glucoronidasa (FR9); 4-Metil Umbeliferone β -D-Galactopiranosidasa (FR10); 4-Metil Umbeliferone 2-Acetoamida-2-Desoxygiocopiranosidasa (FR12).

Comparación de las secuencias del gen *16S RNAr* del género *Serratia*. Todas las secuencias del *RNAr 16S* se obtuvieron del banco de genes y secuencias del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, National Center for Biotechnology Information). *S. entomophila* DSM12358, *S. ficaria* DSM4569, *S. fonticola* DSM4576, *S. foonticola* UTAD54, *S. grimesii* DSM30063, *S. grimesii* LMG7883, *S. liquefaciens* 01, *S. liquefaciens* 02, *S. liquefaciens* 03, *S. marcescens* ATCC13880, *S. marcescens* DSM30121, *S. marcescens* SA AN16, *S. marcescens* ES-2, *S. odorifera* DSM4582, *S. plymuthica* DSM4540, *S. plymuthica* GS10, *S. plymuthica* JA05, *S. plymuthica* RVH1, *S. proteamaculans* DSM4597, *S. proteamaculans* DSM4543, *S. rubidaea* DSM4480, *S. rubidaea* 01, *S. ureilytica* NiVa51T, *Escherichia coli* AE1-2, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* WAB1906.

Comparación de los métodos de amplificación.

Extracción de ADN. Las 21 cepas estudiadas (15 cepas de *Serratia* y 6 de otros géneros y especies) fueron sembradas en agar soya tripticasa de 16 a 24 horas, se tomó una colonia aislada y se resuspendió en 100 μ L de solución amortiguadora de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1 mM), se congeló a -70° C, por 15 minutos, inmediatamente después se colocaron en un recipiente con agua hirviendo por 10 minutos, se dejaron enfriar y se agitaron con vortex por 2 segundos. Se agregaron 50 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y 50 μ L de fenol saturado, se agitaron con vortex por 5 segundos, se centrifugaron a temperatura ambiente por 5 minutos a 5,000 rpm, se separó la fase acuosa en un tubo limpio y se lavaron dos veces cada una con 200 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugaron por 1 minuto a 5,000 rpm, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, pH 7.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezclaron por inversión y se almacenaron a -20° C, toda la noche; posteriormente, se centrifugaron durante 30 minutos a 14,000 rpm a 4° C, el paquete de ADN se lavó 2 veces con 300 μ L etanol al 80% frío y se centrifugaron 3 minutos a 14,000 rpm, se dejaron secar y finalmente se resuspendieron con 100 μ L de agua desionizada. Finalmente se almacenaron a -20° C, hasta su uso.

Amplificación del espacio intergénico por PCR. Para la amplificación del espacio intergénico de los genes *16S* y *23S RNAr*, de las 21 cepas estudiadas, se emplearon dos juegos de iniciadores reportados por Ibrahim *et al.*, 1996 (Sentido: 5' CCG GTC CTC TCG TAC T 3', Antisentido: 5' GAG TTT GAT CCT GGT TCA 3') y por Jensen *et al.*, 1993 (Sentido: 5' GAA GTC GTA ACA AGG 3', Antisentido: 5' CAA GGC ATC CAC CGT 3'). Cuatro μ L del templado de ADN de las cepas estudiadas, fueron adicionados a 21 μ L de una mezcla de reacción para PCR, conteniendo: Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, gelatina 0.01% (peso/vol.), 1 mM de cada uno de los dideoxinucleótido (Boehringer, Mannheim), 20 pM de cada uno de los iniciadores y 2.5 U de *Taq* DNA polimerasa (Boehringer, Mannheim). La amplificación por PCR se realizó en un termociclador GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystems). Para los iniciadores reportados por Ibrahim *et al.*, se realizó la desnaturalización a 95° C, 1 minuto; alineamiento a 60° C, 1 minuto y extensión a 72° C por 2.5 minutos, durante 30 ciclos y finalmente una incubación a 72° C por 10 minutos. Para los iniciadores reportados por Jensen *et al.*, se realizó la desnaturalización a 95° C, 1 minuto;

alineamiento a 55° C, 7 minutos y extensión a 72° C por 2 minutos, durante 25 ciclos y finalmente una incubación a 72° C por 7 minutos. Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio y examinados bajo la luz UV.

Determinación de parentesco: Se realizó por medio del Coeficiente de parentesco: $a+d / a+b+c+d$, en donde, a: Número de características presentes en ambos organismos; b: Número de características presentes en organismo 1 y ausentes en organismo 2; c: Número de características ausentes en organismo 1 y presentes en organismo 2; y d: Número de características ausentes en ambos organismos, para todos los resultados producidos en cada uno de los ensayos realizados. Por medio de la configuración binaria se obtuvo la correlación de Pearson, para reflejar el grado de asociación que existe entre dos variables que entre más se acerquen al +1 la relación es más directa. Con estos resultados se construyeron dendrogramas, con el programa estadístico SPSS versión 11.0; la alineación de secuencias se realizó usando el programa ALIGN (Scientific and Educational software), el análisis filogenético y de evolución molecular fue realizado usando el algoritmo de UPGMA, con la medición de distancias de Kimura, dos parámetros implementados en el programa de MEGA3 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

RESULTADOS

El trabajo consistió en la realización de pruebas bioquímicas a 15 cepas de *Serratia* y otros géneros estudiados por el método convencional, dos métodos automatizados (MICROSCAN Autoscan-4 y SENSITITRE, Sistema Aris) utilizados en los laboratorios de microbiología clínica, dos métodos moleculares de amplificación de los espacios intergénicos del operón ribosomal reportados en la bibliografía y un estudio teórico de parentesco con secuencias de nucleótidos obtenidos en el banco de genes del NCBI para miembros del género *Serratia* y otros géneros.

Método convencional pruebas bioquímica. La identificación de las cepas bacterianas estudiadas con las pruebas bioquímicas convencionales, permitió confirmar la identidad de 20 (95.2%) de las 21 cepas sometidas a las pruebas de acuerdo con el Manual de Identificación Bacteriológica Bergey's (Tabla 1). Los porcentajes de parentesco para los microorganismos sometidos a pruebas de identificación con el método estándar fueron obtenidos a partir del Manual de Determinación Bacteriológica BERGEY'S, cabe destacar que sólo 5 cultivos se tipificaron con el 100%, en su mayoría están por arriba del 90%. La cepa de *S. entomophila* A1MO2 tuvo un porcentaje del 97.3%. El parentesco obtenido experimentalmente en la comparación de la cepa *Serratia sp* MOR4.1 con la cepa *S. entomophila* A1MO2 fue del 97.3 %, mientras que para *S. marcescens* ATCC 8100 fue del 91.6% . (Tabla 2).

El parecido o el grado de asociación entre los 21 cultivos, derivados en base a las pruebas bioquímicas fue obtenido por medio de la correlación de Pearson, del programa SPSS versión 11.0. En la Tabla 3 se observa que de acuerdo a la escala resultante se formaron 20 grupos combinados de los cuales *S. entomophila* UC7 y UC9, además de *S. marcescens* ATCC 8100, FHS48 y MAC alcanzaron una correlación de 1.0, mientras que *S. entomophila* A1MO2 tiene una correlación de 0.94 con respecto a UC7 y UC9; *Serratia sp* MOR4 presentó una correlación de 0.861 con *S. entomophila* mientras que con respecto a *S. marcescens* es de 0.681, los grupos más alejados fueron entre *S. marcescens* y *S. grimesii* con 0.441; *S. marcescens* y *S. proteamaculans* con 0.305; y *S. marcescens* y *V. cholerae* con 0.204. Con estos valores se construyó un dendrograma o árbol filogenético utilizando el programa SPSS versión 11.0 (Figura 2), donde se observan de una manera gráfica las relaciones de similitud entre los cultivos estudiados y podemos destacar que se forman

dos grupos A y B, en el grupo A se divide en dos grandes grupos, en el A.1 se nota que lo conforman la mayoría de las especies del género *Serratia*, mientras que en el A.2 lo componen los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Echerichia* y dos especies del género *Serratia*, así mismo se percibe que la distancia entre estos dos grupos es de 0.305. El grupo B sólo esta formado por la cepa de *Vibrio cholerae* se encuentra separado de las demás cepas con una distancia de 0.204.

Métodos automatizados. Basados en los resultados obtenidos y al comparar ambos métodos semiautomatizados, se observó que el sistema MICROSCAN sólo pudo identificar adecuadamente 12 de las 21 cepas (57%); El método SENSITITRE, el cual sólo pudo identificar aceptablemente 11 de las 21 cepas estudiadas (52%) ver tabla 2. Cabe destacar que 10 de las cepas que no pudieron ser identificados correctamente por los dos métodos 8 pertenecen al género *Serratia*. Por otro lado, la mayoría de los microorganismos identificados por SENSITITRE Sistema Aris y MICROSCAN Sistema Autoscan-4 presentaron un parentesco de identidad por arriba del 90% (Tabla 2).

Secuencias obtenidas del gen *RNAr 16S* en el banco de genes y secuencias del NCBI. Se obtuvieron 23 secuencias de miembros del género *Serratia*, una de *Escherichia coli*, una de *Klebsiella pneumoniae* y una de *Enterobacter aerogenes*, las cuales se alinearon con el programa ALINE, donde se puede observar que hay diferencia en los alineamientos de las secuencia de nucleótidos, siendo principalmente las regiones comprendidas entre los 420-460 bp y 970-1130 bp de acuerdo a la secuencia de *S. entomophila* (Figura 3). El porcentaje de parentesco obtenido de las diferentes especies con respecto a *S. entomophila* DSM12358 fue del 99.9% con *S. ficaria* DSM4569, del 97.1% con *S. fonticola* DSM4576 y *S. fonticola* UTAD54, del 97.4% con *S. grimesii* DSM30063, del 97.2% con *S. grimesii* LMG7883, del 95.9% con *S. liquefaciens* 01, del 97.1% con *S. liquefaciens* 02 y *S. liquefaciens* 03, del 97.5% con *S. marcescens* ATCC13880 y *S. marcescens* SA AN16, del 96.8% con *S. marcescens* DSM30121, del 97.2% con *S. marcescens* ES-2, del 98.0% con *S. odorífera* DSM4582, del 98.2% con *S. plymuthica* DSM4540, del 97.9% con *S. plymuthica* GS10, del 98.3% con *S. plymuthica* JA05, del 98.7% con *S. plymuthica* RVH1, del 97.5% con *S. proteamaculans* DSM4597, del 97.1% con *S. proteamaculans* DSM4543, del 96.5% con *S. rubidaea* DSM4480 y *S. rubidaea* 01, del 96.4% con *S. ureilytica* NiVa51T, del 94.2% con *Escherichia coli* AE1-2, del 95.9% con *Klebsiella pneumoniae* y del 96.1% con *Enterobacter aerogenes* WAB1906. Cabe destacar que el más cercano en cuanto al parentesco entre las secuencias estudiadas es *S.*

ficaria y el más alejado es *E. coli*, además de que todas las especies estudiadas presentaron un porcentaje mayor al 95.0%.

El análisis de las secuencias nucleotídicas para determinar el parentesco filogenético se realizó usando el programa MEGA, el cual dio como resultado un dendograma en donde se observan dos grupos (Figura 4), los cuales denominados grupo A y B. El grupo A se subdividió en dos grandes subgrupos A1 y A2; el grupo A1, a su vez se subdivide en varios subgrupos y sobresale que la mayoría de las especies del complejo *S. liquefaciens* están en el mismo subgrupo, así como las dos variedades de *S. fonticola*, *S. ficaria* en mismo con *S. entomophila* y al igual que el complejo *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, 3 de sus variedades se agrupan en el mismo subgrupo y la cuarta se encuentra separada (Figura 4). En el grupo A.2 se observan las cuatro variedades de *S. marcescens* en el mismo subgrupo, al igual que las variedades *S. rubidaea*, además podemos destacar en este subgrupo que una de las variedades de *S. liquefaciens* esta en el mismo subgrupo que *K. pneumoniae*, al igual que *S. aureilytica* con *E. aerogenes* (Figura 4). En el grupo B sólo se encuentra *E. coli*.

Métodos de amplificación PCR de los espacios intergénicos del 16S-23SRNA_r. Con base en el estudio teórico reralizado de las relaciones genéticas del RNA_r 16S de los miembros del género *Serratia*. Se procedió al estudio experimental de estas donde se emplearon los iniciadores propuestos por Ibrahim (Ibrahim *et al*, 1996) y Jensen (Jensen *et al*, 1993). Con los iniciadores propuestos por Ibrahim, sólo se observó amplificación de un fragmento para la cepa de *E. aerogenes* L3 (Figura 5). Contrariamente de esta región con los iniciadores propuestos por Jensen, mostró un polimorfismo en los productos amplificados por PCR de las 21 cepas estudiadas, donde se observa que 11 cepas del género *Serratia* presentaron 5 bandas de diferente peso molecular, dos cultivos con tres bandas, 1 con seis bandas y 1 con ocho bandas (Figura 6 y Figura 7), los demás géneros presentaron diferente cantidad de bandas.

De una manera más representativa se acomodaron cada una de las bandas obtenidas por PCR en un esquema (Figura 8), donde se puede observar que los tres cultivos de *S. entomophila* presentaron un polimorfismo semejante entre ellos, al igual que *S. marcescens* FHS-48 y ATCC 8100, mientras que *S. marcescens* MAC sólo fue parecido en tres bandas a FHS-48 y ATCC 8100; por su parte *S.*

plymuthica ATCC 15928 y *S. odorifera* ATCC 33077 fueron semejantes en cuatro bandas, así como *S. liquefaciens* ATCC 27592 y *S. proteamaculans* AgR142 en tres bandas, los demás cultivos de *Serratia* presentan bandeos diferentes.

Mientras que el polimorfismo genético de *K. pneumoniae* ATCC 10031 y *E. aerogenes* LT y L3 fueron similares en cinco bandas, a diferencia de *E. aerogenes* ATCC13048 que sólo comparten tres bandas con *E. aerogenes* LT y L3, por su parte *E. coli* ATCC 25922 y *V. cholerae* V074 presentaron un polimorfismo diferente (Figura 6, Figura 7 y Figura 8).

Se observó que 16 cepas presentaron la banda de 600 pb, 12 de 500 pb, 11 de 400 pb, 10 de 1000 y 800 pb, 9 de 900 pb, 8 de 650 pb, 7 de 550 y 350 pb, 5 de 1500, 700 y 350 pb, 4 de 450 y 300 pb, 3 de 750 y 200 pb, y 1 de 2000 pb. De aquí se puede destacar que de las 16 cepas que presentaron la banda de 600pb, 12 de ellas pertenecen al género *Serratia* (Tabla 4).

El parecido filogenético de acuerdo al polimorfismo de los fragmentos amplificados por PCR del espacio intergénico 16S-23S de las 21 cepas estudiadas, fue obtenido por medio de la correlación de Pearson, con el programa de SPSS versión 11.0 (Tabla 5), donde se puede observar que de acuerdo a la escala elaborada, *S. entomophila* UC7, UC9 y A1MO2, además de *S. marcescens* ATCC 8100 y FHS48 alcanzaron una correlación de 1.0 de acuerdo a Person; *S. grimesii* ATCC 35478 y *K. pneumoniae* ATCC 10031 tiene una correlación de 0.772, mientras que *S. liquefaciens* ATCC 27592 y *S. proteamaculans* AgR142, además de *S. plymuthica* ATCC 15928 y *S. odorifera* ATCC 33077 tienen una correlación de 0.717; los grupos más alejados fueron *Serratia sp* MOR4 que presentó una correlación de 0.171 con *S. entomophila*, mientras que con *S. marcescens* MAC es de -0.039, así como con *S. rubidaei* de 0.043 y *S. proteamaculans* AgR142 con 0.284 (Tabla 5).

Con los valores obtenidos en la correlación de Pearson se formó un dendrograma obtenido a partir del programa SPSS versión 11.0 (Figura 9) donde se observa gráficamente la relación de similitud entre los cultivos estudiados y es importante destacar que al igual que el elaborado con pruebas bioquímicas se forman dos grandes grupos el A y B. El grupo A se subdivide a su vez en dos subdivisiones A1 y A2 se encuentran muy alejadas tal como se muestra en la correlación de Pearson con un valor de 0.191. En el grupo B hay el mismo efecto que en el grupo A, ya que este también se

subdivide en dos B1 y B2 con una correlación todavía más alejada con un valor de 0.043. Se observa claramente que la distancia entre las especies es muy amplia como lo muestra la correlación de Pearson.

Tabla 1. Resultados de las pruebas bioquímicas por el método convencional para los 21 cultivos bacterianos en estudio.

Microorganismos	I N D	H 2 S	M O V	U R E	V P	R M	N I T	D N A s a	E S C	O N P G	T C	I T A	C I T	M A L	T A R	A C E	A R G	L I S	O R N	F D A	C E T	G L U	G L U	L A C	S A C	S O R	R A F	R H A	A R H	I N D	A D O	T R E	M E L	C E L	C A T	O X I		
<i>S. marcescens</i> MAC	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0		
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0		
<i>Serratia</i> sp MOR4	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0		
<i>S. marcescens</i> FH S48	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0		
<i>S. liquefaciens</i> ATCC 27592	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0		
<i>S. entomophila</i> A1MO2	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0		
<i>S. entomophila</i> UC7	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0		
<i>S. entomophila</i> UC9	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0			
<i>S. rubidea</i> ATCC 27593	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
<i>S. odorifera</i> ATCC 33077	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
<i>S. grimesii</i> ATCC 35478	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0		
<i>S. ficaria</i> ATCC 33105	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
<i>S. proteamaculans</i> AgR142	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	
<i>S. fonticola</i> ATCC 29844	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>E. aerogenes</i> L3	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>E. aerogenes</i> LT	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
<i>V. cholerae</i> V074	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	

0: Negativo; 1: Positivo; Adonitol (ADO); Sacarosa (SAC); Arabinosa (ARA); Sorbitol (SOR); Glucosa (GLU); Trealosa (TRE); Inositol (INO); Lactosa (LAC); Melibiosa (MEL); Rafinosa (RAF); Rhamnosa (RHA); Malonato (MAL); Acetato (ACE); Tartrato (TAR); Citrato de Simon's (CIT); Lisina (LIS); Ornitina (ORN); Arginina (ARG); Desaminación de Fenilalanina (FDA); Reducción de Nitratos (NIT); Hidrólisis de la Gelatina (GEL); O-Nitrofenil-β-D-Galactopyranoside (ONPG); Hidrólisis de DNA (DNAsa); Hidrólisis de Urea (URE); Hidrólisis de Esculina (ESC), Rojo de Metilo (RM); Voges-Proskauer (VP); Producción de Sulfhídrico (SUL); Crecimiento en Talio-Capriolato (TAL); Producción de Indol (IND); Crecimiento en Itaconato (ITA); Movilidad (MOV), Producción de Oxidasa (OXI).

Tabla 2. Comparación de los métodos automatizados y el convencional en la identificación de las especies del género *Serratia*.

MICROORGANISMO	AUTOSCAN-4 (%)	ARIS 2.0 (%)	ESTANDAR (%)
<i>S. entomophila</i> UC7	<i>C. lapagei</i>	<i>A. hidrophila</i>	<i>S. entomophila</i> (100%)
<i>S. entomophila</i> UC9	<i>C. lapagei</i>	<i>A. sobria</i>	<i>S. entomophila</i> (100%)
<i>S. entomophila</i> A1MO2	<i>S. plymuthica</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. entomophila</i> (97.3%)
<i>S. ficaria</i> ATCC 33015	<i>S. plymuthica</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>S. ficaria</i> (97.3%)
<i>S. fonticola</i> ATCC 29844	<i>S. fonticola</i> (100%)	<i>S. fonticola</i> (100%)	<i>S. fonticola</i> (100%)
<i>S. grimesii</i> ATCC 35478	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. proteamaculans</i>	<i>S. grimesii</i> (100%)
<i>S. liquefaciens</i> ATCC 27592	<i>S. liquefaciens</i> (99%)	<i>S. proteamaculans</i>	<i>S.liquefaciens</i> (97.3%)
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	<i>S. marcescens</i> (99%)	<i>S. marcescens</i> (99%)	<i>S. marcescens</i> (97.3%)
<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. marcescens</i> (99%)	<i>S. marcescens</i> (99% ⁹)	<i>S. marcescens</i> (97.3%)
<i>S. marcescens</i> FHS-48	<i>S. marcescens</i> (100%)	<i>S. marcescens</i> (99%)	<i>S. marcescens</i> (97.3%)
<i>S. odorifera</i> ATCC 33077	<i>S. odorifera</i> (90%)	<i>S. odorifera</i> (80.1%)	<i>S. odorifera</i> (94.6%)
<i>S. plymuthica</i> ATCC 15928	<i>S. plymuthica</i> (95%)	<i>S. plymuthica</i> (99.9%)	<i>S. plymuthica</i> (94.6%)
<i>S. proteamaculans</i> AgR142	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>S.proteamaculans</i> (92%)
<i>Serratia</i> sp MOR4	<i>S. plymuthica</i>	<i>S. rubidaea</i>	<i>Serratia</i> sp *
<i>S. rubidaea</i> ATCC 27593	<i>S. rubidaea</i> (99%)	<i>S. rubidaea</i> (99.6%)	<i>S. rubidaea</i> (94.6%)
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	<i>E. aerogenes</i> (100%)	<i>E. aerogenes</i> (90.5%)	<i>E. aerogenes</i> (100%)
<i>E. aerogenes</i> LT	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. aerogenes</i> (97.3%)
<i>E. aerogenes</i> L3	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. aerogenes</i> (97.3%)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> (100%)	<i>E. coli</i> (97%)	<i>E. coli</i> (92%)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031	<i>K. pneumoniae</i> (99%)	<i>K. pneumoniae</i> (97%)	<i>K. pneumoniae</i> (92%)
<i>V. cholerae</i> V074 NO O:1	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> (85%)	<i>V. cholerae</i>

* *S. entomophila* del 97.3%, *S. marcescens* del 89%

Tabla 3. Promedio de asociación entre los grupos de acuerdo a la correlación de Pearson con las pruebas bioquímicas de las 21 cepas estudiadas.

Grupo	Cluster Combinado		Correlación Pearson
	Cluster 1	Cluster 2	
1	<i>S. marcescens</i> 8100	<i>S. marcescens</i> FHS48	1.000
2	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. marcescens</i> 8100	1.000
3	<i>S. entomophila</i> UC7	<i>S. entomophila</i> UC9	1.000
4	<i>S. entomophila</i> A1MO2	<i>S. entomophila</i> UC7	0.946
5	<i>S. odorifera</i> 33077	<i>S. ficaria</i> 33105	0.892
6	<i>E. aerogenes</i> L3	<i>E. aerogenes</i> LT	0.875
7	<i>Serratia sp</i> MOR4.1	<i>S. entomophila</i> A1MO2*	0.861
8	<i>E. aerogenes</i> 13048	<i>E. aerogenes</i> L3	0.818
9	<i>E. aerogenes</i> 13048	<i>K. pneumoniae</i> 10031	0.768
10	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. liquefaciens</i> 27592	0.732
11	<i>S. rubidaea</i> 27593	<i>S. odorifera</i> 33077	0.715
12	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>Serratia sp</i> MOR4.1*	0.681
13	<i>S. rubidaea</i> 27593	<i>S. plimuthica</i> 15928	0.672
14	<i>S. proteamaculans</i> AgR142	<i>E. aerogenes</i> 13048	0.594
15	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. rubidaea</i> 27593	0.548
16	<i>S. proteamaculans</i> AgR142	<i>S. fonticola</i> 29844	0.507
17	<i>S. proteamaculans</i> AgR142	<i>E. coli</i> 25922	0.451
18	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. grimasii</i> 35478	0.441
19	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. proteamaculans</i> AgR142	0.305
20	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>V. cholerae</i> V074	0.204

*Se puede resaltar que la cepa *Serratia sp* MOR4.1 tiene un mayor índice de asociación 0.861 con *S. entomophila*, que con *S. marcescens* que es de 0.681.

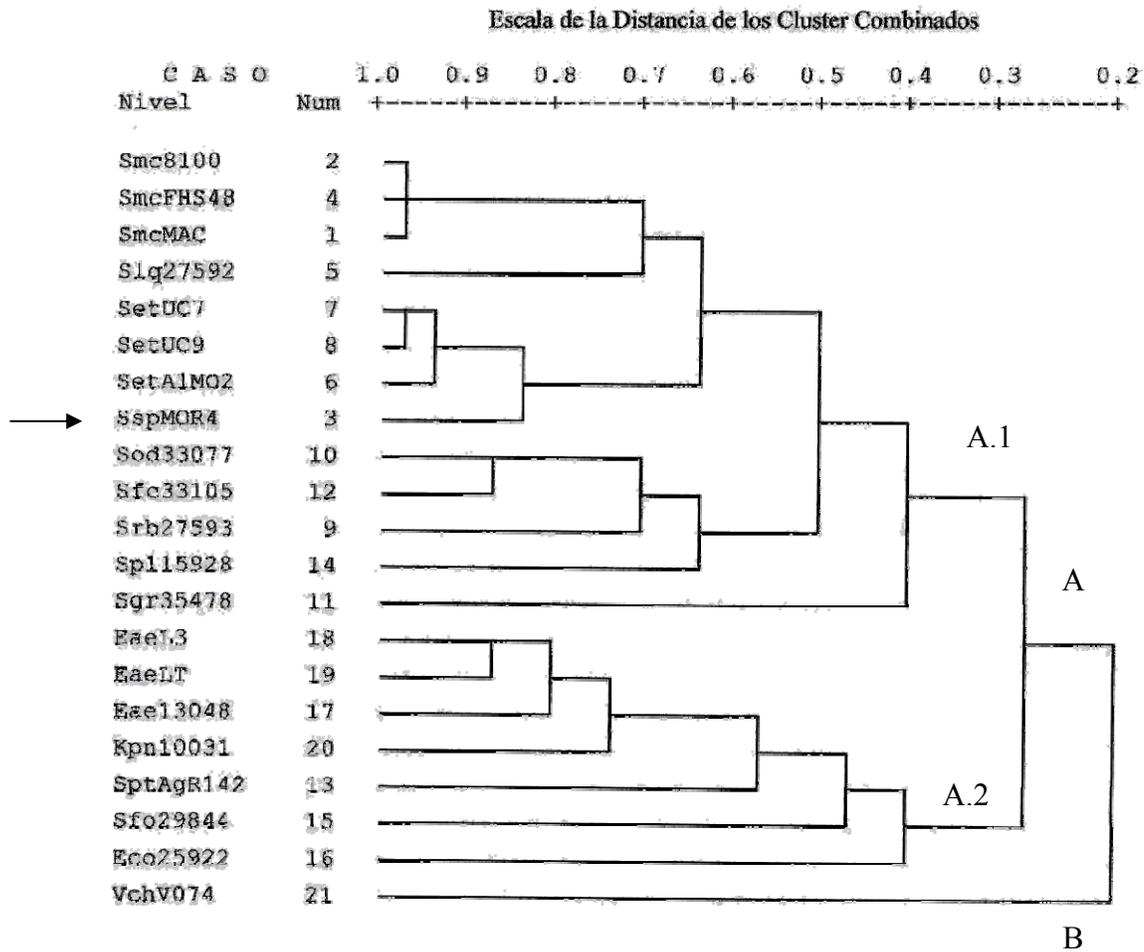


Figura 2. Árbol filogenético (Dendrograma) de las 21 cepas estudiadas, obtenido de las pruebas bioquímicas con el programa estadístico SPSS versión 11.0. SmcFHS48 (*S. marcescens* FHS48), SspMor4 (*Serratia sp* MOR4.1), SmcMAC (*S. marcescens* MAC), SetUC9 (*S. entomophila* UC9), SetUC7 (*S. entomophila* UC7), SetA1M02 (*S. entomophila* A1M02), SptAgR142 (*S. proteamaculans* AgR142), Smc8100 (*S. marcescens* ATCC 8100), Slq27592 (*S. liquefaciens* ATCC 27592), Srb27593 (*S. rubidea* ATCC 27593), Sod33077 (*S. odorifera* ATCC 33077), Sgr35478 (*S. grimesii* ATCC 35478), Sfc33105 (*S. ficaria* ATCC 33105), Spl15928 (*S. plymuthica* ATCC 15928), Sfo29844 (*S. fonticola* ATCC 29844), Eco25922 (*E. coli* ATCC 25922), Eae13048 (*E. aerogenes* ATCC 13048), EaeL3 (*E. aerogenes* L3), EaeLT (*E. aerogenes* LT), Kpn10031 (*K. pneumoniae* ATCC 10031), VchV074 (*V. cholerae* V074 No O1). La flecha indica la cepa SspMor4, que se encuentra en el grupo de *S. entomophila*.

	13	344	555	556	666	777	777	788	111	111	111	111	112	222	222	223	333	444	444	444	444	444
<i>Serratia entomophila</i> DSM12358	cg	atg	tga	cgg	ggg	ccc	tgg	tac	aat	gta	act	tcg	tca	cga	ggg	tg-	ccg	ccc	agt	aat	gtc	cgg
<i>Serratia ficaria</i> DSM4569a.	.a.	.t.	a..-c	g..
<i>Serratia fonticola</i> DSM4576a	a..	..-cag	..a	..-	tc.	..g	gca
<i>Serratia fonticola</i> UTAD54a	a..	..-cag	..a	..-	tcg	..g	gca
<i>Serratia grimesii</i> DSM30063a.	.a.	.t.-	tca	..g	gca
<i>Serratia grimesii</i> LMG7883aa	.a.	.t.g	tca	..g	gca
<i>Serratia liquefaciens</i> 01a	.a.	.t.	..-g	caa	...	t..	...	c.-t	gcg	tta	agg	acc
<i>Serratia liquefaciens</i> 02a.	.a.	.t.	a..	...	t..-	tca	..g	gca
<i>Serratia liquefaciens</i> 03aa--	...	a..	...	t..--	..g	gca
<i>Serratia marcescens</i> ATCC13880	..ta.g	caa	a.t	t..-g	gtg	ag.	..t
<i>Serratia marcescens</i> DSM30121	a.tang	caa	a.t	t..n	nn.g	gtg	ag.	..c
<i>Serratia marcescens</i> SA AN16	a.ta.g	caa	a.t	t..-g	gtg	ag.	..c
<i>Serratia marcescens</i> ES-2	..taa	.a.	.t.g	caa	a.t	t..-g	gtg	ag.	..c
<i>Serratia odorifera</i> DSM4582a.	.a.	.t.c	..g	...	a..	a.t	t.g	...	c.-cc	...	ag.	..t
<i>Serratia plymuthica</i> DSM4540a.	.a.	.t.	a..-	...	a..	..c	.g.	..g	gca
<i>Serratia plymuthica</i> GS10	.a.aa	.a.	.t.t.	a..-	...	a..	...	tca	..g	gca
<i>Serratia plymuthica</i> JA05c.aa	.a.	.t.	g..	a..-	...	a..	...	tca	..g	gca
<i>Serratia plymuthica</i> RVH1a-	.a.	.t.	a..-	...	a..g.	..g	gca
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM4597a.	.a.	.t.-g.	..g	gca
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM4543a.	.a.	.t.-	tca	..g	gca
<i>Serratia rubidaea</i> DSM4480	c.g	g.a	..a	t..	.cc	cg.	gtc	.cg	..g	caaag	aa.	..-g	gtg	aa.	..n
<i>Serratia rubidaea</i> 01	c.g	g.a	..a	t..	.cc	cg.	gtc	.cg	..g	caaag	aa.	..-g	gtg	ag.	..c
<i>Serratia ureilytica</i> NiVa51T	..t	..-a.	t..	..g	caa	a.t	t..-g	gtg	ag.	..c	
<i>Escherichia coli</i> AE1-2a	.a.	gaa	a.c	g.t	.tc	..t	..cg	caa	a-t	t.g	...	a.-	..a	.t.	g.a	gta	aag	.ct
<i>Klebsiella pneumoniae</i>a	.a.	.t.	..-g	caa	...	t..	...	c.-	gcg	.ta	agg	acc	
<i>Enterobacter aerogenes</i> WAB1906a-g	caa	a.t	t..	...	c.-	..a	.t.	gtg	g.g	..-	..a	

Figura 3. Sitios polimorficos en el gen *16S RNAr* de las diferentes especies de *Serratia* y otros generos.

	444	444	445	555	566	666	666	666	777	777	788	888	889	999	999	990	111	111	111	111	111	111	111
<i>Serratia entomophila</i> DSM12358	cat	tcg	-tg	tta	ctg	att	aaa	c-g	-cg	ga-	tt-	tc-	ata	cga	ctt	ccg	gat	tgt	ccg	att	cg-	ttc	
<i>Serratia ficaria</i> DSM4569	...	cgc	-..-	-..	..-	..--	...	
<i>Serratia fonticola</i> DSM4576	.cg	.tc	-..	...	a.t	t-	-a	..-	.c-	..-	g..	.c.	g.a	cg.	aat	.gt	
<i>Serratia fonticola</i> UTAD54	.cg	.tc	-..	...	a.t	t-	-a	..-	.c-	..t	g..	.c.	g..	cg.	.at	.gt	
<i>Serratia grimesii</i> DSM30063	.tg	.gc	-..	t-	-a	..-	.c-	..-	g..	...	tcg	.ta	.c.	.a.	...	cg.	aat	.g.	
<i>Serratia grimesii</i> LMG7883	.tg	.tc	-..	t-	-a	..-	.c-	..-	g..	...	tcg	.ta	.c.	.a.	...	cg.	aat	.g.	
<i>Serratia liquefaciens</i> 01	ttg	g..	-c.	ccg	g.c	.c.c	.g.	t-	-a	..-	c-	..-	..g	gc.	g..	g.c	..-	.c.	
<i>Serratia liquefaciens</i> 02	.tg	.gc	-..	tg.	-a	..-	.c-	..-	g-	...	tcg	.ta	.c.	.a.	...	cg.	aat	.g.	
<i>Serratia liquefaciens</i> 03	...	gt.	c..	t-	-a	..-	.c-	..-	g..	...	tcg	.ta	.c.	.a.	..n	cg.	aat	.gt	
<i>Serratia marcescens</i> ATCC13880	tca	.a	-..	...	gcc-	-g.	c.-	..-	..-	g..	..-	.c.	
<i>Serratia marcescens</i> DSM30121	tca	.a	-..n	...	gcc	n..-	-..	nn-	..-	..-n	n..	..-	.c.	
<i>Serratia marcescens</i> SA AN16	tca	.a	-..	...	gcc-	g..	..g	..g	..-	g..	..-	.c.	
<i>Serratia marcescens</i> ES-2	tca	.a	-..	...	gcc-	-..	..-	..-	c-	g..	..-	.c.	
<i>Serratia odorífera</i> DSM4582	tg.	.g.	-..-	-..	..-	..-	..-a	g..	...	g..	..-	.c.
<i>Serratia plymuthica</i> DSM4540gc	-..	t-	-a	..-	..-	..-	tcg	.ta	.c.	.a.-	...	
<i>Serratia plymuthica</i> GS10	.tg	.gc	-..	t-	-a	..-	..-	..--	...	
<i>Serratia plymuthica</i> JA05	.tg	.ac	-..	t-	-a	..-	..-	..--	...	
<i>Serratia plymuthica</i> RVH1rc	-..	t-	-a	..-	..-	..--	...	
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM4597gc	-..	t-	-a	..-	.c-	..-	g..	...	tcg	.ta	.c.	.a.	..a	cg.	aat	.gt	
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM4543	.tg	.gc	-..	t-	-a	..-	.c-	..-	g..	.c.	tcg	.ta	.c.	.a.	..a	cg.	aat	.gt	
<i>Serratia rubidaea</i> DSM4480	tca	.a	-..	...	a.t-	-..	..-	..-	..-	g..	..-	.c.	
<i>Serratia rubidaea</i> 01	tca	.a	-..	...	a.t-	-..	..-	c-	..-	g..	..-	.c.	
<i>Serratia ureilytica</i> NiVa51T	tca	.a	-..	ccg	gcc	.c.c	g..	t-a	-a	..-	cc-	..-	g..a	g..	ct.	g..	a-	.c.	
<i>Escherichia coli</i> AE1-2	ttg	ctc	-c.	...	gcc	.c.t	t.t	.--	cc-	..-	g.g	cgg	g..	t..	aga	atc	g..	g.c	..-	c..	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ttg	...	-c.	ccg	gcc	.c.c	.g.	t-	..a	..-	c-	..-	..g	gc.	..a	g..	ct.	...	g..	g.c	..-	c..	
<i>Enterobacter aerogenes</i> WAB1906	.c.	caa	-c.	ccg	gcc	.c.c	.g.	t-	..a	..-	cc-	..-	g..	gc.	g.c	..-	c..	

Figura 3. Sitios polimorficos en el gen *16S RNAr* de las diferentes especies de *Serratia* y otros generos (continuación).

	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	1
	111	222	222	222	222	222	223	333	333	333	3
	345	001	122	444	555	567	791	111	113	113	5
	166	010	878	578	346	765	612	346	788	788	0
<i>Serratia entomophila</i> DSM12358	tgc	gta	tgt	gtc	gat	ata	cta	tga	gta	tga	t
<i>Serratia ficaria</i> DSM4569	a..	..c
<i>Serratia fonticola</i> DSM4576a.	a..	..c	...	tcg
<i>Serratia fonticola</i> UTAD54a.	a..	..c	...	tcg
<i>Serratia grimesii</i> DSM30063	a..	..ccg
<i>Serratia grimesii</i> LMG7883	a..	..ccg
<i>Serratia liquefaciens</i> 01	.at	cc.	.a.	c..	..c	...	t..
<i>Serratia liquefaciens</i> 02	c..	a..	..ccg
<i>Serratia liquefaciens</i> 03	a..	..ccg
<i>Serratia marcescens</i> ATCC13880	.ata.	c..	..c	...	t..
<i>Serratia marcescens</i> DSM30121	.ata.	c..	..c	...	t..
<i>Serratia marcescens</i> SA AN16	.at	c..	..c
<i>Serratia marcescens</i> ES-2	.at	.g	.a.	c..	..c	...	t..
<i>Serratia odorífera</i> DSM4582	.at	a.t
<i>Serratia plymuthica</i> DSM4540	a..	..c
<i>Serratia plymuthica</i> GS10	a..	..c	gag	tc.
<i>Serratia plymuthica</i> JA05	a..	..c
<i>Serratia plymuthica</i> RVH1	a..	..c
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM4597	a..	..c	c..	.cg
<i>Serratia proteamaculans</i> DSM4543	a..	..c	c..	.cg
<i>Serratia rubidaea</i> DSM4480	.at	act	agc
<i>Serratia rubidaea</i> 01	.at	act	.gc
<i>Serratia ureilytica</i> NiVa51T	cat	c..	..c
<i>Escherichia coli</i> AE1-2	.at	cc.	..c	c..	..c	.gg	c	.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	.at	cc.	.a.	c..	..c	.c.	t..
<i>Enterobacter aerogenes</i> WAB1906	.atc	c..	..c	.g

Figura 3. Sitios polimorficos en el gen *16S RNAr* de las diferentes especies de *Serratia* y otros generos (continuación).

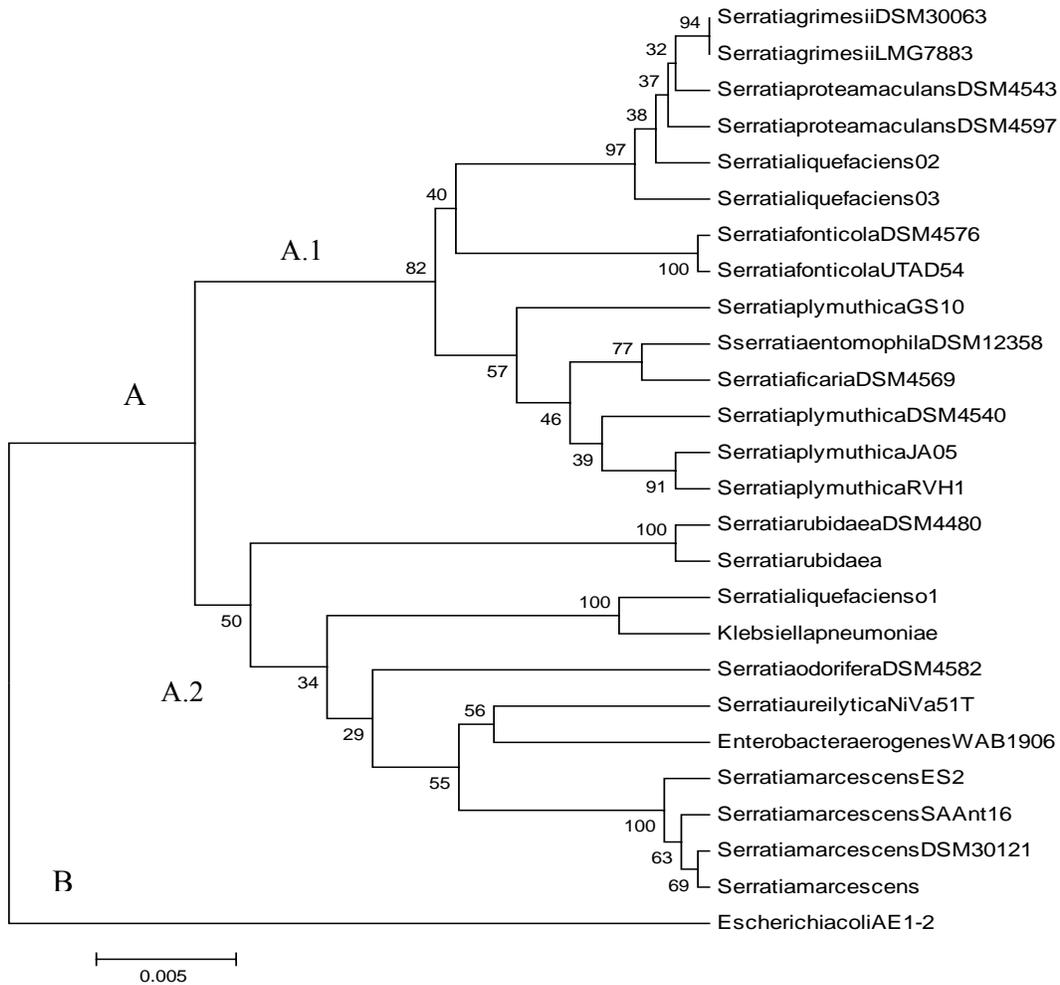


Figura 4. Análisis filogenético del gen *16S rRNA* de las 26 secuencias de nucleótidos de las especies de *Serratia* y otros géneros, obtenidas del banco de genes (NCBI).



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del espacio intergénico *16S-23S RNAr*, de las cepas de *Serratia* y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Ibrahim. PM = Marcador de peso molecular \uparrow /Hind III; carril 1: *S. marcescens* FHS48, carril 2: *Serratia* sp. MOR4.1, carril 3: *S. marcescens* MAC, carril 4: *S. entomophila* UC9, carril 5: *S. entomophila* UC7, carril 6: *S. entomophila* A1M02, carril 7: *S. proteamaculans* AgR142, carril 8: *E. aerogenes* L3, carril 9: *E. aerogenes* LT, carril 10: *S. marcescens* ATCC 8100, carril 11: *S. liquefaciens* ATCC 27592, 12: *S. rubidea* ATCC 27593, carril 13: *K. pneumoniae* ATCC 10031.

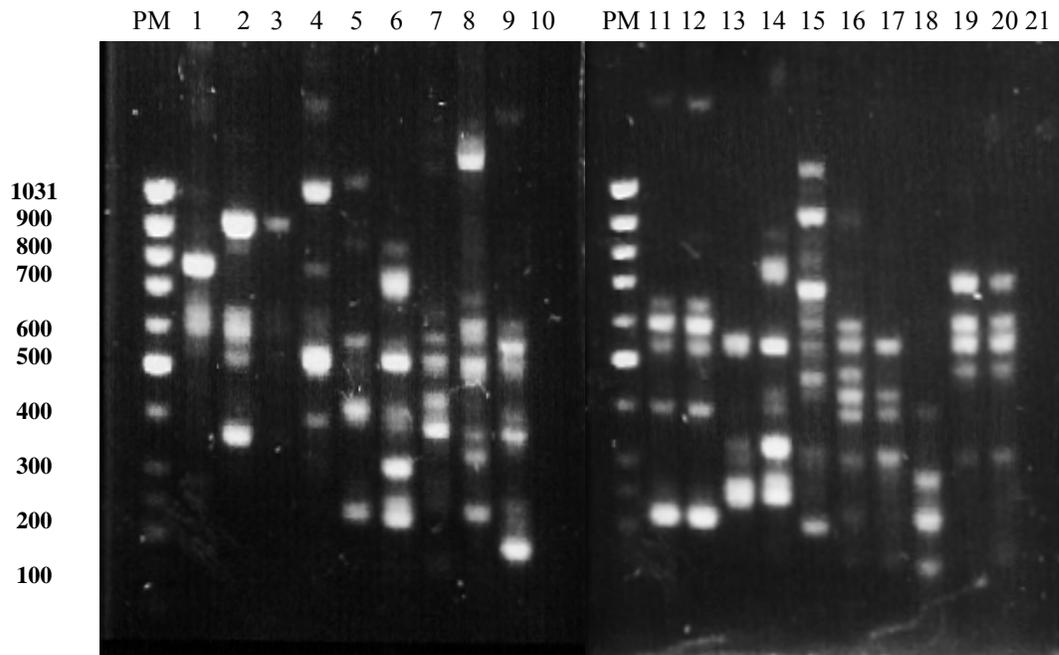


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico 16S-23S *RNAr*, de las cepas de *Serratia* y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Jensen. PM = Marcador de peso molecular 1Kb carril 1: *S. fonticola* ATCC 29844, carril 2: *S. plymuthica* ATCC 15928, carril 3: *S. odorifera* ATCC 33077, carril 4: *S. grimesii* ATCC 35478, carril 5: *E. aerogenes* LT, carril 6: *E. aerogenes* L3, carril 7: *E. coli* ATCC 25922, carril 8: *S. ficaria* ATCC 33105, carril 9: *S. entomophila* UC9, carril 10: *E. aerogenes* ATCC 13048, carril 11: *S. entomophila* A1M02, carril 12: *S. entomophila* UC7, carril 13: *S. liquefaciens* ATCC 27592, carril 14: *S. proteamaculans* AgR142, carril 15: *S. rubidea* ATCC 27593, carril 16: *K. pneumoniae* ATCC 10031, carril 17: *S. marcescens* MAC, carril 18: *Serratia* sp MOR4.1, carril 19: *S. marcescens* ATCC 8100, carril 20: *S. marcescens* FHS48, carril 21: *V. cholerae* V074 No O1.

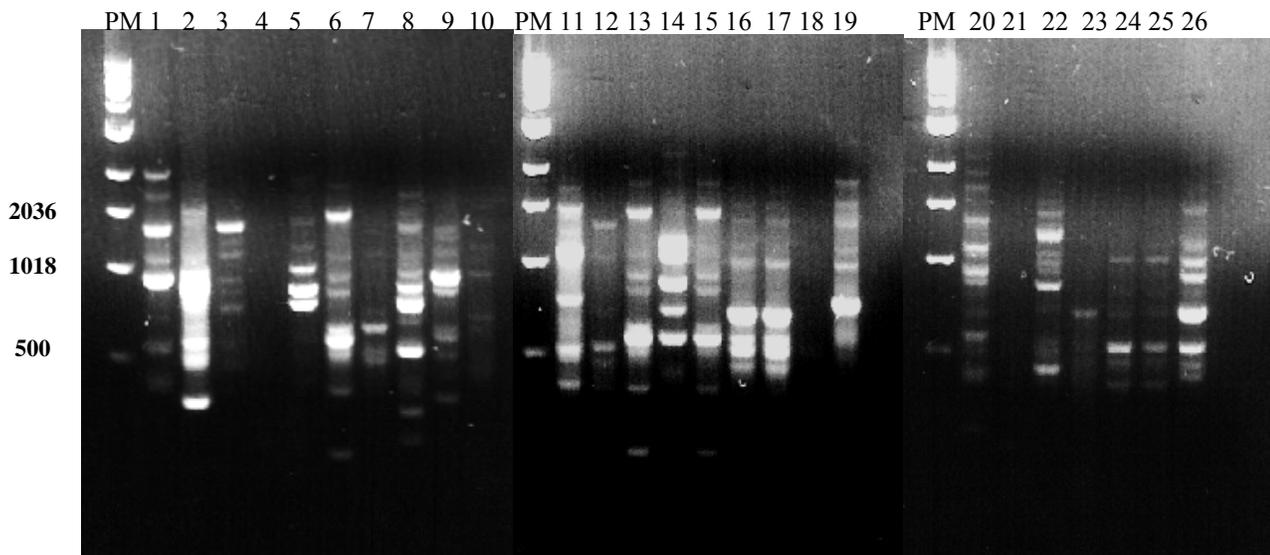


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico 16S-23S *RNAr*, de las cepas de *Serratia* y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Jensen. PM = Marcador de peso molecular de 1 Kb (DNAbLander) Introgene T.M., carril 1: *E. aerogenes* ATCC 13048, carril 2: *V. cholerae* V074 No O1 carril 3: *S. plymutica* ATCC 15928, carril 4: *S. ficaria* ATCC 33105, carril 5: *K. pneumoniae* ATCC 10031, carril 6: *S. entomophila* UC9, carril 7: *S. proteamaculans* AgR142, carril 8: *E.aerogenes* L3, carril 9: *S. odorifera* ATCC 33077, carril 10: *S. rubidea* ATCC 27593, carril 11: *S. grimesii* ATCC 35478, carril 12: *S. marcescens* MAC, carril 13: *S. entomophila* A1M02, carril 14: *Enterobacter sp*, carril 15: *S. entomophila* UC7, carril 16: *S. marcescens* FHS48, carril 17: *S. marcescens* ATCC 8100, carril 18: *S. liquefaciens* ATCC 27592, carril 19: *S. fonticola* ATCC 29844, carril 20: *E. aerogenes* LT, carril 21: *Serratia sp* MOR4.1, carril 22: *E. coli* ATCC 25922, carril 23: *S. marcescens* 83a, carril 24: *S. marcescens* 97b, carril 25: *S. marcescens* 50a, carril 26: *S. marcescens* 94.

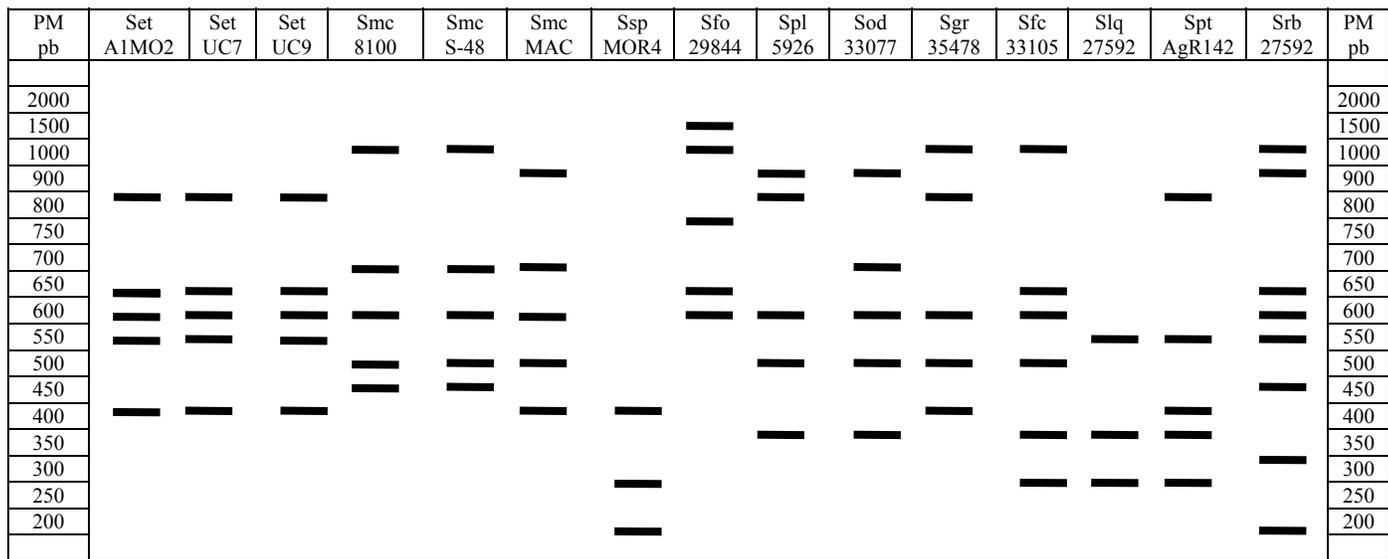


Figura 8. Esquema de Polimorfismo genético generado por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico 16S-23S *RNAr*, de las cepas de *Serratia* y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Jensen. *S. marcescens* S-48 (Smc S-48), *Serratia sp* MOR4.1 (Ssp MOR4), *S. marcescens* MAC (Smc MAC), *S. entomophila* UC9 (Set UC9), *S. entomophila* UC7 (Set UC9), *S. entomophila* A1M02 (Set A1M02), *S. proteamaculans* AgR142 (Set AgR142), *S. marcescens* ATCC 8100 (S. mar 8100), *S. liquefaciens* ATCC 27592 (S. liq 27592), *S. rubidea* ATCC 27593 (Srb 27593), *S. odorifera* ATCC 33077 (Sod 33077), *S. grimesii* ATCC 35478 (Sgr 35478), *S. ficaria* ATCC 33105 (Sfc 33105), *S. plymuthica* ATCC 15928 (Spl 15928), *S. fonticola* ATCC 29844 (Sfo 29844).

PM pb	Eae 13048	Eae L3	Eae LT	Kpn 10031	Eco 25922	Vch V074	PM pb
2000	—						2000
1500	—	—	—		—		1500
1000			—	—	—	—	1000
900	—	—	—	—		—	900
800		—	—	—		—	800
750	—		—				750
700			—				700
650					—	—	650
600	—	—	—	—	—		600
550					—		550
500		—	—	—	—	—	500
450					—		450
400		—	—	—	—		400
350							350
300	—	—			—		300
250		—			—	—	250
200				—			200

Figura 8. Esquema de Polimorfismo genético generado por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR del espacio intergénico 16S-23S *RNAr*, de las cepas de *Serratia* y otros géneros; empleando los iniciadores propuestos por Jensen (Continuación). *E. coli* ATCC 25922 (Eco 25922), *E. aerogenes* ATCC 13048 (Eae 13048), *E. aerogenes* L3 (Eae L3), *E. aerogenes* LT (Eae LT), *K. pneumoniae* ATCC 10031 (Kpn 10031), *V. cholerae* V074 No O1 (Vch V074).

Tabla 4. Numero de bandas para cada peso molecular, obtenidos en los productos de PCR para la amplificación de espacio intergénico entre el *16S-23S RNAr* con los iniciadores propuestos por Jensen *et al* para las 21 cepas estudiadas.

PM pb	GÉNERO <i>Serratia</i> (15) No	OTROS GÉNEROS (6) No	TOTAL (21) No
2000	0	1	1
1500	1	4	5
1000	6	4	10
00	4	5	9
800	6	4	10
750	1	2	3
700	4	1	5
650	6	2	8
600	12	4	16
550	6	1	7
500	7	5	12
450	3	1	4
400	7	4	11
350	5	0	5
300	1	3	4
250	4	3	7
200	2	1	3

Tabla 5. Relación de acercamiento entre los grupos de acuerdo a la correlación de Pearson del polimorfismo genético obtenidos de los productos de PCR para la amplificación de ISRs entre el *16S-23S RNAr* con los iniciadores propuestos por Jensen *et al* para las 21 cepas estudiadas.

Grupo	Cluster Combinado		Correlación de Pearson
	Cluster 1	Cluster 2	
1	<i>S. marcescens</i> 8100	<i>S. marcescens</i> FHS48	1.000
2	<i>S. entomophila</i> UC7	<i>S. entomophila</i> UC9	1.000
3	<i>S. entomophila</i> A1MO2	<i>S. entomophila</i> UC7	1.000
4	<i>S. grimesii</i> 35478	<i>K. pneumoniae</i> 10031	0.772
5	<i>S. liquefaciens</i> 27592	<i>S. proteamaculans</i> AgR142	0.717
6	<i>S. odorifera</i> 33077	<i>S. plimuthica</i> 15928	0.717
7	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>E. aerogenes</i> LT	0.609
8	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. grimesii</i> 35478	0.525
9	<i>S. ficaria</i> 33105	<i>S. fonticola</i> 29844	0.433
10	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>E. aerogenes</i> L3	0.419
11	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. odorifera</i> 33077	0.378
12	<i>S. marcescens</i> 8100	<i>S. ficaria</i> 33105	0.292
13	<i>Serratia sp</i> MOR4.1	<i>S. liquefaciens</i> 27592	0.284
14	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>V. cholerae</i> V074	0.239
15	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>S. marcescens</i> 8100	0.191
16	<i>S. rubidaea</i> 27593	<i>E. coli</i> 25922	0.181
17	<i>Serratia sp</i> MOR4.1	<i>S. entomophila</i> A1MO2	0.171
18	<i>Serratia sp</i> MOR4.1	<i>S. rubidaea</i> 27593	0.043
19	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>E. aerogenes</i> 13048	-0.018
20	<i>S. marcescens</i> MAC	<i>Serratia sp</i> MOR4.1	-0.039

Podemos destacar que sólo las especies de *S. entomophila* y *S. marcescens* tuvieron el 100% de correlación y *Serratia sp* MOR4.1 presenta una asociación alejada de las demás especies, ya que con el más cercano es *S. liquefaciens* con 0.284.

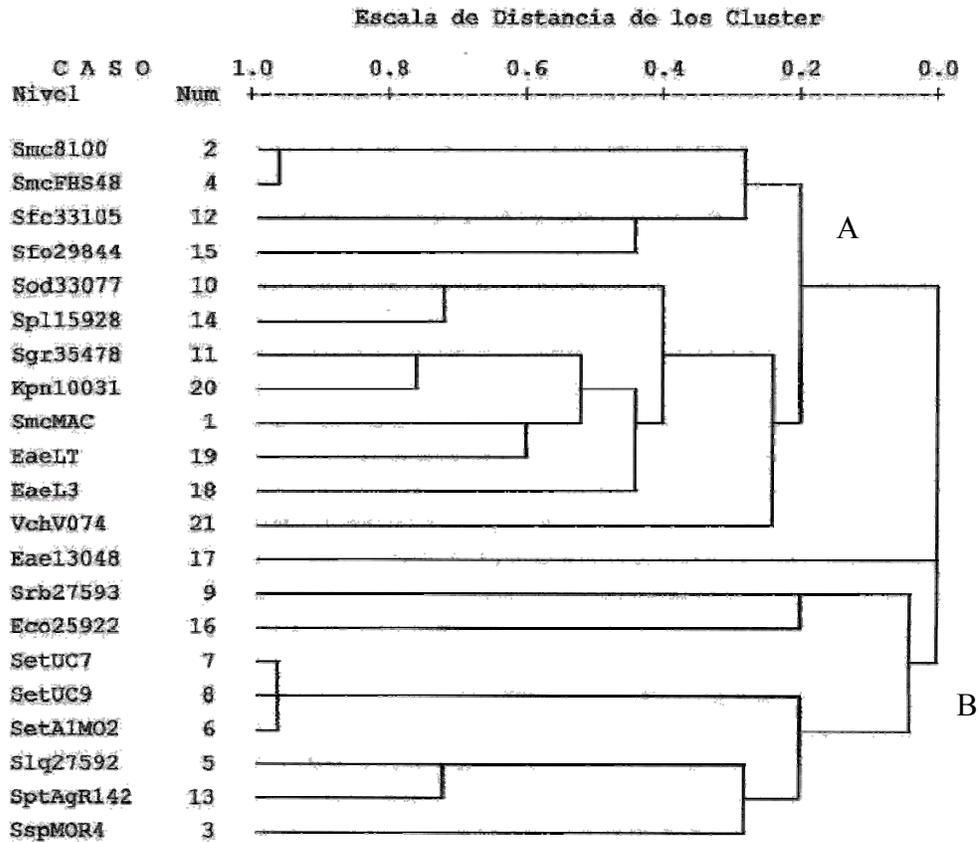


Figura 9. Árbol filogenético (Dendrograma) del polimorfismo genético obtenido a partir de los productos de PCR para la amplificación de ISRs del *16S RNAr* con los iniciadores propuestos por Jensen *et al* para las 21 cepas estudiadas, para este fin se uso el programa estadístico SPSS versión 11.0. SmcFHS48 (*S. marcescens* FHS48), SspMor4 (*Serratia sp* MOR4.1), SmcMAC (*S. marcescens* MAC), SetUC9 (*S. entomophila* UC9), SetUC7 (*S. entomophila* UC7), SetAIM02 (*S. entomophila* AIM02), SptAgR142 (*S. proteamaculans* AgR142), Smc8100 (*S. marcescens* ATCC 8100), Slq27592 (*S. liquefaciens* ATCC 27592), Srb27593 (*S. rubidea* ATCC 27593), Sod33077 (*S. odorifera* ATCC 33077), Sgr35478 (*S. grimesii* ATCC 35478), Sfc33105 (*S. ficaria* ATCC 33105), Spl15928 (*S. plymuthica* ATCC 15928), Sfo29844 (*S. fonticola* ATCC 29844), Eco25922 (*E. coli* ATCC 25922), Eae13048 (*E. aerogenes* ATCC 13048), EaeL3 (*E. aerogenes* L3), EaeLT (*E. aerogenes* LT), Kpn10031 (*K. pneumoniae* ATCC 10031), VchV074 (*V. cholerae* V074 No O1).

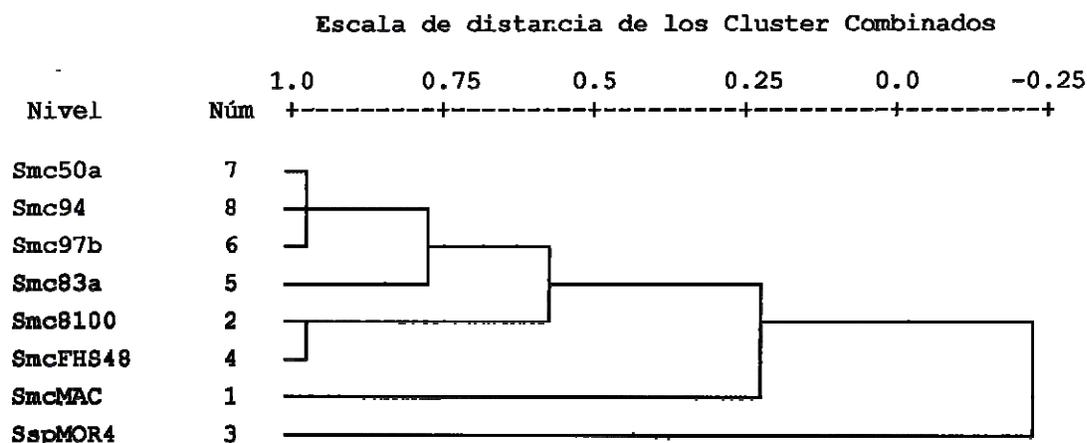


Figura 10. Árbol filogenético (Dendrograma) del polimorfismo genético obtenido a partir de los productos de PCR para la amplificación de ISRs del *16S RNAr* con los iniciadores propuestos por Jensen *et al* para 7 cepas de *S. marcescens* y una cepa de *Serratia sp*, conseguido con el programa estadístico SPSS versión 11.0. SmcFHS48 (*S. marcescens* FHS48), SspMor4 (*Serratia sp* MOR4.1), SmcMAC (*S. marcescens* MAC), Smc8100 (*S. marcescens* ATCC 8100), Smc50a (*S. marcescens* 50a), Smc94 (*S. marcescens* 94), Smc97b (*S. marcescens* 97b), Smc83a (*S. marcescens* 83a).

DISCUSIÓN

Los miembros del género *Serratia* crecen bien en medios de cultivo mínimos bajo condiciones aerobias y anaerobias, su aislamiento más frecuente es de muestras clínicas, donde se le relaciona con infecciones en humanos (Callaghan, *et al.*, 1993; Holt, *et al.*). La identificación de las especies de *Serratia* con excepción de *S. marcescens* en los laboratorios de bacteriología en ocasiones es difícil por ser especies de aislamiento poco frecuente (Farmer III, 1999), por lo que, es importante contar con metodologías que ayuden a la tipificación, lo cual en este estudio se propone una alternativa que apoye en la identificación de los miembros del género *Serratia*.

La selección del método que ayude en la determinación del género y especie, además del parentesco entre los diferentes microorganismos, está definida mediante criterios que van desde los morfológicos, fisiológicos, metabólicos, genéticos y cladísticos (Spooner, *et al.*, 2001). De esta manera, en los laboratorios de bacteriología se pretende la identificación de las especies bacterianas con base en los criterios mencionados. Y debido a los diferentes criterios y metodologías disponibles en la identificación de especie bacteriana, en este estudio se evaluaron distintos métodos para establecer las relaciones de afinidad entre las especies del género *Serratia*, por medio de la comparación de características particulares y asumiendo de esta manera, que determinadas similitudes reflejen el parentesco entre ellas.

Particularmente para el uso potencial de bacterias del género *Serratia* para el control de insectos de plagas agrícolas se necesita contar con metodologías para lograr una identificación precisa del microorganismo, ya que muchos de estos microorganismos son aislados en las zonas donde se emplean, debido a que el introducir o multiplicar un agente etiológico sería riesgoso para la salud.

Una de las herramientas evaluadas en este trabajo fueron los métodos automatizados en la identificación bacteriana, ya que su uso en los laboratorios de bacteriología ha venido en aumento día con día, por lo que el número de sistemas de identificación comerciales se han extendido y en algunos casos se han mejorado. Cada uno de estos sistemas presenta diferentes porcentajes de confiabilidad y costos, lo que permite, que con base a sus características los laboratorios obtengan el que mejor se ajuste a sus necesidades (Podzorski, *et al.*, 1999).

En general, los sistemas comerciales de identificación bacteriana se basan en los microorganismos de mayor recuperación en muestras clínicas, por lo que microorganismos poco frecuentes o poco comunes no son identificados adecuadamente por estos sistemas comerciales (Soler, *et al.*, 2003; Yi-Weitang, *et al.*, 1998; Vivas, *et al.*, 2000).

Un sistema comercial utilizado por algunos investigadores es el BIOLOG, el cual se basa en la habilidad de los microorganismos para utilizar 95 diferentes fuentes de carbono, que dan como resultado “una huella metabólica o fingerprint”. Sin embargo, es un sistema de baja o casi nula disponibilidad en el mercado. En un estudio de comparación de los sistemas Vitek y Biolog, se observó que el sistema Biolog presentó una identificación correcta en cepas tipo del 98%, mientras que, el sistema Vitek sólo identificó a las cepas estudiadas en un 87% (Klingler, *et al.*, 1992). En otros estudios donde se comparó el sistema Biolog y la secuenciación del gen *16S RNAr*, se observó que el sistema comercial identificaba correctamente el 87.5% de los bacilos gramnegativos estudiados (Yi-Wei, *et al.*, 1998) y menos del 50% de los microorganismos poco frecuentes en muestras clínicas (Kay, *et al.*, 1994).

En México los sistemas comerciales disponibles son: API, VITEK, MICROSCAN, ARIS, entre otros. En este estudio se utilizaron el Sistema de Gestión de Datos AUTOSCAN-4 (Microscan) y el Sistema ARIS versión 2.0. El sistema Microscan se eligió porque en general identifica aproximadamente a los bacilos gramnegativos en un 97%, y en la identificación de microorganismos poco frecuentes como las *Aeromonas sp* sólo las identificó correctamente en un 14.8% y en un estudio con *Serratia sp* observaron un 98.5% para *S. plymuthica*, *S. liquefaciens* y *S. rubideae* (Vivas, *et al.*, 2000; Soler, *et al.*, 2003). Mientras que el sistema Aris reporta que identifica aceptablemente a bacilos gramnegativos en 96% incluyendo *S. marcescens* y otras especies del género *Serratia* (Chapin, *et al.*, 2003).

En la comparación realizada para la identificación de los microorganismos en estudio, se observó que el sistema Autoscan tuvo un 57% contra un 52% del sistema Aris, donde podemos destacar que la mayoría de las cepas que no se pudieron identificar correctamente fueron del género *Serratia* y dos aislados silvestres del género *Enterobacter*.

La identificación convencional es un método de referencia (estándar de oro) utilizado en los laboratorios de bacteriología clínica (Farmer III, 1999). En nuestro estudio empleamos este sistema para corroborar la identificación de las cepas estudiadas. Se observó que la identificación bacteriana fue correcta hasta especie en 20/21 (95%) de las cepas estudiadas, todos los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se compararon con las tablas del Manual Bergey's de la novena edición. La cepa de *Serratia* sp MOR4.1 que no se identificó a nivel de especie, fue debido a que las reacciones obtenidas en las pruebas bioquímicas no son comparables completamente con alguna especie en particular, o lo que sugiere una especie nueva del género *Serratia*.

La búsqueda de similitudes o de parentescos en estudios de diversidad o filogenia, se realiza por medio de la agrupación de algoritmos que tienen la habilidad de encontrar las similitudes ocultas entre los datos obtenidos en un estudio (Datta, *et al.*, 2006). Tal es el caso del estudio filogenético realizado sobre las especies del género *Vicia*, donde encontraron que los niveles de similitud eran por arriba del 80%, además se observó que en 6 variedades de una misma especie presentaron un parentesco del 95% (Sakowicz, *et al.*, 2006).

El coeficiente de parentesco obtenido de las 21 cepas estudiadas fue por arriba del 90% como resultado de las pruebas bioquímicas de cada uno de las cepas con respecto al Manual de Determinación Bacteriológica Bergey's. De acuerdo a la caracterización bioquímica por el método convencional, la cepa de *Serratia* sp MOR4.1 presentó un parentesco del 97.3% con la cepa de *S. entomophila* A1MO2 y de 91.6% con *Serratia marcescens*, y en concordancia con lo descrito por Grimont *et al.*, en 1988, *S. entomophila* no descarboxila lisina, arginina y ornitina, así como no desamina la fenilalanina, a diferencia de *S. marcescens* que descarboxila lisina y ornitina. En nuestro estudio la cepa de *Serratia* sp MOR4.1 no descarboxiló ninguno de los aminoácidos anteriormente descritos, por lo tanto tiene mayor parentesco a *S. entomophila* que a *S. marcescens*. Aunado a que cuando se realizó la Correlación de Pearson's, también se observó que *Serratia* sp MOR4.1 presentó un parentesco con *S. entomophila* de 0.861, mientras que con *S. marcescens* de 0.681.

Con el fin de hacer un análisis filogenético del género *Serratia* a partir de las secuencias nucleotídicas del gen *RNAr 16S* de las 11 especies del género *Serratia* descritas hasta el momento, se obtuvieron 26 secuencias nucleotídicas completas del gen *16S RNAr* del Banco de genes, estas se

alinearon con el programa ALINE1 (Figura 3). El alineamiento mostró que las posiciones de nucleótidos 170-215, 405-461, 573-643 y 984-1125, sobre salen importantes diferencias nucleotídicas entre las especies de *Serratia*. Por otro lado, se puede observar que existen regiones muy conservadas entre las secuencias comparadas. De manera similar a lo reportado por Spröer *et al.* en 1999, que con respecto a su estudio filogenético, se encontraron dos grupos correspondientes para el género *Serratia*. Como miembros del Grupo I, coloca a *S. odorifera*, *S. marcescens* y *S. rubidaea*; como miembros del Grupo II a *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans* y *S. grimesii*, además de que reporta similitudes mayores al 95%. En nuestro estudio a diferencia de Spröer *et al.* y buscando tener más precisión, incluimos 11 especies del género *Serratia* con diferentes secuencias y otros tres géneros que correspondieron a *E. coli*, *E. aerogenes* y *K. pneumoniae*. En el árbol filogenético de la Figura 8 se observaron dos grupos, en uno se separó *E. coli* de los demás géneros, en el otro grupo se subdividen en dos, donde los miembros del subgrupo A.1 (figura 9) corresponden a *S. grimesii*, *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans* y *S. liquefaciens*; los miembros del subgrupo A.2 (Figura 9) corresponden a *S. odorifera*, *S. marcescens*, *S. rubidaea*, *S. liquefaciens*, *S. ureilytica*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*. Los porcentaje de parentesco obtenidos con respecto a *S. entomophila* fue el más bajo para *E. coli* del 94.2% y el más alto para *S. ficaria* con el 99.9%, las otras especies fluctuaron entre el 95.9% al 98.7%. Estos altos porcentajes de homología en secuencias de base hacen evidente la dificultad para separar miembros de diferentes especies incluso podrían confundirse diferentes géneros (ejemplo *K. pneumoniae* y *S. liquefaciens*). Por lo que es necesario buscar otra alternativa que muestre mayor correlación entre especies de un mismo género.

Por otro lado, basados en los estudios de Ibrahim *et al.*, e Jenssen *et al.* en los cuales se obtuvieron iniciadores para PCR y las condiciones de amplificación del espacio intergénico del gen *16S-23S RNAr*, los cuales están basados en el polimorfismo genético de esta región. En el estudio de Ibrahim, este determinó el polimorfismo genético a partir de los géneros *Acinetobacter* y *Fransicella* que son bacterias patógenas de aislamiento poco frecuente. Al utilizar estos iniciadores para PCR en nuestras cepas estudiadas, sólo se observó amplificación de la cepa *E. aerogenes* LT. Se puede suponer que no resultó la amplificación para las cepas, debido a que Ibrahim obtuvo un polimorfismo genético a partir de los géneros *Acinetobacter* y *Fransicella* que son bacterias patógenas de aislamiento poco frecuente pertenecientes a otro grupo taxonómico (Ibrahim, *et al.*, 1999).

Por otro lado, Jensen *et al* en 1993, obtuvo el polimorfismo genético del espacio intergénico *I6S-23S RNAr* sin el uso de enzimas de restricción, a partir de bacterias patógenas de aislamiento frecuente en el laboratorio clínico, con el fin de obtener una identificación de género y especie bacteriana, sin la necesidad de una identificación previa. Reporta que los productos de PCR pueden generar en el gel de electroforesis de dos hasta seis bandas y así tener polimorfismos genéticos para cada especie. En este estudio con las 15 cepas del género *Serratia* presentaron en general un polimorfismo diferente en cada una de las 10 especies estudiadas y se observó que en las tres cepas de *S. entomophila* tuvo un perfil de bandas similar. Con respecto a *S. marcescens*, las cepas tipo de *S. marcescens* ATCC 8100 y S-48 presentaron un perfil de bandas similar, mientras que en *S. marcescens* MAC se observaron diferencias en dos bandas. Las demás especies tuvieron un polimorfismo diferente entre ellas y lo mismo se observó en los seis géneros restantes. Otro punto interesante es el que la mayoría de los cultivos del género *Serratia* presentaron 5 bandas de diferente peso molecular que van de los 400 bp a los 1,500 bp, por otro lado *Serratia sp* MOR4 y *S. liquefaciens* ATCC 27592 tuvieron tres bandas que van de 200 a los 400 pb y de 250 a 550 pb, respectivamente; en *S. ficaria* ATCC 33105 se observaron seis bandas que van de los 200-1,000 pb y para *S. rubidae* ATCC 27592 ocho bandas que van de 200 a los 1,000 pb y que tres bandas de estas son similares a tres bandas de *S. ficaria*. En general podemos destacar que en la mayoría de las cepas del género *Serratia*, *E. aerogenes* y *K. pneumoniae* predominó la banda de 600 pb. Lo que nos puede indicar que esta banda no es específica de género. Al someter los datos obtenidos por PCR a la correlación de Pearson's se observó que el parentesco entre los grupos de especies es de -0.039, lo que significa que no hay relación entre los grupos.

Uno de los problemas que se tienen es el poder comparar la técnica con otros aislados de todas las especies. Solamente se comparó *S. marcescens* ATCC 8100, S-48 y MAC, además de *Serratia sp* MOR4.1, con otras cepas de la misma especie obtenidos de una larva enferma (Zitlaly, 2004) (*S. marcescens* 50a, 83a, 94 y 97b). En la Figura 7 se puede observar que las 7 cepas de *S. marcescens* comparten las bandas de 700 y 500 bp, 6 cepas la banda de 450 bp, 5 cepas la banda de 1,000 bp, 4 cepas comparten la banda de 300 bp. Con la correlación de Pearson existe una buena correlación de los aislados con las cepas tipo, destacando que los cultivos de *S. marcescens* 50a, 94 y 97b presentaron una correlación de 1.0 entre ellos, así mismo entre *S. marcescens* ATCC 8100 y S-48,

estos cultivos con respecto a las tres cepas restantes presentaron una correlación mínima de 0.592 y 0.751. Por otro lado, la correlación con *S. marcescens* MAC fue de 0.258, con *S. marcescens* 83ª fue de 0.751 y la correlación con *Serratia sp* MOR4.1 marco una diferencia con respecto a todos los demás cultivos de -0.263. Al realizar el árbol filogenético (Figura 10), se muestra un solo grupo con todos los cultivos de *S. marcescens* a diferentes distancias lo que nos indica el gran parecido entre los cultivos.

Con respecto a la cepa *Serratia sp* MOR4.1 sólo presentó tres bandas y no tuvo parecido con otras cepas de acuerdo a la correlación de Pearson, donde el mayor parentesco fue con *S. liquefaciens* y *S. proteamaculans* con una distancia de 0.284 lo que nos indica que son muy distantes, por lo que no tienen mucho parecido aunque se encuentren en el mismo subgrupo. En el estudio de parentesco realizado a partir de pruebas bioquímicas se observó mayor acercamiento de *Serratia sp.* MOR4.1 a *S. entomophila* que *S. marcescens*, a diferencia del obtenido con el polimorfismo genético de ISRs que fue de 0.171 para *S. entomophila* y de -0.039 para *S. marcescens*, lo que nos indica que con esta metodología no se pudo aproximar a *Serratia sp* MOR4.1 con ninguna de las cepas en estudio.

Se ha sugerido que el miembro más cercano de *S. entomophila* es *S. marcescens* (Grimont, *et al.*, 1988). Sin embargo, en nuestro estudio vemos que *Serratia sp.* MOR4.1 esta muy distante de *S. marcescens* desde el punto de vista, tanto bioquímico como por la amplificación del espacio intergénico 16-23S, contrariamente a lo que se observó para *S. entomophila*. Lo que significa que tiene más parecido a *S. entomophila* que a *S. marcescens*. Para visualizar mejor esta diferencia se intentó hacer secuenciación del DNA16S de la cepa *Serratia sp* MOR4.1 mediante el uso de oligos universales para poder sintetizar el DNA 16S por PCR. No se obtuvo amplificación de DNA (MEDI LABS INC, USA), posiblemente debido a sustancias inhibitorias de la polimerasa en el sistema, lo que complica a esta metodología como sistema preferente de discriminación.

Para poder ubicar taxonomicamente a esta cepa se requiere hacer más intentos con diferentes oligonucleotidos para determinar la secuencia de DNA 16S. Es recomendable estudios de reasociación DNA-DNA, que pudieran ser efectivos pero muy tardados, en ese sentido el sistema de Jensen *et al* resulta ser ventajoso. Por lo tanto, se consideró que el sistema propuesto por Jensen *et al*, aplicado al género *Serratia* es más efectivo para separar las especies.

CONCLUSIONES

- 1.- El método de identificación bioquímica convencional resulto ser más exacto que los métodos automatizados en la tipificación de las diferentes especies del género *Serratia*.
- 2.- Los sistemas Microscan y Sensititre no permitieron diferenciar las diferentes especies del género *Serratia*.
- 3.- En las secuencias de nucleótidos *16S RNAr* no existen tantas diferencias que permitan agrupar sin equivocación a las especies del género *Serratia*.
- 4.- Los iniciadores y condiciones propuestos por Ibrahim *et al* no amplificaron los ISRs de las especies del género *Serratia*, por lo que se descarta el uso de este método.
- 5.- Con los iniciadores y condiciones propuestos por Jensen *et al* se amplificaron los ISRs y se pudo diferenciar las especies del género *Serratia*. Esta metodología es recomendable para diferenciar especies e incluso variedades del género *Serratia*.

PERSPECTIVAS

En la mayoría de los miembros del género *Serratia*, la identificación por métodos fenotípicos y genéticos se dificulta debido al parentesco tan cerrado que existe entre ellos, además, de que las identificaciones se realizan generalmente por métodos bioquímicos que no siempre correlacionan con lo reportado en la bibliografía. El método molecular realizado en este estudio mostro una aceptable diferenciación de las especies de éste género, por lo que, se sugiere probar esta técnica con más aislados del género *Serratia*, con el fin de notar mejor diferencia, ya que todas las cepas utilizadas fueron cepas tipo. También es recomendable introducir más secuencias de este y otros géneros y así, poder obtener porcentajes de parentesco y comparar con otros métodos, como por ejemplo el bioquímico. Además sería interesante obtener la secuencia del DNAr 16S de las cepas en estudio y poder hacer el análisis de secuencias y obtener el dendrograma para ver si correlacionan con las secuencias analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott Sharon. ***Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter y Serratia***. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC. Manual of clinical microbiology. 7^a edition. ASM Press. Washington DC, USA. 1999:475-482.

Antón A, Martínez-Murcia A, Rodríguez-Varela F. **Sequence diversity in the 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of the *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12.** J Bacteriol 1996;47:62-72.

Asociación de Ingenieros Agronomos del Valle. En Línea: http://www.asiava.com.co/guia_agricola.html

Aucken MH, Wilkinson GS, Pitt LT. **Identification of capsular antigens in *Serratia marcescens*.** J Clin Microbiol 1997;35:59-63.

Badenoch PR, Thom AL, Coster DJ. ***Serratia ficaria* Endophthalmitis.** J Clin Microbiol 2002;40:1563-1564.

Berg G. **Diversity of antifungal and plant-associated *Serratia plymutica* strains.** J Appl Microbiol 2000;88:952-960.

Bollet Claude, Gannier Marc, Sainty Jean-Marie, Philippe Orhesser, Philippe De Micco. ***Serratia fonticola* isolated from a leg abscess.** J Clin Microbiol 1991;29:834-835.

Bollet C, Gannier M, Sainty JM, Orhesser P, De Micco P. ***Serratia fonticola* isolated from a leg abscess.** J Clin Microbiol 1991;29:834-835.

Breed RS, Murray EGD, Smith NR. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** 7^a edition. The Williams and Wilkins Company. Baltimore USA. 1957:290-340.

Callaghan MO, Jackson TA. **Isolation and Enumeration of *Serratia entomophila*-a Bacterial pathogen of the New Zealand Grass Grub, *Costelytra zealandica*.** J Appl Bacteriol 1993;75:307-314.

Chmel Herman. ***Serratia odorifera* biogrupo 1 causing an invasive human infection.** J Clin Microbiol 1988;26:1244-1245.

Chun J, Huq A, Cowell R. **Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*.** Appl Environ Microbiol 1999;65:2202-2208.

Cook MA, Lopez JJ. ***Serratia odorifera* biogrupo 1: an emerging pathogen.** J Am Osteopathol Assoc 1998;98:505-507.

Datta Susmita, Datta Sounath. **Methods for evaluating clustering algorithms for gene expression data using a reference set of functional classes.** BMC Bioinformatics 2006;7:397. En línea: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/397>

Eliosa Leon Hector, Navarro Carvajal Ma. del Carmen. **La sistemática en México.** Elementos 2005;55:13-19.

FAO. **Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.** Última actualización: febrero 2005. En línea: <http://www.fao.org>

Farmer III JJ. **Enterobacteriaceae: Introducción e identificación.** In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 7^a edition. ASM Press. Washington DC, USA. 1999:442-458.

Gal-Mor O, Finlay BB. **Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence.** Cellular Microbiol 2006;8:1707-1719.

García Martínez J, Martínez Murcia AJ, Rodríguez Varela F. **Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of the same *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12.** J Bacteriol 1996;178:6374-6377.

García Martínez J, Martínez Murcia AJ, Rodríguez Varela F, Zorraquino A. **Molecular evidence supporting the existence of two major groups in uropathogenic *Escherichia coli*.** FEMS Immunol and Med Microbiol 1996;14:231-244.

Giddens Stephen R, Tormo Antonio, Mahanty Khris H. **Expression of the antifeeding gene *anf A1* in *Serratia entomophila* requires RpoS.** Appl Environ Microbiol 2000;66:1711-1714.

Glare TR, Corbett GE, Sadler AJ. **Association of a large plasmid with amber disease of the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*, caused by *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*.** J Invertebr Pathol 1993;62:165-170.

Grimont PAD, Grimont F, Richard C, Davis DR, Steigenwalt AG, Brenner DJ. **Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. Nov. (type strain ICPB 3995).** Int J Sys Evol Microbiol 1978;28:453-463.

Grimont PAD, Grimont F. **The Genus *Serratia*.** In Starr MP, Stolp H. The prokaryotes, a handbook on habitat, isolation and identification of bacteria. 3^a edition. Springer-Verlag, New York USA. 1981;II:1187-1203.

Grimont PAD, Jackson TA, Ageron E, Noonan MJ. ***Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*.** Int J Syst Bacteriol 1988;38:1-6.

Grkovic S, Glare TR, Jackson TA, Corbett GE. **Genes Essential for Amber Disease in Grass Grubs Are Located on the Large Plasmid Found in *Serratia entomophila* and *Serratia proteamaculans*.** Appl Environ Microbiol 1995;61:2218-2223.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9^a edition. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, Maryland USA. 1994:175-247.

Hurst Mark RH, Glare Travis R, Jackson Trevor A, Ronson Clive W. **Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photorhabdus luminescens***. J Bacteriol 2000;182:5127-5138.

Ibrahim A, Gerner SP, Sjo SA. **Amplification and Restriction Endonuclease Digestion of a Large Fragment of Genes Coding for rRNA as a Rapid Method for Discrimination of Closely Related Pathogenic Bacteria**. J Clin Microbiol 1996;34:2894-2896.

Jensen MA, Webster JA, Straus N. **Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms**. Appl Environ Microbiol 1993;59:945-952.

Johnson VW, Pearson JF, Jackson TA. **Formulation of *Serratia entomophila* for Biological Control of Grass Grub**. New Zealand Plant Protection 2001;54:125-127.

Kay Mifflin Jaenette. **Identification of Human Pathogenic *Vibrio species***. (1994). En línea: www.sph.uq.edu.au/acithn/thesis/MIFLIN.html

Kelly MT, Brenner DJ, Farmer III JJ. ***Enterobacteriaceae***. In Lennette EH, Balows A, Husler WJ, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. 4^a edition. ASM Press. Washington DC, USA. 1985:263-277.

Klingler JM, Stowe RP, Obenhuber DC, Groves TO, Mishra SK, Pierson DL. **Evaluation of the Biolog Automated Microbial Identification System**. Appl Environ Microbiol 1992;58:2089-2092.

Konemam EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. **Diagnóstico Microbiológico: TextoAtlas**. 5^a Edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1999:152-185.

Krieg NR, Holt JG. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 7^a edition. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, Maryland USA. 1984:477-484.

Kumar S, Tamura K, Nei M. **MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment**. Briefings in Bioinformatics 2004;5:150-163.

Lim Daniel. **Microbiology**. 2^a edition. WCB/Mac Graw-Hill, New York, USA. 1998:305-348.

Mac Faddin Jean F. **Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica**. 2^a Reimpresión. Ed. Panamericana. México DF. 1993:205-274.

Chapin KC, Musgnug MC. **Validation of the Sensititre Automated Reading and Incubation Sistem (ARIS) for Antimicrobial Susceptibility Testing in a High Volumen Clinical Microbiology Laboratory.** J Clin Microbiol 2003;41:1951-1956.

Nash P, Krenz MM. **Culture Media.** In Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. 5^a edition. ASM Press. Washintong DC, USA. 1991:1226-1288.

Nixon KC, Ochoterena H. **Taxonomía tradicional, cladística y construcción de hipótesis filogenéticas.** In Hernández HM, García AA, Alvarez F, Ulloa M. (Compiladores) **Enfoques Contemporáneos para el Estudio de la Biodiversidad.** 1^a Edición. Ediciones Científicas Universitarias, Fondo de Cultura Económica. Universidad Nacional Autónoma de México, DF. 2001:15-38.

NSTC (National Science and Tecnology Council). **Infectious Disease: A Global Health Threat.** Reporte del National Science and Tecnology Council. Washington, USA. 1995. En línea: http://www.ostp.gov/nstc/html/_reports.html

Núñez VME, Ramírez GRM, Calderón MA, Hernández L, Romero A, Rodríguez SZ, Aranda E, Bravo A, Villalobos FJ. **Bacterias Entomopatógenas para el Control de Larvas de *Phyllophaga spp.*** En: Aragón GA, Marín JA (Eds.). Estudios Sobre Coleópteros del Suelo en America. Publicación Especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 2003:347-359.

Podzorski RP, Persing DH. **Molecular detection and identification of microorganisms.** In Murray PR, Baron EJ, Pfaller, MA, Tenover FC, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. 6^a edition. ASM Press. Washintong DC, USA. 1999:130-157.

D'amato RF, EJ Bottone, D Amsterdam. **Substrate Profile Systems for the Identification of Bacteria and Yeasts by Rapid and Automated Approches.** In Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 5^a edition. ASM Press. Washintong DC, USA. 1991:128-136.

Rodríguez SZ, Villalobos FJ, Hernández L, Aranda E, Nuñez VME. **Bacterias entomopatógenas para el manejo de daños provocados por “Gallina Ciega” (Coleoptera: Scarabaeidae).** Claridades Agropecuarias 2005);146:50-58.

Sakowicz Tomasz, Cieslikowki Tomasz. **Phylogenetic analyses within three sections of the genus *Vicia.*** Cellular Molec Biol Lett 2006;11:594-615.

Soler L, Marco F, Vila J, Chacon MR, Guarro J, Figueras MJ. **Evaluation of two miniaturizad system, MicroScan W/A and BBL cristal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas spp.*** J Clin Microbiol 2003;41:5732-5734.

Spooner MD, Lara-Cabrera S. **Sistemática molecular y evolución de plantas cultivadas.** En Hernández HM, García Alderete AN, Álvarez F, Ulloa Miguel. **Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad.** Primera Edición. Ed. Fondo de Cultura Económica, Instituto de Biología, UNAM. México DF. 2001:57-114.

Spröer Cathrin, Mendrock Ulrike, Swiderski Jolantha, Lang Elke, Stackebrandt Erko. **The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the Family *Enterobacteriaceae*.** Int J Sys Bacteriol 1999;49:1433-1438.

Stock Ingo, Burak Sonja, Kimberley Jane, Gruger Thomas, Wiedemann Bernd. **Natural antimicrobial susceptibilities of strains of “unusual” *Serratia* species: *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* and *S. rubidaea*.** J Antimicrob Chemother 2003;51:865-885.

Trias J, Viñas V, Guinea J, Lorén G. **Induction of Yellow Pigmentation in *Serratia marcescens*.** Appl Environ Microbiol 1988;54:3138.

Trought TET, Jackson TA, French RA. **Incidence and transmission of a disease of grass grub *Costelytra zealandica* in Canterbury N. Z.** J Exp Agric 1982;10:79-82.

Ursua PR, Unzaga MJ, Melero P, Iturburu I, Ezpeleta C, Cisterna R. ***Serratia rubidaea* as an invasive pathogen.** J Clin Microbiol 1996;34:216-217.

Villalobos FJ, Romero-López A y Nuñez-Valdez ME. **Diagnóstico del problema causado por gallina ciega en cultivos del maíz del estado de morelos.** En Memorias del 1er Simposium de Manejo Integrado de Plagas del Estado de morelos. 2001. UAEM. Morelos, México

Vivas J, González JA, Barbeyto L, Rodríguez LA. **Identification of Environment *Serratia plymuthica* strains with the new combo panel type 1S.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2000;95:227-229.

Volkow-Fernandez P, Ponce de Leon-Rosales S, Sifuentes-Osornio J, Calva-Mercado JJ, Ruíz-Palacios GM, Cerbón MA. **Na epidemic of primary bacteremia due to na endemic strain of *Serratia marcescens* in an intensive care unit.** Salud Pública Mex. 1993;35:440-447.

Walker G, Hertle R, Braun V. **Activation of *Serratia marcescens* Hemolysin through a Conformational Change.** Infec Immun 2004;72:611-614.

Yi-Wei T, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH. **Comparison of Phenotypic and Genotypic Techniques for Identification of Unusual Aerobic Pathogenic Gram-Negative Bacilli.** J Clin Microbiol 1998;36:3674-3679.

Woese Carl R. **Bacterial evolution.** Microbiological Reviews 1987;51:221-271.