



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS
MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN POLIFÁSICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

PACTLI ALEXIS CABANÉDOS RENAUD



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Q.F.B. Aurora Irma Ortegón Ávila

VOCAL: Q.F.B. Eduardo Bonilla Espinosa

SECRETARIO: M. en B. Martha Giles Gómez

1er. SUPLENTE: Dr. José Adelfo Escalante Lozada

2º SUPLENTE: M. en C. Norma Angélica Camacho De la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Departamento de Biología, Sección Cepario, Edificio A, 1er. piso, laboratorio 1-C, Facultad de Química, UNAM.

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR LOS PROGRAMA DGAPA-PAPIME-UNAM PE205606 Y PE203410.

M. en B. Martha Giles Gómez

ASESOR DEL TEMA

Pactli Alexis Cabanétos Renaud

SUSTENTANTE

ÍNDICE	PÁGINA
Índice de tablas	VIII
Índice de figuras	IX
1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Taxonomía	3
2.1.2 Taxonomía bacteriana	3
2.2 Identificación de microorganismos	4
2.2.1 Características morfológicas	5
2.2.2 Tinciones diferenciales	6
2.2.3 Ensayos bioquímicos	6
2.2.4 Serología	7
2.3 Métodos de identificación de enterobacterias	8
2.3.1 Métodos fenotípicos	8
2.3.2 Métodos rápidos	9
2.3.3 Métodos moleculares empleados en la identificación de microorganismos	10
2.3.3.1 Cronómetros evolutivos	10
2.3.3.2 Elección del cronómetro adecuado	11
2.3.3.3 ARNs ribosómicos como cronómetros evolutivos	12
2.3.3.4 Secuencias del ARNs ribosómicos y evolución celular	13
2.3.3.5 Método de secuenciación de Sanger	14
2.3.3.6 Generación de árboles filogenéticos a partir de las secuencias de los ARNs	16
2.3.4 Identificación genotípica	17
2.4 Enterobacterias	18

2.4.1 Generalidades	18
2.4.2 Importancia	19
2.4.3 Clasificación	20
2.4.3.1 Importancia clínica de enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos	21
2.4.4. Microorganismos Gram-negativos involucrados en la descomposición de alimentos	22
2.4.5 Coliformes como indicadores de sanidad alimentaria	25
3. Antecedentes	27
4. Objetivos	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos particulares	30
5. Metodología	31
5.1 Microorganismos empleados en el estudio	32
5.2 Reactivación de cepas	33
5.3 Comprobación de pureza de las cepas	33
5.4 Caracterización fenotípica	35
5.4.1 Características morfológicas	35
5.4.2 Características microscópicas	36
5.4.3 Pruebas bioquímicas	37
5.4.4 Pruebas bioquímicas complementarias	39
5.5 Identificación molecular	41
5.5.1 Preparación de la cepa	41
5.5.2 Extracción del ADN cromosomal bacteriano	41
5.5.3 Electroforesis	43
5.5.4 Amplificación del gen ribosomal 16S	45
5.5.5 Condiciones de amplificación	47
5.5.6 Electroforesis	47

5.5.7 Purificación de productos de PCR	47
5.5.8 Electroforesis	49
5.5.9 Secuenciación genética	49
5.5.10 Análisis de secuencias	50
6. Resultados y discusión	52
6.1 Reactivación	52
6.2 Caracterización fenotípica	52
6.2.1 Aislamiento y purificación. Características morfológicas y microscópicas	52
6.3 Identificación bioquímica	55
6.4 Caracterización genotípica	57
6.4.1 Extracción de ADN cromosomal de las cepas y electroforesis	57
6.4.2 Amplificación del gen 16S por PCR y electroforesis	59
6.4.3 Purificación del gen 16S y electroforesis	61
6.4.4 Secuenciación del gen ribosomal 16S	63
6.5 Identificación fenotípica y genotípica de las cepas individuales	65
6.6 Árbol filogenético general de los microorganismos Gram-negativos	93
7. Conclusiones	94
8. Perspectivas	95
9. Bibliografía	96
10. Apéndices	101
10.1 Apéndice 1	101
10.2 Apéndice 2	102

ÍNDICE DE TABLAS

PÁGINA

Tabla 1. Criterios de definición fenotípica para la inclusión en la familia Entobacterias, excepciones a la regla	20
Tabla 2. Descomposición de alimentos causada por enterobacterias	23
Tabla 3. Medios y condiciones empleados en la purificación de microorganismos	34
Tabla 4. Características morfológicas observadas y reportadas en la bibliografía para las cepas analizadas	35
Tabla 5. Componentes, reacciones/enzimas y resultados de lectura de las diferentes pruebas de API20E	39
Tabla 6. Características de los primers utilizados en el estudio	46
Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción de PCR con la concentración y volumen utilizado	46
Tabla 8. Condiciones de amplificación	47
Tabla 9. Características morfológicas y microbiológicas observadas y reportadas en la bibliografía para las cepas analizadas	53
Tabla 10. Resultados de identificación bioquímicas de los bacilos Gram-negativos empleando el sistema de identificación API20E	56
Tabla 11. Identificación fenotípica y genotípica de bacterias estudiadas empleando el sistema de identificación API20E y la secuenciación del gen del ADNr 16S	66

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1. ARN ribosomal 16S	13
Figura 2. Secuenciación del ARN ribosómico de un cultivo axénico de un microorganismo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	15
Figura 3. Metodología de secuenciación de Sanger	16
Figura 4. Metodología general utilizada en la identificación de los microorganismos Gram-negativos	31
Figura 5. Esquema de la metodología de identificación bioquímica por API 20E	38
Figura 6. Extracción de ADN cromosomal empleando el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de Mobio Laboratories	44
Figura 7. Marcador de peso molecular de 1 Kbp de Invitrogen	47
Figura 8. Purificación del producto de PCR empleando el sistema miniaturizado Pure Link PCR Purification Kit de Invitrogen	48
Figura 9. Identificación bioquímica con el sistema API 20E para la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> CFQ.	57
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) del ADN cromosomal de las cepas en estudio	58
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) del ADN cromosomal de las cepas en estudio	58
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) del ADN cromosomal de las cepas en estudio	59
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S de las cepas en estudio	60
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S de las cepas en estudio	61
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S purificados de las cepas en estudio	62
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S purificados de las cepas en estudio	63

Figura 17. Cromatograma de la secuencia del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ obtenido por el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing	64
Figura 18. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ en formato FASTA empleando el programa BIOEDIT	64
Figura 19. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	67
Figura 20. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> CFQ (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	68
Figura 21. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter</i> sp. CFQ (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	70
Figura 22. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	71
Figura 23. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	73
Figura 24. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	74
Figura 25. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Klebsiella oxytoca</i> (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	75
Figura 26. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 9992 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	77
Figura 27. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Salmonella</i> Enteritidis (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	78
Figura 28. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Salmonella</i> Nitra (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	80

Figura 29. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Shigella sonnei</i> (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	81
Figura 30. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Proteus mirabilis</i> P13 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	83
Figura 31. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Proteus vulgaris</i> P20 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	84
Figura 32. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	85
Figura 33. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	86
Figura 34. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Vibrio cholerae</i> No O1 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	88
Figura 35. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Yersinia enterocolitica</i> (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	89
Figura 36. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Serratia marcescens</i> (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI	91
Figura 37. Árbol filogenético general con todas las secuencias parciales del ADNr 16S de las cepas estudiadas y las secuencias parciales de cepas de referencia con mayor similitud obtenidas del NCBI	93
Figura 38. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ empleando el programa Bioedit.	102
Figura 39. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter</i> sp. CFQ empleando el programa Bioedit.	102
Figura 40. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Enterobacter cloacae</i> empleando el programa Bioedit.	103
Figura 41. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 10536 empleando el programa Bioedit.	103

Figura 42. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 11229 empleando el programa Bioedit.	104
Figura 43. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Klebsiella pneumoniae</i> CFQ empleando el programa Bioedit.	104
Figura 44. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131 empleando el programa Bioedit.	105
Figura 45. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Salmonella</i> Typhi ATCC 9992 empleando el programa Bioedit.	105
Figura 46. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Salmonella</i> Enteritidis CFQ empleando el programa Bioedit.	106
Figura 47. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Salmonella</i> Nitra CFQ empleando el programa Bioedit.	106
Figura 48. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Shigella sonnei</i> CFQ empleando el programa Bioedit.	107
Figura 49. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Proteus mirabilis</i> CFQ P13 empleando el programa Bioedit.	107
Figura 50. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Proteus vulgaris</i> CFQ P20 empleando el programa Bioedit.	108
Figura 51. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Serratia marcescens</i> CFQ S48 empleando el programa Bioedit.	108
Figura 52. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 empleando el programa Bioedit.	109
Figura 53. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 empleando el programa Bioedit.	109
Figura 54. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Vibrio cholerae</i> No O1 empleando el programa Bioedit.	110
Figura 55. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa <i>Yersinia enterocolitica</i> CFQ empleando el programa Bioedit.	110

1. Resumen

La identificación de microorganismos tradicionalmente se ha realizado mediante el uso de criterios fenotípicos que incluyen características microscópicas, morfocoloniales y bioquímicas. En la actualidad estos criterios de caracterización fenotípica se complementan con criterios moleculares basados en la tipificación molecular y en el análisis de genes específicos como son los ADN ribosomales 16S. El Cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, había utilizado estos criterios fenotípicos para asegurar la identidad de cada una de las cepas que resguarda, en el presente proyecto se emplearon algunas bacterias Gram-negativas resguardadas en el cepario utilizando sistemas miniaturizados y una identificación molecular de las mismas; de la misma manera, se identificaron por criterios fenotípicos y criterios moleculares veintidós microorganismos que comprendieron enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos. Fenotípicamente se utilizó el sistema API 20E, se encontró una correlación adecuada en el 90.91% de los casos; con respecto a la caracterización genotípica, se extrajo el ADN cromosomal de los microorganismos empleados en el estudio. Para todas las cepas empleadas, se amplificó, purificó y secuenció el gen *rrs*, el cual codifica para el ARNr 16S. Las secuencias se identificaron en la base de datos del NCBI empleando el programa BLAST (Basic Alignment Search Tool), finalmente se construyeron los árboles filogenéticos respectivos.

Para las bacterias estudiadas *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter* sp., *Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Nitra, *Shigella*

sonnei, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* se encontró correlación perfecta entre la caracterización fenotípica y genotípica; para la cepa *Serratia marcescens* se encontró correlación fenotípica a nivel de género y correlación genotípica a nivel de género y especie; para la bacteria *Escherichia coli* ATCC 10536 se encontró correlación a nivel de género entre la caracterización fenotípica y genotípica, sin embargo, fue inconsistente con la clasificación del cepario.

Se demostró que a pesar de que la identificación genotípica es más consistente, la información obtenida por métodos fenotípicos y genotípicos complementa la identidad de una bacteria.

2. Introducción

2.1 Taxonomía

La taxonomía es la ciencia de la clasificación y está constituida por dos subdisciplinas principales: identificación y nomenclatura. Tradicionalmente, la taxonomía bacteriana se ha basado en los análisis fenotípicos como elementos básicos de la clasificación. Debido a que las bacterias son tan pequeñas y contienen relativamente pocos caracteres estructurales indicativos de sus raíces evolutivas, la filogenia de los procariotes se ha empezado a conocer sólo a partir de los análisis genotípicos. Sin embargo, los análisis fenotípicos (fenéticos) han tenido tradicionalmente una función importante en la identificación y clasificación bacteriana, especialmente en los campos aplicados, donde la identificación puede ser un fin en sí misma como, por ejemplo, en el diagnóstico microbiológico clínico. En la taxonomía bacteriana clásica, se determinan varias características y los resultados se emplean para agrupar los organismos en la escala taxonómica, desde la especie hasta el dominio. Varios aspectos de la morfología, nutrición, fisiología y hábitat son características con valor taxonómico ampliamente utilizadas (Madigan *et al.*, 2003).

2.1.2 Taxonomía bacteriana

Muchos cambios han tenido lugar en la clasificación o taxonomía de las bacterias en las dos décadas pasadas. Muchos de los nuevos taxones fueron creados como resultado del empleo de métodos moleculares y genéticos, solos o combinados

con otros métodos tradicionales; en la actualidad algunas de las aproximaciones que se emplean son:

1. Homología de ADN y contenido molecular de %G+C en ADN
2. Similitud de secuencias de ARN_r, 23S, 16S y 5S.
3. Catalogación de oligonucleótidos.
4. Análisis taxonómico numérico del total de proteínas solubles o de una batería de características morfológicas y bioquímicas.
5. Análisis de la pared celular.
6. Perfiles serológicos.
7. Perfiles de ácidos grasos.

Aunque algunos de estos han sido utilizados por muchos años (análisis de la pared celular y perfiles serológicos) otros (similitud de secuencias de ARN_r) tuvieron amplio uso apenas en los ochentas (Jay *et al.*, 2005).

Existen diversos grupos de bacterias en la naturaleza, los cuales se agrupan taxonómicamente de acuerdo a características como la morfología microscópica, Gram, tipo de respiración y algunas reacciones bioquímicas típicas, entre otras.

2.2 Identificación de microorganismos

Los microorganismos se identifican para propósitos prácticos, por ejemplo, para determinar el tratamiento apropiado para una infección. La mayoría de las bacterias y arqueas no han sido cultivadas, los científicos estiman que sólo el 1% de los microorganismos han sido descubiertos. Esto originó que se hayan

desarrollado una variedad de métodos para probar reacciones metabólicas y otras características (Tortora *et al.*, 2004).

La dificultad en los esquemas de identificación radica en que los resultados de las pruebas de caracterización pueden variar dependiendo del tamaño del inóculo, la temperatura de incubación, la duración del periodo de incubación, la composición del medio, la superficie o volumen del medio y los criterios usados para definir como “positiva” o “negativa” una reacción. El uso de sistemas comerciales de análisis ofrecen un intento para incrementar la estandarización entre los diferentes laboratorios, debido al alto grado de control de calidad ejercido sobre los medios y agentes, pero ningún sistema ha sido actualmente aceptado como universal para un taxón dado. Es altamente recomendable que se comparen las características de una bacteria aislada que se sospecha que pertenece a cierta especie con las de cepa tipo o una cepa de referencia establecida para esa especie (Holt *et al.*, 2000).

2.2.1 Características morfológicas

Las características morfológicas o estructurales han ayudado a los taxónomos a clasificar organismos por 200 años. Los organismos superiores son frecuentemente clasificados de acuerdo a su observación anatómica, pero los microorganismos se ven muy similares para poderlos clasificar por sus estructuras, sin embargo, la morfología celular nos dice un poco sobre la relación filogenética. Las características morfológicas aún son útiles para identificar

bacterias, por ejemplo, diferencias en estructuras como endosporas o flagelos pueden ser de gran ayuda (Tortora *et al.*, 2004).

2.2.2 Tinciones diferenciales

Uno de los primeros pasos en la identificación bacteriana son las tinciones diferenciales. Las bacterias son Gram-positivas o Gram-negativas. Otras tinciones diferenciales como ácido alcohol resistencia pueden ser útiles para un grupo de microorganismos limitado. Estas tinciones se basan en la composición química de la pared celular y por lo tanto no son útiles para identificar las bacterias que carecen de pared celular (Tortora *et al.*, 2004).

2.2.3 Ensayos bioquímicos

La actividad enzimática es usada ampliamente para diferenciar bacterias. Inclusive bacterias muy relacionadas se pueden separar en diferentes especies sometiénolas a pruebas bioquímicas, como su habilidad para fermentar una serie de carbohidratos. Además, las pruebas bioquímicas pueden dar idea del nicho de las especies en el ecosistema. Por ejemplo, una bacteria que puede fijar nitrógeno proveerá importantes nutrientes para plantas y animales.

Se han desarrollado diversas pruebas para que se pueda identificar rápidamente el microorganismo patógeno y de esta forma se de el tratamiento adecuado. El tiempo necesario para identificar bacterias se puede reducir considerablemente con el uso de medios selectivos y diferenciales o por métodos rápidos de identificación. Los medios selectivos contienen ingredientes que suprimen el crecimiento de organismos competitivos y promueven el desarrollo de los

deseados, en cambio los diferenciales permiten al organismo deseado formar colonias que se distinguen (Tortora *et al.*, 2004).

Se han elaborado herramientas de identificación rápida sobre todo para grupos de bacterias médicamente importantes, como las entéricas (cuyo hábitat es el tracto gastrointestinal de humanos y animales). Estas herramientas están diseñadas para realizar diversas pruebas bioquímicas simultáneamente y pueden identificar bacterias entre 4 y 24 horas. Esto es llamado identificación numérica porque a los resultados de cada prueba se les asigna un número. De la forma más simple, una prueba positiva tiene asignado un valor de 1 y una negativa un valor de 0. En las pruebas comerciales, una prueba positiva tiene un valor asignado en un rango de 1 a 4 que está basado en la fidelidad e importancia de cada prueba, los resultados totales se comparan con bases de datos de microorganismos conocidos. Una limitación de las pruebas bioquímicas es que las mutaciones y la adquisición de plásmidos pueden generar cepas con características diferentes, además, si no se utiliza un gran número de pruebas, un organismo puede ser identificado incorrectamente (Tortora *et al.*, 2004).

2.2.4 Serología

La serología es la ciencia que estudia el suero sanguíneo y la respuesta inmune evidente en el suero. Los microorganismos tienen estructuras que funcionan como antígenos, es decir, los microorganismos que penetran el cuerpo de un animal estimulan la formación de anticuerpos, estos son proteínas que circulan en la sangre y se combinan de manera altamente específica con la bacteria que causa

su producción. Soluciones de anticuerpos usados en la identificación de muchos microorganismos médicamente importantes se encuentran comercialmente disponibles; esta solución es llamada antisuero. En un procedimiento llamado prueba de aglutinación en portaobjetos, las muestras de una bacteria desconocida se colocan en una gota de solución salina isotónica (SSI) en diversos portaobjetos. Luego antisueros conocidos diferentes entre sí, se añaden a cada muestra. La bacteria aglutina cuando se mezcla con los anticuerpos que fueron producidos en respuesta a esas especies o cepas de bacterias; una prueba positiva se indica por la presencia de aglutinación. Las pruebas serológicas no solamente pueden diferenciar especies; sino también, entre cepas de especies. Las cepas con diferentes antígenos son llamadas serotipos, serovars o biovars (Tortora *et al.*, 2004).

2.3 Métodos de identificación de enterobacterias

2.3.1 Métodos fenotípicos

Los estudios taxonómicos basados en pruebas bioquímicas llegaron a otro nivel entre 1950 y 1960 debido al uso generalizado de los programas computarizados. Estos programas permitieron un análisis mucho más rápido de la similitud entre diferentes grupos fenotípicos basados en taxonomía numérica con aproximadamente 85 % o más de similitud visto como la línea base o umbral entre dos grupos pertenecientes a la misma especie. En nuestros días los métodos fenotípicos pueden incluir una variedad de métodos adicionales a las pruebas bioquímicas. Las propiedades fenotípicas como herramienta taxonómica tienen

grandes limitaciones, entre las que se incluyen la valoración de solo una pequeña porción del ADN genómico de las especies y la potencial variabilidad en la expresión debida a las condiciones de cultivo (temperatura, pH o nutrientes). Aunque el uso de taxonomía numérica como herramienta primaria para identificar nuevos taxones no se encuentra en boga, las propiedades fenotípicas todavía juegan un papel muy importante en la taxonomía bacteriana (Doyle *et al.*, 2001).

2.3.2 Métodos rápidos

Un método rápido puede ser una simple modificación de un procedimiento que disminuya el tiempo de ensayo, debido a que los métodos convencionales pueden tardar días o hasta una semana completa, cualquier modificación que reduzca el tiempo de análisis puede ser llamada técnicamente un método rápido. Los métodos rápidos generalmente son más sensibles y específicos que los métodos microbiológicos convencionales, los cuales emplean medios específicos comerciales para la identificación o detección de microorganismos en diferentes matrices. El formato común de los métodos rápidos comerciales es: 1. Sistemas miniaturizados de identificación bioquímica (kits) 2. Modificación de métodos microbiológicos convencionales 3. Ensayos basados en anticuerpos 4. Ensayos basados en la detección de ácidos nucleicos.

La mayoría de los sistemas miniaturizados se componen de un recipiente desechable, con multicámaras, que contiene entre 15 y 30 sustratos, designados para identificar un grupo específico o especie. Con la excepción de algunos sistemas, en que los resultados se pueden leer en 4 horas, la mayoría de estos

requieren de una incubación entre 18 a 24 horas. En general, las pruebas bioquímicas miniaturizadas muestran entre 90 y 99% de exactitud y son comparables con los métodos de identificación convencionales. Los sistemas de identificación bioquímica son muy similares en procedimiento, costo y desempeño y ciertamente son mucho más sencillas y económicas que los métodos convencionales (Doyle *et al.*, 2001).

A pesar de que los métodos fenotípicos para la identificación y caracterización de bacterias en los alimentos se continúan usando, la clara tendencia es el uso de métodos genotípicos, especialmente para identificar patógenos en los alimentos.

2.3.3 Métodos moleculares empleados en la identificación de microorganismos

2.3.3.1 Cronómetros evolutivos

En la actualidad está claro que ciertas macromoléculas son cronómetros evolutivos, es decir, medidas del cambio evolutivo. Se ha demostrado que la distancia evolutiva entre dos organismos puede determinarse por las diferencias en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos de macromoléculas homólogas aisladas de cada uno de ellos. Esto se debe a que el número de diferencias en la secuencias de una macromolécula es proporcional al número de cambios mutacionales estables fijados en el ADN que codifica esa molécula en ambos organismos. La evolución se produce a medida que las mutaciones quedan fijadas en las diferentes poblaciones, siendo la biodiversidad el resultado final. (Madigan *et al.*, 2003).

2.3.3.2 Elección del cronómetro adecuado

Para determinar las verdaderas relaciones evolutivas entre organismos, es esencial elegir las moléculas adecuadas para los estudios de secuenciación. Esto es importante por varios motivos. Primero, la molécula debe estar universalmente distribuida en el grupo elegido para ser estudiado. Segundo, debe ser funcionalmente homóloga en cada organismo; en este contexto las comparaciones filogenéticas deben realizarse con moléculas de idéntica función. Tercero, resulta crucial poder alinear apropiadamente las dos moléculas a fin de identificar regiones tanto con homología como con variación de secuencia. Finalmente, la secuencia de la molécula elegida debería cambiar con una velocidad proporcional a la distancia filogenética que se va a determinar. Y, de hecho, cuanto mayor sea la distancia filogenética a determinar, menor será la velocidad de cambio de la molécula; demasiado cambio tiende a enturbiar el registro evolutivo.

Se han evaluado muchas moléculas como cronómetros moleculares y con ellas se han realizado estudios de comparación de secuencias, a fin de generar árboles filogenéticos. Estas moléculas son: varios citocromos, proteínas de hierro y azufre, tales como las ferredoxinas, y genes de otras proteínas y de los ARNs ribosómicos. Sin embargo, los genes que codifican los ARNs ribosómicos, componentes clave del sistema de traducción; la ATPasa, complejo enzimático de membrana que puede sintetizar e hidrolizar ATP; y la RecA, proteína requerida para la recombinación genética, son los que han proporcionado la información genética más significativa sobre los microorganismos. Todas estas moléculas eran probablemente esenciales, incluso para las células más primitivas y así, la

variación de la secuencia en los genes que las codifican, nos permiten profundizar en el registro evolutivo (Madigan *et al.*, 2003).

2.3.3.3 ARNs ribosómicos como cronómetros evolutivos

Debido a la probable antigüedad de la maquinaria sintetizadora de proteínas, y por varias otras razones, los ARNs ribosómicos son moléculas excelentes para discernir las relaciones evolutivas entre los seres vivos. Los ARNs ribosómicos son funcionalmente constantes, están universalmente distribuidos y su secuencia está moderadamente bien conservada a través de amplias distancias filogenéticas. También, dado el elevado número de diferentes secuencias posibles de moléculas grandes, tales como los ARNs ribosómicos, la similitud de dos secuencias indica alguna relación filogenética. Sin embargo, es el grado de semejanza de las secuencias del ARN ribosómico de dos organismos, lo que indica su parentesco evolutivo relativo. A partir del análisis comparativo de secuencias, se pueden construir las genealogías moleculares que conducen a los árboles filogenéticos; éstos muestran la posición evolutiva más probable existente entre los organismos.

Hay tres moléculas de ARN ribosómico, que en procariotas tienen tamaño de 5S, 16S y 23S. Los ARNs bacterianos grandes, 16S y 23S (aproximadamente 1500 y 2900 nucleótidos respectivamente) contienen varias regiones de secuencia altamente conservada que resulta útil para obtener alineamientos de secuencia apropiados, pero, al mismo tiempo, la variabilidad de secuencia suficiente en otras regiones de la molécula para servir como excelentes cronómetros filogenéticos.

Dado que el ARN 16S (figura 1) es más manejable experimentalmente que el ARN 23S, se ha utilizado preferentemente para desarrollar filogenia tanto de procariontas como de eucariotas (en eucariotas se secuencia el homólogo del ARNr 16S, es decir, el ARNr 18S de los ribosomas 80S) (Madigan *et al.*, 2003).

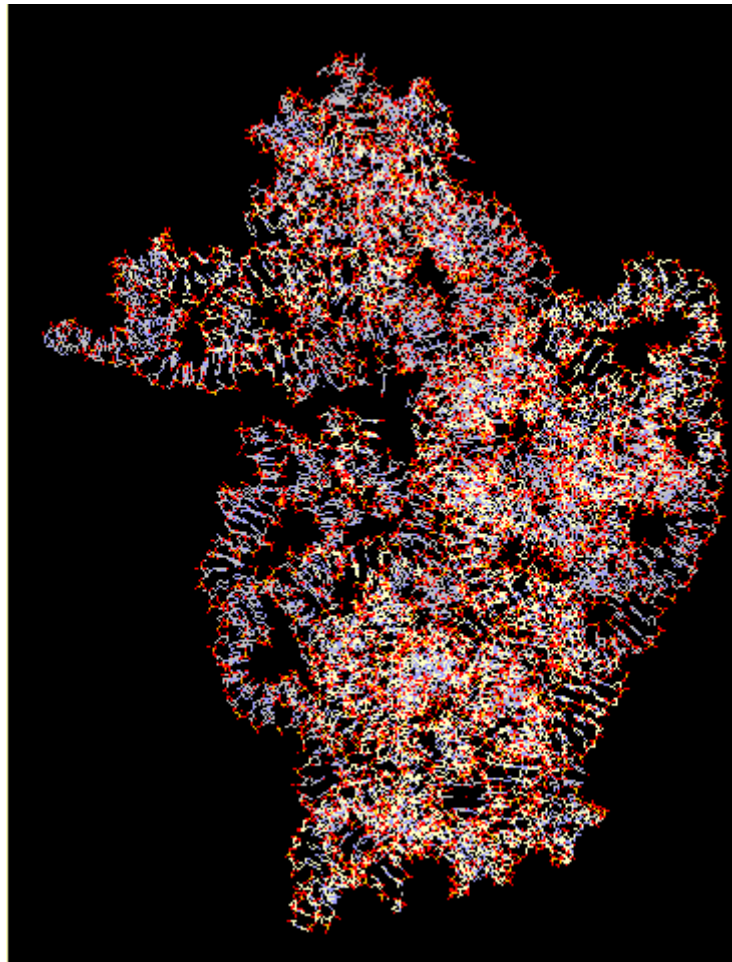


Figura 1 ARN ribosomal 16S (www.biochem.umd.edu; 20 julio 2009)

2.3.3.4 Secuencias del ARN ribosómico y evolución celular

Los métodos para obtener secuencias del ARN ribosómico y generar árboles filogenéticos, son actualmente bastante rutinarios e implican una combinación de biología molecular y análisis computarizado. Las nuevas secuencias generadas se

comparan con aquéllas almacenadas en diversas bases de datos como Genbank perteneciente al NCBI (National Center for Biotechnology Information), la RDP (Ribosomal Database Program), DDSS (Japón) o EMLB (Alemania). Luego, utilizando un programa, se generan varios árboles posibles y se selecciona el que mejor se “adapte” a la información evolutiva presente en las secuencias (Madigan *et al.*, 2003).

2.3.3.5 Método de secuenciación de Sanger

Los métodos para la secuenciación del ARN ribosómico han evolucionado a lo largo de los años y aunque existen varios métodos para obtener la secuencia, se emplea actualmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar directamente los genes que codifican el ARN ribosómico 16S a partir de ADN genómico (Figura 2), y luego se secuencia el producto de PCR utilizando la secuenciación estándar didesoxi (nucleótidos) del ADN (es decir, la secuenciación de Sanger, figura 3). Este procedimiento es rápido y específico y, utilizando como indicadores oligonucleótidos sintetizados químicamente complementarios de las secuencias conservadas en la subunidad pequeña del ARNr, se pueden obtener grandes cantidades del producto de PCR para las reacciones de secuenciación a partir de una ínfima cantidad de ADN del cultivo microbiano. Los datos obtenidos pueden analizarse mediante programas informáticos (Hopwood, 1989).

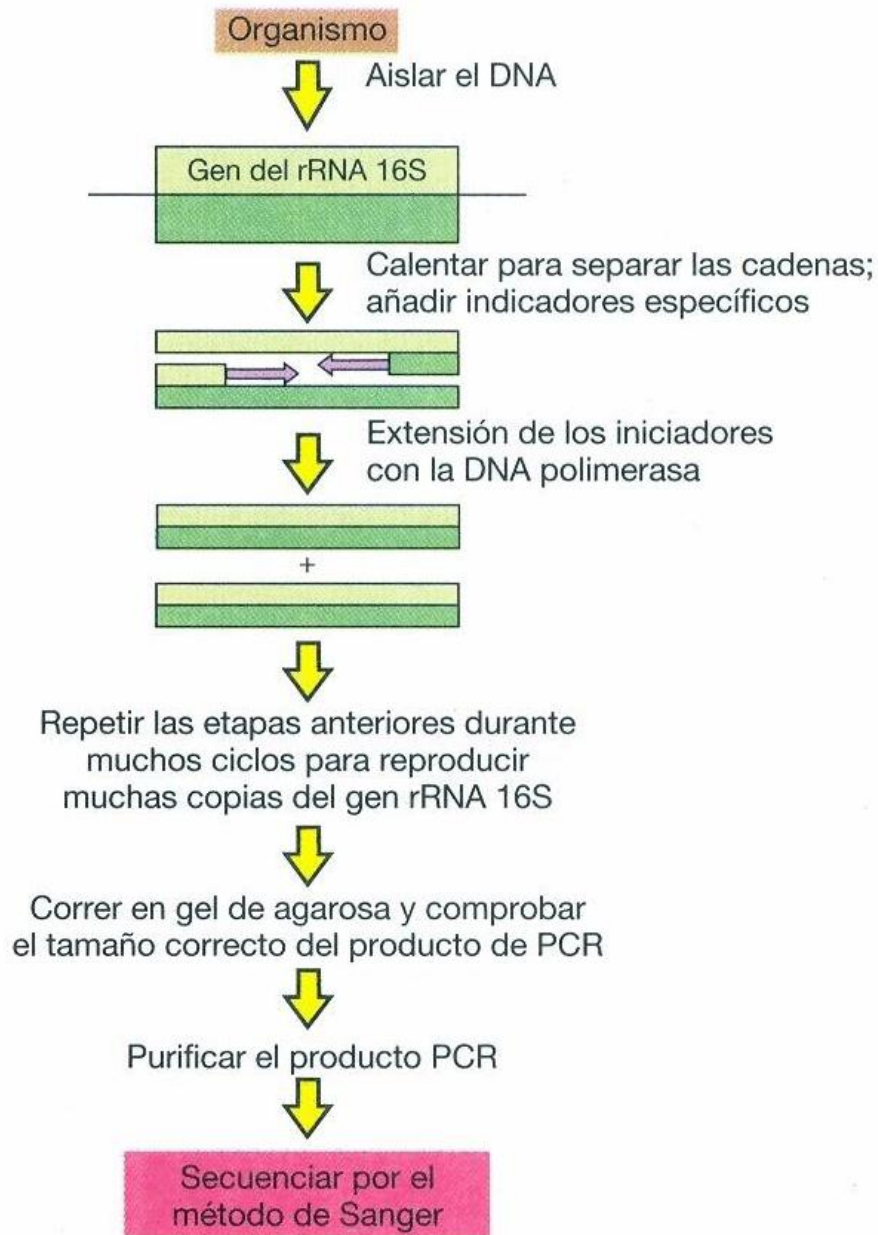


Figura 2 Secuenciación del ARN ribosómico de un cultivo axénico de un microorganismo usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El gen del ARNr 16S se amplifica y luego se secuencia por el método de Sanger. Los iniciadores añadidos son complementarios a las secuencias conservadas en uno de los dominios del ARNr 16S (Madigan *et al.*, 2003).

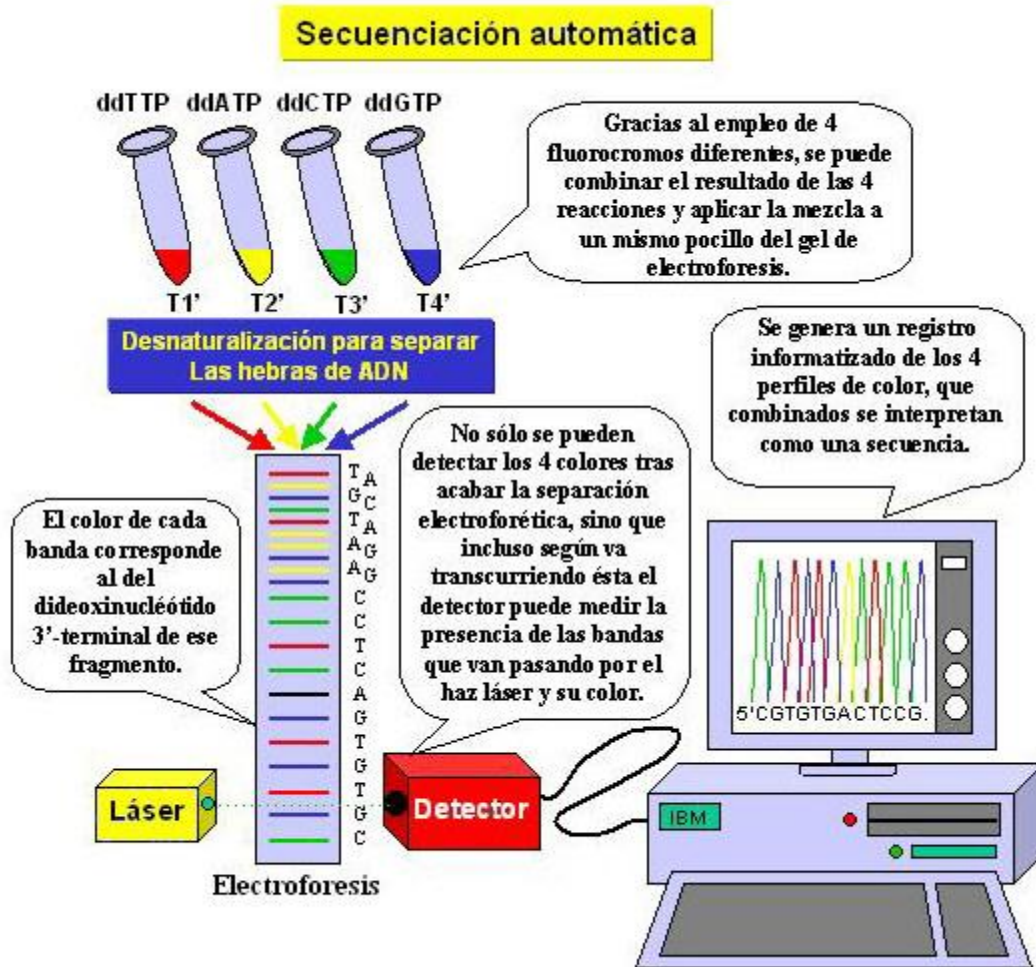


Figura 3 Metodología de secuenciación de Sanger
 (<http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.html>;
 08 de agosto de 2010)

2.3.3.6 Generación de árboles filogenéticos a partir de las secuencias de los ARNs

Para comparar las secuencias de los ARNs, existen varios algoritmos disponibles capaces de analizar dichas secuencias y construir un árbol filogenético. Sin embargo, independientemente del programa utilizado, la secuencia obtenida debe en primer lugar alinearse con las secuencias a comparar; ya alineadas son importadas en el programa de construcción de árboles elegido, para realizar el

examen comparativo. Dos algoritmos muy utilizados son: la distancia y la parsimonia. En los métodos de distancia, se alinean las secuencias, y la distancia evolutiva (E_D) se calcula mediante el recuento por computadora de todas las posiciones en que exista una diferencia. A partir de aquí, se puede construir una matriz de distancias que muestra la E_D entre cada dos secuencias. Luego se introduce un factor de corrección de la E_D que tiene en cuenta la posibilidad de que en un lugar determinado se hayan producido varios cambios. Por ejemplo, existe una baja probabilidad, pero estadísticamente significativa, de que una base, presente en un determinado lugar, dos secuencias como resultado de dos acontecimientos mutagénicos; uno que inicialmente cambió la secuencia y otro que restauró la situación original. Estas posibilidades pueden estimarse y esto es lo que hace el factor de corrección. Finalmente se genera un árbol filogenético en el que las longitudes en el árbol son proporcionales a las distancias evolutivas (Madigan *et al.*, 2003).

2.3.4 Identificación genotípica

El ribosoma procariótico es una unidad 70S, que está compuesta de dos subunidades separadas funcionalmente: 50S y 30S. La subunidad 50S está compuesta de ARN 23S y 5S además de 34 proteínas, así como la subunidad 30S está compuesta por ARN 16S y 21 proteínas.

La subunidad 16S está altamente conservada y es considerada un excelente marcador molecular para bacterias. El ADN_r 16S puede ser secuenciado después de la amplificación de regiones específicas, por métodos basados en la reacción

en cadena de la polimerasa (PCR). Se han realizado bases de datos de las secuencias del ARNr 16S, para muchos organismos (Jay *et al.*, 2005).

Para los microorganismos Gram-negativos, actualmente, existen diversos estudios en todo el mundo, que utilizan este método. Li *et al.* (2009), determinaron por medio de análisis secuencial de ADNr 16S y 23S, las secuencias de las regiones transcritas interesporiales (regiones tipo mosaico, con tres estructuras conservadas y dos variables) de cuatro especies de *Proteus*, lo que les permitió, diferenciar con mayor resolución estas cuatro especies posiblemente implicadas en enfermedades de origen nosocomial.

Prendergast *et al.* (2009), determinaron la cantidad y prevalencia de *Salmonella* en granjas de cerdos por medio de análisis de las secuencias del ADNr 16S. La comparación de secuencias de ARNr es una herramienta poderosa para deducir relaciones filogenéticas y evolutivas entre las bacterias, arqueobacterias y organismos eucarióticos. Estas secuencias se han determinado previamente por métodos que incluyen la catalogación de nucleótidos, secuenciación de clonas, secuenciación directa del ARN utilizando transcriptasa reversa y secuenciación de material amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (Weisburg, 1991).

2.4 Enterobacterias

2.4.1 Generalidades

La familia definida taxonómicamente como enterobacterias incluye a los bacilos anaeróbicos facultativos Gram-negativos que fermentan la glucosa produciendo

ácido, son oxidasa-negativos, generalmente catalasa-positivos, reducen los nitritos y pueden o no tener motilidad por flagelos peritricos (Downes e Ito, 2001).

La abundancia de las enterobacterias en alimentos crudos o procesados es generalmente proporcional a su abundancia en la naturaleza. Es irreal esperar que los alimentos no estériles estén libres de estos microorganismos. Su presencia puede establecer una relación para considerar el origen y los modos de ingreso a los alimentos comerciales y establecer objetivos de tolerancia basados en el conocimiento histórico del tipo de alimento (Ayres, 1980).

2.4.2 Importancia

Muchas enterobacterias forman parte de la microbiota intestinal normal, sin embargo, también son patógenos “oportunistas” que pueden causar infecciones fatales cuando las defensas del huésped son insuficientes, como en recién nacidos, en pacientes en etapa terminal o en pacientes que reciben un tratamiento inmunosupresivo. Estos microorganismos son las causas más comunes de infección de los tractos biliares y urinarios obstruidos, y junto con los anaerobios intestinales, la causa principal de infección del peritoneo contaminado; especialmente *E. coli* y *Klebsiella* sp., son en la actualidad la causa más común de septicemia en pacientes hospitalizados. Todas las bacterias del tracto gastrointestinal sintetizan endotoxinas que causan pirogenicidad, activación del sistema del complemento, consumo de factores de coagulación y shock. Algunas cepas producen enterotoxinas que tienen un papel prominente en la patogenia de la diarrea animal y humana (Braude, 1984).

2.4.3 Clasificación

Hace décadas, cuando solo se incluían unos cuantos géneros y especies en la familia de enterobacterias, la familia se definía por una serie de características fenotípicas rígidas que incluían morfología y características bioquímicas. Desde que las investigaciones taxonómicas empezaron a incluir los datos de hibridación del ADN y los estudios de relación filogenética basados en ADN ribosomal 16S y otros genes, la familia se ha expandido rápidamente y ha incluido a otros organismos que previamente no fueron considerados cercanos al núcleo del género de enterobacterias, como *E. coli*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Estas adiciones taxonómicas a la familia, ha causado la modificación de las definiciones sobre características fenotípicas para poder incluirse en la familia de enterobacterias de absoluto a “para casi todas las especies”. Estos ejemplos se citan en la tabla 1.

Tabla 1. Criterios de definición fenotípica para la inclusión en la familia Enterobacterias, excepciones a la regla (Janda, 2005).

Característica	Excepción
Gram-negativo	<i>Alterococcus agarolyticus</i>
Oxidasa-negativo	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
Catalasa-positivo	<i>Shigella dysenteriae</i> O grupo 1; <i>Xenorhabdus nematophila</i>
No formación de endosporas	<i>Serratia marcescens</i> subespecie <i>sakuensis</i>
Nitrato reductasa positivo	<i>Erwinia</i> (algunas); <i>Yersinia</i> (algunas especies)
Antígeno común a enterobacterias	<i>Dickeya (Pectobacterium) chrysanthemi</i>
Crecimiento en medio común	Endosimbiontes

Se mencionan en los siguientes párrafos, la relevancia de algunas enterobacterias dentro del marco clínico y/o de alimentos.

2.4.3.1 Importancia clínica de enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos

El tracto gastrointestinal de los animales homeotérmicos (que incluye humanos), sirve como reservorio natural de las enterobacterias; virtualmente todos los animales domesticados y humanos saludables contienen enterobacterias como parte de su microbiota intestinal. Debido a que los animales están naturalmente colonizados por estas bacterias, no es sorprendente que se encuentren en los alimentos.

Escherichia coli es una bacteria capaz de causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como cistitis, meningitis, peritonitis y neumonía; existen diversos grupos patogénicos de *E. coli*, entre los que se encuentran enteropatógena, enteroinvasiva, enterotoxigénica, productora de toxina Shiga, enteroagregativa y adherente difusa (Roberts *et al.*, 2005).

Otro microorganismo de importancia clínica es *Shigella*, causante de shigelosis, una forma de disentería causada por condiciones sanitarias deficientes, así como agua y alimentos contaminados, ésta comienza con síntomas generalizados, sistémicos, que incluyen fiebre, fatiga, anorexia y malestar, seguida de diarrea acuosa acompañada de dolor abdominal (Roberts *et al.*, 2005).

Salmonella es un género que puede causar infecciones asintomáticas o diarrea autolimitante en más del 95% de los casos. Las enfermedades clínicas causadas por *Salmonella* son usualmente divididas en cuatro síndromes: gastroenteritis, fiebre entérica o tifoidea (caracterizada por diarrea y erupción cutánea), septicemia

con infección focalizada o no e infección asintomática o estado portador (Roberts *et al.*, 2005).

Existen otros géneros implicados como causantes de infecciones importantes, es el caso de *Klebsiella*, género que provoca infecciones del tracto respiratorio, urinario y enfermedad hepática, de igual manera *Serratia* puede causar meningitis en neonatos e infantes y *Enterobacter*, que aunque tradicionalmente no es un microorganismo patógeno se ha incrementado como tal, particularmente en los hospitales, ya que puede causar bacteremia, enfermedades del sistema nervioso central y meningitis (especialmente en niños) . De la misma forma *Yersinia*, de ocurrencia poco frecuente en especímenes clínicos relativos a otras enterobacterias ha sido documentada como causante de una gran variedad de infecciones intestinales y extraintestinales en humanos. Los síntomas van desde síndromes pseudoapendiculares hasta septicemia, faringitis e infecciones de huesos y articulaciones (artritis y osteomielitis). Por último, dentro del género *Proteus*, se han encontrado microorganismos responsables de infecciones del tracto urinario, en particular *P. mirabilis*, a pesar de su aparente incidencia decreciente basada en reportes recientes como agente de infección nosocomial (Janda, 2005).

2.4.4 Microorganismos Gram-negativos involucrados en la descomposición de alimentos

La contribución de las enterobacterias a la descomposición de alimentos ha sido ampliamente estudiada debido a la atención dada a la importancia clínica de

algunos miembros de esta familia. La descomposición de alimentos, incluye una combinación de actividades microbiológicas, bioquímicas y químicas y la compleja interacción entre estos factores, en conjunto con factores intrínsecos y extrínsecos asociados con cada alimento en particular. En la tabla 2 se detallan algunas de las características relacionadas con la descomposición de alimentos y las enterobacterias.

Tabla 2. Descomposición de alimentos causada por enterobacterias (Blackburn, 2006).

Alimento	Tipo de descomposición	Causa	Género o especie bacteriana involucrada
Vegetales frescos	Pudrición blanda	Formación de enzimas pépticas	<i>Erwinia</i> spp. <i>Erwinia carotovora</i>
Tocino empacado al vacío	Olor a col	Metano tiol producido por actividad metabólica	<i>Proteus</i> (<i>Proteus inconstans</i>)
Carnes curadas secas	Mancha de hueso	Actividad metabólica y producción de compuestos volátiles	Varias enterobacterias, especialmente <i>Serratia</i> spp. y <i>Proteus</i> spp.
Carne y pollo	Aromas desagradables	Rompimiento de aminoácidos libres y compuestos relacionados con H ₂ S (aminoácidos que contienen azufre) y NH ₃ (varios aminoácidos)	Varias enterobacterias
Pescado (especialmente con conservación ligera y empacado al vacío)	Aromas y sabores desagradables	Reducción del óxido de trimetilamina (TMAO) y formación de trimetilamina (TMA). Producción de varios compuestos volátiles	Varias enterobacterias

Tabla 2. Descomposición de alimentos causada por enterobacterias (continuación; Blackburn, 2006).

Alimento	Tipo de descomposición	Causa	Género o especie bacteriana involucrada
Pescado y productos derivados	Histamina	Actividad de la descarboxilasa (histidina a histamina)	Varias enterobacterias (especialmente <i>E. aerogenes</i> , <i>M. morganii</i> y <i>Raoultella ornithinolytica</i> así como algunas cepas de <i>Klebsiella planticola</i> y <i>Citrobacter youngae</i>)
Carne	Cadaverina y putrescina	Actividad de la descarboxilasa (lisina-descarboxilasa a cadaverina y ornitina-descarboxilasa o arginina a putrescina)	Varias enterobacterias
Queso cottage	Formación de limo (grumos limosos) sabores y aromas desagradables	Actividad metabólica y rompimiento enzimático	<i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Escherichia</i>
Quesos duros (ej. cheddar)	Gas	Fermentación de lactosa y producción de gas	<i>E. coli</i> y otros miembros de las enterobacterias
Quesos duros (ej. cheddar)	Sabores desagradables	Actividad metabólica y producción de compuestos volátiles	Varias enterobacterias
Ensalada de col	Producción de gas y aromas desagradables (aroma fecal fuerte)	Fermentación y actividad metabólica	<i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia</i> y <i>Citrobacter</i>
Descomposición de la cerveza	Supresión de la fermentación, aromas desagradables (característico frutal)	Actividad metabólica y producción de compuestos volátiles (niveles incrementados de dimetil sulfóxido, dimetil disulfido, diacetil y aceites fundidos)	<i>Obescumbacterium proteus</i>
Cascarón de huevo	Putrefacción bacteriana	Rompimiento enzimático (proteolítico) de albúmina y ennegrecimiento de la yema (podrición negra)	<i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> (podrición negra), <i>Serratia</i> (podredumbre roja)

Otro género muy implicado con la descomposición de alimentos es *Pseudomonas*, un buen número de los microorganismos pertenecientes a este género es fluorescente, móvil y nutricionalmente versátil. Es abundante en tierra, agua y

muchos hábitats. *Pseudomonas* es generalmente activa en descomposición y biodegradación aeróbica. Principalmente cuatro especies: *P. fluorescens*, *P. veridiflava*, *P. fragi* y *P. lundensis*, en combinación con *Shewanella putrefaciens* y *Xanthomonas campestris* son responsables de la descomposición de una gran cantidad de alimentos. Las cepas pectinolíticas de *P. fluorescens*, *P. veridiflava* y *X. campestris* están asociadas a la descomposición de frutas y vegetales. *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis* y *S. putrefaciens* están asociadas a la descomposición de alimentos de origen animal incluyendo carne, pollo, leche y pescado. La descomposición causada por estas bacterias se presenta como una apariencia babosa o pastosa, producción de aromas desagradables y degradación parcial o completa del tejido vegetal o animal (Blackburn, 2006).

A pesar de que la mayoría de la atención se ha enfocado en la importancia clínica de las enterobacterias y la prevención de contaminación por patógenos, actualmente existe evidencia, de que la descomposición de alimentos también puede facilitar el crecimiento de patógenos, al alterar los factores intrínsecos de los alimentos y provocando una gran pérdida económica a la industria de alimentos y al consumidor (Blackburn, 2006).

Algunas enterobacterias tienen utilidad como indicadores de seguridad alimentaria, por lo cual es indispensable su adecuada identificación.

2.4.5 Coliformes como indicadores de sanidad alimentaria

Dentro de las enterobacterias se ha empleado al grupo de los coliformes como indicadores de sanidad alimentaria; idealmente, un indicador microbiológico de

sanidad alimenticia debe: ser fácil y rápidamente detectable, distinguirse fácilmente de la microbiota del alimento, tener una historia de asociación constante con el patógeno cuya presencia se quiere identificar, siempre estar presente cuando el patógeno que se busca está presente, ser un microorganismo que crezca en cantidades similares a las del patógeno, poseer requerimientos y tasa de crecimiento equivalente o excedente al patógeno, tener un índice de mortalidad parecido al del patógeno o idealmente persistir más tiempo que éste y estar ausente en alimentos que se encuentran libres de patógenos, excepto quizás en pequeñas cantidades. Los coliformes se encuentran representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. *Escherichia coli* es el mayor indicador de contaminación fecal, por eso es deseable determinar su incidencia en poblaciones de coliformes. Una de sus propiedades es que generalmente muere al mismo tiempo que las bacterias patógenas intestinales más comunes.

3. Antecedentes

Los esquemas de identificación no son esquemas de clasificación, sin embargo puede existir una similitud superficial. Un esquema de identificación para un grupo de organismos, puede ser únicamente concebido después de que ese grupo haya sido clasificado (reconocido como diferente de otros organismos). Primero, la identificación; se basa en un patrón de características que todos los miembros del grupo tienen y que otro grupo no tiene. Éstas, no son siempre aquellas que estuvieron involucradas en la clasificación del grupo; por ejemplo, la clasificación se puede basar en estudios de hibridación ADN/ADN aunque la identificación se puede basar en características fenotípicas que se hayan encontrado que se correlacionan con la información genética. En general, las características escogidas para un esquema de identificación, deben ser fácilmente determinables, mientras que aquellas utilizadas para clasificación, pueden ser difíciles de determinar. También, las características deben ser pocas, mientras que en la clasificación, puede involucrar un gran número. Estas características ideales de un esquema de identificación pueden no siempre ser posibles, particularmente con géneros o especies que no son susceptibles de ser caracterizados por pruebas bioquímicas tradicionales o fisiológicas. En estos casos, se puede requerir de procedimientos relativamente más complejos para lograr una adecuada identificación (Garrity *et al.*, 2004).

Escalante *et al.*, (2001; 2004; 2008), utilizaron los primers Eu530F y Eu1449R para la amplificación de genes ribosomales a partir de muestras de ADN metagenómico en suelos, pozol y pulque. En este último producto, lograron

caracterizar la comunidad bacteriana presente por medio de un método polifásico que depende tanto de métodos que requieren cultivo, así como de métodos que no lo requieren. Se concluyó que en el pulque se encontraron bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas. Por lo tanto se utilizaron estos primers, por su carácter inespecífico, los cuales permiten la amplificación de los ADNr 16S de cada uno de los templados obtenidos para cada microorganismo.

Bornemann *et al.* (1996), utilizaron los mismos primers universales utilizados en este trabajo y partiendo de tierra, se logró identificar la relación filogenética entre 124 secuencias obtenidas, 98.4% de las cuales pertenecen al dominio bacteria, siendo principalmente de los reinos *Proteobacteria*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, *Bacteroides* y de Gram-positivos con poco contenido G+C. Además concluyeron, que sólo el 4% de los 124 ADNr obtenidos, podrían ser duplicados y que la mayoría de los microorganismos identificados no tienen relación cercana.

También fueron utilizados estos primers por Lozano (2007), con los cuales se identificaron por análisis de secuencias de ADNr 16S a bacterias lácticas como *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides*, *L. kimchii* y *Lactococcus lactis* en aguamiel. De igual forma, se identificaron los microorganismos anteriormente mencionados además de *Bacillus licheniformis* en pulque.

Conca (2008), de igual manera, identificó en el pulque por análisis secuencial de ADNr 16S a *Leuconostoc citreum* como productor de dos exopolisacáridos (uno de ellos identificado como dextrana).

El presente proyecto surge por el interés del Cepario del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, en el que usualmente se habían

utilizado criterios fenotípicos, tales como la caracterización morfológica y microscópica, así como identificación bioquímica tradicional y con métodos miniaturizados (para asegurar la identidad de cada una de las cepas que resguarda). Entre las bacterias destacan algunas aisladas de alimentos. Durante el presente proyecto, se identificarán las cepas utilizando un sistema miniaturizado de caracterización bioquímica, así como una tipificación molecular de las mismas, empleando para este fin, la secuenciación del gen que codifica el ARN ribosomal 16S, siendo la primera vez que se hace una identificación molecular a estas bacterias.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general:

Identificar de manera polifásica (identificación fenotípica, así como análisis y secuenciación del gen ribosomal 16S) algunas enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos que forman parte de la colección del Cepario de la Facultad de Química, UNAM para complementar la identificación de las mismas.

4.2 Objetivos particulares:

- Reactivar y verificar la pureza de enterobacterias y bacilos Gram-negativos de la colección del Cepario de la Facultad de Química.
- Caracterizar fenotípicamente las bacterias aisladas mediante observación microscópica y pruebas bioquímicas.
- Caracterizar molecularmente las bacterias identificadas fenotípicamente mediante la comparación y análisis de las secuencias del gen ribosomal 16S.
- Correlacionar las características fenotípicas con las genotípicas de las bacterias caracterizadas.
- Conservar las cepas de manera adecuada para su posterior utilización en docencia e investigación.

5. Metodología:

El siguiente esquema representa la secuencia técnica de la metodología que se desarrolló para cumplir con los objetivos del presente trabajo.

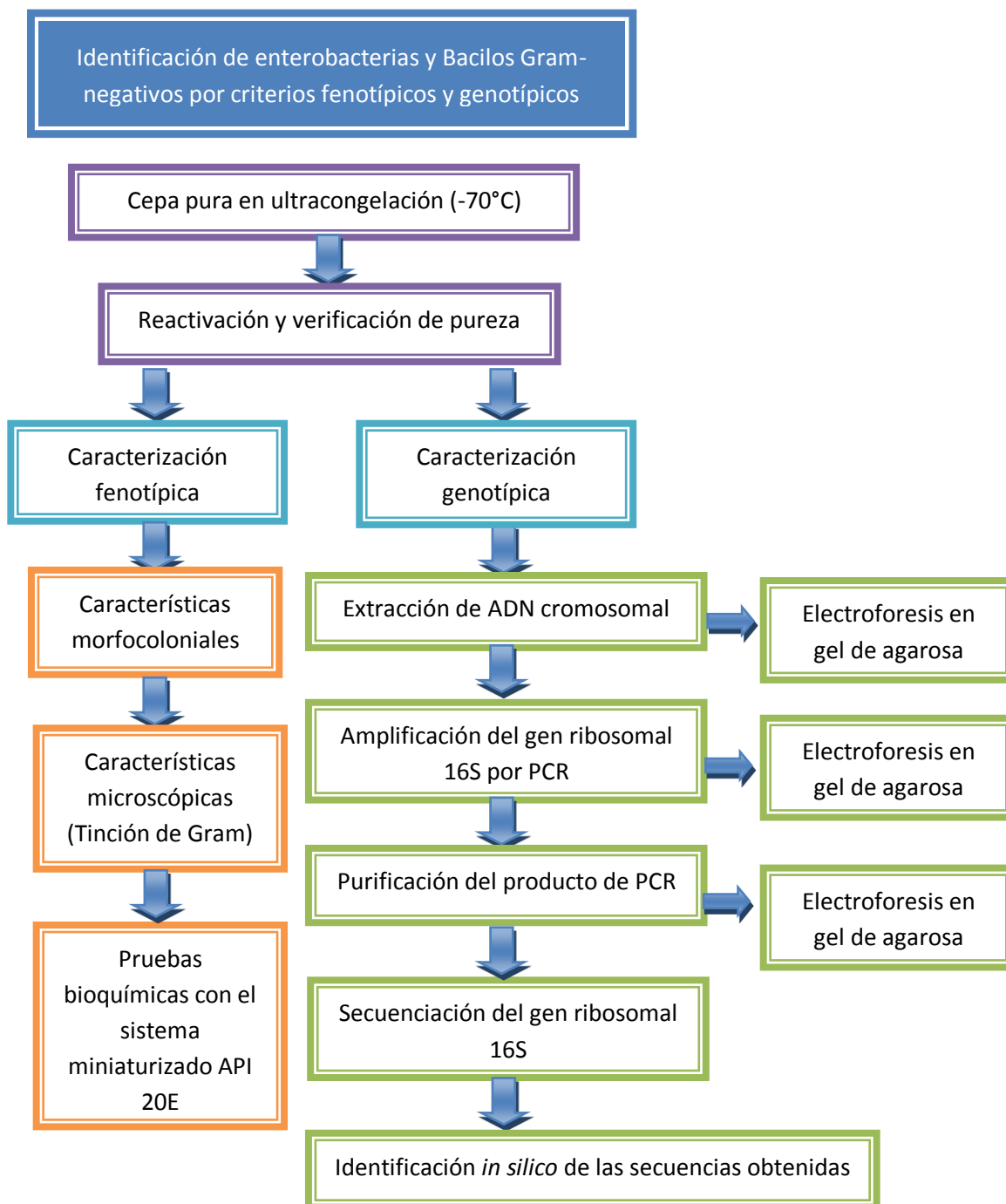


Figura 4. Metodología general utilizada para la identificación de los microorganismos Gram-negativos.

5.1 Microorganismos empleados en el estudio.

Los microorganismos analizados pertenecen a la colección del Cepario de la Facultad de Química, UNAM (WFCC/WDCM-100; World Federation for Culture Collections/World Data Centre for Microorganisms) y comprendieron:

- *Enterobacter aerogenes* CFQ
- *Enterobacter* sp. CFQ
- *Enterobacter cloacae* CFQ
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Escherichia coli* ATCC 11229
- *Klebsiella pneumoniae* CFQ
- *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131
- *Salmonella* Typhi ATCC 9992
- *Salmonella* Enteritidis CFQ
- *Salmonella* Typhimurium ATCC14028
- *Salmonella* Nitra CFQ
- *Shigella sonnei* CFQ S53
- *Shigella sonnei* CFQ
- *Proteus mirabilis* CFQ P13
- *Proteus vulgaris* CFQ P20
- *Serratia marcescens* CFQ S48

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Vibrio cholerae* No O1
- *Yersinia enterocolitica* CFQ

5.2 Reactivación de cepas

Se realizó la reactivación de las cepas que se encontraban conservados en crioviales (caldo infusión cerebro corazón (ICC) con glicerol al 50% (p/v)), en ultracongelación a -70°C. Se inoculó una asada de cada una en caldo ICC e incubaron por 24 horas a 37°C. Para *Serratia marcescens* se incubó a 28°C durante 24 h. En el caso de las enterobacterias se inocularon en caldo bilis verde brillante con lactosa y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

5.3 Comprobación de pureza de las cepas

Después de reactivar las cepas, se corroboró la pureza de los microorganismos, inoculando por agotamiento radial en diversos medios de cultivo selectivos descritos en la tabla 3. Este procedimiento se realizó por duplicado, con la finalidad de asegurar la pureza de las colonias aisladas.

Tabla 3. Medios y condiciones empleados en la purificación de microorganismos.

Microorganismo	Medio de purificación	Condiciones de incubación
<i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Enterobacter cloacae</i> CFQ	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Citrobacter freundii</i> CFQ B057	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CFQ	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 9992	XLD / McConkey	24 horas / 37°C
<i>Salmonella</i> Enteritidis CFQ	XLD / McConkey	24 horas / 37°C
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC14028	XLD / McConkey	24 horas / 37°C
<i>Salmonella</i> Nitra CFQ	XLD / McConkey	24 horas / 37°C
<i>Shigella sonnei</i> CFQ S53	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Shigella sonnei</i> CFQ	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Proteus mirabilis</i> CFQ P13	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Proteus vulgaris</i> CFQ P20	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Cetrimida	24 horas / 37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Cetrimida	24 horas / 37°C
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	Gelosa especial	24 horas / 37°C
<i>Yersinia enterocolitica</i> CFQ	McConkey	24 horas / 37°C
<i>Serratia marcescens</i> CFQ S48	Agar nutritivo	24 horas / 28°C

5.4 Caracterización fenotípica

5.4.1 Características morfocoloniales:

Se corroboró que las características morfocoloniales fueran las esperadas para cada microorganismo (Tabla 4).

Tabla 4. Características morfológicas observadas y reportadas en la bibliografía para las cepas analizadas

Cepa	Medio selectivo	Características morfocoloniales encontradas	Características morfocoloniales reportadas (Blackburn, 2006)
<i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ	McConkey	Colonias pequeñas rosas circulares, convexas y acuosas	Colonias circulares pequeñas, suaves, convexas y húmedas
<i>Enterobacter cloacae</i> CFQ	McConkey	Colonias pequeñas rosas circulares, convexas y acuosas	Colonias circulares pequeñas, suaves, convexas y húmedas
<i>Enterobacter sp</i>	McConkey	Colonias pequeñas rosas circulares, convexas y acuosas	Colonias circulares pequeñas, suaves, convexas y húmedas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	McConkey	Colonias circulares planas rosa brillante	Colonias circulares color rosa o transparentes
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	McConkey	Colonias circulares planas rosa brillante	Colonias circulares color rosa o transparente
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	McConkey	Colonias circulares planas rosa brillante	Colonias circulares color rosa o transparente
<i>Citrobacter freundii</i> CFQ B057	McConkey	Colonias circulares y rosas	Colonias circulares de color rosa
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CFQ	McConkey	Colonias alargadas mucoides y rosas	Colonias largas mucoides
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131	McConkey	Colonias alargadas mucoides y rosas	Colonias largas mucoides
<i>Salmonella Typhi</i> ATCC 9992	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro
<i>Salmonella Enteritidis</i> CFQ	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC14028	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro
<i>Salmonella Nitra</i> CFQ	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro

Tabla 4. Características morfológicas observadas y reportadas en la bibliografía para las cepas analizadas (continuación)

Cepa	Medio selectivo	Características morfológicas encontradas	Características morfológicas reportadas (Blackburn, 2006)
<i>Shigella sonnei</i> CFQ S53	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o translúcidas
<i>Shigella sonnei</i> CFQ	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o translúcidas
<i>Proteus mirabilis</i> CFQ P13	McConkey	Colonias irregulares, café translúcido, cremosas	Colonias translúcidas, irregulares, mucosas
<i>Proteus vulgaris</i> CFQ P20	McConkey	Colonias irregulares, café translúcido, cremosas	Colonias translúcidas, irregulares, mucosas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Cetrmida	Colonias translúcidas puntiformes y surgimiento de coloración azul en el medio	Colonias muy pequeñas translúcidas o blancas rodeadas de piocianina (surgimiento de color azul-verdoso en medio)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Cetrmida	Colonias translúcidas puntiformes y surgimiento de coloración azul en el medio	Colonias muy pequeñas translúcidas o blancas rodeadas de piocianina (surgimiento de color azul-verdoso en medio)
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	Gelosa especial pH 8.5	Colonias circulares planas amarillo translúcido	Colonias pequeñas opacas
	TCBS	Colonias circulares amarillas de borde translúcido	Colonias pequeñas amarillo translúcido
<i>Yersinia enterocolitica</i> CFQ	McConkey	Colonias pequeñas circulares, mucoides y rosas	Colonias muy pequeñas rosas
<i>Serratia marcescens</i> CFQ S48	Agar nutritivo	Colonias circulares húmedas y rojo brillante.	Colonias rojas húmedas

5.4.2 Características microscópicas:

A partir de colonias aisladas de cada medio selectivo, se corroboró que la morfología microscópica correspondiera a bacilos cortos Gram-negativos para las bacterias estudiadas y vibriones en el caso de *Vibrio cholerae*. Así como la

homogeneidad en el ancho y largo de cada bacteria para determinar que se trataba de una colonia aislada y pura.

5.4.3 Pruebas bioquímicas

A partir de cada colonia purificada, se realizó la identificación bioquímica empleando el sistema miniaturizado API 20 E para enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos no exigentes (BioMérieux).

El API 20E es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram-negativos no exigentes, que incluyen 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas, así como una base de datos. La galería del sistema API 20 E se compone de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados. Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye los ensayos. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos. Se observó la concordancia de esta caracterización con el software del mismo sistema. (Figura 5).

De acuerdo a las instrucciones del sistema API 20E, las colonias aisladas de 24 horas en los medios de cultivo selectivos correspondientes, fueron resuspendidas en 5 mL de SSI hasta llegar a una escala de 0.5 en McFarland (equivalente a una concentración bacteriana de 6×10^8 /mL). Para ajustar esta densidad celular se empleó el equipo Densimat (Biomérieux®). El aparato indica los valores en McFarland, proporcionales a los valores medios de concentraciones bacterianas obtenidos con bacilos Gram-negativos, identificados en bacteriología clínica.

La lectura de estas reacciones, se llevó a cabo utilizando la tabla de lectura, y la identificación se obtiene con la ayuda del catálogo analítico o del software de identificación. (BioMérieux, 2003)

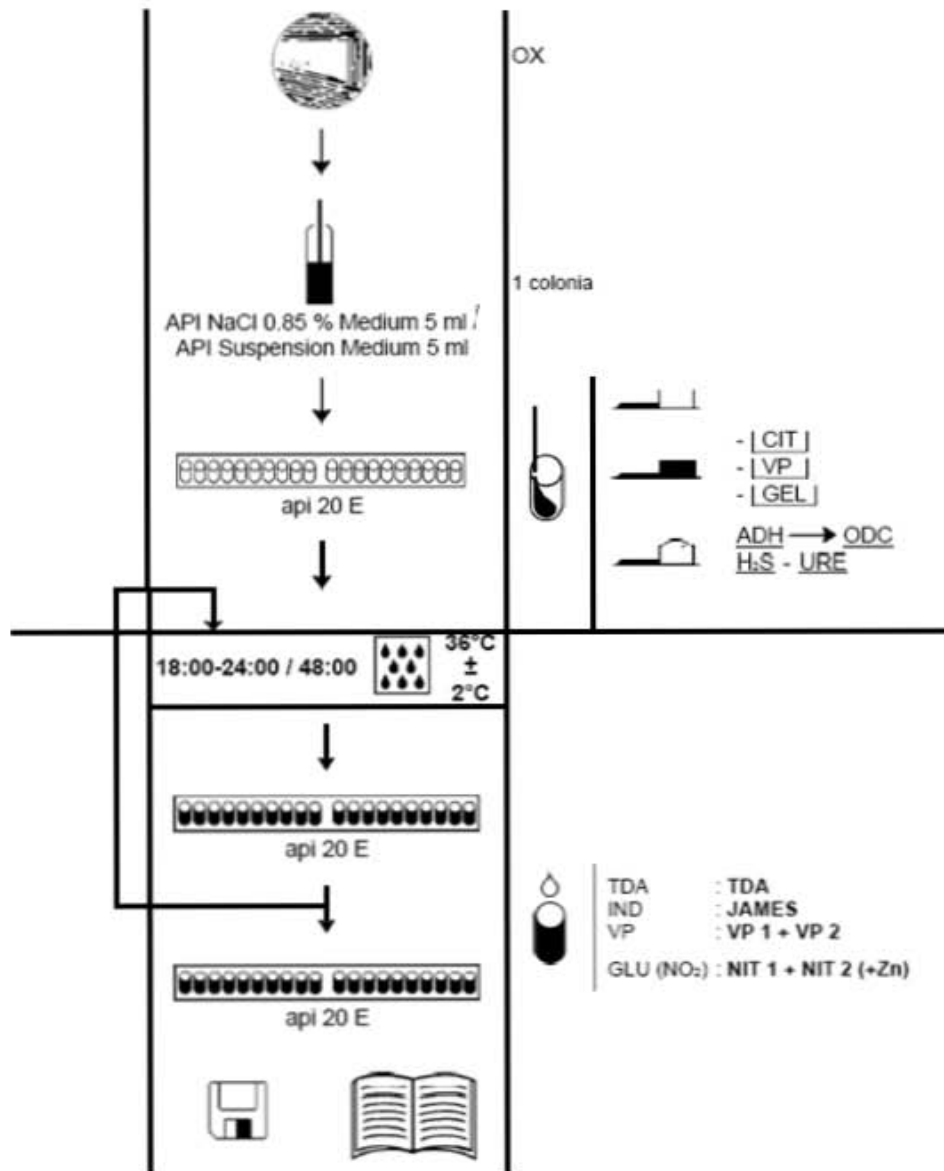


Figura 5. Esquema de metodología de identificación bioquímica por API 20E.

Cada uno de los microtubos de la galería fue inoculado con un volumen aproximado de 115 µL de la suspensión y el mismo volumen de aceite mineral

estéril fue agregado a las cúpulas de Arginina-dihidrolasa, Ornitina Decarboxilasa, Lisina Decarboxilasa, Ureasa y Producción de H₂S, con el fin de crear las condiciones de anaerobiosis necesarias. Durante el período de incubación, el resultado se traduce en un cambio de color en el tubo, debido a la producción de algún compuesto, utilización de algún sustrato o la presencia de una enzima.

Se interpretaron los resultados a las 24 horas, otorgando valores negativos (-) o positivos (+) a los microtubos de acuerdo a la tabla 5 de lectura de resultados.

5.4.4 Pruebas bioquímicas complementarias

De acuerdo a las instrucciones del sistema API 20E es necesario complementar las pruebas bioquímicas miniaturizadas con otras pruebas como movilidad (realizada en medio SIM), cultivo sobre agar McConkey y óxido/fermentación de la glucosa (realizada en medio O/F), todas estas se realizaron para complementar el perfil de 9 cifras que el software de identificación indica.

Tabla 5. Componentes, reacciones/enzimas y resultados de lectura de las diferentes pruebas de API20E (Biomeriéux) *.

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				Negativo	Positivo
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	0.233	B-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	Incoloro	Amarillo
<u>ADH</u>	L-arginina	1.9	Arginina-dihidrolasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
<u>LDC</u>	L-lisina-descarboxilasa	1.9	Lisina Decarboxilasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
<u>ODC</u>	L-ornitina-descarboxilasa	1.9	Ornitina Decarboxilasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
CIT	Citrato trisódico	0.756	Utilización del citrato	Verde pálido/amarillo	Azul-verde/azul
<u>H₂S</u>	Tiosulfato sódico	0.075	Producción de H ₂ S	Incoloro/grisáceo	Depósito negro/fin liserado
<u>URE</u>	Urea	0.76	Ureasa	Amarillo	Rojo/anaranjado
TDA	L-triptófano	0.38	Triptofano desaminasa	Amarillo	Marrón-rojizo
IND	L-triptófano	0.19	Producción de indol	Incoloro Verde pálido/amarillo	Rosa
VP	Piruvato sódico	1.9	Producción de acetoína (Voges Proskauer)	incoloro	Rosa/rojo
GEL	Gelatina (origen bovino)	0.6	Gelatinasa (gelatina)	No difusión	Difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1.9	Fermentación/oxidación (glucosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1.9	Fermentación/oxidación (manitol)	Azul/azul verdoso	Amarillo
INO	Inositol	1.9	Fermentación/oxidación (inositol)	Azul/azul verdoso	Amarillo
SOR	D-sorbitol	1.9	Fermentación/oxidación (sorbitol)	Azul/azul verdoso	Amarillo
RHA	L-ramnosa	1.9	Fermentación/oxidación (rhamnosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo
SAC	D-sacarosa	1.9	Fermentación/oxidación (sacarosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo
MEL	D-melibiosa	1.9	Fermentación/oxidación (melibiosa)	Azul/azul verdoso	amarillo
AMY	Amigdalina	0.57	Fermentación/oxidación (amigdalina)	Azul/azul verdoso	Amarillo
ARA	L-arabinosa	1.9	Fermentación/oxidación (arabinosa)	Azul/azul verdoso	Amarillo

* Los ensayos subrayados requieren de una cúpula de aceite para crear un ambiente de anaerobiosis, los ensayos en negritas llevan el doble del volumen.

5.5 Identificación molecular

5.5.1 Preparación de la cepa

Se realizó una suspensión saturada en 5 mL de infusión cerebro corazón (ICC) con colonias de 24 horas aisladas de medios de cultivo selectivos. La finalidad de contar con una solución saturada es tener suficientes bacterias y por lo tanto lograr una extracción significativa de ADN.

5.5.2 Extracción del ADN cromosomal bacteriano

En general los protocolos de extracción de ADN constan de dos partes: una técnica que permite la lisis de las células y solubiliza el ADN, seguida del uso de varios métodos enzimáticos o químicos que permiten la eliminación de proteínas, ARN y otras macromoléculas contaminantes.

La extracción del ADN cromosomal se llevó a cabo utilizando el sistema UltraClean™ Microbial ADN Isolaton Kit de MoBio Laboratories, Inc. (Figura 6).

Se emplearon 1.8 ml del cultivo saturado y se centrifugaron a 10,000 x g durante 1 minuto para obtener una pastilla de las células. Dicha pastilla se resuspendió en 300 µl de la Bead Solution, la cual contiene sales y un buffer que estabiliza y dispersa homogéneamente las células microbianas antes de la lisis. La suspensión se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se adicionaron 50 µL de la solución MD1, misma que contiene SDS, detergente aniónico que rompe ácidos grasos y lípidos asociados a la membrana celular. Se homogenizó en vórtex a máxima velocidad por 10 minutos generando las condiciones óptimas de

lisis celular y así liberar los ácidos nucleicos. El tubo se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto con el fin de precipitar los restos celulares. El sobrenadante que contenía el ADN cromosomal se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se le adicionó 100 µL de la solución MD2, misma que precipita material orgánico e inorgánico diferente al ADN, entre éstos, a restos celulares y proteínas. Se homogenizó en vórtex por 5 segundos el contenido y se incubaron los tubos a 4°C por 5 minutos para formar una pastilla. Se centrifugaron los tubos a 10,000 x g durante 1 minuto para compactar la pastilla formada. Evitando tocar ésta, se transfirió el volumen completo del sobrenadante a otro tubo de centrífuga de 2 mL. Se adicionaron 900 µL de la solución MD3, una solución salina altamente concentrada que genera las condiciones salinas necesarias para la posterior unión del ADN al filtro de membrana y se homogenizó en vórtex por 5 segundos el contenido. Se cargaron 700 µL en el Spin Filter (un pequeño filtro con una membrana de base sílica en la cual el ADN se une específicamente, mientras las impurezas son removidas con buffer y centrifugación) y se centrifugó descartando el líquido resultante, esto se repitió de 2 a 3 veces hasta asegurar cargar el total del volumen. El ADN se une selectivamente a la membrana del filtro mientras que sustancias ajenas pasan a través de él. Se adicionaron 300 µL de la solución MD4, una solución de lavado que arrastra residuos de sal y otros contaminantes manteniendo el ADN unido al filtro de membrana. Se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto descartando el líquido resultante. Nuevamente se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto con el fin de eliminar residuos de la solución de lavado. El filtro de membrana se transfirió a un nuevo tubo de centrífuga de 2 mL y se adicionaron 50 µL de la solución MD5, un buffer de elución 10 mM Tris pH 8 sin

sales. Se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto y se desechó el filtro de membrana, en el tubo únicamente quedó el ADN cromosomal extraído, el cual fue conservado a -4°C .

5.5.3 Electroforesis

Los ácidos nucleicos (que están negativamente cargados) migran a través del gel cuando se aplica corriente eléctrica, a velocidades que dependen de la forma y tamaño de la molécula. Las moléculas pequeñas o compactas migran más rápidamente que las moléculas grandes. Después de un periodo definido, el gel puede teñirse con un compuesto que se une al ADN. Si se usa bromuro de etidio como colorante, las bandas fluorescen bajo la luz ultravioleta (Madigan *et al.*, 2003).

La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1 % con buffer TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico, 89 mM y EDTA 2mM) para comprobar la extracción de ADN cromosomal. Cada gel contenía 5 μL de bromuro de etidio (0.004%); se corrió la muestra (5 μL) con colorante de corrida 10X (3 μL) con su respectivo marcador de peso molecular de 1 Kbp de Invitrogen (figura 7). La corrida se realizó a 100 volts.

Kit de Aislamiento de ADN Microbiano Ultraclean®

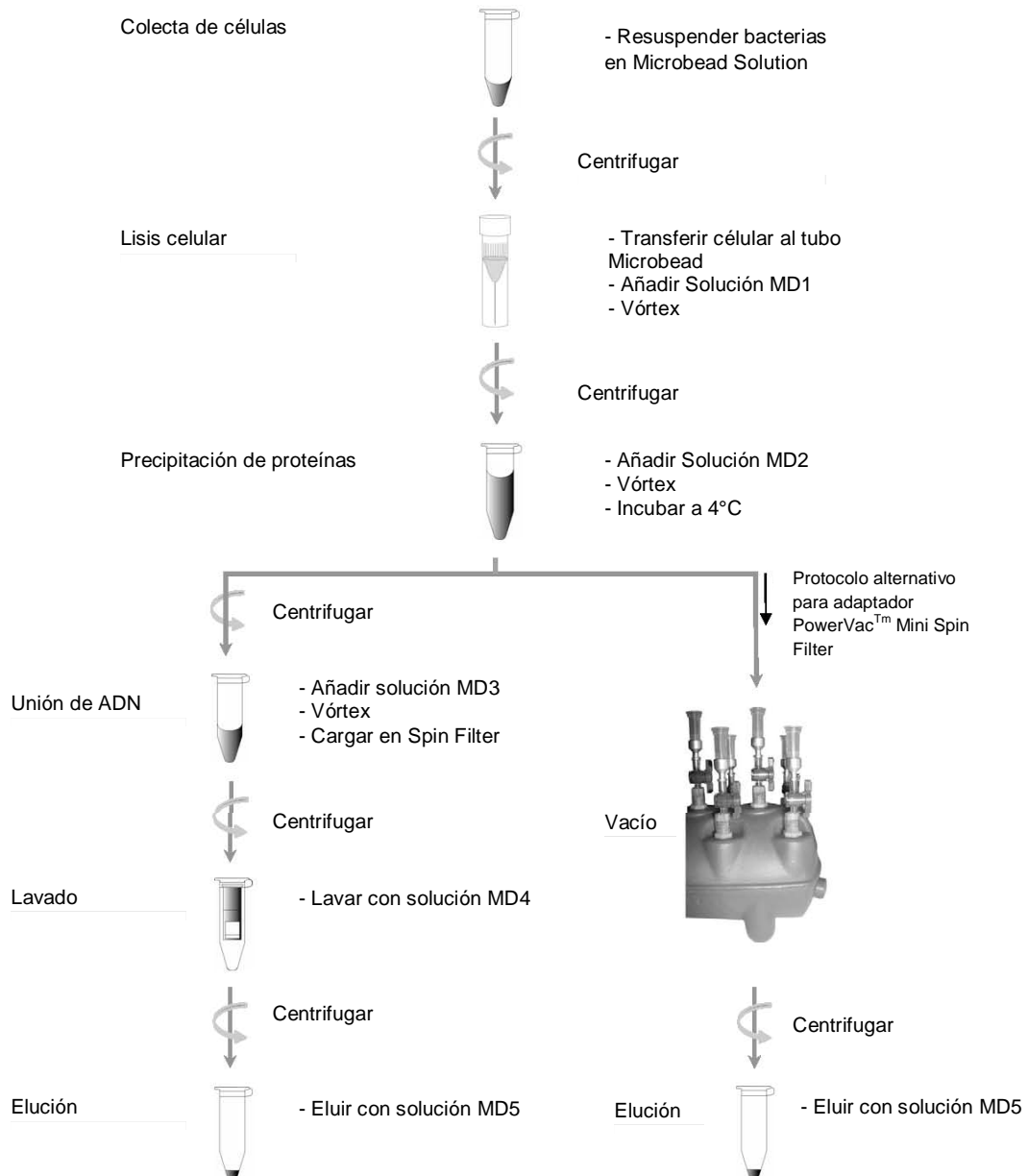


Figura 6. Extracción de ADN cromosomal empleando el UltraClean Microbial DNA Isolation Kit de MoBio Laboratories (www.mobio.com; 17 septiembre 2010).

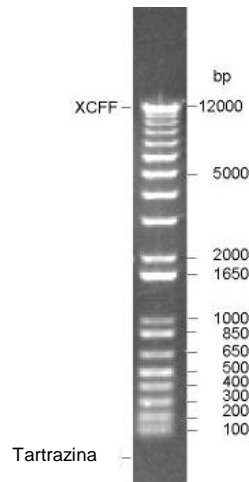


Figura 7. Marcador de peso molecular de 1 Kbp de Invitrogen (www.invitrogen.com, 20 octubre, 2010)

5.5.4 Amplificación del gen ribosomal 16S

Después de verificar por electroforesis en gel de agarosa al 1%, la extracción del ADN cromosomal de cada microorganismo, se procedió a la amplificación del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó la ADN polimerasa amplificasa de Biogénica, mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 100 mM, asimismo, primers universales para eubacterias denominados como Eu530F (5'- TGA CTG ACT GAG TGC CAG GAC CCG CGG – 3') y Eu1449R (5' – TGA CTG ACT GAG GCT ACC TTG TTA CGA CTT – 3') ambos a 0.5 μ M. Los primers universales Eu530F y Eu1449R se utilizaron de acuerdo a estudios previos (Bornemann *et al.*, 1996, Escalante *et al.*, 2001; 2004; 2008), para la amplificación de genes ribosomales a partir de muestras de ADN metagenómico en suelos, pozol y pulque. Se utilizaron estos

primers por su carácter inespecífico que permite la amplificación de los ADNr 16S de cada uno de los templados obtenidos de cada microorganismo.

Tabla 6. Características de los primers utilizados en el estudio

Característica	Oligo Eu530F	Oligo Eu1449R
Longitud	27 b	30 b
A ₂₆₀	0.525	0.333
Volumen	500 µL	500 µL
Concentración	2.30 µg/ µL	1.40 µg/ µL
% G+C	66.67	46.67
Tm(1)	75.54	70.20
Tm(2)	90.00	88.00
PM	8768.40	9681.00
pmol/µL	262.76	144.26

Cada tubo de PCR contenía la mezcla por cada reacción como se indica en la tabla 7:

Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción de PCR con la concentración y volumen utilizado

Componente	Volumen (µL)
Templado (~100 ng)	1
Buffer 10X	5
Sulfato de Magnesio 50 mM	2.5
Mezcla de dNTPs 100 mM	1
Primer Forward 0.5 µM	1
Primer Reverse 0.5 µM	1.7
Enzima Amplificasa® Biogénica	0.25
Agua estéril	cbp 50

Con dichas condiciones se esperó obtener un producto de amplificación de aproximadamente 1500 kbp.

5.5.5. Condiciones de amplificación

La reacción se llevó a cabo en el termociclador MyCycler Personal Thermal Cycler (BioRad) con las condiciones de amplificación especificadas.

Tabla 8. Condiciones de amplificación.

1 ciclo de desnaturalización	95°C 5 minutos
30 ciclos de amplificación	Desnaturalización 95°C 1 minuto
	Alineamiento 49.9 °C 1 minuto
	Amplificación 72°C 1.5 minutos
1 ciclo de amplificación final	72°C 5 minutos
Almacenamiento	4°C por tiempo indefinido

5.5.6. Electroforesis

Para corroborar que se obtuvo el producto de PCR esperado (aproximadamente 1500 kbp), se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando la metodología descrita en el inciso 5.5.3

5.5.7. Purificación de productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó empleando el sistema miniaturizado Pure Link™ PCR Purification Kit de Invitrogen, el cual se basa en la unión selectiva de ADN de doble hebra, a una membrana de sílica en presencia de sales caotrópicas. La metodología que se realizó se indica en la figura 8.

El sistema está diseñado para remover eficientemente primers, dNTPs, enzimas y sales de los productos de PCR. El producto de PCR purificado es adecuado para secuenciación de ADN, digestión con enzimas de restricción y clonación. El procedimiento se divide en tres etapas: unión del ADN, lavado del ADN y elución del ADN.

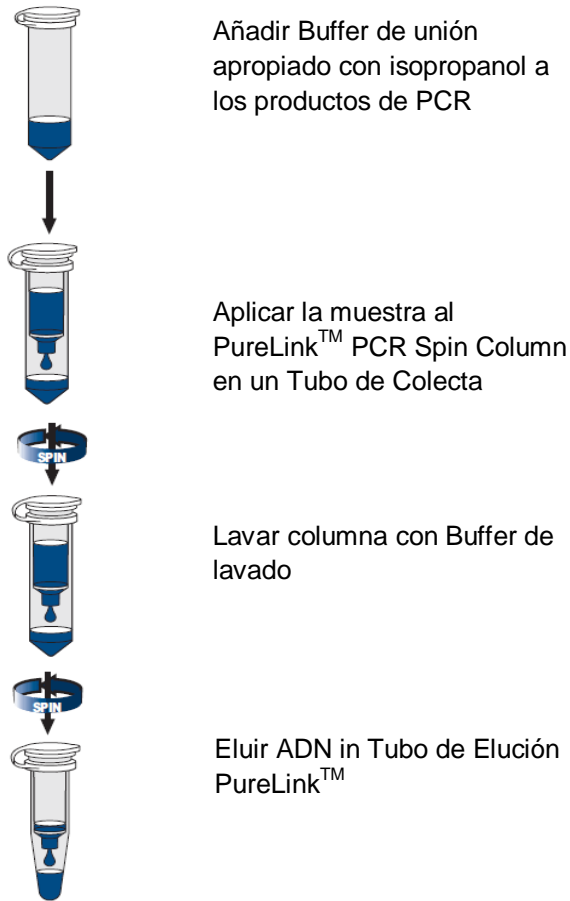


Figura 8. Purificación del producto de PCR empleando el sistema miniaturizado Pure Link PCR Purification Kit de Invitrogen (www.invitrogen.com, 20 octubre 2010).

Unión del ADN: Se añadieron 200 μ L del buffer de unión HC con isopropanol de PureLink™ y se mezcló. Este buffer proporciona las condiciones adecuadas para que el ADN se pueda unir selectivamente a la membrana del filtro de la columna de elución. El volumen total se colocó en la columna y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto para unir selectivamente el ADN; se desechó el sobrenadante que contenía a los contaminantes disueltos.

Lavado del ADN: Se añadieron 650 μ L de etanol a la columna para lavar el ADN unido al filtro. Se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos para eliminar cualquier residuo del buffer de lavado.

Elución del ADN: La columna con el ADN unido y lavado se colocó en un tubo de elución PureLink™ de 1.7 mL, se le añadieron 50 μ L de buffer de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) al centro de la columna. Se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos. Este buffer eluye el ADN del filtro por afinidad. El producto de purificación de PCR se guardó en congelación. (Invitrogen, 2004).

5.5.8. Electroforesis

Para verificar la pureza del gen ribosomal 16 S después de esta etapa, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% empleando la metodología descrita en el inciso 5.5.3.

5.5.9. Secuenciación genética

La secuenciación genética se realizó en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizó un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730 que emplea el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing. Se proporcionó a la unidad el templado de los productos de PCR purificados con las siguientes especificaciones: 10 ng de ADN templado por cada 100 bp de producto de PCR.

La concentración del ADN se calculó bajo las siguientes consideraciones:

La concentración del marcador de peso molecular es 0.1 µg/µL y se colocaron 0.3 µL en cada gel :

$$0.1 \text{ µg/µL} (0.3 \text{ µL}) = 0.3 \text{ µg de ADN}$$

Considerando la densidad de estas bandas y utilizando un analizador de imágenes Eagleeye2 (Stratagene) se obtuvo la densidad del marcador de peso molecular de 383073. Por ejemplo, para *Enterobacter sp*, la densidad de la banda fue de 159786, por lo tanto se obtiene:

$$159786 (0.3 \text{ µg de ADN}/159786) = \mathbf{0.125 \text{ µg}} \text{ de ADN en } 5 \text{ µL de muestra}$$

$$0.125 \text{ µg de ADN}/5 \text{ µL} = 0.025 \text{ µg de ADN por µL de muestra} = \mathbf{25 \text{ ng}} \text{ de ADN/µL}$$

Al tener 25 ng de ADN/µL, se necesitan 4 µL para lograr la concentración de **100 ng/µL**.

Con base en esta información, se realizaron los cálculos correspondientes con los cuales se decidió colocar 100 ng/ µL de templado. El primer forward Eu530f y el primer reverse Eu449R se enviaron a 10 pmol/ µL de concentración. Se aforó a 50 µL con agua grado biología molecular.

5.5.10 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas se visualizaron y editaron mediante el programa editor de secuencias biológicas BioEdit, Biological Sequence Alignment Editor (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit).

Las secuencias se analizaron con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) mismo que permite encontrar regiones de similitud en las secuencias biológicas comparándolas con bases de datos y calculando la significancia estadística de los semejantes.

Para construir el árbol filogenético de la cepa, se tomaron cinco secuencias que mostraron tener mayor similitud con la cepa. Dichas secuencias fueron introducidas en el programa ClustalX2 (www.clustal.org) lo que permitió realizar el alineamiento múltiple de las mismas.

Las secuencias se analizaron con el paquete de programas de filogenética computacional PHYLIP-3.68 (evolution.genetics.washington.edu/phylip.html). Se generaron con el programa 100 réplicas del archivo y una matriz de distancia usando el algoritmo de Jukes-Cantor. Con esta matriz se construyó el árbol consenso mediante el método Neighbor Joining.

Para estimar la robustez del árbol se incluyó un análisis Bootstrap con las 100 réplicas indicadas.

Finalmente el árbol consenso obtenido fue visualizado y editado empleando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; www.megasoftware.net/) (Conca, 2008; Lozano, 2007; Luangsakul, *et al.*, 2009; Cervantes, 2010).

6. Resultados y discusión.

6.1. Reactivación.

Se lograron reactivar las cepas de manera satisfactoria, ya que se observó su crecimiento tanto en caldo infusión cerebro corazón (ICC) como en caldo bilis verde brillante con lactosa, por lo que se prosiguió con el aislamiento y purificación.

6.2. Caracterización fenotípica.

6.2.1. Aislamiento y purificación. Características morfológicas y microscópicas.

Las cepas se aislaron y purificaron en medios de cultivo selectivos, mediante dos resiembras consecutivas de colonias aisladas. Se observaron las características de las colonias en cada medio selectivo, se realizó tinción de Gram y observación microscópica de cada bacteria, los resultados se encuentran en la sección 5.4.3 de la metodología.

Tabla 9. Características morfológicas y microbiológicas observadas y reportadas en la bibliografía para las cepas analizadas

Cepa	Medio selectivo	Características morfológicas encontradas	Características morfológicas reportadas (Blackburn, 2006)	Características microscópicas observadas	Características microscópicas reportadas (Holt <i>et al.</i> , 2000)
<i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ	McConkey	Colonias pequeñas rosas circulares, convexas y acuosas	Colonias circulares pequeñas, suaves, convexas y húmedas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos de 0.6-1 µm de ancho y 1.2-3 µm de largo. Gram-negativo
<i>Enterobacter cloacae</i> CFQ	McConkey	Colonias pequeñas rosas circulares, convexas y acuosas	Colonias circulares pequeñas, suaves, convexas y húmedas	Bacilos cortos y largos Gram-negativos	Bacilos rectos de 0.6-1 µm de ancho y 1.2-3 µm de largo. Gram-negativo
<i>Enterobacter</i> sp.	McConkey	Colonias pequeñas rosas circulares, convexas y acuosas	Colonias circulares pequeñas, suaves, convexas y húmedas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos de 0.6-1 µm de ancho y 1.2-3 µm de largo. Gram-negativo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	McConkey	Colonias circulares planas rosa brillante	Colonias circulares color rosa o transparentes	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos de 1.1-1.5 µm de ancho y 2-6 µm de largo. Ordenados singularmente o en pares. Gram-negativo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	McConkey	Colonias circulares planas rosa brillante	Colonias circulares color rosa o transparente	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos de 1.1-1.5 µm de ancho y 2-6 µm de largo. Ordenados singularmente o en pares. Gram-negativo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	McConkey	Colonias circulares planas rosa brillante	Colonias circulares color rosa o transparente	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos de 1.1-1.5 µm de ancho y 2-6 µm de largo. Ordenados singularmente o en pares. Gram-negativo
<i>Citrobacter freundii</i> CFQ B057	McConkey	Colonias circulares y rosas	Colonias circulares de color rosa	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos o ligeramente curvos, de 1 µm de diámetro y 2-6 µm de largo. Ordenados singularmente o en pares, Gram-negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CFQ	McConkey	Colonias alargadas mucoides y rosas	Colonias largas mucoides	Bacilos cortos Gram-negativos con cápsula	Bacilos rectos, de 0.3-1 µm de diámetro y 0.6-6 µm de largo. Ordenados singularmente, en pares o en pequeñas cadenas, presentan cápsula. Gram-negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131	McConkey	Colonias alargadas mucoides y rosas	Colonias largas mucoides	Bacilos cortos Gram-negativos con cápsula	Bacilos rectos, de 0.3-1 µm de diámetro y 0.6-6 µm de largo. Ordenados singularmente, en pares o en pequeñas cadenas, presentan cápsula. Gram-negativo
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 9992	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos, de 0.7-1.5 µm de diámetro y 2-5 µm de largo. Gram-negativo
<i>Salmonella</i> Enteritidis CFQ	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos, de 0.7-1.5 µm de diámetro y 2-5 µm de largo. Gram-negativo

Cepa	Medio selectivo	Características morfológicas encontradas	Características morfológicas reportadas (Blackburn, 2006)	Características microscópicas observadas	Características microscópicas reportadas (Holt et al., 2000)
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC14028	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos, de 0.7-1.5 µm de diámetro y 2-5 µm de largo. Gram-negativo
<i>Salmonella</i> Nitra CFQ	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o blancas a veces con centro negro	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos, de 0.7-1.5 µm de diámetro y 2-5 µm de largo. Gram-negativo
<i>Shigella sonnei</i> CFQ S53	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o translúcidas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos Gram-negativo
<i>Shigella sonnei</i> CFQ	McConkey	Colonias circulares planas amarillo translúcido, algunas punteadas	Colonias incoloras o translúcidas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos Gram-negativo
<i>Proteus mirabilis</i> CFQ P13	McConkey	Colonias irregulares, café translúcido, cremosas	Colonias translúcidas, irregulares, mucosas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos Gram-negativos
<i>Proteus vulgaris</i> CFQ P20	McConkey	Colonias irregulares, café translúcido, cremosas	Colonias translúcidas, irregulares, mucosas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos Gram-negativos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Cetrimida	Colonias translúcidas puntiformes y surgimiento de coloración azul en el medio	Colonias muy pequeñas translúcidas o blancas rodeadas de picocianina (surgimiento de color azul-verdoso en medio)	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos o ligeramente curvos, de 0.4-0.8 µm de diámetro y 0.8-2 µm de largo. Gram-negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Cetrimida	Colonias translúcidas puntiformes y surgimiento de coloración azul en el medio	Colonias muy pequeñas translúcidas o blancas rodeadas de picocianina (surgimiento de color azul-verdoso en medio)	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos, de 0.4-0.8 µm de diámetro y 0.8-2 µm de largo. Gram-negativo
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	Gelosa especial pH 8.5	Colonias circulares planas amarillo translúcido	Colonias pequeñas opacas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos o curvados de 0.5-0.8 µm de ancho y 1.4-2.6 µm de largo. Gram-negativo
	TCBS	Colonias circulares amarillas de borde translúcido	Colonias pequeñas amarillo translúcido		
<i>Yersinia enterocolitica</i> CFQ	McConkey	Colonias pequeñas circulares, mucoides y rosas	Colonias muy pequeñas rosas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos, a veces toman forma esférica, de 0.5-0.8 µm de diámetro y 1-3 µm de largo. Gram-negativo
<i>Serratia marcescens</i> CFQ S48	Agar nutritivo	Colonias circulares húmedas y rojo brillante.	Colonias rojas húmedas	Bacilos cortos Gram-negativos	Bacilos rectos, de 0.5-0.8 µm de diámetro y 0.9-2 µm de largo. Gram-negativo

El desarrollo de las colonias en los medios de cultivo selectivos no es criterio adecuado de identificación, ya que muchas bacterias presentan características similares; sin embargo, es un indicativo de una purificación adecuada de acuerdo a las características reportadas en la bibliografía.

Al realizar la tinción de Gram, se observó que todas las bacterias analizadas fueron Gram-negativas, lo cual es una característica del grupo de enterobacterias y los bacilos analizados. También el género *Pseudomonas* está compuesto por bacilos Gram-negativos, no esporulados, generalmente aeróbicos y móviles por flagelos (Blackburn, 2006). De la misma manera, Bergey's clasifica a *Proteus*, *Serratia* y *Vibrio*, como Gram-negativos. En todos los casos se obtuvo la morfología microscópica esperada, siendo todos bacilos cortos aunque de longitud variable conforme a género y especie (Janda, 2005).

Microscópicamente se observó uniformidad en el ancho y largo de las bacterias, por lo que se puede decir que se contaba con microorganismos puros. Existe correlación entre las características morfológicas y microscópicas observadas con las teóricas, por lo que se puede decir que la identificación morfológica y microscópica es confiable en todos los casos.

6.3 Identificación bioquímica

Se identificaron bioquímicamente por medio del sistema API 20E, cuyos resultados se basan en cambios de color de los indicadores presentes en cada microtubo (Figura 9); la identificación se realizó por medio del programa APIweb de BioMérieux (V: 1.1.0; 2003), los resultados obtenidos se anexan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de identificación bioquímica de los bacilos Gram-negativos empleando el sistema de identificación API20E.

Cepa	Código de identificación	Identificación con sistema API-20E	Porcentaje de identificación*	Calidad de identificación*
<i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ	5305773	<i>Enterobacter aerogenes</i>	97.7	Buena
<i>Enterobacter cloacae</i> CFQ	3305163	<i>Enterobacter cloacae</i>	91.3	Buena
<i>Enterobacter</i> sp.	5305773	<i>Enterobacter aerogenes</i>	97.7	Buena
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7144552	<i>Escherichia coli</i> tipo 1	95.5	Muy buena
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	1144173	<i>Kluyvera</i> spp.	97.8	Buena
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	1144552	<i>Escherichia coli</i> tipo 1	89.9	Aceptable
<i>Citrobacter freundii</i> CFQ B057	3604572	<i>Citrobacter freundii</i>	99.9	Excelente
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CFQ	5215773	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97.8	Buena
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131	4255773	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.8	Muy buena
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 9992	4504552	<i>Salmonella</i> spp.	84.8	Muy buena
<i>Salmonella</i> Enteritidis CFQ	6704512	<i>Salmonella</i> spp.	95.4	Excelente
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC14028	6704752	<i>Salmonella</i> spp.	99.9	Excelente
<i>Salmonella</i> Nitra CFQ	6704552	<i>Salmonella</i> spp.	97.6	Buena
<i>Shigella sonnei</i> CFQ S53	1104112	<i>Shigella sonnei</i>	99.2	Muy buena
<i>Shigella sonnei</i> CFQ	1104102	<i>Shigella sonnei</i>	97.6	Buena
<i>Proteus mirabilis</i> CFQ P13	0734000	<i>Proteus mirabilis</i>	99.9	Excelente
<i>Proteus vulgaris</i> CFQ P20	0456021	<i>Proteus vulgaris</i>	99.9	Muy buena
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2216000	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98.7	Buena
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	2216000	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98.7	Muy buena
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	5147124	<i>Vibrio cholerae</i>	99.9	Presuntiva
<i>Yersinia enterocolitica</i> CFQ	1154723	<i>Yersinia enterocolitica</i>	98.1	Buena
<i>Serratia marcescens</i> S48	5307763	<i>Serratia liquefaciens</i>	76.2	Muy buena identificación de género
		<i>Serratia marcescens</i>	23.7	

* De acuerdo al manual API® 20E de BioMérieux® s.a. Francia. 2002



Figura 9. Identificación bioquímica con el sistema API 20E para la cepa *Enterobacter cloacae* CFQ. Cambios de color a las 24 horas de incubación a 37°C.

6.4 Caracterización genotípica

6.4.1 Extracción de ADN cromosomal de las cepas y electroforesis

Para cada una de las cepas empleadas se logró la extracción de ADN cromosomal. Para corroborar la extracción se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) observando las bandas de un peso molecular de mayores a 12 kbp, empleando bromuro de etidio al 0.04% para visualizarlas, con una velocidad de corrida de 100 volts (figuras 10, 11 y 12). El material genético no se degradó, pues se observó en todos los casos una sola banda definida (Downes *et al.*, 2001).

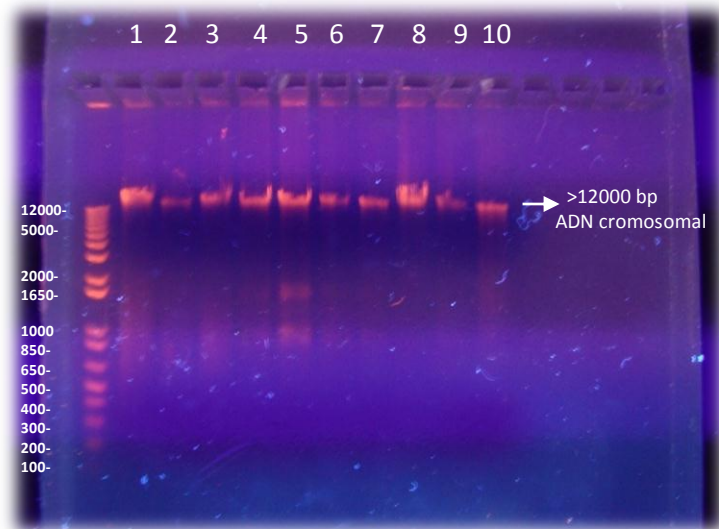


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) del ADN cromosomal de las cepas en estudio. Velocidad de corrida: 100 Volts Carril 1. Marcador de peso molecular de 1 kbp. 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 3. *Proteus vulgaris* CFQ P20. 4. *Proteus mirabilis* CFQ P13. 5. *Escherichia coli* ATCC 25922. 6. *Escherichia coli* ATCC 10536. 7. *Enterobacter aerogenes* CFQ. 8. *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131. 9. *Citrobacter freundii* CFQ B057. 10. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. 11. *Salmonella typhi* ATCC 9992.

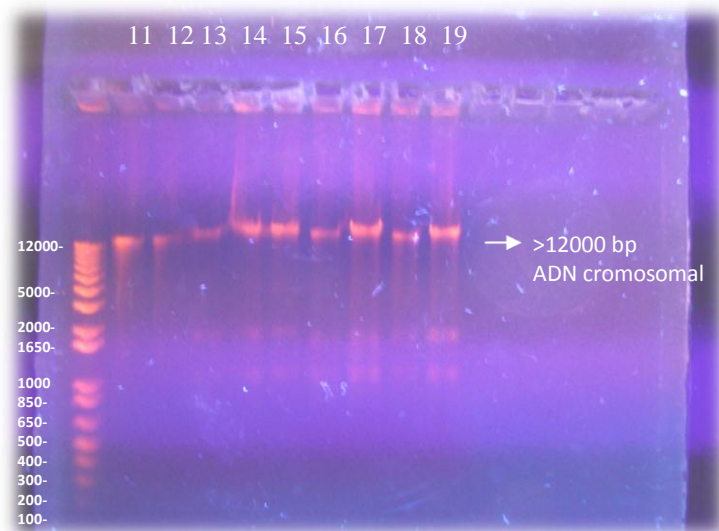


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) del ADN cromosomal de las cepas en estudio. Velocidad de corrida: 100 Volts Carril 1. Marcador de peso molecular de 1 kbp. 2. *Salmonella* Typhimurium ATCC14028. 3. *Salmonella* Nitra CFQ. 4. *Klebsiella pneumoniae* CFQ. 5. *Enterobacter* sp. 6. *Shigella sonnei* CFQ. 7. *Vibrio cholerae* No O1. 8. *Salmonella* Enteritidis CFQ. 9. *Serratia marcescens* CFQ S48. 10. *Yersinia enterocolitica* CFQ

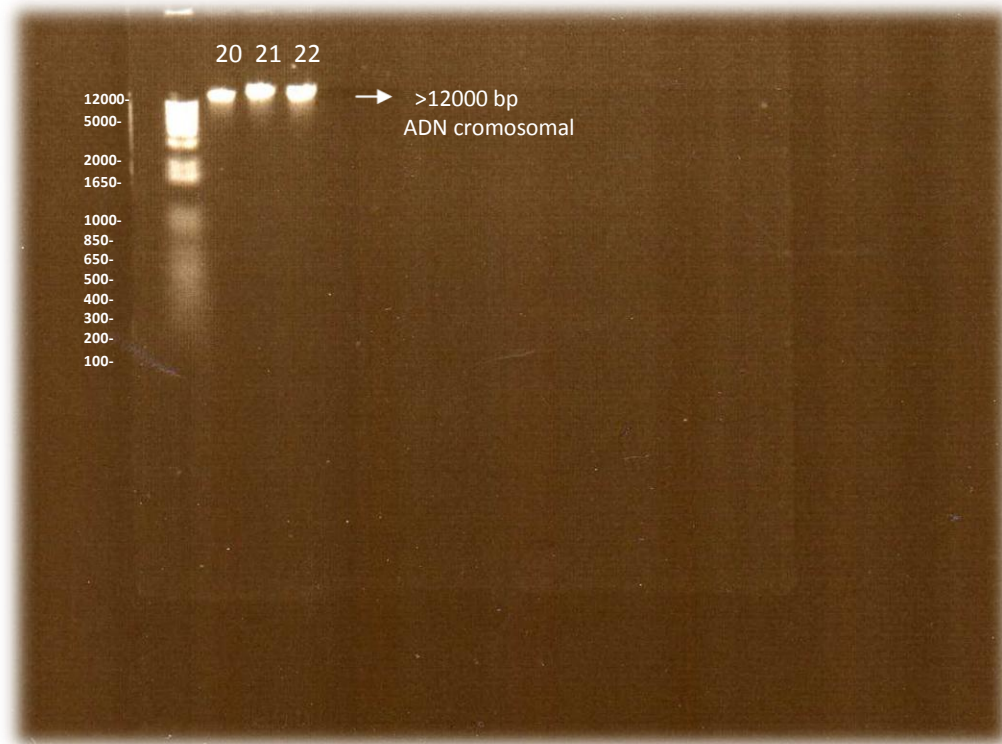


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) del ADN cromosomal de las cepas en estudio. Velocidad de corrida: 100 Volts Carril 1. Marcador de peso molecular de 1 kbp. 2. *Enterobacter cloacae* CFQ. 3. *Shigella sonnei* CFQ S53. 4. *Escherichia coli* ATCC 11229

6.4.2 Amplificación del gen 16S por PCR y electroforesis

Una vez obtenido el ADN cromosomal de cada una de las cepas, se realizó una reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen que codifica para el ARNr 16S empleando los cebadores universales Eu530F y Eu1449R.

Para verificar los amplicones del gen 16S de cada una de las cepas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%), con una velocidad de corrida de 100 volts (figuras 13 y 14). Se logró en todos los casos amplificar el gen del tamaño

esperado al obtener un producto de PCR de aproximadamente 1,500 bp de acuerdo al marcador de peso molecular Invitrogen (Downes e Ito, 2001) .



Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S de las cepas en estudio. Velocidad de corrida: 100 Volts Carril 1. Marcador de peso molecular de 1 kbp. 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 3. *Proteus vulgaris* CFQ P20. 4. *Proteus mirabilis* CFQ P13. 5. *Escherichia coli* ATCC 25922. 6. *Escherichia coli* ATCC 10536. 7. *Enterobacter aerogenes* CFQ. 8. *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131. 9. *Citrobacter freundii* CFQ B057. 10. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. 11. *Salmonella* Typhi ATCC 9992. 12. *Salmonella* Typhimurium ATCC14028. 13. *Salmonella* Nitra CFQ.

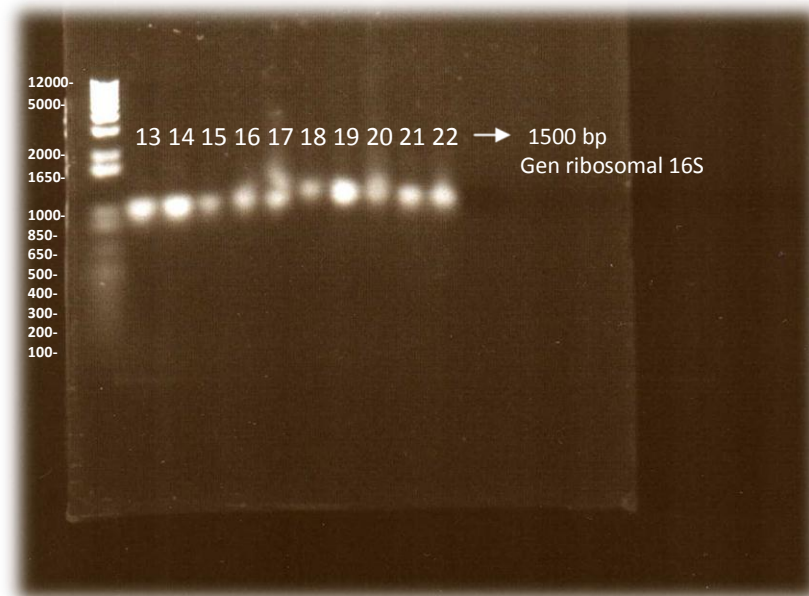


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S de las cepas en estudio. Velocidad de corrida: 100 Volts Carril 1. Marcador de peso molecular de 1 kbp. 2. *Klebsiella pneumoniae* CFQ. 3. *Enterobacter sp.* 4. *Shigella sonnei* CFQ. 5. *Vibrio cholerae* No O1. 6. *Salmonella* Enteritidis CFQ. 7. *Serratia marcescens* CFQ S48. 8. *Yersinia enterocolitica* CFQ. 9. *Enterobacter cloacae* CFQ. 10. *Shigella sonnei* CFQ S53. 11. *Escherichia coli* ATCC 11229

6.4.3 Purificación del gen 16S y electroforesis

Después de amplificar el gen 16S, se procedió a la purificación del amplicón para la eliminación de sales u otros compuestos ajenos al gen 16S que pudieran interferir con la reacción de secuenciación, empleando el Pure Link™ PCR Purification Kit de Invitrogen. Se corroboró la purificación de los amplicones del gen ribosomal 16S para todas las cepas, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En las figuras 15 y 16 se observan los amplicones purificados, la presencia de bandas únicas y nítidas que indican la presencia del gen 16S puro.

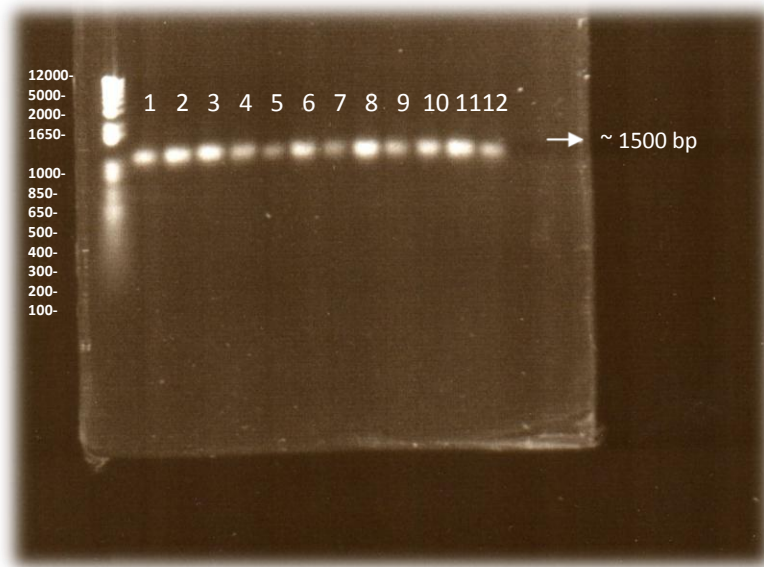


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S purificados de las cepas en estudio. Velocidad de corrida: 100 Volts Carril
1. Marcador de peso molecular de 1 kbp. 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. 3. *Proteus vulgaris* CFQ P20. 4. *Proteus mirabilis* CFQ P13. 5. *Escherichia coli* ATCC 25922. 6. *Escherichia coli* ATCC 10536. 7. *Enterobacter aerogenes* CFQ. 8. *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131. 9. *Citrobacter freundii* CFQ B057. 10. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. 11. *Salmonella* Typhi ATCC 9992. 12. *Salmonella* Typhimurium ATCC14028. 13. *Salmonella* Nitra CFQ.

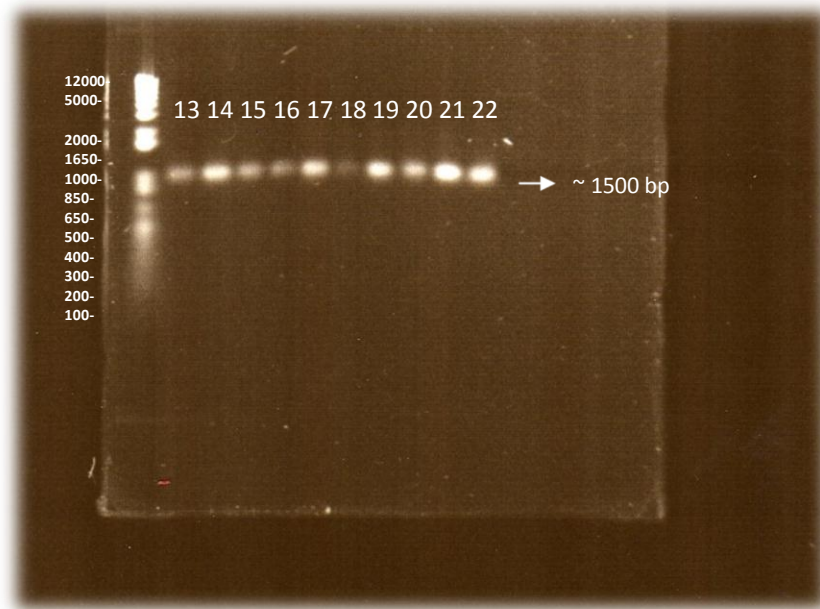


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de los productos de PCR del gen 16S purificados de las cepas en estudio. Velocidad de corrida: 100 Volts Carril
 1. Marcador de peso molecular de 1 kbp. 2. *Klebsiella pneumoniae* CFQ. 3. *Enterobacter* sp. 4. *Shigella sonnei* CFQ. 5. *Vibrio cholerae* No O1. 6. *Salmonella* Enteritidis CFQ. 7. *Serratia marcescens* CFQ S48. 8. *Yersinia enterocolitica* CFQ. 9. *Enterobacter cloacae* CFQ. 10. *Shigella sonnei* CFQ S53. 11. *Escherichia coli* ATCC 11229

6.4.4 Secuenciación del gen ribosomal 16S

Para todas la cepas analizadas se obtuvieron las secuencias en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología, UNAM.

En la figura 17, Se muestra un segmento del cromatograma para *Enterobacter aerogenes* CFQ de la misma forma en la figura 18 se muestra la secuencia parcial en formato fasta para la misma cepa. La secuenciación en formato fasta del resto de las cepas estudiadas se encuentra en el apéndice 2.

6.5 Identificación fenotípica y genotípica de las cepas individuales.

En la tabla 10 se encuentran los resultados obtenidos de la comparación entre la aproximación fenotípica y la genotípica. Para cada caso se presenta el taxón, así como el porcentaje de identificación.

La cepa de *Enterobacter aerogenes* CFQ se encuentra descrita en la bibliografía como bacilos rectos cortos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), característica que se corroboró mediante el análisis microscópico (tabla 9). En la bibliografía está descrita como una bacteria anaerobia facultativa que fermenta la glucosa, es Voges-Proskauer positiva y citrato positiva, usualmente utiliza el malonato y no produce H₂S, desoxiribonucleasa ni lipasa. Fermenta L-arabinosa, celobiosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, salicina y trehalosa. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas y la comparación específica contra lo reportado en la bibliografía, se presenta en la tabla 11 y concuerdan con lo descrito en la bibliografía para todas las pruebas. Utilizando la base de datos APIWEB, la cepa se identificó fenotípicamente, como *Enterobacter aerogenes* con un 97.7% de identidad, correspondiente a una buena identificación (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico*, de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Enterobacter aerogenes* cepa RW7M1 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la caracterización fenotípica.

Tabla 11 Identificación fenotípica y genotípica de bacterias estudiadas empleando el sistema de identificación API20E (Biomériux) y la secuenciación del gen ADNr 16S

Microorganismo	Identificación fenotípica Sistema API 20E			Identificación genotípica Secuenciación ADNr 16S	
	Taxón significativo	%ID	Calidad de identificación	Descripción	% de homología en secuencia
<i>Enterobacter aerogenes</i> CFQ	<i>Enterobacter aerogenes</i>	97.7	Buena	<i>Enterobacter aerogenes</i> cepa RW7M1	99
<i>Enterobacter cloacae</i> CFQ	<i>Enterobacter cloacae</i>	91.3	Buena	<i>Enterobacter cloacae</i> cepa B5	99
<i>Enterobacter</i> sp	<i>Enterobacter aerogenes</i>	97.7	Buena	<i>Enterobacter aerogenes</i> cepa NCTC10006T	99
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	<i>Kluyvera</i> spp.	97.8	Buena	<i>Kluyvera ascorbata</i> cepa 14751	85
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Escherichia coli</i> tipo 1	89.9	Aceptable	<i>Escherichia coli</i> KCTC cepa 2441	99
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CFQ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97.8	Buena	<i>Klebsiella pneumoniae</i> cepa K30	97
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 49131	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99.8	Muy buena	<i>Klebsiella oxytoca</i> cepa KOU78183	98
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 9992	<i>Salmonella</i> spp.	84.8	Muy buena	<i>Salmonella</i> Typhi cepa T7	99
<i>Salmonella</i> Enteritidis CFQ	<i>Salmonella</i> spp.	95.4	Excelente	<i>Salmonella</i> sp. cepa D1942	99
<i>Salmonella</i> Nitra CFQ	<i>Salmonella</i> spp.	97.6	Buena	<i>Salmonella</i> sp. cepa 2	99
<i>Shigella sonnei</i> CFQ	<i>Shigella sonnei</i>	97.6	Buena	<i>Shigella sonnei</i> cepa HDDMG04	99
<i>Proteus mirabilis</i> CFQ P13	<i>Proteus mirabilis</i>	99.9	Excelente	<i>Proteus mirabilis</i> cepa Hu	99
<i>Proteus vulgaris</i> CFQ P20	<i>Proteus vulgaris</i>	99.9	Muy buena	<i>Proteus vulgaris</i> cepa ATCC 29905	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98.7	Buena	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa X13	99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	98.7	Muy buena	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepa MW3AC	99
<i>Vibrio cholerae</i> No O1	<i>Vibrio cholerae</i>	99.9	Presuntiva	<i>Vibrio cholerae</i> cepa RC356	99
<i>Yersinia enterocolitica</i> CFQ	<i>Yersinia enterocolitica</i>	98.1	Buena	<i>Yersinia enterocolitica</i> cepa ER-3206-92	99
<i>Serratia marcescens</i> CFQ S48	<i>Serratia liquefaciens</i>	76.2	Muy buena identificación de género	<i>Serratia marcescens</i> . Cepa MH6	98

La Figura 19 corresponde al árbol filogenético que se construyó para la cepa *Enterobacter aerogenes*.

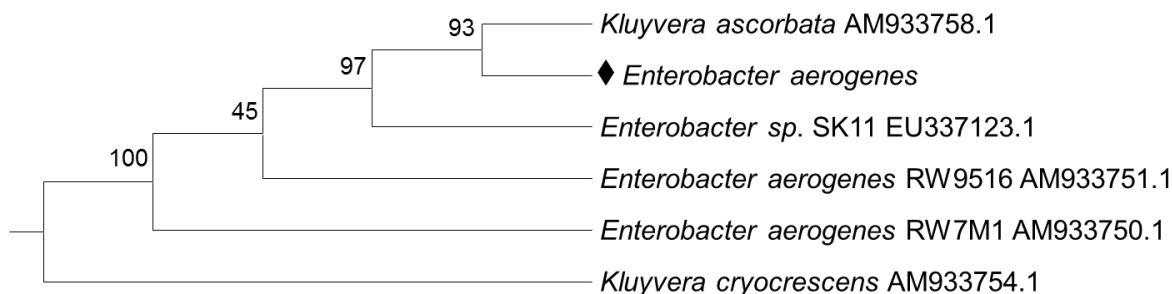


Figura 19. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Enterobacter aerogenes* CFQ (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesoión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Se obtuvo con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Enterobacter aerogenes* cepa RW7M1, indicando una excelente robustez. De la misma forma, se agrupa con otros *Enterobacter aerogenes*, soportando la identificación tanto fenotípica como genotípica.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Ceparario de la Facultad de Química.

Enterobacter cloacae CFQ está descrito en la bibliografía, como bacilos rectos cortos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), característica que se corroboró mediante el análisis microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa, es Voges-Proskauer positiva y citrato positiva, lisina-descarboxilasa negativa y ornitina-descarboxilasa positiva, usualmente

utiliza el malonato y no produce H₂S, desoxiribonucleasa ni lipasa. Fermenta L-arabinosa, celobiosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, salicina y trehalosa. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (Tabla 9) concuerdan con lo descrito, exceptuando la prueba de sorbitol, que es positiva en el 80% de los casos y rafinosa que es positiva en el 79% de los casos; probablemente debido a esta discrepancia, la cepa fue identificada fenotípicamente como *Enterobacter cloacae* con un 91.3% de identidad, correspondiente a una buena identificación (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Enterobacter cloacae* cepa B5 (Tabla 11) lo cual concuerda con la identificación fenotípica.

La Figura 20 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

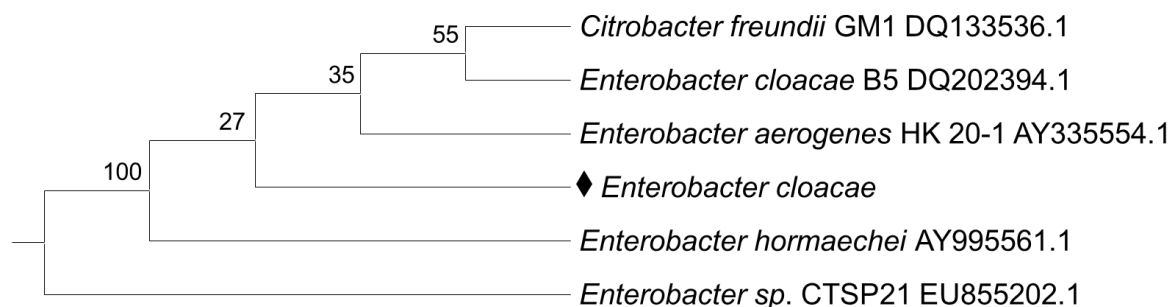


Figura 20. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Enterobacter cloacae* CFQ (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Se observó que se agrupa dentro del mismo género con el cual está clasificada originalmente en la Colección del Cepario de la Facultad de Química, observándose su cercanía con otras especies.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético, se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 27 en la rama que corresponde a la especie *Enterobacter cloacae* cepa B5 indicando una robustez menor.

Para esta cepa se obtuvieron buenos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario; sin embargo, sería recomendable realizar análisis genotípicos mas específicos para asegurar el género y especie identificada.

En la bibliografía, *Enterobacter* sp. CFQ se describe como bacilos cortos rectos Gram-negativo (Holt *et al.*, 2000), característica que se ratificó mediante el análisis microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa, es Voges-Proskauer positiva y citrato positiva, lisina-descarboxilasa negativa y ornitina-descarboxilasa positiva, usualmente utiliza el malonato y no produce H₂S, desoxiribonucleasa ni lipasa. Fermenta l-arabinosa, celobiosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, salicina y trehalosa. (Holt *et al.*, 2000). Las pruebas bioquímicas (Tabla 10) concuerdan con lo descrito. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Enterobacter aerogenes* con un 97.7% de identidad, correspondiente a una buena identificación. Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Enterobacter aerogenes* cepa NCTC10006T (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 21 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

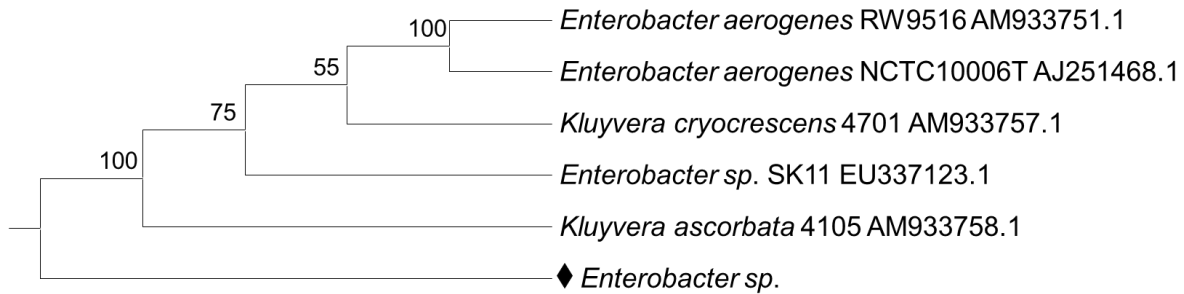


Figura 21. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Enterobacter* sp. CFQ (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Enterobacter aerogenes* cepa NCTC10006T indicando una excelente robustez. En el árbol se observa que la cepa se agrupa con otros *Enterobacter* y *Kluyvera*, Paván *et al.*, (2005) determinaron que estos dos géneros son muy cercanos filogenéticamente e incluso propusieron la reclasificación de una especie de *Enterobacter* como *Kluyvera*, la agrupación en el árbol de la cepa junto a *Kluyvera* concuerda con lo descrito por los autores.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario.

Escherichia coli se describe como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), característica que se confirmó mediante el análisis microscópico (tabla 9). Es una bacteria anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa, catalasa positiva y usualmente citrato negativa, para producción de H₂S, hidrólisis de la urea y lipasa. La mayoría de las

especies reducen los nitratos y casi todas fermentan L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, trehalosa y D-xilosa Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos para la cepa *Escherichia coli* ATCC 10536 de las pruebas bioquímicas (tabla 10) no concuerdan con lo descrito. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Kluyvera* spp. con un 97.8% de identidad, correspondiente a una buena identificación (tabla 11). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 85% de homología para el taxón *Kluyvera ascorbata* cepa 14751 (Tabla 11) dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica a nivel de género y además con la identificación mediante la comparación de secuencias del gen ribosomal 16S se identificó la especie más próxima.

La Figura 22 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

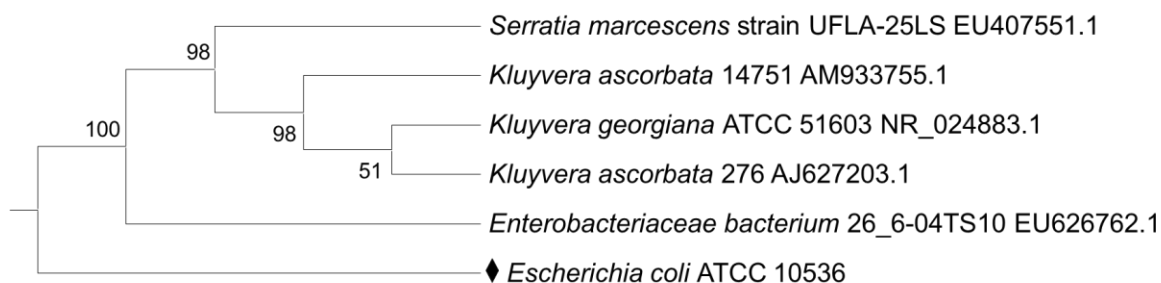


Figura 22. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Escherichia coli* ATCC 10536(rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético, se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 98 en la rama que corresponde a la especie *Kluyvera ascorbata* cepa 14751 indicando una muy buena robustez.

Se observa que a pesar de ser un organismo de la ATCC, la identificación tanto fenotípica como genotípica no coincide con lo esperado (tabla 11), por lo que puede ser que haya cambiado su fenotipo. Sería necesario una reclasificación de esta cepa en el Cepario.

Para el caso de la cepa *Escherichia coli* ATCC 11229, los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 9) concuerdan con lo descrito en todos los casos (Hanson y Brinton, 1989). La cepa fue identificada fenotípicamente como *Escherichia coli* tipo 1 con un 89.9% de identidad, correspondiente a una identificación aceptable (tabla 10). Es considerada *Escherichia coli* biotipo 1 ya que fenotípicamente se consideran dos tipos de *Escherichia coli*; la tipo 1 cuando la prueba IMViC es indol positivo, rojo de metilo positivo, Voges-Proskauer negativo y citrato negativo y la biotipo 2 cuando es indol negativo, conservando el resto de las pruebas IMViC iguales que el biotipo. Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Escherichia coli* KCTC cepa 2441 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 23 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

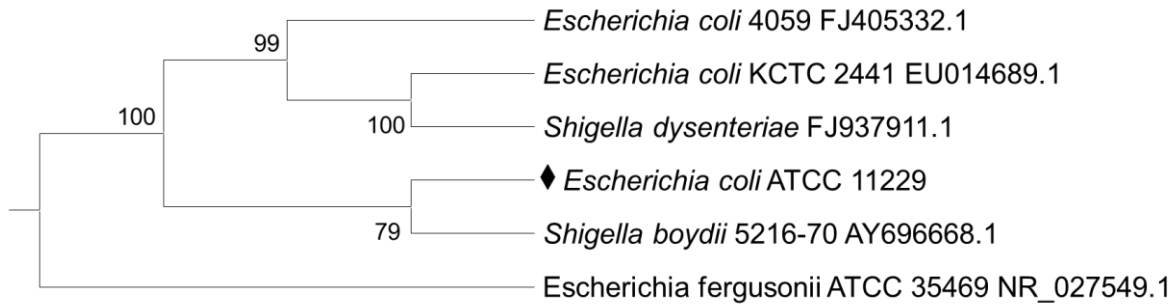


Figura 23. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Utilizando el programa para la construcción del árbol filogenético, se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Escherichia coli* KCTC 2441, indicando una excelente robustez.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario.

En la bibliografía se describe a *Klebsiella pneumoniae* como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), característica corroborado con análisis microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva. Las pruebas de indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato varían entre especies. Usualmente lisina-descarboxilasa positiva y ornitina-descarboxilasa negativa, arginina hidrolasa negativa. Muchas especies hidorilizan la urea. No producen H₂S y reducen los nitratos. La mayoría de las especies fermentan todos los carbohidratos evaluados excepto dulcitol y eritritol. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 10) concuerdan con lo descrito, excepto para ONPG, que es positiva en el 89% de los casos. La

cepa fue identificada fenotípicamente como *Klebsiella pneumoniae* con un 97.8% de identidad, correspondiente a una identificación buena (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 97% de homología para el taxón *Klebsiella pneumoniae* cepa K30 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 24 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa con respecto a las secuencias mas parecidas obtenidas por BLAST del NCBI.

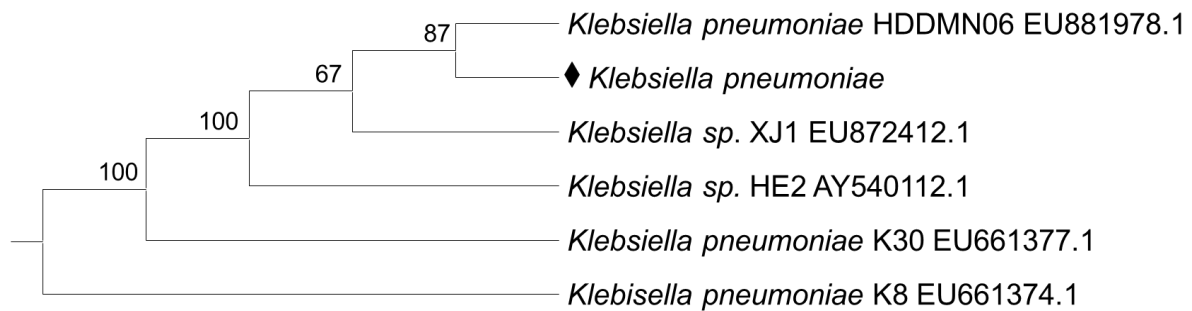


Figura 24. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Klebsiella pneumoniae* (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético, se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Klebsiella pneumoniae* cepa K30 indicando una excelente robustez.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario.

Klebsiella oxytoca ATCC 49131 es una cepa descrita como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.* 2000), característica que se corroboró mediante el análisis microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia

facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva. Las pruebas de indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer y citrato de Simmons varían entre especies. Usualmente lisina-descarboxilasa positiva y ornitina-descarboxilasa negativa, arginina hidrolasa negativa. Muchas especies hidorilizan la urea. No producen H₂S y reducen los nitratos. La mayoría de las especies fermentan todos los carbohidratos evaluados excepto dulcitol y eritritol. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 10) concuerdan con lo descrito en todos los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Klebsiella oxytoca* con un 99.8% de identidad y corresponde a una identificación muy buena. Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 98% de homología para el taxón *Klebsiella oxytoca* cepa KOU78183 (Tabla 11) dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 25 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

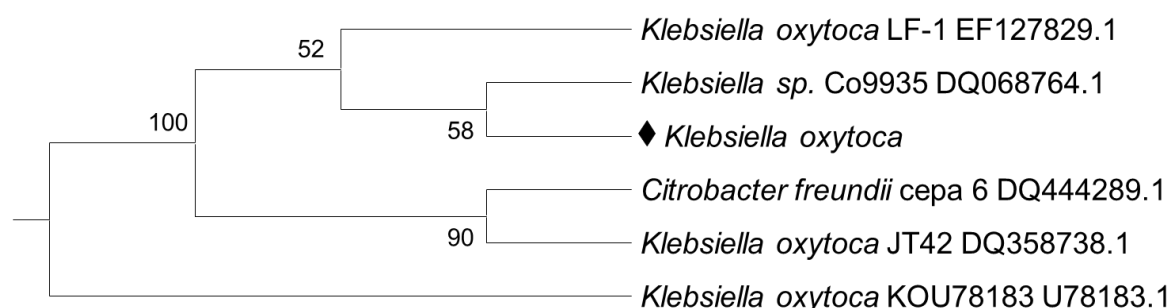


Figura 25. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Klebsiella oxytoca* (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético, se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Klebsiella oxytoca* cepa KOU78183 indicando una excelente robustez.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario.

Salmonella Typhi ATCC 9992 se encuentra descrito por bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.* 2000). Mediante análisis microscópico fue rectificada esta característica (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva, indol y Voges-Proskauer negativa; rojo de metilo y citrato positiva. lisina-descarboxilasa y ornitina-descarboxilasa positiva, la arginina deshidrolasa es variable, no hidrolizan la urea. La mayoría de las cepas producen H₂S y reducen los nitratos. Los carbohidratos que usualmente fermentan son L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa y D-xilosa. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas concuerdan con lo descrito, exceptuando el citrato que es positivo el 75% de los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Salmonella* sp. con un 84.8% de identidad, correspondiente a una identificación muy buena (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Salmonella* Typhi cepa T7 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 26 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

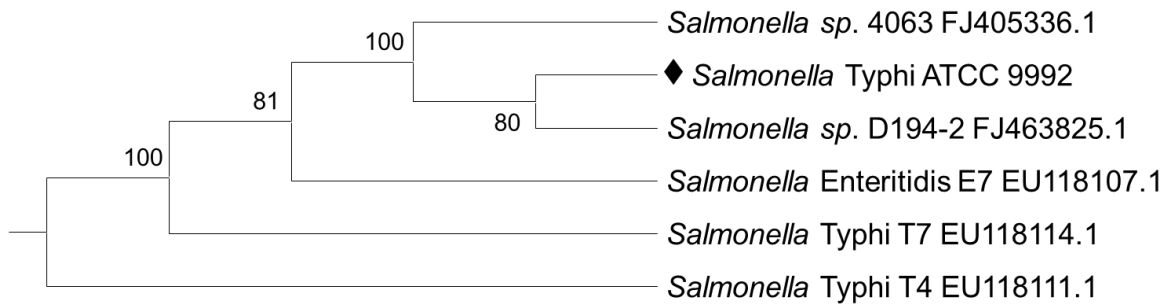


Figura 26. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Salmonella* Typhi ATCC 9992 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesoión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Salmonella* Typhi cepa T7 indicando una excelente robustez; sin embargo, al analizar el resto de las ramales filogenéticas se observa que también la relaciona con un valor de bootstrap aceptable a *Salmonella* Enteritidis E7, *Salmonella* sp. 4063 y *Salmonella* sp. D194-2. Esta ambigüedad refleja las limitaciones de la identificación genotípica empleando el gen ribosomal 16S, en varios casos no es posible identificar a nivel de especie, subespecie o cepa.

Para esta cepa se obtuvieron buenos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario. La identificación fenotípica sólo logró resolver el género, en cambio la identificación genotípica permitió resolver género y especie, complementando de manera importante la identificación.

Salmonella Enteritidis está descrita como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), característica que se corroboró mediante el análisis

microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva, indol y Voges-Proskauer negativa; rojo de metilo y citrato positiva. lisina-descarboxilasa y ornitina-descarboxilasa positiva, la arginina deshidrolasa es variable, no hidroliza la urea. Produce H₂S y reduce los nitratos. Los carbohidratos que usualmente fermenta son L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa y D-xilosa. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 9) concuerdan con lo descrito exceptuando en la fermentación de melobiosa que es positiva en el 78% de los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Salmonella* sp. con un 95.4% de identidad, correspondiente a una identificación excelente (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 99% de homología para el taxón *Salmonella* sp. cepa D1942 (Tabla 11) dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 27 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

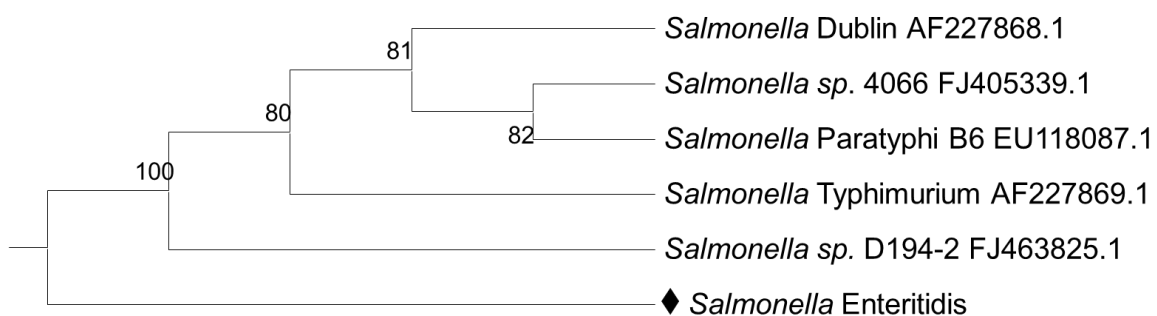


Figura 27. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Salmonella* Enteritidis (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Salmonella* sp. cepa D1942 indicando una excelente robustez.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario. Tanto la identificación fenotípica como genotípica sólo lograron resolver a nivel de género. Esta inconsistencia refleja, de igual manera, las limitaciones en la identificación fenotípica como la secuenciación del gen ribosomal 16S, por lo que es recomendable realizar pruebas serológicas complementarias para resolver a nivel de cepa este microorganismo, ya que para la realización de este trabajo no se contó con los reactivos para analizar a este nivel de identificación. Asimismo, para la identificación empleando aproximaciones genéticas sería recomendable la secuenciación de genes específicos.

En la bibliografía se describe a *Salmonella* Nitra como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), el análisis microscópico confirmó esta característica (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva, indol y Voges-Proskauer negativa; rojo de metilo y citrato Simmons positiva. lisina-descarboxilasa y ornitina-descarboxilasa positiva, la arginina deshidrolasa es variable, no hidroliza la urea. Produce H₂S y reduce los nitratos. Los carbohidratos que usualmente fermenta son L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, L-ramnosa, D-sorbitol, trehalosa y D-xilosa. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 10) concuerdan con lo descrito en

todos los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Salmonella* sp. con un 97.6% de identidad, correspondiente a una identificación buena (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Salmonella* sp. cepa 2 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 28 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

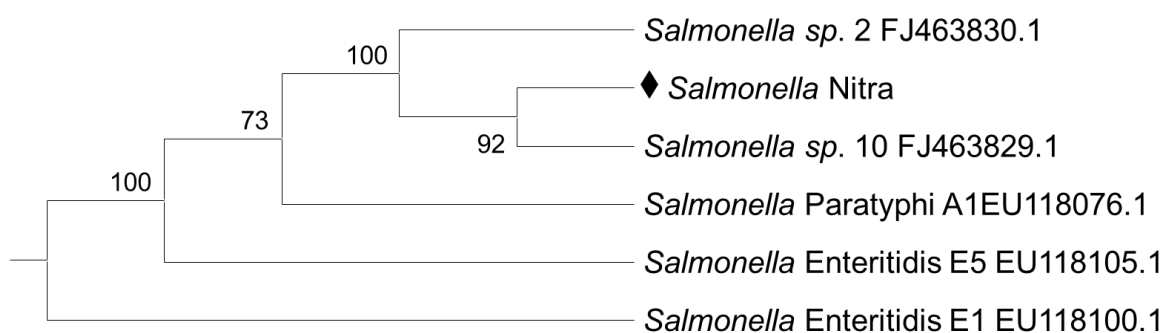


Figura 28. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Salmonella Nitra* (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Salmonella* sp. cepa 2 indicando una excelente robustez.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario a nivel de género, aunque a nivel de cepa ambas aproximaciones tuvieron limitaciones.

Shigella sonnei está descrita como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), esto se confirmó mediante análisis microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de

ácido y gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva, la producción de indol varía, Voges-Proskauer y citrato negativa; rojo de metil, lisina-descarboxilasa y ornitina-descarboxilasa negativa, la ornitina-descarboxilasa es variable, no hidroliza la urea. No produce H₂S y reduce los nitratos. Los carbohidratos que usualmente fermenta son D-manitol, D-manosa y usualmente maltosa y trehalosa. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas concuerdan con lo descrito excepto la fermentación de rafinosa que es positiva en el 75% de los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Shigella sonnei* con un 97.6% de identidad, correspondiente a una identificación buena (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Shigella sonnei* cepa HDDMG04 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 29 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

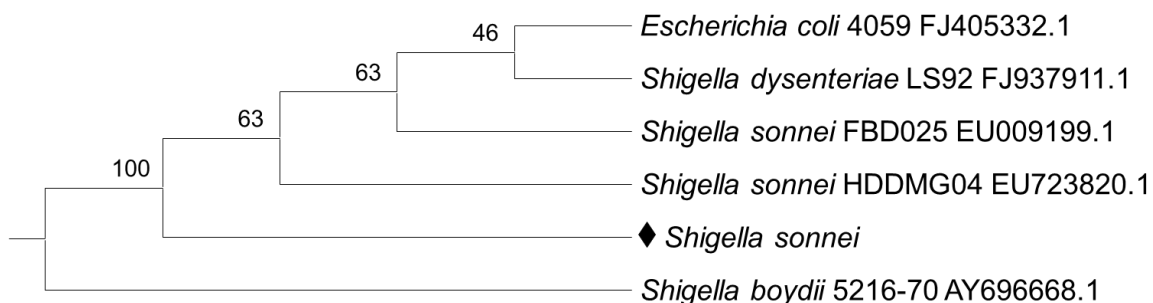


Figura 29. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Shigella sonnei* (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Shigella sonnei* cepa HDDMG04 indicando una excelente robustez.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos y la clasificación del Cepario.

Proteus mirabilis se describe en la bibliografía como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), el análisis microscópico de la misma concordó con esta descripción (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa y quimiorganotrófa, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa, catalasa positiva y rojo de metilo positiva, indol negativa, las pruebas de Voges-Proskauer y citrato varían entre las diferentes especies, es negativa a lisina-descarboxilasa, ornitina-descarboxilasa y arginina dihidrolasa (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 10) concuerdan con lo descrito para todos los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Proteus mirabilis* con un 99.9% de identidad, correspondiente a una identificación excelente (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S se identificó con un 99% de homología para el taxón *Proteus mirabilis* cepa NCTC 11938 (Tabla 11) dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 30 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

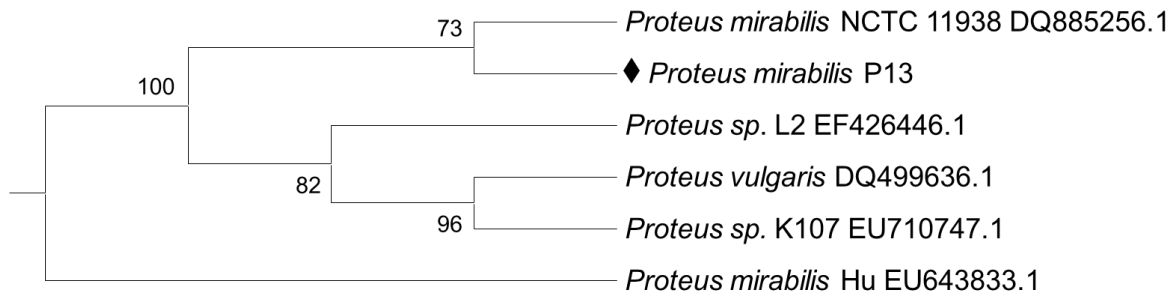


Figura 30. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Proteus mirabilis* P13 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 73 en la rama que corresponde a la especie *Proteus mirabilis* cepa NCTC 11938 indicando una robustez aceptable.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos con la clasificación del Cepario.

Proteus vulgaris es una cepa formada por bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000) y fue confirmado con análisis microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa y quimiorganotrófica, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, es oxidasa negativa, catalasa positiva y rojo de metilo positiva, indol positivo, Voges-Proskauer y citrato varían entre las diferentes especies, es negativa a lisina-descarboxilasa, ornitina-descarboxilasa y arginina dihidrolasa (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 10) concuerdan con lo descrito excepto para triptofano desaminasa que es positiva en el 99% de los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Proteus vulgaris* con un 99.9% de identidad, correspondiente a una muy buena identificación (tabla 10). Al realizar la

identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 100% de homología para el taxón *Proteus vulgaris* cepa ATCC 29905 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 31 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

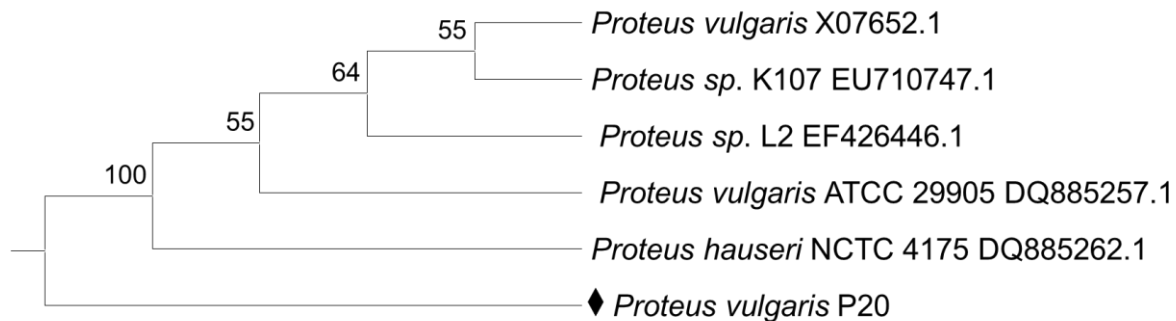


Figura 31. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Proteus vulgaris* P20 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Proteus vulgaris* cepa ATCC 29905 indicando una excelente robustez, aunque también la relaciona con buena robustez a *Proteus hauseri* NCTC 4175 y a otras cepas del género *Proteus*.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos y la clasificación del Cepario.

En la bibliografía se describe a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), característica que se corroboró mediante el análisis microscópico (tabla 9). Esta bacteria se describe como aerobia aunque en ocasiones puede utilizar nitrato como aceptor alternativo

de electrones, permitiéndole crecer anaeróbicamente; es oxidasa positiva y catalasa positiva (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas concuerdan con lo descrito excepto oxidasa que es positiva en un 97% de los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Pseudomonas aeruginosa* con un 98.7% de identidad, correspondiente a una identificación buena (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Pseudomonas aeruginosa* cepa X13 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 32 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

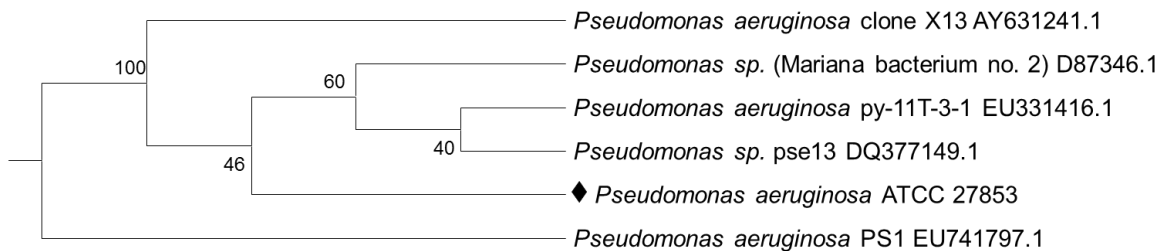


Figura 32. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Pseudomonas aeruginosa* cepa X13 indicando una excelente robustez.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos y la clasificación del Cepario.

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 se describe microscópicamente como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), característica ratificada por medio de análisis microscópico (tabla 9). Es aerobia aunque en ocasiones puede utilizar nitrato como aceptor alternativo de electrones, permitiéndole crecer anaeróbicamente; puede ser oxidasa positiva y catalasa positiva (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 9) concuerdan con lo descrito en todos los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Pseudomonas aeruginosa* con un 98.7% de identidad, correspondiente a una identificación muy buena (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Pseudomonas aeruginosa* cepa MW3AC (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 33 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

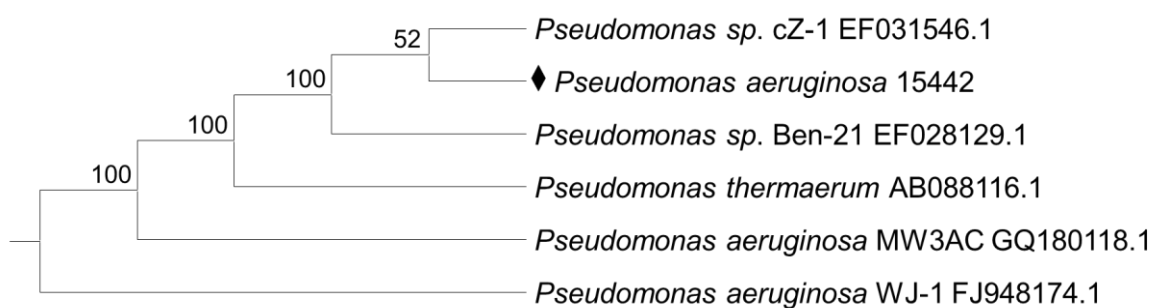


Figura 33. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie

Pseudomonas aeruginosa cepa MW3AC indicando una excelente robustez, aunque también la relaciona adecuadamente con *Pseudomonas thermaerum*, *Pseudomonas* sp. cZ-1 y *Pseudomonas* sp. Ben-21. De manera general se observan altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos y la clasificación del Cepario.

Vibrio cholerae No O1 es teóricamente una bacteria formada por bacilos cortos rectos o curvos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), el análisis microscópico determinó que cumplía con esta característica (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido pero sin gas, es oxidasa positiva y reduce los nitratos. Los carbohidratos que usualmente fermentan son D-manosa, maltosa y trehalosa. (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 10) concuerdan con lo descrito en todos los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Vibrio cholerae* con un 99.9% de identidad, correspondiente a una identificación presuntiva (tabla 10), ya que el sistema API 20E requiere una identificación serológica acompañada de la bioquímica para cerciorarse de los resultados.

Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Vibrio cholerae* cepa RC356 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 34 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

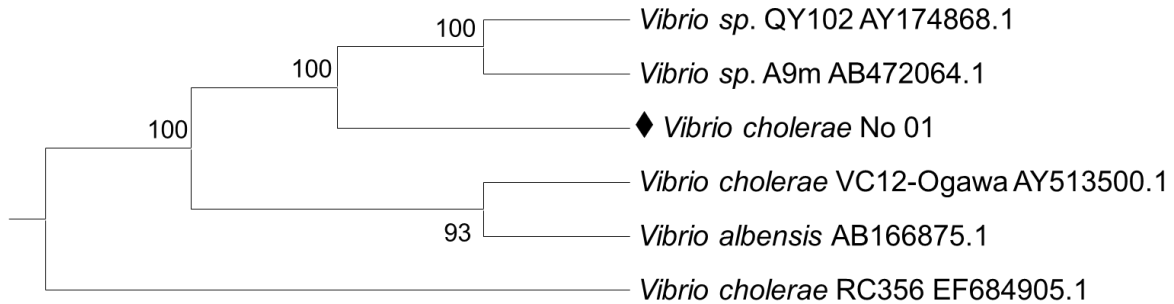


Figura 34. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Vibrio cholerae* No O1(rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Vibrio cholerae* cepa RC356 indicando una excelente robustez; en este sentido, con el análisis de la secuencia se pudo resolver la identificación aproximada obtenida por el análisis fenotípico a nivel de especie.

Para esta cepa se obtuvieron buenos porcentajes de identificación entre ambos métodos y la clasificación del Cepario.

En la bibliografía (Holt *et al.*, 2000) se describe a *Yersinia enterocolitica* como bacilos cortos rectos Gram-negativos (corroborado por análisis microscópico en la tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido pero con poco o sin gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva, la producción de indol varía, Voges-Proskauer y citrato negativa a 37°C. Usualmente las cepas son rojo de metilo y ornitina-descarboxilasa positiva, lisina-descarboxilasa y arginina desdhirolasa negativa. No produce H₂S, hidroliza la urea y reduce los nitratos y no utiliza el malonato. Los carbohidratos que usualmente fermenta son L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa y

trehalosa (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas (tabla 10) concuerdan con lo descrito, excepto inositol que es positiva únicamente en el 25% de los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Yersinia enterocolitica* con un 98.1% de identidad, correspondiente a una buena identificación (tabla 10). Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 99% de homología para el taxón *Yersinia enterocolitica* cepa ER-3206-92 (Tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 35 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

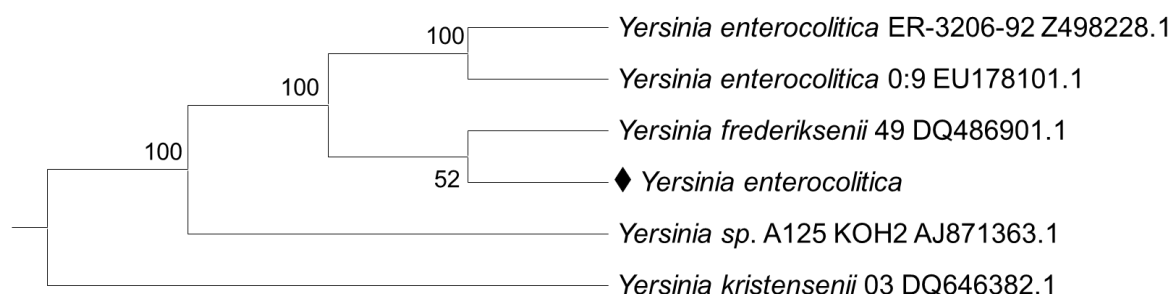


Figura 35. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Yersinia enterocolitica* (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de accesoión precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 100 en la rama que corresponde a la especie *Yersinia enterocolitica* cepa ER-3206-92 indicando una excelente robustez, aunque también la correlaciona con *Yersinia frederiksenii* 49, *Yersinia kristensenii* 03 y *Yersinia sp.* A125.

Para esta cepa se obtuvieron altos porcentajes de identificación así como congruencia entre ambos métodos y la clasificación del Cepario.

En la bibliografía se describe a *Serratia marcescens* como bacilos cortos rectos Gram-negativos (Holt *et al.*, 2000), el análisis microscópico de la misma determinó que cumplía con esta característica (tabla 9). Esta bacteria se describe como anaerobia facultativa que fermenta la glucosa con producción de ácido y a veces gas, es oxidasa negativa y catalasa positiva, la producción de indol es negativa, Voges-Proskauer y citrato positiva, la prueba de rojo de metilo varía, y ornitina-descarboxilasa descaboxilasa y lisina-descarboxilasa descaboxilasa positiva, así como arginina desdhirolasa negativa. No produce H₂S, no hidroliza la urea, no reducn los nitratos y no utiliza el malonato. Usualmente hidroliza la gelatina. Los carbohidratos que usualmente fermenta son L-arabinosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, salicina, sacarosa y trehalosa (Holt *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas concuerdan con lo descrito, exceptuando la fermentación de arabinosa, que únicamente es positiva en el 19% de los casos. La cepa fue identificada fenotípicamente como *Serratia liquefaciens* con un 76.2% de identidad, correspondiente a una muy buena identificación de género (tabla 10). Sin embargo, existe ambigüedad en la especie, de acuerdo al sistema API 20E es más probable que sea *Serratia liquefaciens* con 76.2% y para *Serratia marcescens* 23.7%, debido a que sólo el 19% dan positiva la prueba de fermentación/oxidación de arabinosa. Al realizar la identificación *in silico* de la secuencia obtenida del gen ARNr 16S, se identificó con un 98% de homología para el taxón *Serratia marcescens* cepa MH6 (tabla 11). Dicho resultado es consistente con la identificación fenotípica.

La Figura 36 corresponde al árbol filogenético que se construyó para esta cepa.

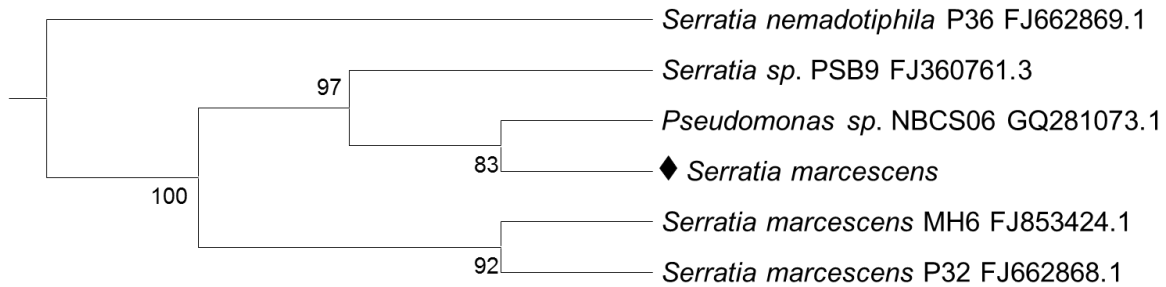


Figura 36. Árbol filogenético de la secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Serratia marcescens* (rombo) y las secuencias parciales de las cepas con mayor similitud depositadas en la base de datos de NCBI. El número de acceso precede al nombre de cada una de las secuencias de referencia.

Con el programa para la construcción de dicho árbol filogenético se obtuvo un valor de *bootstrapping* de 92 en la rama que corresponde a la especie *Serratia marcescens* cepa MH6 indicando una buena robustez. Sin embargo, la relaciona con otras cepas del género *Serratia* (*S. nemadotiphila* P36) Y *Pseudomonas* sp. NBCS06, aunque de manera general se observó que la identificación molecular aseguró la especie *S. marcescens* como la más parecida a la secuencia obtenida de esta.

6.6. Árbol filogenético general de los microorganismos Gram-negativos.

En la figura 37 se observa el árbol filogenético general, que incluye todas las secuencias de las cepas analizadas y algunas bacterias de referencia obtenidas del NCBI que se utilizan con el fin de observar las relaciones filogenéticas que estos microorganismos presentan.

Se puede observar que los géneros de bacterias coliformes (*Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*) se encuentran relacionados de manera muy cercana, ya que son microorganismos muy afines filogenéticamente.

Se observa que los géneros de *Salmonella* se encuentran en todos los casos muy emparentados entre sí, de la misma forma, se observan en el mismo ramal que *Shigella sonnei*, ya que su relación es muy estrecha; es notorio que el género *Escherichia* también es cercano a los géneros de *Salmonella* y *Shigella*, ya que filogenéticamente se encuentran altamente relacionados.

Es importante señalar que los géneros *Pseudomonas*, y *Vibrio*, son los más lejanos al resto de las bacterias, ya que no pertenecen a las enterobacterias como el resto de las cepas. Las cepas del género *Proteus* y *Yersinia enterocolítica* CFQ se poseen similitudes filogenéticas mas cercanas.

En general el árbol presenta valores altos de bootstrapping para varias cepas, indicando robustez. Sin embargo, con otras cepas ocurre lo contrario, ya que existen valores bajos de bootstrapping. Esto también está relacionado con el hecho de que son bacterias de diversas familias, lo cual las aleja desde el punto de vista filogenético.

Este árbol muestra congruencia con los árboles individuales mostrados anteriormente. La asociación de las cepas en cuestión en el árbol general, coincide con la descripción bibliográfica.

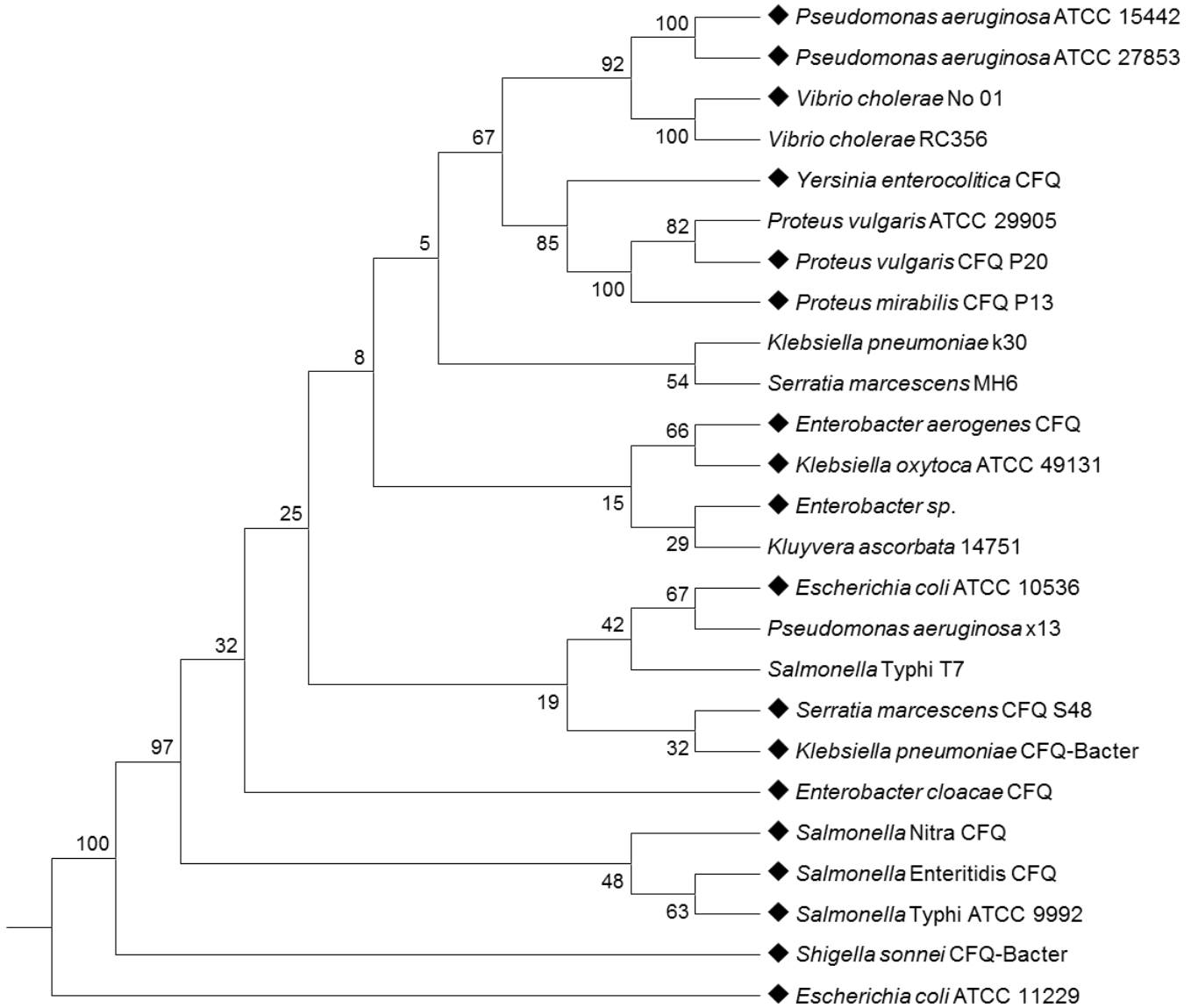


Figura 37. Árbol filogenético general con todas las secuencias parciales de ADN ribosomal 16S de las cepas estudiadas (rombos) y las secuencias parciales de cepas de referencia con mayor similitud obtenidas del NCBI.

7. Conclusiones

En cuanto a la identificación fenotípica, se observó correlación entre las características morfológicas, microscópicas y bioquímicas encontradas con lo reportado en la literatura. La caracterización genotípica basada en la técnica de PCR demuestra ser un instrumento de tipificación más discriminativo al identificar género y especie de manera más constante para la mayoría de las cepas empleadas.

Aunque las técnicas de caracterización genética proporcionan un tipo de identificación más confiable, las pruebas fenotípicas tienen un rol muy importante en la identificación; en los estudios taxonómicos, la información de los atributos tanto fenotípicos como genotípicos son de suma importancia para tener una identificación confiable.

En el presente trabajo se demostró que el uso de la información que los métodos fenotípicos y genotípicos brindan, asegura la identidad de las cepas estudiadas.

8. Perspectivas

Se sugiere realizar un segundo estudio en el caso de *Serratia marcescens* CFQ S48, en el cual se encontró discrepancia entre la identificación fenotípica y genotípica a nivel de especie.

Reclasificar en el Cepario microorganismos como *Escherichia coli* ATCC 10536 cuyo género y especie discrepó con ambos métodos del género y especie que mantiene el Cepario en su clasificación.

Realizar una segunda fase de identificación, para la cual se utilicen cebadores específicos para el grupo de bacterias en los casos en que se obtuvieron resultados ambiguos tanto para la aproximación fenotípica como genotípica.

9. Bibliografía

Ayres J., Mundt J., and Sandine W. (1980). *Microbiology of Foods*. Freeman. USA.

Blackburn C. (Ed.) (2006). *Food spoilage microorganisms*. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, CRC. England. 507-530, 624-659.

Borneman J., Skroch P., O'Sullivan K., Palus J., Rumjanek N., Jansen J., and Nienhhius J. (1996). Molecular microbial diversity in an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1935-1943.

Braude A. (1984). *Microbiología clínica*. Médica Panamericana. México. 321-327.

Cervantes A. (2010). Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y por análisis de secuencias del gen ribosomal 16S. Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM. 172 p.

Conca, R. (2008). Aislamiento e identificación de cepas de bacterias lácticas productoras de nuevos polisacáridos extracelulares del pulque. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 41-44.

Downes F., and Ito K, (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, USA. 345-362.

Doyle M., Beuchat L., and Montville T. (Eds.) (2001). *Food Microbiology. Fundamentals and frontiers*. 2nd ed. American Society for Microbiology Press. USA. 250-275; 775-782.

Escalante A., Rodríguez M., Martínez A., López-Munguía A., Bolívar F., and Gosset G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235: 273-279.

Escalante A., Wachter C., and Farrés A. (2001). Determination of lactic acid bacteria diversity present in pozol, a Mexican traditional fermented dough, determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 21-31.

Escalante, A., Giles-Gómez M., Hernández G., Córdova M., López-Munguía A., Gosset, G. and Bolívar F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 126-134.

Garrity G., Bell J., and Lilburn T. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Bergey's Manual Trust, 2d ed., USA: 93, 94, 177-181, 186-188, 192-194.

Hanson M., and Brinton C. (1998). Identification and characterization of *E. coli* type-1-pilus tip adhesion protein. *Nature*, 332: 265-268

Holt J., Krieg N., and Stanley J. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins, 9th ed., USA. 1-21; 326-335

Hopwood, C. (1989). *Genetics of bacterial diversity*. Academic Press limited, London. 200-232.

Janda A., (2005). The Enterobacteria. American Society for Microbiology, USA, 123-148.

Jay M., Loessner M., and Golden D. (2005). Modern food microbiology. 7th ed. edición. Springer. USA. 14-15; 533-538.

Li Y., Cao B., Liu D., Gao Q., Peng X., Wu J., Bastin D., Feng L., and Wang L. (2009). Molecular detection of all 34 distinct O-antigen forms of Shigella. Journal of Medical Microbiology 58: 69-81

Lozano M. (2007). Análisis de la diversidad de bacterias Gram-positivas presentes en aguamiel y en el inicio de la fermentación del pulque, por técnicas microbiológicas y moleculares. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 36-39.

Luangsakul N., Keeratipibul S., Jindamorakot S., and Tanasupawat S. (2009). Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for Chinese steamed buns in Thailand. LWT. Food Science and Technology 42:1404–1412.

Madigan M., Martinko J. y Parker J. (2003). Brock Biología de los Microorganismos. Pearson Educación. España.

Pavan M., Franco R., Rodríguez J., Gadaleta P., Abbott S., Janda J., and Zorzópolos J. (2005). Phylogenetic relationships of the genus *Kluyvera*: transfer of *Enterobacter intermedius* Izard *et al.*, 1980 to the genus *Kluyvera* as *Kluyvera intermedia* comb. nov. and reclassification of *Kluyvera clochleae* as a later

synonym of *K. intermeda*. International journal of systematic evol. Microbiology, 55: 473-442

Prendergast D., Duggan S., Gonzales-Barron U., Fanning S., Butler F., Cormican M., and Duffy G. (2009). Prevalence, numbers and characteristics of Salmonella spp. on Irish retail pork. International Journal of Food Microbiology 131, 233-239.

Roberts, Baird-Parker, Tompkin (2003) Microorganisms in foods 5. Characteristics of microbial pathogens. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London. 531-542.

Tortora G., Funke B., and Case C., (2004) Microbiology. an introduction. 8th ed. Pearson, USA. 285-292.

Weisburg, W., Barns S., Pelletier D., and Lane D. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697-703.

Sitios electrónicos

www.biochem.umd.edu 20 julio de 2009.

<http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.html>; 08 de agosto de 2010

www.mobio.com 17 de septiembre de 2010.

www.invitrogen.com 20 de octubre de 2009.

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. National Center for Biotechnological Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Basic Local Alignment Search Tool.

evolution.genetics.washington.edu/phylip.html. PHYLIP-v. 3.68.

www.megasoftware.net. MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

10. Apéndice I

Perfiles bioquímicos para las cepas estudiadas, obtenidos a través de la galería API 20E

Cepa	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>E. aerogenes</i> CFQ	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>E. cloacae</i> CFQ	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i> ATCC 10536	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>E. coli</i> ATCC 11229	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>Enterobacter</i> sp.	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>K. oxytoca</i> ATCC 49131	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i> -CFQ	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. mirabilis</i> CFQ P13	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. vulgaris</i> CFQ P20	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>S. Enteritidis</i> CFQ	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
<i>S. marcescens</i> CFQ S48	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>S. Nitra</i> CFQ	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>S. sonnei</i> CFQ	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>S. Typhi</i> ATCC 9992	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i> No O1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Y. enterocolitica</i> CFQ	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-

Apéndice II. Secuencias parciales del ADNr 16S de la cepas empleadas

>10576

```
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGG
CTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGAC
AAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTT
AAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATC
CAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTG
CCAGCGGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGA
GAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCA
ACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCACAATGCTACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTA
ACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAGTCGTAACAAGGTAGCTTC
CGTAAACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTTCCTGAATGGTAAGGCCCTCCGAGAGATAAGCTAAA
TATTATGATTTGCTAACACTACATGAGTGGATGGCGGGTATACGAGGCCGGAAAGTAATATCGA
ATGATACTGATCACGATATCTGCCAGTTCATTACTATAG
```

Figura 38. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Enterobacter aerogenes* CFQ empleando el programa BioEdit.

>10582

```
CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGG
GAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGG
TGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGAC
GCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGTCGACTTGGAGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTTATTTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTA
GCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGT
GTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCG
GCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA
TCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTC
GCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAAGTAGCTTAACCTTCGGGAG
GGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCTCACTCACGCTC
AGAAAATAAAAAGTTCGAGAGGGGTGAGCGCCATCAGGAGTCAGACACATACTTGTGTTGCAACC
ACTCCAAGAGAGAGCGGGGGGAGAAGACGGGTACGATATCCATAACAGACAGTGTCAAG
```

Figura 39. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Enterobacter* sp. CFQ FASTA empleando el programa BioEdit.

>10588

TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACG
CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTC
CAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAAC TCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
TGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGC
CGGGAAC TCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC
ATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGC
GAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAA GAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGG
CGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGT GAGTCATAACAAGGTAGCCCCCGTCCAGGTCAA
ATAAAAAAAAAAAGATCGAAGATGGTAGCGGCCATCTGATGGTTAAAATAGGACATATATAGA
ACTCAGTCACTATA

Figura 40 .Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Enterobacter cloacae* empleando el programa BioEdit.

>10575

CGGGCTAAACGACCGGCGTTTGTTAATCGAAGTATACCCCGGGCTCACCTGGGAACTGCTTTGA
AACTGGCAGCTTGAGTCTCGTAAAGGGGGGTAGAATCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAG
ATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAA ACTGACGCTCAGGTGCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTATTTGGAG
GTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCCGAGCTAACGCGTTTAATAGACCGCCTGGGGAGTACGGC
CGCAAGGTTAAAAC TCAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAT
TTTATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACTGGTGGCATT CAGAGAAATTAACAAAATGCTTTGGT
GCCTTCGGGAACCTGAAACAAGGGCTGCATGGGTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGGT
AAGTCCC GCAAGAGCGCAAACCTTTTCTTTTTTTGCCCGCGGGTCGGCGGGGACTCAAGGAAAT
GCCATGAAA ACTGGAGGAAGGGGGGATGGGGCAGTCATATGGGCCTTACGATGGGTAGACAAG
AGCTACATGGCAATACAAAAAAAAAAGACTCCCCAGACAAGCAAAAACATAAAAATGCATAAA
CCGATTGGGGCTGAACTCAACCATAAAAACGAATCGCAGTATAGTAATTAATGTTTCATGAAAC
CTTCCTGGCCTGGTAAACCCCGACCACCGAGGAGGGGTGGCAAAAAAAGGGGGGTACCTC
GAAAGGGGCTTCCCCTTTTAAGATGGTGGGGAAACGAAAAGGGAACCCGGTAAAAAATAGA
AAGTGGAATAGTAATATGATTTTTGAGTGGGATAAATAATAAGTGATACACACAGATTGATGCG
AGAGACTAGTGTAGAATCA

Figura 41. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Escherichia coli* ATCC 10536 empleando el programa BioEdit.

>10589

CTTATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCC
GGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTG
GACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTGACTTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC
GTAAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTGAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT
TGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTG
CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGTAGCTT
AACCTTCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAGGTAGCC
CCTCGCCAGCCAAAAAAGAAAAGGTTTCAGAGTGAGAAGCGTCCTACGAGGGTAGCTCATAGT
ATTATGCAAGCATCACTAGATGTGACTGAGAGATAGTAA

Figura 42. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Escherichia coli* ATCC 11229 empleando el programa BioEdit.

>10581

GGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGA
ACTGCATTTCGAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGC
TCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA
TGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCT
GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCA
GAGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAACCTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTT
GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCC
GGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG
AGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCACTCGACTCCATGAA
GTCGGAATCGCTAGTATCGTAGATCACAATGCTACGGTGAACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACATGGGGTGGTTTGCAAAAAAATAAGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGGGGCTT
ACACTTGTGATTATGACTGGGGTGAATCCATAACAGGTAGCCCTCGGACACCCAAAAA
AAAAA

Figura 43. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Klebsiella pneumoniae* CFQ empleando el programa BioEdit.

>10577

```
GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTC
AACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAA
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCT
GTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGT
CGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCACA
GAATTTGGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACCCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAG
CGATTCGGTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAG
CGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCACAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGGAGTGGGTTGCAAAAAGTAGGTAGCTTACCCT
TCGGGAGGGCGCTTACCCTTTGTGATTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCT
AGATCAGTACAAAAAATAA
```

Figura 44.Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Klebsiella oxytoca* ATCC 49131 en formato FASTA empleando el programa BioEdit.

>10579

```
TTATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCG
GGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTTGTAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTC
CAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCG
TTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGACA
TCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGT
TGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAAAA
GAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTG
CAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGT
TCCCGGCCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCT
TAACCTTCGGGGGGCGCTTACCCTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTGACAAGGTAC
CCCCGGTCCACTAAAAACAAAAAAGGTACAGGTGTAGACGCCCTCCATAGGTTAGGTACTT
ACATATATGATACACATCACAGAGTTGTGCAGGCGTGAATGAAGAGATGGGGACGTTTTTACCG
TTATCTTTTTTGTAGTCCGATATTACCG
```

Figura 45.Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Salmonella Typhi* ATCC 9992 empleando el programa BioEdit.

>10585

GATTGTATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATC
CCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCC
CTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAA
CGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT
GACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTTGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCT
TTGTTGCCAGCGATTAGGTTCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATA
CAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGA
GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGT
AGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTGTGATTTCATGACTGGGGGTGAAGTCGTAACAA
CGTAGCCTCCCGTCCAACCAAAAAAA

Figura 46. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Salmonella* Enteritidis CFQ empleando el programa BioEdit.

>10580

GATTCTGGGCGTAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC
TGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTTGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGA
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCCGCACAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTACATCCACAGAA
GAATCCAGAGATGGATTTGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGG
TTAGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGA
CCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCC
TTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAGAAGTAGGAAGCTTAACCTTCGG
GAGGGCGCTTACCACCTTGTGATTTCATGACTGGGGGTGAAGTCGTAACCAGGGTAGCCCTCAGT
CAGTCAAAAAAAAAAAAAA

Figura 47. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Salmonella* Nitra CFQ empleando el programa BioEdit.

>10583

TGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACG
CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
ATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGC
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACGGAACCTTT
CAGAGATGAAAAGGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTG
TTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGG
CCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT
CATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCG
CGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA
CACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTACCTTCGGGAGGG
CGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGGTAGGCCTCCGTCAGCCA
AAGGAAAAAAAAAAG

Figura 48.Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Shigella sonnei* CFQ empleando el programa BioEdit.

>10574

TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGC
TTAACTTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACA
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCTGTAACGATGTGATTTAGAGGTTGTGGTCTTGAACCGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAA
ATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCA
GCGAATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCC
TCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCC
AGCACGTAATGGTGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAG
AAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGAACTCATAAAGTCTGTCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAA
CTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTATGTAGCTTAA
CCTTCGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCTCC
GTCCATCTCAAAGAAAAAAAAAAGGTAAGGTTAAGCGCCTCCCGAAGTAAGCTACTACT
GCTTTGGCACCATAGCGGTAGGGACGGAGGTGTGTAGAGGGCGGGGACGTAATCCGGAACGT
TTATATTCATAGTAGCTGATCCAAAGTCAGTGAAATCAAGATGCAGAAAATCCGGTTACGGCA
CTGAC

Figura 49.Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Proteus mirabilis* CFQ P13 empleando el programa BioEdit.

>10573

CGGAATTACTGGGCGTAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTT
AACTTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAA
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCT
GTAAACGATGTTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTTGAAGTGTGGCTTCTGGAGCTAACGCGTTAAATC
GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGCG
AATCCTTTAGAGATAGAGGAGTGCCTTCGGGAACGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
GCTCGTGTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGC
GCGTAATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGAGAAG
CGACCTCGGAGAGCAAGCGAACTCATAAAGTCTGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCT
TCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCTCTC
GGCCAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTCCAAGGGGTAGGCGCCTTCACGAAGATAAGCGACCT
ACTTCATTGCACCAAATCCCCAGAGGGGACGGAGGGTGTGTACAGGACGGGCAAGTAATACTGC
TGAAGCAGACTCCAGTACATAGCGATTCACTCATGAGATGCGAGATTGAGAATCAATCAGAAGC
ATGAAAGTATGTAAGATGCATTGACTGCTAGCCGGGGCTGCAGCTTGCTTTAGTGTATCAGCTC
ACATGTAGAT

Figura 50. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Proteus vulgaris* CFQ P20 empleando el programa BioEdit.

>10586

ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC
CTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGAC
TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGA
CCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAA
CTTTCCAGAGATGGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCT
CGTGTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGT
TCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACATCAAG
TCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAC
CTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTACGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCTACT
CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCACAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCCCGTCCACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAAAAAAAGGAGCTTAAGCTCGGGAGG
GGTACCCTTTGTGATTTATGACCGGGGGGGGAAGCGGAACAGGGGGGCCTCGGTCACTAAAA
AAAAAAAAAAAAATCTTAGTAATGGGACACAGCATAGAACAAGAGAAAAACAACCTACATAA
TTAGGACGAAATTACAAGGATAGGAAATAGAGCAGATAATAATAGTCCCTGCGATAGTACGTA
GAGA

Figura 51. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Serratia marcescens* CFQ S48 empleando el programa BioEdit.

>10572

AATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
CCTGGGAACTGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATA
CTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCG
ACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGA
ACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAG
CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCA
CCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTGCC
AAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGA
CTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCGCA
AGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTTATGACTGGGGTGAATTCGTAACAAGGTAACCCTCCAA
TCAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATAATTCGTGGAAACCACACCTATGCAGATACAAAAATACA
AGAAACAAACAATCCATGAATAACAGGAAAAGAGATAAGAGCACGGAAACATATCCACGGACA
ATGCTATATCGCATAACAACAGTTACAATCTCCACGATCG

Figura 52. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 empleando el programa BioEdit.

>10578

GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTC
AACCTGGGAACTGCATCCAAAACACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGA
TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGT
CGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGA
GAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAG
CACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTG
CCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC
GACTGCGTGAAGTTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCC
GCAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCTCTC
GTCAATCAAAATAAAAAAAGCTAGATCGTGGTTACCGTCCCCTAGCGGTAGACTAGCTAGATC
TGAGTACCGACTTCCTATAGGTGAAGATCGCTCGTATCAGGGCTGGGACCTATAGACGGTACCA
TTC

Figura 53. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 empleando el programa BioEdit.

>10584

GGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCTGGGCTC
AACCTAGGAATCGCATTTGAAACTGACAAGCTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTACAGGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGA
TACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGACCTAGAGGCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGT
AGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGA
GAATCTAGCGGAGACGCTGGAGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCGCATGGCTGTCGTC
GCTCGTGTGTAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGC
ACGTAATGGTGGGAACCTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGT
CAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAGAGGGCAG
CGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCACAAAGTACGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC
GACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCACAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAGAAGCAGGTAGTTAACCT
TCGGGAGGACGCTTGCCTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCCTAC
GTCCACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCCCAAAAGGGCAAGGGTCTGCCGAAGGTTTAACTAAGTGC
TCTGTGCAGTCACATCAGATGTGTGACGGTGGTGTGGTAAAGGGCGGAGACGTAATCTCGGACA
GTAGAATTGTCATTACA

Figura 54. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Vibrio cholerae* No O1 empleando el programa BioEdit.

>10587

TTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACG
TGGGAACGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAG
CGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACT
GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGA
CCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCG
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAA
CTTAGCAGAGATGCTTCGGTGCCTTCGGGAACGTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGC
TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCAC
GTCATGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCAGATACAAAGTGAAGCG
AACTCGCGAGAGCAAGCGGACCACATAAAGTCTGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGA
CTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTC
GGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAGGGAGCCCTCCAGC
CATCTCAAAAAAAAAACAATAGTTAAAAAATGAATCCGTGATGACAAAAATTATCTACTACATAGT
AAGTTCATACTACAGCT

Figura 55. Secuencia parcial del ADNr 16S de la cepa *Yersinia enterocolitica* CFQ empleando el programa BioEdit.