



CIAD

CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION
Y DESARROLLO A.C.

TESIS

**Caracterización e identificación fenotípica, molecular y patogénica
de bacterias aisladas de tilapias (*Oreochromis niloticus*)
cultivadas en Sinaloa**

POR

Jose Ulises Alcaraz Saucedo

Tesis aprobada por la
UNIDAD MAZATLÁN
EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestría en Ciencia

Mazatlán, Sinaloa, México.

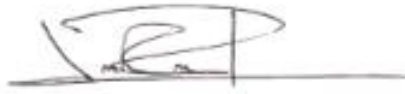
Diciembre del 2010

APROBACIÓN

Los miembros de este comité designado para revisar la tesis de Jose Ulises Alcaraz Saucedo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Manejo Ambiental.



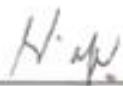
Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala
Director de Tesis



Dra. Sonia Araceli Soto Rodríguez



Dra. Silvia Alejandra Garcia Gasca



Dr. Emma Josefina Fajér Ávila

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso al Director del Centro o Jefe del Área correspondiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora C.P. 83000 México, para citas o consultas más completas con fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.

La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del director.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General del CIAD, A.C.

DEDICATORIA

A Dios, por ser la gran fuerza en el universo que me motiva.

A mí Mamá, por ser mi principal motivo de superación y fuerza para seguir adelante.

A mis hermanos y abuela; parte fundamental de mi vida.

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar estudios de maestría y la estancia de investigación en la Universidad de Santiago de Compostela, España.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, unidad Mazatlán, por las facilidades y el apoyo otorgado para la realización de la maestría.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la culminación de dicha tesis.

Al Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, por su apoyo y dirección de esta tesis.

A la Dra. Sonia Soto Rodríguez, Silvia Alejandra García Gasca, Emma Josefina Fajér Ávila por su apoyo, y asesoría en el presente trabajo.

A las técnicas del laboratorio de Microbiología y de Biología Molecular, M.C. Carmen Bolán Mejía, M.C. Rubí Hernández, por su enseñanza, sus consejos y su paciencia.

Al B.P. Luis Adrián Gámez Alejo, a I.P. Francis Isela Marrujo López y M.V.Z Rodolfo Lozano Olvera por su ayuda en los diferentes bioensayos así como sus acertados consejos y observaciones.

Al grupo de investigación del Departamento de Microbiología y Parasitología. Centro de Investigaciones Biológicas (CIBUS)-Facultad de Biología, Santiago de Compostela, España. Al Dr. Jesús López Romalde, así como a su grupo de estudiantes; Sabela, Ana Belén, Noe, Alejandra, Asmine, Carmen, Mari y Javier por haberme hecho parte de su equipo de trabajo en mi estancia.

A la M.C Itzel Sifuentes Romero por sus consejos y su amistad.

Al Lic. Jorge Alberto Durán Niebla por su asesoría técnica durante el desarrollo de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de maestría, que de alguna u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis, Martha Olivia, Martha Daniela, Marco y Mauricio,

A mis amigos Alexia, Carmina, Carolina, María del rayo, José Ángel, Víctor.

Y por último y no menos importante a la IBQ Nallely Cázares y IBQ Karla Aguilar por su valiosa ayuda en la realización de esta tesis.

CONTENIDO

Índice de tablas

Índice de figuras

Resumen

I. INTRODUCCIÓN.....	XII
II. ANTECEDENTES	17
2.1 Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	177
2.1.1 Hábitat y biología.....	17
2.1.2 Distribución geográfica.....	177
2.1.3 Sistemas de producción.....	188
2.1.3.1 Estanques.....	188
2.1.3.2 Jaulas flotantes.....	18
2.2 Microbiota de tilapias vivas.....	19
2.3 Enfermedades bacterianas.....	222
2.3.1 <i>Aeromonas</i> móviles (septicemia).....	222
2.3.2 <i>Pseudomonas</i>	244
2.3.3 Vibriosis.....	244
2.3.4 Estreptococosis.....	255
2.3.5 Estafilococosis.....	288
2.3.6 Micobacteriosis.....	288
2.3.7 Edwardsielosis.....	300
2.3.8 Columnaris.....	311
2.3.9 Piscirickettsiosis.....	322
2.3.10 Otras enfermedades bacterianas.....	333
2.4 Identificación y caracterización de agentes potencialmente patógenos. ...	344
2.4.1 Técnicas basadas en características fenotípicas.....	344
2.4.2 Métodos moleculares.....	355
2.4.2.1 Técnicas para identificación. Secuenciación.....	355

2.4.2.2 Técnicas de caracterización basadas en la PCR.	366
2.5 Factores de virulencia.....	377
III. OBJETIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.0
3.1 Objetivo General.	400
3.2 Objetivos Particulares.....	400
IV. METODOLOGÍA.	411
4.1 Obtención de los aislados.....	411
4.2 Purificación y preservación de los aislados.....	411
4.3 Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos.....	422
4.3.1 Métodos microbiológicos convencionales.	422
4.3.1.1 Tinción Gram.	422
4.3.1.2 Oxidasa.	422
4.3.1.3 Catalasa.	433
4.3.1.4 Voges-Proskauer (VP).	433
4.3.1.5 Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS).....	444
4.3.1.6 McConkey.	444
4.3.1.7 Oxidación-Fermentación (O-F).....	444
4.3.1.8 Motilidad.	455
4.3.2 Sistema miniaturizado API 20E.	455
4.4 Caracterización genómica de los aislados bacterianos.	466
4.4.1 Caracterización por rep-PCR.	466
4.4.1.1 Extracción de ADN.	466
4.4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos repetidos (rep-PCR).....	477
4.4.1.3 Electroforesis.	488
4.4.2 Identificación molecular.....	49
4.4.2.1 Extracción de DNA.	49
4.4.2.2 Amplificación del gen 16S.	49
4.4.2.3 Purificación del producto de PCR.	500
4.4.2.4 Reacción de secuenciación.....	511
4.5 Estudio de potenciales factores de patogenicidad extracelulares.....	522

4.5.1 Obtención de los productos extracelulares (ECP).....	522
4.5.2 Determinación de las actividades enzimáticas presentes en los ECP.	533
4.5.2.1 Sistema de determinación en placa.....	533
4.5.2.2 Valoración de la actividad proteolítica sobre el sustrato azocoll.	544
4.5.2.3 Ensayo de citotoxicidad.	544
4.5.2.4 Actividad hemolítica de los ECP.....	555
4.6 Patogenicidad y factores de virulencia.....	555
4.6.1. Preliminares.	555
4.6.1.1. Infecciones experimentales con ECP.....	555
4.6.2 Infección experimental en tilapias (<i>O. niloticus</i>) y ECP de cepas potencialmente patógenas.....	577
4.6.3 Infecciones experimentales con células y ECP de la cepa C510m (<i>Aeromonas hydrophila</i>).....	578
V. RESULTADOS.....	59
5.1 Caracterización e identificación de los aislados.	59
5.1.1 Caracterización fenotípica.	59
5.1.2 Identificación fenotípica.....	600
5.1.3 Caracterización genómica.	611
5.1.3.1 Análisis filogenético.	611
5.1.3.2 Identificación.....	633
5.2 Estudio de potenciales factores de patogenicidad extracelulares.....	70
5.2.1 Cuantificación de proteínas y determinación de la actividad proteolítica presente en los PEC.....	71
5.2.2 Actividades enzimáticas de los PEC.....	73
5.2.2.1 Sistema de determinación de actividades enzimáticas en placa.	73
5.2.2.2 Ensayo de citotoxicidad.	755
5.2.2.3 Actividad hemolítica de los PEC.....	777
5.3 Patogenicidad y factores de virulencia.....	788
5.3.1 Ensayos preliminares.	788
5.3.1.1 Infecciones experimentales con PEC en lenguados (<i>Solea vulgaris</i>)... 788	
5.3.2 Infecciones experimentales con células y PEC de la cepa <i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i> (C5 10m) en tilapias (<i>O. niloticus</i>).....	788

5.3.3 Infección experimental en tilapias (<i>O. niloticus</i>) y PEC de cepas potencialmente patógenas.....	80
VI. DISCUSIÓN.	811
6.1 Identificación de los aislado bacteriano.	811
6.2 Análisis de potenciales factores de virulencia extracelulares.	833
6.3 Infección experimental en tilapias (<i>O. niloticus</i>) y PEC de cepas potencialmente patógenas.	877
VII. CONCLUSIONES.	92
VIII. RECOMENDACIONES.	9293
IX. LITERATURA CITADA.	944
ANEXOS.	12121

Índice de tablas

Tabla		Página
1	Iniciadores empleados.	50
2	Cepas a ensayar en los lenguados (<i>Solea vulgaris</i>).	56
3	Diseño experimental para la evaluación de cepas potencialmente patógenas y sus ECP en tilapias <i>O. niloticus</i> .	58
4	Porcentaje de prevalencia de los géneros y especies bacterianas identificadas.	60
5	Comparación de la Identificación fenotípica contra la identificación genotípica.	64
6	Porcentaje de prevalencia de las cepas identificadas.	67
7	Porcentaje de prevalencia de las cepas identificadas por presa estudiada.	68
8	Especies estudiadas y su fuente de aislamiento.	70
9	Cuantificación de proteína y actividad proteolítica en los PEC obtenidos.	72
10	Actividades enzimáticas detectadas en los PEC de los diferentes aislados. Ensayo en placa	74
11	Actividad citotóxica de los PEC de los diferentes aislados sobre la línea células HeLa.	76
12	Actividad hemolítica de los PEC estudiados.	77

Índice de figuras

Figura		Página
1	Acuarios experimentales de lenguados (<i>Solea vulgaris</i>).	56
2	Inyección intraperitoneal de lenguados.	56
3	Árbol filogenético basado en el método del vecino más cercano (neighbor-joining) usando las secuencias del anexo 3. La distancia fue obtenida empleando el modelo de Jukes y Cantor. El árbol filogenético se realizó empleando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Ver. 4.1, a) γ -protobacterias, b) Gram postivass y c) Gram negativas.	62
4	Dendrograma a partir de repPCR de los aislados de tilapias (<i>O. niloticus</i>). La similitud entre los patrones de bandas fue calculada empleando el coeficiente de similitud de Jaccard. El dendrograma fue construido con el algoritmo de Ward (optimización 0.35, 1.82%). El número indica la asignación que se le dio al cluster (valido <42% de similitud). * indica las cepas identificadas mediante la secuenciación del gen 16S RNAr.	66
5	Porcentajes de prevalencia de los géneros identificados con respecto a las presas estudiadas.	69
6	Correlacion entre la concetración de proteínas y la actividad proteolítica.	71
7	Ensayo de citotoxicidad de células HeLa. A) Control negativo (Células HeLa+PBS), B) Destrucción total del tapiz celular por <i>Pseudomonas mosselii</i> (C4 1m).	75
8	Promedio de mortalidad en tilapia (<i>O. niloticus</i>) con células y PEC de <i>Aeromonas hydrophila</i> (C5 10m).	79
9	Mortalidad en tilapia (<i>O. niloticus</i>) con células y ECP de <i>Aeromonas hydrophila</i> (C5 10m).	80

RESUMEN

Se realizó la identificación de 89 aislados bacterianos obtenidos de la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM) provenientes de tilapias (*Oreochromis niloticus*), dichos aislados fueron obtenidos de hígado, cerebro, riñón y bazo de tilapias sanas y enfermas provenientes de tres presas del estado de Sinaloa; presa Adolfo López Mateos en Badiraguato, presa Sanalona en Culiacán y Dique IV en Mazatlán, durante el periodo comprendido entre el 9 de febrero al 25 de mayo de 2009. El estudio se realizó empleando dos técnicas de tipificación molecular: rep-PCR y secuenciación del gen 16S ARNr, así como el empleo de diez perfiles fenotípicos con el objetivo de estudiar la composición de la microbiota de la tilapia. Los resultados empleando rep-PCR produjeron un dendrograma con 15 clados compuestos por 37 cepas y 40 cepas que no formaron ningún clado, las cepas seleccionadas se les secuenció el gen 16S ARNr; se identificaron 27 especies diferentes: *Acinetobacter* sp. (tres cepas), *Acinetobacter junii* (una cepa), *Aeromonas hydrophila* (cuatro cepas), *Aeromonas jandaei* (tres cepas), *Aeromonas* sp. (tres cepas), *Aeromonas veronni* (tres cepas), *Bacillus* sp. (tres cepas), *Brevibacterium casei* (una cepa), *Deftia tsuruhatensis* (dos cepas), *Enterobacter hormaechei* (tres cepas), *Edwardsiella tarda* (dos cepas), *Microbacterium paraoxydans* (seis cepas), *Microbacterium esteraromaticum* (una cepa), *Micrococcus yunnanensis* (dos cepas), *Oceanobacillus oncorhynchi* (una cepa), *Plesiomonas shigelloides* (12 cepas), *Proteus penneri* (dos cepas), *Pseudomonas alcaligenes* (11 cepas), *Pseudomonas alcaliphila* (una cepa), *Pseudomonas anguilliseptica* (dos cepas), *Pseudomonas mosselii* (cuatro cepas) *Pseudomonas monteii* (una cepa) *Pseudomonas* sp. (una cepa), *Rheinheimera* sp. (una cepa), *Soonwooa buanensis* (una cepa), *Sphingobacterium* sp. (dos cepas) y *Klebsiella pneumoniae* (una cepa). Se realizó extracción de los productos extracelulares (PEC) de 27 de las cepas identificadas, las bacterias del género *Aeromonas* obtuvieron un nivel de actividad proteolítica más alto, observándose resultados positivos en todas las muestras para las actividades gelatinolítica, DNAasas y lipasa. Las cepas de *Microbacterium paraoxydans* (C2 6m) y *Pseudomonas moselii* (C4 1m), presentaron sólo actividad en placas con gelatina como sustrato. En el resto de las muestras analizadas no fue posible correlacionar los niveles de actividad proteolítica con la hidrólisis de sustratos específicos. Se probaron 12 de las cepas con mayor actividad enzimática, inyectándose en tilapias (*O. niloticus*) vía intraperitoneal. La cepa C5 10m (*Aeromonas hydrophila*) fue la que causó una mortalidad del 100% a una densidad de 1.4×10^8 UFC/ml de células bacterianas vivas y con sus PEC. Otra de la cepa que causó mortalidades con sus PEC fue la cepa C4 1m *Pseudomonas mosselii*, pero la densidad de 1.5×10^8 UFC/ml de células bacterianas vivas no causó mortalidad.

I. INTRODUCCIÓN.

La tilapia (*Oreochromis niloticus*), es un pez del grupo de los teléosteos, orden Perciformes, perteneciente a la familia Ciclidae, sub familia Tilapiinae y género *Oreochromis*. Aunque se conocen más de 100 especies de tilapia, sólo algunas son de importancia a nivel de producción en condiciones controladas de cultivo: tilapia roja, tilapia nilótica, tilapia áurea y tilapia Stirling (Chacón, 2002).

Estos organismos presentan una serie de características biológicas y ecológicas especiales como un rápido crecimiento, resistencia a enfermedades y a condiciones adversas, conversión eficiente del alimento, alta fecundidad, maduración temprana, aceptación de alimentos artificiales, entre otros (Perez, 1998). Su capacidad de producir una alta descendencia a una edad relativamente temprana la hace ideal para su cultivo. La tilapia madura a una edad de dos o tres meses y puede tener crías cada tres o seis semanas, en condiciones óptimas (Perez, 1998).

Las tilapias se encuentran entre las especies de mayor importancia en la acuicultura debido a que tienen una serie de características deseables que las hacen populares entre los acuicultores. Su cultivo es percibido como muy atractivo por aquellos que dictan las políticas agroalimentarias del país y por los inversionistas del sector (Alceste y Jory, 2000). Desde el punto de vista gubernamental, esta actividad económica es significativa para la producción de proteínas, la generación de empleos y la producción de divisas.

Son producidas en países en vías de desarrollo con climas tropicales y subtropicales y responden favorablemente a la aplicación de nuevas tecnologías, tales como el mejoramiento genético y la hibridación (Alceste y Jory, 2000). La producción mundial de tilapia viene prosperando durante la última década, con una producción duplicándose desde 830 mil t en 1990 a 1.6 millones de toneladas en 1999 y más de 2.5 millones de toneladas en el 2005. La estimación del potencial de crecimiento de la producción de tilapia para el

año 2010 era de 2.5 millones de toneladas siendo esta estimación rebasada en el 2005 (Lumpur, 2007).

En el año 2008, la producción de tilapia en México alcanzó alrededor de las 74,847 t, con un valor estimado de 977,217 pesos. De este total, únicamente 3,789 t fueron producidas en sistemas controlados de cultivo y el resto correspondió a pesquerías en cuerpos de aguas continentales. Con respecto a Sinaloa, la producción fue de 6,901 t con un valor estimado de 75,884 mil pesos (CONAPESCA, 2008). En años recientes se ha impulsado la producción masiva de crías 100% machos, a través de diferentes técnicas en las que destaca la reversión sexual por su amplio uso, que consiste en la aplicación de hormonas en etapas tempranas de su desarrollo, aún cuando no se diferencian los tejidos gonádicos para producir poblaciones masculinizadas (Infopesca, 2005).

En términos de producción, las enfermedades infecciosas son la causa principal de las pérdidas económicas en acuicultura debido a la mortalidad de los animales, los costos de los tratamientos y el descenso de la producción. La aparición y desarrollo de patologías infecciosas son el resultado de la interacción entre el microorganismo patógeno, el hospedero y el ambiente (Snieszko, 1973).

Igual que en otros cultivos acuícolas, el de tilapias se ve afectado por las enfermedades (Conroy y Armas, 1997), destacándose entre éstas las de etiología bacteriana, que son responsables de elevadas mortalidades en peces silvestres y cultivados (Paperna, 1996).

Con respecto a la microbiota bacteriana de la tilapia viva, ésta depende de la flora existente en las aguas de donde proviene y varía de acuerdo con el hábitat de la especie, sobre todo con la temperatura, profundidad, grado de contaminación de las aguas y cercanía de la costa (Viquez *et al.*, 2003). Se destaca la presencia de psicrófilos Gram negativos incluyendo *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrionaceae* y

Aeromonadaceae. Entre los Gram positivos existe una proporción variable de *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Corynebacterium* (Gram & Huss, 1996). Las bacterias patógenas o indicadoras de contaminación raramente son encontradas en el pescado recién capturado, a no ser que provenga de aguas excesivamente contaminadas con materia fecal (Viquez *et al.*, 2003).

El papel de estos microorganismos puede variar desde el de un patógeno primario hasta el de un invasor oportunista en un hospedero moribundo, por causa de otra enfermedad (Richards y Roberts, 1978). Muchos de estos organismos patógenos son componentes usuales de la flora bacteriana de ambientes acuáticos, por lo cual es necesario contar con información relativa al tipo y a la diversidad específica de la microbiota de peces sanos y de su entorno, pues muchas de estas bacterias constituyen patógenos potenciales ante una baja de las defensas orgánicas de los peces (Álvarez *et al.*, 2000).

El avance de la biología molecular ha permitido el desarrollo de herramientas que permiten la caracterización e identificación de aislados bacterianos de forma más precisa, aun cuando la caracterización mediante pruebas bioquímicas es utilizada como un complemento.

La secuencia del gen 16S rARN, secuencias de genes constitutivos o “*housekeeping*” son considerados como criterios para la delineación de especies procarióticas (Stackerbrandt *et al.*, 2002). Existen otras técnicas de identificación como las técnicas de amplificación de elementos repetitivos, conocidas genéricamente como rep-PCR, que han sido utilizadas para el estudio de la diversidad de comunidades microbianas, para diferenciar y clasificar cepas muy relacionadas, y para estudios medioambientales y epidemiológicos (Versalovic *et al.*, 1994).

La amplificación por reacción en cadena de la cadena de la polimerasa de fragmentos palíndromicos (rep-PCR) empleando el iniciador (GTG₅) ha sido reconocida como una técnica de alto poder discriminatorio, un bajo costo, un

alto rendimiento con un gran número de aislados y ha demostrado ser una herramienta confiable para la clasificación e identificación de aislados bacterianos procedentes de diversas fuentes (Versalovic *et al.*, 1994; Gevers *et al.*, 2001; Gomez-Gil *et al.*, 2004)

Bajo este contexto, el objetivo principal de este estudio es caracterizar e identificar la composición de la microbiota de tilapias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en tres presas en el estado de Sinaloa: Adolfo López Mateos (Badiraguato), Sanalona (Culiacán) y Dique IV (Mazatlán), así como la determinación de la patogenicidad de algunas de las cepas aisladas mediante la obtención de sus productos extracelulares y el empleo de desafíos experimentales.

II. ANTECEDENTES

2.1 Tilapia (*Oreochromis niloticus*).

2.1.1 Hábitat y biología.

La tilapia (*Oreochromis niloticus*) es una especie tropical que prefiere vivir en aguas someras. Temperaturas inferiores a 11-12 °C y superiores a 42 °C son letales, en tanto que las temperaturas ideales varían entre 31 y 36 °C. Es un omnívoro, que se alimenta de fitoplancton, perifiton, plantas acuáticas, pequeños invertebrados, fauna béntica, desechos y capas bacterianas asociadas al detritus. La tilapia puede filtrar alimentos tales como partículas suspendidas, incluyendo el fitoplancton y bacterias que atrapa en las mucosas de la cavidad bucal, si bien la mayor fuente de nutrición la obtiene pastando en la superficie sobre las capas de perifiton. En estanques, la madurez sexual la alcanzan a la edad de cinco ó seis meses. El desove inicia cuando la temperatura alcanza 24 °C (Lin *et al.*, 1996; FAO, 2010).

2.1.2 Distribución geográfica.

Las tilapias son un grupo de peces de agua salobre, especies originalmente exclusivas de África y de Palestina. Fuera de África, también se encuentran extensamente distribuidas en Centroamérica y Suramérica, Suroeste de India y Sri Lanka y lago Kinneret en Israel (Philippart y Ruwert, 1982). Estos organismos se encuentran en diversos sistemas ecológicos de agua, incluidos los ríos y sus lagunas de lento movimiento, planicies de inundación y pantanos, lagos pequeños, grandes y profundos, aguas termales y aguas salobres (Philippart y Ruwert, 1982; Lowe-McConnell, 2000).

2.1.3 Sistemas de producción.

2.1.3.1 Estanques.

Los estanques para el cultivo de tilapia deben tener un área entre 500 y 1 500 m² para facilitar la recolección de alevines y la cosecha. Para asegurar una producción alta y constante, es importante monitorear con frecuencia parámetros como oxígeno disuelto, pH y sólidos disueltos (FAO, 2010).

Los estanques pueden ser exteriores o interiores. Generalmente se emplean estanques exteriores para las fases de maduración de reproductores y desove. Los estanques interiores se utilizan para los procesos de reversión y pre-cría y son cubiertos con algún tipo de plástico para mantener la temperatura constante.

En los estanques de reproducción es necesario tener sistemas antipájaros como mallas, para evitar la depredación de camadas y ataques a reproductores adultos.

2.1.3.2 Jaulas flotantes.

El cultivo de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) en jaulas flotantes a alta densidad, se practica en grandes lagos y represas de varios países, incluyendo China, Indonesia, México, Honduras, Colombia y Brasil. La medida de las mallas tiene un impacto significativo en la producción y se recomienda que sea de 1,9 cm o mayor para permitir la libre circulación del agua (FAO, 2010).

El cultivo en jaulas ofrece varias ventajas importantes tales como:

- Utilización de cuerpos de agua que no pueden ser drenados o en los que no se pueden utilizar redes de cerco y que de no ser por el cultivo en jaulas, no serían aptos para la acuicultura.
- Flexibilidad de administración con múltiples unidades de producción.
- Facilidad y bajo costo de cosecha.

- Observación cercana de la respuesta de los peces a la alimentación y de su salud.
- Inversión de capital relativamente baja, comparada con otras técnicas de cultivo.

Sin embargo también tiene diversas desventajas, entre las que se incluyen:

- Riesgo de pérdida derivado de robo o daño a las jaulas por los depredadores o por tormentas.
- Menor tolerancia de los peces a la mala calidad del agua.
- Dependencia de dietas nutricionalmente balanceadas.
- Mayor riesgo de brotes de enfermedades (FAO, 2010).

2.2 Microbiota de tilapias vivas.

Estudios específicos de la microbiota intestinal de tilapia han sido elaborados por diferentes investigadores, Sakata *et al.* (1980) aislaron microorganismos del contenido intestinal de la trucha arco iris (*Salmo gairdneri*), del ayu (*Plecoglossus altivelis*), de la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), de la carpa común (*Cyprinus carpio*) y de la carpa dorada (*Carassius auratus*). Observaron que en la tilapia y el ayu, la cantidad de microorganismos aerobios obligados resultó ser mayor que el de anaerobios facultativos, mientras que en las demás especies resultó ser a la inversa. Así mismo en todas las especies la comunidad microbiana de anaerobios y aerobios fue igual.

En otro estudio, Sakata *et al.* (1984) investigaron la microbiota aeróbica dominante en el intestino de tilapia nilótica cultivada en agua salobre, encontrando que los géneros dominantes fueron *Pseudomonas*, *Aeromonas* y Enterobacterias. Por su parte, Belman (1999) analizó la flora intestinal de juveniles de tilapia nilótica y concluyó que su flora intestinal estaba constituida principalmente de bacterias aeróbicas facultativas, con familias predominantes entre las que figuraban Vibronaceae y Enterobacteraceae.

Las principales bacterias encontradas en el intestino de tilapias han sido de los géneros: *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* y *Aeromonas* (Sugita *et al.*, 1990).

Clavijo *et al.*, (2001) obtuvieron aislados de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* a partir del contenido intestinal de ejemplares juveniles de tetrahíbridos de la tilapia roja (*Oreochromis mossambicus* X *O. urolepis hornorum* X *O. niloticus* X *O. aureus*) cultivados en estanques de agua salobre en Venezuela.

Por otro lado Al-Harbi y Naim (2004) en su estudio encontraron que las densidades de bacterias en la flora intestinal asociada con el intestino de tilapia híbrida (*Oreochromis niloticus*) varía de acuerdo a las estaciones del año siendo en verano cuando las densidades aumentan. Las bacterias predominantes fueron las Gram-negativas. *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefasciens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* fueron las especies más abundantes con un 10% de prevalencia excepto *V. cholerae*.

Lara-Flores (2003) realizó un estudio con el objetivo de caracterizar el tracto intestinal de la tilapia (*O. niloticus*) cultivada en tanques de concreto, de acuerdo a su abundancia, géneros y especies presentes, encontrando que los géneros más abundantes eran *Pseudomonas*, seguido de *Vibrio* y *Citrobacter*. Adicionalmente Al-Harbi y Uddin (2005), estudiaron la diversidad bacteriana de la tilapia nilótica cultivada en agua salobre y encontraron que los géneros predominantes en el tracto gastrointestinal de esta especie bajo esas condiciones fueron *Vibrio* y *Streptococcus*.

Entre los estudios que se han realizado para saber la diversidad bacteriológica de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) se encuentran los siguientes:

Al-Harbi (1994) se aisló por primera vez *Streptococcus* sp (α -hemolíticas), las muestras fueron tomadas del riñón, bazo, hígado, cerebro y ojos de tilapias (*Oreochromis niloticus* y *Oreochromis aureus*).

Jyh-Wei y Yin-Hung (2000) señalan que al analizar filetes de tilapias provenientes de supermercados de varias regiones de Taiwán, el 0.36 % de las muestras analizadas estaban contaminadas con *Aeromonas* y *Micrococcus* y libres de larvas o parásitos, así como de vibrios.

Morales *et al.* (2004) encontraron que los niveles de coliformes en los análisis microbiológicos realizados a tilapias fueron inaceptables para el consumo humano. Aislaron *Salmonella* spp. y *Aeromonas* sp. como parte de su flora normal. Según los datos obtenidos, no existe diferencia significativa (95% de confianza) entre el recuento total aerobio, los niveles de coliformes totales y coliformes fecales, *Enterococcus* sp. y *Aeromonas* sp. a partir de la tilapia proveniente de los criaderos de las zonas de San Carlos y Cañas, en Costa Rica.

Al-Harbi y Uddin (2005) analizaron el sedimento, branquias e intestinos de tilapias (*Oreochromis niloticus*) saludables, encontrando un total de 19 especies bacterianas. Las bacterias fueron predominantemente Gram-negativas (87%). Observaron que las condiciones del agua y sedimento influyeron en la composición bacteriana de las branquias y el intestino de la tilapia. Las especies bacterianas aisladas fueron predominantemente: *Vibrio parahaemolyticus*, "*Vibrio carchariae*", *Vibrio alginolyticus*, *Chryseomonas* sp., *Vibrio vulnificus* y *Streptococcus* sp., dicha identificación fue realizada mediante pruebas bioquímicas.

Salah *et al.* (2008) aislaron e identificaron de tilapias (*Oreochromis niloticus*) *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas* spp. y dos especies Gram-positivas, *Bacillus pumilus* y *Bacillus firmus*.

2.3. Enfermedades bacterianas.

Las bacterias se encuentran de forma natural en el intestino de la tilapia y pueden ser patógenas cuando las condiciones ambientales y de cultivo son desfavorables.

Al-Harbi y Naim Uddin (2004) aislaron e identificaron del intestino de híbridos de tilapia (*O. niloticus* x *O. aureus*) criados en estanques de tierra en Arabia Saudita 17 géneros bacterianos. A pesar de que muchas de estas bacterias han sido reportadas como patógenas para la tilapia, ninguno de los peces exhibió síntomas de alguna enfermedad bacteriana o estaba muerto. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto más atención a las enfermedades en tilapias. Bacterias Gram-negativas y Gram-positivas han sido asociadas a enfermedades presentes en tilapias. Las infecciones bacterianas dependen principalmente de la calidad del agua, carga orgánica y la intensificación del cultivo. Los siguientes grupos bacterianos han sido reportados como patógenos para tilapias silvestres y de granja.

2.3.1 *Aeromonas* móviles (septicemia).

Las bacterias móviles Gram-negativas del género *Aeromonas* son probablemente las causantes de las enfermedades bacterianas más comunes que afectan a tilapias silvestres y cultivadas. Les causa lesiones en aletas y piel y pueden provocar grandes mortalidades en tilapias cultivadas (Roberts y Sommerville, 1982). Los peces infectados usualmente presentan oscurecimiento de la piel, pérdida del apetito y desarrollo de úlceras e hiperemia en las bases de las aletas pectorales y pélvicas, así como exoftalmia (Scott, 1977). Los síntomas internos son hígado pálido y presencia de necrosis hemorrágicas en el hígado, corazón y músculo esquelético.

Brotes de infecciones causadas por *Aeromonas hydrophila* han causado mortalidades de 80-100% en tilapias cultivada en el sur de China (Liu *et al.*, 1993). Los peces infectados mostraron movimientos lentos, aletas caudales podridas, nado cerca de la superficie y apetito pobre. Infecciones similares de tilapias del Nilo con *A. hydrophila* fueron reportados en estanques en invierno en algunos distritos de China (Wang y Xu, 1985). Los principales síntomas observados fueron erosiones circulares o elípticas en la piel y aletas dorsales. En estadios tempranos de la infección, se presentaron hemorragias en la superficie del cuerpo.

Garcia *et al.* (1999) aisló *A. hydrophila*, *A. shubertii*, y *A. sobria* de *O. mossambicus* e híbridos de tilapia (*O. mossambicus* y *O. niloticus*) en Venezuela. La bacteria fue aislada de riñón, hígado y lesiones en la piel de peces infectados.

Aeromonas salmonicida también ha causado mortalidades en carpas silvestres y *O. mossambicus* en la India (Reddy *et al.*, 1994). También se registraron en México infecciones en tilapia azul (*O. aureus*) con *A. hydrophila* (Constantino-Casas *et al.*, 1997). El estrés y la falta de condiciones adecuadas en los cultivos son la mayor contribución al desarrollo de la enfermedad.

Infecciones experimentales en tilapia Mozambica en agua de mar con *A. hydrophila* mediante una inyección intramuscular provocaron ulceraciones que conducen a heridas abiertas, necrosis dérmica y degeneración muscular, con infiltraciones de células y factores séricos en el sitio de la infección (Azad *et al.*, 2001). Las mayores manifestaciones histopatológicas fueron necrosis focal, pérdida de submucosa y pérdida de las vellosidades intestinales. Liu *et al.*, (1990) reportaron infecciones experimentales similares por *Aeromonas* sp. en Taiwán.

Cai *et al.* (2004) estudiaron la resistencia de tilapias *O. niloticus*, *O. aureus* y sus híbridos a *Aeromonas sobria*. Basados en la dosis letal media (LD₅₀), encontraron que los híbridos presentaron una mayor resistencia a la enfermedad y que *O. aureus* una menor resistencia.

2.3.2 Pseudomonas.

Se han reportado infecciones en peces cíclidos en diferentes regiones geográficas. Miyashita (1984) encontró que *Pseudomonas fluorescens* causa mortalidades crónicas en crías de tilapias del Nilo en Japón. Los peces infectados presentaron finos nódulos blancos en el hígado y abscesos en la vejiga natatoria. Las infecciones ocurrieron principalmente en invierno y primavera, con las mortalidades más altas cuando se presentaron bajas temperaturas (15-20°C). En estanques de crías de tilapias *O. niloticus* infectados con *Pseudomonas* en Japón presentaron exoftalmia, coloración oscura en el cuerpo, lesiones nodulares, necrosis focal en el hígado, bazo, riñón y branquias, inflamación en la vejiga natatoria, abscesos en los ojos, bazo y vejiga natatoria y formulación de granulomas.

Abad *et al.*, (1999) señalan que en Filipinas se han registrado mortalidades en la tilapia roja (*O. mossambicus*), tilapia azul (*O. aureus*) y sus híbridos cultivados en agua salobre, causando lesiones dérmicas y aumento de mortalidad en los peces infectados.

2.3.3 Vibriosis.

La vibriosis, enfermedad bacteriana causada por bacterias Gram-negativas del género *Vibrio*, pueden afectar peces de agua salada y salobre. Estas bacterias pueden constituir un peligro para la salud de la tilapia cultivada. Varias incidencias de infecciones con vibrios se han presentado en tilapia, con diferentes niveles de daño. La susceptibilidad de la tilapia a los vibrios depende

de la especie de la tilapia, especie bacteriana, cepas, las condiciones ambientales y el sistema de cultivo.

Sakata y Hattori (1988) aislaron diferentes especies de vibrios, incluyendo *V. vulnificus*, *V. harveyi* y *V. mimicus* de tilapia roja, azul y sus híbridos enfermos, cultivados en jaulas flotantes en agua salobre en las Filipinas. Los peces infectados mostraron lesiones en su cuerpo y altas mortalidades, además las infecciones se atribuyeron a una gran fluctuación de la salinidad del agua (18-35‰) en los sitios de la jaula, presentando algunos síntomas de la enfermedad como exoftalmia, descamación, hemorragia y el aumento de secreción de moco.

Un caso similar fue reportado por Saeed (1993) quien informó de un brote de *Vibrio* sp. en *Oreochromis spilurus* criados en tanques de agua de mar en Kuwait. Los peces infectados sufrieron letargia, coloración oscura, necrosis cutánea y mortalidad.

Se ha investigado la susceptibilidad de la tilapia *O. niloticus* a una cepa de *V. vulnificus* de la colección Española de cultivos tipo (CECT 4604), las tilapias fueron inoculadas mediante una inyección intraperitoneal de células vivas y productos extracelulares, los organismos mostraron una notable actividad contra eritrocitos de la tilapia, que se correlacionó con la producción en vivo de extensas hemorragias. El estudio concluyó que dicha bacteria podría constituir un peligro para la salud de las tilapias (Fouz *et al.*, 2002).

2.3.4 Estreptococosis.

Enfermedad producida por *Streptococcus* spp.; bacterias Gram-positivas, inmóviles, son patógenos oportunistas. Han sido aislados del agua de los estanques, lodo del fondo, el abono orgánico utilizado para la fertilización del estanque y peces contaminados (Bunch y Bejerano, 1997).

Wu (1970) fue el primer investigador a reportar una “nueva” enfermedad, ahora reconocida como la estreptococosis, en tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en Taiwán, que fue caracterizada por elevadas mortalidades. Las tilapias enfermas presentaron signos de anorexia, intestinos distendidos y alteraciones muy potentes en el hígado. En este caso en particular, se aisló un estreptococo beta-hemolítico, parecido a *Streptococcus pyogenes*, a partir de las tilapias enfermas y se consideró posible que la bacteria pudo haber sido introducida conjuntamente con el material fecal usado para fertilizar a los estanques.

Una de las preocupaciones importantes acerca de los estreptococos es que pueden transmitirse de los peces a los humanos. Getchell (1998) señala que existen infecciones en personas por el manejo de pescado fresco, entero (principalmente tilapia) de las piscifactorías en Toronto, Canadá por *Streptococcus iniae*. Dichas infecciones pueden deberse al mal manejo del producto, al momento de limpiarlo y a que el personal durante su manipulación puede estar lesionado, permitiendo el paso de la bacteria a través de las heridas.

La infección de la tilapia por *Streptococcus* sp. ha sido ampliamente reportada, pero *Streptococcus iniae* es uno de los patógenos más graves que afectan a la industria del cultivo de tilapia. Condiciones de estrés en el cultivo, incluyendo alta o baja temperatura, alta salinidad y alcalinidad (pH>8), bajo oxígeno disuelto, alta concentración de nitritos y alta densidad poblacional, incrementan la susceptibilidad de la tilapia a infecciones por estreptococos (Chang y Plumb, 1996; Bunch y Bejerano, 1997; Perera *et al.*, 1997; Shoemaker *et al.*, 2000).

Tung *et al.* (1987) informó de infecciones de tilapias (*O. mossambicus*) cultivadas en jaulas en Taiwán, con *Streptococcus* sp., donde se produjo una mortalidad que alcanzó a 50-60% de la población en un mes. Los mayores signos patológicos de esta enfermedad son hemorragia, exoftalmia, con corneas opacas, coloración oscura del cuerpo, con formación de nódulos o abscesos.

Síntomas similares de la enfermedad y mortalidades fueron reportadas en la misma especie infectada con *Streptococcus iniae* en estanques de agua salobre en la India; cuando los peces sanos fueron inyectados con el patógeno (10^{5-8} células/ml) se observó un 10% de mortalidad durante siete días de la infección (Munkni *et al.*, 2001).

La mortalidad de híbridos de tilapias de tipo comercial en granjas de agua dulce en Colombia se ha asociado a infecciones causadas por *Streptococcus* sp. y *Enterococcus* sp. (Pulido *et al.*, 1999). Por otro lado Berridge *et al.*, (1998) reportaron brotes de estreptococosis causada por *Streptococcus iniae* y *Streptococcus difficilis* en tilapia híbrida (*O. aureus* x *O. niloticus*) en Texas, USA.

McNulty *et al.* (2003) estudiaron los cambios hematológicos en la tilapia del Nilo, infectados con *Streptococcus iniae* por inoculación nasal. Los peces infectados incrementaron la pigmentación, mostraron ojos opacos, nado errático y letargia. Los autores sugieren que dos factores de estrés pueden tener como resultado a la infección: la baja de oxígeno y un aumento en los niveles de hierro; este último debido a la degradación de la hemoglobina en las células de huesped.

Varios medicamentos han sido probados para el tratamiento de estreptococosis. El tratamiento con antibióticos es generalmente ineficaz y se tiene la necesidad de una vacuna adecuada (Klesius *et al.*, 2000). Sin embargo, Darwish y Griffin (2002) encontraron que la oxitetraciclina fue eficaz en el control de *Streptococcus iniae* en tilapia (*O. aureus*). La oxitetraciclina se incorporó a la alimentación a los 0, 25, 50, 75 y 100 mg/Kg de peso corporal. La dosis de 75 y 100 mg aumentó significativamente la supervivencia de los peces infectados.

2.3.5 Estafilococosis.

Se tienen reportes de infecciones en tilapias con *Staphylococcus epidermidis*. *Streptococcus iniae* describieron la epidemiología y la patogenicidad de *Staphylococcus epidermidis* en tilapia (*Oreochromis* spp.) en Taiwán. Los peces enfermos mostraron esplenomegalia con la difusión de múltiples nódulos de color blanco y lesiones en bazo y riñón. En las infecciones con *Staphylococcus epidermidis* se observaron células apoptóticas principalmente en los linfocitos y macrófagos en el bazo, riñón, ocasionalmente en el cerebro, hígado, gónadas, mesenterio, estómago intestino y músculo esquelético (Huang *et al.*, 2000).

Casos esporádicos de granulomatosis en tilapias cultivadas en algunos sitios en América Central y del Sur mostraron signos clínicos muy parecidos a los reportados por Huang *et al.* (1999). Aislados bacterianos identificados como *Staphylococcus haemolyticus* fueron obtenidos a partir de esos peces, hecho que indica que la estafilococosis debe ser agregada a la lista de las enfermedades bacterianas de potencial importancia para las operaciones de tilapiacultura en América Latina.

2.3.6 Micobacteriosis.

Es una enfermedad crónica bacteriana ocasionada por *Mycobacterium* spp. La enfermedad puede llegar a afectar tanto a peces de agua dulce como peces de agua salada.

Chen *et al.* (1998) reportan tres agentes patógenos, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* causantes de la enfermedad. *Mycobacterium fortuitum* ha sido reportado en tilapias *Saratherodon andersonii* y *Tilapia sparrmanii* de los pantanos de Okavangu en Botswana (Roberts y Matthiessen, 1979). Roberts y Sommerville (1982) reportan infecciones en crías de tilapias (*O. niloticus*) en Kenya con *Mycobacterium fortuitum*. Por otro lado Wolf y Smith (1999) reportan infecciones en híbridos (*O. niloticus* x *O. mossambicus* x *O. aureus*) con *Mycobacterium*

marinum. Los peces infectados mostraron granulomas focales en el hígado, bazo, riñón y vísceras, una alta proporción de macrófagos epiteliales y más linfocitos periféricos.

Noga *et al.* (1990) describieron casos de la micobacteriosis en tilapias de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*). Las tilapias afectadas presentaron pequeños granulomas focales en el riñón, hígado y bazo. Existen casos de la micobacteriosis que han ocurrido en híbridos de tilapias rojas cultivados en un centro de producción en un país centroamericano y a partir de los cuales se aisló *Mycobacterium fortuitum* (Abdel-Fattah, 2006)

En Venezuela, Cabrera y Jiménez (2004) obtuvieron 11 aislados de micobacterias a partir de muestras de la piel y tejido muscular superficial de 60 ejemplares de *O. mossambicus* que fueron recolectados en dos diferentes sitios en el Lago de Valencia. Las tilapias muestreadas estaban dentro del rango de 304-555 g de peso y de 19-34 cm de largo. Los principales signos clínicos reportados incluían áreas de necrosis sobre las aletas, e hígados pálidos con focos hemorrágicos localizados. Los aislados venezolanos fueron inicialmente identificados como *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. marinum*.

Ranzani-Paiva *et al.* (2004) realizaron un estudio sobre las alteraciones hematológicas inducidas por infecciones experimentales con *Mycobacterium marinum* en tilapias del Nilo. Para ese estudio, usaron 100 peces adultos, peso promedio 54.21 g, longitud promedio 15.27 cm, mantenidos en estanques de tierra en agua con una temperatura promedio de 23°C. *M. marinum* fue inyectado por la vía intraperitoneal. Se estableció que la infección tenía un efecto pronunciado sobre los tejidos hematopoyéticos del riñón y bazo y produjo una discreta anemia hipocrómica y microcítica. Al primer día después de la inyección, hubo una inicial leucocitosis asociada con neutrofilia y una marcada linfocitosis. Los números de monocitos circulantes aumentaron después de dos semanas y a medida en que la infección avanzaba, dichas células mostraron evidencia de una vacuolización citoplasmática. Las alteraciones detectadas a nivel de los recuentos leucocitarios diferenciales fueron interpretadas como

indicativas de una aguda reacción inflamatoria inicial, que luego se transformó en una condición crónica infecciosa en las tilapias.

Recientemente, Lara-Flores *et al.* (2006) han reportado el aislamiento en el medio Löwenstein-Jensen de micobacterias a partir de la sangre y del riñón de *O. niloticus* procedentes de cuatro granjas en el Estado Campeche, México, así como la detección de micobacterias en cortes histológicos de esas tilapias. De las tilapias examinadas, 90% de los juveniles y 10% de los adultos resultaron positivos a micobacterias aisladas *in vitro*.

Los efectos de los productos extracelulares (PEC) de *Mycobacterium* spp. sobre la respuesta inmune no específica de la tilapia del Nilo han sido examinados por Chen *et al.* (1998). Los peces fueron inmunizados mediante una inyección en sus vejigas natatorias con los PEC, así mismo se les proporcionaron adyuvantes: el adyuvante completo de Freund (FCA) y el adyuvante incompleto de Freund y Titremax, obteniendo que las tilapias a las cuales se les habían inyectado los adyuvantes los productos extracelulares tenían una mejor respuesta inmune, ya que estos habían proporcionando una buena estimulación de la respuesta inmune no específica.

2.3.7 Edwardsielosis.

Enfermedad causada por *Edwardsiella tarda*, bacilos cortos, Gram-negativos, de la familia Enterobacteriaceae. La patogenicidad de *Edwardsiella tarda* aumenta bajo condiciones de estrés, especialmente en una temperatura del agua mayor de 30°C y un alto contenido orgánico (incluso a bajas temperaturas).

Diversos autores han reportado infecciones bacterianas por *Edwardsiella tarda*. Miyashita (1984) señaló infecciones crónicas en tilapias del Nilo en algunas granjas en Japón por *Edwardsiella tarda*. Muratori *et al.* (2000) aislaron *Edwardsiella tarda* de piel, branquias, aletas, intestino y músculo de tilapias (*O.*

niloticus). Signos patológicos de esta enfermedad incluyen hemorragia, corneas opacas y mortalidades crónicas.

Cuando se inyectó una preparación de proteínas (PS-K) a tilapias del Nilo por vía intraperitoneal, a una dosis de 0.1 mg/g de peso corporal, la máxima resistencia se desarrolló en los peces una semana después de la inyección (Park y Joeng, 1996).

2.3.8 Columnaris.

La columnaris es una enfermedad infecciosa provocada por una mixobacteria, *Flavobacterium columnare*, la cual puede afectar peces de aguas frías y aguas calientes. Columnaris es la enfermedad mixobacteriana más común en el cultivo de tilapia y son usualmente asociadas a estrés debido a las condiciones de cultivo, especialmente alta o baja temperatura del agua y altas concentraciones de amonio (Roberts y Sommerville, 1982; Amin et al., 1988). Los síntomas de la enfermedad incluyen desórdenes respiratorios, pérdida de la coloración, intensas secreciones mucosas, erosión en aletas y branquias y lesiones en piel y músculos.

Flavobacterium columnare es susceptible a los antibióticos como oxitetraciclina, cloranfenicol, eritromicina (Amin et al., 1988), la kanamicina, tetraciclina y amikacinam pero resistentes a las drogas sulfa (Chun y Sohn, 1985).

La prevención y control de la columnaris en las tilapias implica la aplicación e implementación de manera rutinaria de estrictas medidas de higiene en el criadero o en la granja, incluyendo un cuidadoso monitoreo de los parámetros químicos del agua, la densidad de la población y temperatura del agua (Conroy et al., 2008).

2.3.9 Francisellosis.

La francisellosis es una enfermedad causada por un cocobacilo Gramnegativo, *Francisella* sp. es un patógeno bacteriano que causa enfermedades desde agudas hasta crónicas en peces cultivados y silvestres en agua caliente y fría (Soto et al. 2009). Los miembros de este género también se han encontrado en muestras de suelo y agua (Scoles 2004).

El género *Francisella* contiene cuatro especies reconocidas: *F. tularensis*, *F. novicida*, *F. philomiragia* y recientemente *F. piscicida*, aislado de bacalao cultivado en Noruega (Ottem et al. 2007). Durante el periodo comprendido entre agosto y septiembre del año 2007, se presentaron mortalidades en tilapias (*O. niloticus*) cultivadas en estanques de agua dulce, presentándose mortalidades entre 50-60% del total de la población con mortalidades de hasta 200 peces por estanque al día (Soto et al. 2009).

Este grupo de patógenos a causado altas mortalidades importantes en peces como bacalao (*Gadus morhua*) en Noruega, híbridos rayados (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) en los USA, salmon del Atlántico (*Salmo salar*) en Chile y tilapia (*Oreochromis* sp.) en América Latina, Taiwan y Costa Rica (Kamaishi et al. 2005; Hsieh et al. 2006; Mikalsen et al. 2007).

Los peces infectados presentan nado errático, anorexia, anemia, exoftalmia, oscurecimiento de la piel, aletas ligeramente lesionadas, branquias con parches blanquecinos con formación de pequeños nódulos internamente, bazo y riñón con nódulos irregulares, hígado pálido, los peces sobrevivientes continúan su desarrollo sin nuevos episodios (portadores asintomáticos) (Soto et al. 2009).

2.3.10 Otras enfermedades bacterianas.

Infecciones bacterianas por otras especies de bacterias han sido reportadas en la tilapia.

Paperna *et al.* (1996) observaron que híbridos de tilapia (*O. aureus* x *O. niloticus*) presentaron lesiones focales blancas en el hígado, organismos ameboideos dentro y fuera de las células huésped.

Lalitha y Gopakumar (2001) estudiaron la susceptibilidad de tilapias (*O. mossambicus*) a toxinas (de tipo A-E) producidas por *Clostridium botulinum* (bacilos Gram-positivos, formadores de esporas, anaeróbicos). Las cinco toxinas resultaron ser tóxicas para los peces. Los autores destacaron que la higiene adecuada debe mantenerse en las granjas de peces para minimizar la contaminación bacteriana.

Como se había mencionado previamente, existe la presencia de “infecciones mixtas” en las tilapias. Bragg (1988) aisló *Aeromonas hydrophila* y *Edwardsiella tarda* de especímenes de *Oreochromis mossambicus* que presentaban mortalidades en estanques de tierra en Sudafrica. Van Damme y Vandepitte (1980) aislaron *E. tarda* y *Plesiomonas shigelloides* a partir de tilapias aparentemente sanas que habían sido capturadas en ríos de Zaire y que fueron destinadas al consumo humano. En el Japón, Miyashita (1984) aisló *E. tarda* y *Pseudomonas fluorescens* de tilapias del Nilo (*O. niloticus*).

Lightner *et al.* (1988) reportaron los resultados de tres años de investigaciones sobre las bacterias asociadas con las enfermedades de las tilapias cultivadas en agua dulce y en agua salobre en el Estado de Arizona, USA. Las especies de tilapias y sus híbridos estudiados eran *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus*, *O. mossambicus* X *O. urolepis hornorum* y *Tilapia zillii*. En tilapias mantenidas en agua dulce, los aislados bacterianos obtenidos fueron identificados como *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas* sp. y *Vibrio* sp. En el caso de las tilapias mantenidas en agua salobre (salinidad entre 20-25‰), los

correspondientes aislados fueron identificados como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas* sp. y *Vibrio* sp.

2.4 Identificación y caracterización de agentes bacterianos potencialmente patógenos.

En una década han ocurrido numerosos cambios en el ámbito de la taxonomía de procariotas debido a que han aparecido nuevas metodologías de análisis. Se están haciendo avances importantes en el campo de la clasificación basados en estas nuevas tecnologías.

La clasificación taxonómica busca describir y diferenciar la amplia diversidad de especies bacterianas poniendo nombres y agrupando organismos según sus similitudes. Por ello es necesario describir que es una especie. En microbiología se concibe especie como aquel grupo monofilético de organismos que muestran suficiente grado de coherencia genómica y fenotípica como para identificarse de forma aislada de sus semejantes (Rosselló, 2009). La taxonomía, y en especial la de procariotas, demanda que el sistema que se genere sea operativo y predictivo.

El sistema de clasificación de procariotas requiere de un estudio exhaustivo de los organismos que configurarían las distintas categorías. Es por ello que se demanda la obtención de la mayor cantidad de información posible sobre el taxón a clasificar (Rosselló, 2009).

2.4.1 Técnicas basadas en características fenotípicas.

Las técnicas clásicas de identificación bacteriana se han basado en el estudio de características fenotípicas, entre las que destacan las morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. En este sentido, el biotipificación, que se refiere al patrón que define las características bioquímicas que presenta un aislado bacteriano, es uno de los métodos de tipificación más ampliamente utilizado.

La caracterización bioquímica supone el empleo de métodos fáciles y económicos aunque, a menudo, conlleva la realización de procedimientos largos. Asimismo, la interpretación de los resultados está, en ocasiones, sujeta a un componente subjetivo; como la interpretación de los resultados. Por ello, se considera un método de tipificación de escaso poder discriminatorio y pobre reproducibilidad. El tiempo necesario para la identificación de bacterias en base a características bioquímicas puede reducirse considerablemente con el uso de los sistemas comerciales estandarizados (por ejemplo, las galerías API, BioMérieux); no obstante, hay que considerar que estas herramientas son diseñadas para la identificación de cepas aisladas de humanos, por lo que su utilización para la caracterización de bacterias en otras especies puede dar lugar a resultados erróneos (Santos *et al.*, 1993).

A pesar de los inconvenientes reseñados, el biotipado sigue siendo en la actualidad una herramienta útil para la caracterización e identificación presuntiva de microorganismos patógenos de importancia en los sistemas de producción de peces (Alavandi *et al.*, 2006; Fouz *et al.*, 2007; Beaz Hidalgo *et al.* 2008).

2.4.2 Métodos moleculares.

2.4.2.1 Técnicas para identificación. Secuenciación.

Como se ha expuesto anteriormente, las técnicas microbiológicas convencionales tienen algunas limitaciones para la identificación de un gran número de microorganismos. En estas circunstancias, la identificación basada en el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S puede representar una ventaja en cuanto a la disminución del tiempo para el diagnóstico y a la especificidad, llegando así a sustituir incluso a otras técnicas rápidas y eficaces (Rodicio y Mendoza, 2004).

Woese (1987) destacó el importante papel del ARNr 16S como cronómetro molecular en base a las propiedades de esta molécula como unidad universal,

ya que su estructura y función ha permanecido conservada durante tiempo, presenta la variabilidad suficiente para diferenciar organismos alejados y próximos en la escala evolutiva y su tamaño es relativamente grande (1500 pb), lo que minimiza las fluctuaciones estadísticas. La facilidad para secuenciar el gen que codifica esta molécula ha favorecido la existencia de bases de datos amplias que están en continuo crecimiento.

2.4.2.2 Técnicas de caracterización basadas en la PCR.

A lo largo del genoma de una gran cantidad de especies bacterianas existen diferentes familias de secuencias repetidas de las que no se conoce con exactitud su función, pero se postula que pueden desempeñar algún tipo de papel en la organización del genoma (Krawiec, 1985; Krawiec & Riley, 1990), en la expresión génica, en la estabilidad de ARNm, o en las interacciones proteína-ADN (Higgins *et al.*, 1988; Yang & Ames, 1988). Independientemente de la función que presenten, estas secuencias repetidas están situadas en posiciones características en el genoma (Dimri *et al.*, 1992), lo que les confiere una utilidad para caracterizar la estructura genómica mediante técnicas de “impresión de huella dactilar” (fingerprinting). Otras características de estos elementos repetitivos es que se localizan en regiones intergénicas y están altamente conservados (Hulton *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1992), siendo, por tanto, útiles para discriminar entre especies y/o cepas bacterianas (Bruant *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2006). Las técnicas de amplificación de elementos repetitivos, conocidas genéricamente como rep-PCR, han sido utilizadas para el estudio de la diversidad de comunidades microbianas, para diferenciar y clasificar cepas muy relacionadas, y para el desarrollo de estudios medioambientales y epidemiológicos (Versalovic *et al.*, 1994; Gomez-Gil *et al.*, 2004).

La amplificación por reacción en cadena de la polimerasa de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas empleando el iniciador (GTG)₅ ha sido reconocida como una técnica taxonómica simple que se caracteriza por tener un alto poder discriminatorio, un bajo costo, un alto rendimiento con una gran

numero de aislados y ha demostrado ser una herramienta confiable para la clasificación e identificación procedente de diversas fuentes (Alvarez, 2006; Gomez-Gil et al., 2004).

En este sentido, las técnicas de amplificación de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP) y de secuencias consenso intergénicas repetitivas de enterobacterias (ERIC) están siendo ampliamente utilizadas gracias a su rapidez y sencillez de aplicación (Gillings & Holley, 1997). El uso de cebadores apropiados, diseñados para detectar estas secuencias repetitivas, genera múltiples productos de amplificación que reflejan polimorfismos de distancias entre secuencias de ADN repetitivas adyacentes.

2.5 Factores de virulencia.

El término “factores de virulencia” hace referencia a las propiedades que confieren a un microorganismo la capacidad de infectar a un hospedero de una determinada especie, aumentando su potencial para causar enfermedad. Los factores de virulencia incluyen, entre otros, las moléculas de superficie celular que median en la adhesión a las células o tejidos del hospedador, las moléculas de invasión, los mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedero y la producción de toxinas bacterianas (Labella, 2010).

Estos factores de virulencia están codificados por genes de patogenicidad que pueden encontrarse agrupados en el genoma bacteriano formando islas de patogenicidad (Labella, 2010). Sin embargo, algunos de los factores de virulencia pueden estar codificados por genes plasmídicos o de profagos (Wassenaar & Gastra, 2001).

La capacidad de una bacteria patógena para producir enfermedad en un hospedero susceptible está determinada por la presencia de múltiples factores de virulencia que actúan, ya sea individualmente o interaccionando entre sí, en las diferentes fases de un proceso infeccioso. Los factores de virulencia

bacterianos pueden clasificarse en distintos grupos en base a sus mecanismos de actuación y función (Finlay y Falkow, 1997):

- Moléculas de superficie que participan en la adhesión y colonización de células y tejidos (adhesinas). Promueven la adherencia a la superficie celular del hospedero, confieren resistencia a antimicrobianos y facilitan la comunicación celular. Algunos ejemplos de estas adhesinas, incluyendo a las fimbrias tipo I, II y III, ácido lipoteico, glicocálix, diferentes proteínas de membrana; la proteína F, pertactina, proteína M y intimina.
- Moléculas de invasión que propician la penetración microbiana en células y tejidos del huésped, así como su destrucción. Se pueden incluir en este grupo a proteasas, hidrolasas, activador de plasminógeno, etc.
- Mecanismos de evasión de los sistemas de defensa del huésped. Estos mecanismos pueden ser estructuras como el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de la pared celular bacteriana o la cápsula bacteriana. Pueden ser consecuencia de la síntesis bacteriana de moléculas solubles como sideróforos, C5a peptidasa, etc. También se incluyen en este grupo la variación de los antígenos somáticos bacterianos, los mecanismos de reducción del estallido respiratorio, resistencia a factores séricos y a ácidos nitrosos y la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma.
- Producción de toxinas que permiten la degradación y lisis de células y tejidos del hospedero.

En el caso de las bacterias patógenas de peces, diversos autores han relacionado la virulencia con la producción de exotoxinas y enzimas extracelulares, que favorecen la invasión y ocasionan daños en los tejidos del hospedero (Allan & Stevenson, 1981; Smith & Merkel, 1982; Kreger, 1984; Fouz *et al.*, 1990; Biosca & Amaro, 1996; Lee *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2003; Farto *et al.*, 2006).

Todar (1998) señala que la producción de enzimas secretadas por bacterias patógenas producen lisis celular, tales como las proteasas, lipasas, fosfolipasas, lecitinas y hemolisinas. Las bacterias patógenas requieren nutrientes especiales a diferencia de su contraparte no patógena, las características nutricionales de las cepas virulentas consisten en una habilidad especial de los patógenos para liberar nutrientes del huésped que permitan un crecimiento continuo y la diseminación de los microorganismos invasores (Soto-Rodriguez, 2002). La producción de enzimas degradativas como mucinasas, elastasas, lectinasas, fosfolipasas, lipasas y proteasas ha sido largamente asociada con la virulencia de cepas bacterianas específicas (Soto-Rodriguez, 2002).

Los productos extracelulares (PEC) son producidos por los patógenos bacterianos para facilitar la obtención de nutrientes del medio, favoreciendo su crecimiento y aumentando la eficiencia de colonización y supervivencia dentro del hospedero (Bakopoulos *et al.*, 2003).

La actividad enzimática asociada a los PEC de cepas patógenas para organismos marinos se ha investigado principalmente en bacterias del género *Vibrio* y *Aeromonas* (Soto-Rodriguez, 2002). Las exoenzimas comúnmente detectadas en los PEC son las lipasas fosfolipasas, proteasas (caseínas, gelatinas y colagenasas) y DNAsas. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo en bacterias patógenas aisladas de peces (Amaro, 1992; Alcaide *et al.*, 1999).

Se ha sugerido que las actividades hidrolíticas de los PEC de bacterias aisladas de organismos enfermos juegan un papel crucial en la virulencia durante la infección del huésped (Balebona *et al.*, 1998).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

El objetivo del presente trabajo es la identificación y caracterización fenotípica, molecular y patogénica de los aislados bacterianos de las tilapias cultivadas en el estado de Sinaloa.

3.2 Objetivos Particulares.

- 1.- Caracterización molecular y fenotípica de las bacterias aisladas de tilapia.
- 2.- Identificación de las bacterias caracterizadas.
- 3.- Evaluar la patogenicidad de trece cepas por medio de desafíos experimentales en tilapias.

IV. METODOLOGÍA.

4.1 Obtención de los aislados.

Los aislados bacterianos fueron obtenidos de la colección de cepas del laboratorio de bacteriología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Mazatlán, provenientes de un proyecto financiado por Fundación Produce Sinaloa titulado “Bacterias potencialmente patógenas para tilapias cultivadas en jaulas flotantes en Sinaloa”. Dichos aislados fueron obtenidos de hígado, cerebro, riñón y bazo de tilapias (*Oreochromis niloticus*) sanas y enfermas provenientes de tres presas del estado de Sinaloa; presa Adolfo López Mateos, en Badiraguato, presa Sanalona; en Culiacán y Dique IV en Mazatlán, durante el periodo comprendido entre 9 de Febrero a 25 Mayo de 2009.

4.2 Purificación y preservación de los aislados.

La purificación de los aislados se llevó a cabo mediante un re-sembrado en agar TSA incubándose a 30°C durante 24 horas. Posteriormente se analizó la pureza de las cepas con la ayuda de un microscopio estereoscopio (Stemi SVII, Zeiss), re-sembrando nuevamente los aislados potencialmente puros en agar TSA e incubándose a 30°C durante 24 horas, con el objeto de confirmar su pureza; observando la homogeneidad de las colonias en cuanto a forma y color. Los aislados se preservaron en tubos Eppendorf con agar TSA y aceite mineral estéril en la oscuridad.

4.3 Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos.

4.3.1 Métodos microbiológicos convencionales.

Se realizaron pruebas bioquímicas básicas para determinar a nivel género los aislados indicadas en Holt *et al.* (1994).

4.3.1.1 Tinción Gram.

La tinción Gram se realizó empleando el kit de tinción Gram (HYCEL de México).

Se realizó un frotis de los aislados con un portaobjetos limpio y se fijó calentando con la flama, se agregaron unas gotas de cristal violeta y se mantuvieron las laminillas durante un minuto, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se drenaron las laminillas, en seguida se agregaron unas gotas de lugol, se mantuvieron durante un minuto y se decoloraron en etanol al 70%, en seguida se enjuagaron con agua corriente y se drenaron las laminillas, se agregaron unas gotas de safranina durante 30 segundos y se enjuagaron con agua corriente, se drenaron y secaron las laminas.

La visualización de la tinción se realizó con un microscopio de luz (Carl Zeiss, Axiolab drd KT) a 100X.

4.3.1.2 Oxidasa.

Se colocaron trozos de papel filtro en una caja de Petri, a cada trozo de papel se le agregó una gota de tetrametil-p-fenilediamina (sin HCl) (Aldrich Chemical CO., Milwaukee, USA), posteriormente se le añadió un poco de aislado bacteriano puro con un asa de siembra de platino estéril. La coloración de color violeta en el papel indicó reacción positiva.

4.3.1.3 Catalasa.

Se tomó el centro de una colonia pura de 18 a 24 h de crecimiento con una aguja de inoculación y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio. Posteriormente se agregó una gota de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 30% sobre el portaobjetos. Se observó inmediatamente la formación de burbujas (liberación de gas) y se registró como resultado positivo.

4.3.1.4 Voges-Proskauer (VP).

Para la realización de la prueba caldo VP se preparó el medio Clark y Lubs (7g de peptona, 5g de dextrosa, 5g de fosfato de potasio (K_2HPO_4), 1000 ml de agua destilada).

Después de disolver los ingredientes se esterilizó el medio en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio fue distribuido en tubos de ensaye bajo condiciones de esterilidad (5 ml por tubo) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los tubos se inocularon con crecimiento de las bacterias a ensayar mediante picadura.

Para la lectura de la prueba VP, se añadieron 0.6 ml de una solución de α -naftol al 5% y 0.2 ml de una solución de KOH al 40% (o NaOH al 40%). Se agitó el tubo para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoina y obtener la reacción de color. Se dejó descansar el tubo por lo menos durante 10 a 15 minutos antes de intentar la interpretación del color.

La reacción VP positiva: color rojo rosado en la superficie del medio (presencia de acetoína). Reacción VP negativa: color amarillo en la superficie del medio (mismo color del medio), puede formarse un color cobrizo, pero aun así la reacción es negativa (esto es debido a la acción de los reactivos al mezclarse).

4.3.1.5 Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS).

Se sembró una colonia pura de 18 a 24 h de crecimiento en cajas de agar TCBS, para determinar el crecimiento y coloración de la misma. En este medio se esperan colonias amarillas y verdes pertenecientes a las bacterias del género *Vibrio*, colonias azules que pudieran ser *Pseudomonas*, *Aeromonas* y otros, o bien colonias traslucidas muy pequeñas correspondientes a la familia de enterobacterias.

4.3.1.6 McConkey.

Se sembró una colonia pura de 18 a 24 h en cajas de agar McConkey, para determinar el crecimiento y coloración de la misma. Las bacterias que hidrolizan lactosa producen ácidos orgánicos volviéndolas de color rosa-rojo, considerándose como prueba positiva, las colonias lactosas negativas permanecen incoloras aun cuando el medio tiende a poner se de color amarillo. En este medio pueden crecer colonias traslucidas que puede corresponder a especies del género *Salmonella*, *Shigella* y otros, algunas colonias rosas (*Enterobacter*, *Klebsiella*), colonias muy opacas (*Enterococcus*, *Staphylococcus* y otros).

4.3.1.7 Oxidación-Fermentación (O-F).

Para la realización de la prueba O-F se preparó el medio Hugh y Leifson (MacFAddin, 1990) (2g de peptona, 25g de NaCl, 0.3g de fosfato de potasio, 3g de agar, 0.03-0.08g de Bromotimol, 1 L de agua destilada).

Después de disolver los ingredientes se ajusto el pH a 7.5 y se esterilizó el medio en autoclave a 110°C durante 15 minutos. Posteriormente, se dejó enfriar el medio a 45 – 50 °C y se agregó glucosa estéril por filtración al 10%. El medio fue dispensado en tubos de ensaye bajo condiciones de esterilidad (5 ml por tubo) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Los tubos fueron inoculados

por picadura hasta 0.6 mm del fondo del tubo y uno de los tubos se cubrió con uno a dos ml de vaselina o parafina fundida estéril para excluir el oxígeno.

Interpretación de resultados: la oxidación y fermentación se observó en los tubos donde hubo producción de ácido y se presentó un color amarillo en los tubos, para los organismos que no son oxidativos ni fermentativos no se observó ningún cambio de color en el tubo.

4.3.1.8 Motilidad.

Para la prueba de motilidad se empleó el método de gota colgante. Se lavaron portaobjetos a los cuales se les colocaron unas gotas de parafina derretida, inmediatamente se colocó una gota de agua estéril inoculada con el aislado bacteriano en un cubreobjetos (se observó con la ayuda de un microscopio de luz (Carl Zeiss, Aciolab drd Kt) a 40X).

4.3.2 Sistema miniaturizado API 20E.

Para complementar la caracterización bioquímica de los aislados se utilizó el sistema comercial API 20E (BioMérieux), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las galerías una vez inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24-48 h. Las actividades ensayadas en este sistema fueron: β -galactosidasa, arginina dihidrolasa, lisina y ornitina descarboxilasa, citocromo oxidasa, triptófano desamina, ureasa, gelatinasa, utilización de citrato, reducción de nitrato, producción de H₂S, producción de acetoína, y fermentación-oxidación de glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amigdalina y arabinosa.

4.4 Caracterización genómica de los aislados bacterianos.

4.4.1 Caracterización por rep-PCR.

4.4.1.1 Extracción de ADN.

Se resembró una colonia pura en agar TSA y se incubó a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente se tomó con la ayuda de un asa microbiológica el crecimiento bacteriano y se suspendió en 480 µl de EDTA (58 mM) en un tubo Eppendorf, el cual se centrifugó a 13 000 X g durante 5 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se agregaron 600 µl de solución de lisis (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA). El pellet bacteriano se resuspendió con la ayuda de una pipeta estéril, se calentó un termoblock (VWR Scientific industries Inc. USA.) a 80°C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 5 µl de solución RNasa (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA) a las células bacterianas, invirtiendo el tubo Eppendorf de dos a cinco veces, se incubaron los tubos Eppendorf en baño maría a 37 °C durante 60 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de solución de precipitación protéica (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, PROMEGA) a cada tubo Eppendorf, se agitaron en vortex (VWR Vortex mixer, Scientific industries Inc. USA.) a máxima velocidad durante 20 segundos y se incubaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 x g durante tres minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf conteniendo 600 µl de isopropanol (Sigma) a temperatura ambiente, los tubos se agitaron gentilmente hasta que se observó el pellet de ADN. Después se centrifugaron a 13 000 x g durante tres minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se agregaron 600 µl de etanol al 70% (Sigma) y se resuspendió el pellet, en seguida se centrifugó a 13 000 x g durante tres minutos nuevamente a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante.

Los tubos se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se agregó a cada tubo 30 μl de solución de rehidratación (10 mM Tris.HCl, pH 7.4; 1mM EDTA, pH 8.0), dejando re-hidratar el ADN durante toda la noche a 4 °C. Se almacenó la extracción de ADN a -20 °C.

El ADN de cada aislado se ajustó a una concentración de 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$, con la ayuda de un espectrofotómetro (México, Samrtspec 300, BIORAD), diluyendo 5 μl de ADN en 995 μl de agua milliQ estéril (1:200, usando como blanco 1 ml de agua 18.8 M Ω estéril, las lecturas de absorbancia se realizaron a una densidad óptica de 260 nm y 280 nm. Una vez conocida la concentración de ADN en cada extracción se ajustó con agua destilada ultra pura de 8 M Ω estéril en todas las extracciones a 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$. El ADN se almacenó a -20°C.

4.4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa de elementos palindrómicos repetidos (rep-PCR).

La mezcla de rep-PCR se realizó bajo condiciones estériles y en hielo. En un tubo Eppendorf de 0.2 ml se agregaron las siguientes reactivos: 10.6 μl de buffer H/C (KCl 50 mM; MgCl₂ 1.5 mM; Tris HCl pH 8.8 10 mM; Triton X-100 al 1%; Wong y Lin, 2001), 0.1 μl de mezcla de dNTP's (25 mM c/u), 0.5 μl de iniciador (GTG)₅ (0.3 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$, 5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'; Versalovic *et al.*, 1994; Gomez-Gil *et al.*, 2004), 0.2 μl de Taq polimerasa (Promega, 5 U/ μl). Posteriormente se agregó 1 μl de ADN (50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$), el volumen final de cada reacción fue de 12.5 μl .

El protocolo de rep-PCR en el termociclador (MyCycler™ Thermalcycler, BIORAD) fue de 95 °C durante 7 minutos, seguido de 35 ciclos de 90 °C durante 30 segundos, 45 °C durante 1 minuto y 65 °C durante 3 minutos, con una temperatura de extensión final de 70 °C durante 10 minutos.

4.4.1.3 Electroforesis.

Los productos de la reacción de rep-PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2.25% (Grado analítico, Promega, USA) en buffer TAE 0.5 X (800 ml de agua destilada, 96.8 g de Tris-base, 22.8 ml de ácido acético glacial, 40 ml , de EDTA 0.5 M, pH 8), cada reacción de PCR se mezcló con 2 μ l de buffer de carga (6X, 25 mg de azul de bromofenol; 4 g de sacarosa; se aforó a 10 ml con agua destilada estéril). Se agregaron 5 μ l de la solución en cada carril del gel; se utilizó 3 μ l del marcador de peso molecular 1 kb DNA 100 μ g ml⁻¹ (Promega).

El gel se corrió en una cámara de electroforesis horizontal (E-C maxicell EC360M, USA) a 4°C durante 260 minutos con una fuente de poder (EPS 301, Amersham pharmacia biotech, USA) a 70 V. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio (120 μ l de solución madre de 10 mg ml⁻¹ en 1 L de TAE 0.5 X) durante 30 minutos a temperatura ambiente, enjuagándose después con agua destilada a temperatura ambiente durante 15 minutos. El gel se fotografió en un fotodocumentador de longitud de onda corta (UVP 3.527, USA), con el software LabWorks, Ver 4.0.0.8 (Media Cybernetics, LP), la imagen se guardó como archivo TIFF.

Análisis de Patrón de Bandas

Los patrones de banda de cada cepa presentes en las imágenes obtenidas de la electroforesis de rep-PCR se analizaron con el software GelCompar II Ver. 4.5 (Applied-Maths).

La similitud entre los patrones de bandas fue calculada empleando el coeficiente de similitud de Jaccard (Kosman y Leonard, 2005). El dendrograma fue construido con el algoritmo de Ward (optimización 0.35, tolerancia de comparación de bandas 1.82%).

4.4.2 Identificación molecular.

Los grupos (clados) obtenidos mediante el análisis numérico realizado con el GelCompar fueron identificados mediante de secuenciación del fragmento 16S rADN. Se seleccionó una cepa representativa de cada grupo.

4.4.2.1 Extracción de ADN.

Se realizó una extracción de ADN con el Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad), la cual consistió en resuspender la bacteria en 1 ml de agua estéril en un tubo de microcentrifuga, se centrifugó a 12000 rpm durante un minuto descartando el sobre nadante, se añadió 200 μ l de IntaGene Matriz al pellet y se incubo a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se dio un vórtex fuerte durante 10 segundos, seguido de una incubación en baño maría a 100°C durante 8 min. Después se dio un segundo vórtex de 10 segundos y una centrifugación de 3 minutos a 12000 rpm. El pellet mas el sobrenadante se guardo a -20°C.

4.4.2.2 Amplificación del gen 16S.

Para la amplificación se utilizaron los iniciadores pA y pH. La Mezcla de PCR se realizó sobre una capa de hielo, en un tubo Eppendorf de 0.2 ml se agregaron los siguientes reactivos: 1 μ l del ADN (30-60 ng), una bolita de PCR beads por cada reacción, 1 μ l del iniciador pA (2 μ M) (Tabla 1), 1 μ l del iniciador pH (2 μ M) y 22 μ l de agua destilada estéril. El volumen final de la reacción de la PCR fue de 25 μ l. El procedimiento general de amplificación consiste en un ciclo inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 1 min 30 seg, con una temperatura de extensión final de 72°C por 5min.

Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 1.25% durante 30 minutos a temperatura ambiente aplicando un voltaje de 110 V, con la finalidad de verificar la amplificación del gen 16S (una banda de aproximadamente 1400 pb).

Tabla1. Iniciadores empleados.

Iniciador ^a	Posición ^b	Secuencia 5' - 3'
pA (d)	8-27	GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
pH (r)	1540-1521	AGGAGGTGATCCAGCCGCA
8 (r)	539-517	TTACCGCGGCTGCTGGCACG
Anti k8(d)	517-537	CGTGCCAGCAGCCGCGTAAT
3 (r)	1109-1090	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT
Anti 3 (r)	1398-1382	CGGTGTGTACAAGGCC

^a(r); iniciador reverso, (d) iniciador directo, ^b; numeración de la posición corresponde con la establecida para el gen 16S de *E. coli*.

NOTA: Para algunos de los aislados identificados, la amplificación del gen rRNA 16S se realizó con los iniciadores 27F (5'AGA GTT AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') y 1492R (5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), donde M= A/C, Y= C/T.

4.4.2.3 Purificación del producto de PCR.

La purificación se llevó a cabo con el kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), para la eliminación de residuos de productos de la amplificación.

Se añadieron 125 µl de tampón SpinBind a 25 µl de producto de PCR, se mezcló por pipeteo y se transfirió a un tubo con filtro spin y se centrifugó por un min a 13000 rpm. Posteriormente se removió el filtro spin y se descartó el líquido por decantación colocando de nuevo el filtro, para agregar 300 µl de buffer SpinClean al filtro y centrifugar por 30 seg a 13000 rpm. Se removió el filtro spin una vez más para descartar el líquido y se colocó de nuevo en el mismo tubo para centrifugarse por 60 seg a 1300 rpm. Se colocó el filtro spin en un tubo limpio y se agregaron 30 µl de agua 18 Ω estéril y se centrifugó a 60 seg a 13000 rpm.

Posteriormente se cuantificó la concentración en nanogramos del producto de PCR, para la reacción de secuenciación de utilizó con una concentración entre 30-60 ng de ADN.

4.4.2.4 Reacción de secuenciación.

Se realizó la reacción con el kit de secuenciación de Beckman.

La mezcla de PCR se realizó bajo una capa de hielo, en tubos Eppendorf de 0.2 ml se agregaron los siguientes reactivos (por cada tubo de reacción): 4 µl de Master Mix, 1 µl de sequencing reaction buffer kit, 2 µl de cada iniciador (2 pmol/µl) (Tabla 1) y 13 µl entre el ADN y agua. Las condiciones de secuenciación fueron 30 ciclos de 96°C durante 20 seg (desnaturalización), 50°C durante 20 seg (unión del cebador) y 60°C por 4 min (elongación).

Precipitación de los productos de PCR con etanol.

Se preparó una solución stop (para cada reacción de secuenciación): 2 µl de acetato sódico 3M (pH 5.2), 2 µl Na₂-EDTA 100 mM (pH 8.0) y 1 µl de glucógeno 20 mg/ml (kit). En tubos de Eppendorf se añadieron 5 µl de la mezcla por tubo, se añadió 60 µl de etanol 95 % (v/v-H₂O), se centrifugó inmediatamente a 14000 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente se eliminó cuidadosamente el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta y se lavó el pellet 2 veces con 200 µl de etanol al 70%, en cada lavado se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4°C. Después del último lavado se eliminó el sobrenadante y se dejó secar al vacío por 10 minutos, para luego ser resuspendidos en 40 µl de Sample loading solution (kit). Las muestras se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente fueron almacenadas a -20°C.

Los productos de PCR generados se secuenciaron utilizando el producto "Bigdye® Terminator v3.1" (Applied Biosystems) y un secuenciador modelo 377 DNA de la misma casa comercial. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando los programas "Sequencing Analysis v3.4.1" (Applied Biosystems) y "Seqman v5.53" (DNASTAR). Finalmente, se utilizó el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), así como el programa EzTaxon server 2.1 (http://147.47.212.35:8080/2_identify.jsp), para seleccionar entre las

secuencias de ADNr 16S existentes en la base de datos GenBank, aquellas que mostraron una mayor identidad con las secuencias obtenidas para los aislados.

4.5 Estudio de potenciales factores de virulencia extracelulares.

4.5.1 Obtención de los productos extracelulares (PEC).

Para la obtención de productos extracelulares (PEC) de los distintos cultivos bacterianos se utilizó la técnica de extracción en medio sólido descrita por Liu (1957). Para ello se prepararon inóculos de 3 ml de las cepas a ensayar en el medio TSA. Estos inóculos se sembraron empleando un rastrillo de vidrio estéril en placas de 24 x 24 cm que contenía 250 ml del medio, sobre el que previamente se había depositado una membrana de celofán estéril, algunos de los PEC fueron inoculados en cajas petri aumentando a 10 cajas por cepa. Tras el periodo de incubación (24 h a 25°C), se procedió al lavado de las membranas con 15 ml de tampón fosfato salino estéril (PBS), pH 7.2. Las suspensiones recogidas se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de membranas estériles de celulosa de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore). Todos los productos filtrados se sometieron a una prueba de esterilidad, sembrando 5-6 µl en una placa de TSA, procediendo a un nuevo paso de filtración en caso de registrar crecimiento bacteriano tras el periodo de incubación. Los PEC extraídos se conservaron a -20°C hasta su uso.

La concentración de proteína presente en los PEC se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando concentraciones crecientes (de 5 a 100 µg/ml) de seroalbúmina bovina (Sigma) para la elaboración de la curva patrón. A 100 µl de cada concentración de albumina, así como de las muestras a estudiar y de agua destilada (tubo control) se añadieron 5 ml del reactivo de Bradford (Biorad). Una vez homogenizadas las muestras (entre 2 min y 1 h), se midió la absorbancia a 595 nm (A_{595}). La concentración de proteínas de cada muestra se ajustó a 0.5 -1 mg/ml por dilución en agua estéril.

4.5.2 Determinación de las actividades enzimáticas presentes en los PEC.

4.5.2.1 Sistema de determinación en placa.

Las diferentes actividades enzimáticas presentes en los PEC fueron estudiadas mediante la utilización de placas que contenían un medio de cultivo y el sustrato a ensayar. Cada uno de estos medio se inoculó con 15 μ l de cada muestra de PEC y las placas se incubaron durante 48 horas a 25 °C. Las actividades estudiadas fueron:

- Gelatinolítica: su detección se llevó a cabo en medio TSA suplementado con 1% (p/v) de gelatina, utilizando $MgCl_2$ como reactivo de revelado. Se determinó como positiva cuando se observó un halo transparente en el medio indicando la presencia de proteasas, de lo contrario se considero negativa.
- Amilolítica: se determinó en placas de TSA suplementado con un 0.4 % (p/v) de almidón, utilizando lugol como reactivo de revelado. Después de incubar se inundaron las placas con lugol que al unirse con el almidón intacto forma un complejo púrpura. La prueba se consideró positiva en aquellos casos donde se observó un halo amarillo (degradación del almidón de la placa).
- Lipolítica: su detección se realizó en medio TSA suplementado con un 0.01% (p/v) de Cl_2Ca y 1% (v/v) de Tween 20 o Tween 80 (Panreac). Se consideró actividad lipolítica cuando se presentó un halo transparente en el medio.
- DNAsa: esta prueba se realizó en placas que contenían el medio DNA agar (Biolife). Como reactivo de revelado se utilizó HCl 0.1 N. Algunas bacterias excretan nucleasas que despolimerizan el DNA, zonas claras alrededor de los PEC se consideran como positivas indicando la presencia de DNAsas.

- Esculina: se determinó en placas de TSA suplementando con 0.1 % (p/v) de esculina y 0.05 % de citrato férrico como indicador. El producto aromático de la hidrólisis de la esculina reacciona con el hierro y se produce un color negruzco, siendo así la prueba positiva.

4.5.2.2 Valoración de la actividad proteolítica sobre el sustrato azocoll.

La actividad proteolítica presente en las muestras de PEC se determinó mediante ensayo colorimétrico, utilizando el sustrato azocoll (Sigma). Para ello, a 2.5 ml de tampón Tris-HCl 0.1 M (pH7.2) más 0.02 g de azocoll, se añadió un volumen de 100 µl de PEC y la reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. La reacción se paró añadiendo 2.5 ml de una solución acuosa de ácido tricloroacético 10% (p/v). A continuación las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 15 minutos a 4 °C y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 520 nm. Una unidad de actividad proteolítica equivale a una absorbancia de 1.0 a 520 nm.

4.5.2.3 Ensayo de citotoxicidad.

Los ensayos de citotoxicidad de los PEC se realizaron sobre células HeLa las cuales constituyen una línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical, siguiendo la metodología descrita por Toranzo *et al.* (1983). Las células se cultivaron en placas de 48 pocillos a 22 °C hasta conseguir una monocapa confluyente, usando medio Dulbecco's MEM (HyClone) suplementado con L-glutamina (Gibco) y 10 % (v/v) de suero de bovino inactivado (Cambrex). Tras este período, se retiró el medio de crecimiento, se lavaron las células con PBS estéril y se añadieron 0.9 ml por pocillo de medio L-15. A cada uno de los pocillos se añadió 0.1 ml de los PEC y medio de enriquecimiento con suero de bovino al 2% y se volvieron a incubar a 25 °C. El ensayo se realizó por duplicado, utilizando PBS y caldo de TSA como controles negativos. Los

cultivos se observaron a las 12, 24 y 48 h post-adición y se consideró como actividad citotóxica la destrucción total o parcial del tapiz celular.

4.5.2.4 Actividad hemolítica de los PEC.

La actividad hemolítica fue medida en agar sangre, complementado con 5% de eritrocitos de ovejas. Las placas fueron inoculadas con cinco μ l de cada muestra de PEC y se incubaron a 37 °C por 24-48 horas. La presencia de una zona descolorida clara que rodeaba a las colonias indicó la actividad hemolítica (Gerhardt *et al.*, 1981).

4.6 Patogenicidad y factores de virulencia.

4.6.1. Preliminares.

4.6.1.1. Infecciones experimentales con PEC.

Se seleccionaron 45 lenguados (*Solea vulgaris*) con un peso promedio de 5-10g, se distribuyeron en acuarios que contenían 60 litros de agua a una densidad de 5 peces por acuario (Figura 1). Los lenguados fueron inyectados en la región intraperitoneal (Figura 2) con 100 μ l de los productos extracelulares de ocho cepas diferentes (Tabla 2), las cuales presentaron una actividad proteolítica más alta con respecto al resto, se estableció un grupo control que fue inoculado con 100 μ l de PBS estéril. Se hicieron observaciones por cinco días, registrándose la tasa de mortalidad.

Tabla 2. Cepas a ensayar en los lenguados (*Solea vulgaris*).

Grupo	Numero de peces.	Cepa	Bacteria
1	5	C41m	<i>Pseudomonas mosselii</i>
2	5	C43m	<i>Aeromonas veronii</i>
3	5	C1b4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>
4	5	C7b4m	<i>Soonwooa buanensis</i>
5	5	C26m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
6	5	C510m	<i>Aeromonas hydrophila</i>
7	5	C111m	<i>Aeromonas veronii</i>
8	5	C412m	<i>Aeromonas jandaei</i>
9	5	-	PBS



Figura 1. Acuarios experimentales de lenguados (*Solea vulgaris*).



Figura 2. Inyección intraperitoneal de lenguados.

4.6.2 Infección experimental en tilapias (*O. niloticus*) y PEC de cepas potencialmente patógenas.

Se hizo una selección aleatoria de 300 tilapias (*O. niloticus*) aparentemente sanas (peso promedio de 5-10 g). Para cada cepa a estudiar se distribuyeron en acuarios que contenían 56 L de agua a una densidad de cinco peces por acuario con una replica. Fueron aclimatadas en los acuarios durante una semana y alimentados con la dieta comercial (Purina) dos veces al día, con un contenido del 33% de proteínas. Los peces fueron divididos en 15 grupos iguales (cada uno con una repetición).

Las tilapias fueron inyectadas en la región intraperitoneal con las 13 cepas aisladas e identificadas previamente (Tabla 3), más una cepa de *E. coli* (CAIM 21); obtenida de la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM), así como sus productos extracelulares. La suspensión de las bacterias fue preparada tal como se describe en el apartado 4.5.1.2. Con una dosis de aproximadamente 1×10^8 UFC/ml. Como control se tuvieron tilapias inoculadas con PBS a lo largo de cada experimento.

Se hicieron observaciones durante siete días, registrando la tasa de mortalidad, considerándose la mortalidad consecuencia de la dosis bacteriana inoculada sólo cuando se pudo aislar el agente bacteriano en cultivo puro a partir de los órganos internos del pez (cerebro, corazón, bazo, hígado o riñón) mediante un análisis bacteriológico. Los órganos se resembraron directamente en agar TSA y se incubaron 24 horas. Para comprobar la identidad de las cepas aisladas, se realizó una caracterización por rep-PCR (metodología descrita en el apartado 4.4.1), usando como control la cepa inyectada.

Tabla 3. Diseño experimental para la evaluación de cepas potencialmente patógenas y sus PEC en tilapias *O. niloticus*.

Grupo	Numero de peces.	Cepa	Especie
1	10	C1b4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>
2	10	C510m	<i>Aeromonas hydrophila</i>
3	10	C412m	<i>Aeromonas jandaei</i>
4	10	C411m	<i>Aeromonas sp.</i>
5	10	C43m	<i>Aeromonas veronii</i>
6	10	C111m	<i>Aeromonas veronii</i>
7	10	C25m	<i>Edwardsiella tarda</i>
8	10	CAIM 21	<i>Escherichia coli</i>
9	10	C26m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>
10	10	C27m	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>
11	10	C41m	<i>Pseudomonas mosselii</i>
12	10	C7b4m	<i>Soonwooa buanensis</i>
13	10	C2b4m	<i>Soonwooa buanensis</i>

4.6.3 Infecciones experimentales con células bacterianas y PEC de la cepa C510m (*Aeromonas hydrophila*).

Se realizó una selección de 60 tilapias (*Oreochromis niloticus*) aparentemente sanas con un peso promedio de 5-10g, se dividieron en dos grupos de 10 organismos con tres réplicas respectivamente.

Un lote de tilapias fueron inyectadas en la región intraperitoneal con una suspensión de las células bacterianas vivas y otro con los productos extracelulares de la cepa *Aeromonas hydrophila* y otro lote con PBS las cuales fueron tomadas como el grupo control. La suspensión bacteriana fue preparada mediante un cultivo puro de *A. hydrophila* en agar TSA durante 24 horas. Posteriormente se suspendieron en una solución de suero fisiológico 0.85% y se ajustó a una densidad óptica de (10^8 cel/ml) 1.00 en un espectrofotómetro a una absorbancia de 610 nm. El inóculo final fue de 7.8×10^8 UFC/ml, se inyectó 40 μl por cada 10 g de peso de tilapia equivalente a una dosis de 3.1×10^6 UFC/g.

V. RESULTADOS.

5.1 Caracterización e identificación de los aislados.

5.1.1 Caracterización fenotípica.

Se analizaron 89 aislados bacterianos procedentes de tilapias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas en tres presas del estado de Sinaloa.

Tras un periodo de incubación de los aislados bacterianos, se seleccionaron colonias aisladas, con el fin de obtener cultivos puros de los distintos aislados. Estos aislados se analizaron con diez perfiles morfológicos y bioquímicos. La mayoría (86%) de los aislados bacterianos fueron Gram negativos y móviles, el 80% fue oxidasa y catalasa positiva, fermentadores de glucosa y con capacidad de crecimiento en agar TCBS y McConkey, con respecto a la prueba de Voges-Proskauer sólo el 20% de los aislados bacterianos fueron fermentadores de glucosa a butanodiol. El 22% de los aislados fueron productores de ácidos orgánicos. Del total de los aislados sólo el 14% fueron Gram positivos. Los perfiles fenotípicos observados, se muestran en Anexo 1.

Los perfiles analizados utilizando el sistema API 20E (BioMérieux), se presentan en el anexo 2. El 70% presentó motilidad así como actividad cuando el sustrato fue L-arginina. 50% de los aislados presentaron actividad cuando el sustrato fue 2-nitrofenil-BD-galactopiranisida, L-lisina, L-glucosa y presentaron actividad gelatinolítica y de oxidación, no detectándose las actividades D-sorbitol, L-ramnosa y L-arabinosa en ninguno de los aislados.

5.1.2 Identificación fenotípica.

Mediante la caracterización fenotípica realizada a los aislados bacterianos con los diez perfiles morfológicos y la aplicación del sistema miniaturizado API 20E, se identificaron 15 especies.

Las cepas identificadas fenotípicamente fueron *Alcaligenes fecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Corynebacterium* spp., *Enterobacter agglomerans*, *Flavobacterium* spp. *Flavobacterium spiritivorum*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus* sp., *Plesiomonas shigelloides*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Salmonella* spp., *Streptococcus* sp. y *Staphylococcus* sp.

Las especies con los mayores índices de prevalencia fueron *Plesiomonas shigelloides* (18.6%) (Tabla 4), *Pseudomonas aeruginosa* (14.3%) y *Aeromonas hydrophila* (10.2%).

Tabla 4. Porcentaje de prevalencia de los géneros y especies bacterianas identificadas.

Especie	% Porcentaje de prevalencia
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	18.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14.3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10.2
<i>Alcaligenes fecalis</i>	5.9
<i>Corynebacterium</i> spp.	5.9
<i>Enterobacter agglomerans</i>	5.9
<i>Flavobacterium spiritivorum</i>	5.9
<i>Flavobacterium</i> spp	5.9
<i>Micrococcus</i> sp.	4.6
<i>Proteus vulgaris</i>	3.9
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.5
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	2.5
<i>Salmonella</i> spp	2.5
<i>Staphylococcus</i> sp.	2.5
<i>Streptococcus</i> sp.	2.5

5.1.3 Caracterización genómica.

La caracterización genómica de los aislados mediante el análisis rep-PCR con el iniciador (GTG)₅ produjo un dendrograma con 15 clados compuesto por 37 cepas (Figura 4, 1-15) y 40 cepas que no formaron ningún clado. Se consideró un clado cuando la similitud entre las unidades taxonómicas operacionales (OTU) fue superior al 42% calculando con una tolerancia del 60% en la posición de las bandas. Los aislados fueron considerados clones cuando el porcentaje de similitud fue superior a 90%, hubo casos en los que se obtuvo un porcentaje del 100%.

5.1.3.1 Análisis filogenético.

Se seleccionaron 50 cepas a las cuales se les secuenció un tercio o casi el gen ARNr 16S completo (Anexo 3).

El análisis filogenético de estas secuencias permitió observar tres grupos (Figura 3), el primer grupo está compuesto por bacterias Gram negativas de las familias *Enterobacteriaceae*, *Aeromonadaceae*, *Pseudomonadaceae* y una cepa perteneciente a la familia *Neisseriaceae*, todas pertenecientes a la gama γ -proteobacterias (Figura 3a).

El segundo grupo está formado por bacterias del tipo Gram positivas, de la familia *Micrococcaceae* y *Bacillaceae* (Figura 3b). Dentro de la familia *Micrococcaceae* se agruparon especies de *Microbacterium paraoxydans* y *Microbacterium esteraromaticum* así como *Micrococcus yunnanensis*. En la familia *Bacillaceae* se tienen las especies de *Oceanobacillus oncorhynchi* y *Bacillus* sp.

Y un tercer grupo (Figura 3c) compuesto por bacterias Gram negativas, las cuales no se agruparon con el primer grupo ya que para estas se usó solo una parte del gen al momento de secuenciar, siendo estas las diferencias entre las mismas especies que si se agruparon en el primer y segundo grupo.

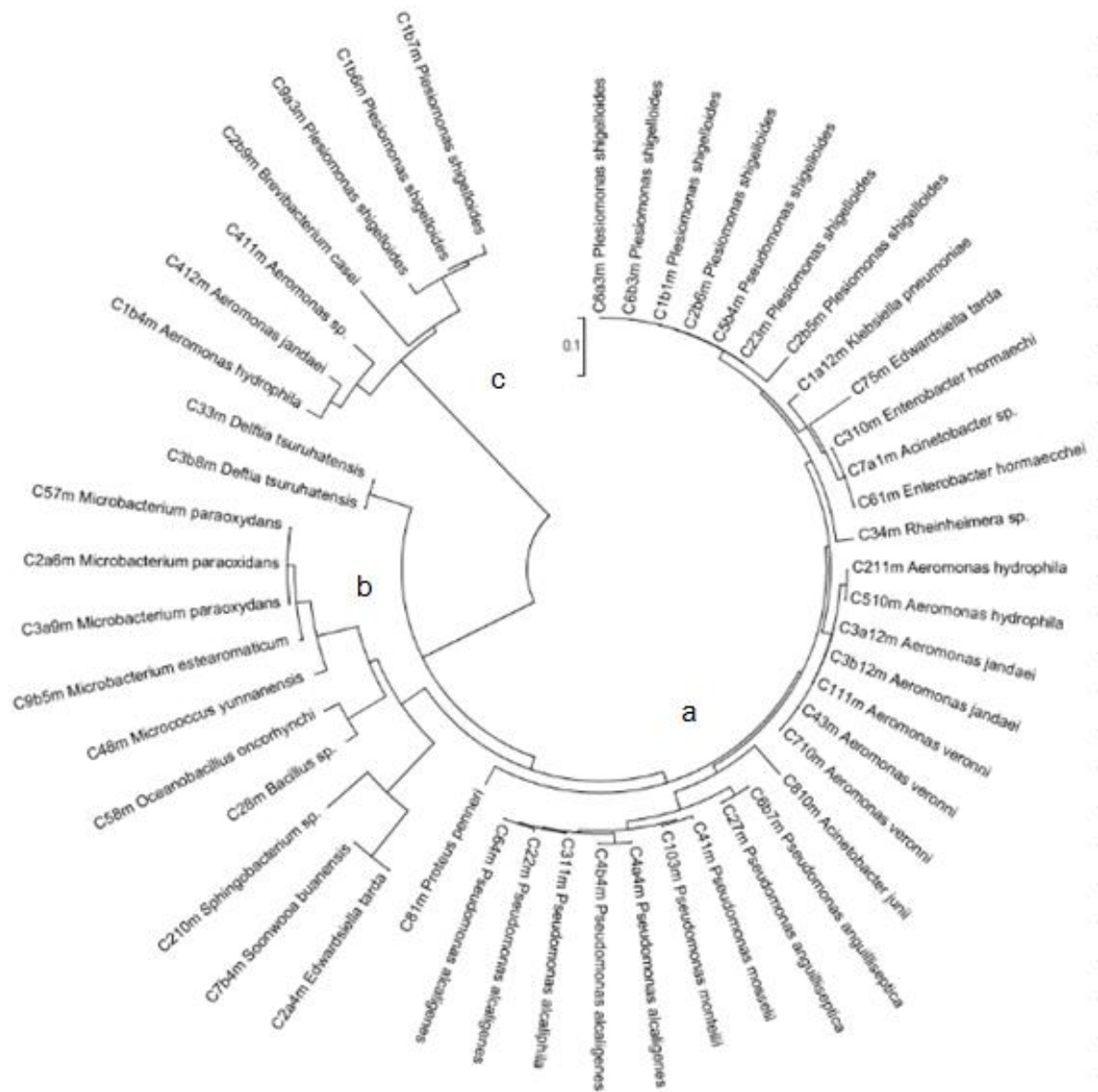


Figura 3. Árbol filogenético basado en el método del vecino más cercano (neighbor-joining) usando las secuencias del anexo 3. La distancia fue obtenida empleando el modelo de Jukes y Cantor. El árbol filogenético se realizó empleando el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Ver. 4.1, a) γ -proteobacterias, b) Gram postivass y c) Gram negativas.

5.1.3.2 Identificación.

La identificación de clados y cepas aisladas obtenidas mediante el dendrograma (Figura 4) se realizó empleando las secuencias del gen 16S ARNr.

Una vez identificadas por este método las cepas representativas de los diferentes clados, se pudo asignar una identidad al resto de las cepas del clado. Este análisis permitió la identificación de 27 especies diferentes: *Acinetobacter* sp. (tres cepas), *Acinetobacter junii* (una cepa), *Aeromonas hydrophila* (cuatro cepas), *Aeromonas jandaei* (tres cepas), *Aeromonas* sp. (tres cepas), *Aeromonas veronii* (tres cepas), *Bacillus* sp. (tres cepas), *Brevibacterium casei* (una cepa), *Deftia tsuruhatensis* (dos cepas), *Enterobacter hormaechei* (tres cepas), *Edwardsiella tarda* (dos cepas), *Microbacterium paraoxydans* (seis cepas), *Microbacterium esteraromaticum* (una cepa), *Micrococcus yunnanensis* (dos cepas), *Oceanobacillus oncorhynchi* (una cepa), *Plesiomonas shigelloides* (12 cepas), *Proteus penneri* (dos cepas), *Pseudomonas alcaligenes* (11 cepas), *Pseudomonas alcaliphila* (una cepa), *Pseudomonas anguilliseptica* (dos cepas), *Pseudomonas mosselii* (cuatro cepas) *Pseudomonas montei* (una cepa) *Pseudomonas* sp. (una cepa), *Rheinheimera* sp. (una cepa), *Soonwooa buanensis* (una cepa), *Sphingobacterium* sp. (dos cepas) y *Klebsiella pneumoniae* (una cepa).

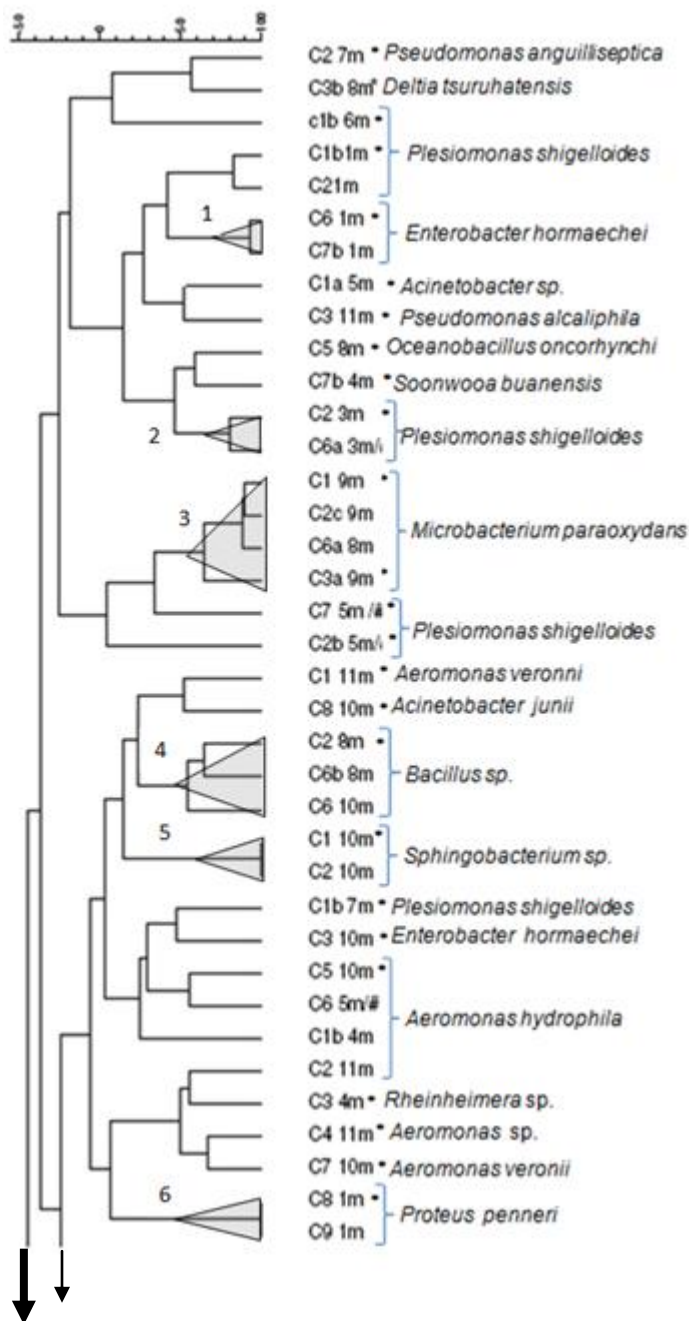
En la Tabla 5 se muestran las identificaciones de las cepas realizadas con métodos genotípicos y método fenotípicos, donde sólo el 48% de las identificaciones fenotípicas coinciden con las genotípicas a nivel de género y sólo el 20% a nivel de especies, estas especies fueron *Aeromonas hydrophila*, y *Plesiomonas shigelloides*. Especies como *A. hydrophila* fueron aisladas e identificadas de tilapias sanas (hígado) y enfermas (cerebro, hígado, riñón), las cuales presentaban signos de enfermedad tales como descamación, oscurecimiento de la piel, exfoltalmia. Por otro lado especies como *Plesiomonas shigelloides*, *Aeromonas veronii*, *Vogesella perlucida*, *Microbacterium paraoxydans* y especies del género *Pseudomonas* fueron aisladas de tilapias

sanas y enfermas con signos aparentes de enfermedad, como descamación, pérdida de un ojo, oscurecimiento de la piel, exfoltalmia y ojos opacos, tal como se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Comparacion de la Identificación fenotípica contra la identificación genotípica.

Cepa	identificación fenotípica	Identificación genotípica	órgano	Signo de enfermedad
C1b 4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Riñón	Descamación, pérdida de un ojo
C5 10m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lesion en ojo	Descamación, oscurecimiento
C4 12m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas jandaei</i>	Hígado	Exfoltalmia
C4 11m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas</i> sp.	Riñón	Ojos rojos
C1 11m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas veronii</i>	Cerebro	Descamación
C4 3m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas veronii</i>	Riñón	Normal
C2 8m	<i>Alcaligenes</i> spp.	<i>Bacillus</i> sp.	Hígado	Normal
C2b 9m	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Brevibacterium casei</i>	Cerebro	Normal
C3a 8m	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	Lesion en ojo	Descamación
C7 5m	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Edwardsiella tarda</i>	Riñón	Oscurecimiento de la piel
C7a 1m	<i>Micrococos</i> sp.	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Riñón	Normal
C2 6m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Hígado	Ojos opacos
C3a 9m	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Cerebro	Normal
C1b 6m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Cerebro	Ojos opacos
C1b 7m	***	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Lesion en ojo	Descamación
C2 5m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Riñón	Descamación
C9a 3m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Bazo	Normal
C2 2m	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Riñón	Normal
C2 7m	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Cerebro	Descamación
C4 1m	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Riñón	Normal
C2b 4m	<i>Flavobacterium</i> spp.	<i>Soonwooa buanensis</i>	Hígado	Descamación, pérdida de un ojo
C7b 4m	<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Soonwooa buanensis</i>	Riñón	Exfoltalmia
C2 10m	<i>Flavobacterium spiritivorum</i>	<i>Sphingobacterium</i> sp.	Cerebro	Ojos opacos
C10 4m	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Vogesella perlucida</i>	Riñón	Exfoltalmia
C6 11M	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Vogesella perlucida</i>	Riñón	Normal

*** ; No se realizo la identificación.



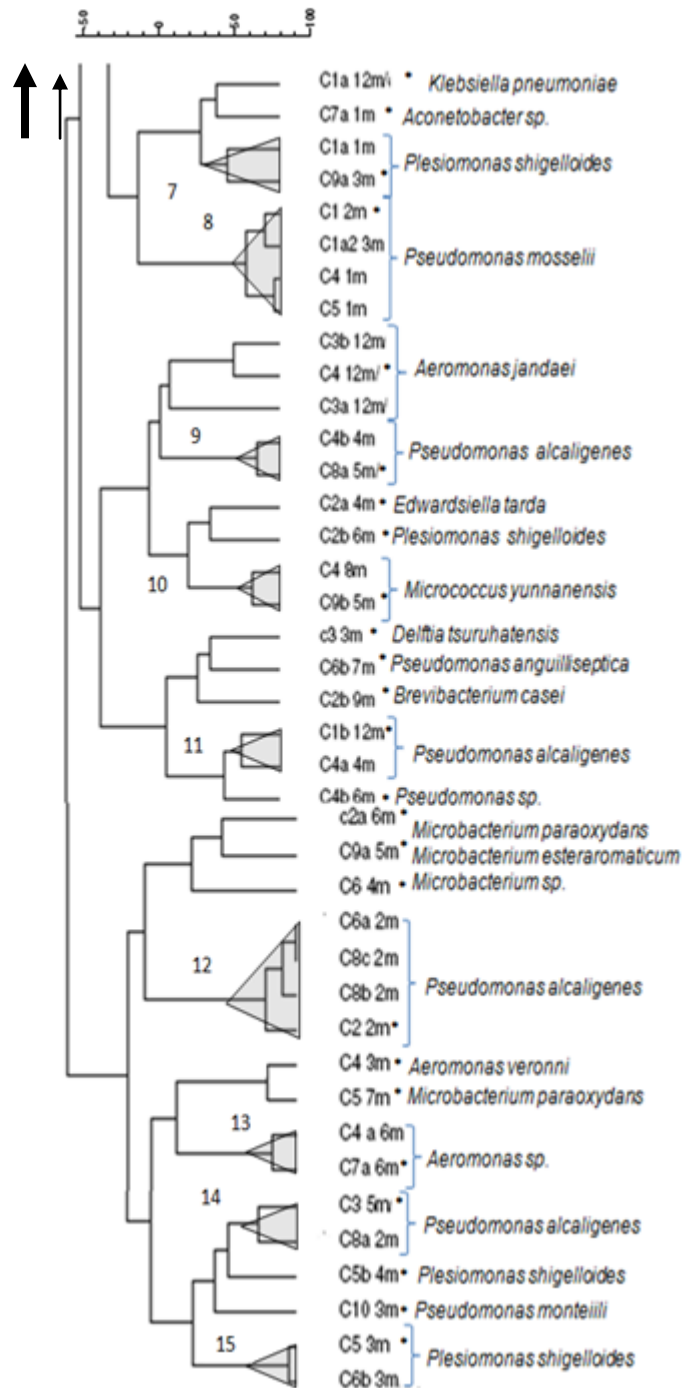


Figura 4. Dendrograma a partir de repPCR de los aislados de tilapias (*O. niloticus*). La similitud entre los patrones de bandas fue calculada empleando el coeficiente de similitud de Jaccard. El dendrograma fue construido con el algoritmo de Ward (optimización 0.35, 1.82%). El número indica la asignación que se le dio al cluster (valido <42% de similitud). * indica las cepas identificadas mediante la secuenciación del gen 16S RNAr.

De las especies identificadas genótipicamente, la que tuvo mayor porcentaje de prevalencia fue *Plesiomonas shigelloides* con un 16% con respecto al número total de cepas identificadas. Las especies con menor porcentaje de prevalencia fueron *Acinetobacter junii*, *Brevibacterium casei*, *Microbacterium esteraromaticum*, *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas monteii*, *Pseudomonas sp.*, *Rheinheimera sp.*, *Soonwooa buanensis* y *Klebsiella pneumoniae* con 1.3% cada una (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de prevalencia de las cepas identificadas.

Especie	% de prevalencia
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	15.6
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	14.3
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	7.8
<i>Aeromonas hydrophila</i>	5.2
<i>Pseudomonas mosselii</i>	5.2
<i>Acinetobacter sp.</i>	3.9
<i>Aeromonas jandaei</i>	3.9
<i>Aeromonas sp.</i>	3.9
<i>Aeromonas veronii</i>	3.9
<i>Bacillus sp.</i>	3.9
<i>Enterobacter hormaechei</i>	3.9
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	2.6
<i>Edwardsiella tarda</i>	2.6
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	2.6
<i>Proteus penneri</i>	2.6
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	2.6
<i>Acinetobacter junii</i>	1.3
<i>Brevibacterium casei</i>	1.3
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	1.3
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	1.3
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	1.3
<i>Pseudomonas monteiii</i>	1.3
<i>Pseudomonas sp.</i>	1.3
<i>Rheinheimera sp.</i>	1.3
<i>Soonwooa buanensis</i>	1.3
<i>Sphingobacterium sp.</i>	1.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.3

Con respecto a la microbiota encontrada en las tres presas estudiadas, las tilapias de la presa Adolfo López Mateos ubicada en Badiraguato presentó la mayor diversidad de especies bacterianas y las de la presa con mayor número de cepas identificadas fue la presa Sanalona en Culiacán (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de prevalencia de las cepas identificadas por presa estudiada.

Especie	% Porcentaje de prevalencia		
	Sanalona	Adolfo López M.	Dique IV
<i>Acinetobacter</i> sp.	7.1	4.5	-
<i>Acinetobacter junii</i>	3.5	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7.1	9.1	-
<i>Aeromonas jandaei</i>	-	-	11.1
<i>Aeromonas</i> sp.	-	4.5	7.4
<i>Aeromonas veronni</i>	3.5	4.5	3.7
<i>Bacillus</i> sp.	3.5	9.1	-
<i>Brevibacterium casei</i>	-	-	3.7
<i>Delftia tsuruhatensis</i>	-	4.5	3.7
<i>Enterobacter hormaechei</i>	10.7	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	3.5	4.5	-
<i>Microbacterium paraoxydans</i>	-	9.1	14.8
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	3.5	-	-
<i>Micrococcus yunnanensis</i>	-	9.1	-
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	-	4.5	-
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	14.3	4.5	25.9
<i>Proteus penneri</i>	7.1	-	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	10.7	13.6	18.5
<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	-	4.5	-
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	7.1	-	-
<i>Pseudomonas mosselii</i>	7.1	4.5	3.7
<i>Pseudomonas monteilii</i>	-	-	3.7
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	3.7
<i>Rheinheimera</i> sp.	-	4.5	-
<i>Soonwooa buanensis</i>	3.5	-	-
<i>Sphingobacterium</i> sp.	7.1	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	4.5	-

(-) Ausente.

Los géneros encontrados en las tilapias de las tres presas estudiadas fueron *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Pseudomonas*; los géneros *Proteus*, *Soonwooa* y *Sphingobacterium* (Figura 5) sólo fueron identificados en las de la presa Sanalona. En la presa Adolfo López M. solo fueron identificaron los géneros *Oceanobacillus*, *Rheinheimera* y *Klebsiella*, y por último el género *Brevibacterium* sólo fue identificado en la presa Dique IV.

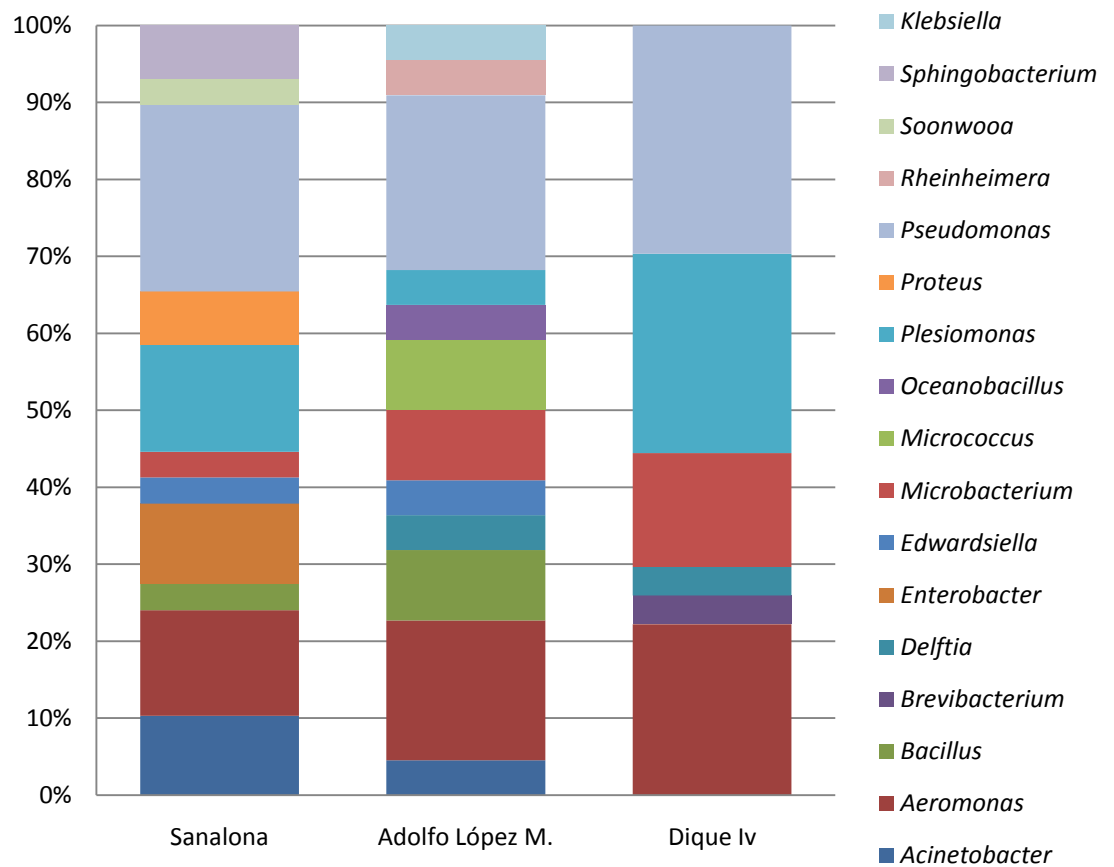


Figura 5. Porcentajes de prevalencia de los géneros identificados con respecto a las presas estudiadas.

5.2 Estudio de potenciales factores de virulencia extracelulares.

El estudio de los potenciales factores de virulencia extracelulares se realizó a 25 cepas (Tabla 8), de las cuales siete fueron aislados de órganos internos de tilapias aparentemente sanas y el resto fueron aislados de órganos y lesiones de tilapias con signos aparentes de enfermedad.

Tabla 8. Especies estudiadas y su fuente de aislamiento.

Cepa	Especie	Órgano	Signo de enfermedad	Presa
C1b 4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Riñón	Descamación, pérdida de un ojo	Sanalona
C5 10m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Lesion en ojo	Descamación, oscurecimiento	Sanalona
C4 12m	<i>Aeromonas jandaei</i>	Hígado	Exfoltalmia	Dique IV
C4 11m	<i>Aeromonas sp.</i>	Riñón	Ojos rojos	ALM*
C1 11m	<i>Aeromonas veronii</i>	Cerebro	Descamación	ALM
C4 3m	<i>Aeromonas veronii</i>	Riñón	Normal	Dique IV
C2 8m	<i>Bacillus sp.</i>	Hígado	Normal	ALM
C2b 9m	<i>Brevibacterium casei</i>	Cerebro	Normal	Dique IV
C3a 8m	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	Lesion en ojo	Descamación	ALM
C7 5m	<i>Edwardsiella tarda</i>	Riñón	Oscurecimiento de la piel	ALM
C7a 1m	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Riñón	Normal	Sanalona
C2 6m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Hígado	Ojos opacos	Dique IV
C3a 9m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	Cerebro	Normal	Dique IV
C1b 6m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Cerebro	Ojos opacos	Dique IV
C1b 7m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Lesion en ojo	Descamación	Sanalona
C2 5m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Riñón	Descamación	Sanalona
C9a 3m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Bazo	Normal	Dique IV
C2 2m	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Riñón	Normal	ALM
C2 7m	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Cerebro	Descamación	Sanalona
C4 1m	<i>Pseudomonas mosselii</i>	Riñón	Normal	Sanalona
C2b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	Hígado	Descamación, pérdida de un ojo	Sanalona
C7b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	Riñón	Exfoltalmia	Sanalona
C2 10m	<i>Sphingobacterium sp.</i>	Cerebro	Ojos opacos	Sanalona
C10 4m	<i>Vogesella perlucida</i>	Riñón	Exfoltalmia	Sanalona
C6 11M	<i>Vogesella perlucida</i>	Riñón	Normal	ALM

*ALM: Adolfo L. Mateos.

5.2.1 Cuantificación de proteínas y determinación de la actividad proteolítica presente en los PEC.

Para la determinación de la concentración de proteínas como la actividad proteolítica presentes en las muestras de PEC analizadas se utilizaron métodos colorimétricos. La concentración de proteína total estimada para las distintas muestras de PEC fue muy variable (240.87 – 12634.08 µg/ml) (Tabla 9).

En cuanto a la actividad proteolítica, Los PEC extraídos de los aislados del género *Aeromonas* presentaron los valores más altos de actividad proteolítica (0.45 - 1.23 U/ml) (Tabla 4), la cepa *A. veronii* (C1 11m) presentó la mayor actividad proteolítica con 1.23 U/ml. La mayoría de los aislados se encontraron en un nivel por debajo de 1 U/ml (0 – 0.90 U/ml).

No hubo una correlación significativa entre la concentración de proteínas y la actividad proteolítica ($r = -0.210$, $p = 0.315$, $n = 25$). Tal y como se muestra en la figura 6.

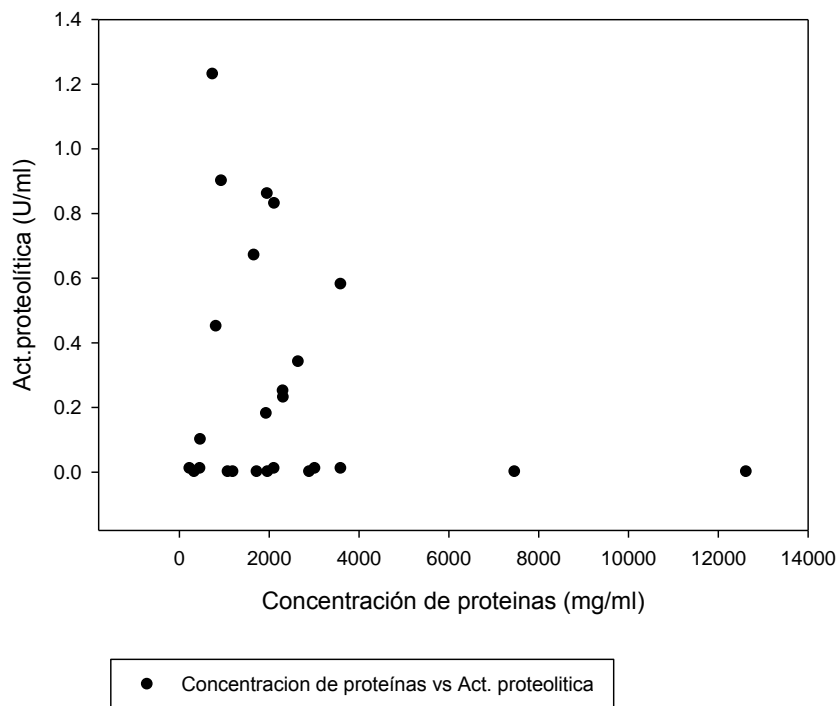


Figura 6. Correlación entre la concentración de proteínas y la actividad proteolítica.

Tabla 9. Cuantificación de proteína y actividad proteolítica en los PEC obtenidos.

Cepa	Especie	Proteína Total (µg/ml)	Actividad Proteolítica (U/ml)
C1b 4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	944.76	0.9
C5 10m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3604.95	0.58
C4 12m	<i>Aeromonas jandaei</i>	1964.17	0.86
C4 11m	<i>Aeromonas sp.</i>	828.25	0.45
C1 11m	<i>Aeromonas veronii</i>	750.58	1.23
C4 3m	<i>Aeromonas veronii</i>	1672.91	0.67
C2 8m	<i>Bacillus sp.</i>	12634.08	0
C2b 9m	<i>Brevibacterium casei</i>	1736.02	0
C3a 8m	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	3027.28	0.01
C7 5m	<i>Edwardsiella tarda</i>	1090.39	0
C7a 1m	<i>Enterobacter hormaechei</i>	240.87	0.01
C2 6m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	2124.37	0.83
C3a 9m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	478.74	0.1
C1b 6m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1978.74	0
C1b 7m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	2905.92	0
C2 5m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	3604.95	0.01
C9a 3m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1202.04	0
C2 2m	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	469.03	0.01
C2 7m	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	342.82	0
C4 1m	<i>Pseudomonas mosselii</i>	2318.54	0.25
C2b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	2323.4	0.23
C7b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	1944.76	0.18
C2 10m	<i>Sphingobacterium sp.</i>	2119.51	0.01
C10 4m	<i>Vogesella perlucida</i>	7478.74	0
C6 11M	<i>Vogesella perlucida</i>	2658.35	0.34

U: unidad de actividad proteolítica equivale a una absorbancia de 1.0 a 520 nm

5.2.2 Actividades enzimáticas de los PEC.

5.2.2.1 Sistema de determinación de actividades enzimáticas en placa.

Los PEC de los aislados del género *Aeromonas* presentaron actividad lipolítica cuando el sustrato utilizado fue el Tween 20 (Tabla 10), lo mismo ocurrió con la actividad gelatinolítica, amilolítica y actividad DNAasas. La actividad esculinolítica sólo se presentó en la especie *Sphingobacterium* sp. (C2 10m).

De los aislados estudiados, el 20% presentó actividad amilolítica siendo estos la mayoría del género *Aeromonas* y *Soonwooa buanensis* (cepas C2b 4m y C2b 7m). El 33.33% presentó actividad DNAasas, principalmente de la especie *Aeromonas veronii* (cepas C4 3m y C1 11m), *Aeromonas hydrophila* (cepas C1b 4m y C5 10m), *Plesiomonas shigelloides* (cepas C9a 3m y C1b 7m y *Soonwooa buanensis* (C7b 4m). El 53.33% de los aislados presentaron actividad gelatinolítica y el 36.67% actividad lipolítica.

Tabla 10. Actividades enzimáticas detectadas en los PEC de los diferentes aislados. Ensayo en placa

Cepa	Especie	Actividades Enzimáticas				
		AMI ^a	DNAasa	ESC	GEL	LIP T20
C1b 4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	-	+	+
C5 10m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	-	+	+
C4 12m	<i>Aeromonas jandaei</i>	+	+	-	+	+
C4 11m	<i>Aeromonas</i> sp.	+	+	-	+	+
C4 3m	<i>Aeromonas veronii</i>	+	+	-	+	+
C1 11m	<i>Aeromonas veronii</i>	+	+	-	+	+
C2 8m	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	+
C2b 9m	<i>Brevibacterium casei</i>	-	-	-	+	-
C3a 8m	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	-	-	-	+	-
C7 5m	<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-	-	-	-
C7a 1m	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	-	-	+	+
C2 6m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	-	-	-	+	-
C3a 9m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	-	-	-	+	-
C9a 3m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	+	-	-	-
C2 5m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	-	-	-
C1b 6m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-	-	-	-
C1b 7m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	+	-	-	-
C2 2m	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	-	-	-	+	-
C2 7m	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	-	-	-	-	-
C4 1m	<i>Pseudomonas mosselii</i>	-	-	-	+	-
C2b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	-	-	-	+	-
C7b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	+	+	-	+	+
C2 10m	<i>Sphingobacterium</i> sp.	-	-	+	-	-
C10 4m	<i>Vogesella perlucida</i>	-	-	-	-	+
C6 11M	<i>Vogesella perlucida</i>	-	+	-	+	+

^a AMI: hidrólisis gelatina; ESC: hidrólisis esculina; GEL: hidrólisis gelatinasa; LIP T20: hidrólisis del Tween 20 (lipasa); +: Actividad positiva; -: Actividad negativa

5.2.2.2 Ensayo de citotoxicidad.

La citotoxicidad de los PEC se ensayó con células HeLa las cuales constituyen una línea de células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma cervical (Toranzo *et al.* 1983). El 100% de los PEC probados mostraron actividad citotóxica sobre estas células (Tabla 11). Los efectos citotóxicos observados consistieron en la destrucción parcial o total de las monocapas celulares. Las cepas *Aeromonas hydrophila* (C1b 4m y C5 10m), *Aeromonas veronii* (C4 3m y C1 11m), *Aeromonas jandaei* (C4 12m), *Soonwooa buanensis* (C2b 4m y C7b 4m), *Microbacterium paraoxydans* (C2 6m) y *Vogesella perlucida* (C6 11m) presentaron destrucción total del tapiz celular durante las primeras doce horas post-infección, el resto de los aislados presentaron sólo destrucción parcial del tapiz celular durante las primeras doce horas y durante el desarrollo del análisis y algunos casos durante las primeras doce horas no se observaron cambios sobre la monocapa celular (Figura 7).

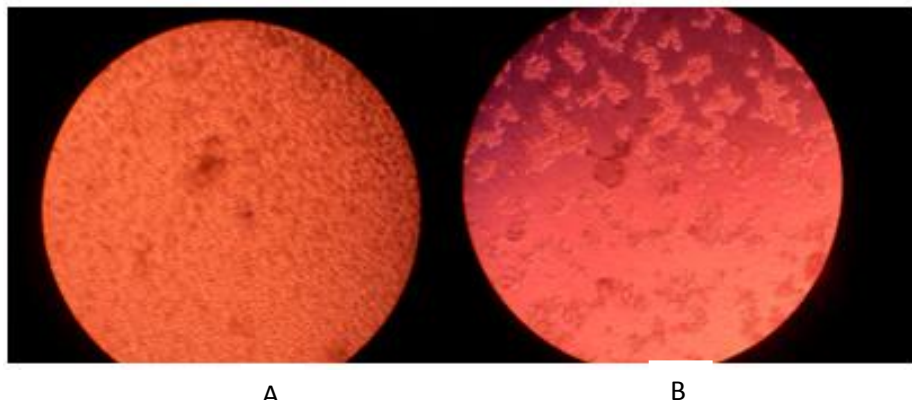


Figura 7. Ensayo de citotoxicidad de células HeLa. A) Control negativo (Células HeLa+PBS), B) Destrucción total del tapiz celular por *Pseudomonas mosselii* (C4 1m).

Tabla 11. Actividad citotóxica de los PEC de los diferentes aislados sobre la línea células HeLa.

Cepa	Especie	Actividad citotóxica.		
		12 h	24 h	48 h
C1b 4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	DT	DT	DT
C5 10m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	DT	DT	DT
C4 12m	<i>Aeromonas jandaei</i>	DT	DT	DT
C4 11m	<i>Aeromonas</i> sp.	DP	DP	DP
C4 3m	<i>Aeromonas veronii</i>	DT	DT	DT
C1 11m	<i>Aeromonas veronii</i>	DT	DT	DT
C2 8m	<i>Bacillus</i> sp.	DP	DP	DP
C2b 9m	<i>Brevibacterium casei</i>	DP	DP	DP
C3a 8m	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	DP	DP	DP
C7 5m	<i>Edwardsiella tarda</i>	DP	DP	DP
C7a 1m	<i>Enterobacter hormaechei</i>	SD	DP	DP
C2 6m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	DT	DT	DT
C3a 9m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	DP	DP	DP
C9a 3m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	SD	DP	DP
C2 5m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	DP	DP	DP
C1b 6m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	DP	DP	DP
C1b 7m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	DP	DP	DP
C2 2m	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	DP	DP	DP
C2 7m	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	DP	DP	DP
C4 1m	<i>Pseudomonas mosselii</i>	DT	DT	DT
C2b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	DT	DT	DT
C7b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	DT	DT	DT
C2 10m	<i>Sphingobacterium</i> sp.	DP	DP	DP
C10 4m	<i>Vogesella perlucida</i>	SD	DP	DP
C6 11M	<i>Vogesella perlucida</i>	DT	DT	DT

DT: destrucción total del tapiz celular; DP: destrucción parcial del tapiz celular; SD : sin destrucción del tapiz celular.

5.2.2.3 Actividad hemolítica de los PEC.

La actividad hemolítica de los productos extracelulares fue positiva desde las 24 horas para las cepas *Aeromonas hydrophila* (C1b 4m y C5 10m), *Aeromonas veronii* (C4 3m y C1 11m), *Aeromonas jandaei* (C4 12m), *Pseudomonas alcaligenes* (C2 2m), *Pseudomonas mosselii* (C4 1m) y *Vogesella perlucida* (C6 11m) (tabla 12). El 52% de los productos extracelulares estudiados presentaron actividad hemolítica en agar sangre suplementado con 5% de eritrocitos de oveja.

Tabla 12. Actividad hemolítica de los PEC estudiados.

Cepa	Especie	Actividad citotóxica	
		12 h	24 h
C1b 4m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+
C5 10m	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+
C4 12m	<i>Aeromonas jandaei</i>	+	+
C4 11m	<i>Aeromonas sp.</i>	-	-
C4 3m	<i>Aeromonas veronii</i>	+	+
C1 11m	<i>Aeromonas veronii</i>	+	+
C2 8m	<i>Bacillus sp.</i>	-	+
C2b 9m	<i>Brevibacterium casei</i>	-	-
C3a 8m	<i>Delftia tsuruhatensis</i>	-	-
C7 5m	<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-
C7a 1m	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	+
C2 6m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	-	+
C3a 9m	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	-	-
C9a 3m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-
C2 5m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-
C1b 6m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-
C1b 7m	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	-	-
C2 2m	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	+	+
C2 7m	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	-	-
C4 1m	<i>Pseudomonas mosselii</i>	+	+
C2b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	-	-
C7b 4m	<i>Soonwooa buanensis</i>	-	+
C2 10m	<i>Sphingobacterium sp.</i>	-	-
C10 4m	<i>Vogesella perlucida</i>	-	+
C6 11M	<i>Vogesella perlucida</i>	+	+

5.3 Patogenicidad y factores de virulencia.

5.3.1 Ensayos preliminares.

5.3.1.1 Infecciones experimentales con PEC en lenguados (*Solea vulgaris*).

De las ocho cepas ensayadas sólo tres presentaron mortalidades del 80% con *Pseudomonas mosselii* (C4 1m), 60% con *Aeromonas hydrophila* y 40% con *Microbacterium paraoxydans* (C2 6m). El resto de las cepas no causaron mortalidades. Los lenguados presentaban nado errático y oscurecimiento de la piel antes de morir.

Las mortalidades con la cepa *Aeromonas hydrophila* (C5 10) se presentaron durante las primeras 24 horas post inyección y respecto a las otras dos cepas las mortalidades fueron durante las primeras 48 horas.

5.3.2 Infección experimental en tilapias (*O. niloticus*) y PEC de cepas potencialmente patógenas.

Sólo dos de las doce cepas ensayadas con las tilapias causaron porcentajes de mortalidad del 100%, los PEC de *Aeromonas hydrophila* (C5 10m) causaron una mortalidad del 100% durante las primeras 12 horas. Las infecciones con células bacterianas de la misma cepa causaron también una mortalidad del 100% entre las 12 y 18 horas post-infección cuando el inóculo inyectado fue 1.4×10^8 UFC/ml (dosis de 5.6×10^6 UFC/g; Figura 8). Tanto los organismos infectados con células y los inyectados con los PEC presentaron nado errático y letargia, oscurecimiento de la piel, inflamación del estómago y presencia de líquido sanguinolento al momento de abrirlas para hacerles el análisis bacteriológico.

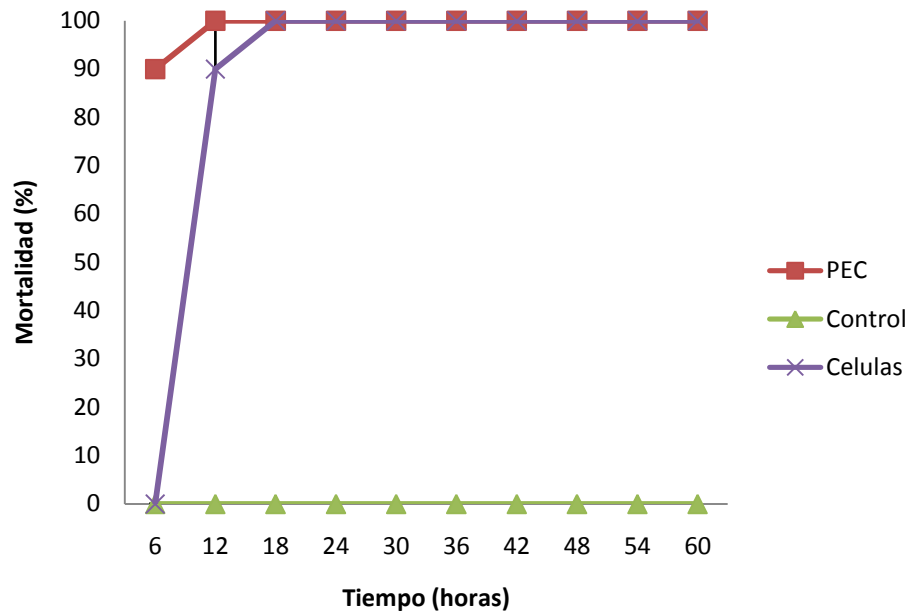


Figura 8. Promedio de mortalidad en tilapia (*O. niloticus*) con células y PEC de *Aeromonas hydrophila* (C5 10m).

La otra cepa que causó mortalidades del 100% fue *Pseudomonas mosselii* (C4 1m), dichas mortalidades sólo se observaron cuando los organismos fueron inyectados con los PEC. Durante las primeras seis horas post-inyección, se tenía ya una mortalidad del 100%. Las infecciones con las células bacterianas no produjeron mortalidad con un inóculo de 1.5×10^8 UFC/ml (dosis de 6×10^5 UFC/g). Las tilapias inyectadas con los PEC presentaron oscurecimiento de la piel y nado errático.

Las demás cepas ensayadas no produjeron mortalidad ni signos de enfermedad durante los siete días del experimento tanto inyectados con PEC como células bacterianas vivas.

Se realizó una infección con la cepa *Escherichia coli* (CAIM 21) con la finalidad de descartar que las tilapias hayan muerto por choque tóxico bacteriano, durante esta infección no se presentó mortalidad con un inóculo

de 2×10^8 UFC/ml, ni con células bacterianas vivas ni sus los productos extracelulares.

5.3.3 Infecciones experimentales con células y PEC de la cepa *Aeromonas hydrophila* (C5 10m) en tilapias (*O. niloticus*).

Se obtuvo un mortalidad del 80% de los organismos infectados con células a una densidad de 7.8×10^8 UFC/ml, una dosis de 3.1×10^6 UFC/g, a las 48 horas post-infección. Se obtuvo un 100% de mortalidad durante las primeras doce horas post-infección con los productos extracelulares (Figura 9). En los organismos inyectados con PBS, los cuales se tomaron como control, no hubo mortalidades.

Los organismos infectados con los productos extracelulares presentaron oscurecimiento de la piel, nado errático e inflamación del estómago. La misma sintomatología fue detectada para los organismos inyectados con células bacterianas vivas solo que se observaban de forma más tardía que con los PEC.

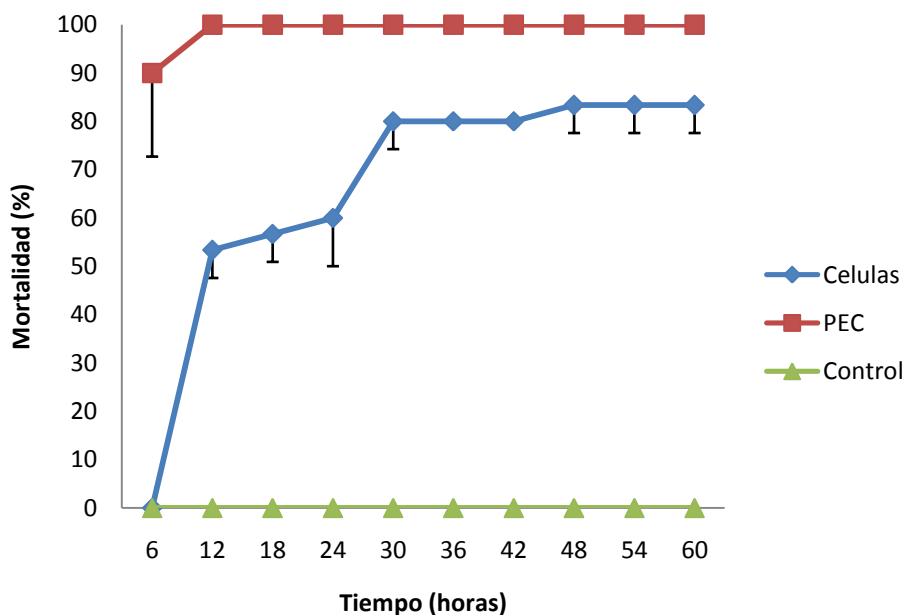


Figura 9. Mortalidad de tilapia (*O. niloticus*) inyectadas con células y PEC de *Aeromonas hydrophila* (C5 10m).

VI. DISCUSIÓN.

6.1 Identificación de los aislados bacterianos.

Este estudio constituye la primera descripción taxonómica de la microbiota de tilapia viva (*O. niloticus*) obtenida a partir de órganos internos y algunas lesiones, donde la caracterización se realizó en base a perfiles fenotípicos y genotípicos.

Muchas de las especies bacterianas analizadas en este estudio han sido reportadas y objeto de numerosas revisiones (Farmer y Hickman-Brenner, 1992; Ruimy *et al.*, 1994), consecuencia de una gran variabilidad a nivel fenotípico, lo que convierte la identificación en una tarea difícil. La aplicación de métodos moleculares como la secuenciación del 16S rARN facilita la interpretación de los perfiles fenotípicos y permite realizar identificaciones más precisas de estos microorganismos (Montez *et al.*, 2003). Este gen es una molécula que contiene regiones altamente conservadas que pueden elucidar relaciones entre clases o filos. Sin embargo también tiene regiones variables que pueden discriminar entre especies y géneros (Stackebrandt y Rainey, 1995; Thompson *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, la caracterización de los aislados bacterianos se ha basado tanto en las propiedades fenotípicas, genotípicas (rep-PCR), así como en el análisis de la secuencia de un fragmento del ADNr 16S, lo que permitió realizar de forma acertada su adscripción taxonómica.

En este trabajo se mostró que la carga bacteriana presenta una gran variedad taxonómica en los diferentes órganos analizados de las tilapias (*O. niloticus*) tanto aparentemente sanas como enfermas.

La microbiota de las tilapias analizadas fue dominada principalmente por bacterias Gram-negativas. Se identificaron 27 especies bacterianas de las cuales los géneros dominantes fueron *Plesiomonas*, *Microbacterium*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Respecto a las presas estudiadas la presa

Adolfo López Mateos fue la que presentó una gran variedad de las especies identificadas, por el contrario donde se identificó menor variedad es en la presa Dique VI. Especies como *Pseudomonas anguilliseptica*, *Enterobacter hormaechei*, *Soonwooa buanensis*, *Acinetobacter junii*, *Sphingobacterium* sp. y *Reinheimera* sp. solo fueron identificadas en la presa Sanalona. Con respecto a la presa Adolfo López Mateos se identificaron las especies *Oceanobacillus oncorhynchi*, *Brevibacterium casei* y *Microbacterium esteraromaticum*. En Dique VI se identificó *Klebsiella pneumoniae* la cual no se identificó en ninguna de las dos presas.

Los resultados del presente estudio coinciden parcialmente con los realizados por Sakata *et al.* (1984) donde las bacterias predominantes en el intestino en las tilapias son las del género *Vibrio*, *Aeromonas* y *Pseudomonas*. Sugita *et al.* (1982) demostró que el intestino de tilapias contiene una gran variedad de especies bacterianas, los géneros predominantes fueron *Pseudomonas*, *Aeromonas* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En otros estudios realizados por Al-Harbi y Uddin (2005) encontraron que los géneros dominantes en la microbiota de la tilapia viva fueron *Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* y *Streptococcus*. Cabe señalar que en el presente estudio no se encontraron especies del género *Vibrio* ya que los aislados bacterianos provienen de presas de agua dulce y la mayoría de los estudios anteriores son en especies cultivadas en sistemas de agua salobres. Probablemente las diferencias encontradas entre los diferentes estudios con respecto a este trabajo, debido a que en estos sólo se realizaron identificaciones fenotípicas.

Los resultados obtenidos difieren con los señalados por Chowdhury *et al.* (1989), donde *Micrococcus* sp. fue la especie bacteriana predominante en la tilapia, encontrando también una alta prevalencia las especies *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Corynebacterium urealyticum*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholera* en el intestino de tilapias. Ruane *et al.* (1977) observaron la presencia significativa de coliformes, incluyendo

Escherichia coli en estanques de cultivo a 24-29 °C, coincidiendo con los resultados obtenidos por Morales et al. (2004).

En este estudio existen diferencias importantes respecto a la identificación de los aislados caracterizados mediante las pruebas fenotípicas (pruebas bioquímicas y aplicación del sistema miniaturizado API 20E) y la identificación genotípica.

Mediante la identificación fenotípica los géneros *Plesiomonas*, *Pseudomonas* y *Aeromonas* fueron los que presentaron los porcentajes de prevalencia más altos, coincidiendo parcialmente con los obtenidos mediante la identificación genotípica, solo que en este último se identificó además el género *Microbacterium*. Mediante la identificación fenotípica fueron identificados 14 géneros bacterianos y mediante la identificación genómica se identificaron 21 géneros. Estos datos ponen en relieve las discrepancias entre los métodos bioquímicos y los moleculares. Por ello, se considera un método de caracterización de escaso poder discriminatorio y pobre reproducibilidad (Janda et al., 1996; Borrell et al., 1997). En cambio los de identificación genotípica son métodos más precisos (Borrel et al., 1997, 1998; Figueras et al., 2000; Castro-Escarpulli et al., 2003).

6.2 Análisis de potenciales factores de virulencia extracelulares.

Varios autores han descrito el papel de los productos extracelulares de bacterias patógenas como importantes factores de virulencia (Fouz et al., 1990; Magariños et al., 1992; Fouz et al., 1993; Biosca y Amaro, 1996; Belabona et al., 1998; Perez et al., 1998; Wang et al., 1998; Farto et al., 2006).

La actividad proteolítica de los PEC se determinó mediante un ensayo colorimétrico utilizando el sustrato azocoll, así como ensayos en medios de

cultivo con gelatina como sustrato. En el caso de los aislados del género *Aeromonas*, donde el nivel de actividad proteolítica fue elevado, se observaron resultados positivos en todas las muestras de PEC para las actividades de gelatinolítica, DNAasas y lipasa (Tabla 9). Las cepas de *Microbacterium paraoxydans* (C2 6m) y *Pseudomonas moselii* (C4 1m), presentaron sólo actividad en placas con gelatina como sustrato. En el resto de las muestras analizadas no fue posible correlacionar los niveles de actividad proteolítica con la hidrólisis de sustratos específicos. Esto pone de manifiesto la presencia en estos PEC de diferentes actividades proteolíticas y por ello la imposibilidad de detectarlas con el empleo de un solo sustrato.

Como se ha mencionado anteriormente, los mayores niveles de actividad proteolítica, así como la actividad de proteasas más amplia, se encontraron en las muestras de PEC procedentes de los aislados del género *Aeromonas*; especies de este género se ha encontrado que poseen factores de virulencia que podrían estar involucrados en los mecanismos de infección (Pemberton et al., 1997). En este estudio principalmente las especies *Aeromonas veronii* (C1 11m), *Aeromonas jandaei* (C4 12m) y *Aeromonas hydrophila* (C5 10m) presentaron los niveles más altos de actividad proteolítica. Diversos autores han correlacionado dicha actividad con su capacidad de inducir patologías en peces, asociando dicha patogenicidad con sus productos extracelulares (Austin y Adams, 1996; González et al., 2001).

Los productos extracelulares pueden contener diferentes factores de virulencia (proteasas, DNAsas, elastasas, lectinasas, amilasas, gelatinasas hemolisinas, lipasas) los cuales pueden alterar la membrana plasmática del huésped y juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades, ya sea en humano o en peces (Howard et al., 1996; Pemberton et al., 1997; Santos et al., 1999; Murray et al., 1999; Soler et al., 2002).

Por lo tanto se puede considerar a las cepas del género *Aeromonas* aquí analizadas como productoras de una gran cantidad de enzimas extracelulares, las cuales degradan activamente complejos protéicos, polisacáridos, mucopolisacáridos y moléculas que contienen lípidos. Estas enzimas son útiles en la identificación de la bacteria, en sus funciones fisiológicas y son considerados frecuentemente factores asociados a la virulencia, en éste y en otros géneros bacterianos (Pemberton et al., 1997).

En el presente estudio, se observó que el 83.3% de los aislados del género *Aeromonas* analizados presentaban citotoxicidad sobre la línea celular HeLa (Tabla 10). La capacidad citotóxica de los miembros de este género ya se ha descrito previamente (Santos et al., 1988; Namdari y Bottone, 1990; Pemberton et al., 1997; Khalil y Mansour, 1997). Algunas cepas de este género presentan citotoxinas que les permiten degradar las células del hospedero facilitando la proliferación de células patógenas. De acuerdo a la relación filogenética existente entre especies del género *Vibrio* y *Aeromonas*, los resultados podrían ser comparables con los obtenidos por Toranzo y Barja (1993) quienes señalan que algunas especies del género *Vibrio* presentan exoenzimas, tales como hemolisinas y exotoxinas, siendo estas citotóxicas en líneas celulares humanas y altamente letales para los peces y algunas especies de animales. La función de estas exotoxinas en especies de ambos géneros parece estar relacionada con la producción de daños en las células epiteliales del hospedero, lo que supone una puerta de entrada del patógeno, posibilitando la producción de una infección sistémica. En otro estudio Wang et al. (1998) señalan que los PEC de *Photobacterium damsela* causa cambios citotóxicos en las líneas celulares epiteliales de peces.

Los aislados del género *Aeromonas* también presentaron actividad hemolítica, Namdari y Bottone (1990) en su estudio consideran la producción de toxinas hemolíticas como una fuerte evidencia del potencial patógeno en

las bacterias de género *Aeromonas*, sin embargo en *Aeromonas* no hemolíticas han sido implicados como patógenos.

Respecto a los demás aislados analizados, dos cepas, *Microbacterium paraoxydans* (C2 6m) y *Pseudomonas mosselii* (C4 1m) presentaron actividad proteolítica elevada, sólo se observaron resultados positivos en las muestras de sus PEC para la actividad gelatinolítica. Existen estudios en donde se ha demostrado que bacterias del género *Pseudomonas* producen una serie de proteínas extracelulares *in vitro* (La Peyre *et al.*, 1995; Faisal *et al.*, 1999), incluyendo proteasas las cuales favorecen a la propagación dentro del huésped y facilitan la proliferación de patógenos (La Peyre *et al.* 1996).

De las demás especies bacterianas, analizadas tales como *Brevibacterium casei*, *Delftia tsuruhatensis*, *Enterobacter hormaechei*, *Soonwooa buanensis*, *Sphingobacterium* sp. y *Vogesella perlucida* no se tienen aun reportes en la literatura sobre la patogenicidad de sus productos extracelulares, pero con los resultados obtenidos en este trabajo se puede decir que estas cepas pudieran ser patógenas para las tilapias cuando existen las condiciones favorables para su proliferación y los peces se encuentren bajo un sistema inmunológico deprimido consecuencia del estrés por las altas densidades de organismos en los cultivos, factores fisicoquímicos del agua (temperatura, pH, falta de oxígeno, etc.), las cuales pueden actuar de forma similar, debido a que hay pruebas claras de que la proteasa está presente en los PEC de diferentes cepas bacterianas y que es independiente del origen y la especie estudiada (Farto *et al.* 2006).

6.3 Infección experimental en tilapias (*O. niloticus*) y PEC de cepas potencialmente patógenas.

Las cepas ensayadas fueron escogidas en base a su alta actividad proteolítica y las que presentaron diferentes actividades enzimáticas como DNAasas, esculinasas, lipasas, amilasas y gelatinasas. Además de presentar actividad citotóxica sobre la línea celular HeLa a las doce horas post-infección. Debido a que en la literatura se señala que la producción cuantitativa y cualitativa de proteasas es importante para el establecimiento de la virulencia de una cepa en particular (Thune *et al.*, 1986; Santos *et al.*, 1988, Toranzo y Barja *et al.*, 1993).

De las doce cepas ensayadas en el presente estudio, sólo dos causaron mortalidades del 100%, estas fueron las cepa C5 10m de *Aeromonas hydrophila* y la C4 1m *Pseudomonas mosselii*. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan parcialmente con lo señalado por Rey *et al.* (2009), quienes obtuvieron mortalidades del 100% cuando inyectaron intraperitonealmente una densidad de 5.8×10^7 UFC/ml de una cepa de *Aeromonas hydrophila* (kj99) a organismos de un peso corporal de 35 g y a otros del mismo peso 100 μ l de sus PEC. Las tilapias infectadas en este trabajo con células bacterianas vivas de *Aeromonas hydrophila* a una densidad de 7.8×10^8 UFC/ml comenzaron a morir siete horas post-infección y dichas mortalidades cesaron a las 12 horas post-infección; los organismos infectados con PEC de estas cepas murieron después de la primera hora post-infección y las mortalidades culminaron a las 12 horas post-infección. Posiblemente las diferencias en cuanto a las horas de mortalidad son por el contacto directo de la concentración de proteínas a las cuales se sometieron los peces principalmente a las proteasas existentes en los mismos. La sintomatología observada fue, tanto en los organismos infectados con células como en los inyectados con los PEC, nado errático y letargia, oscurecimiento de la piel, inflamación del estómago y presencia de líquido sanguinolento, así

como hemorragias en la piel, dichos resultados concuerdan con los observados por Scott (1977) y Liu *et al.* (1993).

Los síntomas fueron similares a los descritos en la trucha arco iris infectadas de forma natural con *Aeromonas hydrophila* (Aydin *et al.*, 1997) y también en el bagre infectados experimentalmente con otra cepa de *A. hydrophila* (Gaines 1972). Hemorragias similares y líquido sanguinolento ha sido observado en varias especies de peces infectados con *A. hydrophila* (Gaines, 1972; Roberts, 1993; Aydin *et al.*, 1997).

Los cambios producidos por los PEC tales como nado errático y letargia, oscurecimiento de la piel, inflamación del estómago y presencia de líquido sanguinolento, así como hemorragias en la piel fueron similares a los observados con los productos extracelulares de *Vibrio anguillarum* en la trucha arco iris (Lamas *et al.*, 1994). Por su parte, Fouz *et al.* (1995) observaron signos clínicos graves y lesiones histológicas con los productos extracelulares de *Photobacterium damsela* en lenguados (*Scophthalmus maximus*). La gravedad de las lesiones de tejidos inducidos en este estudio puede deberse principalmente a la actividad de proteasas. Wang *et al.*, (2003) sugirió que la causa de la citotoxicidad de las especies de *Aeromonas* y sus productos extracelulares puede ser multifactorial y que los productos (α -y β -hemolisinas, DNAasas, enterotoxinas proteasas, y RNasas) actúan solos o en conjunto. Sin embargo, la composición de los productos extracelulares de cepas de *A. hydrophila* podría ser diferente y las condiciones del medio de cultivo y la temperatura también podría afectar a su composición (Khalil y Mansour, 1997). Una amplia gama de funciones biológicas relacionadas con la β -hemolisina de *A. hydrophila* se ha descrito, incluidas las actividades hemolíticas y proteolíticas letales para los peces (Khalil y Mansour 1997, Nelson *et al.*, 1997).

Algunos de los productos extracelulares liberados durante la infección con cepas de *Aeromonas hydrophila* puede desempeñar un papel importante en

la patogénesis de dicha cepa, probablemente induce la degeneración y necrosis (Khalil y Mansour, 1997). La actividad hemolítica encontrada en las células vivas de *Aeromonas hydrophila* se ha correlacionado con la producción en vivo de áreas hemorrágicas en los desafíos experimentales (Rey et al., 2009).

Respecto a la cepa C4 1m de *Pseudomonas mosselii* que produjo mortalidades en las tilapias, no se tiene información sobre estudios de infecciones experimentales, pero se cree que su forma de actuación sobre los organismos es de forma similar a las bacterias de género *Aeromonas*. Se tienen reportes de mortalidades en peces causadas por bacterias de este género, por ejemplo Miyashita (1984) encontró que *Pseudomonas fluorescens* causa mortalidades crónicas en crías de tilapias (*O. niloticus*) en Japón. Las crías de tilapias presentaron exoftalmia, coloración oscura en el cuerpo, lesiones nodulares, necrosis focal en el hígado, bazo, riñón y branquias, inflamación en la vejiga natatoria, abscesos en los ojos, bazo y vejiga natatoria y formulación de granulomas. Cabe señalar que en este estudio no se observaron dichos signos, pero si se observó mortalidad en los organismos.

De las demás cepas ensayadas aun no se tienen estudios en donde hayan sido aisladas de tilapias (*O. niloticus*), pero algunas de estas especies han sido reportadas como patógenos para peces y humanos, así como otros mamíferos.

Rahman et al., (2002) aisló *Aeromonas veronii* de peces tales como; *Clarias gariepinus*, *Puntius gonionotus*, *Labeo rohita*, *Catla catla* y *Channa striatus* de diferentes granjas de Bangladesh. Dichos peces presentaban signos de enfermedad como profundas úlceras hemorrágicas en la mitad del cuerpo y regiones de la cola. En este estudio la cepas C4 3m y C1 11m de *Aeromonas veronii* ensayadas no causaron mortalidad ni signos de enfermedad en las

tilapias. Estas diferencias se pueden dar debido a que son bacterias de la misma especie pero diferentes cepas.

Respecto a *Pseudomonas anguilliseptica* se ha reportado como patógeno para peces (Daly, 1999) y se aisló por primera vez de *Anguilla japonica* en Japón (Wakabayashi y Egusa, 1972). Kou y Kou (1978) describió la enfermedad en cría de *Anguilla anguilla* y *A. japonica*, siendo *A. japonica* la más susceptible a la infección por *Pseudomonas anguilliseptica* (Muroga *et al.*, 1975). Desde entonces, la “enfermedad de las manchas de color rojo” ha sido reportada en la anguila europea en Dinamarca (Møllgaard y Dalsgaard, 1987), también se tienen reportes de infecciones en peces; salmón Atlántico (*Salmo salar*), trucha de mar (*Salmo trutta*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y pez blanco (*Coregonus* sp.) (Wiklund y Dalsgaard, 1987; Wiklund y Bylund, 1990; Wiklund y Lönnström, 1994).

Otra cepa que en el presente trabajo no causó mortalidad, sin embargo se tienen reportes de ser patógena es *Edwardsiella tarda*, la cual es causante de Edwardsielosis, provocando mortalidades a especies de peces de vida silvestre y en granjas (Kusuda y Salati, 1993; Thune *et al.*, 1993; Rashid *et al.*, 1994). Hay poca información disponible sobre la virulencia y estructura genética de este patógeno. Factores de virulencia como la adhesión y la invasión de las células epiteliales (Strauss *et al.*, 1997; Ling *et al.*, 2000.), la producción de hemolisina y otras toxinas (Janda *et al.*, 1991a; Suprpto *et al.*, 1996), y la resistencia al suero (Janda *et al.*, 1991b) han sido implicados en la patogénesis de *Edwardsiella tarda*. Otros genes de virulencia siguen siendo desconocidos.

Por otro lado, *Microbacterium paraoxydans* fue aislado por primera vez de sangre de humano (Laffineur *et al.*, 2003; Gneiding *et al.*, 2008) y de hígado de ratones de laboratorio (Buczolits *et al.*, 2008), hasta la fecha no se tienen reportados casos de infecciones en peces, tal y como ocurrió en este estudio.

La especies *Soonwooa buanensis* y *Vogesella perlucida* son especies Gramnegativas. *Soonwooa buanensis* fue aislada del agua del mar amarillo en Korea, perteneciente a la familia *Flavobacteriaceae* (Young *et al.*, 2009). De *Vogesella perlucida* se reportó un aislado en agua de manantial en el distrito de Tainan, Taiwan (Chou *et al.*, 2008) no se cuenta con información en donde hayan sido patógenas para peces.

En resumen, se identificaron 27 géneros bacterianos de los cuales *Plesiomonas*, *Microbacterium*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* fueron los que presentaron los mayores porcentajes de prevalencia. La cepas C5 10m de *Aeromonas hydrophila* y C4 1m de *Pseudomonas mosselii* son patógenas para la tilapia (*O. niloticus*) al presentar en sus productos extracelulares enzimas tales como proteasas, DNAsas, amilasas, gelatinasas, y lipasas, las cuales alteran la membrana plasmática del huésped permitiendo la proliferación de las células patógenas y el desarrollo de enfermedades. Aun así no se descarta la patogenicidad de las demás cepas estudiadas debido a que hay pruebas claras de que las proteasas están presentes en los PEC y que sus funciones son independientes del origen y la especie estudiada.

VII. CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede deducir las siguientes conclusiones:

1.- Las técnicas de identificación revelaron 27 especies diferentes demostrando que la microbiota de tilapia (*O. niloticus*) presenta un alta variedad taxonómica.

2.- Las especies identificadas con mayor frecuencia fueron: *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Microbacterium paraoxydans*, *Aeromonas hydrophila* y *Pseudomonas mosselii*.

3.- Los métodos moleculares son más precisos y permiten una identificación correcta a diferencia de los métodos fenotípicos.

4.- Los productos extracelulares (PEC) de las cepas patógenas estudiadas son importantes factores de virulencia en base a su elevada toxicidad *in vivo* e *in vitro* y a su contenido en exoenzimas.

5.- La cepa C5 10m de *Aeromonas hydrophila* es patógena para las tilapias (*O. niloticus*) a una dosis de 5.6×10^6 UFC/g, al igual que sus productos extracelulares.

6.- La cepa C4 1m de *Pseudomonas mosselii* causó mortalidad con sus productos extracelulares a tilapias (*O. niloticus*).

7.- Por el contrario las cepas C1b 4m de *Aeromonas hydrophila*, C4 12m de *Aeromonas jandaei*, C4 11m de *Aeromonas* sp., C4 3m y C1 11m de *Aeromonas veronii*, C2 5m de *Edwardsiella tarda*, C2 6m *Microbacterium paraoxydans*, C2 7m de *Pseudomonas anguilliseptica* y C7b 4m y C2b 4m de *Soonwooa buanensis*; no son patógenas para la tilapia (*O. niloticus*).

VIII. RECOMENDACIONES.

Para estudios posteriores de los potenciales factores extracelulares de virulencia se recomienda aplicarles el sistema miniaturizado API ZYM, con la finalidad de hacer una caracterización más amplia de las actividades enzimáticas.

Realizar la detección de genes de virulencia de los posibles patógenos mediante la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y utilizando los cebadores y condiciones publicados, para aerolisinas/hemolisinas, lipasas extracelulares (lip, lipH3, pla, plc y GCAT); Proteasas y DNAsas (Soler et al., 2002)

Se recomienda establecer una dosis letal 50 (DL₅₀) con las cepas que resultaron patógenas en este estudio, estableciendo 20 organismos (Labella, 2010); para cada dosis a ensayar entre 10² y 10⁸ UFC/ml mediante una inyección intraperitoneal y establecer un grupo control. Durante 7 días recolectar los peces muertos, considerándose la mortalidad consecuencia de la dosis bacteriana inoculada sólo cuando se asile el agente bacteriano en cultivo puro apartir de los órganos internos de pez.

Realizar un bioensayo con la DL₅₀ de la cepa C5 10m de *Aeromonas hydrophila* en donde se inyecten células vivas y sus productos extracelulares a la par, realizar muestreos cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de los órganos internos de los peces para obtener una descripción detallada de la distribución en los tejidos y los cambios morfológicos inducidos.

IX. LITERATURA CITADA

- Aban, S.M., Baad, E.G.V., Parreno, S.C. & Garcia, A.C. (1999).** Bacterial diseases and salinity tolerance of red tilapia *Oreochromis aureus* and their hybrids (red tilapia-*Oreochromis aureus*). Paper presented at the Fourth Symposium on Diseases in Asian Aquaculture: Aquatic Animal Health for Sustainability, Cebu City, Philippines, 22–26 November 1999.
- Alavandi, S.V., Manoranjita, V., Vijayan, K.K., Kalaimani, N. & Santiago, T.C. (2006).** Phenotypic and molecular typing of *Vibrio harveyi* isolates and their pathogenicity to tiger shrimp larvae. Lett. Appl. Microbiol., 43: 566-570.
- Alcaide, E., Amaro, C., Todolí, R. & Oltra, R. (1999).** Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing infection in Iberian toothcarp *aphanius iberus*. Dis Aquat. Org., 35: 77-90.
- Alceste, C. & Jory, D.E. (2000).** Best tilapia strains. Aquaculture Magazine. March/April 2000. pp. 80-84.
- Álvarez, R., Agurto, J.D. & Claudia, P. (2000).** Bacterioflora Gram Negativa de Tilapias Silvestres y Cultivadas en la Region de Venezuela Durante el Periodo 1999-2000. Veterinaria Trop.25, 2: 209-228.
- Alvarez, V.R. (2006).** Estudio taxonomico de bacterias del genero *Vibrio* aisladas de ostion (*Crassostrea gigas*) de cultivo. Tesis de maestria. CIAD, Mazatlán, Sinaloa, México. 1-178.
- Al-Harbi, A.H. (1994).** First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. Aquaculture, 128: 195-201

- Al-Harbi, A.H. & Uddin, N. (2004).** Seasonal variations in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229: 37–44.
- Al-Harbi, A.H. & Uddin, N. (2005).** Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 25: 566-572.
- Allan, B.J. & Stevenson, R.M.W. (1981).** Comparative pathogenicity study on antigenically variant strains of *Enterococcus seriolicida*. *J. Fish Dis.*, 19: 39-46.
- Amaro, C., Biosca, E.G. Esteve, C., Fouz, B., Toranzo, A.E. (1992).** Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from European eel farm experiencing mortalities. *Dis. Aquat. Org.*, 13: 29-35.
- Amin, N.E., Abdallah, I.S., Faisal, M., Easa, E.M., Alaway, T. & Alyan, S.A. (1988).** *Columnaris* infection among cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 54: 509–520.
- Austin, B. y Adams, C. (1996).** Fish pathogens. In: Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P.J., Joseph, S. (Eds.), *The Genus Aeromonas*. Wiley, Chichester, pp. 198–243.
- Aydin, S., Ciltas, A. & Akyrut, I. (1997).** Investigations in systemic *Aeromonas hydrophila* infections appeared in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in 1991-1995. *Proceedings of the Mediterranean Fisheries Congress*. Izmir, April 9 to 11, 1997. pp 359-369.

- Azad, I.S., Rajendran, K.V., Rajan, J.J.S., Vijayan, K.K. & Santiago, T.C. (2001).** Virulence and histopathology of *Aeromonas hydrophila* (Sah 93) in experimentally infected tilapia, *Oreochromis mossambicus* (L.). *J. of Aquacul. in the Tropics*, 16: 265–275.
- Balebona, M.C., Zorrila, I., Moriñigo, M.A. & Borrego, J.J. (1998).** Neurotoxic effect on two fish species and a PC12 cell line of the supernate of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio anguillarum*. *Vet. Microbiol.*, 64: 4269-4275.
- Beaz-Hidalgo, R., Cleenwerck, I., Balboa, S., De Wacheter, M., Thompson, F.L., Swings, J., De Vos, P. & Romalde, J.L. (2008).** Diversity of *Vibrios* associated with reared clams in Galicia (NW Spain). *Syst. Appl. Microbiol.*, 31: 215-222.
- Belman, A.G.R. (1999).** Efectos de inclusión de una mezcla prebiótica sobre el comportamiento productivo y la flora bacteriana en la tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Tesis de licenciatura. (CINVESTAV-IPN U Mérida Yucatán. 1-41.
- Berridge, B.R., Gonzalez, M. & Frelie, P.F. (1998).** Outbreak of *S. difficile* in hybrid tilapia (*Oreochromis auro × O. nilotica*) persistently infected with *S. iniae*. In: *Book of Abstracts – Aquaculture '98*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, pp. 186–187.
- Biosca, E.G & Amaro, C. (1996).** Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2331-2337.

- Borrell, N., Acinas, S.G., Figueras, M.J. & Martínez-Murcia, A.J. (1997).** Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 1671– 1674.
- Bragg, R.R. (1988).** First isolation of *Edwardsiella tarda* from fish in South Africa. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 8: 84-88.
- Bruant, G., Watt, S., Quentin, R. & Rosenau, A. (2003).** Typing of non-encapsulated *Haemophilus* strains by repetitive-element sequence-based PCR using intergenic dyad sequence. *J. Clin. Microbiol.*, 61: 437-467.
- Bunch, E.C. & Bejerano, I. (1997).** The effect of environmental factors on the susceptibility of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, to streptococcosis. *J. of Aquacul.*, 49: 67–76.
- Cabrera, H. & Jiménez R. (2004).** Detección de miembros del género *Mycobacterium* de crecimiento rápido en el ecosistema del Lago de Valencia. Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of “Licenciado en Bioanálisis”, Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bioanálisis, Maracay, Venezuela.
- Cai, W.Q., Li, S.F. & Ma, J.Y. (2004).** Disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), blue tilapia (*Oreochromis aureus*) and their hybrid (female Nile tilapia × male blue tilapia) to *Aeromonas sobria*. *Aquaculture*, 229: 79-87.

- Chacón, E. (2002).** Biología general de la tilapia: curso básico de acuicultura, énfasis en trucha y tilapia. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara.
- Chang, P.H. & Plumb, J.A. (1996).** Histopathology of experimental *Streptococcus* sp. infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) and Channelcatfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J. Fish Dis., 19: 235-241.
- Chern, R.S. & Chao, C.B. (1994).** Outbreaks of a disease caused by rickettsia-like organism in cultured tilapias in Taiwan. Fish Pathol., 29: 61-71.
- Chen, S.C., Yoshida, T., Adams, A., Thompson, K.D. & Richards, R.H. (1998).** Non-specific immune response of Nile tilapia, *Oreochromis nilotica*, to the extracellular products of *Mycobacterium* spp. and to various adjuvants. J. Fish Dis., 21: 39-46.
- Chou, Y., Chou, J., Lin, M., Arun, A.B., Young, C. & Chen, W. (2008).** *Vogesella perlucida* sp. nov., a non-pigmented bacterium isolated from spring water. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2677-2681.
- Chowdhury, M.B.R., Muniruzzaman, M. & Uddin, M.N. (1989).** Study on the intestinal bacterial flora of tilapia *Oreochromis niloticus*. Bangladesh J. Aquac., 11: 65-70.
- Chun, S.K. & Sohn, S.G. (1985).** Characteristics of *Flexibacter columnaris* isolated from tilapia (*Tilapia* sp.). Bull. Korean Fish. Soc., 18:369-373.
- Clavijo, A.M., Santander, J., Conroy, G. & Conroy, D.A. (2001).** First report of *Vibrio* spp. from cultured tilapias in Venezuela. J. Aquaricul., 9:253 - 255.

- Conroy, D.A. & Armas, G. (1997).** Importantes enfermedades y parásitos de tilapias y aspectos de su prevención y control en sistemas de cultivo. IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. Cultivo sostenible de camarón y tilapia. Tegucigalpa, Honduras. Asociación Nacional de Acuicultores de Honduras. World Aquaculture Society. p 68-77
- Conroy, D.A. & Conroy G. (2008).** Manual de Métodos y Técnicas de Laboratorio de Uso Común en la Hematología Pisciaría. Spanish-language CD-ROM booklet. Patterson Peddie Consulting Ltd., Carrickfergus, UK.
- Constantino-Casas, F., Armijo-Ortiz, A., Osorio-Sarabia, D. & Chavez-Soriano, L.A. (1997).** Clinical and pathological descriptions of an infection due to *Aeromonas hydrophila* and *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and tilapia (*Oreochromis aureus*, L). *Veterinaria Mexico*, 28: 59-62.
- CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca) (2008).** Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2008. México D.F.
- Daly, J.G. (1999).** Other bacterial pathogens. In: Woo, P.T.K., Bruno, D.W. (Eds.), *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International, New York, pp. 577–598.
- Darwish, A.M. & Griffin, B.R. (2002).** Study shows oxytetracycline controls *Streptococcus* in tilapia. *Global Aquaculture Advocate*, 5 (6): 34-35.

- Dimri, G.P., Rudd, K.E., Morgan, M.K., Bayatt, H. & Ames, G.F.L. (1992).** Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in *E. coli* and phylogenetic distribution among *E. coli* strains and other enteric bacteria. *J. Bacteriol.*, 174: 4583-4593.
- Faisal, M., Schafhauser, K.A., Garreis, K.A., Elsayed, J.F. & La Peyre, J.F. (1999).** Isolation and characterization of *Perkinsus marinus* proteases using bacitracin-Sepharose affinity chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.*, 123B: 417-426.
- FAO. 2009.** El estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2008. Roma, Italia.
- FAO. (2010).** Programa de información de especies acuáticas. Text by Rakocy, J. E. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 18 February 2005. [Cited 13 June 2010]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es
- Farmer, J.J. & Hickman-Brenner, F.W. (1992).** The género *Vibrio* y *Photobacterium*. In: *The Prokaryotes*. Balowz, A., Trüper, H.G. Dworkin, M., Harder, W. & Schleifer, K. (Eds.), pp. 2952-2974. Springer-Verlag, New York, USA.
- Farto, R., Armada, S.P., Montes, M.J. & Nieto T.P. (2006).** Presence of a lethal protease in the extracellular products of *Vibrio splendidus*-*Vibrio lentus* related strains. *J. Fish Dis.*, 29: 701-707.

- Fernandez, L., Lopez, J.R., Secades, P., Menendez, A., Marquez, I. & Guajirro, J.A. (2003).** *In vitro* and *in vivo* studies of the Yrp 1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 7328-7335.
- Finlay, B.B. & Falkow, S. (1997).** Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61: 136-169.
- Fouz, B., Larsen, J.L., Nielsen, B., Barja, J.L. & Toranzo, A.E. (1990).** Relationship among pathogenic *Vibrio anguillarum* and *Vibrio tubiashii* with environmental Vibrios. In: *Pathology in Marine Science*. Perkins, F.O. & Cheng, T.C. (Eds.), pp77-89. Academic Press, Inc., New York, USA.
- Fouz, B., Barja, J.L., Amaro, C., Rivas, C. & Toranzo, A.E. (1993).** Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Curr. Microbiol.*, 27: 341-347.
- Fouz, B., Novoa, B., Toranzo, A.E. & Figueras, A. (1995).** Histopathological lesions caused by *Vibrio damsela* in cultured turbot *Scophthalmus maximus* (L.): inoculations with live cells and extracellular products. *J. of Fish Dis.*, 18: 357-364.
- Fouz, B., Alcaide, E., Barrera, R. & Amaro, C. (2002).** Susceptibility of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to vibriosis due to *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). *Aquaculture*, 212: 21-30.
- Fouz, B., Roig, F.J. & Amaro, C. (2007).** Phenotypic and genotypic characterization of new fish-virulent *Vibrio vulnificus* serovar that lacks potential to infect humans. *Microbiology*, 153: 1926-1934.

- Gaines, J.L. (1972).** Pathology of experimental infection with *Aeromonas hydrophila* (Chester) Stanier, (Bacteria: Pseudomonadales) in the channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). PhD thesis, Auburn University.
- Garcia, C.L., Clavijo, A.M. & Santander, J. (1999).** Incidence of *Aeromonas* spp. in some cultured fish species in the states of Aragua, Carabobo, Monagas and Cojedes in Venezuela. In: Cabrera, T., Jory, D. and Silva, M. (eds) *Aquaculture 99. Congreso sur de Acuicultura Americana*, World Aquaculture Society, Latin American Chapter, Puerto la Cruz, Venezuela, pp. 218-222.
- Gneiding, K., Frodl, R. & Funke, G. (2008).** Identities of *Microbacterium* spp. encountered in human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 46: 3646-3652.
- Getchell, R. (1998).** *S. iniae* causes tilapia infection. *Fish Farming News*, 6: 16.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Castilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. & Phillips, G.B. (1981).** *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Gevers, D., Huys, G. & Swings, J. (2001).** Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. lett.*, 205: 31-36.
- Gillings, M. & Holley, M. (1997).** Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25: 17-21.

- Gomez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazques-Juares, R., Thompson, F.L. & Swings, J. (2004).** Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology*. 150: 1769-1777.
- González, C.J., Santos, J.A., García-López, M.L., González, N. & Otero, A. (2001).** Mesophilic Aeromonad in wild and aquacultured freshwater fish. *J. Food Prot.*, 64: 687– 691.
- Gram, L. & Huss, H. (1996).** Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 121-137.
- Higgins, C.F., McLaren, R.S. & Newbury, S.F. (1988).** Repetitive extragenic palindromic sequences, mRNA stability and gene expression: Evolution by gene conversion: A review. *Gene*, 72: 3-14.
- Huang, S.L., Chen, W.C., Shei, M.C., Liao, I.C. & Chen, S.N. (1999).** Studies on epizootiology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in tilapia (*Oreochromis* spp.) cultured in Taiwan. *Zool. Stud.*, 38: 178-188.
- Huang, S.L., Liao, I.C. & Chen, S.N. (2000).** Induction of apoptosis in tilapia, *Oreochromis aureus* Steindachner, and in TO- 2 cells by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Fish Dis.*, 23: 363-368.
- Hulton, C.S., Higgins, C.F. & Sharp, P.M. (1991).** ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimarium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.*, 5: 525-834.

- Holt, J.G., Krieg, R.N., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams S.T. (1994).** Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Ed. Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland, USA. Pag. 190-194.
- Howard, S.P., MacIntyre, S. & Buckley, J.T. (1996).** Toxins. In: Austin, B., Altwegg, M., Gosling, P.J., Joseph, S. (Eds.), *The Genus Aeromonas*. Wiley, Chichester, pp. 267-281.
- Hsieh, C.Y., Tung, M.C., Tu, C., Chang, C.D. & Tsai, S.S. (2006).** Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisellalike* organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). *Aquaculture*, 254:129-138.
- Janda, J.M., Abbott, S.L. & Oshiro, L.S. (1991a).** Penetration and replication of *Edwardsiella* spp. in Hep-2 cells. *Infect. Immun.*, 59: 154-161.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., Kroske-Bystrom, S., Cheung, W.K., Powers, C., Kokka, R.P. & Tamura, K. (1991b).** Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 1997-2001.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., Khashe, S., Kellogg, G.H. y Shimada, T. (1996).** Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J. Clin. Microbiol.*, 34: 1930-1933.
- Joung, Y., Song, J., Lee, K., Oh, H.M., Joh, K. & Cho, J.C. (2009).** *Soonwooa buanensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Flavobacteriaceae* isolated from seawater. En prensa.
- Jyn-Wei, Shin & Yin-Hunhg, Huang. (2000).** Investigation for Contamination of Parasite and Aerobic Bacteria in Frozen Tilapia Fillets in Taiwan. *J. of Food and Drug Anals.*, 1: 51-56.

- Kamaishi, T., Fukuda, Y., Nishiyama, M., Kawakami, H., Matsuyama, T. & Yoshinaga, T. (2005).** Identification and pathogenicity of intracellular francisella bacterium in threeline grunt *Parapristipoma trilineatum*. *Fish Pathol.*, 40:67–71.
- Khalil, A.H. & Mansour, E.H. (1997).** Toxicity of crude extracellular products of *Aeromonas hydrophila* in tilapia, *Tilapia nilótica*. *Lett. in Appl. Microbiol.*, 25: 269-272.
- Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. & Evans, J.J. (2000).** Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188: 237-246.
- Krawiec, S. (1985).** Minireview: Concept of the bacterial species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 217-220.
- Krawiec, S. & Riley, M. (1990).** Organization of the bacterial chromosome. *Microbiol. Rev.*, 54: 502-539.
- Kreger, A.S. (1984).** Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.*, 44: 326-331.
- Kosman, E. & Leonard, K.J. (2005).** Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetics relationships between individuals for haploid, diploid and polyploidy species. *Mol. Ecology*, 14: 415-424.
- Kuo, S.C. & Kou, G.H. (1978).** *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from red spot disease of pond-cultured eel, *Anguilla japonica*. *Repub. Inst. Fish Biol.* 3: 19-23.

- Kusuda, R. & Salati, F. (1993).** Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 3: 69-85.
- Laffineur, K., Avesani, V., Cornu, G., Charlier, J., Janssens, M., Wauters, G. & Delmée, M. (2003).** Bacteremia due to a novel *Microbacterium* species in a patient with leukemia and description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 2242-2246.
- Lamas, J., Santos, Y., Bruno, D., Toranzo, A.E. & Anadon, R. (1994).** A comparison of pathological changes caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Pathol.*, 29: 79-89.
- La Peyre, J.F., Schaufhauser, D.Y., Rizkalla, E.H. & Faisel, M. (1995).** Production of serine proteases by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) *in vitro*. *J. Euk. Microbiol.*, 42: 522-551.
- La Peyre, J.F., Yarnall, H.A. & Faisal, M. (1996).** Contribution of *Perkinsus marinus* extracellular products in the infection of eastern oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invertebr. Pathol.*, 68: 312-313.
- Lara-Flores, M. (2003).** Aislamiento e identificación de microorganismos nativos del tracto intestinal de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con potencial probiótico. Tesis e doctorado. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida. México, 135 pp.
- Lara-Flores, M., S. B. Balarn-Zetina, R. E. del Río-Rodríguez, R. I. Nolasco-Vázquez & A. D. Cú-Escarnilla. 2006.** First isolation of *Mycobacterium* spp. in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) from Campeche, Mexico. Fifth International Symposium on Aquatic Animal Health, San Francisco, USA, September 2006. Book of Abstracts: 164.

- Lalitha, K.V. & Gopakumar, K. (2001).** Sensitivity of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to *Clostridium botulinum* toxins. *Aquacul. Res.*, 32: 761–764.
- Labella, V.A. (2010).** Aislamiento y caracterización de bacterias potencialmente patógenas asociadas a nuevas especies de espáridos cultivados. Tesis doctoral. Facultad de ciencias. Departamento de microbiología. Malaga, España.
- Lee, K.K., Liu, P.C., Kou, G.H. & Chen, S.C. (1997).** Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.*, 34: 110-117.
- Lightner, D., Redman, R., Mohny, L., Dickenson, G. & Fitzsimmons, K. (1988).** Major diseases encountered in controlled environment culture of tilapias in fresh- and brackishwater over a three-year period in Arizona. In: Pullin, R.S.V., Bhukaswan, T., Tonguthai, K. and Maclean J.L. (ed) *Proceedings of the Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. ICLARM Conference Proceeding No. 15, Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and ICLARM, Manila, Philippines, 111-116 pp.
- Lin, Yi.Y. & Diana, J.S. (1996).** Influence of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) stocking density on their growth and yield in cages and ponds containing the cages. *Aquaculture*, 146: 205-215.
- Ling, S.H., Wang, X.H., Xie, L., Lim, T.M. & Leung, K.Y. (2000).** Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathways of *Edwardsiella tarda* in *in vivo* and *in vitro* fish models. *Microbiology*, 146: 7-19.

- Liu, C.I., Huang, J.L., Hung, H.H. & Pen, C.F. (1990).** The experimental infection of *Streptococcus* and/or *Aeromonas* to induce bacterial septicemia in cultured tilapia. COA Fisheries Series, 24: 40-45.
- Liu, X., Zhou, X. & Mo, X. (1993).** Characteristics on pathogen of caudal fin rot disease of tilapia (*Oreochromis niloticus*) in mariculture. Trop. Oceanol./Redai Haiyang, 12:100-103.
- Lowe-McConnell, R.H. (2000).** The role of tilapias in ecosystem. In: Beveridge, M.C.M. and MacAndrew, B.J. (eds) Tilapias: Biology and Exploitation. Kluner Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp.129-162.
- Magariños, B., Romaldo, J.L., Bandin, I., Fouz, B. & Toranzo, A.E. (1992).** Phenotypic, antigenic and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. Appl. Environ. Microbiol., 58: 3316-3322.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walzer, J., Michell, T., Andrei, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hackenbeck R., Morrison, D.A., Buolnois, G.J. & Claverys, J.P. (1992).** A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Nucleic Acids Res., 20: 3479-3483.
- Mauel, M.J., Miller, D.L, Frazier, K., Liggett, A.D., Styer, L., Montgomery-Brock, D. & Brock, J. (2003).** Characterization of piscirickettsiosis-like disease in Hawaiian tilapia. Dis. Aquat. Org., 53: 249-255.

- Mauel, M.J., Miller, D.L., Styer, E., Pouder, D.B., Yanong, R.P.E., Goodwin, A.E. & Schwedler, T.E. (2005).** Occurrence of piscirickettsiosis-like syndrome in tilapia in the continental United States. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 17: 601-605.
- Mauel, M. J., Soto, E., Morales, J. A. & Hawke, J. (2007).** A piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. *J. Aquat. Animal Health*, 19: 27-34.
- McNulty, S.T., Klesius, P.H., Shoemaker, C.A. & Evans, J.J. (2003).** Hematological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Streptococcus iniae* by naive inoculation. *J. World Aquac. Soc.* 34: 418-422.
- Mellergaard, S. & Dalsgaard, I. (1987).** Disease problems in Danish eel farms. *Aquaculture*, 67: 139-146.
- Mikalsen, J., Olsen, A.B., Tengs, T. & Colquhoun, D.J. (2007).** *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* subsp. nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Int. J. of Syst. and Evolut. Microbiol.*, 57:1960-1965.
- Miyashita, T. (1984).** *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* isolated from diseased tilapia. *Fish Pathol.*, 19: 45-50.

- Morales, G., Blanco, L., Arias, M.L. (2004).** Evaluación de la calidad bacteriológica de tilapia fresca (*Oreochromis niloticus*) proveniente de la Zona Norte de Costa Rica. *ALAN*. [online]. dic. 2004, vol.54, no.4 [citado 13 Agosto 2009], p.433-437. Disponible en la World Wide Web: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000406222004000400010&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0004-0622.
- Montes, M., Farto, R., Perez, M.J., Nieto, T.P., Larsen, J.L. & Christensen, H. (2003).** Characterization of *Vibrio* strains isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*) culture by phenotypic analysis, ribotyping and 16S rRNA gene sequence comparison. *J. Appl. Microbiol.*, 95: 693-703.
- Mukhi, S.K., Chandrika, V., Madhavi, B. & Nayak, B.B. (2001).** Incidence of β -haemolytic streptococcal infection associated with mass mortalities of cultured tilapia, *Oreochromis mossambicus* in brackishwater ponds in India. *J. Aquacul. Trop.*, 16: 373-383.
- Muratori, M.C.S., de Oliveira, A.L., Leite, R.C., Costa, A.P.R. and da Silva, M.C.C. (2000).** *Edwardsiella tarda* isolated in integrated fish farming. *Aquaculture Research*, 31: 481-483.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A. & Tenover, F.C. (1999).** Manual of Clinical Microbiology. Washington: ASM press. 507-16.
- Muroga, K., Jo, Y. & Sawada, T. (1975).** Studies on red spot disease of pond-cultured eels-II. Pathogenicity of the causative bacterium *Pseudomonas anguilliseptica*. *Fish Pathol.*, 9: 107-114.

- Namdari, H. & Bottone E.J. (1990).** Microbiologic evidence supporting the role of *Aeromonas caviae* as a pediatric enteric pathogen. J. Clin. Microbiol., 28: 837-840.
- Nelson, K.L., Raja, S.M. & Buckey, J.T. (1997).** The glycosylphosphatidylinositolanchored surface glycoprotein Thy-1 is a receptor for the channel-forming toxin Aerolysin. J. Biol. Chem., 272: 12170-12174
- Noga, E.J., Wright J.F. & Pasarell L. (1990).** Some unusual features of mycobacteriosis in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. J. Comp. Pathol., 102: 335-344.
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Krossøy, B. & Knappskog, D. (2007).** New species in the genus Francisella (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); Francisella piscicida sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). Archives of Microbiology 188, 547-550.
- Paperna, I. (1996).** Parasites, infections and diseases of fishes in Africa. An update. Rome, Italy. FAO, CIFA Technical, Paper 31. 220 p.
- Paperna, I., Kim, S.H. & Hammerschlag, E. (1996).** Liver lesions in cultured *Oreochromis* hybrids caused by amoeboid organisms similar to the aetiological agent of goldfish kidney granuloma. Dis. Aquat. Org., 25: 151-153.
- Park, K.H. & Jeong, H.D. (1996).** Enhanced resistance against *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by administration of protein-bound polysaccharide. Aquaculture, 143: 135-143.

- Perera, R.P., Johnson, S.K. & Lewis, D.H. (1997).** Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas. *Aquaculture*, 152:25-33.
- Pérez, H., Castillo, J. (1998).** Perfil metodológico para el cultivo de tilapia en estanques de tierra y jaulas flotantes. Informe de Prodepesca. Convenio Istmo/B7-310/IB ALA/90/09. Unión Europea- OSPESCA.
- Perez, M.J., Rodriguez, L.A. & Nieto, T.P. (1998).** The acetylcholinesterase ichthyotoxin is a common component in the extracellular products of *Vibrionaceae* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 47-57.
- Philippart, J.C.L. & Ruwet, J.C.L. (1982).** Ecology and distribution of tilapias. In: Pillin, R.S.V. and Lowe-McConnell, R.H. (eds) *The biology and culture of tilapias*. ICLARM Conference proceedings No. 7, INCLARM, Manila, Philippines, pp. 15-59.
- Pulido, A.B., Iregui, C.C. & Figueroa, J. (1999).** Report of *Streptococcus* in tilapia cultivated in Colombia. In: Cabrera, T., Jory, D. and Silva, M. (eds) *Aquaculture 99*. Congreso sur American de Acuicultura, World Aquaculture Society, Latin American Chapter, Puerto la Cruz, Venezuela, pp. 229-239.
- Pemberton, J.M., Kidd, S.P. & Schmidt, R.(1997).** Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 1-10.
- Rahman, M., Colque-Navarro, P., Kühn, I., Huys, G., Swings, J. & Möllby, R. (2002).** Identification and characterization of pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar *Sobria* associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 650-655.

- Ranzani-Paiva, M.J.T., Ishikawa, C.M.I, Cocuzza das Eiras A. & Risaffi da Silveira, V. (2004).** Effects of an experimental challenge with *Mycobacterium marinum* on the blood parameters of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757). Braz. Arch. Biol. Technol., 47: 1-11.
- Rashid, M.M., Honda, K., Nakai, T. & Muroga, K. (1994).** An ecological study on *Edwardsiella tarda* in on farms. Fish Pathol., 29: 221-227.
- Richards, R.H. & Roberts R.J. (1978).** The bacteriology of teleosts In: Roberts, R.J. (editor). Ballieri, Tindall, London, U.K. Fish Pathology. pp. 183-204.
- Reddy, T.V., Ravindranath, K., Sreeraman, P.K. & Rao, M.V.S. (1994).** *Aeromonas salmonicida* associated with mass mortality of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* in a freshwater reservoir in Andhra Pradesh, India. J. Aquacul. Trop., 9: 259-268.
- Rey, A., Verján, N., Ferguson, H.W. & Iregui, C. (2009).** Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish. Vet. Rec., 164: 493-499.
- Roberts, R.J. & Matthiessen, P. (1979).** Pathological findings in fishes of the Okavangu Swamp, Botswana, following endosulphan spraying. ODM Special Report, UK Ministry of Overseas Development, London, 9 pp.
- Roberts, R.J. & Sommerville, C. (1982)** Diseases of tilapias. In: Pullin, R.S.V. and Lowe-McConnell, R.H. (eds) The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings No. 7, ICLARM, Manila, Philippines, pp. 247-262.

- Roberts, R.J. (1993).** Motile aeromonad septicaemia. In *Bacteriology of Fish Disease*. Eds V. Inglis, R. Roberts, N. Bromage. Blackwell Scientific Publications. pp 143-155.
- Rocio, M.R. & Mendoza, M.C. (2004).** Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 22: 238-245.
- Rodriguez, J.M., Lopez-Romalde, S., Beaz, R., Alonso, M.C., Castro, D. & Romalde, J.L. (2006).** Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using their PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. *Dis. Aquat. Org.*, 69: 175-183.
- Rosselló-Móra R. (2009).** La taxonomía del siglo XXI. Grupo de microbiología marina. Instituto mediterráneo de estudios avanzados. *Actualidad SEM*, 48: 18-24.
- Ruane, R.J., Chu, T.Y. & Vandergriff, V.E. (1977).** Characterization and treatment of waste discharged from high density catfish cultures. *Water Resour.*, 11: 789-800.
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussesmart, O., Gauthier, M. & Christen, R. (1994).** Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas* and *Plesiomonas* deduced from small subunit rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 416-426.
- Saeed, M.O. (1993).** Efforts to control outbreaks of diseases among cultured fish in Kuwait. In: *Proceedings of the First International Aquaculture Symposium: Technologies and Investment Opportunities*. Ministry of Agriculture and Waters, Riyadh, Saudi Arabia, pp. 400–409.

- Salah, M.A., Azza, M., George, J. & Mohamed, F. (2008).** Characterization of Some Bacteria Isolated from *Oreochromis niloticus* and their Potential Use as Probiotics. WorldFish Center, Regional Research Center, Abbassa, Sharkia, Egypt. *Aquaculture*, 277: 1-6.
- Santos, Y., Romalde, J.L., Bandin, I., Magariños, B., Nuñez, S., Barja, J.L. & Toranzo, A.E. (1993).** Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture*, 116: 11-20.
- Santos, J.A., Gonzalez, C.J., Otero, A. & García-López, M.L. (1999).** Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 5612-5614.
- Santos, Y., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Nieto, T.P. & Villa, T.G. (1988).** Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect. Immun.*, 56: 3285-3293.
- Sakata, T. & Hattori, M. (1988).** Characteristics of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased tilapia. *Fish Pathol.*, 23: 33-40.
- Sakata, T., Sugita, H., Mitsuoka, T., Kakimoto, D. & Kadota, H., (1980).** Isolation and distribution of obligate anaerobic bacteria from the intestines of the freshwater fish. *Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46: 1249-1255
- Sakata, T. & Kakimoto, D. (1984).** Dominant bacteria of the aerobic microflora in tilapia intestine. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 50: 489-493.

- Scoles, G.A. (2004).** Phylogenetic analysis of the Francisella-like endosymbionts of Dermacentor ticks. *J. of Medical Entomology* 4: 277-286.
- Scott, P.W. (1977).** Preliminary studies on disease in intensively farmed tilapia in Kenya. MSc thesis, University of Stirling, Stirling, UK.
- Shoemaker, C.A., Evans, J.J. and Klesius, P.H. (2000).** Density and dose: factors affecting mortality to *Streptococcus iniae*-infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188: 229-235.
- Soler, L., Figueras, M.J., Chacón, M.R., Vila, J., Marco, F., Martínez-Murcia, A. y Guarro, J. (2002).** Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 32: 243-247.
- Soto, R.S.A. (2002).** Estudio de los mecanismos de patogenicidad de bacterias luminiscentes en larvas de camarón. Tesis doctoral. Centro de investigación científica y de educación superior de Ensenada. Ensenada, Baja California.
- Soto, E., Hawke, J.P., Fernandez, D. & Morales, J.A. (2009).** Francisella sp., an emerging pathogen of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in Costa Rica. *J. of Fish Dis.*, 32:713-722.

- Shoemaker, C.A., Evans, J.J. & Klesius, P.H. (2000).** Density and dose: factors affecting mortality to *Streptococcus iniae*-infected tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 188: 229-235.
- Snieszko, S.F. (1973).** Recent advances in scientific knowledge and developments pertaining to diseases of fish. In: *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Brandly, C.A. & Cornelius, C.E. (Eds), pp. 291-314.
- Smith, G.C. & Merkel, J.R. (1982).** Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: potential contribution to its invasiveness. *Infect. Immun.*, 35: 1155-1156.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Roselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Auterin, L.V., Ward, A.C. & Whitman, W.B. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, 52: 1043-1047.
- Strauss, E.J., Ghori, N. & Falkow, S. (1997).** An *Edwardsiella tarda* strain containing a mutation in a gene with homology to *sgB* and *hpmB* is defective for entry into epithelial cells in culture. *Infect. Immun.*, 65: 3924-3932.
- Sugita, H., Ishida, Y., Deguchi, Y. and Kadota, H., (1982).** Aerobic microflora attached to wall surface in the gastrointestinal of *Tilapia nilotica*. *Bull. Coll. Agric. Vet. Med., Nihon Univ.*, 39: 212-217.
- Todar, K. (1998).** Mechanisms of bacterial pathogenicity. UW Madison University. 17pp.

- Toranzo, A.E., Barja, J.L., Colwell, R.R., Hetrick, F.M. & Crosa, J.H. (1983).** Haemagglutination, haemolytic and cytotoxic activities of *Vibrio anguillarum* and related vibrios isolated from striped bass on the Atlantic coast. *FEMS Microbiol. Lett.*, 18: 257-262.
- Toranzo, A.E. & Barja, J.L. (1993).** Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 3: 5-36.
- Thune, R.L., Johnson, M.C., Graham, T.E., & Amborski, R.L. (1986).** *Aeromonas hydrophila* P-haemolysin: purification and examination of its role in virulence in 0-group channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.*, 9:55-61.
- Thune, R.L., Stanley, L.A. & Cooper, R.K. (1993).** Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warmwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 3: 37-68.
- Tung, M.C., Chen, S.C. & Tsai, S.S. (1987).** General septicemia of streptococcal infection in cage-culture tilapia, *Tilapia mossambica*, in southern Taiwan. *COA Fisheries Series*, 10: 187-197.
- Van Damme, L.R. & Vandepitte, J. (1980).** Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zairese freshwater fish. A possible source of sporadic diarrhea in the tropics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 475-479.
- Versalovic, J., Schenider, M., de Bruijin, F.J. & Lupski, J.R. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell Biol.*, 5: 25-40.

- Viquez, F., Aiello, J. & Amerling C. (2003).** Características biométricas y químicas de la tilapia de agua dulce (*Oreochromis nilotica*) y uso del pH y de las características organolépticas para estimar su vida útil sensorial almacenada 5°C. Tesis. Universidad de Costa Rica.
- Wang, Z.G. & Xu, B.H. (1985).** Studies on the pathogenic bacteria of the 'rotten-skin' diseases of the Nile tilapia (*Tilapia nilotica*). J. of Fisheries of China/Shuichan Xuebao. 9, 217–221.
- Wang, X.H., Oon, H.L., Ho, G.W., Wong, W.S., Lim, T.M. & Leung, K.Y. (1998).** Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in *Vibrio*-fish epithelial cell interactions. Microbiology, 144: 2987-3002.
- Wang, G., Clark, C., Liu, C., Pucknell, C., Munro, C., Kruk, T., Caldeira, R., Woodward, D. & Rodgers, F. (2003).** Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR. J. of Cli. Microbiol., 41: 1048-1054
- Wassenaar, T.M. & Gaastra W. (2001).** Bacterial virulence: can we draw the line. FEMS Microbiol., Lett., 201: 1-7.
- Wakabayashi, H. & Egusa, S. (1972).** Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 38, 577-587.

- Wiklund, T. & Dalsgaard, I. (1987).** Disease outbreaks caused by *Pseudomonas anguilliseptica* in Finnish fish farms. In: Stenmark, A., Malmberg, G.Ž. Eds., Parasites and Diseases in Natural Waters and Aquaculture in Nordic Countries. Swedish Museum of Natural History, Stockholm, 131 (Abstract).
- Wiklund, T. & Bylund, G. (1990).** *Pseudomonas anguilliseptica* as a pathogen of salmonid fish in Finland. Dis. Aquat. Org. 8: 13-19.
- Wiklund, T. & Lönnström, L. (1994).** Occurrence of *Pseudomonas anguilliseptica* in Finnish fish farms during 1986–1991. Aquaculture, 126: 211-217.
- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. Microbiol. Rev., 51: 221-227.
- Wu, S.Y. (1970).** New bacterial disease of *Tilapia*. FAO Fish Cult. Bull. 2: 14.
- Yang, Y. & Ames, G.F-L. (1988).** DNA gyrase binds to the family of prokaryotic repetitive extragenic palindromic sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa., 85:8850-8854.

ANEXOS

Anexo 1.

Perfiles fenotípicos obtenidos en el presente estudio.

	Muestreo 1. Sanalona							Muestro 2 Adolfo López M.									Muestreo 3 Dique IV												
	C1a 1m	C1b1m	C2 1m	C4 1m	C5 1m	C6 1m	C7a 1m	C7b 1m	C8 1m	C9 1m	C1 2m	C2 2m	C4 2m	C5 2m	C6a 2m	C6b 2m	C8a 2m	C8b 2m	C8c 2m	C1a 3m	C1a23m	C2 3m	C3 3m	C4 3m	C5 3m	C6a 3m	C6b 3m	C9a 3m	C10 3m
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-
O/F ^a	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F	-	-	-	O/F	O/F	-	O/F	-	-	O/-	-	-	-	O/F	-	O/F	-	O/F	-	O/F	-	O/F	O/F	-
Crecimiento en TCBS	3a	3a	3a	1a	3a	3a	0	3b	3c	3c	1a	3e	1a	1a	1a	1a	1a	1a	1a	3a	1a	3a	1a	3e	1a	3a	3a	3a	1a
Crecimiento <i>en</i>																													
McConkey	3*	1	3	2	3	1	0	3	3	3	3f	3f	3f	3f	3f	3f	3f	3f	3f	3e	3e	3e	3d	3e	3e	3e	3e	3d	3b

^aO/F: Oxidación/Fermentación; 1: poco crecimiento; 2: crecimiento moderado; 3: crecimiento abundante; 4: crecimiento escaso; 0: no hubo crecimiento; a: verde; b: amarillo; c: amarillo verdoso; d: rosa; e: amarillo con bordes verdes; f: color del medio.

(Continuación-Perfiles fenotípicos obtenidos en el presente estudio)

	Muestreo 4 Sanalona												Muestreo 5 Adolfo López M.							Muestreo 6 Dique IV							
	Ca1 4m	C1b 4m	C2a 4m	C2b 4m	C3 4m	C4a 4m	C4b 4m	C5a 4m	C5b 4m	C6 4m	C7b 4m	C10 4m	C1a 5m	C2b 5m	C3 5m	C6 5m	C7 5m	C8a 5m	C9a 5m	C9b 5m	C1a 6m	C1b 6m	C2a 6m	C2b 6m	C4a 6m	C4b 6m	C7a 6m
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Rojo de metilo	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
O/F	O/F	O/F	O/F	-	-	-	-	O/F	O/F	-	-	O/F	-	O/F	O/F	O/F	O/F	-	O/F	-	-	O/F	-	O/F	-	O/F	-
Crecimiento en TCBS	3b	3b	0	0	0	1a	0	3a	3a	1a	1a	0	4a	4a	4a	1a	1a	3a	1a	4a	4a	4a	1c	0	4a	4a	4a
Crecimiento en McConkey	3f	3f	3f	0	0	3f	3f	3f	3f	3f	0	2f	1f	3f	3f	3f	3f	4f	3f	0	3f	4f	3f	4f	3f	3f	3f

^aO/F: Oxidación/Fermentación; 1: poco crecimiento; 2: crecimiento moderado; 3: crecimiento abundante; 4: crecimiento escaso; 0: no hubo crecimiento; a: verde; b: amarillo; c: amarillo verdoso; d: rosa; e: amarillo con bordes verdes; f: color del medio.

(Continuación-Perfiles fenotípicos obtenidos en el presente estudio)

	Muestreo 7								Muestreo 8						Muestreo 9				
	Sanalona								Adolfo López M.						Dique IV				
	C1a 7m	C1b 7m	C2 7m	C4 7m	C5 7m	C6a 7m	C6b 7m	C2 8m	C3a 8m	C3b 8m	C4 8m	C5 8m	C6a 8m	C6b 8m	C1 9m	C2b 9m	C2c 9m	C3a 9m	C3b 9m
Tinción Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Motilidad	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	-	-	-	O/F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en TCBS	0	0	4a	0	1c	4a	0	2a	1a	1a	1a	3b	1a	0	1a	3g	1a	1a	0
Crecimiento en McConkey	1f	1f	3f	2f	3f	3f	3e	2f	3f	3f	3f	3f	2f	1d	2d	2d	2f	2d	1d

	Muestreo 10								Muestreo 11				Muestreo 12				
	Sanalona								Adolfo Lopez M.				Dique IV				
	C1 10m	C2 10m	C3 10m	C5 10m	C6 10m	C7 10m	C8 10m	C1 11m	C2 11m	C3 11m	C4 11m	C6 11m	C1a 12m	C1b 12m	C3a 12m	C3b 12m	C4 12m
Tincion Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Voges-Proskauer	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Rojo de metilo	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+
O/F	-	-	O/-	O/-	-	O/-	-	O/F	O/F	-	O/F	-	O/F	O/F	O/F	O/F	O/F
Crecimiento en TCBS	1a	1a	3e	2b	1a	1e	1a	1a	1a	1a	1b	0	1a	1b	2e	1b	1a
Crecimiento en McConkey	1d	1d	3d	3f	1d	3f	2d	3f	3f	3f	3f	0	3f	3f	3f	3f	3f

^aO/F: Oxidación/Fermentación; 1: poco crecimiento; 2: crecimiento moderado; 3: crecimiento abundante; 4: crecimiento escaso; 0: no hubo crecimiento; a: verde; b: amarillo; c: amarillo verdoso; d: rosa; e: amarillo con bordes verdes; f: color del medio.

Anexo 2.

Perfil de actividades de aislados bacterianos estudiados. Sistema API 20E

Aislados	Actividad ^a																											
	bacterianos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
C4 1m	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
C7a 1m	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2 2m	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
C4 3m	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	ND	+	+	+	+	
C9a 3m	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	ND	+	+	+	+	
C1b 4m	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	ND	+	+	+	+	
C2b 4m	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
C7b 4m	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
C10 4m	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
C2 5m	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
C7 5m	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	ND	+	+	+	
C1b 6m	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	ND	+	+	+	+	
C2 6m	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	
C1b 7m	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	ND	+	+	-	-	
C2 7m	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
C2 8m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C3a 8m	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	
C2b 9m	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	
C3a 9m	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	
C2 10m	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	
C5 10m	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	
C1 11m	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	
C4 11m	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	ND	+	+	+	+	
C6 11m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C4 12m	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	ND	+	+	+	

^a1, 2-nitrofenil-BD-galactopiransida; 2, L-arginina; 3, L-lisina; 4, L-ornitina; 5, Citrato trisódico; 6, tiosulfato sódico; 7, urea; 8, L-triptófano; 9, D-triptófano; 10, piruvato sódico; 11, gelatina; 12, D-glucosa; 13, D-manitol; 14, Inositol; 15, D-sorbitol; 16, L-ramnosa; 17, D-sacarosa; 18, D-melibiosa; 19, amígdalina; 20, L-arabinosa; 21, oxidasa; 22 y 23, NO₂; 24, motilidad; 25, Mc conkey; 26, oxidación; 27, fermentación.

Anexo 3.

Secuencias.

Cluster 1.

C6 1m

>C61m-*Enterobacter hormaecchei*

GcTtAcACATGCAAGTCGAACGGtAaCaGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGG
 TGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCAT
 AAcGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAG
 CTAGTAGGtGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCAC
 ACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
 AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGA
 GGAAGGcGaTgAGGTTAATAACCTtGtCgATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCG
 TGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
 AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAG
 GCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA
 TACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT
 GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATG
 AATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAC

Cluster 2.

C2 3m

>C23m-*Plesiomonas shigelloides*

GGCTAAcCATGCAAGTCGAGCGGTAACACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGCGGCGGACGGG
 TGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCCCGATAGAGGGGGATAACTACGGGAAACTGTAGCTAATACCGCAT
 AATGTCTACGGACCAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCAGGTGGGATTAG
 CTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAACTGGTTTGGAGAGAATGACCAGTCAC
 ACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
 AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGGGGA
 GGAAGGGYYACTAGTTAATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCG
 TGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
 AGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAA
 GCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA
 TACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT
 GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATG
 AATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
 CTAC

Cluster 3.

C3a 9m

>C3a9m-*Microbacterium paraoxydans*

CACGCGGCGTGCTAACACAGTGCGAGTCGAGCGGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGG
CGAACGGGTGAGTAACACGGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCT
AATACTGGATATGTGACGTGACCGCATGGTCTGCGTTTGGAAAGATTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTC
GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGG
GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGC
ACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCT
TTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGACGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTT
GTCGCGTCTGCTGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTG
CGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGACCACCGATGG
CGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGA
TACCCTGGTAGTCCACCCCGTAAACGTTGGGAAGTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCCGTGAC
GCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
TGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGAGTGCATGG
TTGTGCTCTGCTCGTG

Cluster 4.

C2 8m

>C28m-*Bacillus* sp.

TGAGGGAGCTTGCTCCCAAAGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAG
ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATCTATTTATACATATAATTAGATGG
AGAAGATGGTCTGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
GCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAAC
TGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGCGGTTCCCTTAAGTCTAGA
TGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAA
AGTGGAATTC AAGTGTAGCGGTGAAATGCGTA

Cluster 5.

C2 10m

>C210m-*Sphingobacterium* sp.

GCTATACATGCAGTCGAACGGGATCCAAGTGTGTTAGCTTGCTAACgATCTGGTGAGAGTGGCGCA
CGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACCTACCCATATCAGGGGGATAGCCCCGAAGAAATTCGGATTAACAC
CGCATAAAGACTACGAGATGGCATCATCAAGTAGTTAAATATTTATAGGATATGGATGGGCTCGCGTG
ACATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGTCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAAT
CCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATATTGGTCAA
TGGACGGAAGTCTGAACCAGCCATGCCGCTGCAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTT
GTGAGGAATAAACCTATCTACGTGTAGATAGCTGAATGTAAGTACTCGAAGAATAAGGATCGGCTAACTC
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGC
GTAGGCGGCACTTTAAGTCAGGGGTGAAAGACGGCAGCTTAACTGTGCGAGTGCCTTTGATACTGAA
GTGCTTGAATGCGGTTGAAGACGGCGGAATGAGACAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGTCTCAG
AACACCGATTGCGAAGGCAGCTGTCTAAGCCGTTATTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCGA

ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGATAACTCGATGTTTGGCATATACCGTA
 AGCGTCCAAGCGAAAGCGTTAAGTTATCCACCTGGGGAGTACGCCCGCAAGGGTAAAACCTCAAAGGA
 ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACC
 C

Cluster 6.

C8 1m

>C81m-*Proteus penneri*

GCCTACCATGCAGTCGGGCGGTaACAGGAGAAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTG
 AGTAATGTATGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTGGCTAATACCGCATGA
 CGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTCTTCGGACCTTGCCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCT
 AGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC
 TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
 GCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGG
 AAGGTGATAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
 CCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
 GCGGTCAATTAAGTCAGATGTGAAAGCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATCTGAAACTGGTTGGC
 TAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATA
 CCGGTGGCGAAGGCGGGCCCCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTAGAGGTTGTGGTCTTGAACCGTGG
 CTTCTGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAATGAAT
 TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCACGCGAAGAACCTTACCTA

Cluster 7.

C3a 9m

>C3a9m-*Microbacterium paraoxydans*

CACGCGGCGTGCTAACACAGTGCAGTGCAGCGGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGG
 CGAACGGGTGAGTAACACGGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCT
 AATACTGGATATGTGACGTGACCGCATGGTCTGCGTTTGGAAAGATTTTTCGGTTGGGGATGGGCTC
 GCGGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGG
 GTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATGC
 ACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCT
 TTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACGTAGGACGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTT
 GTCGCGTCTGCTGTGAAATCCCAGGCTCAACCTCGGGCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTG
 CGGTAGGGGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGACCACCGATGG
 CGAAGGCAGATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACCCGTAACCGTTGGGAAGTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCCGTGAC
 GCAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGAC
 GGGGACCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCT
 TGACATATACGAGAACGGGCCAGAAATGGTCAACTCTTTGGACACTCGTAAACAGGTGAGTGCATGG
 TTGTCGTCTGCTCGTG

Cluster 8.

C1 4m

>C41m-Pseudomonas mosselii

GCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGTATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTATCGAAAGGAACGCTAATACCG
 CATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGAT
 TAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGT
 CACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG
 CGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTG
 GGAGGAAGGTTGTACGCTAATACCGTGCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACT
 CTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTGAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCG
 CGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGG
 CCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAA
 GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC
 AAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAG
 ATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCA
 AATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAG
 GTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCC
 TTGTCTTATTAGTACCAGCACGTTATAGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA
 AGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGG
 TACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGT
 CTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAAATGTTGCGGTGAATACGT
 TCCCCGGCCTTGCTACACTCCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAA
 CCTTCGGGAGGACGGTTACCACGGTGTGATTCAATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA
 GGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTA

Cluster 9.

C4b 4m

>C4b4m-Pseudomonas alcaligenes

GCTANCATGCAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
 CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCTAC
 GGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTAGGT
 GAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGT
 GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
 CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGaGCa
 GTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTC
 AGCAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTA
 CGGTAGAGGGTAGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG
 CGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGC
 AGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGG
 GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTT

Cluster 10.**C4 8m**

>C48m-*Micrococcus yunnanensis*

GGGGGTGCTTAcCATGCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTG
 AGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATA
 GGAGCGcCcACCGCATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTATCAG
 CTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCAC
 ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGa
 AAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTCAGTAGGGA
 AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
 CGTAGGGTTCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGTTTTGTTCGCGTCTGT
 CGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAG
 ACTGGAATTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGT
 CTCTGGGCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTTCCGCGCCGAGCTAACGC
 ATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCA
 CAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCT
 CGA

Cluster 11.**C4a 4m**

>C4a4m-*Pseudomonas alcaligenes*

GGGCCTAcCATGCAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTA
 ATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTC
 TACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTA
 GGTGAGGTAAtGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA
 ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCT
 GATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGa
 GCaGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGG
 TTCAGCAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAACCTACTGAGCTAGA
 GTACGGTAGAGGGTAGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAG
 TGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGG
 CGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGC
 CTT

Cluster 12.**C2 2m**

>C22M-*Pseudomonas alcaligenes*

GATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATAGCAAGTCGAGCGGATGAGTGGAGC
 TTGCTCCATGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAAC
 GTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTGCTTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTGCGC
 TATCAGATGAGCCTAGGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTA
 ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC

AGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGGTGAAGAAGGTCTTCG
 GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCG
 ACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAAGCGTTAAT
 CGGAATTACTGGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCA
 ACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTAGCGTCGAGCTAGAGTACGGTCAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACT
 GACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG
 ATGTGCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGAAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTG
 GGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTCCAGAGATGG
 ATTTGGTGCCTTCGGGAAGTACAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGCTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAA
 GGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCA
 GGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAACCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAA
 AAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAATCTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG
 TGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTACACCATGGGAGT
 GGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATCATGACTGGG
 GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGAACCTGCGGCTGGATCAC

Cluster 13.

C7a 6m

C7a6m-Aeromonas sp.

CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATANGTTAGATGTGAAAGC
 CCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAAGTGTCCAGCTAGAGTCTTGTTAGAGGGGGGTAGAATT
 CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACA
 AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGTGATTTGGAGGCTGTGTCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGAC
 CGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTCA
 GAGATAGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCT
 GAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTGTGCCAGCACGTAATGGTT

Cluster 14.

C3 5m

>C35m-*Pseudomonas alcaligenes*

TAcCATGCAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTACAGCGGCGACGGGTGAGTAATGCC
 TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCTCTACGG
 GAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTAGGTGA
 GGTAAtGGCTCACCTAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGA
 GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCC
 AGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGaGCaGT
 AAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCAG
 CAAGTTGGAGGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCCTCCAAAAGTACTGAGCTAGAGTACG
 GTAGAGGGTAGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCG
 AAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA
 CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAG

CTAACGCATTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCCTT

Cluster 15.

C6b 3m

>C6b3m-*Plesiomonas shigelloides*

GGCAGCTAcCATGCAGTCGAGCGGTAACACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGCGGGCGGACGG
 GTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACGGGAACTGTAGCTAATACCGCA
 TAAAtGTCTACGGACCAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCAGGTGGGATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAACTGGTTTGAGAGAATGACCAGTCA
 CACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGC
 CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGG
 AGGAAGGGTcACTAGTTAATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
 GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACC
 CAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCA
 AGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGA
 ATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG
 TGGCTTCCGGAGCTAACCGTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAAT
 GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
 CCT

Grupo A.

C2 7m

>C27m-*Pseudomonas anguilliseptica*

TGATGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGA
 GAGGAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTGGTGGG
 GGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCGGGGATCTTCGGA
 CCTCGCGCCATTAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGAC
 GATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
 GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA
 AGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGTAGTAACCTAATACGATTGCTACTTT
 GACGTTACCGACAGATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAG
 CGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGTAAGTTGGAAGTGAATCCCCG
 GGCTCAACCTGGGAACTGCTTTCAAACCTGCTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCT
 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATA
 CTGACACTGAGGTGCCAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA
 CGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCC
 TGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATG
 TGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAATTTCCAGAGATG
 GATTGGTGCCTTCGGGAACTCAGACACAGGTAGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTCTCGTGA

C3b 8m

>C3b8m-*Deftia tsuruhatensis*

GCTTACCATGCAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATAC
 ATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAG
 GATGAAAGCGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCATTTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTG
 GGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC
 CAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTTGTACGGAACGAAAAGCT
 CCTTCTAATACAGGGGGCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTAT
 GTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTAC
 GGTAGAGGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGC
 GAAGGCAATCCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAA
 GCTAACCGGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAGGAATTGACGGGG
 ACCCGCACAAAGCGGTGGATGATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAAACCTTACCCACCTTTGACA

Grupo B.**C1b 1m**

>C1b1m-*Plesiomonas shigelloides*

GCTAcCATGCAGTCGAGCGGTaACACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAATGCCTGGGGATCTGCCGATAGAGGGGATAACTACGGGAAACTGTAGCTAATACCGCATAAT
 GTCTACGGACCAAAGTGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTA
 GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAACTGGTTTGGAGAGAATGACCAGTCACACT
 GGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
 CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGA
 AGGGTCACTAGTTAATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGG
 CGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAAGCT
 AGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
 CGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
 TTCCGGAGCTAACCGGTTAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
 TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA

C1b 6m

>c1b6m- *Plesiomonas siguelloides*

CTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGT
 GAGTAATGCCTGGGGATCTGCCGATAGAGGGGATAACTACGGGAAACTGTAGCTAATACCGCATA
 ATGTCTACGGACCAAAGTGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCAGGTGGGATTAGC
 TAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAACTGGTTTGGAGAGAATGACCAGTCACA
 CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
 AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAG
 GAAGGGCCACTAGTTAATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT
 GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCA

GGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAG
 CTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAAT
 ACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
 GCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGA
 ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGC

Grupo C.

C1a 5m

>C1a5m-*Acinetobacter* Sp.

AGCTTANCATGCAGTCGAGCGGGCGAGGTTGCTTCGGTAACTGAGCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
 AGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCTT
 ACGGGAGAAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTTCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCAGATTAGCTAGTTG
 GTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGA
 CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGRAAGCCTG
 ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCT
 ACCTgGATTAATACTCTgGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAG
 CAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGG
 CTTTTTAAGTCGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACTTAGGAATTGCATTCGATACTGGGAAGCTAGA
 GTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGA
 TGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATT
 AGATAACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGG
 CGCAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGA
 CGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGT

C3 11m

>C311m-*Pseudomonas alcaliphila*

GGCAGGCCTAcATGCAAGTCGAGCGGATGAGAGGAGCTTGCTCCTTGATTTAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACG
 TCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTA
 GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACT
 GGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAG
 CCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGA
 AGGGCATTAAACCTAATACGTTAGTGTTCGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGC
 CAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG
 TGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACCTGGCGAGCT
 AGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACAC
 CAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGTTTCCTTGAGAACCTTAG
 TGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATT
 GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTGG
 C

Grupo D.

C5 8m

>C58m-*Oceanobacillus oncorhynchi*

CCTATAcGCAGTCGAGCGCGGGAAGCGAACGGAACTCTTCGGAGGGAAGTTCGTGGAACGAGCGGCG
 GACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCGCGGAAACGCGAGCTAAT
 ACCGGATAACACTTTCTATCACCTGATGGAAAGTTGAAAGGCGGCTTTTGCTGTCACCTACAGATGG
 GCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGA
 GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
 CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAA
 ACTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTACGATAGTAAGTACTGATCGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAA
 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
 GGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAACGTG
 CATTGGAAACTGGAGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAA
 AGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTT
 AGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
 AGGCTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGC
 A

C7b 4m

>C7b4m-*Soonwooa buanensis*

GCTACACATGCAGCTGAGCGGTAGATTTTCTTCGGAAGATTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGTAACAC
 GTGTGCAACCTGCCCTTATCAAGAGGATAGCCCGGAGAAATTCGGATTAATACTCTATAATATATTG
 ACTGGCATCGGTTAATATTGAAAGATTTATCGGATAAGGATGGGCACGCGCAAGATTAGGTAGTTGG
 TAGGGTAACGGCCTACCAAGCCGATGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTGATCCCCACACTGGTAC
 TGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTAAACGCCTGA
 TCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGTCTATGGATTGTAACTTCTTTTATATAGGGATAAACC
 TACTCTCGTGAGAGTAGCTGAAGGTAATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
 GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGGCTTGTA
 AGTCAGTGGTGAATCCGGCAGCTCAACTGTGCAACTGCCATTGATACTGCAAGTCTTGAGTAAATT
 AGAAGTGGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGCGAA
 GGCAGGTCACTATGTTTTAACTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACC
 CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTACTCGTTTTTGGGCTATATAGTTTCAGAGACTAAGCGAAA
 GTGATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAATGGGA
 A

Grupo E.

C7 5m

>C75m-*Edwardsiella tarda*.

GCTACCATGCAGTCGAGCGGTAGCGGGAGAAGCTTGCTTTCTCCGCTGACGAGCGGcGGGAcGGGTG
 AgTaGtGTCTGGGGATCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGACACGGTaCTaATACCGCATAAC
 GTCgCaAGACCAAaGTGGGGACCTTCGGGCCCTCgTGCCcTCAAtATGAaCCCAAtATGGgATTAtCTa
 gTatGTGAGGTAATGGCTCCCCTAcGAgACtATCCCTAtCTGGTCTGAGAGGATGACCacCCACgCT

GGAActGAcACaCGGtCCAcACTCCTACGGGAGGCACgGTGGGAATATTGCACAGTGGGCGCaGC
 CTGATGCacCCgTGCCGCGTGTATGAAgAAgGCCTTCGGTTGTAAAGTACTTTTCagTAGGGAAGAA
 GGTGTGCGTGTTAATAgCACGTGCaATTGACgTTaCCTACAgAAgAAgCaCCGGCTAACTCCGTGCC
 agCagCCGCGTAATACaGAGGGTGCAGCGTTaATCagAATTACTGGGCGTAAAGCgCACgCggGC
 GGTTTGTAAAtTTGGATGTGAAATCCCCGGCTTAAcCTGGgAACTGCcTCCaAgACTGGcaAGCTA
 GAgTCTCgTAGAGGGAGGTAgAATTCCggGTGTAGCGGtGAAATGCgTAGAgATCTGGAAGAATACC
 GGTGGcGAGGcGCTCCTGGACaAAcACTGACtCTCaTGTGCaAAAGCGTGGAGAGCAACaGATTAt
 ATACCCTGGTAgtCCActCTGTAActATGTCATTTGGAGTGTGCCCTTGACGcGTGTcTTCCAAtCT
 ACGCgTTAATCACCGCCTGGGAGtACgCCgCGtTAAaCTCAaTGaTgACGGGGCCCCACGCGGGTGG
 TTTTTtTcatGCCGCAAG

C2b 5m

>C2b5m-*Plesiomonas shigelloides*

GTtTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGACCTATACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAC
 AGAGGTAGTCTTGACTCCTTGGGTGACGAGCGTGCAGGACGGGTGAGTATATTGCCTGGGGATCTGCC
 GCTCGATAGAGGGGGATAACTACCGGAATACTAGTAGCTAATAACCGCATAATATCTACGGACCAA
 AGTGGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAA
 TGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAACTGGTTTgAGAGAATGAACAGTCACACTGGAActGAGACAC
 GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCA
 TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGTCACTAGTT
 AATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGTGCTAACATCTCGCTGCCAGCACGCC
 GCGGTAAATAGCGTGAGTGGTGCACAGCCGTTTATAGTCAAGAAATTTACTGTGGGCAGTAAACAGC
 CCGCAGGCGGTTTCGACAGTCAGGTGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAActGCATTTGAAActGG
 CAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG
 GAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTTGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGG
 CGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAActCAA
 ATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAAct
 TACCTACTCTTGACATCCAGAGAActCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAActGTGAGACAG
 GTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
 TTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTTCGGGAActCAAAGGAGACTGCTCGGTGATAAACCGGAGGAA
 GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATAT
 ACAAAGGGCGGCAAGCTAGCGATAGTGAAGCGAATCCCATAAAGTATGTGCTAGTCCGGATTGGAGTC
 TGCAActCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTT
 CCGGGCCTGTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAGTAGGTACTTAAc
 CTTCCGGGAGGGCGCTTACCActTTGTGATTCATGACTGGGTTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGG
 GAAcCTGCGGCTGGATCACCTCC

Grupo F.

C1 11m

>C111m-*Aeromonas veronni*

TGTTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGG
 AAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCCAGTC
 GAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCT
 TCGGGCCTTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAATGGCTCACCAAG
 GCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAActGAGACACGGTCCAGACTCC
 TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGACACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGATGT
 GTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAActGCC

AGCAGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGG
 GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAA
 AGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACGTGCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGA
 ATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
 ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCTTGGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATC
 GACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGT
 GGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTG
 TAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGG
 GTACTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGATGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCC
 TTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGC
 GAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCATGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCG
 CTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGATGAATACGTTCCCGGGCCTGTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTG
 ATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCTTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCA

C8 10m

>C810m-*Acinetobacter junii*

GCTTANCATGCAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTGACCTTATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
 GCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATTCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACTGCTCCTA
 CGGGAGAAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTTCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGG
 TGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGAC
 TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCCTGA
 TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTA
 CTGAGACTAATACTCTTGGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
 AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTAAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGC
 TTTTTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATTCGATACTGGGAAGCTAGAG
 TATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGAT
 GGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTA
 GATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGC
 GCAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGC

Grupo G.

C1b 7m

>C1b7m-*Plesiomonas shigelloides*

GACGTTACTGGCGGAAGGAGGCACGGCTAACTCGTGCCAGCAGCGGCGGTAATACGGAGGGGCAGGC
 GTTATCGGAATTACTGGGCGTAAGGCGCACGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAG
 CTCAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACT
 GACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACG
 ATGTGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGGAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTG
 GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT
 GGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAAGCCTGCAGAGATGC
 GGGTGTGCCCTTCGGGAACGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTT

GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGATTTCGGTCGGGAACTCAAAG
 GAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAG
 GGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAAGGGCGGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCATA
 AAGTATGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
 GGATCAGAATGCCCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTG
 GGTTGCAAAAAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGAATCATGACTGGGG
 T

C3 10m

>C310m-*Enterobacter hormaechi*

CGGCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTcCTGACGAGTGGCGGACGGGT
 GAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATA
 ACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGC
 TAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACA
 CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
 AGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAG
 GAAGGGcTgAGGTTAATAACCTtGTCgATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
 CCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
 GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCGAAACTGGCAGGC
 TAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA
 CCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG
 CTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA
 TTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACCGGAGAACCTTACCTAC
 T

C5 10m

>C510m-*Aeromonas hydrophila*

GTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGA
 AAGTAGCTTGCTACTTTTGGCCGGCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCAGTCCG
 AGGGGGATAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTT
 CGGGCCTTGC CGGATTGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGG
 CGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTGTG
 AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTGAGTAGCTAATATCTGCTGAC
 AGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTG
 CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATANGTTAGATGTGAAAGC
 CCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACCTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATT
 CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACA
 AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCTTGTAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGAC
 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTCA
 GAGATAGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTG
 GAGATGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGTCTTGTGCCAGCACGTAATGGTT

Grupo I.

C3 4m

>C34m-*Rheinheimera* sp.

GCAGCCTACACATGCAGTCGAGCGGGGTTTTTCGGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCGTAGGA
 AGCTGCCCGATAGAGGGGGATACCAGTTGGAAACGACTGTTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAA
 AGTGTGGGACCTTCGGGCCACATGCTATCGGATGCGCCTACGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAA
 TGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAC
 GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
 TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTGGTGTGTT
 AATAGCACATCATTTTTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGT
 AATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGTTTTTTAAGT
 CAGATGTGAAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAATGCAATTTGAAACTGGGgAACTAGAGTGTGTGAGA
 GGGGGGTAGAAATCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGC
 GGCCCCCTGGCACAACACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTG
 GTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGCTGTTCGTGTCTTGTGATGTGAGTAGCGCAGCTAAC
 GCACTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCCG
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCTA
 CG

C4 11m

>C411m-*Aeromonas* sp.

CCGTGGTAAACGCCCTCCCGAATGTTAAGCTATCTACTTCTGGTCCCCTCCCATGGTGTGACGGGC
 GGTGTGTACAAGCCCGGAACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCGACT
 TCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCGCTTTTTGGGATTCGCTCACTATCGC
 TAGCTTGACGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGA
 CTTGACGTCAATCCACCTTCCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTTGAGTTCACACCATTACGT
 GCTGGCAACAAAGGACAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGCACACGAGCTG
 ACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAAGGCACTCCCCAATCTCTTAGGGATNCCAG
 ACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTNGCATCGAATTANACCACATGCTCCACCGCTTGTGC
 NGGCNCCCGTCAATTCATNTGAGTTTAACTGCGGCGTACTCCCCAGCGTCGATTACCGCGTANCTC
 GAAGCACGTTCAAGACCAGCCTCCATCAATTTACGCTGACTACCAGTTTATCTGTTGCTCCCCTCCC
 CTACTAGTTGTAGGCGCTCCCGATCCATAACC

C7 10m

>C710m-*Aeromonas veronni*

GCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAACCGC
 ATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCCTTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATT
 AGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC
 AACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGG
 GAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAG
 GAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTC
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
 GCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATGCAATTTAAACTGTCT
 CAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG

AATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGAC
 GTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGTTAAAACCTCAA
 TGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT

Grupo J.

C1a 12m

>C1a12m-*Klebsiella pneumoniae*
 GAGAACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGT
 AATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATNATGT
 CGCAAGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT
 AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGG
 AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCC
 TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAG
 GCGATAAGGTTAATAACCTTGTNGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCG
 GTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAACTGGCAGGCTAG
 AGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCG
 GTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT
 TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT
 CCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT

C7a 1m

>C7a1m- *Enterobacter hormaechei*
 GCTACACATGCAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTG
 AGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAA
 CGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTTGGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCT
 AGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACAC
 TGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
 GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGG
 AAGGCGATGAGGTTAATAACCTTGTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
 CCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAG
 GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAACTGGCAGGC
 TAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATA
 CCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG
 GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGG
 CTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAA
 TTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC

Grupo K.

C4 12m

>C412m-*Aeromonas jandaei*

AGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTCAGTAGTAATATCTGCTGGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAA
 GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG
 GCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTG
 CATTAAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
 TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGaA
 AAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGC
 TGTGTCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAA
 GGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCA
 ACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGA
 ATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAA
 CGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTCAAGGGAGACTGCCGGTGAT
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCT
 ACAATGGCGGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTGTAGTGC
 CGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCG
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTA
 GATAGCTTAACATTCGGGAGGGCGTTTACCACGGCCGTGATTC

Grupo L.

C2a 4m

>C2a4m-*Edwardsiella tarda*

AGGCCTACACATGCAGCTGAGCGGTAGATTTTCTTCGGAAGATTGAGAGCGGCGTACGGGTGCGTAA
 CACGTGTGCAACCTGCCCTTATCAAGAGGATAGCCCGGAGAAATTCGGATTAATACTCTATAATATA
 TTGACTGGCATCGGTTAATATTGAAAGATTTATCGGATAAGGATGGGCACGCGCAAGATTAGGTAGT
 TGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGCCGATGATCTTTAGGGGGCCTGAGAGGGTATCCCCCAGACTGG
 TACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGTkaAmGCC
 TGATCCAGCCATCCCGCGTGAAGGACGACGGTTCTATGGATTGTAAACTTCTTTTATATAGGGATAA
 ACCTACTCTCGTGAGAGTAGCTGAAGGTACTATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTCCGTAGGCGGGCTT
 GTAAGTCAGTGGTGAATCCGGCAGCTCAACTGTGCAACTGCCATTGATACTGCAAGTCTTGAGTAA
 ATTAGAAGTGGCTGGAATAAGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACTTAGAACACCAATTGC
 GAAGGCAGGTCACTATGTTTTTAACTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTACTCGTTTTTGGGCTTTATAGTTCAGAGACTAAGC
 GAAAGTGATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGTTGCAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
 CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAAGGCTTAAAT
 G

C2b 6m

>C2b6m-*Plesiomonas shigelloides*

GGGGGCTAAcATGCAAGTCGAGCGGTAACACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGCGGCGGACG
 GGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCCGATAGAGGGGGATAACTACGGGAAACTGTAGCTAATACCGC
 ATAAtTCTACGGACCAAAGTGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCAGGTGGGATTA
 GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAACTGGTTGAGAGAATGACCAGTCA

CACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCG
 CAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGG
 AGGAAGGGtACTAGTTAATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCG
 TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGC
 AGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAAGTGCATTTGAAACTGGCAA
 GCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAA
 TACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAgTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTGCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTG
 GCTTCcGAGCTAACGCGTTaATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
 TGaGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGATCTTTA

Grupo M.

C3 3m

>C33m-*Delftia tsuruhatensis*

GCTTACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTGACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATAC
 ATCGGAACGTGCCAGTCGTGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAG
 GATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGGATTGGAGCGGCCGATGGCAGATTAGGTAGTTGGTG
 GGATAAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATC
 CAGCAATGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACTGCTTTTGTACGGAACGAAAAGCT
 CCTTCTAATACAGGGGGCCCATGACGGTACCGTAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTAT
 GTAAGACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTGTGACTGCATGGCTAGAGTAC
 GGTAGAGGGGGATGGAATTCGCGTGTAGCAGTGAATGCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGC
 GAAGGCAATCCCCTGGACCTGTACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTTCTCAGTAACGAAG
 CTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 ACCCGCACAAAGCGGTGGATGATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTT

C6b 7m

>C6b7m-*Pseudomonas anguilliseptica*

GGCTAcCATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGgAGCTTGCTTCTTGTAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
 GCCTAGGAATCTGCCTAGTGGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTA
 CGGGAGAAAAGCGGGGGATCTTCGGACCTCGCGCCATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
 TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGA
 TCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGT
 AGTAACCTAATACGTTGCTACTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCA
 GCCCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTT
 CAGTAAGTTGGAAGTGAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCAAACTGCTGAGCTAGAGT
 ACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCGATG
 GCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGCCG
 CAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACG

GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT
G

C2b 9m

>C2b9m-*Brevibacterium casei*

GTCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGTAGCTCGTAGGTGGTTGGTCACGTCTGCTGTGGA
AACGCAACGCTTAACGTTGCGCGTGCAGTGGGTACGGGCTGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGTCTGGA
ATTCTTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGACTCTGG
GCTGTAACGTGACACTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATG
CCGTAAACGTTGGGCAC TAGGTGTGGGGGGCATTCCACGTTCTCCGCGCCGTAGCTAACGCATTAAG
TGCCCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
GCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATAACACGGACCGT
CCTGGAAACAGGTCCTCTTCTTTGAAGCTGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGTCTGCTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTCGTTCTACTGTTGCCAGCATGTGATGGT
GGGAAC TCATAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCC
TTTATGTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCTGGTACAGAGAGAGGGCGAACCCGTGAGGGCAAG
CGAATCCCTTAAAGCCAGTCTCAGTTCGGATCGTAGTCTGCAATTCGACTACGTGAAGTCCGAGTCCG
CTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAA
GTCACGAAAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCGTAGATGGAAGGGGCCGTCTAAGGTG
GGACATGGTGATTGGGACTAAGTTGTAACCAGGNKATACCGTACCCGAAAAG

Grupo O.

C2a 6m

>C2a6m-*Microbacterium paraoxidans*

GGGGGGTGCTTACCATGCAGTCGAACGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGG
GTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCCC TGA CTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGG
ATATGTGACGTGACCGCATGGTCTGCGTTTGGAAAGATTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCTA
TCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCA
GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGACGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGTTTTGTGCGGT
CTGCTGTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGG
GGAGATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGC
AGATCTCTGGGCCGTAAC T GACGCTGAGGAGCGAAAGGTTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTG
GTAGTCCACCCGTAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTA
ACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGACC
CGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATA
TACG

C9a 5m

>C9a5m-*Microbacterium estearomaticum*

AgCTTAcCATGCAGTCGACGATGAAGCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC
 ACGTGAGCAACCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATATGTCCC
 GTCACCGCATGGTGTGCGGGTGGAAAGATTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCATCAGCTTGT
 TGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGG
 GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGGAAGCC
 TGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAG
 CGAGAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG
 GGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTGCGCTCTGCTGTGA
 AATCCCGAGGCTCAACCTCGGGCTTGCACTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAGATTGG
 AATTCCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCTCTG
 GGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGGTGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGTCCAC
 CCCGTAAACGTTGGGAAGTAGTTGTGGGGTCCTTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAA
 GTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGC
 GGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACGAGAAC

C6 4m

>C64m-*Microbacterium* sp.

GCTAcCATGCAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGCTCCATGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAATG
 CCTAGGAATCTGCCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTAC
 GGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT
 GAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAC
 GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
 CCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCA
 GTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAG
 CCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTC
 AGCAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTA
 CGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGG
 CGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGcGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGA
 TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGA
 AGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGG
 GGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTG

Grupo P.**C4 3m**

>C43m-*Aeromonas veronni*

GTTTGATCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGA
 AAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCCTGGGGATCTGCCAGTCC
 AGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATACTGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTT
 CGGGCCTTGCGGATTTGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGG
 CGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTG
 AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGC
 TGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTG

CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGC
 CCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACGTGCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATT
 CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACA
 AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 TAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGAC
 CGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA
 GCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAG
 AGATACGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTA
 GATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGTA
 ACTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGTGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT
 TACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCG
 AATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCTGTGAAGTCAGTGCATCG
 CCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGTAATACGTTCCCGGGCATTGTACACACCGCCACGTT
 ACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTAACCTTTTCGGGAGGGCGTTTTACCACGGTG
 TGATTCATGATCTGGGGTGAA

C5 7m

>C57m-*Microbacterium paraoxydans*

GGGGGCTTACATGCAGTCGACGGTGAACACGGAGCTTGCTCTGTGGGATCAGTGGCGAACGGGTGAG
 TAACACGTGAGCAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGGAAACGGCGTCTAATACTGGATATG
 TGACGTGACCGCATGGTCTGCGTTTTGAAAAGATTTTTTCGGTTGGGGATGGGCTCGCGGCCATCAGC
 TTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACA
 CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAA
 AGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAA
 GAAGCGAAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGNCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGCTCTGCT
 GTGAAATCCCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGGGTTAGGGGAGA
 TTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATC
 TCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGGTTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAGT
 CCACCCCGTAAACGTTGGGAACTAGTTGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGACGCAGCTAACGCA
 TTAAGTTCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC
 AAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATATACGA
 GAAC

Grupo Q.

C5b 4m

>C5b4m-*Pseudomonas shigelloides*

GCTAcCATGCAGTCGAGCGGTAAACACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGA
 GTAATGCCTGGGGATCTGCCCGaTAGAGGGGGATAACTACGGGAAACTGTAGCTAATACCGCATAAc
 GTCTACGGACCAAAGTGGGGGCTCTTCGGACCTCATGCTATCGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTA
 GTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTCTAACTGGTTTTGAGAGAATGACCAGTCACACT
 GGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
 CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGA
 AGGGTCACTaGTTAATACCTAGTGGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGCACGCAGG

CGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTCAACTTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCT
AGAGTCCTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATAC
CGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
TTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAAT
TGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT

C10 3m

>C103m *Pseudomonas monteilii*
GGGGCCAATGCAAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
TGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGTCCT
ACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG
GTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAC TGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAA
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTG
ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG
CAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGT
TCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAC TGGCGAGCTAGAG
TATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGC
GCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCC