



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències de la Salut

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

# **DIVERSITAT FENOTÍPICA I GENOTÍPICA**

## **DEL GÈNERE *Aeromonas***

David Miñana i Galbis

2002





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències de la Salut

Facultat de Farmàcia

Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries

Programa de Doctorat: Microbiologia Aplicada

Bienni: 1996 – 1998

# **DIVERSITAT FENOTÍPICA I GENOTÍPICA DEL GÈNERE**

## ***Aeromonas***

Memòria presentada per David Miñana i Galbis  
per optar al títol de Doctor en Biologia.

Barcelona, 14 d'octubre de 2002

VISTIPLAU DELS DIRECTORS DE TESI

Dr. J. Gaspar Lorén Egea

Dra. M. Carmen Fuste i Munné





UNIVERSITAT DE BARCELONA



Divisió de Ciències de la Salut  
Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries  
Unitat de Microbiologia

Facultat de Farmàcia  
Av. Joan XXIII, s/n  
08028 BARCELONA

Tel. 34.93 402 44 97  
Fax 34.93 402 44 98

Dr. J. GASPAR LORÉN EGEA, Catedràtic de Microbiologia, i la Dra. M. CARME FUSTÉ I MUNNÉ, Professora Titular de Microbiologia, del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries de la Facultat de Farmàcia de la Divisió de Ciències de la Salut de la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEN:

Que DAVID MIÑANA I GALBIS ha realitzat sota la nostra direcció la tesi doctoral "Diversitat fenotípica i genotípica del gènere *Aeromonas*", la qual reuneix tots els requisits necessaris per a la seva presentació i defensa per optar al grau de Doctor en Biologia.

Dr. J. Gaspar Lorén Egea

Dra. M. Carme Fusté i Munné

Barcelona, 14 d'octubre de 2002.



## **AGRAÏMENTS**

Al Dr. Lorén i a la Dra. M. Carme Fusté, els meus Directors de Tesi, per l'oportunitat que m'han donat acollint-me al seu Grup de Recerca.

A la Universitat de Barcelona, a la Divisió de Ciències de la Salut i al Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, gràcies als quals sóc Professor Ajudant a dia de hui, per concedir-me la Beca de Formació en la Recerca i la Docència que m'ha permès donar Pràctiques i realitzar la Tesi.

Al Dr. Congregado, Cap del Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, pel seu recolzament i al Dr. Màrius Rubiralta, exVicerector de Recerca, per la seua comprensió.

A tota la gent que està o ha estat al mateix grup de recerca que jo: Lali, Núria, Maribel i, especialment, als meus amics Julio i Rafa. A tots els qui van treballar amb mi directament: Cristina, Núria, Úrsula, Sònia, Sònia Roig, Dani, Raquel, Marta, Juan Luis, Marta (de Santiago), Miquel i, especialment, a Xavi, amic i company d'assistència al Camp del Barça. També a la resta de gent que està o ha estat en el Grup com Isa, Núria Olmedo, Oriol, etc.

Al Dr. Miquel Regué i la seua gent, sobretot amb els qui vaig compartir els dinars de cada dia: Nihal, Francesc, César, Núria Piqué, Núria Climent i també amb altra gent com Fàtima, Elías i Alícia. A la resta de persones que han anat passant: Jose, Raquel, Núria Coderch, Bea i Flori. Però molt especialment a César, Núria Piqué, Núria Climent i Alícia, moltes gràcies per la vostra amistat i companyia.

Al Dr. Guinea i a M. Jesús, Núria Bozal, Paco, Maria i al meu "germà" Víctor. A la Dra. Ana Marqués i a Núria Lázaro, Susana, Cristina i, especialment, a Asun. A la Dra. Dolors Simó, a Pere, Mònica i M. Carme. A la Dra. Elena Mercadé i, especialment, a Alberto. A Pili i a Carmen, Merxe, Pili, Sònia, Marta i Ajo. A Glòria i a Carme, Josep i Lúdia. A la Dra. Àngels Manresa, a la Dra. Josele Espuny i a tots els "Tensis" (o "Surfis"): Jordi (company en la cursa final de la Tesi), Éscar (compartint preocupacions de Vivenda), Jaume (excel·lent

company), Ester, Olga, Isabel, Arelis, Miriam, Dèlia, Pau, Paula, Raül, Anna, Mònica, etc. Al meu amic Albert (company de pràctiques interminables).

A Marisol i a Àngel, companys de reivindicacions, i a Enric García per la seua ajuda.

Al Dr. Antonio Martínez-Murcia, a la Dra. Conxa Segura, al Dr. Guillem Prats, a Xavier Lizana i a la CECT per les soques proporcionades. Al Dr. Ferran Pereira i a la Dra. Sílvia Crespo per l'ajuda en la denominació de les espècies de mol·luscs bivalves. A Lluís López del Servei de Llengua Catalana i a Antonio del Servei d'Audiovisuals.

A tots aquells que han format part de la meua evolució personal.

A tots els meus amics, familiars i coneguts que han cregut sempre amb mi. Gràcies per la vostra confiança.

A la família de Cris pel seu recolzament malgrat el patiment de la distància.

Als meus pares i germans que sempre han estat amb mi i han patit també la llunyania. De nou als meus pares, que m'ho han donat tot.

Al meu fill Jordi, per estar amb nosaltres i per ser tan simpàtic i tan bon xiquet.

A tu Cris, que vas voler vindre-te'n a Barcelona tot i allunyar-te d'amics i familiars. Gràcies per estar junts en l'aventura de la vida. Ja saps, el meu amor ets tu.



# ÍNDEX

---



<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1 - 32</b>
1.1. El gènere <i>Aeromonas</i> : característiques generals.	4
1.2. Hàbitat i patogenicitat.	5
1.3. Factors de virulència.	7
1.3.1. Lipopolisacàrid (LPS).	7
1.3.2. Capa S.	8
1.3.3. Adhesines.	9
1.3.4. Càpsula.	10
1.3.5. Hemolisines i enterotoxines.	10
1.3.6. Proteases.	11
1.3.7. Lipases.	11
1.3.8. Sideròfors.	11
1.4. Aïllament.	11
1.5. Situació taxonòmica.	14
1.5.1. <i>A. hydrophila</i> (HG1).	15
1.5.2. <i>A. bestiarum</i> (HG2).	16
1.5.3. <i>A. salmonicida</i> (HG3).	17
1.5.4. <i>A. caviae</i> (HG4).	18
1.5.5. <i>A. media</i> (HG5).	19
1.5.6. <i>A. eucrenophila</i> (HG6).	19
1.5.7. <i>A. sobria</i> (HG7).	20
1.5.8. <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> (HG8).	21
1.5.9. <i>A. jandaei</i> (HG9).	21
1.5.10. <i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> (HG10).	21
1.5.11. <i>A. schubertii</i> (HG12).	22
1.5.12. <i>A. trota</i> (HG14).	22
1.5.13. <i>A. allosaccharophila</i> .	23
1.5.14. <i>A. encheleia</i> .	23
1.5.15. <i>A. popoffii</i> .	24
1.6. Tècniques d'estudi taxonòmiques.	26
<b>2. OBJECTIUS</b>	<b>33 - 36</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>37 - 80</b>
3.1. Mostratges.	39
3.2. Processament de les mostres.	43



3.2.1.	Mol·luscs bivalves.	43
3.2.2.	Aigües.	44
3.2.3.	Medis i temperatura.	44
3.3.	Purificació, selecció i conservació de les soques aïllades.	45
3.4.	Identificació i caracterització fenotípiques.	46
3.5.	Estudi de taxonomia numèrica.	63
3.5.1.	Processament de les dades i anàlisi numèrica.	63
3.5.2.	Reproductibilitat de les proves i avaluació de l'errada.	63
3.6.	Estudi de diversitat genètica i estructura poblacional d' <i>Aeromonas</i> spp. mitjançant la tècnica MLEE.	64
3.6.1.	Soques incloses en l'estudi.	64
3.6.2.	Obtenció d'extractes cel·lulars.	65
3.6.3.	Electroforesi en gels de poliacrilamida.	66
3.6.4.	Enzims analitzats.	67
3.6.5.	Lectura dels gels.	76
3.6.6.	Anàlisi de dades en la tècnica MLEE.	78
<b>4.</b>	<b>RESULTATS</b>	<b>81 - 136</b>
4.1.	Soques seleccionades i <i>Aeromonas</i> aïllades.	83
4.2.	Prevalència, detecció i identificació a nivell d'espècie de les <i>Aeromonas</i> aïllades.	89
4.3.	Estudi taxonòmic.	97
4.3.1.	Característiques fenotípiques de les soques incloses en l'estudi taxonòmic.	97
4.3.2.	Estructura del dendrograma.	100
4.3.3.	Coefficient de correlació cofenètica ( $r$ ).	107
4.3.4.	Test de reproductibilitat.	107
4.4.	Marcadors fenotípics de patogenicitat.	109
4.5.	Estudi de diversitat genètica i estructura poblacional.	110
4.5.1.	Extractes cel·lulars i enzims.	110
4.5.2.	ETs i diversitat genètica.	120



4.5.3.	Relació genètica entre ETs.	126
4.5.4.	Anàlisi del desequilibri de lligament.	129
4.6.	Correlació MLEE – identificació fenotípica.	131
4.7.	Resum dels resultats obtinguts.	134
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ</b>	<b>137 - 156</b>
5.1.	Medis d'aïllament.	139
5.2.	Detecció i distribució d' <i>Aeromonas</i> spp. en les mostres analitzades.	140
5.3.	Identificació i taxonomia numèrica del gènere <i>Aeromonas</i> .	142
5.4.	<i>Aeromonas</i> com a possible patogen.	146
5.5.	Llocs analitzats i diversitat genètica.	149
5.6.	Relació genètica entre ETs.	152
5.7.	Anàlisi del desequilibri de lligament.	155
5.8.	Correlació MLEE – identificació fenotípica.	156
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS</b>	<b>157 - 160</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>161 - 174</b>
<b>8.</b>	<b>ANNEXOS</b>	<b>175 - 217</b>
8.1.	Medis de cultiu i solucions salines.	177
8.2.	Reactius i colorants.	187
8.3.	Tincions enzimàtiques.	189
8.4.	Solucions amortidores i reactius de tinció.	195
8.5.	Índex de taules i figures.	199
8.6.	Abreviacions	203
8.7.	MIÑANA-GALBIS, D. - FARFÁN, M. - LORÉN, J.G. - FUSTÉ, M.C. (2002): "Biochemical identification and numerical taxonomy of <i>Aeromonas</i> spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain", <i>Journal of Applied Microbiology</i> , 93 (3): 420-430.	207





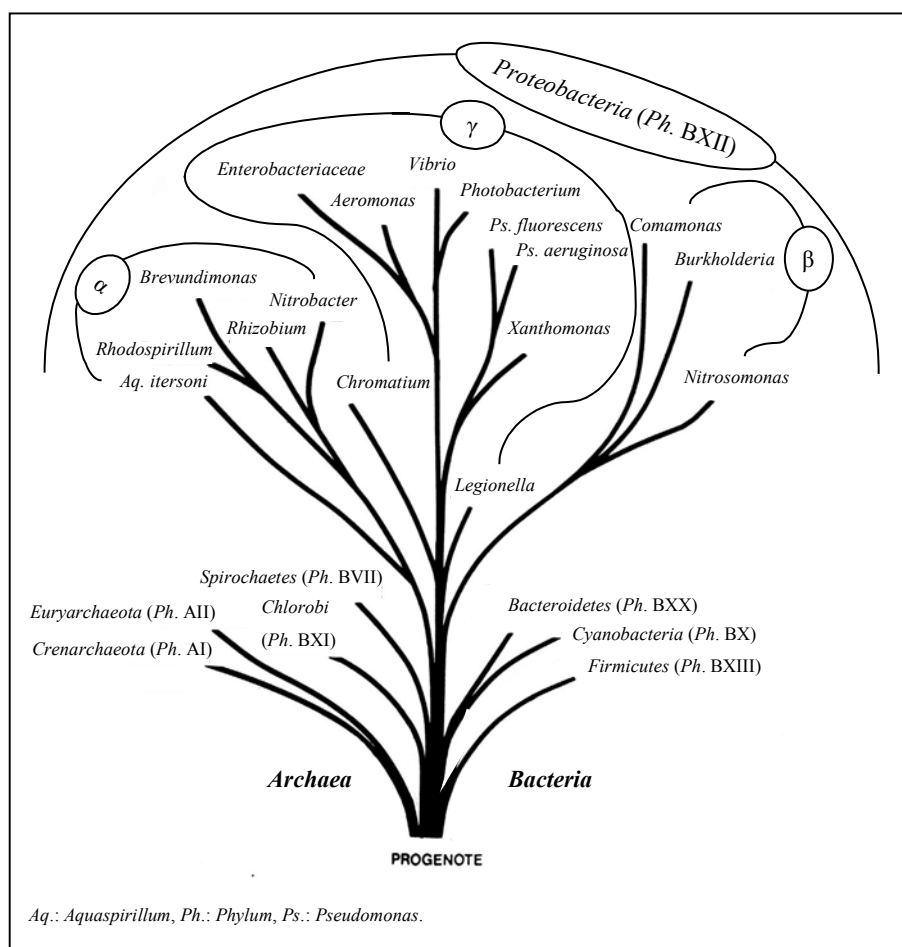
# 1. INTRODUCCIÓ

---



El gènere *Aeromonas* Stanier 1943 (EUZEBY 1998), “mònada productora de gas”, va ser reconegut en 1986 com a únic gènere de la nova família *Aeromonadaceae*, escindint-se de la família *Vibrionaceae* en base a les evidències acumulades en diferents estudis filogenètics (COLWELL i al. 1986). Actualment (BOONE i CASTENHOLZ 2001) també s’inclou en la família *Aeromonadaceae* al gènere *Tolumonas*, format per una única espècie (*Tolumonas auensis*) i una única soca (FISCHER-ROMERO i al. 1996). Altres fonts d’informació acreditades on s’incorporen les novetats taxonòmiques es poden trobar en la xarxa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html> i [www.bacterio.cict.fr/](http://www.bacterio.cict.fr/)).

**Figura 1.** Relacions filogenètiques entre diferents *taxa* de *Bacteria* i *Archaea* basades en catàlegs de 16S rRNA. [Font: Figura 2A modificada, COLWELL i al. 1986].

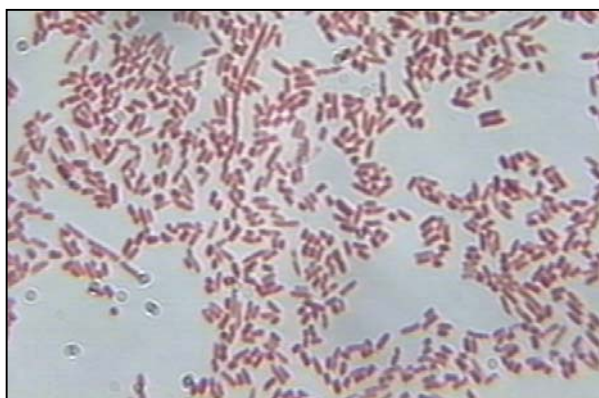


### 1.1. El gènere *Aeromonas*: característiques generals.

La classificació taxonòmica del gènere *Aeromonas* és la següent (Figura 1): Domini *Bacteria*, Phylum BXII *Proteobacteria*, Classe III “Gammaproteobacteria”, Ordre XI “Aeromonadales”, Família I *Aeromonadaceae*, Gènere I *Aeromonas* (BOONE i CASTENHOLZ 2001).

Les *Aeromonas* són bacteris amb forma de bacils rectes amb extrems arrodonits que poden arribar a tindre una forma pròxima a la coccoide. Diàmetre d'entre 0,3-1,0 µm i longitud d'entre 1,0-3,5 µm. Es presenten sols, en parelles o en cadenes curtes. No formen endòspores. Gramnegatiu (Figura

**Figura 2.** Tinció de Gram d'*Aeromonas bestiarum*.



2). Habitualment mòbils per l'existència d'un únic flagel polar, però flagels peritrics poden formar-se en cultius joves sobre medis sòlids. Quimioorganotrofs anaerobis facultatius amb metabolisme respiratori i fermentatiu. Utilitzen oxigen com a acceptor d'electrons. Oxidasa i catalasa positius. Redueixen nitrats però no desnitrifiquen. Catabolitzen D-glucosa i altres carbohidrats formant àcids i, sovint, gas. Utilitzen diversos sucres i àcids orgànics com a font de carboni. Temperatura òptima de creixement entre 22-28°C, poden créixer a baixes temperatures (5°C), la temperatura màxima de creixement en les soques mesòfiles és de 44°C mentre les psicròfiles no

creixen a 36°C. Creixen a pHs elevats (pH 9) però no a pHs baixos (< 5). No requereixen NaCl per al seu creixement i elevades concentracions (6-7 %) són inhibidores. Resistent a l'agent vibriostàtic O/129. Hàbitat principalment aquàtic d'aigües dolces i d'animals aquàtics. Algunes espècies són patògenes d'animals invertebrats i vertebrats, incloent-hi l'home. Contingut de G+C entre 57-63 mol%. (POPOFF 1984, COLWELL i al. 1986, HOLT i al. 1994, HÄNNINEN i al. 1995, JANDA 1998).

## 1.2. Hàbitat i patogenicitat.

Les *Aeromonas* ocupen una enorme diversitat d'hàbitats, encara que el medi aquàtic, principalment aigües dolces i interfase aigua dolça - aigua marina, s'ha descrit com el seu hàbitat natural. Així s'han aïllat *Aeromonas* en nombrosos ambients aquàtics com aigües potables clorades i sense clorar, pous, piscifactories, piscines, rius, llacs, tolls, aigües residuals, platges, estuaris, etc. (POPOFF 1984, POPOFF i LALLIER 1984, KHANDORI i FAINSTEIN 1988, ARAUJO i al. 1990, FARMER III i al. 1992, FIORENTINI i al. 1998). També és freqüent el seu aïllament en llots activats, sòls i sediments (FARMER III i al. 1992).

*Aeromonas* també forma part de la microbiota de mol·luscs, peixos d'aigua dolça i altres animals poiquiloterms (POPOFF i LALLIER 1984, KUEH i CHAN 1985, SAKATA 1989, CAHILL 1990, MAKI i al. 1998, GRAF 1999).

Els aliments també constitueixen una font d'aïllament d'*Aeromonas* spp., així se'n poden trobar en vegetals, peix, carn, llet i derivats, gelats, etc. (FARMER III i al. 1992, MERINO i al. 1995).

Per una altra banda, algunes espècies del gènere *Aeromonas*, si no totes, poden ocasionar un gran ventall de malalties en animals. Les soques psicròfiles i immòbils de l'espècie *A. salmonicida* (*A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* i *A. salmonicida* subsp. *smithia*) representen l'únic cas de

parasitisme estricta dins del gènere *Aeromonas* (POPOFF 1984, FARMER III i al. 1992, HOLT i al. 1994). Aquestes soques són patògenes de peixos d'aigua dolça, principalment dels salmònids (salmó, truita), als quals causen furunculosi que sol presentar-se com a epizoòtia (FARMER III i al. 1992). Altres espècies (principalment *A. hydrophila* i *A. caviae*) són patògenes oportunistes i poden causar malalties en mol·luscs, peixos, amfibis, rèptils i vertebrats (BAYNE 1983, POPOFF i LALLIER 1984, FARMER III i al. 1992).

En humans, cinc espècies són considerades patògenes oportunistes (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. jandaei*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. schubertii*), representant *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii* bv. *sobria*  $\geq 85$  % del total de soques clíniques aïllades (JANDA i ABBOTT 1998). Aquestes espècies poden causar diverses infeccions extraintestinals: infeccions en ferides, septicèmia, síndrome urèmica hemolítica, meningitis, endocarditis, peritonitis, infeccions oculars, malalties del tracte respiratori, etc. La principal diana de les *Aeromonas* en algunes infeccions extraintestinals (septicèmia, meningitis, peritonitis, endocarditis) són adults immunocompromesos i xiquets menors de dos anys amb complicacions clíniques (KHARDORI i FAINSTEIN 1988, JANDA i ABBOTT 1998). En les infeccions gastrointestinals encara no s'ha pogut demostrar que cap brot haja estat causat per *Aeromonas*, ja que sembla que les condicions necessàries per a associar *Aeromonas* a un brot de malaltia gastrointestinal són improbables: presència d'una soca específica virulenta a una elevada concentració (dosi infectiva) i de persones susceptibles de ser infectades (JANDA i ABBOTT 1998). A més, s'han aïllat *Aeromonas* en femtes de persones sanes encara que, en general, no es considera que formen part de la microbiota normal del tracte gastrointestinal per la baixa prevalència ( $\leq 1$  %) en el seu aïllament (ARAUJO i al. 1991, JANDA 1998). Les principals fonts d'infeccions clíniques són l'aigua, el sòl i els aliments contaminats, amb la pell lesionada i l'aparell digestiu com a vies d'entrada (KHARDORI i FAINSTEIN 1988, FARMER III i al. 1992, MERINO i al. 1995, JANDA i ABBOTT 1998). Per una altra banda, la majoria d'*Aeromonas* són sensibles a les tetraciclines, aminoglicòsids, trimetoprim-sulfametoxazole, cefalosporines de tercera generació i quinolones; encara que l'existència de  $\beta$ -lactamases i plasmidis conjugatius amb gens que confereixen resistència a antibiòtics, tant en soques ambientals com en soques clíniques, pot

incrementar-ne la resistència (POPOFF 1984, JANDA 1991, PEMBERTON i al. 1997, JANDA i ABBOTT 1998).

### 1.3. Factors de virulència.

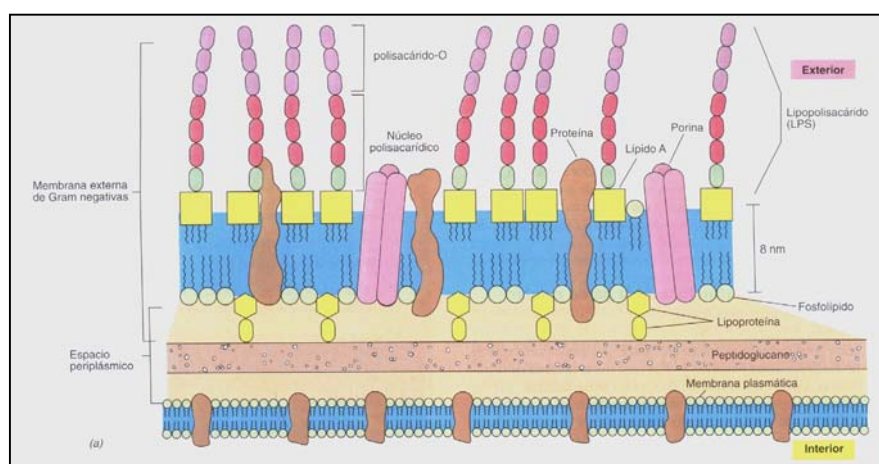
**Taula 1.** Principals factors de virulència en el gènere *Aeromonas*.

Estructurals	Exotoxines
Antigen O (O:11, O:34).	$\beta$ -hemolisina enterotòxica.
Capa S.	$\beta$ -hemolisina no enterotòxica.
Càpsula.	$\alpha$ -hemolisina no enterotòxica.
Endotoxina (lípid A).	Enterotoxina citotònica.
Fímbries i/o pili.	Altres: elastasa, fosfolipasa C ...

#### 1.3.1. Lipopolisacàrid (LPS).

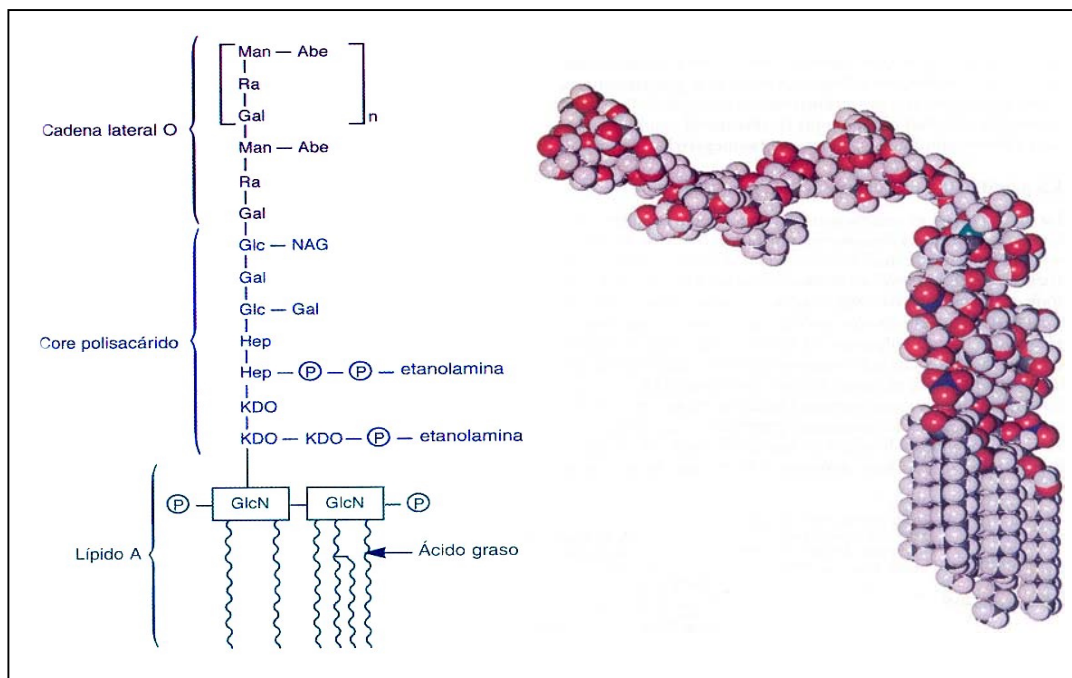
El lípid A del LPS o endotoxina és un factor de virulència dels bacteris gramnegatius (Taula 1, Figura 3, Figura 4). Per una altra banda, el polisacàrid antigen O del LPS està implicat en la resistència al sèrum i a la fagocitosi. A més, s'ha observat que la producció d'algunes exotoxines és dependent de la presència d'antigen O i que algunes soques

**Figura 3.** Envoltos de bacteris gramnegatius. [Font: Figura 3.34.a, MADIGAN i al. 1999].



d'*Aeromonas* spp. produeixen més antigen O a baixes temperatures (20°C). Els serogrups d'*Aeromonas* més freqüentment aïllats de mostres clíniques són O:11 i O:34. (MERINO i al. 1995, ROTGER 1997).

**Figura 4.** Estructura i model molecular d'un LPS. [Font: Figura 3.29, PRESCOTT i al. 1999].



Abe: abequosa, Gal: galactosa, Glc: glucosa, GlcN: glucosamina, Hep: heptulosa, KDO: 2-ceto-3-desoxioctonat, Man: manosa, NAG: *N*-acetil glucosamina, P: fosfat, Ra: ramnosa.

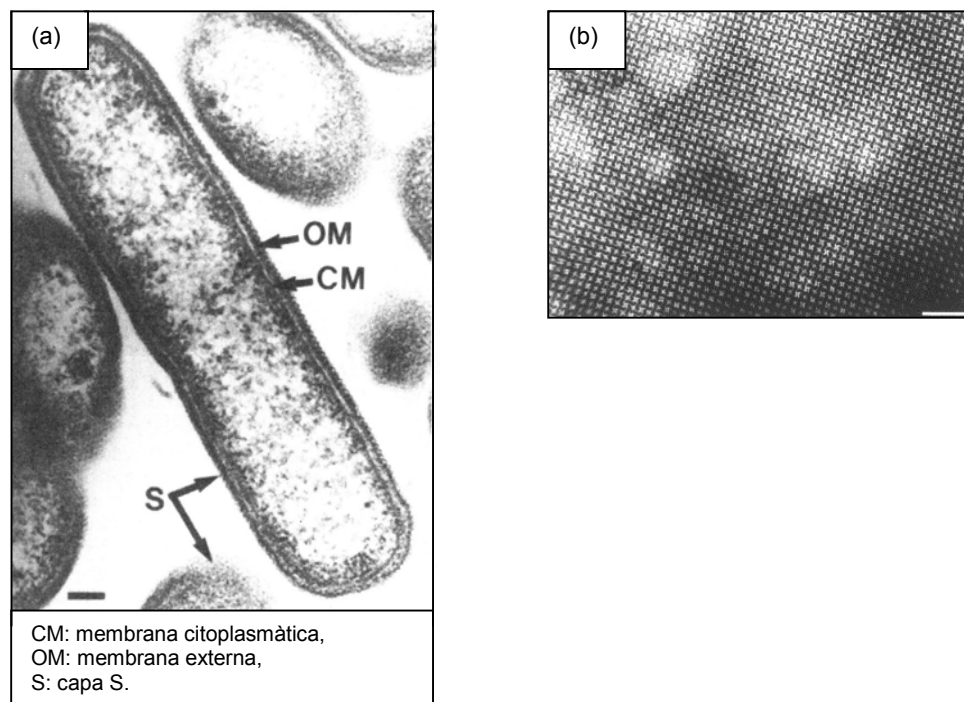
### 1.3.2. Capa S.

La capacitat de formar capa S, associada a l'antigen O, es considera una característica patogènica en bacteris, ja què actua com a barrera de permeabilitat i de protecció davant els mecanismes de defensa de l'hoste (Taula 1, Figura 5). En el gènere *Aeromonas* també se l'anomena capa A i únicament les soques pertanyents al serogrup O:11 tenen la capacitat de formar-la. Aquesta característica és el principal factor de virulència en la infecció d'*A. salmonicida* en peixos. També s'ha descrit l'existència de capa S en soques *A. hydrophila* i *A. veronii* bv. *sobria* procedents de diverses infeccions en animals i en persones. En aquestes dues espècies les capes S són idèntiques però difereixen genèticament i fenotípicament



de la d'A. *salmonicida*. (JANDA 1991, KOKKA i al. 1991, MERINO i al. 1995, MADIGAN i al. 1999).

**Figura 5.** Capa S (a) en una cèl·lula de *Campylobacter rectus* i (b) d'A. *hydrophila*. [Fonts: (a) Figura 2.29.a, HOLT i LEADBETTER 1998, (b) Figura 1, NOONAN i TRUST 1997].



### 1.3.3. Adhesines.

La capacitat d'adhesió constitueix la primera etapa en la colonització de les mucoses. En *Aeromonas* s'han descrit dos tipus morfològics diferents de fimbries o pili (Taula 1), tant en soques clíniques com en ambientals. Els pili, rígids i curts (S/R), són nombrosos, tenen una subunitat de 17-18 kDa i no tenen capacitat d'hemoaglutinació. Les fimbries, flexibles i llargues (L/W), amb una subunitat de només 4 kDa, són hemoaglutinines i se'n presenten poques per cèl·lula. En general, sembla que a temperatures baixes s'afavoreix l'expressió del dos tipus de pili. Les principals adhesines no filamentoses descrites són la proteïna SAP (proteïna formada en la superfície), monòmer de la capa S, i les lectines. (JANDA 1991, RAMBOARINA i al. 1993, MERINO i al. 1995, THORNLEY i al. 1996).

#### 1.3.4. Càpsula.

Les càpsules (Taula 1) tenen capacitat antigènica i d'adherència, formen una barrera davant agents externs (bacteriòfags, anticossos, detergents) i confereixen resistència al sèrum, a la fagocitosi i a la dessecació. La producció de polisacàrid capsular (exopolisacàrid o glicocàlix) és un important factor patogènic en les soques virulentes d'*A. salmonicida*, que pot ser estimulada per la utilització de medis rics amb glucosa. Aquesta característica també s'ha demostrat en *A. hydrophila* i *A. veronii* bv. *sobria*. (MERINO i al. 1995, GARCÍA-RODRÍGUEZ i PICAZO 1996).

#### 1.3.5. Hemolisines i enterotoxines.

Diverses hemolisines (Taula 1) s'han purificat i detectat, principalment, en *A. hydrophila* i *A. veronii* biovar *sobria*. Les  $\beta$ -hemolisines, també anomenades aerolisines, són citotòxiques, termolàbils (a 56°C), tenen un pes molecular d'entre 49-54 kDa, la majoria d'elles són també enterotòxiques i algunes presenten reactivitat creuada amb la toxina colèrica. També s'ha purificat una  $\alpha$ -hemolisina citotòxica de 65 kDa, no enterotòxica, termolàbil i que no s'expressa a una temperatura superior als 30°C. L'activitat citolítica s'origina amb la formació de porus en la membrana cel·lular que resulta en un augment de la pressió osmòtica i en la consegüent lisi cel·lular. En canvi, el mecanisme enterotoxigènic és l'activació en la cèl·lula hoste de l'adenilat ciclase que indueix l'augment del nivell de l'AMPc que incrementarà la secreció cel·lular, resultant en una pèrdua de líquids o diarrea. (ROSE i al. 1989a, ROSE i al. 1989b, JANDA 1991, FERGUSON i al. 1997, FUJI i al. 1999).

A més de les enterotoxines hemolítiques, també s'han descrit enterotoxines citotòniques no hemolítiques (Taula 1), alguna de les quals presenta reactivitat creuada amb la toxina colèrica. La toxicitat citotònica no implica mort cel·lular sinó una alteració de la funció cel·lular o del citoesquelet. (HOUSTON i al. 1991, JANDA 1991, ROTGER 1997).

### 1.3.6. Proteases.

Les proteases poden causar dany tissular, augmentar la capacitat invasiva i proporcionar nutrients. *Aeromonas* produeix principalment metal·loproteases i serinproteases. Recentment, s'ha descrit una metal·loproteasa elastolítica (Taula 1) essencial en la patogenicitat d'*A. hydrophila*. (JANDA 1991, PEMBERTON i al. 1997, VIPOND i al. 1998, CASCÓN i al. 2000).

### 1.3.7. Lipases.

La fosfolipasa C és un important factor de patogenicitat en molts bacteris gramnegatius. Diverses lipases, una d'elles amb activitat fosfolipasa C (Taula 1), s'han obtingut a partir d'*A. hydrophila* i *A. salmonicida*. (PEMBERTON i al. 1997, VIPOND i al. 1998).

### 1.3.8. Sideròfors.

Es postula que la captació de ferro és important per a l'establiment d'una infecció. La majoria d'*Aeromonas* spp. produeixen el sideròfor amonabactina, encara que algunes espècies també produeixen enterobactina. (JANDA 1991, PEMBERTON i al. 1997).

## **1.4. Aïllament.**

Les soques del gènere *Aeromonas* creixen en medis nutritius convencionals (TSA, TSB, aigua de peptona, etc.) ja que no requereixen cap nutrient especial ni factors de creixement. Per a l'aïllament d'*Aeromonas* a partir de mostres clíniques s'han emprat diversos medis de cultiu selectius per a enterobacteris per la resistència d'*Aeromonas* als agents selectius utilitzats en aquests medis com l'agar sang (BA), l'agar McConkey, eosina-blau de metilè (EMB), l'agar SS (*Salmonella-Shigella*), el medi CIN (cefsulodina-irgasan-novobiocina) i l'agar de Butzler.

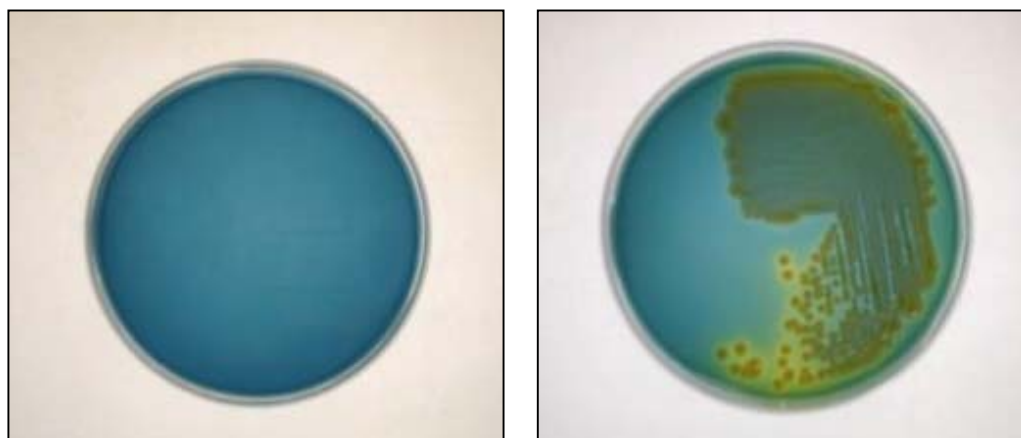
S'han descrit nombrosos medis de cultiu selectius per a l'aïllament d'*Aeromonas*: agar inositol-verd brillant-sals biliars (IBB), medi dextrina-fucsina-sulfit o agar diferencial *Aeromonas* (DFS), medi de Rimler-Shotts (RS), agar sang-ampicil·lina (BAA), agar DNAsa-blau de toluïdina-ampicil·lina (DNTA), agar Pril-xilosa-ampicil·lina (PXA), agar xilosa-desoxicolat-citrat (XDC), agar midó-ampicil·lina (SAA), filtració en agar mA, agar dextrina-ampicil·lina (ADA), agar glutamat-midó-penicil·lina (GSP), agar midó-glutamat-ampicil·lina-penicil·lina (SGAP), APW i TSB amb ampicil·lina, etc. L'addició d'ampicil·lina (10-30 mg/l) als medis s'ha generalitzat, ja que permet el creixement de la majoria d'*Aeromonas* alhora que inhibeix la microbiota acompanyant. (HAVELAAR i al. 1987, FARMER III i al. 1992, RAMBOARINA i al. 1993, GAVRIEL i LAMB 1995).

A banda dels articles on es descriuen els nous medis de cultiu específics per a *Aeromonas*, hi ha pocs estudis comparatius dels medis utilitzats per a la detecció i aïllament d'*Aeromonas*, on molt pocs medis són comparats i on no són comparats els mateixos medis, fent molt difícil l'anàlisi crítica d'aquests estudis (MOYER 1987, CAHILL i MACRAE 1992, PIN i al. 1994, GAVRIEL i LAMB 1995, TSAI i CHEN 1996). Així i tot, s'han recomanat diferents medis de cultiu per a l'aïllament d'*Aeromonas* depenent del tipus de mostra. Per a una òptima recuperació d'*Aeromonas* en femtes, l'ús del medi de transport Cary-Blair, l'enriquiment amb APW (25°C, 24 h) i la posterior sembra en BAA a 37°C durant 24 h sembla ser la millor opció (MOYER 1987, MOYER i al. 1991). Abans de la descripció del medi ADA (HAVELAAR i al. 1987), el medi més emprat per a la detecció d'*Aeromonas* en aliments era l'agar SAA (PALUMBO i al. 1985), mentre en aigües el medi d'elecció era el mA prèvia filtració en membrana (RIPPEY i CABELLI 1979). Aquests medis s'incuben a 28-30°C durant 24 h.

A partir de la descripció del medi ADA, medi inicialment ideat per a mostres d'aigua, s'ha anat fent extensiu l'ús d'aquest medi, utilitzant-se també en aliments (HÄNNINEN i SIITONEN 1995, BORRELL i al. 1998, NEYTS i al. 2000). Després de 24 h a 30°C, les *Aeromonas* creixen formant colònies grogues per la fermentació de dextrina (Figura 6). A més, en mostres d'aigua de mar i de mol·luscs es recomana l'addició d'O/129 (50 mg/l) al medi per a

inhibir el creixement de *Vibrio* spp. (HAVELAAR i al. 1987, BORRELL i al. 1998).

**Figura 6.** Medi ADA abans i després del creixement d'*A. bestiarum*.



En els diferents medis de cultiu, alguns autors també han utilitzat enriquiments previs amb TSB o APW amb o sense ampicil·lina (MOYER i al. 1992*a*, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, BORRELL i al. 1998, KAZNOWSKI 1998, MELAS i al. 1999, NEYTS i al. 2000, MASSA i al. 2001).

L'última descripció d'un medi de cultiu selectiu per a *Aeromonas* trobada en la literatura és la de l'agar PADE (Pril-ampicil·lina-dextrina-etanol) (IMZILN i al. 1997). En aquest estudi, els medis ADA i PADE foren millors que els altres medis assajats (DFS, PXA, SAA). Ara bé, el medi PADE va ser més selectiu que l'ADA a partir de mostres d'aigua molt contaminades perquè conté Pril que inhibeix el *swarming* de *Proteus*, etanol que inhibeix *Klebsiella* i una major concentració d'ampicil·lina (30 mg/l en front dels 10 mg/l de l'ADA), encara que aquesta concentració podria resultar massa elevada per a determinades soques d'*Aeromonas* (HAVELAAR i al. 1987, CARNAHAN i al. 1991*b*, SINGH i SANYAL 1994).

### 1.5. Situació taxonòmica.

En el *Bergey's Manual*<sup>®</sup> of *Systematic Bacteriology* (POPOFF 1984), es van descriure quatre espècies en el gènere *Aeromonas*: l'espècie psicròfila, immòbil i patògena de salmònids *A. salmonicida*, amb tres subespècies (*A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida*), i les espècies mesòfiles i mòbils *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria* (Taula 2).

En un estudi previ, POPOFF i al. (1981) van distingir diversos grups d'hibridació DNA (HG) en les espècies mesòfiles, però que eren fenotípicament indistingibles (Taula 2): tres en *A. hydrophila*, que posteriorment s'han anomenat *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2) i *A. salmonicida* (HG3); dos en *A. caviae* i una soca intermèdia, *A. caviae* (HG4), *A. media* (HG5) i *A. eucrenophila* (HG6); i dos en *A. sobria*, *A. sobria* (HG7) i *A. veronii* bv. *sobria* (HG8) (KUIJPER i al. 1989, CARNAHAN i al. 1991a, ALI i al. 1996). Diversos estudis han aconseguit la separació fenotípica d'aquests grups d'hibridació (ALTWEGG i al. 1990, ALTWEGG i LÜTHY-HOTTENSTEIN 1991, ABBOTT i al. 1992, KÄMPFER i ALTWEGG 1992, HÄNNINEN 1994, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HÄNNINEN i al. 1995, JANDA i al. 1996, KAZNOWSKI 1997, KAZNOWSKI 1998).

A més d'aquestes huit espècies (HG 1-8), se n'han anat descrivint moltes altres fins arribar a les 16 actuals, algunes de les quals sense nom d'espècie (Taula 2): *A. jandaei* (HG9), *A. veronii* bv. *veronii* (HG10), HG11 (sense nom), *A. schubertii* (HG12), HG13 (sense nom), *A. trota* (HG14), *A. allosaccharophila* (HG per numerar), *A. encheleia* (HG per numerar) i *A. popoffii* (HG per numerar) (KUIJPER i al. 1989, CARNAHAN i al. 1991c, MARTÍNEZ-MURCIA i al. 1992b, ESTEVE i al. 1995c, HUYS i al. 1997b).

**Taula 2.** Classificació del gènere *Aeromonas*.

HG	ESPÈCIES	COMPLEX FENOTÍPIC	PATOGENICITAT
1	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>	Oportunista
2	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. hydrophila</i>	No
3	<i>A. salmonicida</i> mesòfila	<i>A. hydrophila</i>	No
3	<i>A. salmonicida</i> psicròfila	<i>A. salmonicida</i>	Estricta
4	<i>A. caviae</i>	<i>A. caviae</i>	Oportunista
5A	<i>A. media</i>	<i>A. caviae</i>	Oportunista
5B	<i>A. media</i>	<i>A. media</i>	No
6	<i>A. eucrenophila</i>	<i>A. caviae</i>	No
7	<i>A. sobria</i>	<i>A. sobria</i>	No
8	<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	<i>A. sobria</i>	Oportunista
9	<i>A. jandaei</i>	<i>A. sobria</i>	Oportunista
10	<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	<i>A. veronii</i>	Oportunista
11	<i>Aeromonas</i> sp. ODC+	<i>A. veronii</i>	
12	<i>A. schubertii</i>	<i>A. schubertii</i>	Oportunista
13	Group 501	<i>A. schubertii</i>	
14	<i>A. trota</i>	<i>A. sobria</i>	No
15	<i>A. allosaccharophila</i>	<i>A. allosaccharophila</i>	No
16	<i>A. encheleia</i>	<i>A. encheleia</i>	No
17	<i>A. popoffii</i>	<i>A. popoffii</i>	No

### 1.5.1. *A. hydrophila* (HG1).

L'espècie *A. hydrophila* presenta les següents característiques (Taula 5): mòbil, no pigmentada, produeix indole i sulfhídric (de cisteïna), Voges-Proskauer (VP) positiva, arginina deshidrolasa (ADH) positiva, lisina descarboxilasa (LDC) variable, ornitina descarboxilasa (ODC) negativa, fermenta glucosa amb producció de gas, fermenta sacarosa i manitol, i hidrolitza esculina (POPOFF 1984, HOLT i al. 1994). La soca tipus d'*A. hydrophila* és la CECT 839<sup>T</sup> (= ATCC 7966<sup>T</sup>).

El complex fenotípic *A. hydrophila* està format per *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2) i les soques mesòfiles d'*A. salmonicida* (HG3) (Taula 2); a causa de la semblança fenotípica d'aquestes tres espècies (KUIJPER i al. 1989, ALI i al. 1996). Molts estudis no discriminen aquestes espècies i utilitzen el nom d'*A. hydrophila* en compte de complex fenotípic *A. hydrophila*, cosa que genera confusió al ja complex gènere *Aeromonas*.

De totes les proves bioquímiques proposades per a la separació de les espècies que conformen aquest complex, la fermentació de ramnosa i sorbitol, l'assimilació de lactat, *n*-acetil glucosamina (NAGA) i àcid urocànic, i el creixement a 40,5°C són les proves que han mostrat un major poder de discriminació (ALTWEGG i al. 1990, ALTWEGG i LÜTHY-HOTTENSTEIN 1991, ABBOTT i al. 1992, KÄMPFER i ALTWEGG 1992, HÄNNINEN 1994, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HÄNNINEN i al. 1995, JANDA i al. 1996, KAZNOWSKI 1997, KAZNOWSKI 1998). *A. hydrophila* és l'única espècie que creix a 40,5°C i que assimila lactat, *A. bestiarum* és l'única que fermenta ramnosa i *A. salmonicida* l'única que fermenta sorbitol. NAGA és utilitzat per *A. hydrophila* i *A. bestiarum* mentre l'àcid urocànic és assimilat per *A. bestiarum* i *A. salmonicida* (Taula 3).

**Taula 3.** Diferenciació fenotípica de les espècies del complex fenotípic *A. hydrophila*.

		<i>A. hydrophila</i>	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. salmonicida</i>
Assimilació	Lactat	+	-	-
	NAGA	+	+	v-
	Urocànic	-	+	+
Creixement	40,5°C	+	-	-
Fermentació	Ramnosa	-	+	-
	Sorbitol	-	-	+

#### 1.5.2. *A. bestiarum* (HG2).

L'any 1996 va ser descrita i validada com a nova espècie (ALI i al. 1996, IJSB 1996), encara que l'any 1981 ja podia ser discriminada en base a l'anàlisi d'hibridació de DNA (POPOFF i al. 1981).

Les característiques comunes i diferencials amb *A. hydrophila* i *A. salmonicida* estan descrites més amunt (Taula 3). La soca tipus d'*A. bestiarum* és la CECT 4227<sup>T</sup> (= ATCC 51108<sup>T</sup>).



### 1.5.3. *A. salmonicida* (HG3).

En principi l'espècie *A. salmonicida* va ser descrita com a psicròfila, immòbil i paràsita estricta de peixos (POPOFF 1984). Estudis d'hibridació de DNA van demostrar que les soques d'un dels grups d'hibridació que formaven l'espècie *A. hydrophila* eren genèticament similars a les soques *A. salmonicida*, constituint-se el HG3 (Taula 2) (ALTWEGG i al. 1990).

D'aquesta manera *A. salmonicida* està formada per dos grups fenotípics fàcilment diferenciables: les soques psicròfiles, immòbils i patògenes i les soques mesòfiles i mòbils (Taula 2). Al mateix temps, en el primer grup s'han diferenciat quatre subespècies (Taula 4): *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, *A. salmonicida* subsp. *achromogenes*, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* (POPOFF 1984) i *A. salmonicida* subsp. *smithia* (AUSTIN i al. 1989, IJSB 1989b). L'única subespècie que produeix pigment marró soluble en aigua és *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, en canvi, l'única VP positiva és *A. salmonicida* subsp. *masoucida*. Altres característiques fenotípiques com la producció d'indole, positiva en *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* i *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, la hidròlisi d'esculina i la fermentació de manitol, positives en *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* i *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, són útils en la diferenciació d'aquestes subespècies (Taula 4) (HOLT i al. 1994). La soca tipus d'*A. salmonicida* és la CECT 894<sup>T</sup> (= ATCC 33658<sup>T</sup>).

**Figura 7.** Producció de pigment marró en TSA per *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.



**Taula 4.** Característiques diferencials de les subespècies psicròfiles d'*A. salmonicida*.

<i>A. salmonicida</i> subsp.	Pigment	VP	Indole	Fermentació Manitol	Hidròlisi Esculina
<i>achromogenes</i>	-	-	+	-	-
<i>masoucida</i>	-	+	+	+	+
<i>salmonicida</i>	+	-	-	+	+
<i>smithia</i>	-	-	-	-	-

Recentment s'ha descrit una nova subespècie, *A. salmonicida* subsp. *pectinolytica*, a partir de tres soques aïllades de l'aigua d'un riu contaminat de Buenos Aires (PAVAN i al. 2000). Aquesta subespècie és una *A. salmonicida* mesòfila, però amb els següents trets diferencials: immòbil, productora de pigment marró i LDC negativa.

Les característiques comunes i diferencials entre el grup de soques mesòfiles i mòbils d'*A. salmonicida* i les espècies *A. hydrophila* i *A. bestiarum* s'han descrit anteriorment (Taula 3).

#### 1.5.4. *A. caviae* (HG4).

L'espècie *A. caviae* presenta les següents característiques (Taula 5): mòbil, no pigmentada, produeix indole però no sulfhídric (de cisteïna), VP negativa, ADH positiva, LDC i ODC negativa, fermenta glucosa sense producció de gas, fermenta sacarosa i manitol, i hidrolitza esculina (POPOFF 1984, HOLT i al. 1994). La soca tipus d'*A. caviae* és la CECT 838<sup>T</sup> (= ATCC 15468<sup>T</sup>).

El complex fenotípic *A. caviae* està format per *A. caviae* (HG4), *A. media* (HG5) i *A. eucrenophila* (HG6) (Taula 2) (SCHUBERT i HEGAZI 1988, KUIJPER i al. 1989). En un principi la diferenciació entre les tres espècies resultava senzilla ja que *A. eucrenophila* produeix gas en la fermentació de glucosa i *A. media* va ser descrita com immòbil i productora de pigment marró (ALLEN i al. 1983, HOLT i al. 1994). Posteriorment, es va descobrir que soques d'un dels grups d'hibridació

que formaven l'espècie *A. caviae* (POPOFF i al. 1981, POPOFF 1984) eren genèticament similars a les soques *A. media*, constituint-se el HG5 amb dos subgrups, HG5A per a les soques mòbils i no pigmentades i HG5B per a l'altre grup de soques (Taula 2 i Taula 5) (ALTWEGG i al. 1990). Seguidament diversos autors van intentar la discriminació de les espècies d'aquest complex, especialment HG4 i HG5A, amb noves proves bioquímiques, de les quals únicament l'assimilació de lactat i la temperatura màxima de creixement aconseguien el seu propòsit: *A. caviae* HG4 i *A. media* HG5B utilitzen lactat i *A. caviae* HG4 és l'única que pot créixer a 40,5°C mentre *A. eucrenophila* HG6 presenta la menor temperatura màxima de creixement (ALTWEGG i al. 1990, ALTWEGG i LÜTHY-HOTTENSTEIN 1991, KÄMPFER i ALTWEGG 1992, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HÄNNINEN i al. 1995).

#### 1.5.5. *A. media* (HG5).

Inicialment l'espècie *A. media* va ser descrita a partir de 15 soques, aïllades d'un riu i d'una piscifactoria del mateix riu a Anglaterra, immòbils i productores de pigment marró soluble en aigua (ALLEN i al. 1983), característiques diferencials respecte d'*A. caviae*. Com s'ha esmentat abans, estudis d'hibridació de DNA van demostrar que les soques d'un dels grups d'hibridació que formaven l'espècie *A. caviae* eren genèticament similars a les soques *A. media*, constituint-se el HG5 amb dos subgrups, HG5A (*A. media* mòbil i no pigmentada) i HG5B (*A. media* immòbil i pigmentada) (Taula 2 i Taula 5). La soca tipus d'*A. media* és la CECT 4232<sup>T</sup> (= ATCC 33907<sup>T</sup>).

#### 1.5.6. *A. eucrenophila* (HG6).

L'any 1988 va ser descrita i validada com a nova espècie (SCHUBERT i HEGAZI 1988, IJSB 1988b), encara que l'any 1981 ja podia ser discriminada en base a l'anàlisi d'hibridació de DNA (POPOFF i al. 1981). Com s'ha comentat abans, la producció de gas per *A. eucrenophila* és la diferència principal amb *A. caviae* (Taula 5). La soca tipus d'*A. eucrenophila* és la CECT 4224<sup>T</sup> (= ATCC 23309<sup>T</sup>).

1.5.7. *A. sobria* (HG7).

L'espècie *A. sobria* presenta les següents característiques (Taula 5): mòbil, no pigmentada, produeix indole i sulfhídric (de cisteïna), VP variable, ADH i LDC positiva, ODC negativa, fermenta glucosa amb producció de gas, fermenta sacarosa i manitol, i no hidrolitza esculina (POPOFF 1984, HOLT i al. 1994). La soca tipus d'*A. sobria* és la CECT 4245<sup>T</sup> (= ATCC 43979<sup>T</sup>).

El complex fenotípic *A. sobria* està format per *A. sobria* (HG7), *A. veronii* bv. *sobria* (HG8), *A. jandaei* (HG9) i *A. trota* (HG14) (Taula 2) (JANDA 1991). En l'estudi dels grups d'hibridació DNA de les espècies mesòfiles del gènere *Aeromonas* POPOFF i al. (1981) va distingir-ne dos fenotípicament idèntics en l'espècie *A. sobria* (POPOFF 1984). Posteriorment, KUIJPER i al. (1989) i ALTWEGG i al. (1990) van observar que únicament la soca de referència de l'espècie, d'origen ambiental, formava el HG7, prenent aquest grup el nom original de l'espècie (*A. sobria*). En canvi, les soques clíniques formaven l'altre grup d'hibridació (HG8), que alhora eren genèticament similars però fenotípicament diferents a l'espècie *A. veronii* (HG10). Així, CARNAHAN i al. (1991a) van proposar, amb èxit, anomenar *A. veronii* bv. *sobria* al HG8 i *A. veronii* bv. *veronii* al HG10 (Taula 2). Alguns autors han diferenciat els dos grups d'hibridació en base a l'ADH, negativa en *A. sobria* i positiva en *A. veronii* bv. *sobria* (ABBOTT i al. 1992, OAKLEY i al. 1996a), però aquests resultats estan en contradicció amb la descripció d'*A. sobria* (POPOFF 1984) i altres estudis (CARSON i al. 2001) on *A. sobria* també és ADH positiva; de fet s'ha demostrat que el medi i la temperatura d'incubació influeixen en el resultat de les proves de descarboxilació d'aminoàcids (ALTWEGG i al. 1987). Actualment, l'única diferència fenotípica que permet discriminar aquests grups d'hibridació és la temperatura màxima de creixement: les soques del HG8 poden créixer a 40°C, a diferència de les del HG7 (HÄNNIEN i SIITONEN 1995, HÄNNINEN i al. 1995).

Per una altra banda, *A. jandaei* i *A. trota* no fermenten sacarosa (Taula 5) i *A. trota* és sensible a l'ampicil·lina, característiques que

diferencien aquestes espècies d'*A. sobria* (CARNAHAN i al. 1991a, CARNAHAN i al. 1991b).

1.5.8. *A. veronii* bv. *sobria* (HG8).

Aquesta variant fenotípica de l'espècie *A. veronii* està perfectament detallada en les descripcions d'*A. sobria* i *A. veronii*. La soca de referència d'*A. veronii* bv. *sobria* és la CECT 4246 (= ATCC 9071).

1.5.9. *A. jandaei* (HG9).

A partir de huit soques clíniques i una soca ambiental aïllades als EUA, CARNAHAN i al. (1991a) va descriure l'espècie *A. jandaei* (HG9) (Taula 2), validada a l'any següent (IJSB 1992a). Com s'ha esmentat anteriorment, *A. jandaei* no fermenta sacarosa, principal característica diferencial amb *A. sobria* i *A. veronii* bv. *sobria* (Taula 5). La soca tipus d'*A. jandaei* és la CECT 4228<sup>T</sup> (= ATCC 49568<sup>T</sup>).

1.5.10. *A. veronii* bv. *veronii* (HG10).

HICKMAN-BRENNER i al. (1987) van analitzar fenotípicament i genèticament 11 soques clíniques ODC positives semblants bioquímicament a *V. cholerae* i anomenades *Enteric group 77*. Aquests autors van demostrar que totes aquestes soques pertanyien al gènere *Aeromonas* i definiren dos nous grups d'hibridació, nou soques que formaven la nova espècie *A. veronii* (validada a l'IJSB 1988a) i les altres dues classificades com a *Aeromonas* sp. ODC positives i que es diferenciaven de les primeres per no ser  $\beta$ -hemolítiques. Posteriorment es va designar la numeració d'aquests grups d'hibridació, HG10 per a *A. veronii* i HG11 per a les soques classificades com a *Aeromonas* sp. ODC positives (KUIJPER i al. 1989). Actualment, el HG10 s'anomena *A. veronii* bv. *veronii* perquè és genotípicament semblant i fenotípicament diferent d'*A. veronii* bv. *sobria* HG8 (CARNAHAN i al. 1991a), mentre el HG11 continua sense ser anomenat (Taula 2).

Les característiques bioquímiques d'*A. veronii* bv. *veronii* són les següents (Taula 5): mòbil, no pigmentada, produeix indole però no sulfhídric, VP positiva, ADH negativa, LDC i ODC positiva, fermenta glucosa amb producció de gas, fermenta sacarosa i manitol, i hidrolitza esculina (HOLT i al. 1994). La soca tipus d'*A. veronii* bv. *veronii* és la CECT 4257<sup>T</sup> (= ATCC 35624<sup>T</sup>).

Per una altra banda, s'ha demostrat que l'espècie *A. ichthiosmia* (SCHUBERT i al. 1990b, IJSB 1991) és idèntica a *A. veronii* en base a l'anàlisi de les seqüències del 16S rRNA (COLLINS i al. 1993).

#### 1.5.11. *A. schubertii* (HG12).

L'any 1988 HICKMAN-BRENNER i al. van descriure dos nous grups d'hibridació a partir de huit soques clíniques semblants a *V. damsela* anomenades *Enteric Group 501*. Set d'aquestes soques van definir la nova espècie *A. schubertii* (validada a l'IJSB 1989a), mentre l'altra soca, que també va resultar ser membre del gènere *Aeromonas*, es va anomenar *Aeromonas Group 501*. Actualment, *A. schubertii* és el HG12 i *Aeromonas Group 501* el HG13 (Taula 2) (ALTWEGG i al. 1990, CARNAHAN i al. 1991c).

Les característiques bioquímiques d'*A. schubertii* són les següents (Taula 5): mòbil, no pigmentada, no produeix ni indole ni sulfhídric, VP variable, ADH i LDC positiva, ODC negativa, fermenta glucosa sense producció de gas, no fermenta ni sacarosa ni manitol, i no hidrolitza esculina (HICKMAN-BRENNER i al. 1988, HOLT i al. 1994). El HG13 es diferencia d'*A. schubertii* per produir indole i ser LDC negativa. La soca tipus d'*A. schubertii* és la CECT 4240<sup>T</sup> (= ATCC 43700<sup>T</sup>).

#### 1.5.12. *A. trota* (HG14).

L'espècie *A. trota* va ser descrita per CARNAHAN i al. (1991b) a partir de 13 soques clíniques de diferent origen geogràfic, representa el HG14 (CARNAHAN i al. 1991c) i fou validada a l'IJSB 1992a. Com s'ha exposat anteriorment, *A. trota* forma part del complex fenotípic *A. sobria*

(Taula 5) i té com trets diferencials la incapacitat de fermentar sacarosa (Taula 2) i la sensibilitat a l'ampicil·lina. La soca tipus d'*A. trota* és la CECT 4255<sup>T</sup> (= ATCC 49657<sup>T</sup>).

Per una altra banda, s'ha demostrat que l'espècie *A. enteropelogenes* (SCHUBERT i al. 1990a, IJSB 1991) és idèntica a *A. trota* en base a l'anàlisi de les seqüències del 16S rRNA (COLLINS i al. 1993).

#### 1.5.13. *A. allosaccharophila*.

MARTÍNEZ-MURCIA i al. (1992b) van descriure l'espècie *A. allosaccharophila* en base a l'anàlisi filogenètica i a la caracterització fenotípica de tres soques, dues aïllades d'àngules malaltes a València i una de les dues soques del HG11 (*Aeromonas* sp. ODC positives). Aquesta espècie fou validada a l'IJSB 1992b. Posteriorment, els resultats obtinguts per ESTEVE i al. (1995b) en l'anàlisi d'hibridació de DNA d'aquesta espècie van mostrar que *A. allosaccharophila* constitueix un grup genotípicament homogeni i alhora diferenciat de la resta d'*Aeromonas* spp., formant un nou grup d'hibridació que cronològicament hauria de ser el HG15 (Taula 2).

La descripció fenotípica d'aquesta espècie és la següent (Taula 5): mòbil, no pigmentada, produeix indole però no sulfhídric, VP negativa, LDC positiva, ADH i ODC variables, fermenta glucosa amb producció de gas, fermenta sacarosa i manitol, hidròlisi d'esculina variable i hidròlisi d'arbutina negativa (MARTÍNEZ-MURCIA i al. 1992b). La soca tipus d'*A. allosaccharophila* és la CECT 4199<sup>T</sup> (= ATCC 51208<sup>T</sup>).

#### 1.5.14. *A. encheleia*.

L'espècie *A. encheleia* va ser descrita per ESTEVE i al. (1995c) en base a l'anàlisi d'hibridació de DNA i a la caracterització fenotípica de quatre soques aïllades d'anguiles sanes a València, constituint una nova espècie i un nou grup d'hibridació que cronològicament hauria de ser el HG16 (Taula 2).

Les seues característiques fenotípiques són (Taula 5): mòbil, no pigmentada, produeix indole però no sulfhídric, VP variable, ADH positiva, LDC i ODC negativa, fermenta glucosa amb producció de gas variable, fermentació de sacarosa variable i de manitol positiva, i hidròlisi d'esculina i d'arbutina positiva (ESTEVE i al. 1995c). La soca tipus d'*A. encheleia* és la CECT 4342<sup>T</sup> (= ATCC 51929<sup>T</sup>).

#### 1.5.15. *A. popoffii*.

Els estudis d'hibridació de DNA, de caracterització fenotípica, de ribotipificació i del perfil d'àcids grassos van portar a HUYS i al. (1997b) a descriure l'espècie *A. popoffii* (nou grup d'hibridació que cronològicament li correspon el HG17) (Taula 2), a partir de set soques aïllades de l'aigua de plantes potabilitzadores de Bèlgica i Escòcia.

Les seues característiques fenotípiques són (Taula 5): mòbil, no pigmentada, producció d'indole i sulfhídric variable, VP positiva, ADH positiva, LDC i ODC negativa, fermenta glucosa amb producció de gas, no fermenta sacarosa però sí manitol, i hidròlisi d'esculina negativa (HUYS i al. 1997b). La soca tipus d'*A. popoffii* és la CECT 4995<sup>T</sup> (= LMG 17541<sup>T</sup>).



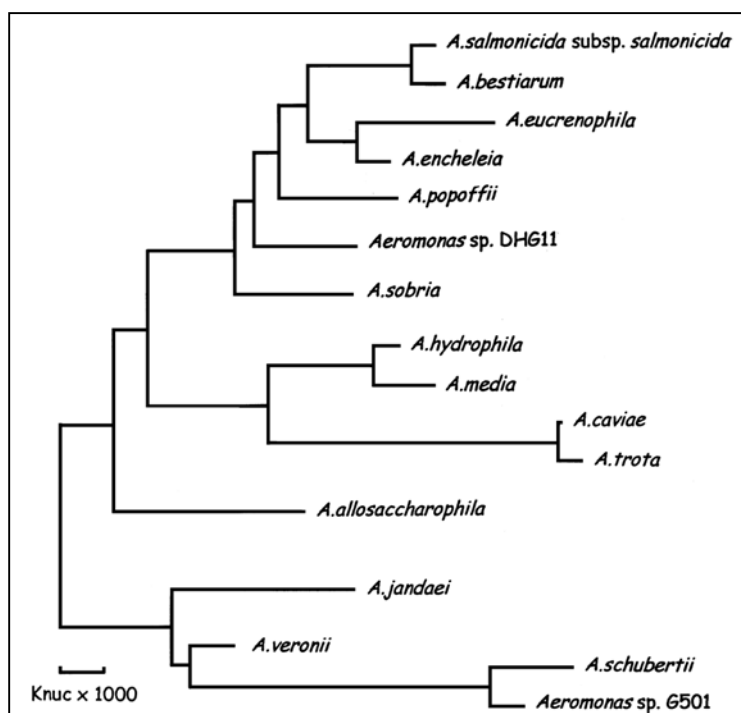
**Taula 5.** Proves fenotípiques útils en la diferenciació de les espècies o complexos fenotípics mesòfils del gènere *Aeromonas*.

	Mobilitat	Pigment	Indole	Sulfitídic	VP	ADH	LDC	ODC	Gas			Fermentació		Hidròlisi			
									Glucosa	Sacarosa	Manitol	Sacarosa	Manitol	Esculina	Esculina		
<i>A. hydrophila</i> (HG1-2-3)	+	-	+	+	+	+	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>A. caviae</i> (HG4-5A)	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. media</i> (HG5B)	-	+	V	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	V	+
<i>A. eucrenophila</i> (HG6)	+	-	+	-	-	+	-	-	+	V	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. sobria</i> (HG7-8)	+	-	+	+	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. jandaei</i> (HG9)	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>A. veronii</i> (HG10)	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. schubertii</i> (HG12)	+	-	-	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. trota</i> (HG14)	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. allosaccharophila</i> (HG15)	+	-	+	-	-	V	+	V	+	+	+	+	+	+	+	V	V
<i>A. encheleia</i> (HG16)	+	-	+	-	V	+	-	-	-	V	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. popoffii</i> (HG17)	+	-	V	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 1.6. Tècniques d'estudi taxonòmiques.

La **seqüenciació del 16S rRNA** o rDNA permet l'elaboració d'arbres filogenètics i, encara que és possible l'existència de seqüències idèntiques o amb molt poques diferències nucleotídiques (com per exemple entre *A. bestiarum* i *A. salmonicida* o entre *A. caviae* i *A. trota*, Figura 8), pot servir com una primera aproximació en la definició d'una nova espècie, que ha de ser confirmada per l'anàlisi d'hibridació DNA-DNA i la composició de G+C (mol %) i acompanyada de característiques fenotípiques que la diferencien de les espècies més pròximes perquè pugui ser anomenada (WAYNE i al. 1987, MARTÍNEZ-MURCIA i al. 1992a, MARTÍNEZ-MURCIA 1999).

**Figura 8.** Relacions filogenètiques de les espècies descrites en el gènere *Aeromonas* determinades comparant les seqüències del 16S rDNA. [Font: Figura 1, MARTÍNEZ-MURCIA 1999].



Actualment es considera que una espècie bacteriana està constituïda per soques amb valors, en general,  $\geq 70\%$  d'hibridació DNA-DNA i  $\leq 5^\circ\text{C}$  de  $\Delta T_m$  (temperatura de fusió), amb un determinat interval en el contingut de G+C (WAYNE i al. 1987, ROSSELLÓ-MORA 1999). En el gènere *Aeromonas* s'han

emprat diversos mètodes per als estudis d'**hibridació DNA-DNA** (HICKMAN-BRENNER i al. 1988, AUSTIN i al. 1989, SUGITA i al. 1994, ESTEVE i al. 1995c, HUYS i al. 1997a, KAZNOWSKI 1997), cosa que pot haver ocasionat la polèmica, encara no resolta, sobre els resultats contradictoris en els percentatges d'hibridació entre soques de les espècies *A. eucrenophila*, *A. encheleia* i el HG11 que podrien portar a una redefinició d'aquestes espècies (SCHUBERT i HEGAZI 1988, ESTEVE i al. 1995c, HUYS i al. 1997a, MARTÍNEZ-MURCIA 1999). Una possible solució al conflicte fóra la definició d'un únic mètode per a la realització d'aquest tipus d'anàlisi (MARTÍNEZ-MURCIA 1999).

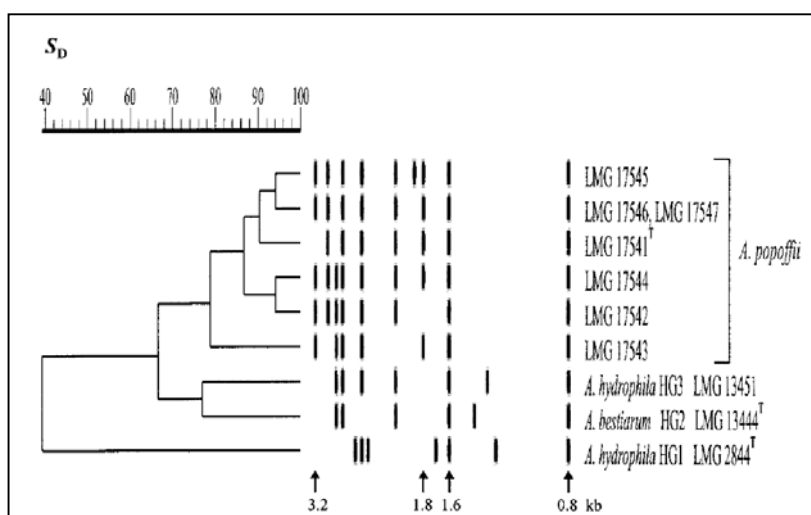
En els últims anys s'han utilitzat diverses tècniques per a identificar les espècies sense necessitat d'haver de recórrer a la hibridació de DNA, ja que aquesta tècnica requereix aïllar gran quantitat de DNA així com també molt de temps. Una de les aproximacions més emprades és l'anàlisi del perfil dels èsters metilats dels àcids grassos (**FAME**), encara que no ha donat resultats gaire satisfactoris en el gènere *Aeromonas*: HUYS i al. (1994) van obtenir un 55 % de correlació amb els grups d'hibridació, percentatge que va arribar al 73,5 % en l'estudi de HUYS i al. (1995).

El perfil de bandes polimòrfiques en l'electroforesi de camp polsant en gels d'agarosa de fragments llargs de DNA genòmic generats per un enzim de restricció de tall poc freqüent (**PFGE**) és d'utilitat en els estudis epidemiològics però no ha aconseguit ser una tècnica útil en la discriminació dels grups d'hibridació en *Aeromonas* (TALON i al. 1996, HÄNNINEN i HIRVELÄ-KOSKI 1997, HÄNNINEN i HIRVELÄ-KOSKI 1999).

En la **ribotipificació** s'utilitza una endonucleasa de restricció que talla el DNA genòmic en nombrosos fragments que són separats en gels d'agarosa i transferits a una membrana de niló, on els fragments s'hibriden amb una sonda universal per al 16S rDNA. Aquesta tècnica també és útil en estudis epidemiològics (MOYER i al. 1992a, MOYER i al. 1992b, PEDERSEN i al. 1996) però, a diferència de la PFGE, sí que ha demostrat ser útil en la identificació de les *Aeromonas* spp (Figura 9). La ribotipificació distingeix la majoria dels grups d'hibridació, inclosos els HG5A i HG5B; en canvi, no discrimina ni entre HG8 i HG10 ni entre *A. eucrenophila*, *A. encheleia* i el

HG11 (MARTINETTI-LUCCHINI i ALTWEGG 1992, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HUYS i al. 1996a, HÄNNINEN i al. 1997, DEMARTA i al. 1999).

**Figura 9.** Dendrograma i perfil de bandes generats per l'aplicació de la ribotipificació a set soques *A. popoffii* i les soques tipus o de referència d'*A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2) i *A. salmonicida* (HG3). [Font: Figura 1, HUYS i al. 1997b].

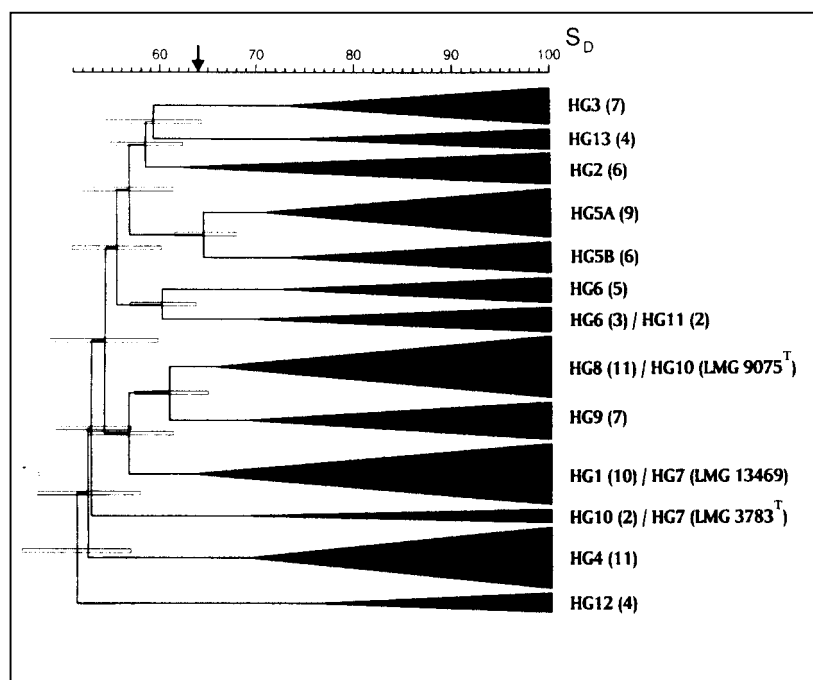


$S_D$ , coeficient de Dice. Les posicions dels marcadors de pes molecular estan indicades per fletxes.

El polimorfisme de fragments llargs amplificats (**AFLP**) requereix dues endonucleases per a la digestió del DNA genòmic i oligonucleòtids curts que s'uneixen als fragments finals de restricció i serveixen de motlle per a l'amplificació dels fragments que són separats electroforèticament en gels de poliacrilamida. La tècnica AFLP s'ha utilitzat en la construcció de mapes genètics, en la detecció de clons genòmics, en estudis evolutius i en la tipificació epidemiològica (VOS i al. 1995, JANSSEN i al. 1996). Ara bé, també s'ha emprat amb èxit en la identificació de soques pertanyents al gènere *Aeromonas* (Figura 10) (JANSSEN i al. 1996, HUYS i al. 1996b); de fet les soques que posteriorment definirien l'espècie *A. popoffii* (HUYS i al. 1997b) van ser primerament diferenciades de la resta d'espècies del gènere mitjançant la tècnica AFLP (HUYS i al. 1996c). A més, les anàlisis d'AFLP estan d'acord amb els resultats filogenètics sobre l'equivalència entre *A. enteropelogenes* – *A. trota* i *A. ichthiosmia* – *A. veronii* (COLLINS i al. 1993, HUYS i al. 1996b). Per contra, aquesta tècnica no aconsegueix la diferenciació ni entre les espècies *A. eucrenophila*, *A. encheleia* i HG11 ni entre *A. allosaccharophila* i els dos grups

d'hibridació d'*A. veronii* (HG8 i HG10), resultats similars als de la ribotipificació (HUYS i al. 1996a, HUYS i al. 1996b).

**Figura 10.** Dendrograma de l'anàlisi numèrica del perfil de bandes AFLP de diferents espècies del gènere *Aeromonas*. [Font: Figura 4, JANSSEN i al. 1996].



$S_D$ , coeficient de Dice. HG13, *A. trota*.

Una altra tècnica que pot ser utilitzada en la identificació de determinades espècies és la detecció de seqüències específiques de gens o fragments de gens com els que codifiquen el 16S rDNA, enzims, etc., mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (**PCR**) (DORSCH i al. 1994, CASCÓN i al. 1996, KHAN i CERNIGLIA 1997, DEMARTA i al. 1999, HØIE i al. 1999, SANTOS i al. 1999).

L'amplificació a l'atzar de DNA mitjançant oligonucleòtids de 10 pb. (**RAPD**) és una tècnica de genotipificació ràpida i econòmica que s'ha utilitzat per a propòsits epidemiològics i identificatius (LOUIE i al. 1996, BANDO i al. 1998). Ara bé, pocs estudis han aplicat aquesta tècnica al gènere *Aeromonas* (MIYATA i al. 1995, OAKEY i al. 1996b, O'HICI i al. 2000) encara que pot ser d'utilitat en la diferenciació dels diferents grups d'hibridació (OAKEY i al. 1996b).

El polimorfisme de fragments llargs de restricció (**RFLP**) consisteix en la digestió i posterior electroforesi en gels d'agarosa de DNA amplificat amb oligonucleòtids d'unió al 16S rDNA. Aquesta tècnica, descrita recentment, ha mostrat uns excel·lents resultats en la discriminació de les *Aeromonas* spp. (Taula 6) (BORRELL i al. 1997, FIGUERAS i al. 2000).

**Taula 6.** Perfils dels fragments de DNA de diferents *Aeromonas* spp. obtinguts aplicant la tècnica RFLP. [Font: Taula 1, BORRELL i al. 1997].

Species	Reference strain	Presence of 16S rRNA gene RFLP fragments of the following size (bp):																							
		346	242	228	211	207	204	195	188	180	174	172	165	158	157	138	118	78	69	66	54	47	42	40	33
<i>A. hydrophila</i> (DHG 1)	CECT839 <sup>T</sup>	x				x	x						x	x	x				x	x	x	x	x		x
<i>A. salmonicida</i> (DHG 3) <sup>a</sup>	CECT894 <sup>T</sup>	x				x	x								x	x	x		x	x	x	x	x		x
<i>A. caviae</i> (DHG 4)	CECT838 <sup>T</sup>					x	x	x	x				x	x	x				x	x	x				x
<i>A. media</i> (DHG 5)	CECT4232 <sup>T</sup>					x	x			x	x	x			x	x			x	x	x		x		x
<i>A. eucrenophila</i> (DHG 6)	CECT4224 <sup>T</sup>				x	x	x			x	x				x	x			x	x		x	x		x
<i>A. sobria</i> (DHG 7)	CECT837 <sup>T</sup>					x	x			x			x	x	x	x			x	x	x	x	x		x
<i>A. veronii</i> biogroup <i>sobria</i> (DHG 8) <sup>b</sup>	CECT4247 <sup>T</sup>					x	x			x			x	x	x				x	x	x	x	x	x	x
<i>A. jandaei</i> (DHG 9)	CECT4228 <sup>T</sup>					x	x	x					x	x	x				x	x	x	x	x	x	x
<i>A. schubertii</i> (DHG 12)	CECT4241 <sup>T</sup>				x	x	x			x					x				x	x	x		x		x
<i>A. trota</i> (DHG 13)	CECT4255 <sup>T</sup>		x			x	x			x			x	x	x				x	x					x
<i>A. allosaccharophila</i> (DHG 14)	CECT4199 <sup>T</sup>					x	x	x			x	x			x				x		x	x	x	x	x

<sup>a</sup> Identical profiles for *A. bestiarum* CECT4247<sup>T</sup> (DHG 2), *Aeromonas* sp. CECT4253<sup>T</sup> (DHG 11), and *A. encheleia* CECT4342<sup>T</sup>.  
<sup>b</sup> Identical profile for *A. veronii* biogroup *veronii* CECT4257<sup>T</sup> (DHG 10).

La identificació clàssica de les espècies mitjançant determinades **proves fenotípiques** continua sent la més emprada avui en dia pel seu caràcter pràctic i perquè no tots els laboratoris clínics, veterinaris i d'anàlisi d'aigües i d'aliments disposen de suficients recursos com per a poder implantar tècniques moleculars en la rutina diària. En el cas de la identificació dels membres del gènere *Aeromonas*, molts laboratoris no discriminen ni les espècies descrites recentment ni les actualment establertes dins de les espècies clàssiques o complexos fenotípics *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria*, ja què es necessiten proves addicionals a les que presenten els diferents sistemes miniaturitzats comercials. Tot i així, hi ha estudis que han identificat fenotípicament les diferents espècies del gènere, la majoria d'ells amb percentatges d'entre 80-99 % en la identificació de soques mitjançant la utilització d'entre 25 a 40 proves fenotípiques (ABBOTT i al. 1992, JANDA i al. 1996, OAKEY i al. 1996a, BORRELL i al. 1998, CARSON i al. 2001).

Altres estudis clàssics són els de **taxonomia numèrica** de característiques fenotípiques. Malgrat la contínua descripció de noves espècies en el gènere *Aeromonas*, únicament cinc estudis taxonòmics s'han dut a terme en els últims 10 anys i cap d'ells en els últims tres anys (KÄMPFER i ALTWEGG 1992, CARNAHAN i JOSEPH 1993, ESTEVE 1995, NOTERDAEME i al. 1996, KAZNOWSKI 1997). Els resultats d'aquests estudis no estan en total concordança amb els estudis d'hibridació DNA-DNA, així *A. hydrophila*, *A. bestiarum* i *A. salmonicida* no sempre estan en *phena* diferents, a l'igual que ocorre amb les espècies *A. caviae*, *A. media* i *A. eucrenophila*. A més, les soques *A. sobria* solen distribuir-se en diferents *phena* i *A. veronii* bv. *veronii* no s'agrupa mai amb *A. veronii* bv. *sobria*.

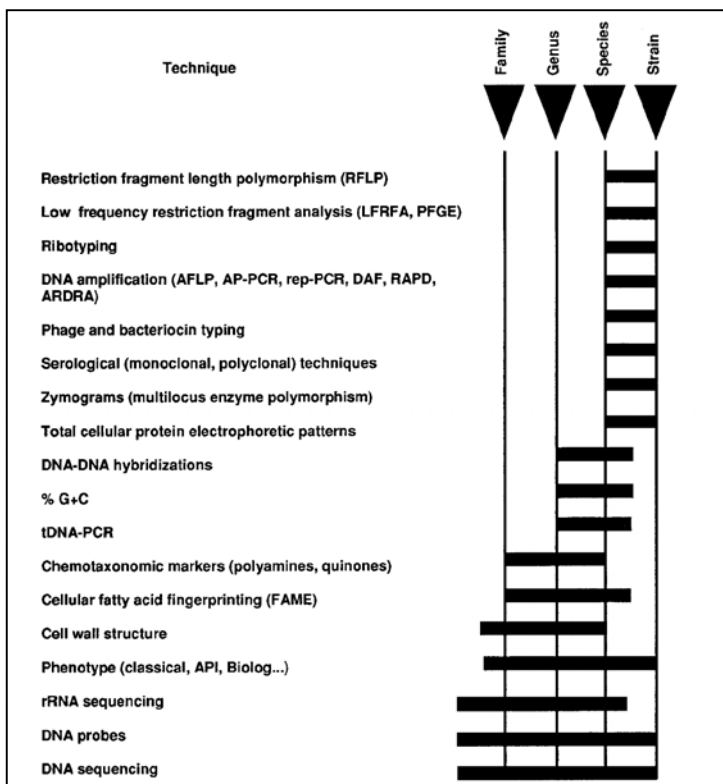
L'electroforesi d'enzims multilocus (**MLEE**) permet analitzar el nivell de variació genètica dins de les poblacions i el grau de relació genètica entre soques, poblacions i espècies, i és útil en epidemiologia, evolució i filogènia. Aquesta tècnica requereix de l'obtenció prèvia d'extractes de proteïnes cel·lulars (normalment per sonicació), on estaran els enzims cel·lulars hidrosolubles. Aquests enzims són separats electroforèticament en gels de poliacrilamida o de midó en condicions no desnaturalitzants i posteriorment visualitzats en forma de bandes mitjançant tincions enzimàtiques específiques. La càrrega neta electrostàtica permet igualar les diferents mobilitats electroforètiques o **electromorfs** a les variacions al·lèliques o al·loenzims d'un determinat locus enzimàtic. En haver-se analitzat tots els enzims (entre 15 i 25 normalment), s'obté un perfil electroforètic o al·lèlic per a cada soca anomenat tipus electroforètics (**ETs**) o genotipus multilocus. L'anàlisi de les dades permet conèixer la diversitat genètica i l'estructura poblacional del conjunt de soques estudiat. La MLEE detecta el 80-90 % de substitucions aminoacídiques ja que n'hi ha que no tenen efecte en la mobilitat electroforètica. Per tant, a nivell de seqüència encara hi pot haver major heterogeneïtat. Per una altra banda, les modificacions posttranscripcionals poden ser una font d'errada. (SELANDER i al. 1986, FARFÁN i al. 2000, RIUS i al. 2001).

La tècnica MLEE també s'ha emprat en la identificació de les espècies del gènere *Aeromonas* (ALTWEGG i al. 1991, TONOLLA i al. 1991). ALTWEGG i al. (1991) van obtindre una bona correlació amb els grups d'hibridació mitjançant

les freqüències al·lèliques de tres loci enzimàtics, encara que els agrupaments formats en el dendrograma no mostraren tan bona correlació. Diversos autors han mostrat un especial interès en la utilització d'aquesta tècnica per a la identificació de les espècies del gènere *Aeromonas* com a alternativa als mètodes d'hibridació de DNA (ALTWEGG i LÜTHY-HOTTENSTEIN 1991, JANDA 1991, KÄMPFER i ALTWEGG 1992).

Per últim, la **taxonomia polifàsica** intenta integrar informació genotípica, fenotípica i filogenètica. Els estudis polifàsics haurien d'utilitzar determinades tècniques complementàries depenent del nivell de discriminació taxonòmica que es vulga assolir (Figura 11) (VANDAMME i al. 1996, GILLIS i al. 2001). D'aquesta manera alguns autors han realitzat estudis polifàsics d'algunes espècies d'*Aeromonas* com en la descripció d'*A. popoffii* on es van fer anàlisis fenotípiques, de FAMEs, de ribotipificació, de contingut en G+C i d'hibridació DNA-DNA (HUYS i al. 1997b); o en l'estudi de HUYS i al. (1996a) sobre les espècies *A. eucrenophila*, *A. encheleia* i el HG11, on van utilitzar les tècniques d'AFLP, ribotipificació, FAMEs i perfil de proteïnes totals.

**Figura 11.** Resolució taxonòmica de les principals tècniques utilitzades en taxonomia bacteriana. [Font: Figura 2, VANDAMME i al. 1996].





## 2. OBJECTIUS

---



1. Aïllament de soques del gènere *Aeromonas*, especialment a partir de mostres de mol·luscs bivalves de consum humà, ja que *Aeromonas* pot suposar un risc per a la salut pública alhora que s'han realitzat molt pocs estudis a partir d'aquest tipus de mostra.
2. Obtenció d'una col·lecció pròpia de soques del gènere *Aeromonas* i identificació d'aquestes soques a nivell d'espècie.
3. Estudi de taxonomia numèrica, incorporant-hi les soques tipus de totes les espècies d'*Aeromonas* descrites.
4. Aplicació de la tècnica de l'electroforesi d'enzims multilocus (MLEE) al gènere *Aeromonas*. Aquest estudi representarà el primer treball que aplique la tècnica MLEE en *Aeromonas* emprant gels de poliacrilamida.
5. Estudi de la diversitat genètica i de la relació genètica de les soques d'*Aeromonas* incloses en aquest estudi. L'espècie amb major nombre de soques aïllades serà la seleccionada.
6. Anàlisi del desequilibri de lligament, a partir dels resultats obtinguts en la MLEE, per a conèixer l'estructura de la població del gènere *Aeromonas* estudiada. Aquest estudi significarà el primer treball sobre l'estructura poblacional d'*Aeromonas*.



## 3. MATERIAL I MÈTODES

---

---



### 3.1. Mostratges.

Entre febrer de 1997 i juliol de 1998 es van realitzar una sèrie d'11 mostratges amb l'objectiu d'aïllar soques del gènere *Aeromonas* a partir de mostres d'aigua de mar, d'aigua dolça potable i no potable i dels següents mol·luscs bivalves: cloïsses (*Tapes decussatus*), escopinyes (*Cardium* sp.), musclos (*Mytilus* sp.), musclos de roca (*Mytilus* sp.), navaixes o navalles (*Ensis* sp.), ostres (*Ostrea edulis*), ostres portugueses (*Crassostrea gigas*), rossellones (*Venus gallina*) i tellines o tallarines (*Donax trunculus*). Per a la correspondència entre el nom comú i el nom de l'espècie o gènere dels diferents mol·luscs bivalves es va consultar al Dr. Ferran Pereira (Dpt. Biologia Animal, Universitat de Barcelona), a la Dra. Sílvia Crespo (Universitat Autònoma de Barcelona) i diverses fonts bibliogràfiques (BOUCHET i al. 1979, CAHNER 1986, ALTABA i al. 1994, IEC 1995).

#### 3.1.1. Mostratge 1.

Data: 27/02/97.

Mostres: cloïsses (*Tapes decussatus*) i musclos (*Mytilus* sp.) del mercat de St. Ildefons (Cornellà, Barcelona).

Dilucions: 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD (agar dextrina), ADA (agar dextrina-ampicil·lina), TCBS (agar tiosulfat-citrat-bilis-sacarosa), TSA (agar triptona de soja).

Medis d'enriquiment: APW (aigua de peptona alcalina), TSB (caldo triptona de soja).

#### 3.1.2. Mostratge 2.

Data: 03/04/97.

Mostres: cloïsses (*Tapes decussatus*) i musclos (*Mytilus* sp.) del mercat de St. Ildefons (Cornellà, Barcelona).

Dilucions: 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS, TSA.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

### 3.1.3. Mostratge 3.

Data: 05/05/97.

Mostres: aigua d'una font no potable d'El Preventori de Mariola (Alcoi) i cloïsses (*Tapes decussatus*), musclos i musclos de roca (*Mytilus* sp.) del mercat de Les Corts (Barcelona).

Dilucions: directa, 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

### 3.1.4. Mostratge 4.

Data: 04/06/97.

Mostres: cloïsses (*Tapes decussatus*), escopinyes (*Cardium* sp.), musclos i musclos de roca (*Mytilus* sp.), rossellones (*Venus gallina*) i tellines (*Donax trunculus*) del mercat de Les Corts (Barcelona).

Dilucions: 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.



3.1.5. Mostratge 5.

Data: 15/07/97.

Mostres: aigua potable de dues fonts del Montseny (Barcelona).

Dilucions: directa, 1:10.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

3.1.6. Mostratge 6.

Data: 21/07/97.

Mostres: aigua potable i aigua d'una bassa d'Hostalets de Balenyà (Barcelona).

Dilucions: directa, 1:10.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

3.1.7. Mostratge 7.

Data: 16/09/97.

Mostres: escopinyes (*Cardium* sp.), navaixes (*Ensis* sp.) i ostres portugueses (*Crassostrea gigas*).

Dilucions: 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

3.1.8. Mostratge 8.

Data: 01/10/97.

Mostres: escopinyes (*Cardium* sp.), navaixes (*Ensis* sp.) i tellines (*Donax trunculus*) del supermercat d' "El Corte Inglés Diagonal" (Barcelona).

Dilucions: 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

3.1.9. Mostratge 9.

Data: 07/07/98.

Mostres: ostres (*Ostrea edulis*), ostres portugueses (*Crassostrea gigas*) i tellines (*Donax trunculus*) del mercat de La Boqueria (Barcelona).

Dilucions: 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD, ADA, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

3.1.10. Mostratge 10.

Data: 14/07/98.

Mostres: navaixes (*Ensis* sp.) del mercat de La Boqueria i ostres (*Ostrea edulis*) i ostres portugueses (*Crassostrea gigas*) del supermercat d' "El Corte Inglés Diagonal" (Barcelona).

Dilucions: 1:10, 1:100, 1:200, 1:1000, 1:10000. La primera dilució no es va sembrar en medi AD i el TCBS només es va emprar en les dues primeres dilucions.

Medis de cultiu sòlid: AD, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

#### 3.1.11. Mostratge 11.

Data: 20/07/98.

Mostres: aigua de la platja de Cunit (Tarragona) i de la platja i de la zona rocosa de la platja de Sant Adrià del Besòs (Barcelona).

Dilucions: directa, 1:10 i 1:100.

Medis de cultiu sòlid: AD, TCBS.

Medis d'enriquiment: APW, TSB.

### **3.2. Processament de les mostres.**

#### 3.2.1. Mol·luscs bivalves.

Primerament, es van seleccionar els individus amb la closca intacta i tancada. Seguidament, es van netejar les closques i es van eixugar. Els mol·luscs es van obrir amb un ganivet d'ostres desinfectat amb etanol i es van dipositar 25 g de mostra (molla i líquid) en una bossa estèril. La mostra es va diluir amb Ringer estèril fins a un pes total de 250 g (dilució 1:10) i es va triturar en un homogeneïtzador ("Masticator, IUL

instruments”) (HUNT i al. 1984). Després, es va fer un banc de dilucions amb Ringer estèril.

Les diferents dilucions de la mostra es van sembrar per duplicat en medis de cultiu sòlid (TSA, AD, ADA, TCBS), incubant-los durant 24-48 h a 25°C. També es van fer dos cultius d'enriquiment amb APW i TSB, a partir de 10 ml de la mostra homogeneïtzada i 90 ml de medi de cultiu i posterior incubació durant 24 h a 25°C. A partir dels medis d'enriquiment es van sembrar, per esgotament en placa, els mateixos medis de cultiu esmentats.

### 3.2.2. Aigües.

Totes les aigües analitzades, tant d'aigua dolça com marina, van seguir el mateix procediment. A partir d'1 l de cadascuna de les mostres d'aigua, es va fer un banc de dilucions i es van sembrar per duplicat, directament i a partir de les dilucions, els medis de cultiu sòlid abans esmentats. També es van fer dos cultius d'enriquiment, però amb 100 ml de mostra i 100 ml d'APW o TSB doble concentrats.

Els períodes i temps d'incubació van ser els mateixos que a l'apartat anterior.

### 3.2.3. Medis i temperatura.

Es va seleccionar el medi ADA per la seua eficàcia en l'aïllament d'*Aeromonas* respecte d'altres medis (HAVELAAR i al. 1987, GAVRIEL i LAMB 1995) i per ser un dels medis d'elecció en estudis previs d'altres autors (HÄNNINEN 1994, HÄNNINEN i SIITONEN 1995). Paral·lelament es va emprar el medi AD ja que s'han descrites soques d'*Aeromonas* sensibles a l'ampicil·lina (CARNAHAN i al. 1991b, SINGH i SANYAL 1994).

També es va emprar el medi TCBS per ser comú en l'aïllament i detecció de *Vibrionaceae* (ORTIGOSA i al. 1994, MONTILLA i al. 1995), amb espècies pròximes fenotípicament al gènere *Aeromonas*, i per haver-

se utilitzat en altres estudis per a la detecció i aïllament d'*Aeromonas* a partir de mostres d'aigua de mar i de mol·luscs (RIQUELME i al. 1996).

Paral·lelament es van realitzar enriquiments previs amb TSB (HÄNNINEN i SIITONEN 1995) i APW (MOYER i al. 1991).

La temperatura escollida en aquest estudi va ser de 25°C per tractar-se de mostres ambientals (KUEH i CHAN 1985, ORTIGOSA i al. 1994), per la possibilitat d'aïllar soques psicròfiles (FARMER III i al. 1992) i estar en l'interval de temperatura òptima per a les mesòfiles (HOLT i al. 1994), i per haver-se utilitzat aquesta temperatura en altres estudis fenotípics d'*Aeromonas* (NOTERDAEME i al. 1996, OAKLEY i al. 1996a).

Els medis d'enriquiment i el TSA van ser preparats a l'1 % NaCl, ja que està descrit en la literatura que en aquesta concentració de NaCl hi ha soques de totes les espècies d'*Aeromonas* que són metabòlicament més actives (HOLT i al. 1994).

### **3.3. Purificació, selecció i conservació de les soques aïllades.**

De les colònies crescudes en els medis AD i ADA només es van seleccionar les grogues (fermentadores de dextrina), mentre que no va haver-hi cap selecció prèvia pel tipus colonial en el medi TCBS. A cada soca seleccionada se li va assignar un número, per ordre d'aïllament, seguit d'una o dues lletres, que corresponien a les inicials del tipus de mostra (A: aigua dolça, AM: aigua de mar, C: cloïssa, Cl: clínica, E: escopinya, M: músclo, MR: músclo de roca, N: navaixa, O: ostra, OP: ostra portuguesa, R: rossellona, T: tellina).

Un primer pas de purificació va consistir en ressemar, en TSA 1 % NaCl, 10 soques per placa fent una estria curta mitjançant escuradents estèrils. A les 24 h d'incubació a 25°C es va fer una rèplica de cada placa.

A partir del creixement en TSA, les diferents soques aïllades foren assajades per a les proves del Gram, oxidasa i O/F. Van ser descartades totes aquelles soques que no foren bacils Gram -, oxidasa + i O/F +/+. Dels mostratges 9, 10 i 11, també van ser descartades la majoria de colònies que produïen *swarming*, a causa de l'enorme quantitat de soques amb aquesta característica, de les dificultats que comporten quan creixen amb altres aïllats en la mateixa placa i perquè no està descrita cap soca d'*Aeromonas* productora de *swarming* en TSA.

Les soques no descartades van ser ressebrades en TSA per esgotament en placa. A partir d'una colònia ben aïllada es va repetir la ressebra. Després d'aquestes dues últimes purificacions, les soques van ser conservades.

Les soques finalment seleccionades van ser conservades, en un primer moment, de dues maneres diferents:

- a) Medi TSA inclinat en tub, sembrat per estria simple en superfície i mantingut a temperatura ambient.
- b) Medi TSB amb un 20 % de glicerol. Cultius de TSA, sembrats per superfície amb nansa de Kolle, van ser recollits, resuspendos en el medi i immediatament congelats a -40°C.

### **3.4. Identificació i caracterització fenotípiques.**

Les soques van ser considerades com a ***Aeromonas*** en base als resultats de **9 proves fenotípiques**: bacils, Gram -, oxidasa +, O/F +/+, *swarming* -, creixement al 0 % NaCl, manca de creixement al 9 % NaCl i resistència a l'O/129.

La identificació de les diferents espècies del gènere *Aeromonas* es va fer en funció dels resultats obtinguts a partir de soques tipus i de referència (**Taula 7**), ja que no es troba a la bibliografia unanimitat de criteris en la selecció de les proves fenotípiques per a la identificació a nivell d'espècie dels membres del gènere *Aeromonas*.

Totes les soques d'*Aeromonas* aïllades i proporcionades (**Taula 7, Taula 8**) van ser caracteritzades fenotípicament amb un total de **64 proves**, incloses les proves identificatives a nivell de gènere i espècie. A partir d'aquesta caracterització es va realitzar l'**estudi taxonòmic** de les soques.

**Taula 7.** Soques tipus i de referència incloses en l'estudi taxonòmic.

ESPÈCIES	SOQUES	FONT D'ÀILLAMENT
<i>A. allosaccharophila</i>	CECT 4199 <sup>T</sup>	Angula ( <i>Anguilla anguilla</i> ) malalta
<i>A. bestiarum</i>	CECT 4227 <sup>T</sup>	Peix
<i>A. caviae</i>	CECT 838 <sup>T</sup>	Epizoòtia de porc de Guinea
<i>A. encheleia</i>	CECT 4342 <sup>T</sup>	Anguila sana
<i>A. enteropelogenes</i>	CECT 4487 <sup>T</sup>	Femtes humanes
<i>A. eucrenophila</i>	CECT 4224 <sup>T</sup>	Peix d'aigua dolça
<i>A. hydrophila</i>	CECT 839 <sup>T</sup>	Llet en mal estat
<i>A. jandaei</i>	CECT 4228 <sup>T</sup>	Femtes humanes
<i>A. media</i>	CECT 4232 <sup>T</sup>	Efluent de piscifactoria
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 <sup>T</sup>	Salmó ( <i>Salmo salar</i> )
<i>A. schubertii</i>	CECT 4240 <sup>T</sup>	Abscés humà
<i>A. sobria</i>	CECT 4245 <sup>T</sup>	Carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> )
<i>A. trota</i>	CECT 4255 <sup>T</sup>	Femtes humanes
<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	CECT 4246	Granota amb la malaltia de la "cama vermella"
<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	CECT 4257 <sup>T</sup>	Esput de persona ofegada
<i>Escherichia coli</i>	CECT 405	
<i>Vibrio cholerae</i>	CECT 514 <sup>T</sup>	Femtes humanes
<i>Vibrio furnissii</i>	CECT 4203 <sup>T</sup>	Femtes humanes

CECT: Col·lecció Espanyola de Cultius-Tipus, Universitat de València, Burjassot, València.

<sup>T</sup>: Soca tipus.

**Taula 8.** Altres soques proporcionades i incloses en l'estudi taxonòmic.

SOQUES	TIPUS DE MOSTRA	SOQUES	TIPUS DE MOSTRA
A10Cl <sup>A</sup>	Femtes	A20Cl <sup>A</sup>	Sang
A13Cl <sup>A</sup>	Ferida	A22Cl <sup>A</sup>	Sang
A14Cl <sup>A</sup>	Bilis	A23Cl <sup>A</sup>	Pus
A15Cl <sup>A</sup>	Sang	A24Cl <sup>A</sup>	Ferida
A17Cl <sup>A</sup>	Femtes	CT812736A <sup>B</sup>	Aigua dolça
A18Cl <sup>A</sup>	Líquid ascític	D2Cl <sup>C</sup>	Drenatge
A19Cl <sup>A</sup>	Sang	D3Cl <sup>C</sup>	Ferida

<sup>A</sup>: soques clíniques cedides pel Dr. Guillem Prats, Hospital de Sant Pau i la Santa Creu, Barcelona; <sup>B</sup>: soca provinent de la xarxa de distribució d'aigua potable de Barcelona, cedida pel Llic. Xavier Lizana; <sup>C</sup>: soques clíniques cedides per la Dra. Conxa Segura, Hospital Duran i Reynals, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

Tots els medis de cultiu se sembraren a partir d'un creixement de les diferents soques en TSA. Els medis de cultiu sòlid en placa van ser sembrats fent una estria amb la nansa de Kolle o amb escuradents estèrils, i els medis sòlids en tub (agar inclinat) per estria simple amb la nansa de Kolle. Els medis semisòlids se sembraren per picadura. Per a la sembra dels medis de cultiu líquid es van afegir 50 µl d'inòcul ( $10^8$ - $10^9$  ufc/ml) a 5 ml del medi corresponent. El 10 % de les soques assajades van ser duplicades com a mesura de control dels resultats. Aquest control també s'assegurava per la presència de soques control en determinades proves i per la introducció de soques tipus i de referència del gènere *Aeromonas* (**Taula 7**) en l'estudi taxonòmic. També es va utilitzar un blanc en la inoculació dels medis de cultiu líquid, que va consistir en la inoculació de Ringer estèril.

Tots els medis de cultiu van ser preparats a l'**1 % NaCl**, excepte en el cas dels medis selectius. Si no s'indica altra cosa, la temperatura d'incubació fou de **25°C** pels motius esmentats a l'apartat 3.2.3.

En els **annexos 8.1. i 8.2.** es detallen la composició i preparació dels medis de cultiu, solucions salines, reactius i colorants.



### 3.4.1. Activitat catalasa (mètodes 1 i 2, GERHARDT i al. 1994).

Medi: es van aprofitar cultius nutritius (TSA o Mueller-Hinton) de 24-48 h.

Lectura i interpretació: s'afegeix directament, al creixement bacterià, unes gotes d'aigua oxigenada ( $H_2O_2$ ). També es pot fer de manera indirecta, agafant i dipositant creixement en un portaobjectes i després posant-hi l'aigua oxigenada. La formació de bombolles ( $H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$ ), indica la presència de l'enzim catalasa.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+), *Enterococcus hirae* CECT 4081 (-).

### 3.4.2. Activitat oxidasa (GERHARDT i al. 1994).

Medi: es van aprofitar cultius en TSA de 24-48 h.

Lectura i interpretació: s'agafa creixement amb escuradents estèrils, se'n posa sobre paper de filtre i es deixa caure una gota del reactiu de l'oxidasa. L'activitat citocrom C oxidasa es manifesta per la formació d'un color blavós. La lectura és immediata, ja que el reactiu s'oxida ràpidament i pot donar falsos positius.

Controls: *Pseudomonas aeruginosa* CECT 111 (+), *Escherichia coli* CECT 405 (-).

### 3.4.3. Creixement en AD.

Medi: AD (agar dextrina o agar base selectiu m-*Aeromonas* de Havelaar sense ampil·lina).

Temps d'incubació: 24-48 h.

Lectura i interpretació: la prova és positiva si s'observa creixement.

3.4.4. Creixement en agar McConkey.

Medi: agar McConkey.

Temps d'incubació: 24-48 h.

Lectura i interpretació: la prova és positiva si s'observa creixement. La coloració del creixement indica si la soca és fermentadora (color rosat) o no (sense color) de la lactosa.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+, rosa), *Salmonella enteritidis* Choleraesuis CECT 4594 (+, sense color).

3.4.5. Creixement en TCBS.

Medi: TCBS.

Temps d'incubació: 48 h.

Lectura i interpretació: la prova és positiva si s'observa creixement. La coloració del creixement indica si la soca és fermentadora (color groc) o no (verd) de la sacarosa.

Controls: *Vibrio cholerae* CECT 514<sup>T</sup> (+, groc), *Escherichia coli* CECT 405 (-, no creixement).

3.4.6. Creixement a diferents temperatures d'incubació (ESTEVE 1995).

Medi: TSB.

Temperatures d'incubació: 4°C, 25°C, 36°C o 45°C.

Temps d'incubació: 15 dies per als 4°C i 24 h per a la resta de temperatures.

Lectura i interpretació: la terbolesa indica creixement.

3.4.7. Descarboxilació d'arginina (ADH), lisina (LDC) i ornitina (ODC)  
(MAC FADDIN 1981).

Medi: caldo base de descarboxilacions de Falkow amb un 0,5 % de l'aminoàcid a assajar.

Temps d'incubació: 4 dies.

Lectura i interpretació: el medi preparat és d'un color violaci a causa del seu indicador del pH (púrpura de bromocresol). En un primer moment (en les primeres 10-12 h d'incubació), els bacteris fermentaran la dextrosa, acidificant el medi i tornant-lo groc. En resposta a l'acidesa, hi ha soques que produeixen descarboxilacions d'aminoàcids, formant amines o diamines i CO<sub>2</sub>; per tant, alcalinitzaran el medi, que tornarà a ser de color violaci, però més intens i tèrbol. Per una altra banda, és recomanable la preparació d'un medi control (Ø), és a dir, sense l'addició de cap aminoàcid. Aquest medi control serà igualment inoculat, però com no conté aminoàcids, el medi romandrà groc (només hi haurà fermentació de la dextrosa).

Controls ADH/LDC/ODC: *Serratia marcescens* CECT 159 (-/+/+), Ø (-/-/-).

3.4.8. Fermentació acidomixta, prova del roig de metil (GERHARDT i al. 1994).

Medi: caldo VPRM (Voges-Proskauer i roig de metil).

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: la fermentació acidomixta a partir de la glucosa fosfat baixa el pH del medi. Aquesta acidificació es pot

comprovar mitjançant l'addició del reactiu del roig de metil, que li donarà una coloració rogenca al medi.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+), *Serratia marcescens* CECT 159 (-).

3.4.9. Fermentació butanodiòlica, prova del Voges-Proskauer (GERHARDT i al. 1994).

Medi: caldo VPRM.

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: el 2,3-butanodiol i l'acetoïna s'oxiden, en medi àlcali, a diacetil. Aquesta última substància és la que reacciona amb el reactiu de Barrit (solucions A i B), donant una coloració rogenca en la part superior del medi als 15 min aproximadament. Per cada 1 ml de cultiu s'afegeixen primer 0,6 ml d' $\alpha$ -naftol (solució A), després 0,2 ml de KOH (solució B) i finalment es remena enèrgicament.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (-), *Serratia marcescens* CECT 159 (+).

3.4.10. Fermentació d'arabinosa, lactosa, manitol, manosa, sacarosa, salicina i sorbitol (TWEDT 1984, MONTILLA 1992).

Medi: caldo base de fermentacions amb un 1 % del sucre a assajar.

Temps d'incubació: 24 h - 7 dies.

Lectura i interpretació: la fermentació dels sucres acidifica el medi, que es tornarà groc per la presència de púrpura de bromocresol com a indicador del pH.

3.4.11. Fermentació de dextrina.

Medi: AD.

Temps d'incubació: 24-48 h.

Lectura i interpretació: el creixement de colònies de color groc és indicatiu de la fermentació de la dextrina del medi. El medi, que és de color blau per la presència del blau de bromotimol com a indicador del pH, es torna groc quan s'acidifica.

Controls: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>r</sup> (+), *Escherichia coli* CECT 405 (-).

3.4.12. Gas de glucosa (mètode 1, GERHARDT i al. 1994; ORTIGOSA 1995).

Medi: caldo glucosat.

Temps d'incubació: 48 h.

Lectura i interpretació: és positiva quan hi ha terbolesa i gas a l'interior de la campana de Durham. Abans d'inocular el medi, s'ha de comprovar l'absència de bombolles a l'interior de la campana per a evitar falsos positius.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+).

3.4.13. Gram (FLUHARTY i PACKARD 1967; mètode Hucker, GERHARDT i al. 1994).

Medi: es van aprofitar cultius en TSA de 24-48 h.

Lectura i interpretació: es disposa cultiu bacterià en un porta amb la nansa de Kolle, es deixa caure damunt una gota de solució aquosa de KOH al 3 % i amb la mateixa nansa es fa una emulsió. La formació de

viscositat és indicativa de la lisi de la paret Gram negativa. En cas de resultat dubtós, es va realitzar la tinció de Gram.

Controls: *Enterococcus hirae* CECT 4081 (+), *Escherichia coli* CECT 405 (-).

#### 3.4.14. β-hemòlisi (mètode 1, GERHARDT i al. 1994).

Medi: agar sang Colúmbia.

Temps d'incubació: 48 h - 4 dies.

Lectura i interpretació: la β-hemòlisi produeix una lisi completa de les hematies, de manera que hi ha una zona d'aclariment del medi al voltant de les colònies.

#### 3.4.15. Hidròlisi d'arbutina (JANDA i al. 1984).

Medi: agar arbutina inclinat.

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: després d'afegir-hi unes gotes de KOH al 40 %, la prova és positiva si es torna el medi marronós. Aquesta coloració és produïda per la presència d'hydroquinona oxidada.

#### 3.4.16. Hidròlisi de DNA (mètode 1, GERHARDT i al. 1994).

Medi: agar DNA.

Temps d'incubació: 4 dies.

Lectura i interpretació: s'inunda la placa amb HCl 0,1 N, que precipita els àcids nucleics adquirint un aspecte blanquinós. Les soques amb activitat DNAsa es posaran de manifest perquè es formarà un halo transparent al voltant de la zona de creixement.

Controls: *Serratia marcescens* CECT 159 (+), *Escherichia coli* CECT 405 (-).

3.4.17. Hidròlisi d'elastina (POPOFF i LALLIER 1984).

Medi: agar elastina.

Temps d'incubació: 15 dies.

Lectura i interpretació: l'aclariment del medi al voltant del creixement és indicatiu d'activitat elastasa.

3.4.18. Hidròlisi d'esculina (SANCHO i al. 1989; modificat, GERHARDT i al. 1994).

Medi: agar esculina.

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: la hidròlisi d'esculina allibera glucosa i esculetina. Aquesta última reacciona amb l'ió fèrric formant precipitats de color negre.

Controls: *Enterococcus hirae* CECT 4081 (+), *Salmonella enteritidis* Choleraesuis CECT 4594 (-).

3.4.19. Hidròlisi de midó (GERHARDT i al. 1994).

Medi: agar midó.

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: en inundar les plaques amb solució de Lugol, el medi es torna blau excepte al voltant de l'estria de

creixement de les soques que hidrolitzen el midó, on hi haurà un halo transparent.

Controls: *Bacillus subtilis* CECT 356 (+), *Escherichia coli* CECT 405 (-).

#### 3.4.20. Hidròlisi d'urea (MAC FADDIN 1981).

Medi: caldo urea de Rustigian i Stuart.

Temps d'incubació: 48 h.

Lectura i interpretació: l'alcalinització del medi per l'activitat ureasa es pot observar per un canvi de color del roig de fenol del vi rosat al fúcsia.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+), *Serratia marcescens* CECT 159 (-).

#### 3.4.21. Hidròlisi de xantina (PHILIPS i NASH 1985).

Medi: agar xantina.

Temps d'incubació: 15 dies.

Lectura i interpretació: la hidròlisi de la xantina s'observa per un aclariment del medi al voltant del creixement

#### 3.4.22. Mobilitat (MERCK 1994, GERHARDT i al. 1994).

Medi: SIM (agar sulfhídric-indole-mobilitat) i AP (aigua de peptona).

Temps d'incubació: 72 h i 24 h, respectivament.

Lectura i interpretació: la mobilitat es manifesta per una terbolesa difosa pels voltants del canal de picadura. En canvi, el creixement únicament al llarg de la picadura mostra immobilitat. En els casos de



resultat dubtós, es van examinar microscòpicament cultius de 24 h en AP pel mètode de la gota pendent. En aquest mètode es posen unes gotes del cultiu líquid en un cobreobjectes, se li posa una mica de silicona als cantons, es col·loca damunt un portaobjectes excavat cara cap avall, es fa una mica de pressió perquè s'enganxen cobreobjectes i portaobjectes, amb molta cura es dona la volta perquè tot quede cara cap amunt, es posa oli d'immersió i ràpidament s'observa al microscopi òptic a 100x augments. Per a considerar que les cèl·lules són mòbils, el moviment ha de ser caòtic i individualitzat, de manera que no hi ha un moviment lleu cap una mateixa direcció ni un moviment de tremolor.

Controls: *Salmonella enteritidis* Choleraesuis CECT 4594 (+),  
*Enterococcus hirae* CECT 4081 (-).

#### 3.4.23. Mobilitat colonial swarming (GERHARDT i al. 1994).

Medi: TSA.

Temps d'incubació: 7 dies.

Lectura i interpretació: es parla de *swarming* quan el creixement de les colònies s'estén més enllà del lloc on s'ha sembrat, en un medi relativament sec i com a conseqüència de l'expressió de la mobilitat colonial.

#### 3.4.24. Morfologia (GERHARDT i al. 1994).

Medi: TSB.

Temps d'incubació: 24 h.

Lectura i interpretació: després de fer un frotis bacterià, es deixa la preparació durant 1 min amb safranina i s'observa al microscopi òptic a 100x augments amb oli d'immersió. Les *Aeromonas* tenen forma de

filament, bacil o bacil curt. En les ocasions en què es va fer la tinció de Gram, aquesta fou aprofitada per a observar la morfologia cel·lular.

3.4.25. ONPG, test de la  $\beta$ -galactosidasa (BRIDSON 1990).

Medi: 200  $\mu$ l de Ringer. S'hi afegeix un disquet d'ONPG després de la inoculació.

Temps d'incubació: 6-24 h.

Lectura i interpretació: la  $\beta$ -galactosidasa hidrolitza l'ONPG (orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galacto-piranos), produint l'orto-nitrofenol que és cromogènic i li dóna una coloració groguenca a la solució.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+), *Salmonella enteritidis* Choleraesuis CECT 4594 (-).

3.4.26. Oxidació i fermentació de glucosa (HUGH i LEIFSON 1953, MAC FADDIN 1981).

Medi: O/F (medi basal per a l'oxidació i la fermentació de carbohidrats) amb un 1 % de glucosa.

Temps d'incubació: 24 h - 7 dies.

Lectura i interpretació: les soques fermentadores de la glucosa presentaran els dos tubs grocs (+/+); la fermentació de la glucosa baixarà el pH del medi i el blau de bromotimol virarà de verd a groc.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+/+, fermentatiu), *Pseudomonas aeruginosa* CECT 111 (+/-, oxidatiu).

3.4.27. Producció d'indole (mètode 2, GERHARDT i al. 1994).

Medi: medi indole.

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: la producció d'indole a partir del triptòfan es posa de manifest per la formació d'un anell roig intens després d'afegir-hi unes gotes del reactiu de Kovacs.

Controls: *Escherichia coli* CECT 405 (+), *Salmonella enteritidis* Choleraesuis CECT 4594 (-).

3.4.28. Producció de pigment marró difusible (ESTEVE 1995).

Medi: TSA.

Temps d'incubació: 7 dies.

Control: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> (+).

3.4.29. Producció de sulfhídric de la cisteïna (POPOFF i LALLIER 1984).

Medi: sulfhídric de L-Cys.

Temps d'incubació: 4 dies.

Lectura i interpretació: la producció de sulfhídric a partir de la cisteïna formarà un precipitat negre de sulfur ferrós al voltant de la zona de picadura.

3.4.30. Producció de sulfhídric del tiosulfat (MERCK 1994, GERHARDT i al. 1994).

Medi: SIM.

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: la producció de sulfhídric a partir del tiosulfat formarà un precipitat negre de sulfur ferrós al voltant de la zona de picadura.

Controls: *Salmonella enteritidis* Choleraesuis CECT 4594 (+),  
*Enterococcus hirae* CECT 4081 (-).

#### 3.4.31. Reducció de nitrats a nitrits (MAC FADDIN 1981).

Medi: caldo de nitrats.

Temps d'incubació: 48 h.

Lectura i interpretació: afegir-hi dues gotes dels reactius Griess I i Griess II. La prova és positiva si el medi es torna roig. La lectura és immediata.

#### 3.4.32. Resistència a l'ampicil·lina, cefalotina, colistina, estreptomicina, polimixina B i tetraciclina (JORGENSEN i al. 1999).

Medi: caldo i agar de Mueller-Hinton i disquets d'antibiòtics.

Temps d'incubació: 24 h.

Lectura i interpretació: el mètode emprat per a la realització de l'antibiograma fou el de la difusió en placa. Les soques van ser inoculades en caldo Mueller-Hinton i incubades durant 2-3 h, fins que assolien el núm. 0,5 de l'escala de McFarland. A partir d'aquests cultius es van sembrar, per superfície i mitjançant hisops estèrils, plaques de Mueller-Hinton, per a després col·locar els sis disquets dels diferents antibiòtics equidistantment, amb unes pinces metàl·liques desinfectades amb etanol. La lectura es va fer en funció del diàmetre d'inhibició del creixement (en mm), manifestat per un halo transparent (**Taula 9**).

**Taula 9.** Concentracions d'antibiòtics i diàmetres (mm) de la zona d'inhibició.

ANTIBIÒTIC	RESISTENT	INTERMEDI	SENSIBLE
Ampicil·lina (10 µg)	≤ 11	12-13	≥ 14
Cefalotina (30 µg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Colistina (50 µg)	< 15	-	> 15
Estreptomina (10 µg)	≤ 11	12-14	≥ 15
Polimixina B (300 U)	≤ 8	9-11	≥ 12
Tetraciclina (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19

#### 3.4.33. Resistència a l'agent vibriostàtic O/129.

Medi: caldo i agar de Mueller-Hinton i disquets d'O/129 (150 µg).

Temps d'incubació: 24 h.

Lectura i interpretació: el mètode emprat per a la realització de l'antibiograma fou el de la difusió en placa (JORGENSEN i al. 1999). Les soques amb un diàmetre d'inhibició ≤ 10 mm foren considerades resistents a l'O/129.

#### 3.4.34. Tolerància a pHs 4,5 i 9,0 (ESTEVE 1995).

Medi: TSB.

Temps d'incubació: 48 h.

Lectura i interpretació: la terbolesa és indicativa de creixement i, per tant, de tolerància a un determinat pH.

#### 3.4.35. Tolerància salina, a diferents concentracions de NaCl (0-1-3-6-9 % p/v) (TWEDT 1978, ORTIGOSA 1995).

Medi: STB (caldo de tolerància salina).

Temps d'incubació: 72 h.

Lectura i interpretació: la terbolesa és indicativa de creixement i, per tant, de tolerància a una determinada salinitat.

3.4.36. Utilització d'acetat, arabinosa, arginina, histidina, lactat i manitol com a única font de carboni i energia (VÉRON 1975, POPOFF i LALLIER 1984, RIUS 1993).

Medi: solució M-70 amb un 0,1 % si es tracta d'un sucre o amb un 0,2 % si es tracta d'un altre tipus de compost orgànic.

Temps d'incubació: 14 dies.

Lectura i interpretació: la terbolesa indicarà creixement i, per tant, la utilització del compost orgànic assajat.

3.4.37. Utilització del citrat com a única font de carboni i energia (mètode 1, GERHARDT i al. 1994).

Medi: agar citrat de Simmons inclinat.

Temps d'incubació: 24 h – 7 dies.

Lectura i interpretació: és positiu quan s'observa creixement. A més, la utilització del citrat alcalinitza el medi, produint-se un viratge del color del medi, de verd a blau; ja que el medi porta blau de bromotimol com a indicador del pH.

Controls: *Salmonella enteritidis* Choleraesuis CECT 4594 (+),  
*Escherichia coli* CECT 405 (-).

### 3.5. Estudi de taxonomia numèrica.

#### 3.5.1. Processament de les dades i anàlisi numèrica.

Els resultats de les proves fenotípiques es codifiquen com dades binàries de la següent manera: 1 per als resultats positius, 0 per als negatius, i 9 per als no determinats o no comparables. D'aquesta manera es crea una matriu de dades.

L'anàlisi numèrica es va realitzar utilitzant el programa NTSYS® (*Numerical taxonomy and multivariate analysis system*), versió 1.8 (ROHLF 1993). La matriu de similituts fou calculada mitjançant el coeficient de concordança simple de Sokal-Michener (**S<sub>SM</sub>**, *simple matching coefficient*). L'anàlisi de l'agrupament a partir de la matriu de similituts es realitzà pel mètode d'associació **UPGMA** (*Unweighted pair group method with arithmetic mean analysis*).

Per a la validació de l'agrupament de les soques es va crear la matriu de valors cofenètics a partir de la matriu UPGMA. El coeficient de correlació (**r**) s'obté a partir de la matriu de valors cofenètics i la matriu de similituts. Així, el valor de **r** ens donarà la bondat de la concordança entre totes dues matrius (SNEATH i SOKAL 1973, ORTIGOSA 1995):

$r > 0,9$	excel·lent
$0,9 > r > 0,8$	bona
$0,8 > r > 0,7$	pobra
$r < 0,7$	molt pobra

#### 3.5.2. Reproductibilitat de les proves i avaluació de l'errada (SNEATH i JOHNSON 1972, ORTIGOSA 1995).

En els caràcters amb resposta binària, l'estimació de l'errada es realitza duplicant un determinat nombre de soques, que normalment és del 10 %.

L'estimació en una prova determinada per a una parella de rèpliques es calcula en base a la següent fórmula:

$$S_i^2 = d / 2t$$

*d*: nombre de discrepàncies en una prova determinada

*t*: nombre de soques duplicades.

Es recomanable descartar aquelles proves amb una  $S_i^2 > 0,10$ .

Per a estimar la probabilitat mitjana de l'errada comesa en els resultats de totes les proves s'utilitza la següent expressió:

$$S^2 = (1/n) (S_1^2 + \dots + S_n^2)$$

*n*: nombre total de proves.

Els valors de  $S^2 < 10\%$  es consideren acceptables.

### **3.6. Estudi de diversitat genètica i estructura poblacional d'*Aeromonas* spp. mitjançant la tècnica MLEE.**

#### 3.6.1. Soques incloses en l'estudi.

Un total de **122 soques** van ser incloses en l'estudi de diversitat genètica i estructura poblacional d'*Aeromonas* spp. mitjançant la tècnica MLEE (electroforesi d'enzims multilocus):

**74** soques ***A. bestiarum***: totes les soques identificades com a *A. bestiarum* (apartat 4.2.), excepte 567A i 608A.

**22** soques ***A. salmonicida***: totes les soques identificades com a *A. salmonicida* (apartat 4.2.), excepte 83C, 640A i 946N.

**6** soques ***A. hydrophila***: totes les soques identificades com a *A. hydrophila* (apartat 4.2.).



- 5** soques ***A. hydrophila* complex**: 556A, 569A, 582A, 619A i 623A (apartat 4.2.).
- 7** soques ***A. popoffii*** (proporcionades pel Dr. Antonio Martínez Murcia, Universitat Miguel Hernández): LMG 17541<sup>T</sup>, LMG 17542, LMG 17543, LMG 17544, LMG 17545, LMG 17546 i LMG 17547.
- 8 soques tipus i de referència** (proporcionades per la CECT, Col·lecció Espanyola de Cultius-Tipus): *A. bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>, *A. enteropelogenes* CECT 4487<sup>T</sup>, *A. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup>, *A. salmonicida* subsp. *masoucida* CECT 896<sup>T</sup>, *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>, *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup>, *Listonella anguillarum* CECT 522<sup>T</sup> i *Vibrio furnissii* CECT 4203<sup>T</sup>.

### 3.6.2. Obtenció d'extractes cel·lulars.

Cadascuna de les 122 soques esmentades a l'apartat anterior es va sembrar en plaques de TSA (1 % NaCl) a 25°C durant 24 h. Els cultius, en fase estacionària, es van resuspendre en una solució amortidora de fosfats (**annex 8.4.**). Els extractes cel·lulars es van obtenir per sonicació ("Branson Sonifier 250, Ultrasonics Co.") de les resuspensions mantingudes en un bany de gel, mitjançant 4 cicles de 30 s amb intervals d'1 min. Després de la sonicació, les mostres van ser centrifugades ("201M, Sigma"), dues o tres voltes, a 135.000 rpm durant 15 min. Els sobrenedants o extractes cel·lulars van ser conservats a -40°C.

Durant aquest procés, es van realitzar dos punts de control, un que controlava la densitat poblacional inicial mesurant la terbolesa dels cultius resuspesos a 600 nm ("Uvikron® 810, Kontron"), i un altre per a determinar la concentració proteica total de cada extracte (LOWRY i al. 1951).

### 3.6.3. Electroforesi en gels de poliacrilamida.

Es van utilitzar gels de poliacrilamida verticals, discontinus, en condicions no desnaturalitzants. Les condicions no desnaturalitzants permeten detectar l'activitat dels enzims que contenen els extractes. Els enzims foren assajats, en primera instància, en gels al 10 % / 8 % de poliacrilamida (gel separador / gel iniciador). Aquestes concentracions permeten una més fàcil manipulació dels gels (són més compactes), respecte de les concentracions 8 % / 5 %. Ara bé, els enzims que migraren molt poc en el gel (es quedaven en el gel iniciador o en el començament del separador), foren assajats en gels al 8 % / 5 %. Una altra combinació en la preparació dels gels fou la seua grossària, que depèn del volum de mostra; així els gels prims admeten aproximadament 80 µl i els grossos 150 µl.

Per a la preparació dels gels de poliacrilamida es va partir d'una solució de poliacrilamida al 30 %, protegida de la llum i en refrigeració. Aquesta solució s'obté amb 29,2 g d'acrilamida PAGE ("Pharmacia 17-1302-02") i 0,8 g de metilè-bis-acrilamida ("Pharmacia 17-1304-01") per cada 100 ml de volum total, en les condicions de treball adients (guants, mascareta, campana de fums) per la neurotoxicitat dels seus components.

A la **Taula 10** s'exposa la composició dels gels separadors i iniciadors conforme al percentatge de poliacrilamida i a la seua grossària.

Per a la polimerització dels gels separadors s'hi van afegir 360 µl d'APS i 90 µl de TEMED, i 140 µl d'APS i 20 µl de TEMED en el cas dels gels iniciadors.

L'electroforesi es va realitzar a un voltatge constant de 50 V ("Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia Biotech") i en refrigeració, 7°C ("MultiTemp III, Pharmacia Biotech"), després d'un prerecorregut a 200 V durant un mínim de 30 min per a l'eliminació dels components del gel no polimeritzats que podrien interferir en l'activitat

enzimàtica. L'electroforesi es va aturar quan el front marcador de l'electroforesi (BBF o blau de bromofenol) va arribar a la fi del gel.

**Taula 10.** Composició dels gels de poliacrilamida.

<b>Gels separadors al 10 % de poliacrilamida</b>	2 prims	1 prim 1 gros	2 grossos
H <sub>2</sub> O destil·lada	10 ml	12 ml	14 ml
Tris-HCl 0,4 M pH 8,8	30 ml	36 ml	42 ml
Poliacrilamida al 30 %	20 ml	24 ml	28 ml
<b>Gels separadors al 8 % de poliacrilamida</b>	2 prims	1 prim 1 gros	2 grossos
H <sub>2</sub> O destil·lada	14 ml	16,8 ml	19,6 ml
Tris-HCl 0,4 M pH 8,8	30 ml	36 ml	42 ml
Poliacrilamida al 30 %	16 ml	19,2 ml	22,4 ml
<b>Gels iniciadors al 8 % de poliacrilamida</b>	2 prims	1 prim 1 gros	2 grossos
H <sub>2</sub> O destil·lada	4,7 ml	5,5 ml	6,6 ml
Tris-HCl 0,125 M pH 6,8	10 ml	12 ml	14 ml
Poliacrilamida al 30 %	5,3 ml	6,4 ml	7,5 ml
<b>Gels iniciadors al 5 % de poliacrilamida</b>	2 prims	1 prim 1 gros	2 grossos
H <sub>2</sub> O destil·lada	6,7 ml	8 ml	9,4 ml
Tris-HCl 0,125 M pH 6,8	10 ml	12 ml	14 ml
Poliacrilamida al 30 %	3,3 ml	4 ml	4,7 ml

El material d'electroforesi emprat (vidres, suports, pintes, cubetes d'electroforesi) fou el "Protean II xi Cell electrophoresis instrument" de "Bio-Rad". A l'**annex 8.4.** (SELANDER i al. 1986, GERHARDT i al. 1994, BIO-RAD 1995) es detallen la preparació i composició de les diferents solucions amortidores i reactius emprats.

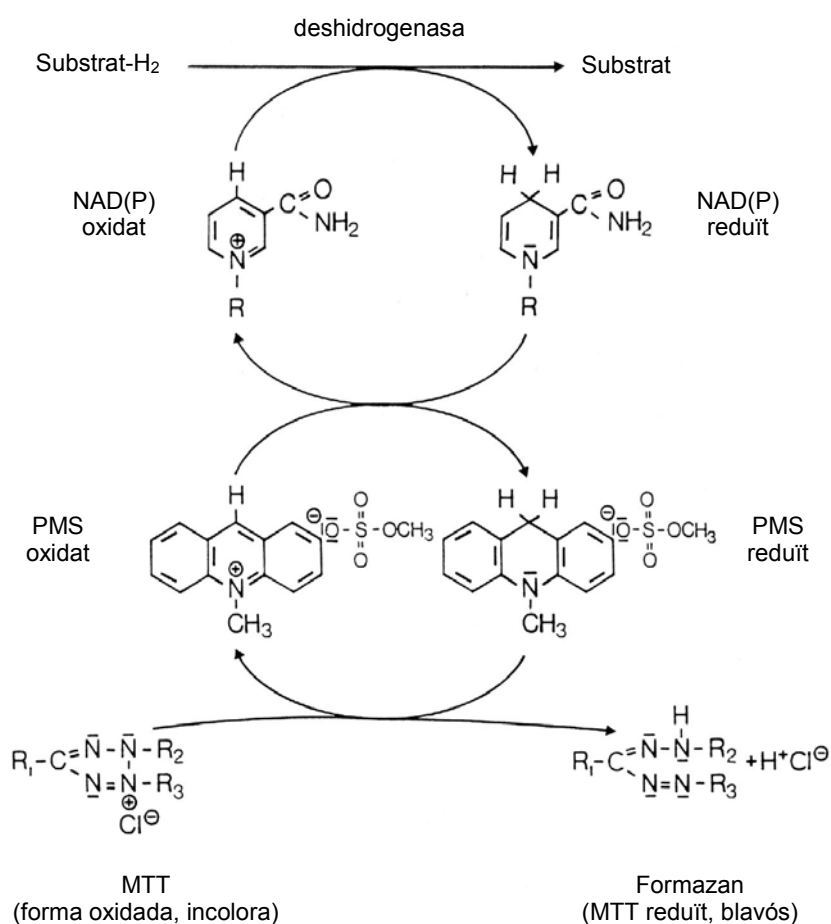
#### 3.6.4. Enzims analitzats.

Una volta finalitzada l'electroforesi, els gels són sotmesos a una tinció específica per a revelar l'activitat de l'enzim que es vol estudiar. Un total de **22 enzims** van ser analitzats. Tots ells estan descrits més endavant en quant a la seua funció i a l'anàlisi emprada per a la seua

visualització. Majoritàriament van ser utilitzats dos sistemes per a la detecció de les diferents activitats enzimàtiques.

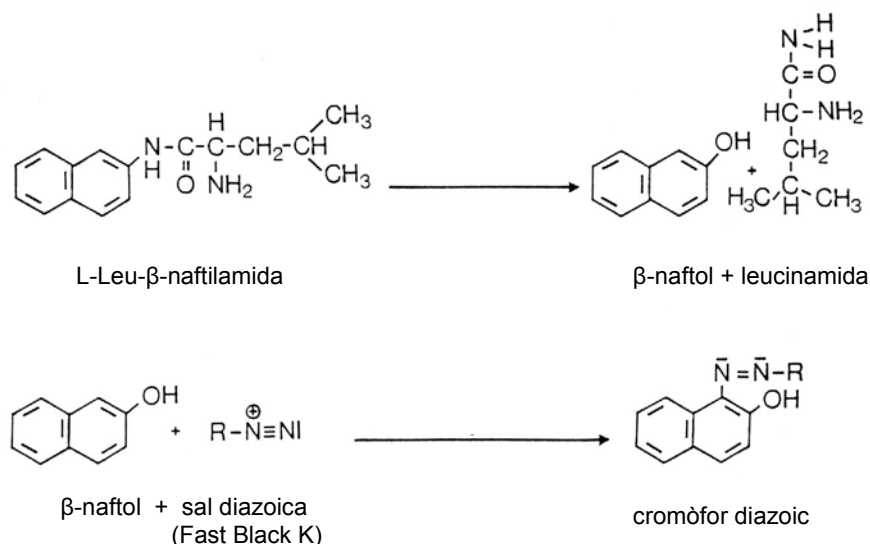
El sistema NAD(P) – PMS (*N*-metildibenzopirazina metil sulfat) – MTT (bromur 3-[4,5-dimetil-tiazolil-2]-2,5-difeniltetrazole) fou el més utilitzat (**Figura 12**), bé directament bé indirectament. Breument, el substrat és oxidat per l'enzim, mentre el coenzim NAD(P) actua com a acceptor d'hidrogen i d'electrons, transformant-se en NAD(P)H. El PMS actua com a molècula de transferència d'hidrogen i d'electrons del NAD(P)H a la molècula final (MTT) d'aquesta cascada de reaccions redox. D'aquesta manera, la forma oxidada de la sal de monotetrazole MTT, soluble en aigua i incolora, es redueix a formazan, insoluble en aigua i de color blau (ROTHER 1994). Aquesta coloració apareixerà en el gel com una banda en el lloc on ha quedat situat l'enzim analitzat.

**Figura 12.** Sistema NAD(P) - PMS - MTT per a la detecció d'activitat enzimàtica.



El segon sistema més utilitzat fou el de les sals de diazoni (**Figura 13**). L'enzim allibera un producte que s'acobra a una sal diazoica, formant-se un producte final (dialzo-cromòfor) que precipita donant un color determinat (ROTHER 1994).

**Figura 13.** Sistema de les sals de diazoni per a la detecció d'activitat enzimàtica.



Els protocols de totes les tincions enzimàtiques assajades estan detallades a l'**annex 8.3**. (SELANDER i al. 1986, RIUS i al. 2001) i la composició de les diferents solucions amortidores i reactius emprats es poden consultar a l'**annex 8.4**. (SELANDER i al. 1986, GERHARDT i al. 1994, BIO-RAD 1995). Més endavant es descriuen els 22 enzims analitzats, indicant-se també el codi recomanat per la "Enzyme Commission" que classifica cada enzim en base a la reacció química específica catalitzada (GIBSON 1971, IUB 1984, SELANDER i al. 1986, HENRY 1988, STRYER 1988, ROTHE 1994, DEVLIN 1999, PURICH i ALLISON 2000, RIUS i al. 2001).

#### 3.6.4.1. ADH (alcohol deshidrogenasa, EC 1.1.1.1).

Funció: redueix acetaldehid en l'última etapa de la fermentació alcohòlica. Aquesta reacció bioquímica és reversible.

Reaccions:

Etanol + NAD (+ ADH) → acetaldehid + NADH.

NADH + PMS → NAD + PMS reduït.

PMS reduït + MTT → PMS + formazan (color blau).

L'isopropanol també pot ser substrat de l'ADH.

3.6.4.2. ALD (alanina deshidrogenasa, EC 1.4.1.1).

Funció: desaminació oxidativa d'alanina. Participa en el metabolisme dels aminoàcids.

Reaccions:

L-Ala + H<sub>2</sub>O + NAD (+ ALD) → pyr + NH<sub>3</sub> + NADH.

NADH + PMS → NAD + PMS reduït.

PMS reduït + MTT → PMS + formazan (color blau).

3.6.4.3. C12O (catecol 1,2-dioxigenasa o pirocatecasa, EC 1.13.11.1).

Funció: participa en el metabolisme de compostos aromàtics.

Reaccions:

Pirocatecol + O<sub>2</sub> (+C12O) → cis,cis-muconat (color marronós).

Enzim làbil al tractament tèrmic de 55°C durant 10 min.

3.6.4.4. C23O (catecol 2,3-dioxigenasa o metapirocatecasa, EC 1.13.11.2).

Funció: participa en el metabolisme de compostos aromàtics.

Reaccions:

Pirocatecol + O<sub>2</sub> (+C12O) → semialdehid 2-hidroxi muconat (color marronós).

Enzim resistent al tractament tèrmic de 55°C durant 10 min.

3.6.4.5. EST (esterasa o  $\alpha$ -naftil acetat esterasa, EC 3.1.1.1).

Funció: hidròlisi d'èsters. Participa en el metabolisme lipídic.

Reaccions:

$\alpha$ -naftil acetat (+ EST)  $\rightarrow$   $\alpha$ -naftol + àcid acètic.

$\alpha$ -naftol + sal diazoica (Fast Blue RR)  $\rightarrow$  cromòfor diazoic  
(color marró).

3.6.4.6. FUM (fumarasa o fumarat hidratasa, EC 4.2.1.2).

Funció: C-O liasa que elimina H<sub>2</sub>O (EC 4.2.1.x). Forma part del cicle de l'àcid cítric.

Reaccions:

Fumarat + H<sub>2</sub>O (+ FUM)  $\rightarrow$  malat.

Malat + NAD + MDH  $\rightarrow$  OAA + NADH.

NADH + PMS  $\rightarrow$  NAD + PMS reduït.

PMS reduït + MTT  $\rightarrow$  PMS + formazan (color blau).

3.6.4.7. G6P (glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, EC 1.1.1.49).

Funció: catalitza la primera etapa del cicle de les pentoses. És l'etapa limitant d'aquesta ruta metabòlica.

Reaccions:

D-glucosa-6-fosfat + NADP (+ G6P)  $\rightarrow$  6-fosfoglucono- $\delta$ -  
lactona + NADPH.

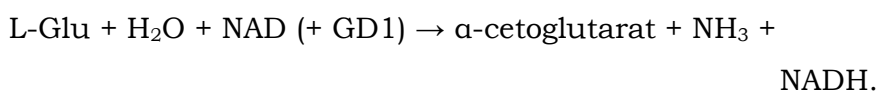
NADPH + PMS  $\rightarrow$  NADP + PMS reduït.

PMS reduït + MTT  $\rightarrow$  PMS + formazan (color blau).

- 3.6.4.8. GD1 (glutamat deshidrogenasa dependent de NAD, EC 1.4.1.2).

Funció: desaminació oxidativa de glutamat. Participa en el metabolisme dels aminoàcids.

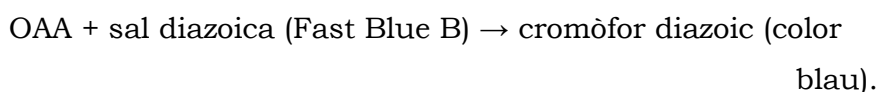
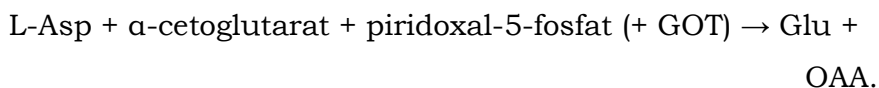
Reaccions:



- 3.6.4.9. GOT (glutamat-oxalacetat transaminasa o ASAT, aspartat aminotransferasa, EC 2.6.1.1).

Funció: participa en el cicle de l'àcid cítric. Necessita piridoxal-5-fosfat com a grup prostètic.

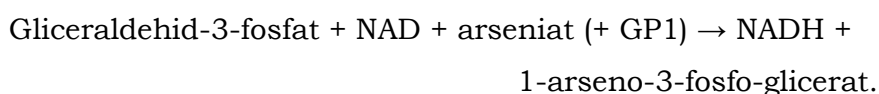
Reaccions:



- 3.6.4.10. GP1 (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa dependent de NAD, EC 1.2.1.12).

Funció: oxida i fosforila gliceraldehid-3-fosfat. Participa en la glucòlisi.

Reaccions:





S'hi utilitza arseniat en compte de fosfat.

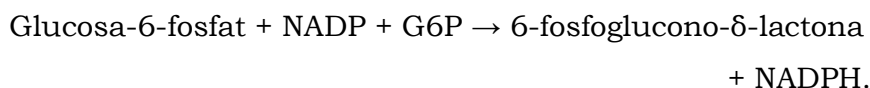
- 3.6.4.11. GP2 (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa depenent de NADP, EC 1.2.1.13).

Com en GP1, però a l'anàlisi s'utilitza NADP en compte de NAD.

- 3.6.4.12. HEX (hexoquinasa, EC 2.7.1.1).

Funció: fosforila la glucosa en la primera etapa de la glucòlisi. Requereix  $Mg^{2+}$  per a la seua activitat.

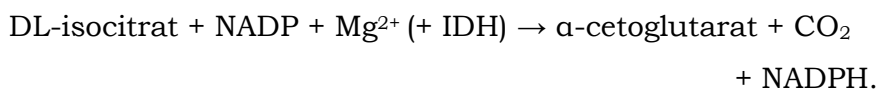
Reaccions:



- 3.6.4.13. IDH (isocitrat deshidrogenasa, EC 1.1.1.42).

Funció: descarboxilació i oxidació d'isocitrat en el cicle de l'àcid cítric. Requereix  $Mg^{2+}$  per a la seua activitat.

Reaccions:



- 3.6.4.14. IPO (indofenol oxidasa o superòxid dismutasa, EC 1.15.1.1).

Funció: elimina anions superòxid ( $O_2^-$ ).

Reaccions:

$\text{PMS} + \text{MTT} + \text{llum} \rightarrow \text{PMS} + \text{formazan (color blau)} + \text{O}_2^-$ .

$\text{Formazan (color blau)} + \text{O}_2^- (+ \text{IPO}) \rightarrow \text{MTT}$ .

En aquesta anàlisi s'utilitza agar-agar, que quedarà blavós, mentre les zones d'activitat enzimàtica es veuran blanques (tinció negativa).

3.6.4.15. LAP (leucina aminopeptidasa o naftilamidasa, EC 3.4.1.1).

Funció: peptidasa. Requereix  $\text{Mg}^{2+}$  per a la seua activitat.

Reaccions:

$\text{L-Leu-}\beta\text{-naftilamida} + \text{Mg}^{2+} (+ \text{LAP}) \rightarrow \text{leucinamida} + \beta\text{-naftol}$ .

$\beta\text{-naftol} + \text{sal diazoica (Fast Black K)} \rightarrow \text{cromòfor diazoic}$   
(color gris-marró).

3.6.4.16. LDH (lactat deshidrogenasa, EC 1.1.1.27).

Funció: reducció del piruvat. Aquesta reacció bioquímica és reversible.

Reaccions:

$\text{L-lactat} + \text{NAD} (+ \text{LDH}) \rightarrow \text{pyr} + \text{NADH}$ .

$\text{NADH} + \text{PMS} \rightarrow \text{NAD} + \text{PMS reduït}$ .

$\text{PMS reduït} + \text{MTT} \rightarrow \text{PMS} + \text{formazan (color blau)}$ .

3.6.4.17. MDH (malat deshidrogenasa, EC 1.1.1.37).

Funció: oxidació del malat en els cicles de l'àcid cítric i del glioxilat.

Reaccions:

$\text{L-malat} + \text{NAD} (+ \text{MDH}) \rightarrow \text{OAA} + \text{NADH}$ .

$\text{NADH} + \text{PMS} \rightarrow \text{NAD} + \text{PMS reduït}$ .

PMS reduït + MTT → PMS + formazan (color blau).

- 3.6.4.18. ME (enzim màlic o malat deshidrogenasa-oxalacetat descarboxilasa dependent de NADP o piruvat-malat carboxilasa, EC 1.1.1.40).

Funció: catalitza la carboxilació reductora del pyr per a donar malat. És una ruta anapleròtica, de reposició d'intermediaris del cicle de l'àcid cítric.

Reaccions:

L-malat + NADP + Mg<sup>2+</sup> (+ ME) → pyr + CO<sub>2</sub> + NADPH.

NADPH + PMS → NADP + PMS reduït.

PMS reduït + MTT → PMS + formazan (color blau).

- 3.6.4.19. NSP (nucleòsid fosforilasa o purina-nucleòsid fosforilasa, EC 2.4.2.1).

Funció: participa en la degradació de nucleòtids.

Reaccions:

Inosina + fosfat (+ NSP) → ribosa-1-fosfat + hipoxantina.

Hipoxantina + PMS + xantina oxidasa → xantina + PMS  
reduït.

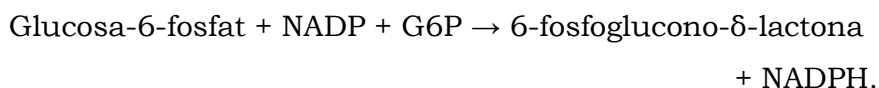
PMS reduït + MTT → PMS + formazan (color blau).

- 3.6.4.20. PGI (fosfoglucoisomerasa o glucosa-6-fosfat isomerasa, EC 5.3.1.9).

Funció: catalitza la conversió d'una aldosa a una cetosa (isomerització) en la segona etapa de la glucòlisi. Aquesta reacció bioquímica és reversible. Requereix Mg<sup>2+</sup> per a la seua activitat.

Reaccions:

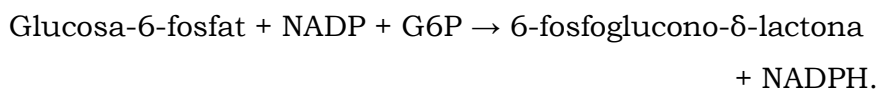
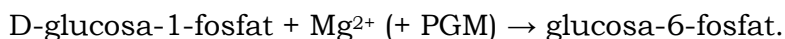
D-fructosa-6-fosfat + Mg<sup>2+</sup> (+ PGI) → glucosa-6-fosfat.



#### 3.6.4.21. PGM (fosfoglucomutasa, EC 2.7.5.1).

Funció: catalitza la transferència del fosfat de la glucosa-1-fosfat. Activa la glucosa provinent de la hidròlisi del glucogen, per a l'entrada en la glucòlisi. Requereix  $\text{Mg}^{2+}$  per a la seua activitat.

Reaccions:



#### 3.6.4.22. THD (treonina deshidrogenasa, EC 1.1.1.103).

Funció: deshidratació i desaminació de Thr. Participa en el metabolisme dels aminoàcids. Aquesta reacció bioquímica és reversible.

Reaccions:



#### 3.6.5. Lectura dels gels.

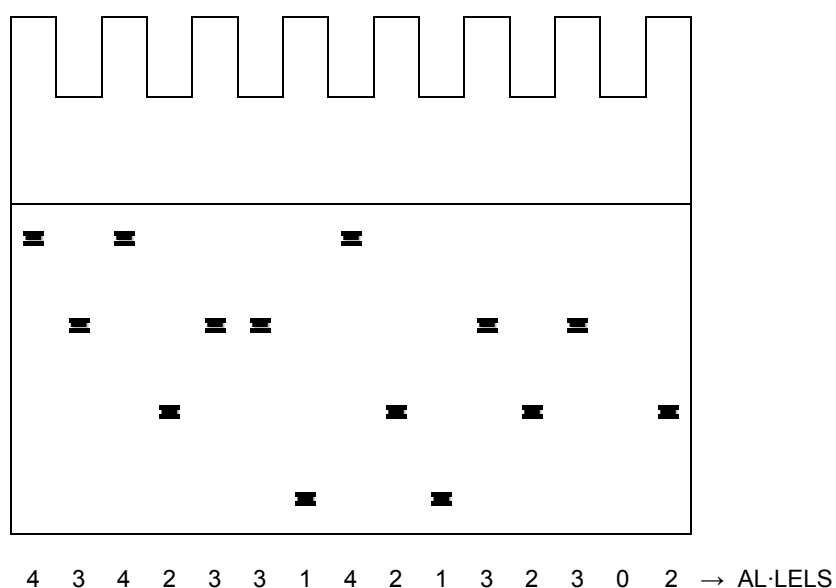
Després de la tinció enzimàtica específica, s'observen bandes tenyides allà on hi ha activitat enzimàtica. Per a un mateix enzim, poden aparèixer bandes amb migració diferent en el gel, depenent de l'extracte utilitzat. Aquestes bandes amb diferent mobilitat, **electromorfs** o

productes al·lèlics del locus enzimàtic analitzat, són numerades en ordre decreixent a llur migració anòdica o, dit d'una altra manera, numerades en ordre creixent de major a menor migració (**Figura 14**).

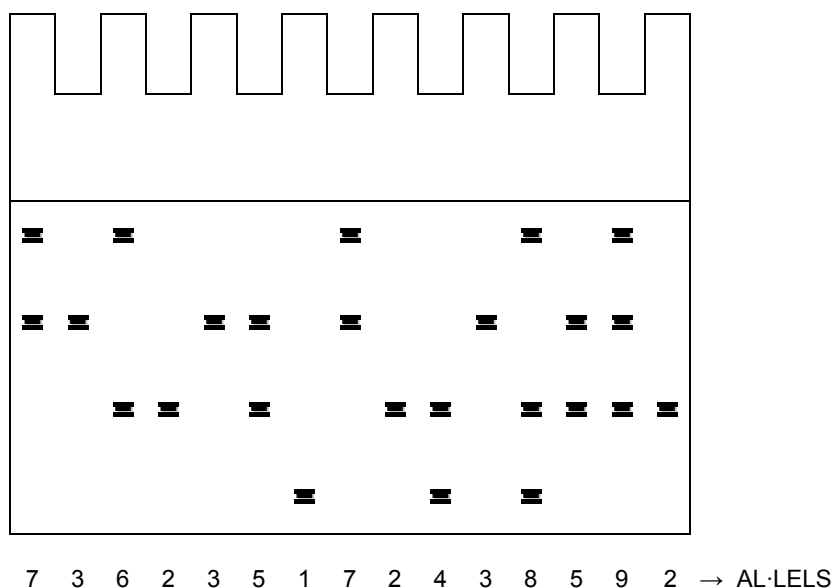
Però també un electromorf pot presentar més d'una banda; en aquest cas se segueix el mateix criteri que l'esmentat però començant a ordenar pels electromorfs que tenen una banda, després pels que en tenen dues, etc. (**Figura 15**).

L'absència d'activitat enzimàtica es considera com a **al·lel nul** i es codifica com 0. Els punts de control en la preparació d'extractes cel·lulars (apartat 3.6.2.) verifiquen aquesta absència d'activitat enzimàtica. Per una altra banda, tots els extractes van ser analitzats per duplicat, com a mínim, amb la finalitat de confirmar el seu genotipus. A la pràctica, molts extractes van ser assajats en diverses ocasions per a cada enzim estudiat, per a poder obtindre una intensitat de banda de fàcil lectura i similar en tots els extractes (ajustant el volum de mostra); ja que ni tots els extractes tenen la mateixa concentració d'un enzim determinat, ni un mateix extracte té la mateixa concentració per als diferents enzims.

**Figura 14.** Lectura de gels amb una banda d'activitat enzimàtica.



**Figura 15.** Lectura de gels amb vàries bandes d'activitat enzimàtica.



En haver analitzat tots els loci enzimàtics, s'obté un perfil al·lèlic per a cada soca. Els diferents perfils al·lèlics o **ETs** (tipus electroforètics) obtinguts són etiquetats (numerats). A partir d'aquest moment ja es podran analitzar totes les dades obtingudes.

Per a facilitar la lectura, els gels es poden aclarir amb una solució de rentat (**annex 8.4.**). Per una altra banda, la primera lectura dels gels va ser visual, mentre la comprovació es va fer mitjançant uns regles col·locats entre la base d'una carmanyola transparent on estaven els gels i un transil·luminador, de manera que es podien mesurar les distàncies amb exactitud. A més, una volta feta la lectura dels gels, aquests es poden conservar entre papers de cel·lofana assecant-los en un forn d'aire calent ("GelAir Drying System, Bio Rad").

### 3.6.6. Anàlisi de dades en la tècnica MLEE.

La diversitat genètica ( $h_j$ ) en els diferents ETs per a un locus enzimàtic ( $j$ ), o probabilitat que dues soques diferisquen en el locus  $j$ , es calcula a partir de les freqüències al·lèliques (NEI 1978, MAYNARD-SMITH i al. 1993):

$$h_j = \frac{n(1 - p_{ij}^2)}{n-1}$$

$j = 1, 2, \dots, m$ .

$p_{ij}$ : freqüència de l'al·lel  $i$  en el locus  $j$ .

$n$ : nombre de soques o ETs.

$m$ : nombre de loci analitzats.

La diversitat genètica mitjana ( $H$ ) es calcula com la mitjana aritmètica dels valors  $h_j$  per a tots els loci analitzats. A partir del perfil d'al·lels obtingut en els diferents ETs, es va obtenir una matriu de distàncies genètiques mitjançant el mètode UPGMA amb el programa PHYLIP (FELSENSTEIN 1993). Les distàncies genètiques entre parelles d'ETs fou calculat com els percentatges de loci amb electromorfs diferents. El coeficient de correlació cofenètica es va calcular mitjançant el programa NTSYS-pc, versió 1.80 (ROHLF 1993).

El desequilibri de lligament multilocus, basat en la distribució de no coincidències al·lèliques entre parelles d'ETs, es va determinar a partir del valor de l'índex d'associació ( $I_A$ ) (BROWN i al. 1980, MAYNARD-SMITH i al. 1993). La proporció de la variància observada en la distribució de no coincidències ( $V_o$ ) respecte de l'esperada en un equilibri de lligament [ $V_E = \sum h_j (1 - h_j)$ ], proporciona una mesura del desequilibri de lligament multilocus:

$$I_A = \frac{V_o}{V_E} - 1$$

$$SD = \frac{\sqrt{M4 - (M2)^2}}{M2}, \text{ expressió utilitzada per T.S. WHITTAM (SELANDER i al. 1986).}$$

$SD$ : desviació estàndard d' $I_A$ .

$M2$ : moment de 2n ordre respecte de la mitjana.

$M4$ : moment de 4t ordre respecte de la mitjana.

$n$ : nombre d'ETs o soques.

En poblacions en equilibri de lligament,  $V_O$  és igual a  $V_E$  i, per tant,  $I_A$  tindrà un valor de zero (BROWN i al. 1980, MAYNARD-SMITH i al. 1993). Mitjançant un test de Monte Carlo amb 10.000 remostratges a l'atzar, es va comprovar si  $I_A$  diferia significativament del seu valor esperat de zero (o si  $V_O / V_E$  diferia significativament d'1). Es van generar mostres a l'atzar, amb reemplaçament i de la mateixa grandària que la de les dades originals, d'acord amb les freqüències al·lèliques de cada locus (GORDON 1997, FARFÁN i al. 2000).

Per als càlculs de la diversitat genètica, de les variàncies, de l'índex d'associació i del test de Monte Carlo es van fer servir programes escrits per T.S. WHITTAM (SELANDER i al. 1986) i J.G. LORÉN (FUSTÉ i al. 1996).



## 4. RESULTATS

---



#### 4.1. Soques seleccionades i *Aeromonas* aïllades.

Un total de **1597 soques** van ser **seleccionades**, de les quals **199 (12 %)** pertanyen al gènere ***Aeromonas***. A la **Taula 11** es pot observar la distribució de les soques seleccionades per medi de cultiu i tipus de mostra. A partir de les diferents mostres de mol·luscs es van seleccionar 1221 soques, mentre 127 procedeixen de les mostres d'aigua dolça i 249 de les d'aigua de mar. El nombre de soques seleccionades en els medis AD i TCBS va ser similar (602 i 646 respectivament), però menor en el medi ADA (335 soques) i ocasional en el TSA (únicament 14 soques). La majoria de les colònies escollides a partir dels medis AD i ADA provenen de la mateixa dilució, fet que va decidir el no emprar el medi ADA en els últims dos mostratges.

A la **Taula 12** es detallen totes les soques d'*Aeromonas* aïllades, també distribuïdes per medi de cultiu i tipus de mostra. De les **199 soques aïllades**, **111** provenen de les mostres **d'aigua dolça** i **88** de les mostres **de mol·luscs**. Cap *Aeromonas* no es va poder aïllar a partir de les mostres de musclos de roca, rossellones i aigua de mar. Per una altra banda, la majoria de les *Aeromonas* van ser aïllades en els medis AD i ADA (190 soques), i únicament l'1 % (8/646) de les soques seleccionades en TCBS pertanyen al gènere *Aeromonas*, sis de 13 (46 %) a partir de mostres d'aigua dolça i dues de 512 (0,4 %) a partir dels diferents mol·luscs (Taula 11, Taula 12). A més, totes aquestes soques aïllades en TCBS provenen d'un enriquiment previ (Taula 12).

Taula 11. Soques seleccionades per medi de cultiu i tipus de mostra.

MOSTRES	AD			ADA			TCBS			TSA			TOTAL
	Directe*	APW	TSB	Directe*	APW	TSB	Directe*	APW	TSB	Directe*	APW	TSB	
Alcoi - Font	9	-	1	5	2	-	-	-	-	-	-	-	17
Hostalets - Bassa	4	3	-	5	3	-	-	3	2	-	-	-	20
Hostalets - Font	1	-	-	-	3	1	-	-	3	-	-	-	8
Montseny - Font 1	2	2	-	1	2	-	-	1	3	-	-	-	11
Montseny - Font 2	24	2	3	37	2	2	-	-	1	-	-	-	71
<b>Aigua dolça</b>	40 (9%)	7 (9%)	4 (6%)	48 (19%)	12 (28%)	3 (8%)	0 (0%)	4 (5%)	9 (11%)	-	-	-	127
<b>Aigua marina</b>	96 (21%)	20 (24%)	12 (18%)	-	-	-	102 (21%)	13 (16%)	6 (7%)	-	-	-	249
Cloïsses	71	3	3	3	1	6	63	5	4	1	2	2	164
Escopinyes	76	9	3	25	3	-	5	5	6	-	-	-	132
Musclos	4	5	4	2	3	7	4	3	6	7	1	1	47
Musclos de roca	37	-	4	52	1	2	13	2	2	-	-	-	113
Navaixes	50	6	9	23	3	1	82	7	14	-	-	-	195
Ostres	19	17	9	10	6	6	1	15	12	-	-	-	95
Ostres portugueses	30	8	12	35	4	2	102	14	12	-	-	-	219
Rosellones	-	2	1	1	4	4	8	2	2	-	-	-	24
Tellines	30	5	6	57	6	5	99	12	12	-	-	-	232
<b>Mol·luscs</b>	317 (70%)	55 (67%)	51 (76%)	208 (81%)	31 (72%)	33 (92%)	377 (79%)	65 (79%)	70 (82%)	8	3	3	1221
<b>TOTALS</b>	453	82	67	256	43	36	479	82	85	8	3	3	1597
		602			335			646			14		

Percentatges calculats respecte del total de soques seleccionades de la columna corresponent.

\* Directe, entès com ús del medi de cultiu sense enriquiment previ.

Taula 12 (1/2). *Aeromonas* aïllades per medi de cultiu i tipus de mostra.

MOSTRES	MEDIS	Enriquiment	SOQUES
A I G Ü E S	Font Alcoi (15)	AD (8)	NO (7) TSB (1) 110A,111A,112A,113A,115A,116A,118A 107A
		ADA (7)	NO (5) APW (2) 105A,133A,134A,147A,148A 106A,130A
	Bassa Hostalets (13)	AD (5)	NO (2) APW (3) 639A,640A 648A,649A,650A
		ADA (8)	NO (5) APW (3) 634A,635A,636A,637A,638A 651A,652A,653A
	Font Hostalets (7)	AD (1)	NO (1) 641A
		ADA (3)	APW (2) TSB (1) 645A,646A 647A
		TCBS (3)	TSB (3) 654A,655A,656A
	Font 1 Montseny (9)	AD (3)	NO (1) APW (2) 555A 623A,624A
		ADA (3)	NO (1) APW (2) 556A 621A,622A
		TCBS (3)	APW (1) TSB (2) 630A 631A,633A
	Font 2 Montseny (67)	AD (27)	NO (22) APW (2) TSB (3) 560A,561A,562A,563A,598A,599A,600A,601A, 602A,603A,604A,605A,606A,607A,608A,609A, 610A,611A,612A,613A,614A,615A 625A,626A 618A,619A,620A
		ADA (40)	NO (36) 557A,558A,559A,564A,565A,566A,567A,568A, 569A,570A,571A,572A,573A,574A,575A,576A, 577A,578A,579A,581A,582A,583A,584A,585A, 586A,587A,588A,589A,590A,591A,592A,593A, 594A,595A,596A,597A
		APW (2) 627A,628A	
		TSB (2) 616A,617A	
M O L · L U S C S	Cloïsses (10)	AD (4)	APW (2) TSB (2) 86C <sup>2</sup> ,292C <sup>4</sup> 84C <sup>2</sup> ,311C <sup>4</sup>
		ADA (3)	APW (1) TSB (2) 44C <sup>1</sup> 45C <sup>1</sup> ,89C <sup>2</sup>
		TCBS (2)	APW (2) 35C <sup>1</sup> ,83C <sup>2</sup>
		TSA (1)	APW (1) 51C <sup>1</sup>
	Escopinyes (14)	AD (4)	NO (2) APW (2) 435E <sup>4</sup> ,684E <sup>7</sup> 431E <sup>4</sup> ,868E <sup>8</sup>
		ADA (10)	NO (10) 418E <sup>4</sup> ,419E <sup>4</sup> ,420E <sup>4</sup> ,442E <sup>4</sup> ,444E <sup>4</sup> ,739E <sup>7</sup> ,818E <sup>8</sup> , 819E <sup>8</sup> ,820E <sup>8</sup> ,821E <sup>8</sup>

Entre parèntesi, el nombre de soques.

Els números en superíndex indiquen el mostratge de procedència de les soques.

Taula 12 (2/2). *Aeromonas* aïllades per medi de cultiu i tipus de mostra.

MOSTRES		MEDIS	Enriquiment	SOQUES
M O L L U S C S	Musclos (5)	AD (4)	APW (2)	92M <sup>2</sup> ,93M <sup>2</sup>
			TSB (2)	87M <sup>2</sup> ,88M <sup>2</sup>
		ADA (1)	TSB (1)	95M <sup>2</sup>
	Navaixes (32)	AD (27)	NO (27)	946N <sup>10</sup> ,947N <sup>10</sup> ,948N <sup>10</sup> ,949N <sup>10</sup> ,950N <sup>10</sup> ,951N <sup>10</sup> , 952N <sup>10</sup> ,953N <sup>10</sup> ,954N <sup>10</sup> ,955N <sup>10</sup> ,956N <sup>10</sup> ,958N <sup>10</sup> , 962N <sup>10</sup> ,963N <sup>10</sup> ,964N <sup>10</sup> ,965N <sup>10</sup> ,966N <sup>10</sup> ,967N <sup>10</sup> , 968N <sup>10</sup> ,970N <sup>10</sup> ,971N <sup>10</sup> ,972N <sup>10</sup> ,991N <sup>10</sup> , 1020N <sup>10</sup> ,1021N <sup>10</sup> ,1022N <sup>10</sup> ,1023N <sup>10</sup>
		ADA (5)	NO (4)	664N <sup>7</sup> ,665N <sup>7</sup> ,668N <sup>7</sup> ,670N <sup>7</sup>
			APW (1)	869N <sup>8</sup>
Ostres (2)	AD (1)	NO (1)	924O <sup>9</sup>	
	ADA (1)	NO (1)	896O <sup>9</sup>	
Ostres portugueses (12)	AD (1)	NO (1)	723OP <sup>7</sup>	
	ADA (11)	NO (10)	705OP <sup>7</sup> ,706OP <sup>7</sup> ,707OP <sup>7</sup> ,709OP <sup>7</sup> ,710OP <sup>7</sup> , 711OP <sup>7</sup> ,712OP <sup>7</sup> ,713OP <sup>7</sup> ,714OP <sup>7</sup> ,715OP <sup>7</sup>	
		APW (1)	733OP <sup>7</sup>	
Tellines (13)	AD (2)	NO (2)	290T <sup>4</sup> ,912T <sup>9</sup>	
	ADA (11)	NO (7)	276T <sup>4</sup> ,278T <sup>4</sup> ,284T <sup>4</sup> ,848T <sup>8</sup> ,849T <sup>8</sup> ,852T <sup>8</sup> ,856T <sup>8</sup>	
		APW (4)	899T <sup>9</sup> ,900T <sup>9</sup> ,901T <sup>9</sup> ,902T <sup>9</sup>	
<b>TOTAL (199)</b>		AD (87)	NO (66)	
			APW (13)	
			TSB (8)	
		ADA (103)	NO (79)	
			APW (18)	
			TSB (6)	
	TCBS (8)	APW (3)		
		TSB (5)		
	TSA (1)	APW (1)		

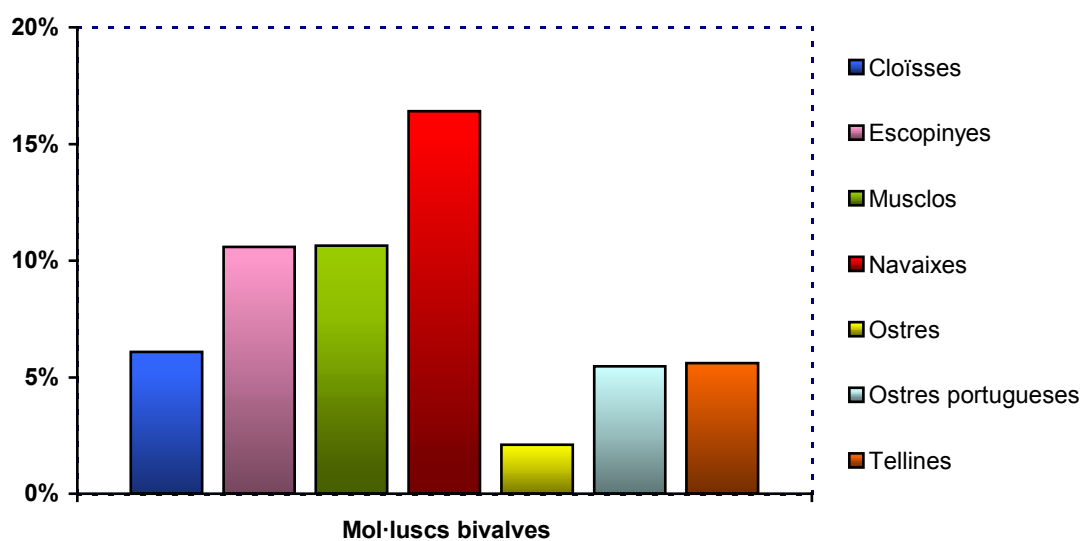
Entre parèntesi, el nombre de soques.

Els números en superíndex indiquen el mostratge de procedència de les soques.

Els **percentatges d'*Aeromonas* aïllades** respecte de les soques seleccionades no va ser gens uniforme en considerar-se la procedència d'aquestes soques (**Taula 13**). Així, les *Aeromonas* aïllades a partir de mostres d'**aigua dolça** van representar un elevat percentatge de les soques seleccionades (**87 %**), en canvi aquest percentatge va ser baix en els **mol·luscs bivalves** (**7 %**) i nul en les mostres d'aigua de mar. Els percentatges més elevats van correspondre a la font 2 del Montseny (94 %) en les mostres d'aigua dolça i a les navaixes (16 %), escopinyes (11 %) i musclos (11 %) en les mostres de mol·luscs bivalves (**Taula 13, Figura 16**).

El medi de cultiu amb **major eficàcia** en l'aïllament d'*Aeromonas* va ser el medi **ADA**, tant a partir de les mostres d'aigua dolça (97 %) com de les mostres de mol·luscs (15 %), seguit del medi AD (86 % en aigües dolces i 10 % en mol·luscs). L'eficàcia de l'ADA va ser similar quan es feren enriquiments previs amb APW i TSB de les aigües dolces, en canvi, mentre l'enriquiment previ amb TSB disminuïa l'eficàcia (9 %), l'APW augmentava clarament l'eficàcia del medi ADA en els mol·luscs (23 %) encara que no en totes les espècies analitzades (**Taula 13**).

**Figura 16.** Percentatges d'*Aeromonas* aïllades en mol·luscs bivalves.



Taula 13. Percentatges d' Aeromonas aïllades per tipus de mostra en els medis AD i ADA.

MOSTRES	TOTAL	AD			ADA				
		Directe*	APW	TSB	Total	Directe*	APW	TSB	Total
Alcol - Font	88%	78%	-	100%	80%	100%	100%	-	100%
Hostalets - Bassa	65%	50%	100%	-	71%	100%	100%	-	100%
Hostalets - Font	88%	100%	-	-	100%	-	67%	100%	75%
Montserrat - Font 1	82%	50%	100%	-	75%	100%	100%	-	100%
Montserrat - Font 2	94%	92%	100%	100%	93%	100%	100%	100%	98%
<b>Aigua dolça</b>	<b>87%</b>	<b>83%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>86%</b>	<b>92%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>97%</b>
Cloïsses	6%	0%	67%	67%	5%	100%	33%	30%	
Escopinyes	11%	3%	22%	0%	5%	40%	-	36%	
Musclos	11%	0%	40%	50%	31%	0%	14%	8%	
Musclos de roca	0%	0%	-	0%	0%	0%	0%	0%	
Navaixes	16%	54%	0%	0%	42%	17%	33%	19%	
Ostres	2%	5%	0%	0%	2%	10%	0%	5%	
Ostres portugueses	5%	3%	0%	0%	2%	29%	25%	27%	
Rossellones	0%	-	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
Tellines	6%	7%	0%	0%	5%	12%	67%	16%	
<b>Mol·luscs</b>	<b>7%</b>	<b>10%</b>	<b>11%</b>	<b>8%</b>	<b>10%</b>	<b>15%</b>	<b>23%</b>	<b>9%</b>	<b>15%</b>

\* Directe, entés com ús del medi de cultiu sense enriquiment previ.



#### 4.2. Prevalència, detecció i identificació a nivell d'espècie de les *Aeromonas* aïllades.

Totes les soques d'*Aeromonas* aïllades van créixer a 36°C, per tant, totes elles són *Aeromonas* mesòfiles. A partir dels resultats de les **64** proves fenotípiques obtinguts en les soques tipus i de referència d'*Aeromonas* mesòfiles proporcionades per la CECT, es van seleccionar **16** proves fenotípiques (**Taula 14**), suficients per a la discriminació de totes les *Aeromonas* spp. descrites. A causa de no disposar de cap soca de referència d'*A. popoffii* ni de cap *A. salmonicida* mesòfila, van ser considerats els resultats obtinguts per altres autors (HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HUYS i al. 1997b, KAZNOWSKI 1998).

La majoria de les espècies van ser diferenciades per tres o més tests (**Taula 14**). Les espècies que pertanyen al complex *A. hydrophila* (*A. hydrophila* HG1, *A. bestiarum* HG2 i *A. salmonicida* HG3) van ser diferenciades en base a la fermentació de sorbitol i a la utilització de lactat com a única font de carboni i energia. *A. eucrenophila* (HG6) es distingia d'*A. caviae* (HG4) per la producció de gas a partir de glucosa i d'*A. encheleia* per les proves de la LDC i la fermentació d'arabinosa. Ara bé, la fermentació de lactosa (no inclosa a la Taula 14) també pot ser útil en la diferenciació d'aquestes dues espècies (*A. eucrenophila* en fermenta però no *A. encheleia*). La fermentació de sacarosa permetia diferenciar *A. sobria* (HG7) d'*A. jandaei* (HG9), encara que els tests de resistència a la colistina i a la polimixina, no inclosos a la Taula 14, també permeten aquesta discriminació (*A. sobria* sensible als dos antibiòtics i *A. jandaei* resistent). Per una altra banda, *A. jandaei* (HG9) va diferenciar-se d'*A. popoffii* (HG17) en base a la LDC i a l'assimilació de lactat. Per últim, la fermentació d'arabinosa i la hidròlisi de midó permetien la discriminació entre *A. sobria* (HG7) i *A. veronii* bv. *sobria* (HG8), encara que la utilització de citrat (no inclosa a la Taula 14) també pot diferenciar aquestes dues espècies (*A. sobria* assimila citrat però no *A. veronii* bv. *sobria*).

Taula 14. Proves clau per a la identificació fenotípica de les espècies d' *Aeromonas* mesòfiles.

Aeromonas spp.	Pigment marró		Indole	VP	LDC	ODC	H <sub>2</sub> S		Fermentació			Gas			Hidròlisi		Utilització Lactat
	Cys	Ara.					Manitol	Sac.	Sor.	Glucosa	Arbutina	Elastina	Esculina	Midó			
<i>A. allosaccharophila</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	
<i>A. bestiarum</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>A. caviae</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	
<i>A. encheleia</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	
<i>A. eucrenophila</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>A. hydrophila</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>A. jandaei</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
<i>A. media</i> <sup>1</sup>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>A. popoffii</i> <sup>2</sup>	-	71%	+	-	-	-	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	-	+	86%	
<i>A. salmonicida</i> <sup>3</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
<i>A. schubertii</i> <sup>1</sup>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
<i>A. sobria</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
<i>A. trota</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> <sup>1</sup>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i> <sup>1</sup>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

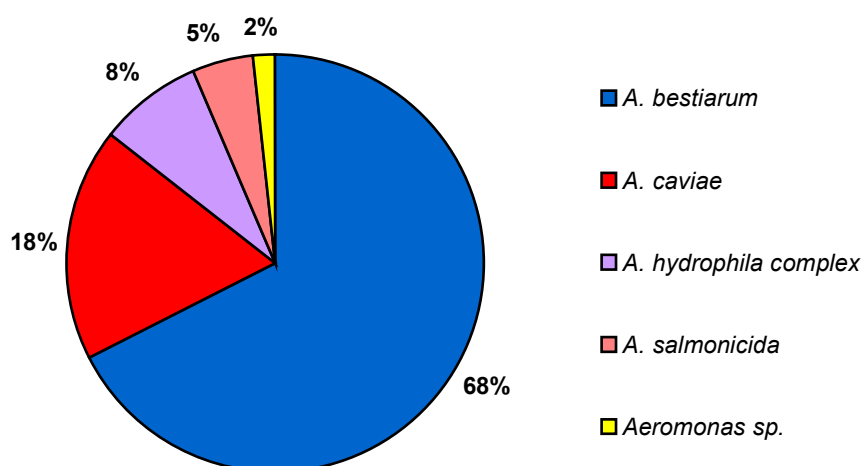
<sup>1</sup> Resultats obtinguts a partir de les soques tipus i de referència.<sup>2</sup> Dades de HUYS i al. (1997b).<sup>3</sup> Dades de HÄNNINEN i SIITONEN 1995, KAZNOWSKI 1998.

ND, no descrit.

VP, Voges-Proskauer; LDC, lisina descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa; Cys, cisteïna, Ara., arabinosa; Sac., sacarosa; Sor., sorbitol.

La distribució i **identificació** de les soques d'**Aeromonas** aïllades va ser diferent segons el tipus de mostra (**Taula 15**). En totes les mostres d'**aigua dolça** analitzades es van aïllar *Aeromonas* que van ser identificades en un elevat percentatge (**98 %**). Aquestes soques es van distribuir entre les espècies *A. bestiarum* (68 %), *A. caviae* (18 %), *A. hydrophila* complex (8 %) i *A. salmonicida* (5 %), i únicament dues soques (2 %) no van poder ser identificades perquè van deixar de ser viables (650A i 651A) (**Figura 17 i Taula 15**). L'espècie predominant variava depenent de la mostra analitzada, així *A. bestiarum* va ser l'espècie predominant en tres de les mostres, mentre *A. caviae* ho va ser en les altres dues (**Taula 15**).

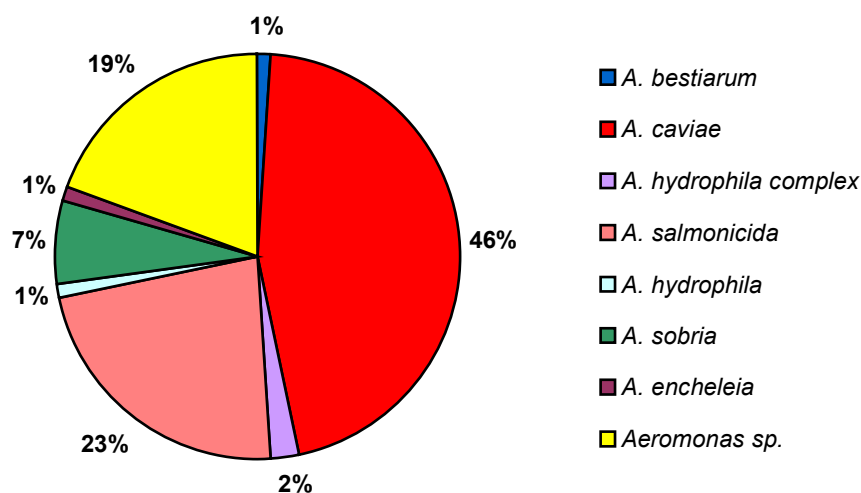
**Figura 17.** Distribució de les espècies d'*Aeromonas* aïllades en aigües dolces.



En el 60 % de les mostres de **mol·luscs bivalves** es van aïllar *Aeromonas*, encara que aquest nivell de detecció va arribar a ser molt diferent en funció de l'espècie de mol·lusc. Així, mentre en tots els mostratges d'escopinyes, navaixes i tellines es van aïllar *Aeromonas*, no se'n van detectar en cap dels mostratges de musclos de roca i rossellones. Un menor percentatge de soques **identificades** (**81 %**) i una distribució més àmplia (soques *A. encheleia*, *A. hydrophila* i *A. sobria* també s'hi van aïllar) es van trobar a partir de mol·luscs bivalves respecte de les mostres d'aigua dolça (**Taula 15**). L'espècie predominant va ser *A. caviae* (46 %), seguida d'*A. salmonicida* (23 %) i *A. sobria* (7 %) (**Figura 18**), encara que aquesta distribució d'espècies d'*Aeromonas* no va ser uniforme entre les diferents

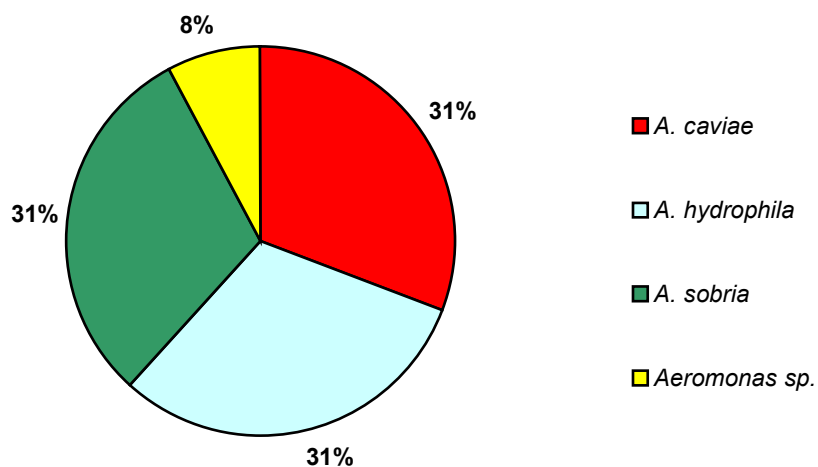
espècies de mol·luscs bivalves analitzades: *A. caviae* va ser predominant en escopinyes, navaixes i ostres; *A. salmonicida* en cloïsses, musclos i tellines; i *A. sobria* en ostres portugueses, d'on van ser aïllades totes les soques *A. sobria* (**Taula 15**).

**Figura 18.** Distribució de les espècies d'*Aeromonas* aïllades en bivalves.



De les 13 soques clíniques subministrades, es van identificar quatre *A. caviae*, quatre *A. hydrophila* i quatre *A. sobria*, mentre la soca A20C1 no va poder ser identificada (**Figura 19**). La soca d'aigua dolça proporcionada (CT812736A) va ser identificada com a *A. hydrophila*.

**Figura 19.** Distribució de les espècies d'*Aeromonas* en mostres clíniques.



Taula 15. Distribució i identificació de les *Aeromonas* aïllades per tipus de mostra.

MOSTRES	Nombre de mostres (positius)	Aeromonas spp.								
		Total	<i>A. bestiarum</i>	<i>A. caviae</i>	<i>A. encheleia</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> complex	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. sobria</i>	<i>Aeromonas</i> sp.
Alcoi - Font	1 (1)	15	1	14	-	-	-	-	-	-
Hostalets - Bassa	1 (1)	13	3	5	-	-	-	3	-	2
Hostalets - Font	1 (1)	7	3	1	-	-	-	3	-	-
Montseny - Font 1	1 (1)	9	6	-	-	-	-	2	1	-
Montseny - Font 2	1 (1)	67	62	-	-	-	-	4	1	-
<b>Aigües dolces</b>	<b>5 (5), 100%</b>	<b>111</b>	<b>75 (67,6%)</b>	<b>20 (18,0%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>9 (8,1%)</b>	<b>5 (4,5%)</b>	<b>2 (1,8%)</b>
Besós - Platja	1 (0)	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Besós - Roques	1 (0)	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Cunit	1 (0)	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Aigües marines</b>	<b>3 (0), 0%</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
Cloïsses	4 (3)	10	1	3	-	-	-	-	5	-
Escopinyes	3 (3)	14	-	9	-	-	-	-	2	3
Musclos	4 (1)	5	-	-	-	-	-	-	2	3
Musclos de roca	2 (0)	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Navaixes	3 (3)	32	-	21	-	-	-	2	6	3
Ostres portugueses	3 (1)	12	-	3	1	-	-	-	1	6
Ostres	2 (1)	2	-	1	-	-	-	-	-	1
Rosellones	1 (0)	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Tellines	3 (3)	13	-	3	-	-	1	-	4	-
<b>Mol·luscs</b>	<b>25 (15), 60%</b>	<b>88</b>	<b>1 (1,1%)</b>	<b>40 (45,5%)</b>	<b>1 (1,1%)</b>	<b>1 (1,1%)</b>	<b>1 (1,1%)</b>	<b>2 (2,3%)</b>	<b>20 (22,7%)</b>	<b>6 (6,8%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>33 (20), 61%</b>	<b>199</b>	<b>76 (38,2%)</b>	<b>60 (30,2%)</b>	<b>1 (0,5%)</b>	<b>1 (0,5%)</b>	<b>1 (0,5%)</b>	<b>11 (5,5%)</b>	<b>25 (12,6%)</b>	<b>6 (3,0%)</b>
										<b>19 (9,5%)</b>

Per tant, van ser **identificades** el **90,6%** (193/213) de les soques d'*Aeromonas* aïllades en aquest estudi (199 soques) i proporcionades (14 soques, Taula 8).

A continuació s'exposa la llista de soques aïllades en funció de la seua identificació (**Taula 14**):

**A. bestiarum** (n=76):

35C	112A	555A	557A	558A	559A
560A	561A	562A	563A	564A	565A
566A	567A	568A	571A	572A	573A
574A	575A <sup>E</sup>	576A	577A	578A <sup>E</sup>	579A <sup>E</sup>
581A <sup>E</sup>	583A	584A	585A	586A	587A <sup>E</sup>
588A <sup>E</sup>	589A	590A <sup>E</sup>	591A <sup>E</sup>	592A	593A
594A	595A	596A	597A	598A	599A
600A	601A <sup>E</sup>	602A	603A	604A <sup>E</sup>	605A <sup>E</sup>
606A	607A <sup>E</sup>	608A	609A	610A <sup>E</sup>	611A
612A	613A	614A	615A	616A	617A
618A	620A	622A	624A <sup>VP</sup>	625A	626A
627A <sup>E</sup>	630A	631A	633A	634A <sup>E</sup>	637A <sup>E</sup>
638A	641A	645A	654A		

59 soques coincideixen amb tots els resultats de les proves clau per a la identificació d'*A. bestiarum*.

<sup>E</sup>: 16 soques no hidrolitzen elastina.

<sup>VP</sup>: 1 soca va resultar negativa per a la prova Voges-Proskauer.

**A. caviae** (n=64):

84C	105A	106A <sup>Cys</sup>	107A	110A	111A <sup>Cys</sup>
113A	115A <sup>Cys</sup>	116A <sup>Cys</sup>	118A <sup>Cys</sup>	130A	133A
134A	147A	148A	276T	292C <sup>Ara</sup>	311C
418E	419E	420E <sup>Arb</sup>	435E	442E	444E
639A*	646A	648A <sup>Arb</sup>	649A <sup>Arb</sup>	652A	653A
664N	668N	684E <sup>Cys</sup>	706OP	707OP	723OP

819E	820E <sup>Esc</sup>	896O <sup>Ara</sup>	901T	902T	947N
950N	951N	952N	954N	956N	958N <sup>Sor</sup>
962N	964N <sup>Sor</sup>	965N <sup>Sor</sup>	966N	967N	968N
970N <sup>Sor</sup>	971N	972N	991N	1020N	1021N <sup>Sor</sup>
A10Cl	A15Cl	A19Cl	D2Cl		

Ara: 2 soques no fermentaren arabinosa.

Arb: 3 soques no van hidrolitzar arbutina.

Cys: la soca tipus CECT 838<sup>T</sup> i 6 soques més van produir H<sub>2</sub>S de cisteïna.

Esc: 1 soca no va hidrolitzar esculina.

Sor: 5 soques fermentaren sorbitol.

\*: 1 soca no inclosa en l'estudi taxonòmic perquè va deixar de ser viable.

El 59 % (38/64) utilitzava el lactat com a única font de carboni i energia.

#### **A. encheleia** (n=1): 705OP<sup>VP</sup>

VP: 1 soca va resultar positiva per a la prova Voges-Proskauer.

Tant la soca tipus CECT 4342<sup>T</sup> com la soca aïllada descarboxilaren lisina.

#### **A. hydrophila** (n=6):

900T <sup>Ara</sup>	A13Cl <sup>Ara</sup>	A17Cl	A23Cl	CT812736A <sup>E</sup>	D3Cl
---------------------	----------------------	-------	-------	------------------------	------

Ara: 2 soques no van fermentar arabinosa.

E: 1 soca no demostrà activitat elastasa.

#### **A. hydrophila complex** (n=11):

556A*	569A	570A*	582A*	619A*	623A*
647A*	655A*	656A*	1022N	1023N	

\*: 8 soques no incloses en l'estudi taxonòmic perquè van deixar de ser viables.

Aquestes 11 soques pertanyen al complex *A. hydrophila* (*A. bestiarum*, *A. hydrophila* o *A. salmonicida*), encara que no se'n va poder conèixer la seua identificació específica per dos motius: la fermentació del sorbitol i l'assimilació del lactat alhora (Taula 14) per part de dues soques (1022N i 1023N) i la pèrdua de viabilitat de la resta de les soques abans d'acabar l'estudi.

**A. salmonicida** (n=25):

44C	45C <sup>E</sup>	83C	86C	87M <sup>E</sup>
89C	92M <sup>VP</sup>	278T	284T	621A <sup>Cys</sup>
628A	635A	636A	640A <sup>VP</sup>	670N
715OP	818E	821E	852T	856T
946N	948N	949N	953N	955N <sup>E</sup>

<sup>E</sup>: 3 soques no van hidrolitzar elastina.

<sup>VP</sup>: la soca 640A va mostrar un resultat dubtós en la prova de Voges-Proskauer, mentre la soca 92M fou negativa.

<sup>Cys</sup>: 1 soca no va produir H<sub>2</sub>S de cisteïna.

**A. sobria** (n=10):

710OP	711OP	712OP	713OP	714OP
733OP <sup>Ara</sup>	A14Cl	A18Cl	A22Cl <sup>Ara</sup>	A24Cl

<sup>Ara</sup>: 2 soques van fermentar arabinosa.

**Aeromonas sp.** (n=20):

51C	88M	93M	95M	290T
431E	650A*	651A*	665N	709OP
739E	848T	849T	868E	869N
899T	912T	924O	963N	A20Cl



- \*: 2 soques no incloses en l'estudi taxonòmic perquè van deixar de ser viables, tampoc no van poder ser identificades pel mateix motiu.

### 4.3. Estudi taxonòmic.

#### 4.3.1. Característiques fenotípiques de les soques incloses en l'estudi taxonòmic.

**220 soques** van ser incloses en l'estudi taxonòmic:

188 soques d'*Aeromonas* aïllades (veure l'apartat anterior).

13 soques clíniques proporcionades (Taula 8).

1 soca ambiental proporcionada (Taula 8).

18 soques tipus o de referència proporcionades per la CECT (Taula 7).

**64 característiques fenotípiques** van ser assajades en cadascuna de les 220 soques (apartat 3.4.).

Totes les soques d'*Aeromonas* tenien forma de bacil o coc-bacil i foren **positives** per a les següents proves: oxidasa; creixement en agar AD; creixement a 25°C i a 36°C (excepte *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>); fermentació de manitol (excepte *A. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup>); O/F; reducció de nitrats; resistència a l'O/129 i tolerància al pH 9 i al 0 %, 1 % i 3 % de NaCl. Per contra, totes foren **negatives** a les següents proves: Gram; hidròlisi d'urea i de xantina; mobilitat *swarming* i tolerància al 9 % de NaCl. Els resultats de les altres proves es presenten a la **Taula 16**.

Els resultats van ser codificats en sistema binari per a poder treballar a continuació amb el programa NTSYS®.

**Taula 16** (1/2). Característiques dels *phena* i de les soques no agrupades.

<i>Phena</i> o soques	I	Ia	Ib	Ic	Id	II	III	IV	IVa	IVb	V
Núm. soques	113	80	17	11	5	2	13	65	40	25	2
Mobilitat	+					+	+	89	83	+	+
Pigment marró	-					-	-	-			-
Catalasa	99	+	+	91	+	+	+	+			+
Gas-glucosa	99	+	94	+	+	+	+	2	-	4	+
ONPG	+					+	+	97	95	+	+
Roig Metil	68	81	41	36	20	50	31	+			+
Voges-Proskauer	96	+	82	91	+	50	+	-			+
ADH	+					+	+	65	70	56	+
LDC	+					+	+	2	-	4	+
ODC	-					-	-	-			-
Producció:											
Indole	99	+	94	+	+	+	+	98	98	+	+
H <sub>2</sub> S-Tiosulfat	93	99	76	73	+	+	+	42	15	84	50
H <sub>2</sub> S-Cisteïna	99	+	94	+	+	+	+	15	3	36	-
Creixement:											
6 % NaCl	1	1	-	-	-	-	-	5	8	-	-
4°C	96	+	+	+	20	+	+	95	95	96	+
45°C	7	9	-	-	20	+	-	5	5	4	-
Mc Conkey	99	99	+	+	+	+	+	+			+
TCBS	99	99	+	+	+	+	92	68	53	92	+
pH 4,5	1	1	-	-	-	-	-	-			-
Hidròlisi:											
Arbutina	+					+	-	95	98	92	+
DNA	+					+	+	98	98	+	+
Elastina	82	79	88	91	+	-	-	-			-
Eritròcits	93	99	65	91	+	50	92	17	20	12	-
Esculina	+					+	8	98	98	+	+
Midó	+					+	+	+			+
Fermentació:											
Arabinosa	98	+	+	+	60	-	23	98	98	+	+
Dextrina	99	+	+	91	+	+	+	+			+
Lactosa	9	-	18	64	-	-	15	75	80	68	+
Manosa	+					+	+	91	85	+	+
Sacarosa	+					+	92	+			+
Salicina	88	89	82	82	+	+	8	94	95	92	+
Sorbitol	25	8	71	91	-	-	-	8	13	-	-
Assimilació:											
Acetat	98	+	94	+	80	50	85	95	98	92	+
Arabinosa	97	+	+	+	40	-	15	97	95	+	+
Arginina	99	+	94	+	+	+	+	+			+
Citrat	73	70	82	82	80	-	85	66	83	40	+
Histidina	+					+	+	+			+
Lactat	8	1	-	27	+	-	8	58	95	-	50
Manitol	+					+	+	98	98	+	+
Resistència:											
Ampicil·lina	+					+	92	98	98	+	+
Cefalotina	+					50	15	92	88	+	+
Colistina	58	79	-	18	20	-	8	2	-	4	-
Estreptomicina	50	48	82	-	80	-	46	43	33	60	-
Polimixina B	48	64	-	18	20	-	8	-			-
Tetraciclina	1	-	6	-	-	-	-	3	5	-	-

+: totes les soques positives, -: totes les soques negatives; els números indiquen percentatge de soques positives.

Taula 16 (2/2). Característiques dels *phena* i de les soques no agrupades.

<i>Phena</i> o soques	VI	VII	VIII	95M	290T	292C	899T	912T	924O	A15CI
Núm. soques	5	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Mobilitat	+	50	+	+	+	+	+	+	+	-
Pigment marró	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gas-glucosa	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Roig Metil	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
ADH	60	+	+	-	-	+	+	-	+	+
LDC	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Producció:										
Indole	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
H <sub>2</sub> S-Tiosulfat	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
H <sub>2</sub> S-Cisteïna	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Creixement:										
6 % NaCl	-	+	50	+	+	+	-	+	-	-
4°C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
45°C	-	50	+	+	-	-	-	-	-	-
Mac Conkey	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TCBS	80	+	+	-	-	+	+	+	+	+
pH 4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidròlisi:										
Arbutina	+	+	50	+	+	+	+	-	-	+
DNA	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Elastina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Eritròcits	40	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Midó	40	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Fermentació:										
Arabinosa	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Dextrina	40	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Manosa	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	20	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Assimilació:										
Acetat	80	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Arabinosa	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Citrat	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Histidina	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lactat	40	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Resistència:										
Ampicil·lina	80	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Cefalotina	60	50	+	+	+	+	+	+	-	-
Colistina	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Estreptomicina	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Polimixina B	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Tetraciclina	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

+: totes les soques positives, -: totes les soques negatives; els números indiquen percentatge de soques positives.

#### 4.3.2. Estructura del dendrograma.

El **dendrograma** obtingut amb el programa NTSYS® es presenta en la **Figura 20** i el **dendrograma simplificat** amb el programa Power Point de Microsoft® en la **Figura 21**.

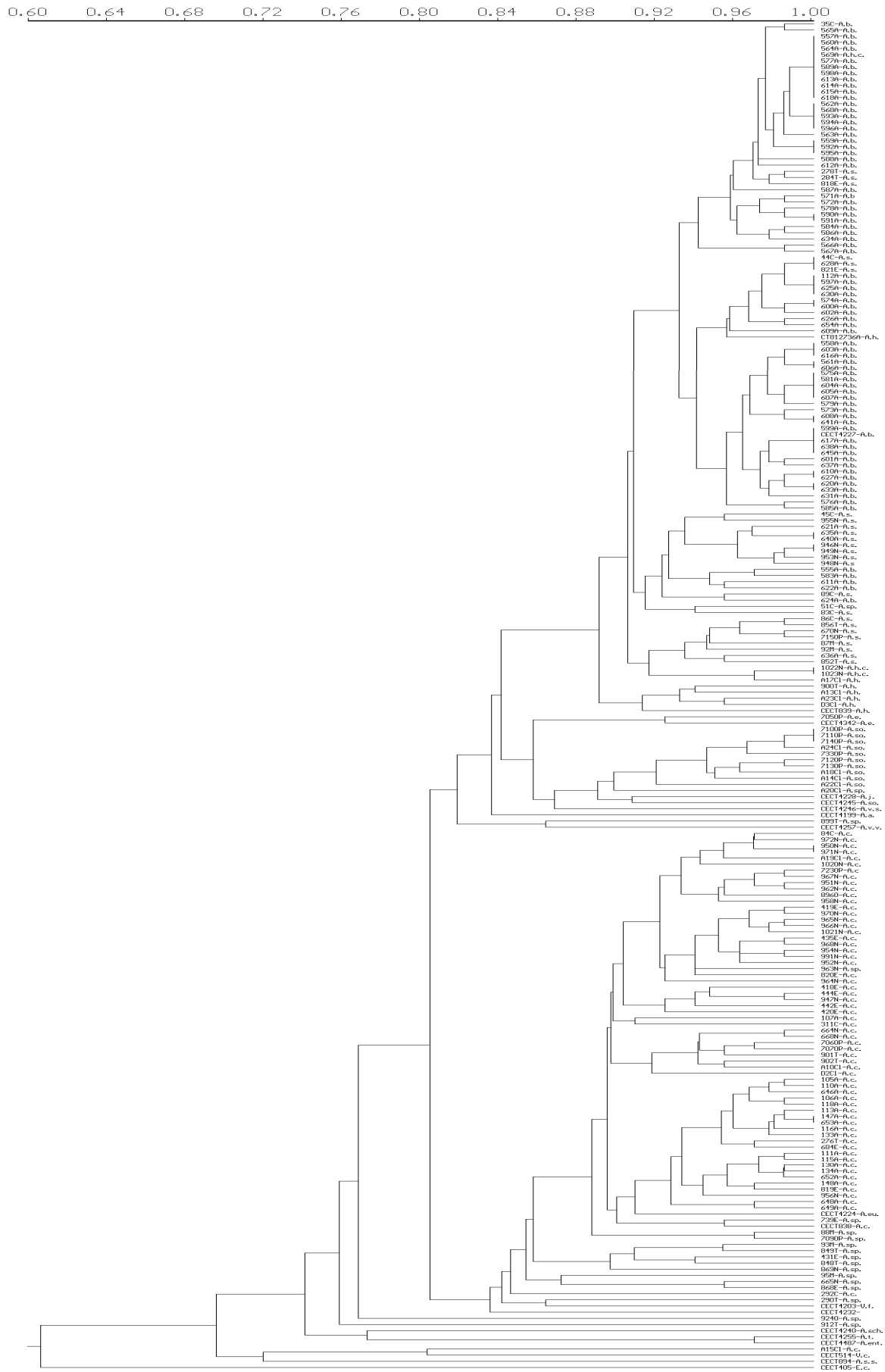
Al **89 % S<sub>SM</sub>** van ser definides huit agrupacions (**I-VIII**) amb dues o més soques cadascuna, mentre 16 soques van romandre sense agrupar (**Figura 21**).

El **phenon I**, definit al 89 % S<sub>SM</sub>, contenia 113 soques, incloent-hi les soques tipus *A. hydrophila* CECT839<sup>T</sup> i *A. bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>. Totes les soques pertanyien al complex *A. hydrophila*, excepte la soca *Aeromonas* sp. 51C (Figura 20, Figura 21). Les característiques fenotípiques del *phenon* I foren consistents amb la descripció d'**A. hydrophila** feta per POPOFF (1984), excepte la fermentació de salicina (el 12 % de les soques no en va fermentar) (Taula 16).

Aquest *phenon* es va dividir en **quatre subgrups** (Figura 21), amb la fermentació de sorbitol i l'assimilació de lactat com a principals diferències entre ells (Taula 16). Aquesta diferenciació fenotípica va permetre associar el subgrup **Ia** amb l'espècie **A. bestiarum** (HG2), els subgrups **Ib** i **Ic** amb **A. salmonicida** (HG3) i el subgrup **Id** amb **A. hydrophila** (HG1). A més, el 94 % de les soques *A. bestiarum* es va agrupar en Ia, el 76 % de les *A. salmonicida* mesòfiles en Ib i Ic, i el 71% de les *A. hydrophila* en Id (Figura 21).

El subgrup majoritari del *phenon* I fou l'**Ia** amb 80 soques: 72 *A. bestiarum* (CECT 4227<sup>T</sup> inclosa), sis *A. salmonicida* (44C, 278T, 284T, 628A, 818E i 821E), una *A. hydrophila* (CT812736A) i una *A. hydrophila* complex (569A). El subgrup **Ib**, amb 17 soques, estava format per 11 *A. salmonicida*, cinc *A. bestiarum* (555A, 583A, 611A, 622A i 624A) i una *Aeromonas* sp (51C). El subgrup **Ic** incloïa 11 soques, amb huit *A. salmonicida*, dues *A. hydrophila* complex (1022N i 1023N) i una *A. hydrophila* (A17Cl). Per últim, el subgrup **Id** agrupava cinc soques *A. hydrophila* (CECT 839<sup>T</sup> inclosa) (Figura 20, Figura 21, Taula 16).

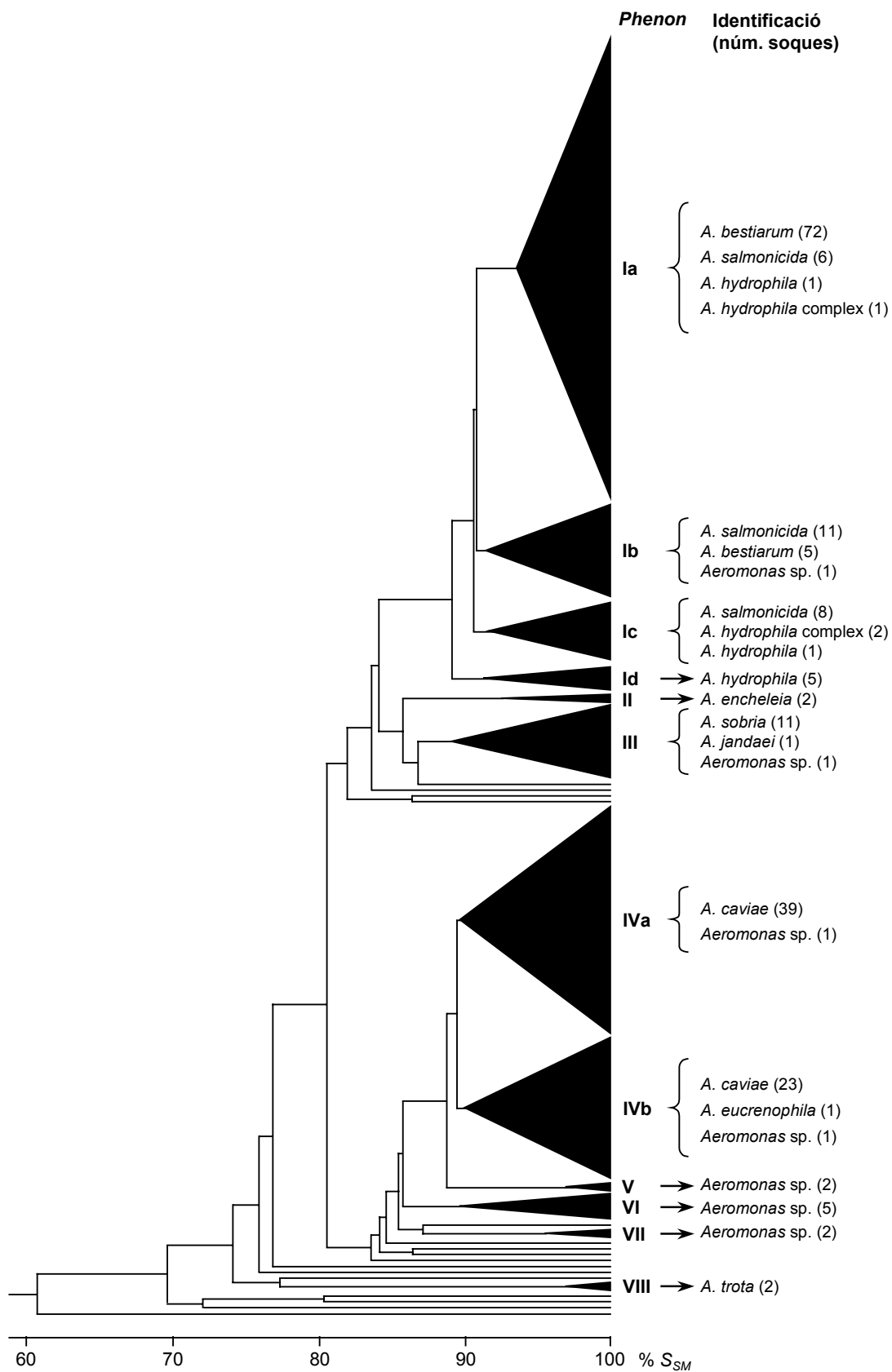
Figura 20. Dendrograma de la taxonomia numèrica del gènere *Aeromonas* obtingut amb el programa NTSYS®.



A.a.: *A. allosaccharophila*, A.b.: *A. bestiarum*, A.c.: *A. caviae*, A.e.: *A. encheleia*, A.ent.: *A. enteropelogenes*, A.eu.: *A. eucrenophila*, A.h.: *A. hydrophila*, A.h.c.: *A. hydrophila* complex, A.j.: *A. jandaei*, A.m.: *A. media*, A.s.: *A. salmonicida*, A.sch.: *A. schubertii*, A.so.: *A. sobria*, A.sp.: *Aeromonas* sp., A.s.s.: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, A.t.: *A. trota*, A.v.s.: *A. veronii* bv. *sobria*, A.v.v.: *A. veronii* bv. *veronii*, E.c.: *Escherichia coli*, V.c.: *Vibrio cholerae*, V.f.: *Vibrio furnissii*.



Figura 21. Dendrograma simplificat amb els huit *phena* obtinguts al 89 %  $S_{SM}$ .



El **phenon II**, definit al 92 %  $S_{SM}$ , incloïa dues soques, la 705OP i la soca tipus CECT 4342<sup>T</sup>, totes dues amb les característiques descrites per a l'espècie **A. encheleia** (ESTEVE i al. 1995c), excepte en la resposta positiva en la LDC i en l'assimilació d'arginina (Figura 20, Figura 21, Taula 16).

El **phenon III**, definit al 89 %  $S_{SM}$ , contenia 13 soques, 11 *A. sobria* (CECT 4245<sup>T</sup> inclosa), una *Aeromonas* sp (A20Cl) i l'*A. jandaei* CECT 4228<sup>T</sup> (Figura 20, Figura 21). Aquest *phenon* es va associar amb l'espècie **A. sobria**, ja que les soques *A. sobria* foren majoritàries i mostraren les característiques descrites per a aquesta espècie (POPOFF 1984), excepte per l'assimilació d'arginina i d'histidina i la utilització d'arabinosa pel 18 % d'aquestes soques (inclosa l'espècie tipus) (Taula 16). Totes les soques *A. sobria* hidrolitzaren midó i la majoria van utilitzar citrat (10/11) però no fermentaren arabinosa (9/11) (Taula 16). La soca tipus CECT 4228<sup>T</sup> va coincidir amb la descripció d'*A. jandaei* (CARNAHAN i al. 1991a).

La soca **899T**, la soca de referència **A. veronii** bv. **sobria** (CECT 4246) i les soques tipus **A. allosaccharophila** CECT 4199<sup>T</sup> i **A. veronii** bv. **veronii** CECT 4257<sup>T</sup> van quedar situades **entre** els **phena III i IV** (Figura 20, Figura 21). El perfil fenotípic de la 899T no va permetre la seua identificació dins del gènere *Aeromonas* (Taula 14, Taula 16). La CECT 4246, soca de referència d'*A. veronii* bv. *sobria*, va fermentar arabinosa, però ni hidrolitzà midó ni assimilà citrat. La CECT 4199<sup>T</sup> presentà les característiques descrites per a *A. allosaccharophila* (MARTÍNEZ-MURCIA i al. 1992b), excepte en la prova d'hidròlisi de midó (Taula 14). La CECT 4257<sup>T</sup> seguia fidelment la descripció d'*A. veronii* bv. *veronii* (HICKMAN-BRENNER i al. 1987).

El **phenon IV**, definit al 89 %  $S_{SM}$ , estava format per 65 soques, amb les soques tipus *A. caviae* CECT 838<sup>T</sup> i *A. eucrenophila* CECT 4224<sup>T</sup> entre elles (Figura 20, Figura 21). La soca CECT 4224<sup>T</sup> va coincidir amb la descripció d'*A. eucrenophila* (SCHUBERT i HEGAZI 1988), excepte amb la hidròlisi d'arbutina i elastina (Taula 14). Dues soques (963N i 739E) no van poder ser identificades a nivell d'espècie. La resta de soques



s'identificaren com a *A. caviae* (Taula 14) (POPOFF 1984), encara que el 65 % fou ADH positiu, l'11 % produí H<sub>2</sub>S de cisteïna (també la CECT 838<sup>T</sup>) i el 40 % no assimilà lactat (inclosa la soca tipus). Així, el *phenon* IV es va associar amb l'espècie ***A. caviae***.

Aquest *phenon* es va dividir en **dos subgrups** (Figura 21), el **IVa** amb 40 soques i el **IVb** amb 25 soques (incloses les dues soques tipus). La principal diferència entre els dos subgrups fou la utilització de lactat (Taula 16). A més, les soques del *phenon* IV aïllades de **mol·luscs** (41 soques) es van agrupar principalment en el subgrup **IVa** (36 soques), mentre 18 de les 19 soques d'**aigua dolça** s'agruparen en el subgrup **IVb** (Taula 17).

El ***phenon V***, definit al 97 % *S<sub>SM</sub>*, incloïa únicament dues soques (88M i 709OP) (Figura 20, Figura 21), cap d'elles **no** va poder ser **identificada** a nivell d'espècie (Taula 14). Les característiques fenotípiques d'aquest *phenon* es mostren a la Taula 16.

El ***phenon VI***, definit al 90 % *S<sub>SM</sub>*, estava format per cinc soques ***Aeromonas sp.*** (93M, 431E, 848T, 849T i 869N) (Figura 20, Figura 21), amb resultat negatiu en la prova de l'indole com a principal característica (Taula 14, Taula 16).

La soca **95M**, localitzada **entre** els *phena VI i VII* (Figura 20, Figura 21), no va poder ser identificada a nivell d'espècie per presentar característiques bioquímiques atípiques com foren el creixement al 6 % NaCl, la resistència a la tetraciclina i els resultats negatius en les proves de fermentació de dextrina i d'hidròlisi de midó (Taula 14, Taula 16).

El ***phenon VII***, definit al 95 % *S<sub>SM</sub>*, presentava dues ***Aeromonas sp.*** (665N i 868E) (Figura 20, Figura 21) que cresqueren al 6 % NaCl però no fermentaren manosa (Taula 14, Taula 16).

Les set soques no agrupades que es van distribuir **entre** els *phena VII i VIII* foren (Figura 20, Figura 21): les soques tipus ***A. media*** CECT 4232<sup>T</sup>, ***A. schubertii*** CECT 4240<sup>T</sup> i ***V. furnissii*** CECT 4203<sup>T</sup>, tres

*Aeromonas* sp. (290T, 912T i 924O) i una *A. caviae* (292C). En general, la soca CECT 4232<sup>T</sup> estava d'acord amb la descripció d'*A. media* (ALLEN i al. 1983), però va presentar mobilitat i resultats negatius en l'ADH i l'ONPG. En canvi, la CECT 4240<sup>T</sup> presentava totes les característiques típiques d' *A. schubertii* (HICKMAN-BRENNER i al. 1988). Les característiques fenotípiques de les soques *Aeromonas* sp. i *A. caviae* es poden consultar a la Taula 16.

El **phenon VIII**, definit al 97 %  $S_{SM}$ , estava format per les soques tipus *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup> i *A. enteropelogenes* CECT 4487<sup>T</sup> (Figura 20, Figura 21), totes dues coincidents amb la descripció d'**A. trota** (CARNAHAN i al. 1991b). Aquestes soques tipus només es van diferenciar en dues característiques: *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup> va créixer al 6 % NaCl i va hidrolitzar arbutina, al contrari que *A. enteropelogenes* CECT 4487<sup>T</sup>.

Més enllà del *phenon* VIII es van situar les quatre soques següents (Figura 20, Figura 21): la soca A15Cl sensible a l'ampicil·lina (Taula 16) i identificada com a *A. caviae* (Taula 14); la soca tipus *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>, d'acord amb la descripció d'aquesta subespècie (POPOFF 1984) excepte pel resultat positiu en la utilització d'histidina i pels resultats negatius de la  $\beta$ -hemòlisi i de l'assimilació d'arabinosa; la soca tipus *V. cholerae* CECT 514<sup>T</sup> i la soca de referència *E. coli* CECT 405.

En considerar-se la **font d'aïllament** de les soques en l'estructura del dendrograma (**Taula 17**) es pot observar que totes les soques aïllades d'**aigua dolça** (101) es van distribuir en els **phena I** (82) i **IV** (19). En el *phenon* I, la majoria es trobaven en el subgrup **Ia** (73), principalment aïllades de la font 2 del Montseny (62), i cap en l'Id. En el *phenon* IV, la majoria es trobaven en el subgrup **IVb** (18), les quals foren aïllades principalment del Preventori d'Alcoi (13) (Taula 17).

Les 88 soques aïllades de **mol·luscs bivalves** es van distribuir per tots els *phena*, excepte el *phenon* VIII (Taula 17). Ara bé, la majoria d'aquestes soques es van localitzar en els *phena IV* (41, 36 en el **IVa**) i **I** (25). Finalment, cal remarcar també que els *phena* (**V, VI i VII**) que no

van poder associar-se amb cap espècie d'*Aeromonas*, estaven formats **únicament** per soques aïllades **de mol·luscs bivalves** (Taula 17, Figura 21).

#### 4.3.3. Coefficient de correlació cofenètica ( $r$ ).

El valor del coeficient de correlació cofenètica ( $r$ ), entre la matriu de similitud i la matriu cofenètica derivada del dendrograma, fou **0,88**. Aquest valor indica una bona correlació entre totes dues matrius (SNEATH i SOKAL 1973).

#### 4.3.4. Test de reproductibilitat.

La probabilitat mitjana ( $p$ ) d'un resultat erroni fou 0,67%, calculat a partir de la variància acumulada ( $S^2 = 0.0067$ ) de les estimacions de resultat erroni per a cada prova en les soques duplicades. Tots els valors de la  $S_i^2$  foren menors de 0,1. Aquests valors són acceptables, d'acord amb el criteri d'SNEATH i JOHNSON (1972).

Taula 17. Distribució de les soques per tipus de mostres i *phena*.

MOSTRA	Ph. I			Ph. II		Ph. III		Ph. IV		Ph. V	Ph. VI	Ph. VII	Ph. VIII	Soques no agrupades	TOTAL
	Ia	Ib	Ic	Id	Total	Ph. II Total	Ph. III Total	IVa	IVb						
Alcoi - Font	1	-	-	-	1	-	-	1	13	14	-	-	-	-	15
Hostalets - Bassa	3	2	1	-	6	-	-	-	4	4	-	-	-	-	10
Hostalets - Font	3	-	-	-	3	-	-	-	1	1	-	-	-	-	4
Montseny - Font 1	3	4	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Montseny - Font 2	62	2	-	-	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64
CT812736A	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Aigües dolces</b>	73	8	1	-	82	-	-	1	18	19	-	-	-	-	101
<b>CECT</b>	1	-	-	1	2	1	2	-	2	2	-	-	2	9	18
<b>Cliniques</b>	-	-	1	3	4	-	5	3	-	3	-	-	-	1	13
Cloïsses	2	4	1	-	7	-	-	2	-	2	-	-	-	1	10
Escopinyes	2	-	-	-	2	-	-	7	3	10	-	1	1	-	14
Musclos	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	1	1	-	1	5
Ostres	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1	2
Ostres portugueses	-	-	1	-	1	1	6	3	-	3	1	-	-	-	12
Navaixes	-	5	3	-	8	-	-	21	1	22	-	1	1	-	32
Tellines	2	-	2	1	5	-	-	2	1	3	-	2	-	3	13
<b>Mol·luscs</b>	6	9	9	1	25	1	6	36	5	41	2	5	2	6	88
<b>TOTAL</b>	80	17	11	5	113	2	13	40	25	65	2	5	2	16	220

Ph., *phenon*.

#### 4.4. Marcadors fenotípics de patogenicitat.

De les 64 característiques fenotípiques, dues d'elles són marcadors fenotípics de patogenicitat: la producció de **β-hemòlisi** i d'**elastasa**. De les 217 soques d'*Aeromonas* assajades, 135 foren hemolítiques (62 %), 95 foren elastolítiques (44 %) i 86 van presentar totes dues activitats (40 %) (**Taula 18**).

L'**activitat β-hemolítica** es va demostrar en la majoria de les soques de les espècies que pertanyen als **complexos *A. hydrophila*** (*A. hydrophila*, *A. bestiarum* i *A. salmonicida*) i ***A. sobria*** (*A. sobria*, *A. veronii* bv. *sobria* i *A. jandaei*, *A. trota*), en les soques tipus d'***A. eucrenophila*** i ***A. veronii* bv. *veronii***, en una soca *A. encheleia* i en algunes soques *A. caviae* (14 %) i *Aeromonas* sp. (28 %) (**Taula 18**).

En canvi, l'**activitat elastolítica** només es va demostrar en la majoria de soques pertanyents al **complex *A. hydrophila*** i en dues soques *Aeromonas* sp. Resultats similars es van obtenir quan es van considerar les dues activitats conjuntament (**Taula 18**).

**Taula 18.** Marcadors fenotípics de patogenicitat.

<b><i>Aeromonas</i> spp.</b>	<b>Soques</b>	<b>β-hemòlisi</b>		<b>Elastasa</b>		<b>β-hemòlisi + Elastasa</b>	
<i>A. allosaccharophila</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%
<i>A. bestiarum</i>	77	72	94%	61	79%	56	73%
<i>A. caviae</i>	64	9	14%	0	0%	0	0%
<i>A. encheleia</i>	2	1	50%	0	0%	0	0%
<i>A. eucrenophila</i>	1	1	100%	0	0%	0	0%
<i>A. hydrophila</i>	7	7	100%	6	86%	6	86%
<i>A. hydrophila</i> complex	3	3	100%	3	100%	3	100%
<i>A. jandaei</i>	1	1	100%	0	0%	0	0%
<i>A. media</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%
<i>A. salmonicida</i>	26	22	85%	23	88%	20	77%
<i>A. schubertii</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%
<i>A. sobria</i>	11	10	91%	0	0%	0	0%
<i>A. trota</i>	2	2	100%	0	0%	0	0%
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	1	1	100%	0	0%	0	0%
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	1	1	100%	0	0%	0	0%
<i>Aeromonas</i> sp.	18	5	28%	2	11%	1	6%
<b>TOTAL</b>	<b>217</b>	<b>135</b>	<b>62%</b>	<b>95</b>	<b>44%</b>	<b>86</b>	<b>40%</b>

#### 4.5. Estudi de diversitat genètica i estructura poblacional.

##### 4.5.1. Extractes cel·lulars i enzims.

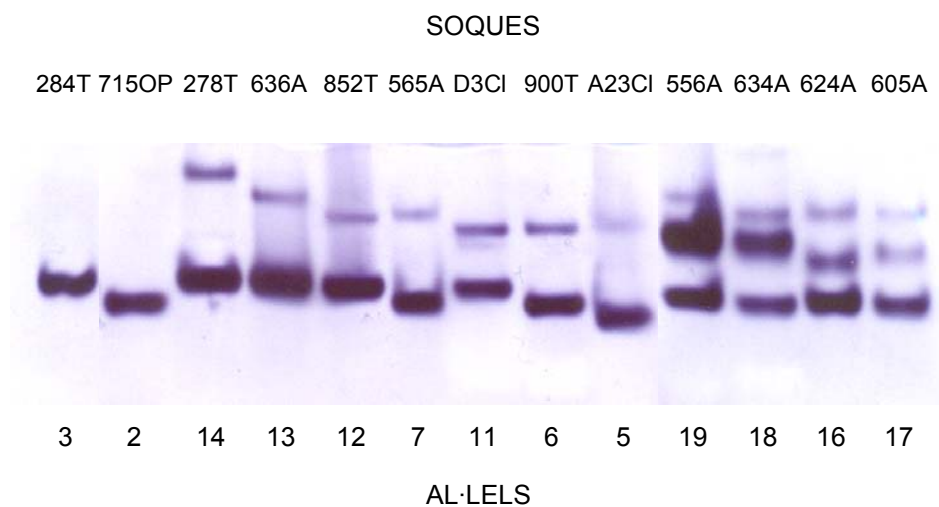
A partir dels extractes cel·lulars es van obtenir unes concentracions de proteïna total d'entre 4 i 32 mg/ml, excepte en els extractes de les soques 949N (1,8 mg/ml) i 953N (2,9 mg/ml).

En nou (ADH, FUM, G6P, GD1, GP1, GP2, PGI, PGM i THD) dels 22 enzims analitzats no es van poder optimitzar les condicions per a la visualització correcta de les seues activitats i, per tant, van ser descartats de l'estudi. Per una altra banda, en les tincions corresponents als enzims LDH i EST es va posar de manifest l'existència de dos enzims en cadascuna de les tincions, ja que presentaven bandes amb migració molt diferent, atribuint-se les bandes de menor migració a un enzim (LDH1 i EST1) i les de major recorregut electroforètic a un segon enzim (LDH2 i EST2). En definitiva, **15 enzims (Figures 22, 23a, 23b, 24, 25, 26, 27, 28, 29a, 29b, 30, 31a, 31b, 32, 33, 34a, 34b i 35)** van ser inclosos en l'estudi de la diversitat genètica i l'estructura poblacional de la població d'*Aeromonas* spp.

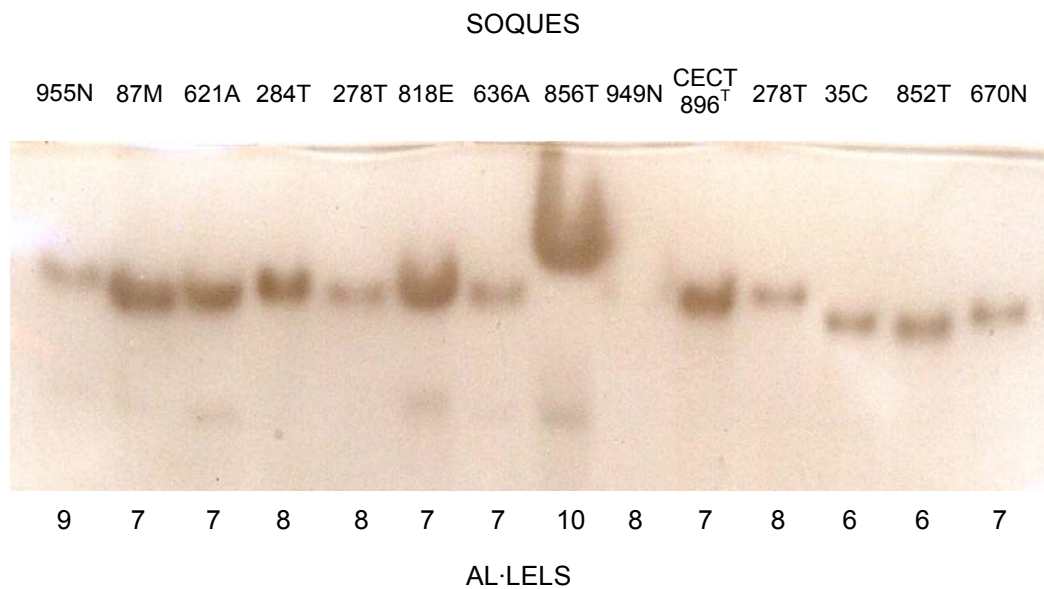
Els enzims analitzats en gels al 10 % / 8 % de poliacrilamida foren els següents: EST1, EST2, GOT, HEX, IDH, IPO, LAP, MDH, ME i NSP. En canvi, la resta d'enzims (ALD, C12O, C23O, LDH1 i LDH2) va requerir gels al 8 % / 5 % de poliacrilamida per a la seua anàlisi.

La majoria dels enzims van presentar una banda per al·lel en totes les soques estudiades, en canvi, els enzims EST2 i IPO podien arribar a tindre dues bandes, l'ALD fins a tres i l'enzim ME fins a quatre bandes per al·lel.

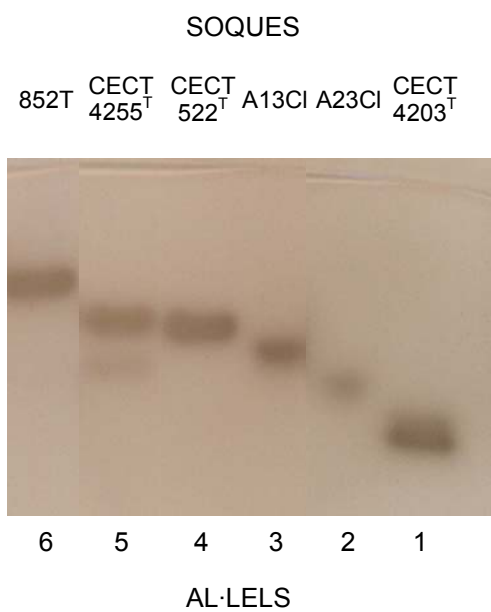
**Figura 22.** Alanina deshidrogenasa.



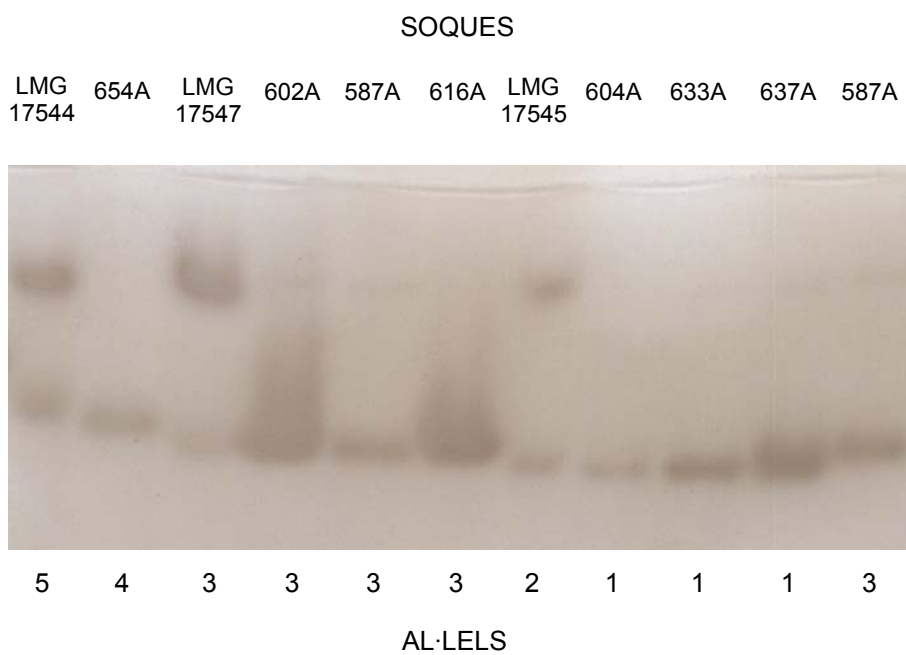
**Figura 23a.** Catecol 1,2-dioxigenasa.



**Figura 23b.** Catecol 1,2-dioxigenasa.

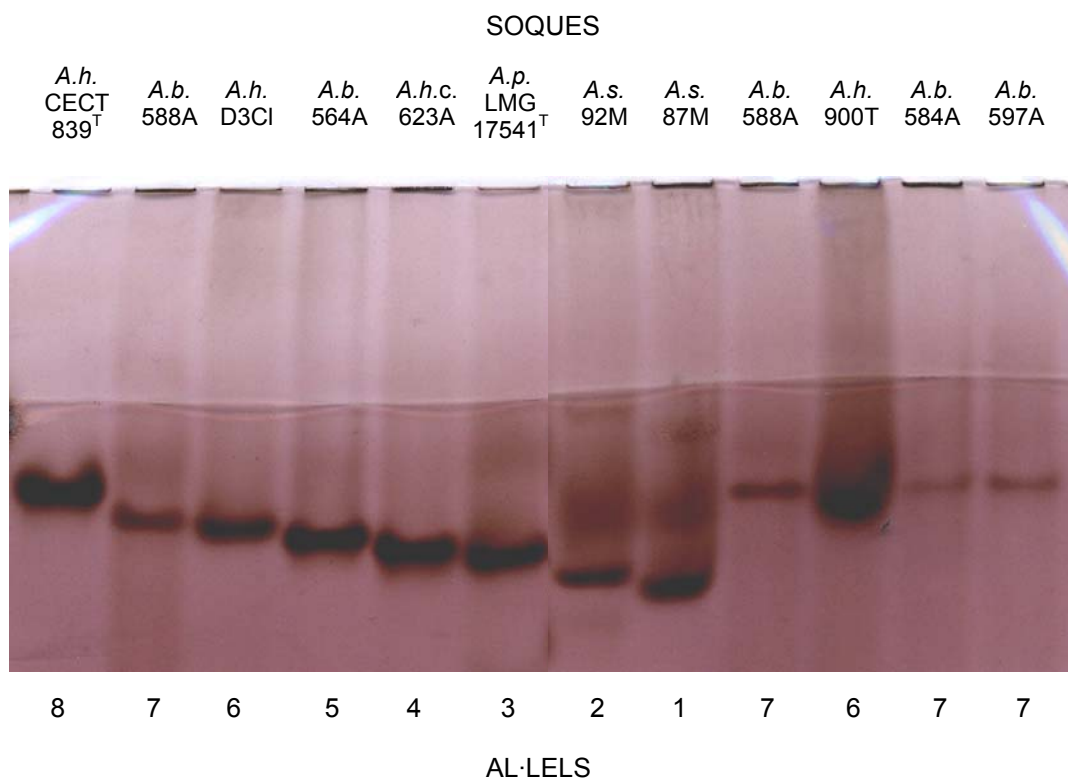


**Figura 24.** Catecol 2,3-dioxigenasa.



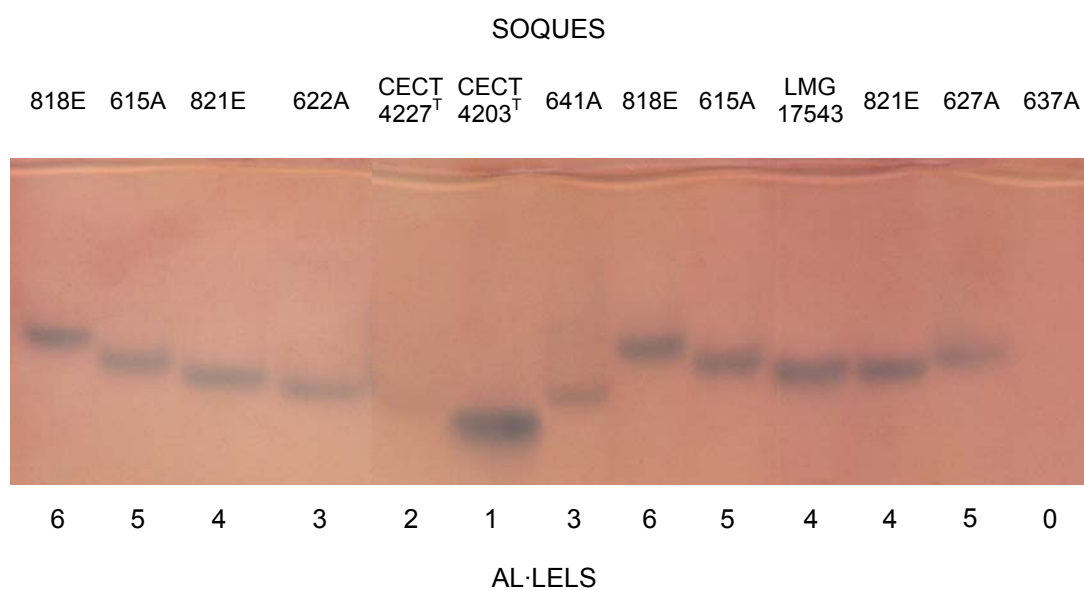


**Figura 25.** Esterasa 1.

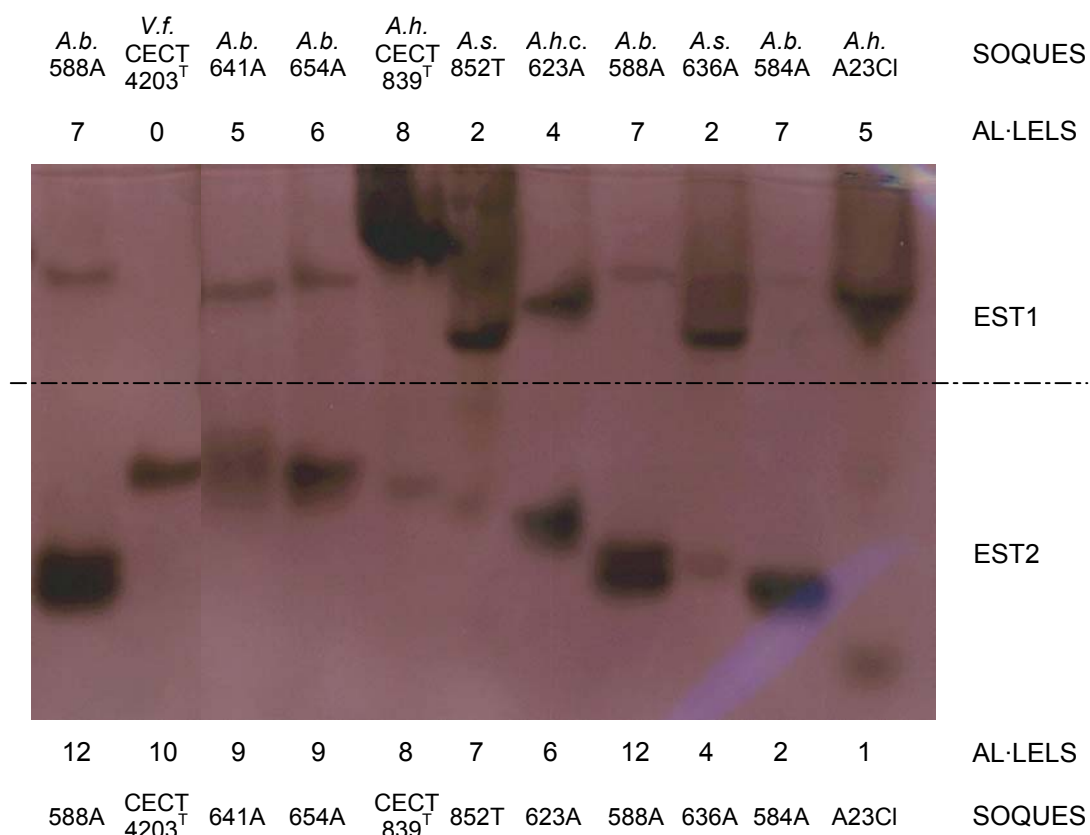


*A.b.*, *A. bestiarum*; *A.h.*, *A. hydrophila*; *A.h.c.*, *A. hydrophila* complex; *A.p.*, *A. popoffii*; *A.s.*, *A. salmonicida*.

**Figura 26.** GOT.



**Figura 27.** Esterases 1 i 2.



*A.b.*, *A. bestiarum*; *A.h.*, *A. hydrophila*; *A.h.c.*, *A. hydrophila* complex; *A.s.*, *A. salmonicida*; *V.f.*, *Vibrio furnissii*.

**Figura 28.** Leucina aminopeptidasa.

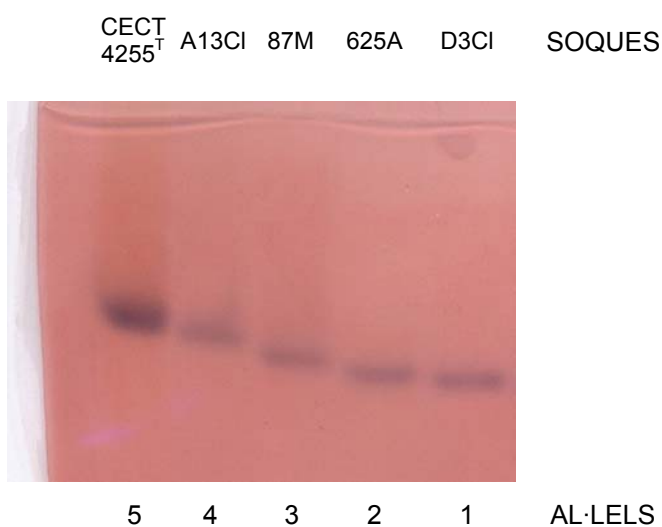
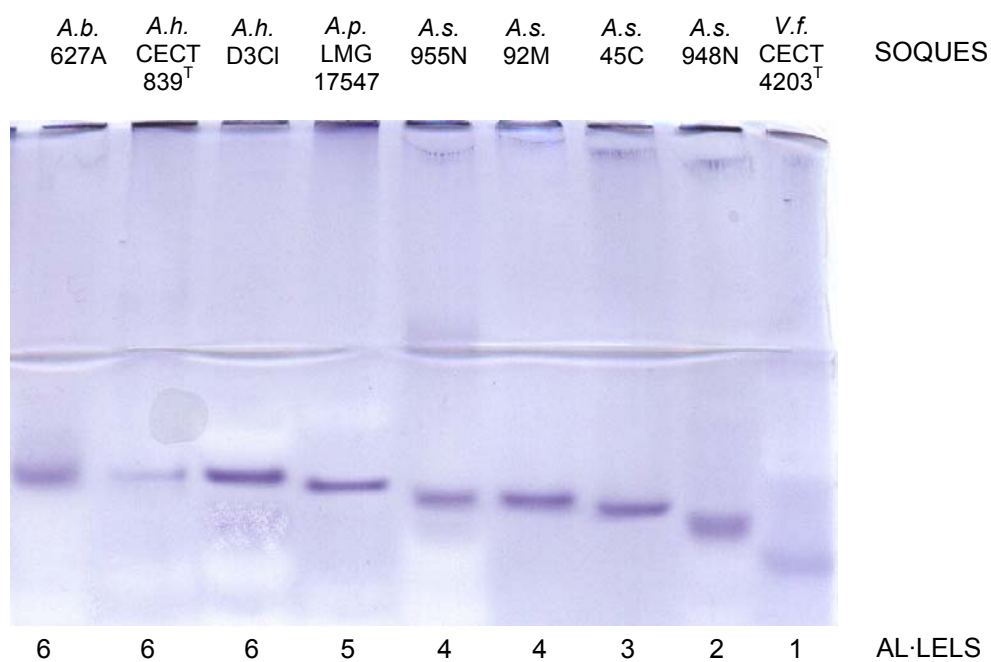
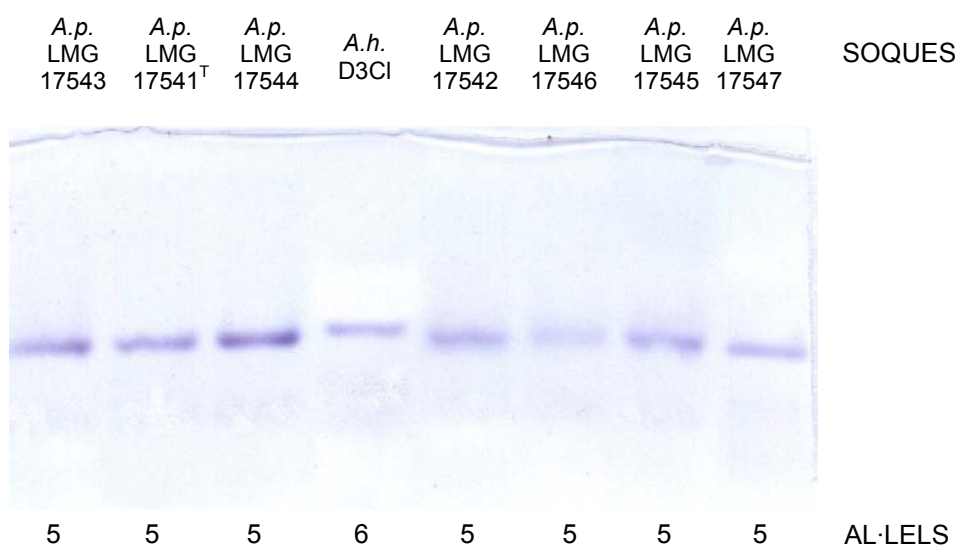


Figura 29a. Hexoquinasa.



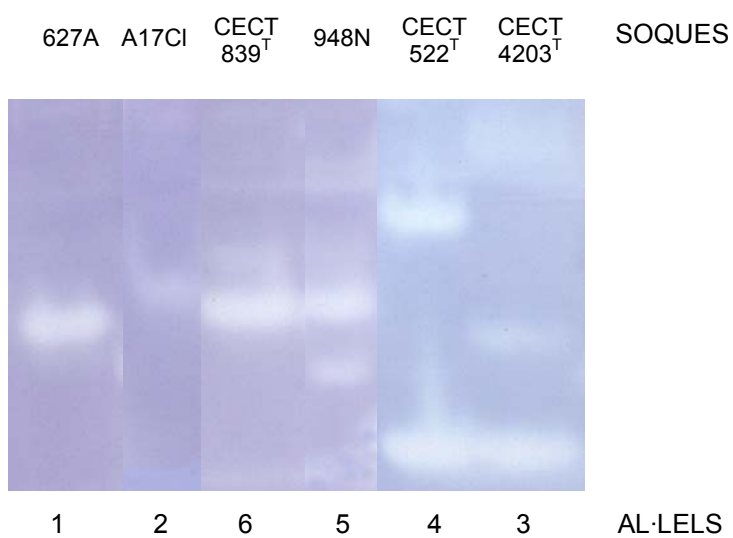
*A.b.*, *A. bestiarum*; *A.h.*, *A. hydrophila*; *A.p.*, *A. popoffii*; *A.s.*, *A. salmonicida*; *V.f.*, *Vibrio furnissii*.

Figura 29b. Hexoquinasa.

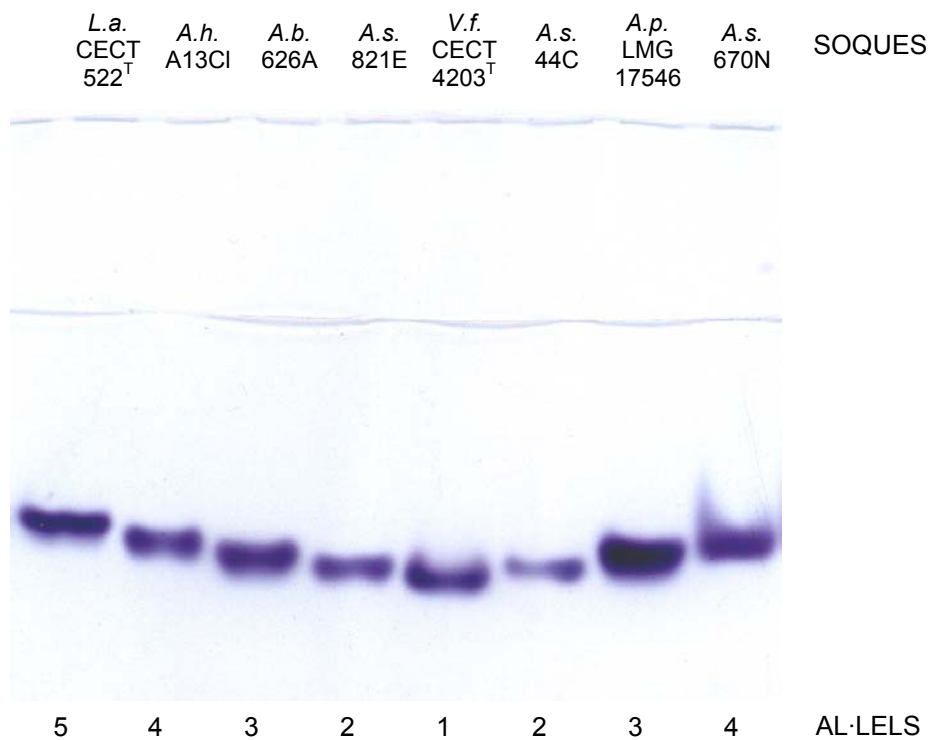


*A.h.*, *A. hydrophila*; *A.p.*, *A. popoffii*.

**Figura 30.** Indofenol oxidasa.

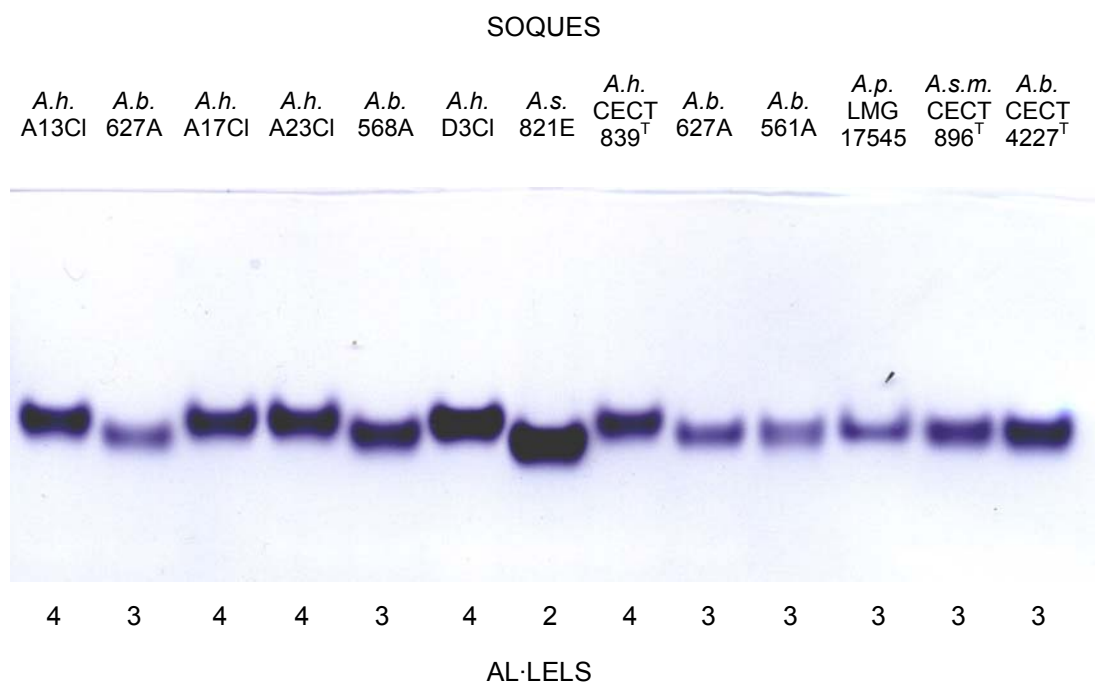


**Figura 31a.** Isocitrat deshidrogenasa.



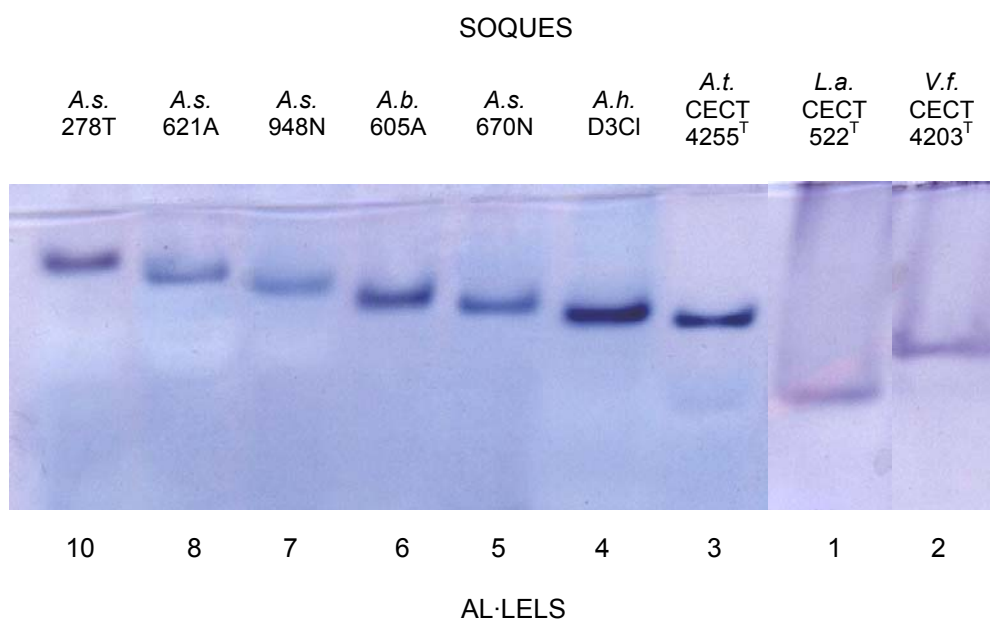
*A.b.*, *A. bestiarum*; *A.h.*, *A. hydrophila*; *A.p.*, *A. popoffii*; *A.s.*, *A. salmonicida*; *L.a.*, *Listonella anguillarum*; *V.f.*, *Vibrio furnisii*.

Figura 31b. Isocitrat deshidrogenasa.



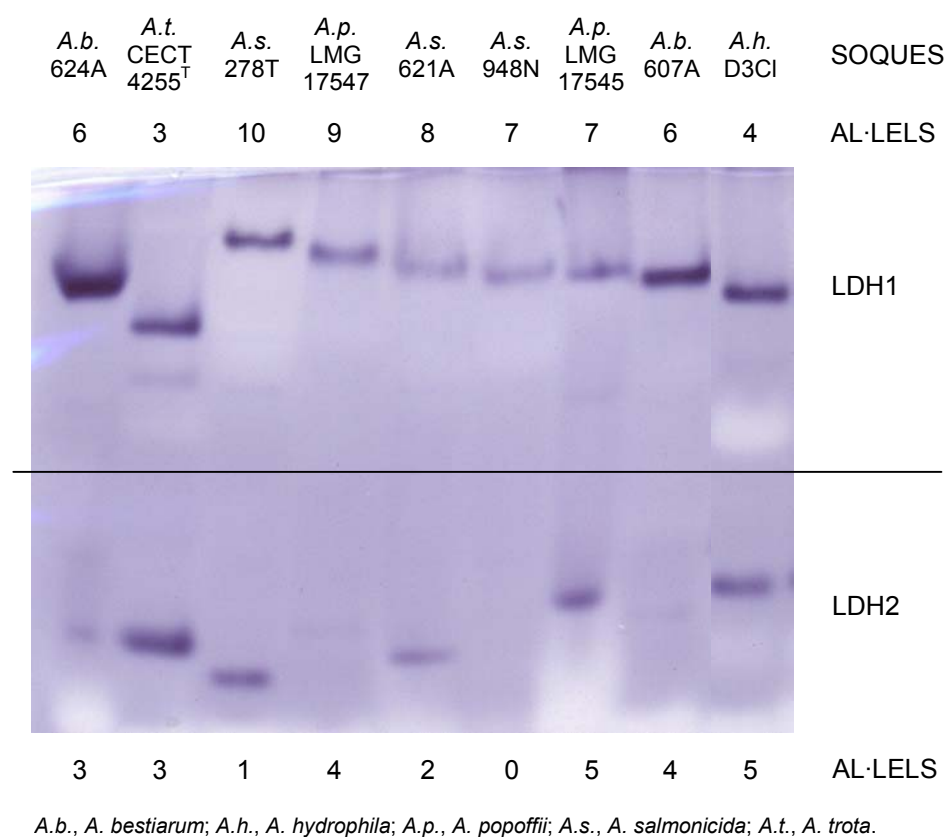
*A.b.*, *A. bestiarum*; *A.h.*, *A. hydrophila*; *A.p.*, *A. popoffii*; *A.s.*, *A. salmonicida*; *A.s.m.*, *A. s. masoucida*.

Figura 32. Lactat deshidrogenasa 1.

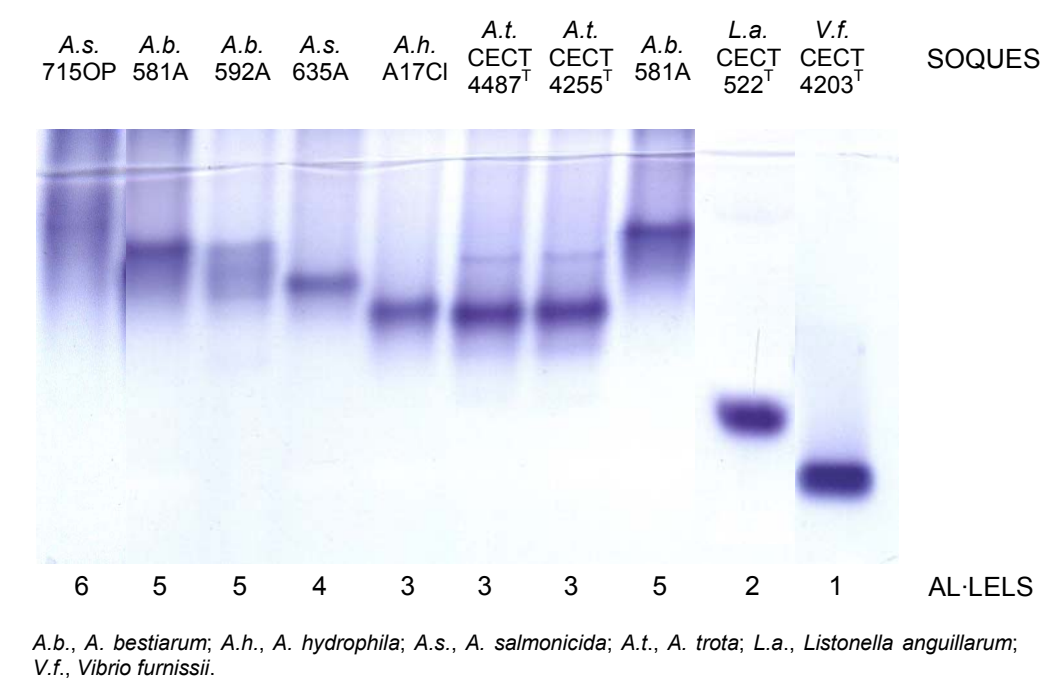


*A.b.*, *A. bestiarum*; *A.h.*, *A. hydrophila*; *A.s.*, *A. salmonicida*; *A.t.*, *A. trota*; *L.a.*, *Listonella anguillarum*; *V.f.*, *Vibrio furnissii*.

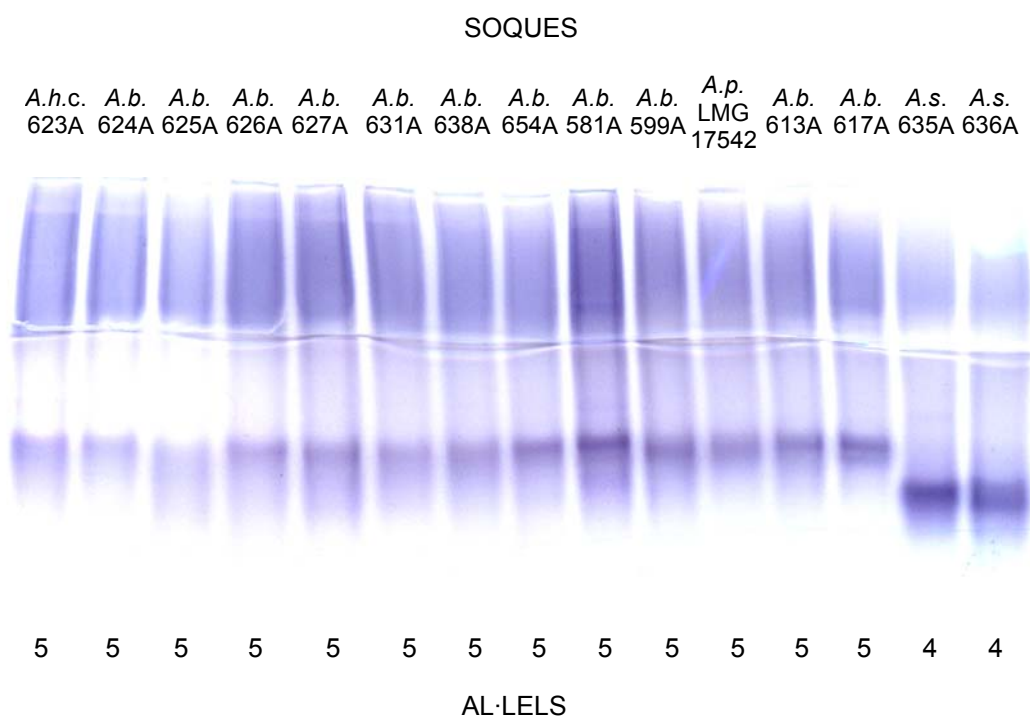
**Figura 33.** Lactat deshidrogenases 1 i 2.



**Figura 34a.** Malat deshidrogenasa.

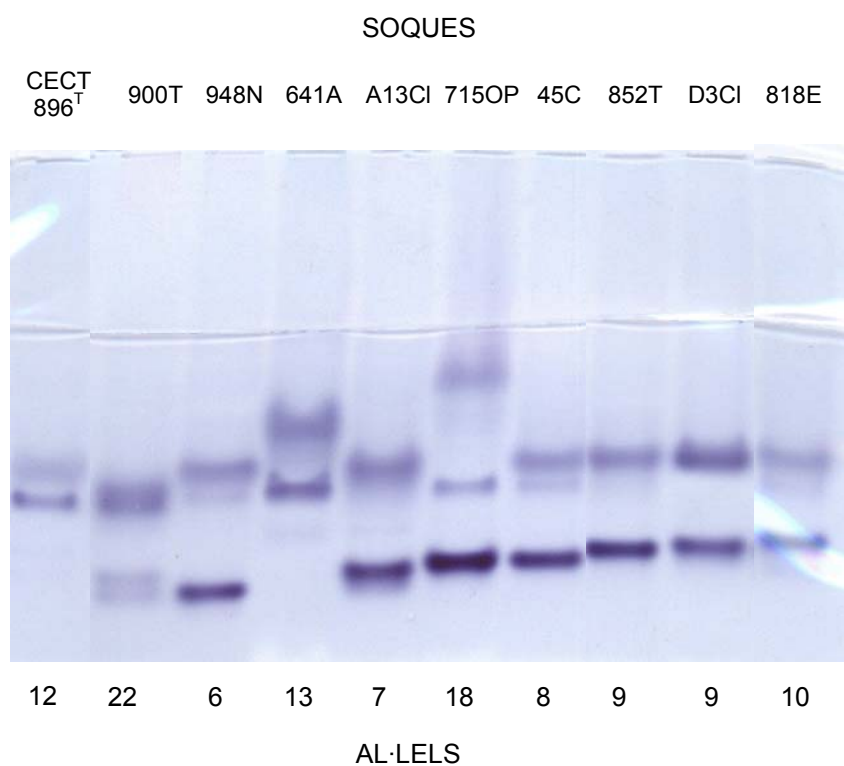


**Figura 34b.** Malat deshidrogenasa.



*A.b.*, *A. bestiarum*; *A.h.c.*, *A. hydrophila* complex; *A.p.*, *A. popoffii*; *A.s.*, *A. salmonicida*.

**Figura 35.** Enzim màlic.



#### 4.5.2. ETs i diversitat genètica.

A partir de les 122 soques analitzades per MLEE, es van identificar un total de **79 ETs** (tipus electroforètics), 69 dels quals estaven representats per una única soca, mentre la resta d'ETs (18, 33, 56, 57, 65, 66, 68, 69, 71 i 75) foren compartits per diverses soques (entre dues i 13 soques per ET). Totes les soques que compartien un mateix ET foren aïllades d'aigua dolça i identificades com a *A. bestiarum* o *A. hydrophila* complex, a excepció de les dues soques *A. popoffii* de l'ET 33 (LMG 17541<sup>T</sup> i LMG 17542). Aquestes dades són mostrades a la **Taula 19** conjuntament amb el perfil al·lèlic de cada ET.

Tots els **loci** enzimàtics foren **polimòrfics**, des dels tres al·lèls del locus NSP fins als 23 del ME, amb una mitjana de 9,4 al·lèls per locus. La mostra completa presentà major polimorfisme en tots els loci respecte de les subpoblacions estudiades (soques aïllades d'aigües dolces, de mol·luscs o de mostres clíniques, i soques identificades com a *A. bestiarum*, *A. hydrophila*, *A. popoffii* o *A. salmonicida*), excepte en el locus NSP (**Taula 20**).

La majoria de soques (89,3 %) va presentar **activitat** per a 12-14 enzims, en set soques (ETs 2, 3, 5, 6, 8, 41 i 44) (5,7 %) es va detectar l'activitat de 9-10 enzims i, únicament, sis soques (ETs 30, 35, 36, 42, 47 i 48) (4,9 %) tenien els 15 enzims (Taula 19). Per una altra banda, tots els loci van presentar una baixa freqüència d'**al·lèls nuls** (0-0,057), excepte els enzims C23O (0,139), EST2 (0,508) i C12O (0,730). Així, els loci ALD i IDH van ser detectats en totes les soques, mentre els loci C12O i EST2 van aglutinar la majoria d'al·lèls nuls (72 %), el locus C12O no es va detectar en 89 soques ni el locus EST2 en 62 soques (Taula 19).



Taula 19 (1/4). Perfil al·lèlic dels ETs.

ET	SOQUES	IDENTIFICACIÓ	AL·LEL DEL LOCUS ENZIMÀTIC INDICAT														
			ALD	C120	C230	EST1	EST2	GOT	HEX	IDH	IPO	LAP	LDH1	LDH2	MDH	ME	NSP
1	CECT 4203 <sup>T</sup>	<i>V. furnissii</i>	1	1	0	0	10	1	1	1	3	2	2	5	1	4	1
2	CECT 522 <sup>T</sup>	<i>L. anguillarum</i>	1	4	0	0	11	0	0	5	4	4	1	0	2	2	1
3	611A	<i>A. bestiarum</i>	2	0	1	5	0	5	0	3	0	4	6	4	0	3	0
4	715OP	<i>A. salmonicida</i>	2	7	4	2	0	5	4	3	1	2	0	3	6	18	2
5	953N	<i>A. salmonicida</i>	2	8	0	2	0	5	0	3	1	3	0	0	4	1	0
6	949N	<i>A. salmonicida</i>	2	8	0	2	0	5	0	4	1	3	0	0	4	1	0
7	44C	<i>A. salmonicida</i>	2	8	0	2	0	5	4	2	1	3	6	3	4	8	2
8	86C	<i>A. salmonicida</i>	3	0	0	2	0	5	4	3	5	2	6	2	0	0	0
9	284T	<i>A. salmonicida</i>	3	8	0	2	0	5	4	2	5	3	10	1	4	5	1
10	CECT 4487 <sup>T</sup>	<i>A. enteropelogenes</i>	4	5	3	0	0	3	4	3	1	3	3	3	3	17	0
11	A23CI	<i>A. hydrophila</i>	5	2	0	5	1	5	6	4	1	3	4	3	4	7	1
12	821E	<i>A. salmonicida</i>	6	0	0	2	0	4	4	2	1	2	4	1	4	3	2
13	A13CI	<i>A. hydrophila</i>	6	3	0	6	0	5	5	4	1	4	4	4	4	7	1
14	900T	<i>A. hydrophila</i>	6	3	0	6	3	3	6	4	6	3	4	5	3	22	1
15	45C	<i>A. salmonicida</i>	7	0	0	1	0	3	3	3	1	2	6	1	4	8	2
16	633A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	1	5	0	0	6	3	1	3	6	5	5	15	2
17	564A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	5	0	2
18	557A, 560A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	5	14	2
19	565A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	5	15	2
20	637A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	1	6	12	0	6	3	1	3	6	5	5	15	2
21	112A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	3	5	0	0	6	3	1	4	6	5	5	14	2
22	593A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	3	7	3	5	6	3	1	0	6	0	5	15	2
23	563A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	3	7	3	5	6	3	1	2	6	4	5	14	2
24	594A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	3	7	3	5	6	3	1	3	6	4	5	14	2
25	592A	<i>A. bestiarum</i>	7	0	3	7	12	5	6	3	1	3	6	5	5	15	2
26	670N	<i>A. salmonicida</i>	7	7	0	2	0	0	3	4	1	2	5	1	4	16	2

Taula 19 (2/4). Perfil al·lèlic dels ETs.

ET	SOQUES	IDENTIFICACIÓ	AL·LEL DEL LOCUS ENZIMÀTIC INDICAT														
			ALD	C120	C230	EST1	EST2	GOT	HEX	IDH	IPO	LAP	LDH1	LDH2	MDH	ME	NSP
27	818E	<i>A. salmonicida</i>	7	7	4	1	0	6	3	3	1	2	6	1	4	10	2
28	92M	<i>A. salmonicida</i>	7	9	0	2	0	2	4	4	1	3	6	2	4	5	2
29	955N	<i>A. salmonicida</i>	7	9	4	2	0	3	4	3	1	3	6	2	4	8	2
30	LMG 17544	<i>A. popoffii</i>	7	9	5	4	6	5	5	3	1	3	5	5	5	20	2
31	LMG 17546	<i>A. popoffii</i>	7	10	3	2	0	4	5	3	1	2	7	5	5	19	2
32	LMG 17545	<i>A. popoffii</i>	7	11	2	3	0	4	5	3	1	4	7	5	5	20	2
33	LMG 17541 <sup>T</sup>	<i>A. popoffii</i>	8	9	4	3	0	5	5	3	1	3	7	5	5	19	2
	LMG 17542																
34	LMG 17547	<i>A. popoffii</i>	9	9	3	3	0	5	5	3	1	2	9	4	5	20	2
35	LMG 17543	<i>A. popoffii</i>	9	9	3	3	6	4	5	3	1	3	8	5	5	20	2
36	CECT 4255 <sup>T</sup>	<i>A. trota</i>	10	5	4	2	9	2	4	4	1	5	3	3	3	17	2
37	D3CI	<i>A. hydrophila</i>	11	0	1	6	9	3	6	4	6	1	4	5	4	9	1
38	CECT 839 <sup>T</sup>	<i>A. hydrophila</i>	11	0	1	8	8	3	6	4	6	2	4	5	4	11	1
39	A17CI	<i>A. hydrophila</i>	11	0	4	8	9	3	6	4	2	2	4	5	3	8	1
40	35C	<i>A. bestiarum</i>	11	6	4	2	0	5	4	3	1	2	4	2	4	5	2
41	CECT 894 <sup>T</sup>	<i>A. salmonicida</i>	12	0	0	2	0	3	0	4	1	2	0	0	4	2	2
		subsp. <i>salmonicida</i>															
42	852T	<i>A. salmonicida</i>	12	6	3	2	7	3	4	3	5	2	6	3	4	9	2
43	856T	<i>A. salmonicida</i>	12	10	4	2	0	4	6	3	5	3	6	3	4	6	2
44	89C	<i>A. salmonicida</i>	13	0	0	1	0	0	4	4	0	0	7	2	4	6	2
45	CECT 896 <sup>T</sup>	<i>A. salmonicida</i>	13	7	0	2	0	3	4	3	1	2	7	2	4	12	2
		subsp. <i>masoucida</i>															
46	621A	<i>A. salmonicida</i>	13	7	4	2	0	5	4	2	1	2	8	2	4	6	1
47	636A	<i>A. salmonicida</i>	13	7	4	2	4	3	4	3	1	2	8	2	4	5	2
48	635A	<i>A. salmonicida</i>	13	7	4	2	5	3	4	3	1	2	8	2	4	5	2
49	948N	<i>A. salmonicida</i>	13	8	4	1	0	5	2	3	5	2	7	0	4	6	2

Taula 19 (3/4). Perfil al·lèlic dels ETs.

ET	SOQUES	IDENTIFICACIÓ	AL·LEL DEL LOCUS ENZIMÀTIC INDICAT														
			ALD	C120	C230	EST1	EST2	GOT	HEX	IDH	IPO	LAP	LDH1	LDH2	MDH	ME	NSP
50	278T	<i>A. salmonicida</i>	14	8	4	2	0	5	4	2	1	3	10	1	4	5	2
51	87M	<i>A. salmonicida</i>	15	7	4	1	0	3	4	3	1	3	6	2	4	9	2
52	624A	<i>A. bestiarum</i>	16	0	1	5	0	3	5	3	1	2	6	3	5	15	2
53	CECT 4227 <sup>T</sup>	<i>A. bestiarum</i>	17	0	1	4	0	2	6	3	1	2	6	4	5	15	2
54	628A	<i>A. salmonicida</i>	17	0	1	5	0	5	6	3	1	1	6	4	5	15	2
55	645A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	3	3	2
56	562A, 599A, 601A, 613A, 617A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	5	14	2
57	561A, 579A, 598A, 600A, 603A, 604A, 605A, 606A, 607A, 612A, 618A, 625A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	5	15	2
58	619A	<i>A. hydrophila</i> complex															
58	CT812736A	<i>A. hydrophila</i>	17	0	1	5	6	3	6	3	1	2	6	4	5	15	2
59	615A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	1	5	6	5	6	3	1	2	6	4	5	15	2
60	622A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	1	6	0	3	6	3	1	1	6	4	5	14	2
61	630A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	1	6	0	3	6	3	1	2	6	4	5	14	2
62	641A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	5	9	3	6	3	1	3	6	4	5	13	2
63	583A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	6	2	5	6	3	1	2	6	4	5	14	2
64	595A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	2	0	6	3	1	3	6	4	5	14	2
65	584A, 587A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	2	5	6	3	1	2	6	4	5	14	2
66	585A, 597A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	2	5	6	3	1	2	6	4	5	15	2
67	589A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	3	5	0	3	1	2	6	4	5	14	0

Taula 19 (4/4). Perfil al·lèlic dels ETs.

ET	SOQUES	IDENTIFICACIÓ	AL·LEL DEL LOCUS ENZIMÀTIC INDICAT																
			ALD	C-120	C230	EST1	EST2	GOT	HEX	IDH	IPO	LAP	LDH1	LDH2	MDH	ME	NSP		
68	558A, 559A,	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	3	5	6	3	1	2	6	4	5	15	2		
	566A, 577A,																		
	586A, 591A,																		
	609A, 620A																		
	569A																		
69	572A, 574A,	<i>A. hydrophila</i> complex	17	0	3	7	5	6	3	1	2	6	4	5	15	2			
	581A																		
70	614A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	12	6	3	1	0	6	4	5	15	2			
71	568A, 571A,	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	12	5	6	3	1	2	6	4	5	15	2		
	573A, 575A,																		
	576A, 578A,																		
	588A, 590A,																		
	596A, 610A,																		
	626A, 627A																		
	582A																		
72	602A	<i>A. hydrophila</i> complex	17	0	3	7	12	6	3	1	2	6	5	5	15	2			
	616A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	12	5	6	3	1	3	6	5	14	2			
73	616A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	3	7	12	5	6	3	1	3	6	5	14	2			
	654A	<i>A. bestiarum</i>	17	0	4	6	9	3	6	3	1	2	6	4	15	2			
74	555A, 631A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	15	2			
	638A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	1	5	6	5	6	3	1	2	6	4	15	2			
75	634A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	4	6	0	5	2	3	1	3	6	0	21	2			
	623A	<i>A. hydrophila</i> complex	19	0	1	4	6	5	6	3	1	2	8	4	15	2			
76	555A, 631A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	15	2			
	638A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	1	5	6	5	6	3	1	2	6	4	15	2			
77	634A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	4	6	0	5	2	3	1	3	6	0	21	2			
	623A	<i>A. hydrophila</i> complex	19	0	1	4	6	5	6	3	1	2	8	4	15	2			
78	555A, 631A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	1	5	0	5	6	3	1	2	6	4	15	2			
	638A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	1	5	6	5	6	3	1	2	6	4	15	2			
79	634A	<i>A. bestiarum</i>	18	0	4	6	0	5	2	3	1	3	6	0	21	2			
	623A	<i>A. hydrophila</i> complex	19	0	1	4	6	5	6	3	1	2	8	4	15	2			
79	556A	<i>A. hydrophila</i> complex	19	0	3	4	6	5	6	3	1	3	8	4	15	2			

La **diversitat genètica mitjana ( $H$ )** de la mostra completa fou **0,642**  $\pm$  0,179 quan va ser estudiada per ETs i **0,523**  $\pm$  0,188 quan va ser estudiada per soques. La  **$H$**  de les subpoblacions de soques clíniques, de soques aïllades de mol·luscs i de soques *A. hydrophila* i *A. salmonicida* fou major que la dels subgrups de soques aïllades d'aigües i de soques *A. bestiarum* i *A. popoffü* (**Taula 20**).

**Taula 20** (1/2). Diversitat genètica dels 15 loci.

LOCUS	Total			Aigües			Clíniques		Mol·luscs	
	Núm. Al·lels	$h$		Núm. Al·lels	$h$		Núm. Al·lels	$h$		
		ETs (79)	Soques (122)		ETs (47)	Soques (90)		ETs* (6)	Núm. Al·lels	$h$ ETs* (20)
ALD	19	0,861	0,714	9	0,726	0,517	5	0,933	9	0,895
C12O	12	0,629	0,460	5	0,341	0,208	4	0,867	7	0,847
C23O	6	0,767	0,716	5	0,650	0,590	4	0,867	3	0,563
EST1	9	0,838	0,787	6	0,777	0,676	5	0,933	3	0,468
EST2	13	0,685	0,704	8	0,774	0,747	3	0,733	3	0,195
GOT	7	0,640	0,477	4	0,507	0,298	3	0,733	6	0,747
HEX	7	0,669	0,511	5	0,458	0,280	3	0,733	5	0,626
IDH	5	0,401	0,278	2	0,043	0,022	2	0,333	3	0,626
IPO	7	0,299	0,201	2	0,043	0,022	3	0,600	4	0,537
LAP	6	0,612	0,474	5	0,585	0,376	5	0,933	3	0,574
LDH1	11	0,642	0,472	5	0,401	0,245	2	0,533	6	0,768
LDH2	6	0,765	0,601	5	0,543	0,344	3	0,733	5	0,795
MDH	7	0,591	0,456	3	0,198	0,107	2	0,600	4	0,284
ME	23	0,889	0,749	10	0,736	0,561	4	0,867	11	0,926
NSP	3	0,347	0,238	3	0,124	0,066	3	0,600	3	0,426
Mitjana	9,4	0,642	0,523	5,1	0,460	0,337	3,4	0,733	5,0	0,618
<i>SD</i>	5,5	0,179	0,188	2,4	0,261	0,237	1,1	0,175	2,4	0,216

\* Els valors  $h$  calculats per ETs foren idèntics als calculats per soques.

En el nombre d'al·lels estan inclosos els al·lels nuls.

Entre parèntesi el nombre d'ETs i / o soques.

Taula 20 (2/2). Diversitat genètica dels 15 loci.

LOCUS	<i>A. bestiarum</i>			<i>A. hydrophila</i>		<i>A. popoffii</i>			<i>A. salmonicida</i>	
	Núm. Al·lels	<i>h</i>		Núm. Al·lels	<i>h</i>	Núm. Al·lels	<i>h</i>		Núm. Al·lels	<i>h</i>
		ETs (36)	Soques (75)				ETs* (7)	ETs (6)		
ALD	6	0,622	0,403	4	0,810	3	0,733	0,762	9	0,873
C12O	2	0,056	0,027	3	0,667	3	0,600	0,524	6	0,786
C23O	3	0,589	0,542	3	0,714	4	0,800	0,810	4	0,598
EST1	5	0,687	0,600	3	0,762	3	0,600	0,524	3	0,409
EST2	7	0,757	0,730	6	0,952	2	0,533	0,476	4	0,239
GOT	4	0,459	0,245	2	0,476	2	0,600	0,571	6	0,728
HEX	5	0,260	0,129	2	0,286	1	0,000	0,000	5	0,594
IDH	1	0,000	0,000	2	0,286	1	0,000	0,000	3	0,598
IPO	2	0,056	0,027	3	0,714	1	0,000	0,000	3	0,409
LAP	5	0,551	0,308	4	0,810	3	0,733	0,667	4	0,587
LDH1	2	0,056	0,027	2	0,286	4	0,800	0,714	7	0,790
LDH2	5	0,459	0,245	3	0,667	2	0,333	0,286	5	0,772
MDH	3	0,160	0,079	3	0,667	1	0,000	0,000	4	0,239
ME	7	0,651	0,485	6	0,952	2	0,533	0,571	13	0,924
NSP	2	0,108	0,053	2	0,286	1	0,000	0,000	3	0,366
Mitjana	3,9	0,365	0,260	3,2	0,622	2,2	0,418	0,394	5,3	0,594
SD	1,9	0,273	0,241	1,3	0,240	1,1	0,327	0,314	2,7	0,221

\* Els valors *h* calculats per ETs foren idèntics als calculats per soques.

En el nombre d'al·lels estan inclosos els al·lels nuls.

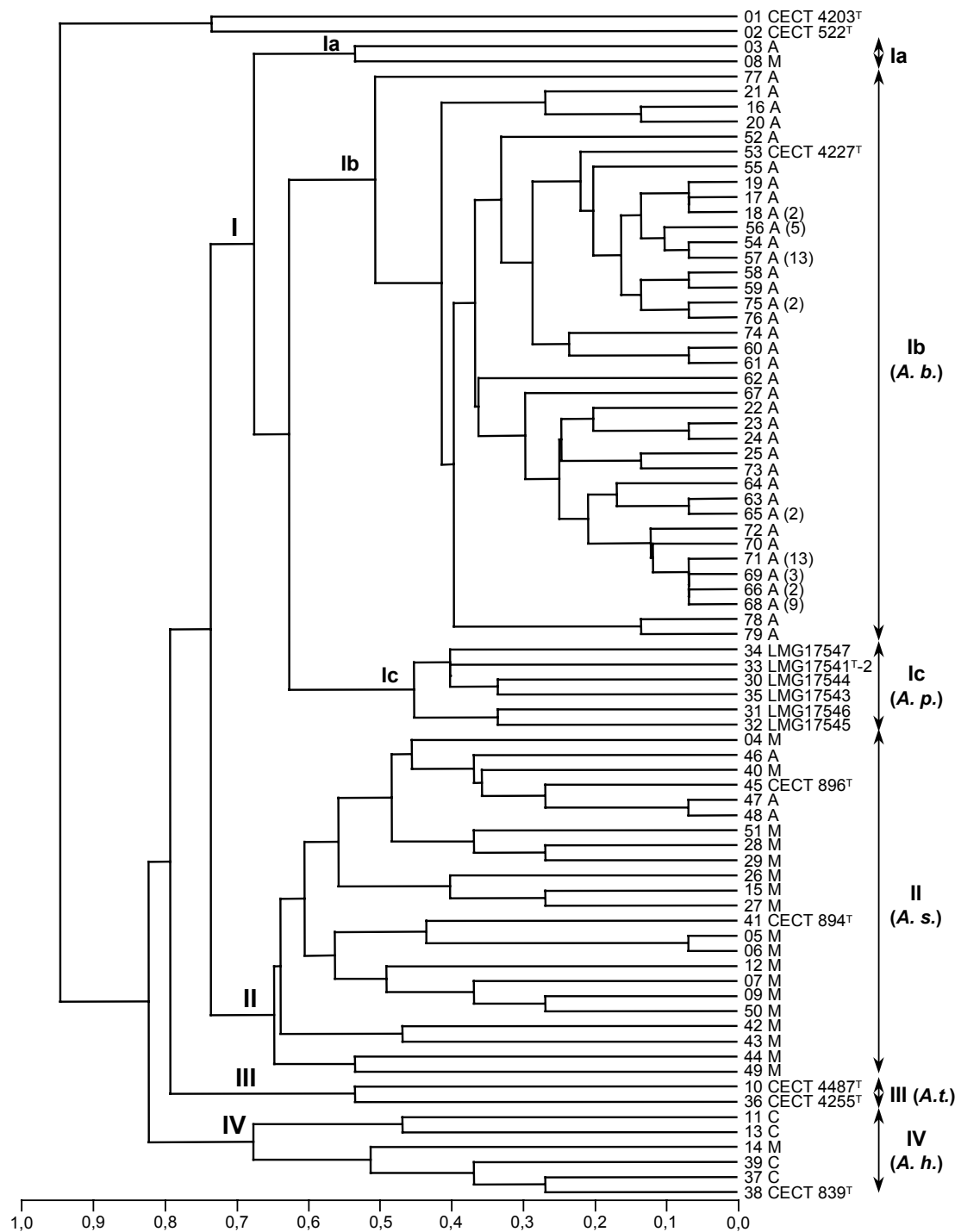
Entre parèntesi el nombre d'ETs i / o soques.

#### 4.5.3. Relació genètica entre ETs.

La **Figura 36** mostra el **dendrograma** de la relació genètica entre els 79 ETs. El coeficient de correlació cofenètica ( $r$ ) fou **0,92**. Tots els ETs obtinguts a partir de les 120 soques del gènere *Aeromonas* analitzades es van agrupar en quatre grups (**I, II, III i IV**) que divergien a una **distància genètica** de **0,7**. Únicament dos ETs, representats per les soques tipus de *V. furnissii* i *L. anguillarum*, van romandre sense agrupar.

A continuació es descriuen es diferents grups formats en el dendrograma (Figura 36 i Taula 19):

Figura 36. Dendrograma de la relació genètica entre els 79 ETs.



Primera columna: ETs. Segona columna: font d'aïllament de les soques (A: aigua, C: clínica, M: mol-lusc) o soques de referència. Entre parèntesi, el nombre de soques quan un ET representa més d'una soca. L'escala indica distància genètica. A.b.: *A. bestiarum*, A.h.: *A. hydrophila*, A.p.: *A. popoffii*, A.s.: *A. salmonicida*, A.t.: *A. trota*.

**Grup I.** Inclou 89 soques o 46 ETs. A una **distància genètica** de **0,6** es distingeixen **tres subgrups (Ia, Ib i Ic)**. El subgrup **Ia** inclou dos dels ETs que presentaren sis al·lels nuls (ET 8 i ET 3). **Ib**, format per 80 soques o 38 ETs, està format majoritàriament per soques **A. bestiarum** (73 soques), i totes les soques d'aquest subgrup foren aïllades d'aigües, excepte la soca tipus d'*A. bestiarum* (CECT 4227<sup>T</sup>). El subgrup **Ic** (sis ETs) comprén les set soques **A. popoffii** analitzades, totes elles procedents de mostres d'aigua dolça.

**Grup II.** Presenta 23 soques o ETs, de les quals la majoria són **A. salmonicida** (22 soques, incloses les soques tipus CECT 894<sup>T</sup> i CECT 896<sup>T</sup>), i/o aïllades a partir de mol·luscs (18 soques).

**Grup III.** Agrupa les soques tipus d'**A. trota** (CECT 4255<sup>T</sup>) i d'*A. enteropelogenes* (CECT 4487<sup>T</sup>), aïllades de mostres clíniques.

**Grup IV.** Inclou sis soques **A. hydrophila** (quatre aïllades de mostres clíniques, una de mol·luscs i la soca tipus CECT 839<sup>T</sup>) amb ETs diferents.

A més, el dendrograma obtingut mostra una molt bona correlació de les soques respecte del seu **origen** d'aïllament (Figura 36, **Taula 21**): el 97 % de les soques aïllades de mostres d'**aigua dolça** s'agrupen en el grup **I**, el 90 % de les soques provinents de **mol·luscs** en el grup **II** i el 100 % de les soques **clíniques** en els grups **III i IV**.



**Taula 21.** Distribució de les soques per font d'aïllament en els grups formats en el dendrograma de la relació genètica entre ETs.

Grups MLEE (soques)	Font d'aïllament			
	Aigües	Clínica	Mol·luscs	Altres
I (89)	87 (97%)	-	1	1
II (23)	3	-	18 (90%)	2
III (2)	-	2	-	-
IV (6)	-	4	1	1

Els números indiquen el nombre de soques, entre parèntesi el percentatge relatiu al total de soques d'una mateixa font d'aïllament.

#### 4.5.4. Anàlisi del desequilibri de lligament.

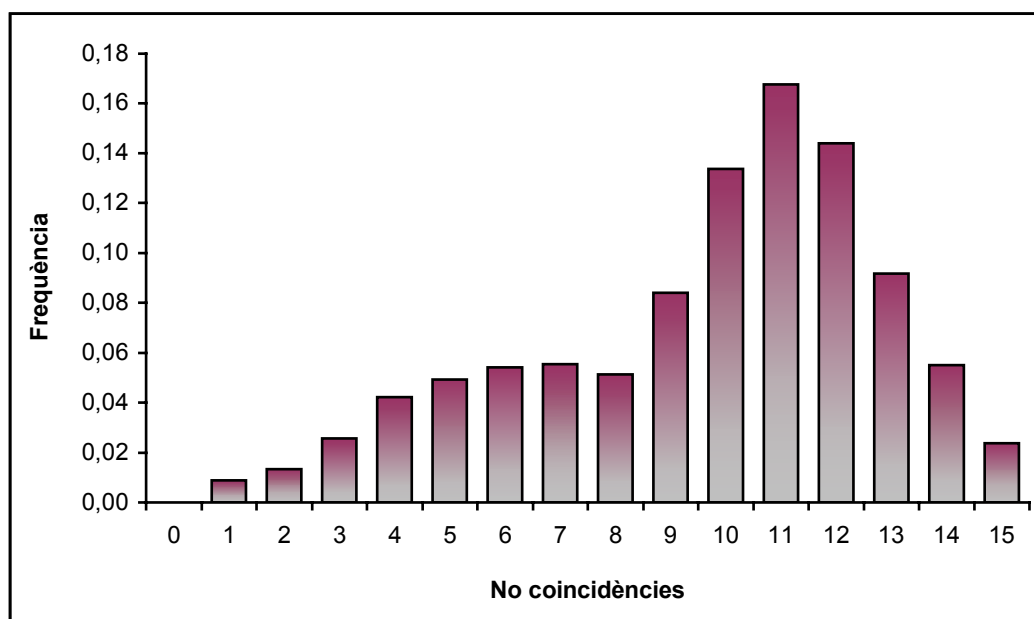
La població estudiada (mostra completa) presenta una mitjana de 9,6 al·lels diferents o **no coincidències** entre parelles d'ETs, així com una ampla distribució en el nombre de no coincidències (**Figura 37**).

Per una altra banda, es va analitzar el **desequilibri de lligament** multilocus en la mostra completa i en les subpoblacions amb un nombre suficient de soques per a la realització d'aquest tipus d'anàlisi (aigües, mol·luscs, *A. bestiarum* i *A. salmonicida*) (**Taula 22**). L'índex d'associació ( $I_A$ ) per a la mostra completa fou **2,38**  $\pm$  0,16 quan va ser analitzada per **ETs** i **4,23**  $\pm$  0,12 quan va ser analitzada per **soques**, aquests valors diferien significativament de zero ( $P < 0,0001$ ). Els valors d' $I_A$  per a les diferents subpoblacions de soques també van ser significativament diferents de zero, excepte en *A. salmonicida*. A més, tots els valors de la variància observada ( $V_o$ ) superaren els de la variància esperada ( $V_E$ ) en la corresponent població en equilibri de lligament (Taula 22). L'anàlisi del desequilibri de lligament també va ser aplicada a un grup de soques *A. bestiarum* que procedien del mateix origen (font 2 del Montseny) i, novament, l' $I_A$  va ser significativament major que zero (Taula 22).

Taula 22. Anàlisi del desequilibri de lligament multilocus.

Mostres	Núm. soques	Núm. ETs	V <sub>E</sub>		V <sub>O</sub>		I <sub>A</sub> ± SD		P*
			ETs	Soques	ETs	Soques	ETs	Soques	
Completa	122	79	3,00	3,25	10,14	16,99	2,38 ± 0,16	4,23 ± 0,12	< 0,0001
Aigües	90	47	2,77	2,57	8,97	10,72	2,24 ± 0,20	3,17 ± 0,15	< 0,0001
Mol·luscs	20	20	2,88	2,88	4,96	4,96	0,72 ± 0,31	0,72 ± 0,31	= 0,0002
<i>A. bestiarum</i>	75	36	2,43	2,07	5,42	5,78	1,23 ± 0,23	1,79 ± 0,16	< 0,0001
<i>A. salmonicida</i>	24	24	2,93	2,93	3,68	3,68	0,25 ± 0,28	0,25 ± 0,28	= 0,0366
<i>A. bestiarum</i> (font 2 del Montseny)	60	22	2,14	1,63	4,94	4,16	1,31 ± 0,29	1,56 ± 0,18	< 0,0001

\* Probabilitat d'observar una relació V<sub>O</sub>/V<sub>E</sub> igual o major que la de les dades originals, basant-se en 10.000 iteracions pel mètode Monte Carlo.

**Figura 37.** Distribució del nombre de no coincidències entre els 79 ETs estudiats.

#### 4.6. Correlació MLEE – identificació fenotípica.

Es va observar una **correlació** del **96 %** (100/115) entre els resultats obtinguts per la MLEE (Figura 36) i la identificació fenotípica de les soques incloses en tots dos estudis (**Taula 23**): el 97 % de les soques **A. bestiarum** estaven localitzades en el subgrup **Ib**, totes les **A. popoffii** en l'**Ic**, el 92 % de les **A. salmonicida** en el grup **II**, les **A. trota** en el **III**, i el 86 % de les **A. hydrophila** en el **IV**.

**Taula 23.** MLEE versus identificació fenotípica.

Grups MLEE (soques / ETs)	Identificació fenotípica				
	<i>A. hydrophila</i> (HG1)	<i>A. bestiarum</i> (HG2)	<i>A. salmonicida</i> (HG3)	<i>A. trota</i> (HG14)	<i>A. popoffii</i> (HG17)
<b>Ia</b> (2 / 2)	-	1 (1 %)	1 (4 %)	-	-
<b>Ib</b> (80 / 38)	1 (14 %)	73 (97 %)	1 (4 %)	-	-
<b>Ic</b> (7 / 6)	-	-	-	-	7 (100 %)
<b>II</b> (23 / 23)	-	1 (1 %)	22 (92 %)	-	-
<b>III</b> (2 / 2)	-	-	-	2 (100 %)	-
<b>IV</b> (6 / 6)	6 (86 %)	-	-	-	-

Els números indiquen el nombre de soques, entre parèntesi el percentatge relatiu al total de soques d'una mateixa espècie.

També es van estudiar les **freqüències al·lèliques** de les subpoblacions de soques agrupades conforme a la seua **identificació fenotípica**. A la **Taula 24** es presenten les freqüències més representatives de les espècies *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* i *A. popoffii*. A partir d'aquesta taula, es van buscar els al·lells suficients per a diferenciar les soques per espècie.

El **96 %** de les soques ***A. bestiarum*** (72 soques en 33 ETs) tenien els al·lells **LDH1-6** i **MDH-5**, i únicament tres soques o ETs *A. bestiarum* no els tenien (ET 3, ET 40 i ET 55). Altres soques també presentaven aquests al·lells: les tres soques *A. hydrophila* complex que compartien ET amb soques *A. bestiarum*, la soca *A. hydrophila* de l'ET 58 i la soca *A. salmonicida* de l'ET 54 (Taula 19).

El **88 %** de les soques ***A. salmonicida*** (21 de 24 soques) tenien els al·lells **EST1-1**, **EST1-2** i **MDH-4**, i només tres soques o ETs *A. salmonicida* no els tenien (ET 4, ET 8 i ET 54). L'única soca que no era *A. salmonicida* però que presentava els al·lells esmentats fou la soca *A. bestiarum* de l'ET 40 (Taula 19).

El **86 %** de les soques ***A. hydrophila*** (sis de set soques) tenien els al·lells **IDH-4** i **LDH1-4**, mentre la soca *A. hydrophila* de l'ET 58 fou l'única que no els tenia. Cap soca més tenia aquesta combinació al·lèlica.

Dos al·lells, **HEX-5** i **IDH-3** o **MDH-5**, permetien diferenciar totes les soques ***A. popoffii*** de la resta, excepte de la soca *A. bestiarum* de l'ET 52 (Taula 19).

Un dels al·lells que permetia diferenciar les dues soques tipus ***A. trota*** (ET 10 i ET 36) de la resta de soques estudiades, fou el **LDH1-3** (Taula 19).

Per tant, cinc loci (**EST1**, **HEX**, **IDH**, **LDH1** i **MDH**) han permès identificar el **94 %** de les soques (108/115) (Taula 24 i Figures 25, 27, 29a, 29b, 31a, 31b, 32, 33, 34a, 34b).

Taula 24. Al·lels més freqüents en les principals espècies estudiades.

<i>A. hydrophila</i> (HG1)		<i>A. bestiarum</i> (HG2)		<i>A. salmonicida</i> (HG3)		<i>A. popoffii</i> (HG17)							
Locus	Al·lels	Freqüències soques = ETs (7)	Locus	Al·lels	Freqüències soques (75) ETs (36)	Locus	Al·lels	Freqüències soques = ETs (24)	Locus	Al·lels	Freqüències soques (7) ETs (6)		
<b>C120</b>	<b>0</b>	0,571	<b>ALD</b>	<b>17</b>	0,760	0,556	<b>C120</b>	<b>0</b>	0,500	<b>C120</b>	<b>9</b>	0,714	0,667
<b>C230</b>	<b>0</b>	0,429	<b>C120</b>	<b>0</b>	0,987	0,972	<b>C230</b>	<b>4</b>	0,417	<b>EST1</b>	<b>3</b>	0,714	0,667
<b>C230</b>	<b>1</b>	0,429	<b>C230</b>	<b>1</b>	0,440	0,444	<b>EST1</b>	<b>1</b> *	0,208	<b>EST2</b>	<b>0</b>	0,714	0,667
<b>GOT</b>	<b>3</b>	0,714	<b>C230</b>	<b>3</b>	0,520	0,472	<b>EST1</b>	<b>2</b> *	0,750	<b>GOT</b>	<b>4</b>	0,429	0,500
<b>HEX</b>	<b>6</b>	0,857	<b>EST1</b>	<b>5</b>	0,410	0,389	<b>EST2</b>	<b>0</b>	0,875	<b>GOT</b>	<b>5</b>	0,571	0,500
<b>IDH</b>	<b>4</b> *	0,857	<b>EST1</b>	<b>7</b>	0,480	0,389	<b>GOT</b>	<b>3</b>	0,333	<b>HEX</b>	<b>5</b> *	1,000	1,000
<b>IPO</b>	<b>1</b>	0,429	<b>GOT</b>	<b>5</b>	0,867	0,722	<b>GOT</b>	<b>5</b>	0,417	<b>IDH</b>	<b>3</b> *	1,000	1,000
<b>IPO</b>	<b>6</b>	0,429	<b>HEX</b>	<b>6</b>	0,933	0,861	<b>HEX</b>	<b>4</b>	0,625	<b>IPO</b>	<b>1</b>	1,000	1,000
<b>LDH1</b>	<b>4</b> *	0,857	<b>IDH</b>	<b>3</b>	1,000	1,000	<b>IDH</b>	<b>3</b>	0,583	<b>LAP</b>	<b>2</b>	0,286	0,333
<b>LDH2</b>	<b>5</b>	0,571	<b>IPO</b>	<b>1</b>	0,987	0,972	<b>IPO</b>	<b>1</b>	0,750	<b>LAP</b>	<b>3</b>	0,571	0,500
<b>MDH</b>	<b>4</b>	0,571	<b>LAP</b>	<b>2</b>	0,827	0,639	<b>LAP</b>	<b>2</b>	0,542	<b>LDH2</b>	<b>5</b>	0,857	0,833
<b>NSP</b>	<b>1</b>	0,857	<b>LDH1</b>	<b>6</b> *	0,987	0,917	<b>LAP</b>	<b>3</b>	0,375	<b>MDH</b>	<b>5</b> *	1,000	1,000
			<b>LDH2</b>	<b>4</b>	0,867	0,722	<b>MDH</b>	<b>4</b> *	0,875	<b>ME</b>	<b>19</b>	0,429	0,333
			<b>MDH</b>	<b>5</b> *	0,960	0,917	<b>NSP</b>	<b>2</b>	0,792	<b>ME</b>	<b>20</b>	0,571	0,667
			<b>ME</b>	<b>14</b>	0,240	0,333				<b>NSP</b>	<b>2</b>	1,000	1,000
			<b>ME</b>	<b>15</b>	0,680	0,500							
			<b>NSP</b>	<b>2</b>	0,973	0,944							

**Vermell:** al·lel més freqüent, amb un valor mínim de 0,550 i igual o major al doble del valor del següent al·lel més freqüent.

**Blau:** els dos al·lels més freqüents que sumats donen com a mínim 0,750.

\* Al·lels suficients per a la detecció de les soques a nivell d'espècie.

## 4.7. Resum dels resultats obtinguts.

Taula 25 (1/3). Taula resum dels estudis taxonòmic i de MLEE.

SOQUES	ESPÈCIE	PHENA		ET
		Taxonomia	MLEE	
35C <sup>1</sup>	A. b.	la	II	40
44C <sup>1</sup>	A. s.	la	II	7
45C <sup>1</sup>	A. s.	lb	II	15
51C <sup>1</sup>	A. sp.	lb		
83C <sup>2</sup>	A. s.	lb		
84C <sup>2</sup>	A. c.	IVa		
86C <sup>2</sup>	A. s.	lc	la	8
87M <sup>2</sup>	A. s.	lc	II	51
88M <sup>2</sup>	A. sp.	V		
89C <sup>2</sup>	A. s.	lb	II	44
92M <sup>2</sup>	A. s.	lc	II	28
93M <sup>2</sup>	A. sp.	VI		
95M <sup>2</sup>	A. sp.	NO		
105A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
106A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
107A <sup>3</sup>	A. c.	IVa		
110A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
111A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
112A <sup>3</sup>	A. b.	la	lb	21
113A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
115A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
116A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
118A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
130A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
133A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
134A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
147A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
148A <sup>3</sup>	A. c.	IVb		
276T <sup>4</sup>	A. c.	IVb		
278T <sup>4</sup>	A. s.	la	II	50
284T <sup>4</sup>	A. s.	la	II	9
290T <sup>4</sup>	A. sp.	NO		
292C <sup>4</sup>	A. c.	NO		
311C <sup>4</sup>	A. c.	IVa		
418E <sup>4</sup>	A. c.	IVa		
419E <sup>4</sup>	A. c.	IVa		
420E <sup>4</sup>	A. c.	IVa		
431E <sup>4</sup>	A. sp.	VI		
435E <sup>4</sup>	A. c.	IVa		
442E <sup>4</sup>	A. c.	IVa		
444E <sup>4</sup>	A. c.	IVa		
555A <sup>5-1</sup>	A. b.	lb	lb	75
556A <sup>5-1</sup>	A. h. c.		lb	79
557A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	18
558A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68
559A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68
560A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	18
561A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57
562A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	56
563A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	23
564A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	17
565A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	19
566A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68
567A <sup>5-2</sup>	A. b.	la		
568A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
569A <sup>5-2</sup>	A. h. c.	la	lb	68
570A <sup>5-2</sup>	A. h. c.			
571A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
572A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	69
573A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
574A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	69
575A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
576A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
577A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68
578A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
579A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57
581A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	69
582A <sup>5-2</sup>	A. h. c.		lb	71
583A <sup>5-2</sup>	A. b.	lb	lb	63
584A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	65
585A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	66
586A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68
587A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	65
588A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
589A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	67
590A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71
591A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68
592A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	25
593A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	22
594A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	24
595A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	64
596A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71

Taula 25 (2/3). Taula resum dels estudis taxonòmic i de MLEE.

SOQUES	ESPÈCIE	PHENA		ET	SOQUES	ESPÈCIE	PHENA		ET
		Taxonomia	MLEE				Taxonomia	MLEE	
597A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	66	646A <sup>6-f</sup>	A. c.	IVb		
598A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	647A <sup>6-f</sup>	A. h. c.			
599A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	56	648A <sup>6-b</sup>	A. c.	IVb		
600A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	649A <sup>6-b</sup>	A. c.	IVb		
601A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	56	650A <sup>6-b</sup>	A. sp.			
602A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	72	651A <sup>6-b</sup>	A. sp.			
603A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	652A <sup>6-b</sup>	A. c.	IVb		
604A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	653A <sup>6-b</sup>	A. c.	IVb		
605A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	654A <sup>6-f</sup>	A. b.	la	lb	74
606A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	655A <sup>6-f</sup>	A. h. c.			
607A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	656A <sup>6-f</sup>	A. h. c.			
608A <sup>5-2</sup>	A. b.	la			664N <sup>7</sup>	A. c.	IVa		
609A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68	665N <sup>7</sup>	A. sp.	VII		
610A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71	668N <sup>7</sup>	A. c.	IVa		
611A <sup>5-2</sup>	A. b.	lb	la	3	670N <sup>7</sup>	A. s.	lc	II	26
612A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	684E <sup>7</sup>	A. c.	IVb		
613A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	56	705OP <sup>7</sup>	A. e.	II		
614A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	70	706OP <sup>7</sup>	A. c.	IVa		
615A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	59	707OP <sup>7</sup>	A. c.	IVa		
616A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	73	709OP <sup>7</sup>	A. sp.	V		
617A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	56	710OP <sup>7</sup>	A. so.	III		
618A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	711OP <sup>7</sup>	A. so.	III		
619A <sup>5-2</sup>	A. h. c.		lb	57	712OP <sup>7</sup>	A. so.	III		
620A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	68	713OP <sup>7</sup>	A. so.	III		
621A <sup>5-1</sup>	A. s.	lb	II	46	714OP <sup>7</sup>	A. so.	III		
622A <sup>5-1</sup>	A. b.	lb	lb	60	715OP <sup>7</sup>	A. s.	lc	II	4
623A <sup>5-1</sup>	A. h. c.		lb	78	723OP <sup>7</sup>	A. c.	IVa		
624A <sup>5-1</sup>	A. b.	lb	lb	52	733OP <sup>7</sup>	A. so.	III		
625A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	57	739E <sup>7</sup>	A. sp.	IVb		
626A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71	818E <sup>8</sup>	A. s.	la	II	27
627A <sup>5-2</sup>	A. b.	la	lb	71	819E <sup>8</sup>	A. c.	IVb		
628A <sup>5-2</sup>	A. s.	la	lb	54	820E <sup>8</sup>	A. c.	IVa		
630A <sup>5-1</sup>	A. b.	la	lb	61	821E <sup>8</sup>	A. s.	la	II	12
631A <sup>5-1</sup>	A. b.	la	lb	75	848T <sup>8</sup>	A. sp.	VI		
633A <sup>5-1</sup>	A. b.	la	lb	16	849T <sup>8</sup>	A. sp.	VI		
634A <sup>6-b</sup>	A. b.	la	lb	77	852T <sup>8</sup>	A. s.	lc	II	42
635A <sup>6-b</sup>	A. s.	lb	II	48	856T <sup>8</sup>	A. s.	lc	II	43
636A <sup>6-b</sup>	A. s.	lc	II	47	868E <sup>8</sup>	A. sp.	VII		
637A <sup>6-b</sup>	A. b.	la	lb	20	869N <sup>8</sup>	A. sp.	VI		
638A <sup>6-b</sup>	A. b.	la	lb	76	896O <sup>9</sup>	A. c.	IVa		
639A <sup>6-b</sup>	A. c.				899T <sup>9</sup>	A. sp.	NO		
640A <sup>6-b</sup>	A. s.	lb			900T <sup>9</sup>	A. h.	Id	IV	14
641A <sup>6-f</sup>	A. b.	la	lb	62	901T <sup>9</sup>	A. c.	IVa		
645A <sup>6-f</sup>	A. b.	la	lb	55	902T <sup>9</sup>	A. c.	IVa		

Taula 25 (3/3). Taula resum dels estudis taxonòmic i de MLEE.

SOQUES	ESPÈCIE	PHENA		ET	SOQUES	ESPÈCIE	PHENA		ET
		Taxonomia MLEE					Taxonomia MLEE		
912T <sup>9</sup>	A. sp.	NO			A19CI	A. c.	IVa		
924O <sup>9</sup>	A. sp.	NO			A20CI	A. sp.	III		
946N <sup>10</sup>	A. s.	Ib			A22CI	A. so.	III		
947N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			A23CI	A. h.	Id	IV	11
948N <sup>10</sup>	A. s.	Ib	II	49	A24CI	A. so.	III		
949N <sup>10</sup>	A. s.	Ib	II	6	CT812736A	A. h.	Ia	Ib	58
950N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			D2CI	A. c.	IVa		
951N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			D3CI	A. h.	Id	IV	37
952N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 405	E. c.	NO		
953N <sup>10</sup>	A. s.	Ib	II	5	CECT 514 <sup>T</sup>	V. c.	NO		
954N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 522 <sup>T</sup>	L. a.		NO	2
955N <sup>10</sup>	A. s.	Ib	II	29	CECT 838 <sup>T</sup>	A. c.	IVb		
956N <sup>10</sup>	A. c.	IVb			CECT 839 <sup>T</sup>	A. h.	Id	IV	38
958N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 894 <sup>T</sup>	A. s. s.	NO	II	41
962N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 896 <sup>T</sup>	A. s. m.		II	45
963N <sup>10</sup>	A. sp.	IVa			CECT 4199 <sup>T</sup>	A. a.	NO		
964N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4203 <sup>T</sup>	V. f.	NO	NO	1
965N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4224 <sup>T</sup>	A. eu.	IVb		
966N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4227 <sup>T</sup>	A. b.	Ia	Ib	53
967N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4228 <sup>T</sup>	A. j.	III		
968N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4232 <sup>T</sup>	A. m.	NO		
970N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4240 <sup>T</sup>	A. sch.	NO		
971N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4245 <sup>T</sup>	A. so.	III		
972N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4246	A. v. so.	NO		
991N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4255 <sup>T</sup>	A. t.	VIII	III	36
1020N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4257 <sup>T</sup>	A. v. v.	NO		
1021N <sup>10</sup>	A. c.	IVa			CECT 4342 <sup>T</sup>	A. e.	II		
1022N <sup>10</sup>	A. h. c.	Ic			CECT 4487 <sup>T</sup>	A. t.	VIII	III	10
1023N <sup>10</sup>	A. h. c.	Ic			LMG 17541 <sup>T</sup>	A. p.		Ic	33
A10CI	A. c.	IVa			LMG 17542	A. p.		Ic	33
A13CI	A. h.	Id	IV	13	LMG 17543	A. p.		Ic	35
A14CI	A. so.	III			LMG 17544	A. p.		Ic	30
A15CI	A. c.	NO			LMG 17545	A. p.		Ic	32
A17CI	A. h.	Ic	IV	39	LMG 17546	A. p.		Ic	31
A18CI	A. so.	III			LMG 17547	A. p.		Ic	34

A. a.: *Aeromonas allosaccharophila*, A. b.: *A. bestiarum*, A. c.: *A. caviae*, A. e.: *A. encheleia*, A. eu.: *A. eucrenophila*, A. h.: *A. hydrophila*, A. h. c.: *A. hydrophila* complex, A. j.: *A. jandaei*, A. m.: *A. media*, A. p.: *A. popoffii*, A. s.: *A. salmonicida*, A. s. m.: *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, A. s. s.: *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*, A. sch.: *A. schubertii*, A. so.: *A. sobria*, A. sp.: *Aeromonas* sp., A. t.: *A. trota*, A. v. so.: *A. veronii* biovar *sobria*, A. v. v.: *A. veronii* biovar *veronii*, E. c.: *Escherichia coli*, L. a.: *Listonella anguillarum*, V. c.: *Vibrio cholerae*, V. f.: *Vibrio furnissii*.

<sup>1</sup> Mostratge 1, <sup>2</sup> Mostratge 2, <sup>3</sup> Mostratge 3, <sup>4</sup> Mostratge 4, <sup>5-1</sup> Font 1 del Mostratge 5, <sup>5-2</sup> Font 2 del Mostratge 5, <sup>6-b</sup> Bassa del Mostratge 6, <sup>6-f</sup> Font del Mostratge 6, <sup>7</sup> Mostratge 7, <sup>8</sup> Mostratge 8, <sup>9</sup> Mostratge 9, <sup>10</sup> Mostratge 10.



## 5. DISCUSSIÓ

---



El gènere *Aeromonas* ha despertat un gran interès en la comunitat científica, com es demostra per la gran quantitat de publicacions que apareixen any rere any (147 citacions l'any 2001 en la base de dades MEDLINE). Aquest interès està motivat per diversos factors com són el seu caràcter cosmopolita, l'augment de la complexitat taxonòmica amb la contínua incorporació de noves espècies, la patogenicitat de les soques psicròfiles d'*A. salmonicida* i la patogenicitat oportunista d'altres espècies amb un controvertit paper en infeccions gastrointestinals humanes, entre altres aspectes. Les qüestions esmentades justifiquen la realització de nous estudis taxonòmics (MIÑANA-GALBIS i al. 2002), així com d'altres estudis com l'electroforesi d'enzims multilocus.

### 5.1. Medis d'aïllament.

De les soques aïllades en medi ADA, a partir de mostres d'aigua dolça, el 97 % es va identificar com a *Aeromonas* (Taula 13). Aquest excel·lent resultat confirma la idoneïtat d'aquest medi de cultiu per a la detecció i enumeració d'*Aeromonas* en aigües dolces (HAVELAAR i al. 1987, GAVRIEL i LAMB 1995), sent el medi de cultiu més emprat en els últims anys tant en mostres d'aigua dolça com en aliments (HÄNNINEN i al. 1997, BORRELL i al. 1998, FIORENTINI i al. 1998, GAVRIEL i al. 1998, NEYTS i al. 2000). El medi ADA també va ser el medi amb major eficàcia en l'aïllament d'*Aeromonas* a partir de mol·luscs bivalves encara que el percentatge va ser molt baix (15 %).

El medi AD va permetre l'aïllament de soques sensibles a l'ampicil·lina (*A. caviae* 292C, *Aeromonas* sp. 431E i *A. caviae* 964N). Encara que aquestes soques només representen el 3 % de les soques aïllades en AD, aquest percentatge és major al descrit per alguns autors ( $\leq 1$  % a HAVELAAR i al. 1987). Per una altra banda, altres soques incloses en l'estudi taxonòmic van mostrar sensibilitat a l'ampicil·lina (*A. caviae* A15Cl, *A. salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>, *A. media* CECT 4232<sup>T</sup>, *A. sobria* CECT 4245<sup>T</sup>, *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup> i *A. enteropelogenes* CECT 4487<sup>T</sup>). Altres estudis han detectat soques sensibles a l'ampicil·lina amb una major freqüència en determinades espècies, com *A. sobria* i *A. trota* (CARNAHAN i al. 1991b, PIN i al. 1994, SINGH i SANYAL

1994). Aquests resultats permeten recomanar AD en compte d'ADA per a estudis de la distribució de les diferents espècies del gènere *Aeromonas*.

En general, els enriquiments previs amb TSB i APW van proporcionar resultats similars als de la sembra sense enriquiment tant en el medi AD com en l'ADA (Taula 13). Per tant, en aquest treball l'ús de TSB i APW no va representar cap avantatge alhora d'aïllar *Aeromonas* spp.

Encara que en altres estudis el medi TCBS s'ha utilitzat per a l'aïllament i detecció d'*Aeromonas* en mostres d'aigua dolça (IVANOVA i al. 2001), d'aigua de mar i de mol·luscs (RIQUELME i al. 1996, CROCI i al. 2001); els resultats obtinguts en el present estudi (l'1 % de les soques seleccionades foren *Aeromonas* spp. i totes elles provenien d'un enriquiment previ) no fan recomanable el seu ús. Això no és d'estranyar ja que es tracta d'un medi selectiu recomanat per a l'aïllament de *Vibrio* spp.

## **5.2. Detecció i distribució d'*Aeromonas* spp. en les mostres analitzades.**

Les *Aeromonas* spp. poden ser detectades i aïllades d'una enorme varietat de tipus de mostra: aigües dolces, carns i productes lactis, mol·luscs i aigües marines, mostres clíniques, peixos, vegetals, etc (HOOD i al. 1983, KUEH i CHAN 1985, MOYER 1987, KUIJPER i al. 1989, RODRÍGUEZ i ANTILLÓN 1989, ALTWEGG i al. 1990, ARAUJO i al. 1990, ARAUJO i al. 1991, OLAFSEN i al. 1993, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HUYS i al. 1995, TSAI i CHEN 1996, HÄNNINEN i al. 1997, KÜHN i al. 1997*b*, BORRELL i al. 1998, FIORENTINI i al. 1998, GAVRIEL i al. 1998, LEGNANI i al. 1998, MELAS i al. 1999, WANG i SILVA 1999, NEYTS i al. 2000, CROCI i al. 2001, MASSA i al. 2001). Les espècies més freqüentment aïllades pertanyen als complexos fenotípics *A. caviae* (*A. caviae* HG4 i *A. media* HG5), *A. hydrophila* (*A. hydrophila* HG1, *A. bestiarum* HG2 i *A. salmonicida* HG3) i *A. sobria* (*A. veronii* bv. *sobria* HG8). Cal remarcar però, que en molts estudis (ARAUJO i al. 1991, HAVELAAR i al. 1992, RAMBOARINA i al. 1993, NOTERDAEME i al. 1996, MELAS i al. 1999, WANG i SILVA 1999, CROCI i al. 2001, MASSA i al. 2001) només es diferenciaven les espècies descrites per POPOFF en 1984, la qual cosa dificulta enormement la comparació de les dades entre diferents treballs.

En totes les mostres d'aigua dolça estudiades s'han detectat *Aeromonas* (Taula 15), resultats similars també es poden trobar a la literatura (HÄNNINEN i al. 1997, BORRELL i al. 1998). A més, un elevat percentatge de les soques aïllades (98 %) va poder ser identificat a nivell d'espècie i, en general, *A. bestiarum* va ser la principal espècie aïllada (68 %) (Figura 17). *A. caviae* va ser predominant en les aigües no potables (d'una font d'aigua del Preventori d'Alcoi i d'una bassa d'Hostalets), en canvi, *A. bestiarum* predominà en les altres tres aigües analitzades que, encara que són aigües no tractades, són consumides al no haver-hi cap indicació que recomane el contrari. Aquests resultats concorden amb l'augment en la prevalència d'*A. caviae* en aigües amb un elevat grau de contaminació fecal i la millor adaptació d'*A. hydrophila* a aigües nêtes o poc contaminades (ARAUJO i al. 1991, FIORENTINI i al. 1998). A més, en molts estudis s'ha observat també una major prevalència d'*A. caviae* en aigües no potables (RAMBOARINA i al. 1993, BORRELL i al. 1998, FIORENTINI i al. 1998, KAZNOWSKI 1998) i d'*A. bestiarum* en aigües potables (HÄNNINEN i SIITONEN 1995, BORRELL i al. 1998).

En mol·luscs bivalves, la presència d'*Aeromonas* es va demostrar en set de les nou espècies estudiades i en el 60 % dels mostratges de mol·luscs realitzats (Taula 15), percentatge superior a l'observat en altres estudis (del 50 % en TSAI i CHEN, 1996, i del 31 % en BORRELL i al., 1998). El 81 % de les soques d'*Aeromonas* aïllades va poder ser assignada a alguna de les espècies descrites. En general, *A. caviae* va ser l'espècie predominant, seguida d'*A. salmonicida* (Taula 15, Figura 18). Un fet sorprenent és que totes les soques *A. sobria* van ser aïllades d'ostres portugueses, on aquesta espècie fou predominant. A partir de mol·luscs, BORRELL i al. (1998) també van aïllar majoritàriament membres del complex fenotípic *A. caviae*, mentre en RODRÍGUEZ i ANTILLÓN (1989) va predominar la fenoespècie *A. hydrophila* (POPOFF 1984). Ara bé, hi ha molt pocs estudis sobre la distribució de les diferents espècies del gènere *Aeromonas* en mol·luscs bivalves, de fet no està descrit l'aïllament d'*Aeromonas* en navaixes i escopinyes; bivalves on s'han detectat *Aeromonas* en tots els mostratges i on més soques d'*Aeromonas* s'han aïllat a partir de mol·luscs en aquest estudi.

A partir de diferents mostres d'aigua del litoral no es va aconseguir aïllar cap *Aeromonas* malgrat haver analitzat un total de 249 soques. A la literatura els resultats respecte a l'aïllament d'*Aeromonas* d'aigua de mar són contradictoris. KUEH i CHAN (1985) i ORTIGOSA i al. (1994) no en van aïllar, en canvi, BORRELL i al. (1998) en van aïllar en el 83 % de les mostres. Altres autors han obtingut, a partir de mostres d'aigua de mar, recomptes importants d'*Aeromonas* de fins a  $10^4$  ufc/100 ml (NAKANO i al. 1990, BORRELL i al. 1998) i  $10^6$  ufc/100 ml (ARAUJO i al. 1990).

Les soques d'origen clínic obtingudes, *A. caviae*, *A. hydrophila* i *A. sobria*, es van identificar en proporcions idèntiques (Figura 19). Aquestes tres espècies coincideixen en ser les més freqüentment aïllades per altres autors a partir de mostres clíniques (JANDA i ABBOTT 1998).

### **5.3. Identificació i taxonomia numèrica del gènere *Aeromonas*.**

Es va fer una extensa recerca bibliogràfica però no es va trobar unanimitat de criteris en la identificació fenotípica de les diferents espècies del gènere *Aeromonas* (ALLEN i al. 1983, JANDA i al. 1984, POPOFF 1984, HICKMAN-BRENNER 1987, HICKMAN-BRENNER 1988, KUIJPER i al. 1989, ALTWEGG i al. 1990, CARNAHAN i al. 1991a, CARNAHAN i al. 1991b, CARNAHAN i al. 1991c, ABBOTT i al. 1992, FARMER III i al. 1992, KÄMPFER i ALTWEGG 1992, MARTÍNEZ-MURCIA i al. 1992b, CARNAHAN i JOSEPH 1993, RAMBOARINA i al. 1993, HOLT i al. 1994, OGDEN i al. 1994, SUGITA i al. 1994, ESTEVE 1995, ESTEVE i al. 1995c, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, JANDA i al. 1996, NOTERDAEME i al. 1996, OAKEY i al. 1996a, HÄNNINEN i al. 1997, HUYS i al. 1997a, HUYS i al. 1997b, KAZNOWSKI 1997, KAZNOWSKI 1998).

En aquest estudi, 16 proves fenotípiques (Taula 14) van ser suficients per a la identificació del 91 % de les soques mesòfiles del gènere *Aeromonas* estudiades, elevat percentatge comparable amb altres estudis que han utilitzat entre 25 i 40 proves fenotípiques en la identificació d'*Aeromonas* (ABBOTT i al. 1992, JANDA i al. 1996, OAKEY i al. 1996a, BORRELL i al. 1998, CARSON i al. 2001). Totes aquestes proves fenotípiques, excepte la de la hidròlisi de

midó, s'han emprat amb propòsits identificatius en la bibliografia consultada. És possible que la no inclusió de la hidròlisi de midó en les taules identificatives consultades obeïsca a dues raons principals: 1) POPOFF (1984) va descriure al *Bergey's Manual*<sup>®</sup> of *Systematic Bacteriology* que el gènere *Aeromonas* hidrolitza midó, i 2) la majoria d'estudis fan servir bateries de proves fenotípiques comercials on no s'inclou aquesta prova. Els resultats de la LDC en *A. encheleia*, de la fermentació d'arabinosa en *A. veronii* biovar *sobria*, i de la hidròlisi de midó en *A. allosaccharophila* i *A. veronii* biovar *sobria* (Taula 14), són discrepants amb els dels estudis consultats. Els medis emprats i la temperatura i el temps d'incubació podrien explicar les diferències observades (ALTWEGG i al. 1987, HOLT i al. 1994).

Diversos autors han demostrat que la fermentació de ramnosa i sorbitol, l'assimilació d'àcid urocànic, lactat i *n*-acetil glucosamina, i el creixement a 40,5°C són útils per a la diferenciació fenotípica de les espècies del complex *A. hydrophila* (Taula 3) (ALTWEGG i al. 1990, ALTWEGG i LÜTHY-HOTTENSTEIN 1991, ABBOTT i al. 1992, KÄMPFER i ALTWEGG 1992, HÄNNINEN 1994, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HÄNNINEN i al. 1995, JANDA i al. 1996, KAZNOWSKI 1997, KAZNOWSKI 1998). En aquest estudi es van emprar la fermentació de sorbitol i l'assimilació de lactat per a la discriminació d'*A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2) i *A. salmonicida* (HG3).

L'estudi de taxonomia numèrica va agrupar totes les soques mesòfiles que pertanyen al complex *A. hydrophila* en el *phenon* I i, en general, va permetre separar les tres espècies del complex en diferents subgrups, així s'observa el 94 % de les soques *A. bestiarum* en el subgrup Ia, el 76 % de les *A. salmonicida* mesòfiles en els subgrups Ib i Ic, i el 71 % de les *A. hydrophila* en el subgrup Id (Figura 21). L'única soca del complex *A. hydrophila* que no va quedar agrupada en el *phenon* I va ser la soca tipus *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> (Figura 20), resultat similar a l'obtingut en altres estudis taxonòmics (ESTEVE 1995, NOTERDAEME i al. 1996).

En el complex *A. caviae* resulta molt difícil la diferenciació fenotípica entre *A. caviae* (HG4) i les soques mòbils i no pigmentades de l'espècie *A. media* (HG5A). De tots els estudis que s'han realitzat fins ara, únicament l'assimilació de lactat i el creixement a 40,5°C semblen poder diferenciar

aquestes soques (ALTWEGG i al. 1990, ALTWEGG i LÜTHY-HOTTENSTEIN 1991, KÄMPFER i ALTWEGG 1992, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HÄNNINEN i al. 1995). Però en aquest estudi, la soca tipus d'*A. caviae* no va créixer amb lactat com a única font de carboni i energia, contràriament al que s'esperava. Per aquest motiu, totes les soques amb el perfil fenotípic d'*A. caviae* (Taula 14) van ser identificades com a *A. caviae* (HG4), independentment del resultat obtingut en l'assimilació de lactat. A més, els percentatges obtinguts en la producció de sulfhídric de cisteïna (11 %) i en l'ADH (65 %), són el més alt i el més baix, respectivament, dels descrits fins ara en la literatura. Per una altra banda, l'estudi de taxonomia numèrica (Figura 21) va agrupar el 98 % de les soques *A. caviae* en el *phenon* IV, però no va aconseguir separar *A. eucrenophila* d'*A. caviae* a causa de la semblança fenotípica entre totes dues espècies (AUSTIN i al. 1989). En canvi, la soca tipus *A. media* CECT 4232<sup>T</sup> (HG5B) va quedar distant del *phenon* IV (Figura 20), resultat similar a l'obtingut per NOTERDAEME i al. (1996).

*A. sobria* (HG7) i *A. veronii* bv. *sobria* (HG8) estan descrites com a espècies no diferenciables fenotípicament excepte per la temperatura màxima de creixement (HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HÄNNINEN i al. 1995, HUYS i al. 1996c). En aquest estudi, tres proves (hidròlisi de midó, fermentació d'arabinosa i assimilació de citrat) han permès separar fenotípicament les soques identificades com a *A. sobria* (*phenon* III) de la soca *A. veronii* bv. *sobria* CECT 4246 (no agrupada, però pròxima al *phenon* III) (Figura 20). Malgrat aquests resultats, el fet d'haver identificat quatre soques aïllades de mostres clíniques com a *A. sobria* posa en dubte la validesa de la separació fenotípica entre *A. sobria* i *A. veronii* bv. *sobria* abans esmentada, ja que mai no s'ha aïllat cap soca *A. sobria* d'origen clínic (HÄNNINEN i SIITONEN 1995, HUYS i al. 1996c). A més, dues de les proves que permeten la diferenciació entre les dues espècies en aquest estudi (Taula 14), mostren resultats contradictoris amb la bibliografia consultada per a *A. veronii* bv. *sobria*. Per una altra banda, la soca tipus *A. jandaei* CECT 4228<sup>T</sup> va quedar agrupada en el *phenon* III (Figura 21), de manera similar als resultats obtinguts per NOTERDAEME i al. (1996) i d'acord amb l'estreta relació fenotípica entre *A. jandaei* i *A. sobria* (JANDA 1991).



Les soques *A. enteropelogenes* CECT 4487<sup>T</sup> i *A. trota* CECT 4255<sup>T</sup> s'han agrupat en un mateix *phenon* (VIII) (Figura 21), en concordança amb estudis filogenètics (COLLINS i al. 1993).

D'acord amb estudis taxonòmics previs, els resultats obtinguts per taxonomia numèrica no van estar en total consonància amb la identificació de les espècies estudiades (KÄMPFER i ALTWEGG 1992, CARNAHAN i JOSEPH 1993, ESTEVE 1995, NOTERDAEME i al. 1996, KAZNOWSKI 1997). La identificació basada en una o dues característiques fenotípiques no mostra la diversitat ambiental real i dificulta la comparació de resultats entre laboratoris diferents. En aquest estudi, es fa palesa la necessitat de trobar altres proves fenotípiques per a separar amb major eficiència espècies semblants fenotípicament però no genèticament, principalment *A. caviae* HG4 - *A. media* HG5A - *A. eucrenophila* HG6 i *A. sobria* HG7 - *A. veronii* bv. *sobria* HG8 - *A. jandaei* HG9. A més, l'actual designació d'espècies en el gènere *Aeromonas* necessita d'una uniformitat de criteris (Taula 2): en algunes ocasions un únic grup d'hibridació inclou soques fenotípicament diferents (per exemple, soques psicròfiles i mesòfiles en *A. salmonicida* HG3 i soques mòbils no pigmentades i immòbils i pigmentades en *A. media* HG5), en altres, soques idèntiques genotípicament tenen grups d'hibridació diferents perquè són diferents fenotípicament (*A. veronii* bv. *sobria* HG8 i *A. veronii* bv. *veronii* HG10) i, per últim, algunes soques no diferenciables fenotípicament pertanyen a grups d'hibridació diferents (*A. sobria* HG7 i *A. veronii* bv. *sobria* HG8) (JANDA 1991, JANDA i ABBOTT 1998).

Per una altra banda, fóra desitjable la realització d'estudis complementaris en les soques no identificades, sobretot en aquelles que estan agrupades en els *phena* V, VI i VII, per a determinar si realment són espècies noves del gènere *Aeromonas*. A més, totes les soques d'aquests *phena* van ser aïllades a partir de diferents espècies de mol·luscs, tipus de mostra on hi ha un major percentatge de soques d'*Aeromonas* no identificades a nivell d'espècie (19 %). Aquests resultats i el fet d'haver-hi pocs estudis sobre la distribució d'*Aeromonas* spp. en mol·luscs bivalves suggereixen que aquest tipus de mostra podria ser una font de noves espècies del gènere *Aeromonas*.

#### 5.4. *Aeromonas* com a possible patogen.

Diversos factors de virulència (exotoxines, LPS, fimbries, capa S, càpsula, resistència al sèrum, plasmidis de resistència a antibiòtics, etc) s'han relacionat amb la patogenicitat i la capacitat d'adaptació al medi del gènere *Aeromonas* (JANDA 1991, MERINO i al. 1995, PEMBERTON i al. 1997). D'entre les exotoxines, s'han descrit diverses  $\beta$ -hemolisines citotòxiques i enterotòxiques (ASAO i al. 1984, ASAO i al. 1986, ROSE i al. 1989*b*, FERGUSON i al. 1997) i l'activitat elastasa s'ha correlacionat amb la virulència d'*Aeromonas* en peixos (ESTEVE i al. 1995*a*, CASCÓN i al. 2000). A més, diversos autors han demostrat que la producció d'hemolisines i citotoxines és independent de l'origen de les soques (NAKANO i al. 1990, SINGH i SANYAL 1992, HANDFIELD i al. 1996, KÜHN i al. 1997*a*) i possible a temperatures de refrigeració (MERINO i al. 1995, TSAI i CHEN 1996, TSAI i al. 1997).

De totes les *Aeromonas* spp. descrites, únicament la fenoespècie *A. salmonicida* psicròfila i immòbil es considera paràsita estricta (POPOFF 1984). Altres fenoespècies (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. jandaei*) són patògenes oportunistes de peixos, mol·luscs i vertebrats (MCGAREY i al. 1991, FARMER III i al. 1992, ESTEVE i al. 1995*a*, RIQUELME i al. 1996), i cinc espècies són considerades patògenes oportunistes en humans (*A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* bv. *sobria*, *A. jandaei*, *A. veronii* bv. *veronii*, *A. schuberti*) (Taula 2), representant *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. veronii* bv. *sobria*  $\geq 85$  % de totes les soques clíniques aïllades (JANDA i ABBOTT 1998). Per una altra banda, i en base als resultats obtinguts de LD<sub>50</sub> en ratolins, JANDA i KOKKA (1991) van classificar les espècies conforme al seu grau de patogenicitat, mostrant que les espècies més virulentes són les abans esmentades excepte *A. caviae*, espècie habitualment descrita com poc virulenta (FARMER III i al. 1992, JANDA 1998), encara que altres estudis han demostrat la seua capacitat d'adherència i de producció d'enterotoxines i citotoxines, influenciada per diversos factors ambientals (temps i temperatura d'incubació, medi de cultiu i altres factors), fet que explicaria els resultats obtinguts en aquests altres estudis i que estaria en consonància amb l'adaptació a un particular ambient (NAMDARI i BOTTONE 1990, SINGH i SANYAL 1992, THORNLEY i al. 1996, SANTOS i al. 1999).

En aquest estudi s'ha demostrat que la majoria de soques de les espècies *A. hydrophila*, *A. bestiarum* i *A. salmonicida* presenten activitat per als dos factors de patogenicitat estudiats ( $\beta$ -hemòlisi i producció d'elastasa) (Taula 18). D'aquestes tres espècies, *A. bestiarum* i *A. salmonicida* (soques mesòfiles) són considerades espècies ambientals amb escassa importància clínica i patogènica (Taula 2) (JANDA i KOKKA 1991, KIROV i al. 1994, JANDA i ABBOTT 1998). En canvi, i d'acord amb els resultats presentats, en molts estudis s'han detectat diversos factors de virulència ( $\beta$ -hemòlisi, producció d'elastasa, citotoxina) en la majoria de les soques d'aquestes dues espècies (KUIJPER i al. 1989, RAMBOARINA i al. 1993, NOTERDAEME i al. 1996, KAZNOWSKI 1997, KAZNOWSKI 1998) i en altres estudis, on no es diferenciaven les tres espècies del complex *A. hydrophila*, també es va mostrar que la majoria de soques *A. hydrophila* produïen enterotoxines, hemolisines i citotoxines (TURNBULL i al. 1984, POTOMSKI i al. 1987, NAKANO i al. 1990, SINGH i SANYAL 1992, TSAI i CHEN 1996). D'aquesta manera, tot indica que *A. bestiarum* i les soques mesòfiles d'*A. salmonicida* també haurien de ser considerades patògenes oportunistes.

Altres espècies no patogèniques també presenten activitat hemolítica (*A. eucrenophila* i *A. trota*), en canvi, no manifesten aquesta activitat ni *A. schubertii* ni la majoria de soques *A. caviae* analitzades. Altres estudis també indiquen que espècies com *A. eucrenophila*, *A. media* i *A. trota* podrien ser potencialment patogèniques (MAKI i al. 1998, SANTOS i al. 1999).

És possible que totes les *Aeromonas* spp. siguin patògenes oportunistes encara que amb diferent grau de virulència. De tota manera, els factors de virulència que actualment es consideren són insuficients per a explicar la patogenicitat d'*Aeromonas*, entre altres coses perquè s'ha de tenir present que la patogenicitat és un fenomen complex on intervien i interaccionen múltiples factors tant ambientals com bacterians i immunològics (NAKANO i al. 1990, JANDA 1991, FARMER III i al. 1992, SINGH i SANYAL 1992, THORNLEY i al. 1996, JANDA i ABBOTT 1998).

En la literatura es poden trobar diversos fets que fan recomanable la introducció de l'anàlisi d'*Aeromonas* en les reglamentacions tecnicosanitàries de mol·luscs i d'aigües potables, recreatives i de piscifactories:

- a) Les infeccions humanes per *Aeromonas* estan causades pel contacte de ferides i cremades amb aigua o sòl contaminats o pel consum d'aigua o aliments contaminats (FARMER III i al. 1992, MERINO i al. 1995, JANDA i ABBOTT 1998).
- b) S'ha demostrat que no hi ha correlació entre el recompte d'*Aeromonas* i els indicadors fecals d'aigües potables i recreatives, recomanant diversos autors la monitorització d'*Aeromonas* en aigües potables, recreatives i d'ús en aqüicultura (BURKE i al. 1984, ARAUJO i al. 1989, ARAUJO i al. 1990, FIORENTINI i al. 1998, LEGNANI i al. 1998, MASSA i al. 2001). Així, s'ha incorporat el recompte d'*Aeromonas* en l'índex de qualitat bacteriològica de l'aigua potable en alguns països com Holanda i Itàlia (LEGNANI i al. 1998, MASSA i al. 2001).
- c) Encara que la cloració disminueix ràpidament la població d'*Aeromonas*, després pot haver-hi un revifament, probablement afavorit per l'existència de biofilms (GRAVIEL i al. 1998, SISTI i al. 1998). Aquest problema en la potabilització de l'aigua pot agreujar-se en els mesos càlids, ja que normalment l'augment en el recompte d'*Aeromonas* es correlaciona amb l'augment de la temperatura (BURKE i al. 1984, GAVRIEL i al. 1998, SISTI i al. 1998).
- d) La densitat elevada d'*Aeromonas* en l'ambient aquàtic és indicativa del nivell tròfic de l'aigua (correlaciona amb el contingut de matèria orgànica) i, per tant, podria emprar-se com a indicador biològic del grau de qualitat de l'aigua (RIPPEY i CABELLI 1989, ARAUJO i al. 1991, FIORENTINI i al. 1998). A més, el material particulat en l'aigua pot proporcionar protecció davant protozous, als quals *Aeromonas* és molt susceptible de ser depredat (PETTIBONE 1998).
- e) L'increment de matèria orgànica i l'augment de la temperatura contribueixen a una significativa proliferació d'*Aeromonas*, predisposant els animals aquàtics a l'aparició d'epizoòties (RIQUELME i al. 1996).

- f) Les *Aeromonas* spp. poden suposar un risc per a la salut pública en la refrigeració continuada d'aliments ja que poden créixer a baixes temperatures (POPOFF 1984) i produir toxines a 5°C (OLAFSEN i al. 1993, TSAI i al. 1997).
- g) Diversos autors han demostrat la capacitat patogènica d'*Aeromonas* en mol·luscs (BAYNE 1984, RIQUELME i al. 1996, MAKI i al. 1998).
- h) Tampoc no hi ha correlació amb els indicadors fecals ni amb patògens potencials (per ex., *Vibrio cholerae*) en mol·luscs (HACKNEY i al. 1980, HOOD i al. 1983), que podrien actuar com a reservori d'*Aeromonas* (MAKI i al. 1998). A més, el consum de mol·luscs crus o poc cuits, com en el cas de les ostres, suposa un risc de salut pública (KUEH i CHAN 1985, TSAI i CHEN 1996).

En aquest estudi, l'aïllament d'una espècie patògena oportunista en humans (*A. caviae*) i de dues espècies (*A. bestiarum*, *A. salmonicida*) amb factors de virulència ( $\beta$ -hemòlisi i producció d'elastasa) en les mostres d'aigua dolça i de mol·luscs confirmen la necessitat de la monitorització d'*Aeromonas* en aigües (potables, recreatives, de piscifactories) i en aliments que van a ser consumits crus o poc cuits.

### **5.5. Loci analitzats i diversitat genètica.**

Hi ha pocs treballs que hagen aplicat la tècnica MLEE al gènere *Aeromonas* (ALTWEGG i al. 1991, TONOLLA i al. 1991). En aquests treballs es va aplicar aquesta tècnica per a la determinació de la diversitat genètica i la diferenciació de les espècies del gènere *Aeromonas*. En canvi, en l'estudi que es presenta l'aplicació de la MLEE s'ha enfocat fonamentalment en la determinació de l'estructura genètica de les poblacions d'*Aeromonas* tot i que alguns loci s'han mostrat com a bons marcadors per a la separació de les espècies d'aquest gènere bacterià.

En aquest estudi s'han analitzat, en gels de poliacrilamida, 15 enzims en una població de 122 soques (principalment *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida* i *A. popoffii*). TONOLLA i al. (1991) van estudiar la variació al·loenzimàtica de 16 enzims en una població de 127 soques d'*Aeromonas* (principalment *A. hydrophila*, *A. sobria* i *A. caviae*), mentre ALTWEGG i al. (1991) analitzaren 11 loci enzimàtics en una població de 153 *Aeromonas* spp. (HG 1 a 12), utilitzant-se en tots dos casos gels de midó (Taula 26). En comparar els enzims seleccionats en els tres treballs, es pot observar que aquest estudi coincideix amb set enzims (ALD, EST, GOT, IDH, IPO, LAP i MDH) amb TONOLLA i al. (1991) i amb cinc enzims (IDH, IPO, MDH, ME i NSP) amb ALTWEGG i al. (1991). En general, els gels de poliacrilamida han resultat en un major nombre d'al·lels per locus, la qual cosa és consistent amb l'obtenció de major polimorfisme en gels de poliacrilamida que en gels de midó.

**Taula 26.** Comparació dels estudis de la tècnica MLEE aplicada al gènere *Aeromonas*.

	ALTWEGG i al. (1991)	TONOLLA i al. (1991)	TESI
Tipus de gels	Midó	Midó	Poliacrilamida
Població d' <i>Aeromonas</i>	153 soques	127 soques	120 soques
Núm. loci	11	16	15
Diversitat genètica ( <i>H</i> )	0,65	0,65	0,64
Principals espècies (núm. soques)	<i>A.h.</i> (15), <i>A.b.</i> (7), <i>A.s.</i> (9), <i>A.c.</i> (43), <i>A.m.</i> (26), <i>A.v.s.</i> (30)	<i>A.h.</i> (39), <i>A.c.</i> (35), <i>A.so.</i> (40)	<i>A.h.</i> (7), <i>A.b.</i> (75), <i>A.s.</i> (24), <i>A.p.</i> (7)

*A.b.*: *A. bestiarum*, *A.c.*: *A. caviae*, *A.h.*: *A. hydrophila*, *A.m.*: *A. media*, *A.p.*: *A. popoffii*, *A.s.*: *A. salmonicida*, *A.so.*: *A. sobria*, *A.v.s.*: *A. veronii* biovar *sobria*.

La freqüència d'al·lels nuls en els diferents loci va ser baixa (entre 0 i 0,057), exceptuant els loci C120, C230 i EST2, i similar a l'obtinguda per TONOLLA i al. (1991) (0 – 0,039) i ALTWEGG i al. (1991) (0 – 0,065). L'elevada freqüència d'al·lels nuls en els loci C120 (0,730) i EST2 (0,508) podria

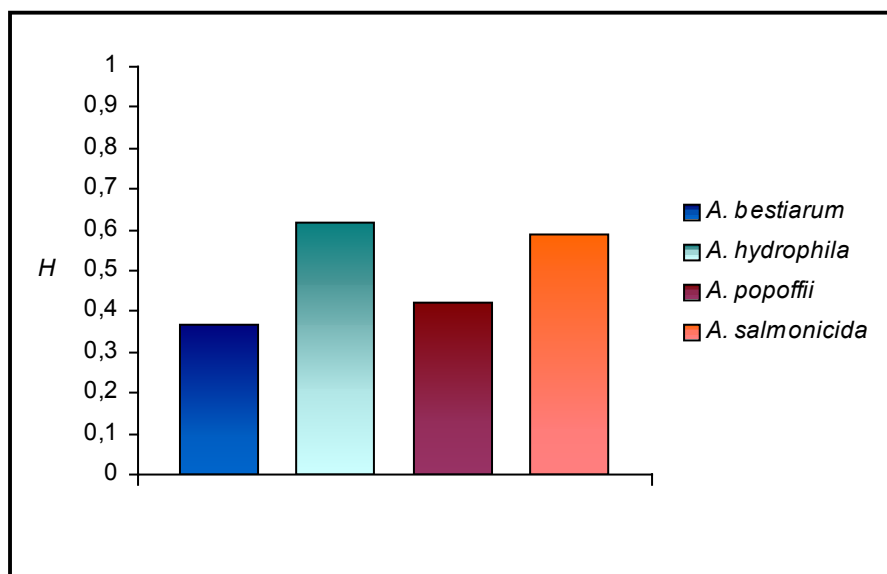
explicar-se per la presència de dos loci amb una funció enzimàtica equivalent (C120 i C230, EST1 i EST2). El fet que en la majoria de soques analitzades no es detecte algun dels enzims, també ha sigut descrit prèviament en altres espècies bacterianes com *Pseudomonas stutzeri* (RIUS i al. 2001) i *Helicobacter pylori* (GO i al. 1996).

La diversitat genètica ( $H$ ) obtinguda en tots els treballs és pràcticament idèntica (Taula 26), dada sorprenent ja que hi ha diferències en quant al tipus de gel emprat, enzims analitzats i població estudiada (espècies i nombre i origen de les soques). Aquests resultats coincidents posen en entredit la crítica que alguns autors fan sobre la tècnica MLEE en el sentit de la seua manca de reproductibilitat (MAIDEN i al. 1998). Per una altra banda, la diversitat genètica d'*Aeromonas* se situa en un valor intermedi respecte d'altres gèneres i espècies bacterians i similar a la de *Salmonella* i *Bradyrhizobium* (Taula 27).

**Taula 27.** Diversitat genètica mitjana ( $H$ ) d'alguns gèneres i espècies bacterians.

ESPÈCIES	$H$	REFERÈNCIES
<i>Aeromonas</i>	0,64	Tesi
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0,25	MUSSER i al. 1987
<i>Bradyrhizobium</i>	0,69	BOTTOMLEY i al. 1994
<i>Escherichia coli</i>	0,34-0,54	SELANDER i al. 1987
<i>Helicobacter pylori</i>	0,74	GO i al. 1996
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,41	O'ROURKE i STEVENS 1993
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0,88	RIUS i al. 2001
<i>Salmonella</i>	0,63	BOYD i al. 1996
<i>Serratia marcescens</i>	0,34	GARGALLO-VIOLA 1989
<i>Vibrio cholerae</i>	0,50	FARFÁN i al. 2000

En considerar les diversos subpoblacions de la població d'*Aeromonas* spp. analitzada, es pot observar que *A. bestiarum* i *A. popoffii* presenten menor diversitat genètica que *A. salmonicida* i *A. hydrophila* (Taula 20, Figura 38). Aquestes diferències bé podrien explicar-se per l'origen més divers de les soques *A. hydrophila* i *A. salmonicida*.

**Figura 38.** Diversitat genètica mitjana ( $H$ ) de les espècies d'*Aeromonas* estudiades.

### 5.6. Relació genètica entre ETs.

Les principals agrupacions formades en el dendrograma de la relació genètica entre ETs s'han definit a una distància genètica  $\leq 0,7$  (Figura 36) i s'han pogut associar clarament amb les espècies *A. bestiarum* / *A. popoffii* (grup I), *A. salmonicida* (grup II), *A. trota* (grup III) i *A. hydrophila* (grup IV) (Taula 23). Alhora, les agrupacions formades en el grup I a una distància genètica  $\leq 0,6$  permeten associar *A. bestiarum* amb el subgrup Ib i *A. popoffii* amb el subgrup Ic.

La diferenciació entre les espècies *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2) i *A. salmonicida* (HG3) va ser primerament descrita mitjançant la tècnica d'hibridació DNA-DNA (POPOFF i al. 1981) i posteriorment per altres tècniques com la MLEE (ALTWEGG i al. 1991), la ribotipificació (MARTINETTI-LUCCHINI i ALTWEGG 1992, HÄNNINEN i SIITONEN 1995, DEMARTA i al. 1999), el AFLP (HUYS i al. 1996b, HUYS i al. 1996c, JANSSEN i al. 1996) i el RFLP (FIGUERAS i al. 2000), encara que *A. bestiarum* i *A. salmonicida* estan estretament relacionades tant genèticament (HÄNNINEN 1994, KAZNOWSKI 1998) com filogenèticament (Figura 8) (MARTÍNEZ-MURCIA i al. 1992a). La tècnica MLEE ha agrupat conjuntament les soques psicròfiles i immòbils i les



soques mesòfiles i mòbils de l'espècie *A. salmonicida*, d'acord amb el fet de pertànyer al mateix grup d'hibridació (Taula 2) (ALTWEGG i al. 1990) i contràriament als resultats obtinguts en l'estudi taxonòmic. A més, aquesta tècnica ha mostrat una clara separació entre *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2) i *A. salmonicida* (HG3), en concordança amb l'existència diferenciada d'aquestes tres espècies.

L'espècie *A. popoffii* va ser inicialment descrita com a "A. bestiarum-like" i va ser considerada com a nova espècie d'*Aeromonas* en base a anàlisis d'hibridació DNA-DNA, proposant-se el nom d'*A. popoffii* (HUYS i al. 1997b). L'estudi que ens ocupa posa de manifest l'estreta relació entre les soques *A. popoffii* i *A. bestiarum*, de manera molt similar a l'anàlisi de AFLP (HUYS i al. 1996c) i d'acord amb els resultats d'homologia DNA-DNA entre aquestes espècies (HUYS i al. 1997b).

D'acord amb la idèntica seqüència del rRNA 16S (COLLINS i al. 1993) i amb altres estudis moleculars (HUYS i al. 1996b, BORRELL i al. 1997), les soques tipus d'*A. trota* i *A. enteropelogenes* formen un grup diferenciat en el dendrograma (Figura 36).

En estudis anteriors on s'ha aplicat la tècnica MLEE al gènere *Aeromonas*, algunes espècies no van formar grups diferenciats en els dendrogrames respectius (Taula 28). En l'estudi de TONOLLA i al. (1991), on *A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria* foren considerades conforme a la descripció de POPOFF (1984), les soques *A. hydrophila* i *A. sobria* estaven disperses en diversos grups en el dendrograma i coexistien en la majoria d'aquests grups, la soca de referència d'*A. eucrenophila* s'agrupava amb soques *A. hydrophila* i *A. sobria* i la soca de referència d'*A. media* va quedar inclosa en el grup d'*A. caviae*. Per una altra banda, en ALTWEGG i al. (1991) les soques *A. media* HG5A i *A. veronii* bv. *sobria* HG8 van distribuir-se en diversos grups, alguns dels quals compartits amb altres espècies com *A. sobria* HG7, *A. jandaei* HG9 i soques HG11.

**Taula 28.** Distribució de les espècies del gènere *Aeromonas* en el dendrograma dels diferents estudis on s'ha aplicat la tècnica MLEE.

ESPÈCIES	ALTWEGG i al. (1991)	TONOLLA i al. (1991)	TESI
<i>A. hydrophila</i>	VI (1), XI (11), XII (2), n (1)	I (15), II (2), III (12), V (4), VII (6)	Ib (1), IV (6)
<i>A. bestiarum</i>	XIV (7)	-	Ia (1), Ib (73), II (1)
<i>A. salmonicida</i>	V (7), n (2)	-	Ia (1), Ib (1), II (22)
<i>A. caviae</i>	VI (43)	IV (35)	-
<i>A. media</i> (HG5A)	I (1), II (12), VII (2), IX (1), n (2)	-	-
<i>A. media</i> (HG5B)	VIII (7), n (1)	IV (1)	-
<i>A. eucrenophila</i>	X (2)	II (1)	-
<i>A. sobria</i>	I (2)	II (3), III (2), V (26), VII (9)	-
<i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i>	I (3), III (5), IV (17), XIII (1), n (4)	-	-
<i>A. jandaei</i>	IV (2)	-	-
<i>A. veronii</i> bv. <i>veronii</i>	-	VI (1)	-
HG11	IX (2)	-	-
<i>A. schubertii</i>	XV (2)	VIII (1)	-
<i>A. trota</i>	-	-	III (2)
<i>A. popoffii</i>	-	-	Ic (7)

Els grups formats en els dendrogrames de les relacions genètiques entre ETs s'indiquen en números romans, el nombre de soques s'indica entre parèntesi, n: soques no agrupades.

En aquest estudi, el dendrograma permet, a més, una molt bona associació de les soques respecte de la seua font d'aïllament (Taula 21): soques aïllades d'aigües dolces (97 % en el grup I), soques aïllades de mol·luscs bivalves (90 % en el grup II) i soques clíniques (totes en els grups III i IV). En l'estudi de TONOLLA i al. (1991), la majoria de les soques també es van agrupar d'acord amb llur origen encara que amb percentatges més baixos (el 88 % de les soques clíniques i el 72 % de les ambientals).

### 5.7. Anàlisi del desequilibri de lligament.

L'estudi que es presenta és el primer que analitza l'estructura poblacional d'*Aeromonas* spp. Per a determinar l'estructura genètica de la població d'*Aeromonas* es va aplicar un estadístic, l'índex d'associació ( $I_A$ ), que permet calcular el grau d'associació que hi ha entre els loci estudiats i analitzar si algunes combinacions d'al·lels es repeteixen amb una freqüència major de la que caldria esperar com a conseqüència de l'atzar.

Els valors d' $I_A$  obtinguts van ser sempre significativament diferents de zero, tant en considerar la població estudiada globalment com en diferents subgrups (a excepció d'*A. salmonicida*) (Taula 22), la qual cosa permet suggerir que aquesta població d'*Aeromonas* està en desequilibri de lligament o, dit d'una altra manera, que es tracta d'una població clonal. De fet, els valors de la variància obtinguts experimentalment ( $V_O$ ) cauen fora de l'interval de valors de la variància teòrics ( $V_E$ ) que caldria esperar en una població on la recombinació permetera una lliure associació d'al·lels (població panmíctica o en equilibri de lligament).

Encara que l'estructura poblacional d'*Aeromonas* sembla ser clonal, pot existir recombinació, però aquesta no seria suficient com per trencar l'estructura clonal de la població. No obstant això, l'existència d'un fort desequilibri de lligament podria explicar-se si es té en consideració que, com en altres grups bacterians, *Aeromonas* forma una metapoblació integrada per múltiples poblacions. Aquestes poblacions ocuparien diferents nínxols ecològics on la recombinació, encara que possible en una mateixa població, seria absent o poc comú entre poblacions diferents (YOUNG 1989, MAYNARD-SMITH i al. 1991, REEVES 1992). Així i tot, quan es va calcular l' $I_A$  d'un grup de soques *A. bestiarum* que provenia d'una mateixa font d'aïllament (60 soques en 22 ETs, Taula 22), aquesta població també mantenia una estructura clonal. Aquesta dada suggereix que la recombinació té una influència escassa en l'estructura poblacional de l'espècie *A. bestiarum* i probablement en la del gènere *Aeromonas*.

### **5.8. Correlació MLEE – identificació fenotípica.**

Alguns autors han utilitzat la tècnica MLEE per a la diferenciació d'*Aeromonas* spp. TONOLLA i al. (1991) van discriminar les tres espècies clàssiques d'*Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. caviae* i *A. sobria*) amb tres enzims (ADK -adenilat quinasa-, GP1 i MDH), mentre ALTWEGG i al. (1991) van separar 12 grups d'hibridació mitjançant uns altres tres enzims (GP1, MDH i NSP).

En aquest estudi, cinc loci (EST1, HEX, IDH, LDH1 i MDH) permeten una excel·lent discriminació de les espècies *A. hydrophila* (HG1), *A. bestiarum* (HG2), *A. salmonicida* (HG3), *A. trota* (HG14) i *A. popoffii* (HG17), amb una correlació del 94 % (108 de 115 soques) amb la identificació fenotípica.

Aquests resultats demostren la vàlua de la tècnica MLEE no només per a l'anàlisi de l'estructura genètica de poblacions bacterianes sinó també per a la identificació de soques d'*Aeromonas* mitjançant un limitat nombre de marcadors enzimàtics. Per tant, aquesta tècnica pot servir de complement a les proves bioquímiques en la identificació de les espècies del gènere *Aeromonas*, a l'igual que s'han emprat altres tècniques com la ribotipificació, el AFLP i el RFLP amb el mateix propòsit (ALTWEGG i LÜTHY-HOTTENSTEIN 1991, MARTINETTI-LUCCHINI i ALTWEGG 1992, JANSSEN i al. 1996, HUYS i al. 1996b, HÄNNINEN i al. 1997, FIGUERAS i al. 2000).

## 6. CONCLUSIONS

---



1. S'han aïllat un total de 199 soques del gènere *Aeromonas*, identificant-se a nivell d'espècie el 91 % de les soques del gènere *Aeromonas* estudiades.
2. El medi ADA (agar dextrina ampicil·lina) és el més eficient dels utilitzats en l'aïllament d'*Aeromonas*. En totes les mostres d'aigua dolça, escopinyes, navaixes i tellines s'han detectat *Aeromonas*, així com en algunes mostres de musclos, ostres i ostres portugueses.
3. La separació fenotípica de les espècies *A. caviae* (HG4) – *A. media* (HG5A) i *A. sobria* (HG7) – *A. veronii* biovar *sobria* (HG8) no va ser suficientment satisfactòria i probablement es requereixen estudis genotípics per a la separació d'aquestes espècies.
4. La formació de diferents *phena* (V, VI i VII) en el dendrograma de taxonomia numèrica que agrupen soques aïllades de mol·luscs bivalves no identificades a nivell d'espècie, suggereix l'existència de noves espècies del gènere *Aeromonas*.
5. El 86 % de les soques *A. hydrophila*, el 77 % de les soques *A. salmonicida* i el 73 % de les soques *A. bestiarum* mostraren activitat  $\beta$ -hemolítica i elastolítica. També mostraren activitat  $\beta$ -hemolítica el 91 % de les soques *A. sobria* i les soques tipus d'*A. eucrenophila*, *A. jandaei*, *A. trota* i *A. veronii*. Aquests resultats suggereixen que altres espècies de les considerades patògenes oportunistes d'humans poden ser potencialment patogèniques.
6. La diversitat genètica de la població del gènere *Aeromonas* estudiada és de 0,64. Les subpoblacions *A. hydrophila* ( $H = 0,62$ ) i *A. salmonicida* ( $H = 0,59$ ) analitzades presenten major diversitat genètica que les subpoblacions *A. popoffii* ( $H = 0,42$ ) i *A. bestiarum* ( $H = 0,37$ ).
7. A una distància genètica  $\leq 0,7$ , el dendrograma de la relació genètica entre tipus electroforètics (ETs) ha separat clarament les espècies *A. salmonicida* (grup II), *A. trota* (grup III) i *A. hydrophila* (grup IV), excepte les espècies *A. bestiarum* (subgrup Ib) i *A. popoffii* (subgrup Ic) que s'han

separat a una distància genètica  $\leq 0,6$ . Per tant, la tècnica MLEE mostra una bona correlació amb la identificació fenotípica de les soques d'*Aeromonas* incloses en tots dos estudis. El dendrograma de la relació genètica entre ETs també mostra una bona correlació amb l'origen de les soques.

- 8.** L'anàlisi del desequilibri de lligament suggereix que l'estructura poblacional d'*Aeromonas* és clonal ( $I_A = 2,38$ ,  $P < 0,0001$ ).
- 9.** Els cinc loci EST1 (esterasa 1), HEX (hexoquinasa), IDH (isocitrat deshidrogenasa), LDH1 (lactat deshidrogenasa 1) i MDH (malat deshidrogenasa) identifiquen correctament el 94 % de les soques.
- 10.** La detecció d'espècies d'*Aeromonas* patògenes oportunistes (principalment *A. caviae*) i d'altres espècies amb factors de virulència en aigües dolces i mol·luscs bivalves, fa aconsellable la monitorització d'*Aeromonas* en aigües (potables, recreatives i de piscifactories) i en aliments que es consumeixen crus o poc cuits com els mol·luscs bivalves.



## 7. BIBLIOGRAFIA

---

---



- ABBOTT, S.L. - CHEUNG, W.K.W. - KROSKE-BYSTROM, S. - MALEKZADEH, T. - JANDA, J.M. (1992): "Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory", *Journal of Clinical Microbiology*, 30 (5): 1262-1266.
- ALI, A. - CARNAHAN, A.M. - ALTWEGG, M. - LÜTHY-HOTTENSTEIN, J. - JOSEPH, S.W. (1996): "*Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources", *Medical Microbiology Letters*, 5: 156-165.
- ALLEN, D.A. - AUSTIN, B. - COLWELL, R.R. (1983): "*Aeromonas media*, a new species isolated from river water", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33 (3): 599-604.
- ALTABA, C.R. i al. (1991): "Invertebrats no Artròpodes", dins *Història Natural dels Països Catalans*, vol. 8, p. 465, Enciclopèdia Catalana S.A., Barcelona.
- ALTWEGG, M. - LÜTHY-HOTTENSTEIN, J. (1991): "Methods for the identification of DNA hybridization groups in the genus *Aeromonas*", *Experientia*, 47: 403-406.
- ALTWEGG, M. - VON GRAEVENITZ, A. - ZOLLINGER-ITEN, J. (1987): "Medium and temperature dependence of decarboxylase reactions in *Aeromonas* spp.", *Current Microbiology*, 15: 1-4.
- ALTWEGG, M. - STEIGERWALT, A.G. - ALTWEGG-BISSIG, R. - LÜTHY-HOTTENSTEIN, J. - BRENNER, D.J. (1990): "Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans", *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (2): 258-264.
- ALTWEGG, M. - REEVES, M.W. - ALTWEGG-BISSIG, R. - BRENNER, D.J. (1991): "Multilocus enzyme analysis of the genus *Aeromonas* and its use for species identification", *Zentralblatt für Bakteriologie*, 275: 28-45.
- ARAUJO, R.M. - ARRIBAS, R.M. - LUCENA, F. - PARÉS, R. (1989): "Relation between *Aeromonas* and faecal coliforms in fresh waters", *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 213-217.
- ARAUJO, R.M. - PARÉS, R. - LUCENA, F. (1990): "The effect of terrestrial effluents on the incidence of *Aeromonas* spp. in coastal waters", *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 439-444.
- ARAUJO, R.M. - ARRIBAS, R.M. - PARÉS, R. (1991): "Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution", *Journal of Applied Bacteriology*, 71: 182-186.
- ASAO, T. - KINOSHITA, Y. - KOZAKI, S. - UEMURA, T. - SAKAGUCHI, G. (1984): "Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin", *Infection and Immunity*, 46 (1): 122-127.
- ASAO, T. - KOZAKI, S. - KATO, K. - KINOSHITA, Y. - OTSU, K. - UEMURA, T. - SAKAGUCHI, G. (1986): "Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin", *Journal of Clinical Microbiology*, 24 (2): 228-232.
- AUSTIN, D.A. - MCINTOSH, D. - AUSTIN, B. (1989): "Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. nov.", *Systematic and Applied Microbiology*, 11: 277-290.
- BANDO, S.Y. - DO VALLE, G.R.F. - MARTÍNEZ, M.B. - TRABULSI, L.R. - MOREIRA-FILHO, C.A. (1998): "Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis", *FEMS Microbiology Letters*, 165: 159-165.
- BAYNE, C.J. (1983): "Molluscan immunobiology. III. Internal defenses of bivalves", dins *The Mollusca* (ed. A.S.M. Saleuddin i K.M. Wilbur), vol. 5, cap. 8, ps. 411-429, Academic Press, New York.
- BIO-RAD LABORATORIES, S.A. (1995): *Protean® II xi Cell and Protean II xi 2-D Cell, Instruction Manual*, Hercules, California.
- BOONE, D.R. - CASTENHOLZ, R.W. (2001): "The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*", *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 2a ed. (ed. G.M. Garrity), vol. 1, Springer, New York.
- 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 genes", *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (7): 1671-1674.
- BORRELL, N. - FIGUERAS, M.J. - GUARRO, J. (1998): "Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and environmental sources", *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 103-108.
- BOTTOMLEY, P.J. - CHENG, H.-H. - STRAIN, S.R. (1994): "Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil", *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (6): 1754-1761.

- BOUCHET, PH. - DANRIGAL, F. - HUYGHENS, C. (1979): *Sea shells of western Europe*, American Malacologists, Melbourne.
- BOYD, E.F. - WANG, F.-S. - WHITTAM, T.S. - SELANDER, R.K. (1996): "Molecular genetic relationships of the salmonellae", *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (3): 804-808.
- BRIDSON, E.Y. (1990): *The Oxoid Manual*, 6a ed., Unipath Limited, Basingstoke, Hampshire.
- BROWN, A.H.D. - FELDMAN, M.W. - NEVO, E. (1980): "Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*", *Genetics*, 96: 523-536.
- BURKE, V. - ROBINSON, J. - GRACEY, M. - PETERSON, D. - PARTRIDGE, K. (1984): "Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates", *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (2): 361-366.
- CAHILL, M.M. (1990): "Bacterial flora of fishes: a review", *Microbial Ecology*, 19: 21-41.
- CAHILL, M.M. - MACRAE, I.C. (1992): "Characteristics of O/129-sensitive motile *Aeromonas* strains isolated from freshwater on starch-ampicillin agar", *Microbial Ecology*, 24: 215-226.
- CAHNER, E. (1986): *Els mol·luscs*, Institut Municipal d'Educació, Badalona, Barcelona.
- CARNAHAN, A.M. - JOSEPH, S.W. (1993): "Systematic assessment of geographically and clinically diverse aeromonads", *Systematic and Applied Microbiology*, 16: 72-84.
- CARNAHAN, A.M. - FANNING, G.R. - JOSEPH, S.W. (1991a): "*Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens", *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (3): 560-564.
- CARNAHAN, A.M. - CHAKRABORTY, T. - FANNING, G.R. - VERMA, D. - ALI, A. - JANDA, J.M. - JOSEPH, S.W. (1991b): "*Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens", *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (6): 1206-1210.
- CARNAHAN, A.M. - BEHRAM, S. - JOSEPH, S.W. (1991c): "Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species", *Journal of Clinical Microbiology*, 29 (12): 2843-2849.
- CARSON, J. - WAGNER, T. - WILSON, T. - DONACHIE, L. (2001): "Miniaturized tests for computer-assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix", *Journal of Applied Microbiology*, 90: 190-200.
- CASCÓN, A. - ANGUITA, J. - HERNANZ, C. - SÁNCHEZ, M. - FERNÁNDEZ, M. - NAHARRO, G. (1996): "Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group 1 by PCR assays", *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (4): 1167-1170.
- CASCÓN, A. - YUGUEROS, J. - TEMPRANO, A. - SÁNCHEZ, M. - HERNANZ, C. - LUENGO, J.M. - NAHARRO, G. (2000): "A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*", *Infection and Immunity*, 68 (6): 3233-3241.
- COLLINS, M.D. - MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. - CAI, J. (1993): "*Aeromonas enteropelogenes* and *Aeromonas ichthiosmia* are identical to *Aeromonas trota* and *Aeromonas veronii*, respectively, as revealed by small-subunit rRNA sequence analysis", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43 (4): 855-856.
- COLWELL, R.R. - MACDONELL, M.T. - DE LEY, J. (1986): "Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov.", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36 (3): 473-477.
- CROCI, L. - SERRATORE, P. - COZZI, L. - STACCHINI, A. - MILANDRI, S. - SUFFREDINI, E. - TOTI, L. (2001): "Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area", *Letters in Applied Microbiology*, 32: 57-61.
- DEMARTA, A. - TONOLLA, M. - CAMINADA, A.-P. - RUGGERI, N. - PEDUZZI, R. (1999): "Signature region within the 16S rDNA sequences of *Aeromonas popoffii*", *FEMS Microbiology Letters*, 172 (2): 239-246.
- DEVLIN, T.M. (1999): *Bioquímica, Libro de texto con aplicaciones clínicas*, 3a ed., Ed. Reverté S.A., Barcelona.
- DORSCH, M. - ASHBOLT, N.J. - COX, P.T. - GOODMAN, A.E. (1994): "Rapid identification of *Aeromonas* species using 16S rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates", *Journal of Applied Bacteriology*, 77: 722-726.
- ESTEVE, C. (1995): "Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* associated with reared fish and surrounding fresh and brackish water", *Systematic and Applied Microbiology*, 18: 391-402.
- ESTEVE, C. - AMARO, C. - GARAY, E. - SANTOS, Y. - TORANZO, A.E. (1995a): "Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels", *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 555-562.
- ESTEVE, C. - GUTIÉRREZ, M.C. - VENTOSA, A. (1995b): "DNA relatedness among *Aeromonas allosaccharophila* strains and DNA hybridization groups of the genus *Aeromonas*", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (2): 390-391.

- ESTEVE, C. - GUTIÉRREZ, M.C. - VENTOSA, A. (1995c): "*Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from european eels", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (3): 462-466.
- EUZEBY, J.P. (1998): "Necessary corrections according to Judicial Opinions 16, 48 and 52", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 613.
- FARFÁN, M. - MIÑANA, D. - FUSTÉ, M.C. - LORÉN, J.G. (2000): "Genetic relationships between clinical and environmental *Vibrio cholerae* isolates based on multilocus enzyme electrophoresis", *Microbiology*, 146: 2613-2626.
- FARMER III, J.J. - ARDUINO, M.J. - HICKMAN-BRENNER, F.W. (1992): "The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*", dins *Prokaryotes*, 2a ed. (ed. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder i K.H. Schleifer), cap. 158, ps. 3012-3045, Springer-Verlag, New York.
- FELSENSTEIN, J. (1993): *PHYLIP package, version 3.5*, University of Washington, Wash, Seattle.
- FERGUSON, M.R. - XU, X.-J. - HOUSTON, C.W. - PETERSON, J.W. - COPPENHAVER, D.H. - POPOV, V.L. - CHOPRA, A.K. (1997): "Hyperproduction, purification, and mechanism of action of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*", *Infection and Immunity*, 65 (10): 4299-4308.
- FIGUERAS, M.J. - SOLER, L. - CHACON, M.R. - GUARRO, J. - MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. (2000): "Extended method for discrimination of *Aeromonas* spp. by 16S rDNA RFLP analysis", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 2069-2073.
- FIORENTINI, C. - BARBIERI, E. - FALZANO, L. - MATARRESE, P. - BAFFONE, W. - PIANETTI, A. - KATOULI, M. - KÜHN, I. - MÖLLBY, R. - BRUSCOLINI, F. - CASIERE, A. - DONELLI, G. (1998): "Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea", *Journal of Applied Microbiology*, 85: 501-511.
- FISCHER-ROMERO, C. - TINDALL, B.J. - JÜTTNER, F. (1996): "*Tolomonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (1): 183-188.
- FLUHARTY, D.M. - PACKARD, W.L. (1967): "Differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria without staining", *American Journal of Veterinary Clinical Pathology*, 1: 31-35.
- FUJII, Y. - NOMURA, T. - OKAMOTO, K. (1999): "Hemolysin of *Aeromonas sobria* stimulates production of cyclic AMP by cultured cells", *FEMS Microbiology Letters*, 176: 67-72.
- FUSTÉ, M.C. - PINEDA, M.A. - PALOMAR, J. - VIÑAS, M. - LORÉN, J.G. (1996): "Clonality of multidrug-resistant nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*", *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (11): 2760-2765.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A. - PICAZO, J.J. (1996): *Microbiología Médica*, vol. 1, Mosby, Madrid.
- GARGALLO-VIOLA, D. (1989): "Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*", *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (5): 860-868.
- GAVRIEL, A. - LAMB, A.J. (1995): "Assessment of media used for selective isolation of *Aeromonas* spp", *Letters in Applied Microbiology*, 21: 313-315.
- GAVRIEL, A.A. - LANDRE, J.P. - LAMB, A.J. (1998): "Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland", *Journal of Applied Microbiology*, 84 (3): 383-392.
- GERHARDT, P. - MURRAY, R.G.E. - WOOD, W.A. - KRIEG, N.R. (1994): *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- GIBSON, D.T. (1971): "Assay of enzymes of aromatic metabolism", *Methods in Microbiology*, 6A: 463-478.
- GILLIS, M. - VANDAMME, P. - DE VOS, P. - SWINGS, J. - KERSTERS, K. (2001): "Polyphasic taxonomy", dins *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 2a ed. (ed. G.M. Garrity), vol. 1, ps. 43-48, Springer, New York.
- GO, M.F. - KAPUR, V. - GRAHAM, D.Y. - MUSSER, J.M. (1996): "Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure", *Journal of Bacteriology*, 178 (13): 3934-3938.
- GORDON, D.M. (1997): "The genetic structure of *Escherichia coli* populations in feral house mice", *Microbiology*, 143: 2039-2046.
- GRAF, J. (1999): "Symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medical leech: a novel model for digestive tract associations", *Infection and Immunity*, 67 (1): 1-7.

- HACKNEY, C.R. - RAY, B. - SPECK, M.L. (1980): "Incidence of *Vibrio parahaemolyticus* and the microbiological quality of seafood in North Carolina", *Journal of Food Protection*, 43: 763-769.
- HANDFIELD, M. - SIMARD, P. - COUILLARD, M. - LETARTE, R. (1996): "*Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29)", *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (9): 3459-3461.
- HÄNNINEN, M.-L. (1994): "Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources", *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 455-462.
- HÄNNINEN, M.-L. - HIRVELÄ-KOSKI, V. (1997): "Pulsed-field gel electrophoresis in the study of mesophilic and psychrophilic *Aeromonas* spp.", *Journal of Applied Microbiology*, 83: 493-498.
- HÄNNINEN, M.-L. - HIRVELÄ-KOSKI, V. (1999): "Genetic diversity of atypical *Aeromonas salmonicida* studied by pulsed-field gel electrophoresis", *Epidemiology and Infection*, 123: 299-307.
- HÄNNINEN, M.-L. - SIITONEN, A. (1995): "Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples", *Epidemiology and Infection*, 115: 39-50.
- HÄNNINEN, M.-L. - SALMI, S. - SIITONEN, A. (1995): "Maximum growth temperature ranges of *Aeromonas* spp. isolated from clinical or environmental sources", *Microbial Ecology*, 29: 259-267.
- HÄNNINEN, M.-L. - OIVANEN, P. - HIRVELÄ-KOSKI, V. (1997): "*Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater", *International Journal of Food Microbiology*, 34 (1): 17-26.
- HAVELAAR, A.H. - DURING, M. - VERSTEEGH, J.F.M. (1987): "Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration", *Journal of Applied Bacteriology*, 62: 279-287.
- HAVELAAR, A.H. - SCHETS, F.M. - VAN SILFHOUT, A. - JANSEN, W.H. - WIETEN, G. - VAN DER KOOIJ, D. (1992): "Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water", *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 435-444.
- HENRY, J.B. (1988): *Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio*, 8a ed., 2 vols., Salvat Editores S.A., Barcelona.
- HICKMAN-BRENNER, F.W. - MACDONALD, K.L. - STEIGERWALT, A.G. - FANNING, G.R. - BRENNER, D.J. - FARMER III, J.J. (1987): "*Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea", *Journal of Clinical Microbiology*, 25 (5): 900-906.
- HICKMAN-BRENNER, F.W. - FANNING, G.R. - ARDUINO, M.J. - BRENNER, D.J. - FARMER III, J.J. (1988): "*Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens", *Journal of Clinical Microbiology*, 26 (8): 1561-1564.
- HØIE, S. - DALSGAARD, I. - AASE, I.L. - HEUM, M. - THORNTON, J.M. - POWELL, R. (1999): "Polymerase chain reaction (PCR)-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*", *Systematic and Applied Microbiology*, 22: 403-411.
- HOLT, S.C. - LEADBETTER, E.R. (1998): "Structure-function relationships in prokaryotic cells", *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9a ed. (ed. L. Collier, A. Balows i M. Sussman), vol. 2, cap. 2, p. 35, Arnold, London.
- HOLT, J.C. - KRIEG, N.R. - SNEATH, P.H.A. - STANLEY, J.Y. - WILLIAMS, S.T. (1994): "Subgroup 2: Family *Vibrionaceae*", *Bergey's Manual<sup>®</sup> of Determinative Bacteriology*, 9a ed., ps. 190-274, Williams & Wilkins, Baltimore.
- HOOD, M.A. - NESS, G.E. - RODRICK, G.E. - BLAKE, N.J. (1983): "Effects of storage on microbial loads of two commercially important shellfish species, *Crassostrea virginica* and *Mercenaria campechiensis*", *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (4): 1221-1228.
- HOUSTON, C.W. - CHOPRA, A.K. - ROSE, J.M. - KUROSKY, A. (1991): "Review of *Aeromonas* enterotoxins", *Experientia* 47: 424-426.
- HUGH, R. - LEIFSON, E. (1953): "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria", *Journal of Bacteriology*, 66: 24-26.
- HUNT, D.A. - MIESCIER, J. - REDMAN, J. - SALINGER, A. - LUCAS, J.P. (1984): "Molluscan shellfish, fresh or fresh frozen oysters, mussels, or clams", dins *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (ed. M.L. Speck), ps. 590-610, American Public Health Association, Washington, D.C.

- HUYS, G. - VANCANNEYT, M. - COOPMAN, R. - JANSSEN, P. - FALSEN, E. - ALTWEGG, M. - KERSTERS, K. (1994): "Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 (4): 651-658.
- HUYS, G. - KERSTERS, I. - VANCANNEYT, M. - COOPMAN, R. - JANSSEN, P. - KERSTERS, K. (1995): "Diversity of *Aeromonas* sp. in Flemish drinking water production plants as determined by gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMES)", *Journal of Applied Bacteriology*, 78: 445-455.
- HUYS, G. - ALTWEGG, M. - HÄNNINEN M.-L. - VANCANNEYT, M. - VAUTERIN, L. - COOPMAN, R. - TORCK, U. - LÜTHY-HOTTENSTEIN, J. - JANSSEN, P. - KERSTERS, K. (1996a): "Genotypic and chemotaxonomic description of two subgroups in the species *Aeromonas eucrenophila* and their affiliation to *A. encheleia* and *Aeromonas* DNA hybridization group 11", *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 616-623.
- HUYS, G. - COOPMAN, R. - JANSSEN, P. - KERSTERS, K. (1996b): "High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (2): 572-580.
- HUYS, G. - KERSTERS, I. - COOPMAN, R. - JANSSEN, P. - KERSTERS, K. (1996c): "Genotypic diversity among *Aeromonas* isolates recovered from drinking water production plants as revealed by AFLP™ analysis", *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 428-435.
- HUYS, G. - KÄMPFER, P. - ALTWEGG, M. - COOPMAN, R. - JANSSEN, P. - GILLIS, M. - KERSTERS, K. (1997a): "Inclusion of *Aeromonas* DNA hybridization group 11 in *Aeromonas encheleia* and extended descriptions of the species *Aeromonas eucrenophila* and *A. encheleia*", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (4): 1157-1164.
- HUYS, G. - KÄMPFER, P. - ALTWEGG, M. - KERSTERS, I. - LAMB, A. - COOPMAN, R. - LÜTHY-HOTTENSTEIN, J. - VANCANNEYT, M. - JANSSEN, P. - KERSTERS, K. (1997b): "*Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47 (4): 1165-1171.
- IEC, Institut d'Estudis Catalans (1995): *Diccionari de la llengua catalana*, Enciclopèdia Catalana S.A. - Edicions 62 S.A. - Publicacions de l'Abadia de Montserrat S.A. - Edicions Moll S.A. - Edicions 3 i 4 S.A., Barcelona - Palma de Mallorca - València.
- IJSB (1988a): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 25", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38 (2): 220-222.
- IJSB (1988b): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 27", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38 (4): 449.
- IJSB (1989a): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 29", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39 (2): 205-206.
- IJSB (1989b): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 31", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39 (4): 495-497.
- IJSB (1991): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 38", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41 (3): 456-458.
- IJSB (1992a): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 40", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (1): 191-192.
- IJSB (1992b): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 42", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (3): 511.
- IJSB (1996): "Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 59", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46 (4): 1189-1190.
- IMZILN, B. - LAFDAL, O.M.Y. - BARAKATE, M. - HASSANI, L. - OUHDOUCH, Y. - BOUSSAID, A. - JANA, M. (1997): "Pril-ampicillin-dextrin-ethanol agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* spp. from polluted environmental waters", *Journal of Applied Microbiology*, 82 (5): 557-566.
- IUB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (1984): *Enzyme Nomenclature 1984, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International*

- Union of Biochemistry on the nomenclature and classification of enzyme-catalysed reactions*, Academic Press, Inc., Orlando, Florida.
- IVANOVA, E.P. - ZHUKOVA, N.V. - GORSHKOVA, N.M. - CHAIKINA, E.L. (2001): "Characterization of *Aeromonas* and *Vibrio* species isolated from a drinking water reservoir", *Journal of Applied Microbiology*, 90: 919-927.
- JANDA, J.M. (1991): "Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*", *Clinical Microbiology Reviews*, 4 (4): 397-410.
- JANDA, J.M. (1998): "*Vibrio*, *Aeromonas* and *Plesiomonas*", *Topley & Wilson's, Microbiology and Microbial Infections*, 9a ed. (ed. L. Collier, A. Balows i M. Sussman), vol. 2, cap. 45, ps. 1065-1082, Arnold, London.
- JANDA, J.M. - ABBOTT, S.L. (1998): "Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions", *Clinical Infectious Diseases*, 27 (2): 332-344.
- JANDA, J.M. - KOKKA, R.P. (1991): "The pathogenicity of *Aeromonas* strains relative to genospecies and phenospecies identification", *FEMS Microbiology Letters*, 90: 29-34.
- JANDA, J.M. - REITANO, M. - BOTTONE, E.J. (1984): "Biotyping of *Aeromonas* isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum", *Journal of Clinical Microbiology*, 19 (1): 44-47.
- JANDA, J.M. - ABBOTT, S.L. - KHASHE, S. - KELLOGG, G.H. - SHIMADA, T. (1996): "Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*", *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (8): 1930-1933.
- JANSSEN, P. - COOPMAN, R. - HUYS, G. - SWINGS, J. - BLEEKER, M. - VOS, P. - ZABEAU, M. - KERSTERS, K. (1996): "Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy", *Microbiology*, 142: 1881-1893.
- JORGENSEN, J.H. - TURNIDGE, J.D. - WASHINGTON, J.A. (1999): "Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods", *Manual of Clinical Microbiology*, 7a ed. (ed. P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover i R.H. Tenover), ps. 1526-1543, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- KÄMPFER, P. - ALTWEGG, M. (1992): "Numerical classification and identification of *Aeromonas* genospecies", *Journal of Applied Bacteriology*, 72: 341-351.
- KAZNOWSKI, A. (1997): "Numerical taxonomy and DNA-DNA hybridizations of *Aeromonas* strains isolated from human diarrhoeal stool, fish and environment", *Systematic and Applied Microbiology*, 20: 458-467.
- KAZNOWSKI, A. (1998): "Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level", *Journal of Applied Microbiology*, 84 (3): 423-430.
- KHAN, A.A. - CERNIGLIA, C.E. (1997): "Rapid and sensitive method for the detection of *Aeromonas caviae* and *Aeromonas trota* by polymerase chain reaction", *Letters in Applied Microbiology*, 24: 233-239.
- KHARDORI, N. - FAINSTEIN, V. (1998): "*Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents", *Annual Review of Microbiology*, 42: 395-419.
- KIROV, S.M. - HUDSON, J.A. - HAYWARD, L.J. - MOTT, S.J. (1994): "Distribution of *Aeromonas hydrophila* hybridization groups and their virulence properties in Australasian clinical and environmental strains", *Letters in Applied Microbiology*, 18: 71-73.
- KOKKA, R.P. - JANDA, J.M. - OSHIRO, L.S. - ALTWEGG, M. - SHIMADA, T. - SAKAZAKI, R. - BRENNER, D.J. (1991): "Biochemical and genetic characterization of autoagglutinating phenotypes of *Aeromonas* species associated with invasive and noninvasive disease", *Journal of Infectious Diseases*, 163: 890-894.
- KUEH, C.S.W. - CHAN, K.-Y. (1985): "Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster", *Journal of Applied Bacteriology*, 59: 41-47.
- KÜHN, I. - ALBERT, M.J. - ANSARUZZAMAN, M. - BHUIYAN, N.A. - ALABI, S.A. - ISLAM, M.S. - NEOGI, P.K.B. - HUYS, G. - JANSSEN, P. - KERSTERS, K. - MÖLLBY, R. (1997a): "Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh", *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (2): 369-373.
- KÜHN, I. - HUYS, G. - COOPMAN, R. - KERSTERS, K. - JANSSEN, P. (1997b): "A 4-year study of the diversity and persistence of coliforms and *Aeromonas* in the water of a Swedish drinking water well", *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 9-16.



- KUIJPER, E.J. - STEIGERWALT, A.G. - SCHOENMAKERS, B.S.C.I.M. - PEETERS, M.F. - ZANEN, H.C. - BRENNER, D.J. (1989): "Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp", *Journal of Clinical Microbiology*, 27 (1): 132-138.
- LEGNANI, P. - LEONI, E. - SOPPELSA, F. - BURIGO, R. (1998): "The occurrence of *Aeromonas* species in drinking water supplies of an area of the Dolomite Mountains, Italy", *Journal of Applied Microbiology*, 85 (2): 271-276.
- LOUIE, M. - JAYARATNE, P. - LUCHSINGER I. - DEVENISH, J. - YAO, J. - SCHLECH, W. - SIMOR, A. (1996): "Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*", *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (1): 15-19.
- LOWRY, O.H. - ROSEBROUGH, N.J. - FARR, A.L. - RANDALL, R.J. (1951): "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- MAC FADDIN, J.F. (1981): *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 2a ed., Williams & Wilkins, Baltimore.
- MADIGAN, M.T. - MARTINKO, J.M. - PARKER, J. (1999): *Brock, Biología de los microorganismos*, 8a ed. rev., p. 113, Prentice Hall, Madrid.
- MAIDEN, M.C.J. - BYGRAVES, J.A. - FEIL, E. - MORELLI, G. - RUSSELL, J.E. - URWIN, R. - ZHANG, Q. - ZHOU, J. - ZURTH, K. - CAUGANT, D.A. - FEAVERS, I.M. - ACHTMAN, M. - SPRATT, B.G. (1998): "Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 3140-3145.
- MAKI, J.S. - PATEL, G. - MITCHELL, R. (1998): "Experimental pathogenicity of *Aeromonas* spp. for the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*", *Current Microbiology*, 36: 19-23.
- MARQUÉS, A.M. (coord.) - RIUS, N. - VENDRELL, E. - LLARCH, M.A. (1996): *Quadern de Pràctiques de Microbiologia*, Promociones y Publicaciones Universitarias S.A., Barcelona.
- MARTINETTI-LUCCHINI, G. - ALTWEGG, M. (1992): "rRNA gene restriction patterns as taxonomic tools for the genus *Aeromonas*", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (3): 384-389.
- MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. (1999): "Phylogenetic positions of *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii*, *Aeromonas* DNA hybridization group 11 and *Aeromonas* group 501", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 (4):1403-1408.
- MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. - BENLLOCH, S. - COLLINS, M.D. (1992a): "Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42 (3): 412-421.
- MARTÍNEZ-MURCIA, A.J. - ESTEVE, C. - GARAY, E. - COLLINS, M.D. (1992b): "*Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*", *FEMS Microbiology Letters*, 91: 199-206.
- MASSA, S. - ALTIERI, C. - D'ANGELA, A. (2001): "The occurrence of *Aeromonas* spp. in natural mineral water and well water", *International Journal of Food Microbiology*, 63: 169-173.
- MAYNARD-SMITH, J. - DOWSON, C.G. - SPRATT, B.G. (1991): "Localized sex in bacteria", *Nature*, 349: 29-31.
- MAYNARD-SMITH, J. - SMITH, N.H. - O'ROURKE, M. - SPRATT, B.G. (1993): "How clonal are bacteria?", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90: 4384-4388.
- MCGAREY, D.J. - MILANESI, L. - FOLEY, D.P. - REYES JR., B. - FRYE, L.C. - LIM, D.V. (1991): "The role of motile aeromonads in the fish disease, Ulcerative Disease Syndrome (UDS)", *Experientia*, 47: 441-444.
- MELAS, D.S. - PAPAGEORGIOU, D.K. - MANTIS, A.I. (1999): "Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in Northern Greece", *Journal of Food Protection*, 62 (5): 463-466.
- MERCK (1994): *Manual de medios de cultivo*, E. Merck, Darmstadt.
- MERINO, S. - RUBIRES, X. - KNØCHEL, S. - TOMÁS, J.M. (1995): "Emerging pathogens: *Aeromonas* spp.", *International Journal of Food Microbiology*, 28: 157-168.
- MIÑANA-GALBIS, D. - FARFÁN, M. - LORÉN, J.G. - FUSTÉ, M.C. (2002): "Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain", *Journal of Applied Microbiology*, 93 (3): 420-430.
- MİYATA, M. - AOKI, T. - INGLIS, V. - YOSHIDA, T. - ENDO, M. (1995): "RAPD analysis of *Aeromonas salmonicida* and *Aeromonas hydrophila*", *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 181-185.

- MONTILLA, R. (1992): "Los *Vibrio* halófilos de las instalaciones de acuicultura del delta del Ebro", Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona.
- MONTILLA, R. - PALOMAR, J. - FUSTÉ, M.C. - VIÑAS, M. (1995): "Taxonomy and protein fingerprinting of halophilic *Vibrio* isolates from bivalves of the Ebre delta", *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 64-69.
- MOYER, N.P. (1987): "Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea", *Journal of Clinical Microbiology*, 25 (11): 2044-2048.
- MOYER, N.P. - GEISS, H.K. - MARINESCU, M. - RIGBY, A. - ROBINSON, J. - ALTWEGG, M. (1991): "Media and methods for isolation of aeromonads from fecal specimens. A multilaboratory study", *Experientia*, 47: 409-412.
- MOYER, N.P. - MARTINETTI, G. - HOLCOMB, L.A. - HALL, N.H. - ALTWEGG, M. (1992a): "Application of ribotyping for differentiating aeromonads isolated from clinical and environmental sources", *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (6): 1940-1944.
- MOYER, N.P. - MARTINETTI, G. - LÜTHY-HOTTENSTEIN, J. - ALTWEGG, M. (1992b): "Value of rRNA gene restriction patterns of *Aeromonas* spp. for epidemiological investigations", *Current Microbiology*, 24: 15-21.
- MUSSER, J.M. - BEMIS, D.A. - ISHIKAWA, H. - SELANDER, R.K. (1987): "Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*", *Journal of Bacteriology*, 169 (6): 2793-2803.
- NAKANO, H. - KAMEYAMA, T. - VENKATESWARAN, K. - KAWAKAMI, H. - HASHIMOTO, H. (1990): "Distribution and characterization of hemolytic, and enteropathogenic motile *Aeromonas* in aquatic environment", *Microbiology and Immunology*, 34 (5): 447-458.
- NAMDARI, H. - BOTTONI, E.J. (1990): "Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*", *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (8): 1796-1798.
- NEI, M. (1978): "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample of individuals", *Genetics*, 89: 583-590.
- NEYTS, K. - HUYS, G. - UYTENDAELE, M. - SWINGS, J. - DEBEVERE, J. (2000): "Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods", *Letters in Applied Microbiology*, 31: 359-363.
- NOONAN, B. - TRUST T.J. (1997): "The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*", *FEMS Microbiology Letters*, 154 (1): 1-7.
- NOTERDAEME, L. - BIGAWA, S. - STEIGERWALT, A.G. - BRENNER, D.J. - OLLEVIER, F. (1996): "Numerical taxonomy and biochemical identification of fish associated motile *Aeromonas* spp.", *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 624-633.
- OAKEY, H.J. - ELLIS, J.T. - GIBSON, L.F. (1996a): "A biochemical protocol for the differentiation of current genomospecies of *Aeromonas*", *Zentralblatt für Bakteriologie*, 284: 32-46.
- OAKEY, H.J. - ELLIS, J.T. - GIBSON, L.F. (1996b): "Differentiation of *Aeromonas* genomospecies using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR)", *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 402-410.
- OGDEN, I.D. - MILLAR, I.G. - WATT, A.J. - WOOD, L. (1994): "A comparison of three identification kits for the confirmation of *Aeromonas* spp.", *Letters in Applied Microbiology*, 18: 97-99.
- O'HICI, B. - OLIVIER, G. - POWELL, R. (2000): "Genetic diversity of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* demonstrated by random amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis analyses", *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 109-119.
- OLAFSEN, J.A. - MIKKELSEN, H.V. - GIAEVER, H.M. - HANSEN, G.H. (1993): "Indigenous bacteria in hemolymph and tissues of marine bivalves at low temperatures", *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (6): 1848-1854.
- O'ROURKE, M. - STEVENS, E. (1993): "Genetic structure of *Neisseria gonorrhoeae* populations: a non-clonal pathogen", *Journal of General Microbiology*, 139: 2603-2611.
- ORTIGOSA, M. (1995): "Bacterias heterotrofas aerobias y facultativas asociadas a agua y ostras en el Mar Mediterráneo: Abundancia, ciclo anual y taxonomía numérica", Tesi Doctoral, Universitat de València, Burjassot, València.
- ORTIGOSA, M. - GARAY, E. - PUJALTE, M.-J. (1994): "Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from oysters and seawater along an annual cycle", *Systematic and Applied Microbiology*, 17: 216-225.

- PALUMBO, S.A. - MAXINO, F. - WILLIAMS, A.C. - BUCHANAN, R.L. - THAYER, D.W. (1985): "Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*", *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (4): 1027-1030.
- PAVAN, M.E. - ABBOTT, S.L. - ZORZÓPULOS, J. - JANDA, J.M. (2000): "*Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinase-positive subspecies isolated from a heavily polluted river", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1119-1124.
- PEDERSEN, K. - DALSGAARD, I. - LARSEN, J.L. (1996): "Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* isolates by ribotyping and plasmid profiling", *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 37-44.
- PEMBERTON, J.M. - KIDD, S.P. - SCHMIDT, R. (1997): "Secreted enzymes of *Aeromonas*", *FEMS Microbiology Letters*, 152: 1-10.
- PETTIBONE, G.W. (1998): "Population dynamics of *Aeromonas* spp. in an urban river watershed", *Journal of Applied Microbiology*, 85 (4): 723-730.
- PHILLIPS, E. - NASH, P. (1985): "Culture media", dins *Manual of Clinical Microbiology*, 4a ed. (ed. E.H. Lennette, A. Balows Jr., W.J. Hausler i H.J. Shadomy), ps. 1051-1092, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- PIN, C. - MARÍN, M.L. - GARCÍA, M.L. - TORMO, J. - CASAS, C. (1994): "Comparision of different media for the isolation and enumeration of *Aeromonas* spp. in foods", *Letters in Applied Microbiology*, 18: 190-192.
- POPOFF, M. (1984): "Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Van Niel 1936, 398<sup>AL</sup>", dins *Bergey's Manual<sup>®</sup> of Systematic Bacteriology* (ed. N.R. Krieg i J.G. Holt), vol. 1, ps. 545-548, Williams & Wilkins, Baltimore.
- POPOFF, M. - LALLIER, R. (1984): "Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*", *Methods in Microbiology*, 16: 127-145.
- POPOFF, M.Y. - COYNAULT, C. - KIREDJIAN, M. - LEMELIN, M. (1981): "Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species", *Current Microbiology*, 5: 109-114.
- POTOMSKI, J. - BURKE, V. - ROBINSON, J. - FUMAROLA, D. - MIRAGLIOTTA, G. (1987): "*Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross reactive with cholera toxin", *Journal of Medical Microbiology*, 23: 179-186.
- PRESCOTT, L.M. - HARLEY, J.P. - KLEIN, D.A. (1999): "Estructura y función de la célula procariota", 4a ed., cap. 3, p. 57, McGraw-Hill-Interamericana de España S.A.V., Madrid.
- PURICH, D.L. - ALLISON, R.D. (2000): *Handbook of biochemical kinetics*, Academic Press, San Diego, CA.
- RAMBOARINA, C. - SCHEFTEL, J.M. - MONTEIL, H. (1993): "Les espèces mobiles du genre *Aeromonas*: difficultés de l'identification et pouvoir pathogène", *Annales de Biologie Clinique*, 51: 91-100.
- REEVES, P.R. (1992): "Variation in O-antigens, niche specific selection and bacterial populations", *FEMS Microbiology Letters*, 100: 509-516.
- RIPPEY, S.R. - CABELLI, V.J. (1979): "Membrane filter procedure for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters", *Applied and Environmental Microbiology*, 38 (1): 108-113.
- RIPPEY, S.R. - CABELLI, V.J. (1989): "Use of thermotolerant *Aeromonas* group for the trophic state classification of fresh waters", *Water Research*, 23: 1107-1104.
- RIQUELME, C. - TORANZO, A.E. - BARJA, J.L. - VERGARA, N. - ARAYA, R. (1996): "Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*)", *Journal of Invertebrate Pathology*, 67: 213-218.
- RIUS, N. (1993): "Modificació del pH extern per suspensions bacterianes no proliferants", Tesi Doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona.
- RIUS, N. - FUSTÉ, M.C. - GUASP, C. - LALUCAT, J. - LORÉN, J.G. (2001): "Clonal population structure of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional genetic diversity", *Journal of Bacteriology*, 183 (2): 736-744.
- RODRÍGUEZ, E. - ANTILLÓN, F. (1989): "*Aeromonas* spp. y *Plesiomonas shigelloides* en bivalvos, cieno y aguas del Golfo de Nicoya, Costa Rica", *Revista de Biología Tropical*, 37 (1): 69-73.
- ROHLF, F.J. (1993): *Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1-80*, Exeter Software, New York.
- ROSE, J.M. - HOUSTON, C.W. - COPPENHAVER, D.H. - DIXON, J.D. - KUROSKY, A. (1989a): "Purification and chemical characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic

- enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila*", *Infection and Immunity*, 57 (4): 1165-1169.
- ROSE, J.M. - HOUSTON, C.W. - KUROSKY, A. (1989b): "Bioactivity and immunological characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*", *Infection and Immunity*, 57 (4): 1170-1176.
- ROSSELLÓ-MORA, R. (1999): "Sobre el concepto de especie en Microbiología", *Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología*, 27: 18-22.
- ROTGER, R. (1997): *Microbiología sanitaria y clínica*, Editorial Síntesis, Madrid.
- ROTHER, G.M. (1994): *Electrophoresis of enzymes, Laboratory methods*, Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.
- SAKATA, T. (1989): "Microflora of healthy animals", dins *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish* (ed. B. Austin i D.A. Austin), cap. 7, ps. 154-155, Ellis Horwood Limited, Chichester.
- SANCHO, J. - BALDRIS, R. - SÁNCHEZ, M. (1989): *Manual de Medios de Cultivo para Microbiología*, 3a ed., ADSA = MICRO, Barcelona.
- SANTOS, J.A. - GONZÁLEZ, C.J. - OTERO, A. - GARCÍA-LÓPEZ, M.L. (1999): "Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish", *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (12): 5612-5614.
- SCHUBERT, R.H.W. - HEGAZI, M. (1988): "*Aeromonas eucrenophila* species nova and *Aeromonas caviae*, a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*", *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilungen 1, Originale Reihe A*, 268: 34-39.
- SCHUBERT, R.H.W. - HEGAZI, M. - WAHLIG, W. (1990a): "*Aeromonas enteropelogenes* species nova", *Hygiene und Medizin*, 15: 471-472.
- SCHUBERT, R.H.W. - HEGAZI, M. - WAHLIG, W. (1990b): "*Aeromonas ichthiosmia* species nova", *Hygiene und Medizin*, 15: 477-479.
- SELANDER, R.K. - CAUGANT, D.A. - OCHMAN, H. - MUSSER, J.M. - GILMOUR, M.N. - WHITTAM, T.S. (1986): "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics", *Applied and Environmental Microbiology*, 51 (5): 873-884.
- SELANDER, R.K. - CAUGANT, D.A. - WHITTAM, T.S. (1987): "Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*", *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (ed. F.C. Neidardt i al.), ps. 1625-1648, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- SINGH, D.V. - SANYAL, S.C. (1992): "Enterotoxicity of clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.", *Journal of Medical Microbiology*, 36: 269-272.
- SINGH, D.V. - SANYAL, S.C. (1994): "Antibiotic resistance in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33: 368-369.
- SISTI, M. - ALBANO, A. - BRANDI, G. (1998): "Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp. in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy", *Letters in Applied Microbiology*, 26 (5): 347-351.
- SNEATH, P.H. - JOHNSON, R. (1972): "The influence on numerical taxonomy similarities of errors in microbiological tests", *Journal of General Microbiology*, 72: 377-392.
- SNEATH, P.H.A. - SOKAL, R.R. (1973): "The principles and practice of numerical classification", *Numerical Taxonomy* (ed. D. Kenedy i R.B. Park), Freeman, San Francisco.
- STRYER, L. (1988): *Bioquímica*, 3a ed., 2 vols., Editorial Reverté S.A., Barcelona.
- SUGITA, H. - NAKAMURA, T. - TANAKA, K. - DEGUCHI, Y. (1994): "Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method", *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8): 3036-3038.
- TALON, D. - DUPONT, M.J. - LESNE, J. - THOUVEREZ, M. - MICHEL-BRIAND, Y. (1996): "Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*", *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 277-282.
- THORNLEY, J.P. - SHAW, J.G. - GRYLLOS, I.A. - ELEY, A. (1996): "Adherence of *Aeromonas caviae* to human cell lines Hep-2 and Caco-2", *Journal of Medical Microbiology*, 45 (6): 445-451.
- TONOLLA, M. - DEMARTA, A. - PEDUZZI, R. (1991): "Multilocus genetic relationships between clinical and environmental *Aeromonas* strains", *FEMS Microbiology Letters*, 81: 193-200.
- TSAI, G.-J. - CHEN, T.-H. (1996): "Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood", *International Journal of Food Microbiology*, 31: 121-131.

- TSAI, G.-J. - TSAI, F.-C. - KONG, Z.-L. (1997): "Effects of temperature, medium composition, pH, salt and dissolved oxygen on haemolysin and cytotoxin production by *Aeromonas hydrophila* isolated from oyster", *International Journal of Food Microbiology*, 38: 111-116.
- TURNBULL, P.C.B. - LEE, J.V. - MILIOTIS, M.D. - VAN DE WALLE, S. - KOORNHOF, H.J. - JEFFERY, L. - BRYANT, T.N. (1984): "Enterotoxin production in relation to taxonomic grouping and source of isolation of *Aeromonas* species", *Journal of Clinical Microbiology*, 19: 175-180.
- TWEDT, R.M. (1978): "Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus*", dins *Bacteriological Analytical Manual*, ps. 1-13, Association of Official Analytical Chemists, Food & Drug Administration, Arlington.
- TWEDT, R.M. (1984): "Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios", dins *Bacteriological Analytical Manual*, 6a ed., ps. 12.01-12.08, Food & Drug Administration, Arlington.
- VANDAMME, P. - POT, B. - GILLIS, M. - DE VOS, P. - KERSTERS, K. - SWINGS, J. (1996): "Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics", *Microbiological Reviews*, 60 (2): 407-438.
- VÉRON, M. (1975): "Nutrition et taxonomie des *Enterobacteriaceae* et bactéries voisines", *Annales de Microbiologie*, 126A (3): 267-274.
- VIPOND, R. - BRICKNELL, I.R. - DURANT, E. - BOWDEN, T.J. - ELLIS, A.E. - SMITH, M. - MACINTYRE, S. (1998): "Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*", *Infection and Immunity*, 66 (5): 1990-1998.
- VOS, P. - HOGERS, R. - BLEEKER, M. - REIJANS, M. - VAN DE LEE, T. - HORNES, M. - FRIJTERS, A. - POT, J. - PELEMAN, J. - KUIPER, M. - ZABEAU, M. (1995): "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting", *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407-4414.
- WANG, C. - SILVA, J.L. (1999): "Prevalence and characteristics of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish", *Journal of Food Protection*, 62 (1): 30-34
- WAYNE, L.G. - BRENNER, D.J. - COLWELL, R.R. - GRIMONT, P.A.D. - KANDLER, O. - KRICHEVSKY, M.I. - MOORE, L.H. - MOORE, W.E.C. - MURRAY, R.G.E. - STACKEBRANDT, E. - STARR, M.P. - TRÜPER, H.G. (1987): "Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37 (4): 463-464.
- YOUNG, J.P.W. (1989): "The population genetics of bacteria", *Genetics of bacterial diversity* (ed. D.A. Hopwood i K.E. Chater), ps. 417-438, Academic Press, London.



## 8. ANNEXOS

---





### 8.1. Medis de cultiu i solucions salines.

**AD** (agar dextrina o agar base selectiu m-*Aeromonas* de Havelaar, Biolife 401019):

- 11,4 g/l Dextrina.
- 5 g/l Triptosa.
- 2 g/l Extracte de llevat.
- 2 g/l KCl.
- 0,10 g/l Sulfat de magnesi.
- 0,10 g/l Desoxicolat de sodi.
- 0,06 g/l Clorur fèrric.
- 0,08 g/l Blau de bromotimol.
- 3 g/l NaCl.
- 13 g/l Agar-agar Bios LL.
- 1 l Aigua destil·lada.

pH 8,25.

Bulliu-ho.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**ADA** (AD amb ampil·lina):

Dissoleu un vial de 5 mg d'ampil·lina (Biolife 421840052) en 5 ml d'aigua destil·lada estèril.

Afegiu-ho a 500 ml d'agar AD estèril, a 50°C.

**Antibiòtics**, disquets:

- 10 µg Ampil·lina (AM10, Biomerieux 54 002).
- 30 µg Cefalotina (CF30, Biomerieux 54 062).
- 50 µg Colistina (CL50, Biomerieux 54 102).
- 10 µg Estreptomina (S10, Biomerieux 54 642).
- 300 U Polimixina B (PB300, Biomerieux 54 522).
- 30 µg Tetraciclina (TE30, Biomerieux 54 882).

**AP** (aigua de peptona, Cultimed 413794):

- 10 g/l Peptona.
- 5 g/l NaCl.
- 1 l Aigua destil·lada.

+ 5 g/l NaCl.

pH 7,2.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

**APW** (aigua de peptona alcalina):

AP (aigua de peptona).

pH 9,0.

Afegiu-ho a una ampolla o matràs de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

**Arbutina**, agar:

- 2 g/l Triptona (Adsa 7-119).
- 5 g/l Arbutina (hidroquinona β-D-glucopiranosida, Fluka 10960).
- 0,3 g/l Fosfat dipotàssic (Fluka 60355).

10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
15 g/l Agar-agar (Adsa 7-004).  
1 l Aigua destil·lada.  
Bulliu-ho.  
Distribuïu-ho en tubs de vidre.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Inclineu els tubs.

**Citrat** de Simmons, agar (Merck 2501):

2 g/l Citrat sòdic.  
1 g/l Fosfat monoamònic.  
1 g/l Fosfat dipotàssic.  
0,2 g/l Sulfat de magnesi.  
0,08 g/l Blau de bromotimol.  
5 g/l NaCl.  
15 g/l Agar-agar.  
+ 5 g/l NaCl (Panreac 141659).  
1 l Aigua destil·lada.  
pH 6,8.  
Bulliu-ho.  
Distribuïu-ho en tubs de vidre.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Inclineu els tubs.

**Colúmbia, agar sang** (Merck Bactokit 4054316):

15 g/l Triptona.  
5 g/l Peptona de soja.  
5 g/l NaCl.  
15 g/l Agar-agar.  
1 l Aigua destil·lada.  
50 ml Sang de xai.  
pH 6,8.  
El medi ja ve distribuït en plaques de Petri.

**DNA**, agar (Difco 0632-17-7):

20 g/l Triptosa.  
2 g/l DNA.  
5 g/l NaCl.  
15 g/l Agar-agar.  
1 l Aigua destil·lada.  
+ 5 g/l NaCl (Panreac 141659).  
pH 7,3.  
Bulliu-ho.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**Elastina**, agar:

10 g/l Peptona (Difco 0118-01).  
10 g/l Elastina (Sigma E1625).  
11,6 g/l CaCl<sub>2</sub> (Panreac 141219).  
7,2 g/l Tris (ICN 103133).  
10 g/l NaCl (Panreac 141659).

20 g/l Agar-agar (ADSA 7-004).  
 1 l Aigua destil·lada.  
 pH 7,8.  
 Bulliu-ho.  
 Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
 Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
 Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**Esculina, agar:**

10 g/l Peptona (Difco 0118-01).  
 1 g/l Esculina (Merck 842).  
 1 g/l Citrat fèrric amònic (ICN 158040).  
 10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
 20 g/l Agar-agar (Adsa 7-004).  
 1 l Aigua destil·lada.  
 pH 7,4.  
 Bulliu-ho.  
 Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
 Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
 Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**Falkow, caldo base de descarboxilacions de (Difco 0872-02):**

5 g/l Peptona.  
 1 g/l Dextrosa.  
 3 g/l Extracte de llevat.  
 0,02 g/l Púrpura de bromocresol.  
 1 l Aigua destil·lada.  
 + 10 g/l NaCl.  
 + 5 g/l L-Arginina (Merck 1543), L-Lisina (Fluka 62840), L-Ornitina (Merck 6906)  
 o sense aminoàcid.  
 pH 6,8.  
 Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
 Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
 Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).  
 Afegiu-hi oli de vaselina (Panreac 141003) estèril, després d'inocular.

**Fermentacions, caldo base de:**

10 g/l Peptona (Difco 0118-01).  
 3 g/l Extracte de carn (Pronadisa 1700).  
 0,04 g/l Púrpura de bromocresol (Panreac 171546).  
 10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
 1 l Aigua destil·lada.  
 + 10 g/l Arabinosa (Difco 0159-1), Lactosa (Panreac 141375), Manitol (Difco 0170-17/15), Manosa (Fluka 63580), Sacarosa (Panreac 131621),  
 Salicina (Sigma S-0625) o Sorbitol (Farmitalia 484705).  
 pH 6,8.  
 Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
 Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
 Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**Glucosat, caldo:**

10 g/l Glucosa (Panreac 141341).  
 10 g/l Peptona (Difco 0118-01).

3 g/l Extracte de carn (Pronadisa 1700).  
10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
1 l Aigua destil·lada.  
pH 7,2.  
Bulliu-ho.  
Distribuïu-ho en tubs de vidre amb campana de Durham.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

**Indole**, medi:

10 g/l Triptona (Adsa 7-119).  
1 g/l Triptòfan (Merck 8374).  
10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
1 l Aigua destil·lada.  
pH 7,5.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**M-70**, solució:

Solució A1:

1960 mg  $H_3PO_4$  (Fluka 79622).  
29 mg  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  (Fluka 96500).  
22 mg  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  (Panreac 131413).  
6 mg  $H_3BO_3$  (Panreac 131015).  
3 mg  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (Merck 2536).  
2,5 mg  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (Probys 26199).  
800 ml Aigua destil·lada.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Solució A2:

56 mg  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck 3965)  
200 ml Aigua destil·lada.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Solució A = A1 + A2.

Solució B1:

123 mg  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (Merck 5886).  
15 mg  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Panreac 141232).  
250 ml Aigua destil·lada.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Solució B2:

2610 mg  $K_2HPO_4$  (Fluka 60355).  
680 mg  $KH_2PO_4$  (Fluka 60230).  
240 ml Aigua destil·lada.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

**Solució B3:**

10 g NaCl (Panreac 141659).  
 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Panreac 131140)  
 500 ml Aigua destil·lada.  
 Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
 Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

**Solució B** = B1 + B2 + B3.

**Solució M-70** (pH 7,2) = solució B + 10 ml solució A.

Esterilitzeu per filtració (filtre de xeringa de 0,2µm, Nalgene 190-2520) les solucions de compostos orgànics (a l'1 %, excepte els sucres que serà del 2 %): Acetat Na (Panreac 141633), L-Arabinosa (Difco 0159-1), L-Arginina (Merck 4351), D-Glucosa (Panreac 141341), L-Histidina (Merck 1543), L-Lactat Na (Fluka 71718) o D-Manitol (Difco 0170-17).

Mescleu la solució M-70 amb la solució del compost orgànic en una proporció 10:1, de manera que la concentració final del compost orgànic serà del 0,1 %, excepte en els sucres que serà del 0,2 %.

Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**McConkey, agar** (Adsa 1-118):

20 g/l Peptona.  
 10 g/l Lactosa.  
 2,5 g/l Sals biliars.  
 0,001 g/l Violeta cristall.  
 0,050 g/l Roig neutre.  
 5 g/l NaCl.  
 15 g/l Agar-agar.  
 1 l Aigua destil·lada.

pH 7,2.

Bulliu-ho.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**Midó, agar** (Adsa 1-283):

5 g/l Peptona.  
 3 g/l Extracte de carn.  
 2 g/l Midó soluble.  
 15 g/l Agar-agar.  
 1 l Aigua destil·lada.

+ 10 g/l NaCl.

pH 7,2.

Bulliu-ho.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**Mueller-Hinton, agar:**

Mueller-Hinton, caldo.

+ 15 g/l Agar-agar (Adsa 7-004).

Bulliu-ho.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclaui (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**Mueller-Hinton**, caldo (Adsa 2-136):

17,5 g/l Hidrolitzat de caseïna.  
4 g/l Extracte de carn.  
1,5 g/l Midó.  
1 l Aigua destil·lada.  
+ 10 g/l NaCl.

pH 7,4.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclaui (20 min a 121°C).

Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**Nitrats**, caldo de:

5 g/l Peptona (Difco 0118-01).  
3 g/l Extracte de carn (Pronadisa 1700).  
1 g/l KNO<sub>3</sub> (Panreac 131524).  
10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
1 l Aigua destil·lada.

pH 7,0.

Afegir-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclaui (20 min a 121°C).

Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**O/129** (2,4-diamino-6,7-di-iso-propilpteridina fosfat), disquets de 150 µg (Oxoid DD15).

**O/F** (medi basal per a l'oxidació i la fermentació de carbohidrats, Difco 0688-01-8):

2 g/l Triptona  
0,3 g/l Fosfat dipotàssic.  
0,08 g/l Blau de bromotimol.  
5 g/l NaCl.  
2 g/l Agar-agar.  
1 l Aigua destil·lada.  
+ 5 g/l NaCl (Panreac 141659).  
+ 10 g/l Glucosa (Panreac 141341).

pH 6,8.

Bulliu-ho.

Distribuïu-ho en tubs de vidre adients.

Esterilitzeu-ho a l'autoclaui (20 min a 121°C).

Afegiu-hi oli de vaselina (Panreac 141003) estèril a la meitat dels tubs.

**ONPG**, disquets (orto-nitrofenil-β-D-galacto-piranosà, Oxoid DD13).

**Ringer** (Scharlau 6-073):

2,250 g/l NaCl  
0,105 g/l KCl  
0,120 g/l KCl<sub>2</sub>  
0,050 g/l Bicarbonat sòdic.  
1 l Aigua destil·lada.

pH 7,2.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclaui (20 min a 121°C).

**SIM** (agar sulfhídric-indole-mobilitat):

- 20 g/l Peptona de caseïna (Adsa 7-154).
- 6,6 g/l Peptona de carn (Adsa 7-152).
- 0,2 g/l Citrat amonicofèrric (ICN 158040).
- 0,2 g/l Tiosulfat sòdic (Probus).
- 10 g/l NaCl (Panreac 141659).
- 3 g/l Agar-agar (Adsa 7-004).
- 1 l Aigua destil·lada.

pH 7,3.

Bulliu-ho.

Distribuïu-ho en tubs de vidre.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

**STB** (caldo de tolerància salina):

- 10 g/l Triptona (Adsa 7-119).
- 3 g/l Extracte de llevat (Difco 0127-01).
- 1 l Aigua destil·lada.

+ 0, 1, 3, 6 o 9 % NaCl (Panreac 141659).

pH 7,2.

Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**Sulfhídric de L-Cys:**Medi A:

- 10 g/l Peptona (Difco 0118-01).
- 4 g/l KCl (Panreac 141494).
- 10 g/l NaCl (Panreac 141659).
- 5 g/l Agar-agar (Adsa 7-004).
- 1 l Aigua destil·lada.

pH 7,2.

Bulliu-ho.

Distribuïu-ho en tubs de vidre.

Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).

Mantingueu-ho a 45-50°C.

Medi B:

- 1 g/l L-cisteïna-HCl (Fluka 30120).
- 1 g/l Citrat amonicofèrric (ICN 158040).

Esterilitzeu-ho per filtració (filtre de xeringa de 0,2µm, Nalgene 190-2520) en una ampolla de vidre estèril.

Afegiu medi B als tubs amb medi A (1 B : 10 A) i remeneu suaument.

**TCBS** (agar tiosulfat-citrat-bilis-sacarosa, Adsa 1-190):

- 20 g/l Sacarosa.
- 5 g/l Peptona de caseïna.
- 5 g/l Peptona de carn.
- 5 g/l Extracte de llevat.
- 10 g/l Citrat de sodi.
- 10 g/l Tiosulfat sòdic.
- 5 g/l Bilis bovina.

3 g/l Colat sòdic.  
1 g/l Citrat fèrric.  
0,04 g/l Blau de timol.  
0,04 g/l Blau de bromotimol.  
10 g/l NaCl.  
14 g/l Agar-agar.  
1 l Aigua destil·lada.  
pH 8,6.  
Bulliu-ho.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

**Tolerància a pHs extrems:**

TSB.  
pH 4,5 o 9,0.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**TSA** (agar triptona de soja, Adsa 1-200):

15 g/l Peptona de caseïna.  
5 g/l Peptona de soja.  
5 g/l NaCl.  
15 g/l Agar-agar.  
1 l Aigua destil·lada.  
+ 5 g/l NaCl (Panreac 141659).  
pH 7,3.  
Bulliu-ho.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient o distribuïu-ho en tubs de vidre (per a cultius purs).  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200) o inclineu els tubs (per a cultius purs).

**TSB** (caldo triptona de soja, Adsa 2-200):

17 g/l Peptona de caseïna.  
3 g/l Peptona de soja.  
2,5 g/l Dextrosa.  
2,5 g/l Fosfat monopotàssic.  
5 g/l NaCl.  
1 l Aigua destil·lada.  
+ 5 g/l NaCl (Panreac 141659).  
pH 7,3.  
Afegiu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**Urea** de Rustigian i Stuart, caldo (Difco 0272-02):

20 g/l Urea.  
0,1 g/l Extracte de llevat.  
9,5 g/l Fosfat disòdic.  
9,1 g/l Fosfat monopotàssic.



0,01 g/l Roig fenol.  
+ 10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
pH 6,8.  
Esterilitzeu-ho per filtració (filtre de xeringa de 0,2µm, Nalgene 190-2520) en una ampolla de vidre estèril.  
Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**VPRM**, caldo (**Voges-Proskauer i roig de metil**, Adsa 2-207):

7 g/l Peptona.  
5 g/l Glucosa.  
5 g/l Fosfat monopotàssic.  
1 l Aigua destil·lada.  
+ 10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
pH 7,0.  
Afegeu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en tubs asèptics de poliestirè (Deltalab Eurotubo 300903).

**Xantina**, agar:

5 g/l Peptona (Difco 0118-01).  
3 g/l Extracte de carn (Pronadisa 1700).  
5 g/l Xantina (Fluka 95490).  
10 g/l NaCl (Panreac 141659).  
15 g/l Agar-agar (Adsa 7-004).  
1 l Aigua destil·lada.  
Bulliu-ho.  
Afegeu-ho a una ampolla de vidre adient.  
Esterilitzeu-ho a l'autoclau (20 min a 121°C).  
Distribuïu-ho en plaques de Petri (Deltalab Eurotubo 200200).

+: addicioneu al medi de cultiu comercial la substància a la concentració indicada.



**8.2. Reactius i colorants (MARQUÉS i al. 1996).****Barrit**, reactiu de:

Solució A:  $\alpha$ -naftol (Merck 6223) al 6 % en etanol absolut (Panreac 141086).

Solució B: KOH (Panreac 211514) al 40 % en aigua destil·lada.

Reactiu per a la prova del Voges-Proskauer.

**Catalasa**, reactiu de la:

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 vol. (Hansmed 76030).

**Griess**, reactiu de:

Griess I: àcid sulfanílic (Fluka 86090) al 0,8 % en àcid acètic (Panreac 121556) 5 N.

Griess II: dimetil- $\alpha$ -naftilamina (Fluka 70731) al 0,5 % en àcid acètic 5 N.

Reactiu per a la prova de la reducció de nitrats.

**Kovacs**, reactiu de:

5 g Paradimetil-amino-benzaldehid (Panreac 161293).

75 ml Alcohol amílic (Panreac 131884).

Escalfeu-ho a 60°C, al bany Maria.

+ 25 ml HCl pur (Panreac 141020), gota a gota i en campana de gasos.

Reactiu per a la prova de la producció d'indole.

**Lugol**, solució de:

2 g KI (Panreac 131542).

2 ml Aigua destil·lada

1 g Iode resublimat (Panreac 141771).

Aforeu a 300 ml amb aigua destil·lada.

Solució emprada en la tinció de Gram i en la prova de la hidròlisi de midó.

**Oxidasa**, reactiu de l':

Tetrametil-*p*-fenilendiamoni (Fluka 878905) a l'1 % en aigua destil·lada.

Prepareu-ho a l'instant.

**Roig de metil**, reactiu del:

Roig de metil (Panreac 171617) al 0,04 % en etanol absolut (Panreac 141086).

Reactiu per a la prova del roig de metil.

**Safranina:**

10 ml Solució alcohòlica de safranina (Panreac 251622) al 2,5 %.

100 ml Aigua destil·lada.

Solució emprada en la tinció de Gram i en la determinació de la morfologia cel·lular.

**Violeta cristall:**

Solució A:

2 g Violeta cristall.

20 ml Alcohol etílic (Panreac 141086).

Solució B:

0,8 g Oxalat amònic (Panreac 131136).

80 ml Aigua destil·lada.

Mescleu les solucions A i B.

És recomanable filtrar el colorant abans d'utilitzar-lo.

Solució emprada en la tinció de Gram.



### 8.3. Tincions enzimàtiques.

#### ADH (alcohol deshidrogenasa, EC 1.1.1.1):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

- 100 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.
- 6 ml Etanol (Panreac 141086).
- 4 ml Isopropanol (Panreac 141090).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

- 0,5 ml PMS.
- 1 ml MTT.
- 2 ml NAD.

t= 3 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

#### ALD (alanina deshidrogenasa, EC 1.4.1.1):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

- 100 ml Fosfats Na 0,2 M pH 7.
- 150 mg L-Ala (Merck 1007).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

- 0,5 ml PMS.
- 1 ml MTT.
- 2 ml NAD.

t= 1-2 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

#### C12O (catecol 1,2-dioxigenasa, EC 1.13.11.1):

Només es lleva el vidre xicotet, de manera que el gel quede en el vidre gran.

Seguidament es posa en una carmanyola, es posa damunt del gel paper de filtre i després s'afegeix la solució de tinció següent:

- 100 ml Tris-HCl 0,02 M pH 7.
- 330 mg Pirocatecol (Fluka 15880).

t = 2-3 h, a 37°C, sense agitació.

Traieu el paper de filtre i decanteu la solució. Deixeu-ho així perquè s'acabe d'oxidar 1-2 h més a temperatura ambient, a la llum.

Renteu amb aigua.

Lectura. Les bandes que apareixen poden ser causades per l'activitat tant de la C21O com de la C23O. Per a fer la lectura únicament de la C12O, s'han de fer en paral·lel gels amb extractes cel·lulars amb i sense tractament tèrmic (55°C, 10 min). Les bandes dels gels corresponents a les mostres tractades correspondran a l'activitat C23O (resistent al tractament tèrmic), mentre que les bandes que no apareixen en aquests gels però sí en aquells corresponents a les mostres sense tractar, seran causades per l'activitat C12O (làbil al tractament).

#### C23O (catecol 2,3-dioxigenasa, EC 1.13.11.2): veure C12O.

**EST** (esterasa, EC 3.1.1.1):

Prepareu en un vas de precipitats i protegiu de la llum:

100 ml Fosfats Na 0,2 M pH 7.

2 ml  $\alpha$ -naftil acetat (Sigma N-8505) a l'1 % en acetona (Panreac 141007).

100 mg Fast Blue RR Salt (Sigma F-0500).

Filtreu-ho, protegit de la llum.

Aboqueu-ho a una carmanyola i poseu-hi el gel, ràpidament.

t= 20 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**FUM** (fumarasa, EC 4.2.1.2):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

100 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.

100 U MDH (Sigma M-7508).

100 mg Àcid fumàric (Sigma F-4633).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

2 ml NAD.

t= 2 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**G6P** (glucosa-6-fosfat deshidrogenasa, EC 1.1.1.49):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

90 ml H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

10 ml Tris-HCl 0,5 M pH 7,1.

100 mg D-glucosa-6-fosfat (Sigma G-7250).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

1 ml NADP.

t= 3 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**GD1** (glutamat deshidrogenasa dependent de NAD, EC 1.4.1.2):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

100 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.

400 mg L-Glu (Panreac 142042).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

2 ml NAD.

t= 4 h 40 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.  
Lectura del gel.

**GOT** (glutamat-oxalacetat transaminasa, EC 2.6.1.1):

Prepareu en un vas de precipitats i protegiu de la llum:  
 100 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.  
 200 mg L-Asp (Panreac 142034).  
 200 mg Àcid  $\alpha$ -cetoglutàric (Sigma K-1750).  
 2 mg Piridoxal-5-fosfat (Sigma P-9255).  
 200 mg Fast-blue-BB salt (Sigma F-0250).  
 Filtreu-ho, protegit de la llum.  
 Aboqueu-ho a una carmanyola i poseu-hi el gel, ràpidament.  
 t= 1 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.  
 Atureu la reacció amb aigua.

**GP1** (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa depenent de NAD, EC 1.2.1.12):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:  
 80 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.  
 100 mg D-Fructosa-1,6-difosfat (Sigma F-0752).  
 50 mg Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Sigma A-6756).  
 10 U Aldolasa (Sigma A-1893).  
 Poseu-hi el gel.  
 Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:  
 0,5 ml PMS.  
 1 ml MTT.  
 2 ml NAD.  
 t= 1 h 30 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.  
 Atureu la reacció amb aigua.  
 Lectura del gel.

**GP2** (gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa depenent de NADP, EC 1.2.1.13):

Com GP1 però amb 1 ml NADP en compte de NAD.

**HEX** (hexoquinasa, EC 2.7.1.1):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:  
 100 ml Glicil-glicina 0,1 M pH 7,5.  
 2 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M.  
 200 mg D-Glucosa (Panreac 141341).  
 50 mg ATP (Sigma A-2383).  
 10 U G6P (Sigma G-8878).  
 Poseu-hi el gel.  
 Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:  
 0,5 ml PMS.  
 1 ml MTT.  
 1 ml NADP.  
 t= 45 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.  
 Atureu la reacció amb aigua.  
 Lectura del gel.

**IDH** (isocitrat deshidrogenasa, EC 1.1.1.42):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

100 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.

4 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M.

60 mg DL-Isocitrat trisòdic (Sigma I-1252).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

1 ml NADP.

t= 15-45 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**IPO** (indofenol oxidasa, EC 1.15.1.1):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

80 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.

4 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M.

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

1 ml MTT.

0,5 ml PMS.

2 ml NAD (se'n pot prescindir).

t= 1 h - 1 h 30 min, a temperatura ambient, llum de flexo a prop.

Lectura del gel.

**LAP** (leucina aminopeptidasa, EC 3.4.1.1):

Prepareu en un vas de precipitats i protegiu de la llum:

100 ml Fosfat K 0,1 M pH 5,5.

2 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M.

60 mg L-Leu β-naftilamida (Sigma L-0376).

40 mg Fast Black K Salt (Sigma F-7253).

Filtreu-ho, protegit de la llum.

Aboqueu-ho a una carmanyola i poseu-hi el gel, ràpidament.

t= 1 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**LDH** (lactat deshidrogenasa, EC 1.1.1.27):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

100 ml Glicil-glicina 0,1 M pH 7,5.

500 mg L-Lactat Na (Fluka 71718).

20 mg Fructosa-1,6-difosfat (Sigma F-0752).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

2 ml NAD.

t= 1-2 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.



Atureu la reacció amb aigua.  
Lectura del gel.

**MDH** (malat deshidrogenasa, EC 1.1.1.37):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

90 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.  
4 ml Àcid màlic 2 M.

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.  
1 ml MTT.  
2 ml NAD.

t= 15-20 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel

**ME** (enzim màlic, EC 1.1.1.40):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

80 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.  
6 ml Àcid màlic 2 M.  
4 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M.

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.  
1 ml MTT.  
1 ml NADP.

t= 1 h - 1 h 30 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**NSP** (nucleòsid fosforilasa, EC 2.4.2.1):

Col·loqueu primer el gel a la cubeta.

Aneu remenant en un vas de precipitats i protegiu de la llum:

80 ml Fosfats Na 0,2 M pH 7.  
40 mg Inosina (Sigma I-4125).  
300 µl Xantina oxidasa (Sigma X-4875).  
1 ml MTT.  
0,5 ml PMS.

Mentrestant, bulliu:

25 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.  
500 mg Agar-agar (Adsa 7-004).

Aboqueu-ho al vas, remeneu-ho ràpidament i aboqueu-ho tot damunt del gel.

t= 15-30 min, a temperatura ambient i exposat a una llum directa.

Lectura del gel.

No es pot conservar, ja que la reacció té lloc a l'agar-agar per difusió.

**PGI** (fosfoglucoisomerasa, EC 5.3.1.9):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

50 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.

0,6 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M.  
20 mg D-Fructosa-6-fosfat (Sigma F-3627).  
6 U G6P (Sigma G-8878).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

600 µl NADP.

t= 1 h 30 min, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**PGM** (fosfoglucomutasa, EC 2.7.5.1):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

75 ml H<sub>2</sub>O.

15 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.

5 ml MgCl<sub>2</sub> 0,1 M.

10 mg α-D-Glucosa-1-fosfat (Sigma G-1259).

50 U G6P (Sigma G-8878).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

50 µl NADP.

t= 2 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

**THD** (treonina deshidrogenasa, EC 1.1.1.103):

Remeneu en un vas de precipitats i després aboqueu a una carmanyola:

100 ml Fosfats Na 0,2 M pH 7.

200 mg L-Thr (Merck 8411).

Poseu-hi el gel.

Prepareu en un vas de precipitats i després aboqueu a la carmanyola:

0,5 ml PMS.

1 ml MTT.

2 ml NAD.

t= 3 h, a 37°C, a la foscor i en agitació.

Atureu la reacció amb aigua.

Lectura del gel.

#### 8.4. Solucions amortidores i reactius de tinció.

##### Àcid màlic 2 M:

160 g NaOH (Panreac 141686).  
 268 g Àcid màlic (Merck 1.00381.0025).  
 → 1 l Aigua destil·lada (H<sub>2</sub>Od.).

Observacions: dissoldre primer la sosa en una botella de vidre en un bany amb gel perquè augmenta moltíssim la T<sup>a</sup> i una volta refredat afegir l'àcid a poc a poc i anar remenant. Utilitzeu ulleres de seguretat i guants.

Conserveu-la a temperatura ambient.

Emprada en els següents enzims: **MDH** i **ME**.

##### APS 10 %:

1 g APS (persulfat amònic, Pharmacia 17-1311-01).  
 → 10 ml H<sub>2</sub>Od.  
 Distribuïu-la en al·lquotes de 500µl i conserveu-les a -20°C.

##### BBF 0,05 % (solució blau de bromofenol):

2 ml Tris-HCl 0,2 M pH 8.  
 8 ml Glicerol (Merck 40914).  
 0,005 g Blau de bromofenol (Ferosa 170382).  
 Conserveu-la en refrigeració.

##### Fosfat K 0,1 M pH 5,5:

13,61 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PM= 136,09) (Fluka 60230).  
 → 1 l H<sub>2</sub>Od.  
 Ajusteu el pH amb NaOH 1 N.  
 Conserveu-la en refrigeració.  
 Emprada en els següents enzims: **LAP**.

##### Fosfats Na 0,2 M pH 7,0:

195 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M:  
 15,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (PM= 156,01) (Panreac 141677).  
 → 500 ml H<sub>2</sub>Od.  
 305 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M:  
 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PM= 141,96) (Fluka 71642).  
 → 500 ml H<sub>2</sub>Od.  
 → 1 l H<sub>2</sub>Od.  
 Conserveu-la en refrigeració.  
 Emprada en els següents enzims: **ALD**, **EST**, **NSP**, **THD**.

##### Fosfats Na 50 mM pH 7,5:

50 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM:  
 3,9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O.  
 → 500 ml H<sub>2</sub>Od.  
 175 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM:  
 3,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.  
 → 500 ml H<sub>2</sub>Od.  
 Esterilitzeu-la a l'autoclau (20 min a 121°C).  
 Conserveu-la en refrigeració.  
 Emprada en l'obtenció d'**extractes cel·lulars**.

**Glicil-Glicina 0,1 M pH 7,5:**

11,3 g Glicina (Panreac 141340).

→ 1 l H<sub>2</sub>Od.

Ajusteu el pH amb KOH 1M.

Conserveu-la en refrigeració.

Emprada en els següents enzims: **HEX, LDH.**

**HCl 1 N:**

104 ml HCl 35 % (PM= 36,47) (Panreac 141019).

→ 1 l H<sub>2</sub>Od.

Observacions: prepareu-ho en una campana de fums amb guants, mascareta i ulleres.

Conserveu-la a temperatura ambient.

**KOH 1 M:**

6,23 g KOH 90 % (PM= 56,11) (Panreac 211514).

→ 100 ml H<sub>2</sub>Od.

Conserveu-la a temperatura ambient.

**MgCl<sub>2</sub> 0,1 M:**

2,03 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (PM= 203,31) (Chemika 63065).

→ 100 ml H<sub>2</sub>Od.

Conserveu-la a temperatura ambient.

**MTT 1,25 %:**

125 mg MTT (bromur 3-[4,5-dimetil-tiazolil-2]-2,5-difeniltetrazole, Sigma M-2128).

→ 10 ml H<sub>2</sub>Od.

Conserveu-la tapada i en refrigeració.

**PMS 1 %:**

100 mg PMS (fenazina metasulfat o *N*-metildibenzopirazina metil sulfat, Sigma P-9625).

→ 10 ml H<sub>2</sub>Od.

Conserveu-la tapada i en refrigeració.

**NAD 1 %:**

100 mg NAD (β-nicotinamida adenina dinucleòtid, Boehringer Mannheim 127981).

→ 10 ml H<sub>2</sub>Od.

Conserveu-la tapada i en refrigeració.

**NADP 1 %:**

100 mg NADP (β-nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat, Sigma N-3886).

→ 10 ml H<sub>2</sub>Od.

Distribuïu-la en alíquotes d'1 ml i conserveu-les a -20°C.

**NaOH 1 N:**

4,17 g NaOH 96 % (PM= 40) (Panreac 141686).

→ 100 ml H<sub>2</sub>Od.

Conserveu-la a temperatura ambient.

**Solució de rentat:**

- 60 ml Etanol absolut (Panreac 141086).
- 10 ml Glicerol (Panreac 141339).
- 500 ml H<sub>2</sub>Od.
- Conserveu-la en refrigeració.

**TEMED** (N,N,N,N'.N'-tetrametiletildiamina, Pharmacia-Biotech 17-1312-01).

**Tris-HCl:**

Tris-hidroximetil-aminoetà (PM= 121,14) (Fluka 93352).

Per a baixar el pH es necessita molt HCl:

Peseu el Tris.

Remeneu amb H<sub>2</sub>Od. però deixant un cert volum per completar.

Ajusteu el pH amb HCl 1 N o 5 N.

Enraseu al volum desitjat.

Torneu a ajustar el pH.

Concentracions de Tris-HCl utilitzades:

0,02 M pH 7: 0,61 g Tris en 250 ml. Emprada en els següents enzims:  
**C120, C230.**

0,125 M pH 6,8: 7,57 g Tris en 500 ml. Emprada en la solució del **gel iniciador.**

0,2 M pH 8: 24,23 g Tris en 1 l. Emprada en els següents enzims: **ADH, FUM, GD1, GOT, GP1, GP2, IDH, IPO, MDH, ME, NSP, PGI i PGM.**

0,4 M pH 8,8: 48,46 g Tris en 1 l. Emprada en la solució del **gel separador.**

0,5 M pH 7,1: 30,29 g Tris en 500ml. Emprada en els següents enzims:  
**G6P.**

Conserveu-les en refrigeració.

**Tris-Glicina 0,19 M pH 8,3:**

15,1 g Tris-hidroximetil-aminoetà 0,025 M (PM= 121,14) (Fluka 93352).

71,3 g Glicina 0,19 M (PM= 75,07) (Panreac 141340).

→ 1 l H<sub>2</sub>Od. (solució x5)

Conserveu-la en refrigeració.

A l'hora d'utilitzar-la, diluïu-la amb H<sub>2</sub>Od., enrasant a 5 l.

És la **solució d'electroforesi.**

→: aforeu al volum final indicat.



## 8.5. Índex de taules i figures.

<b>Figura 1.</b>	Relacions filogenètiques entre diferents <i>taxa</i> de <i>Bacteria</i> i <i>Archaea</i> basades en catàlegs de 16S rRNA.	3
<b>Figura 2.</b>	Tinció de Gram d' <i>Aeromonas bestiarum</i> .	4
<b>Figura 3.</b>	Envoltos de bacteris gramnegatius.	7
<b>Figura 4.</b>	Estructura i model molecular d'un LPS.	8
<b>Figura 5.</b>	Capa S (a) en una cèl·lula de <i>Campylobacter rectus</i> i (b) d' <i>A. hydrophila</i> .	9
<b>Figura 6.</b>	Medi ADA abans i després del creixement d' <i>A. bestiarum</i> .	13
<b>Figura 7.</b>	Producció de pigment marró en TSA per <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> .	17
<b>Figura 8.</b>	Relacions filogenètiques de les espècies descrites en el gènere <i>Aeromonas</i> determinades comparant les seqüències del 16S rDNA.	26
<b>Figura 9.</b>	Dendrograma i perfil de bandes generats per l'aplicació de la ribotipificació a set soques <i>A. popoffii</i> i les soques tipus o de referència d' <i>A. hydrophila</i> (HG1), <i>A. bestiarum</i> (HG2) i <i>A. salmonicida</i> (HG3).	28
<b>Figura 10.</b>	Dendrograma de l'anàlisi numèrica del perfil de bandes AFLP de diferents espècies del gènere <i>Aeromonas</i> .	29
<b>Figura 11.</b>	Resolució taxonòmica de les principals tècniques utilitzades en taxonomia bacteriana.	32
<b>Figura 12.</b>	Sistema NAD(P) - PMS - MTT per a la detecció d'activitat enzimàtica.	68
<b>Figura 13.</b>	Sistema de les sals de diazoni per a la detecció d'activitat enzimàtica.	69
<b>Figura 14.</b>	Lectura de gels amb una banda d'activitat enzimàtica.	77
<b>Figura 15.</b>	Lectura de gels amb vàries bandes d'activitat enzimàtica.	78
<b>Figura 16.</b>	Percentatges d' <i>Aeromonas</i> aïllades en mol·luscs bivalves.	87
<b>Figura 17.</b>	Distribució de les espècies d' <i>Aeromonas</i> aïllades en aigües dolces.	91
<b>Figura 18.</b>	Distribució de les espècies d' <i>Aeromonas</i> aïllades en bivalves.	92
<b>Figura 19.</b>	Distribució de les espècies d' <i>Aeromonas</i> en mostres clíniques.	92
<b>Figura 20.</b>	Dendrograma de la taxonomia numèrica del gènere <i>Aeromonas</i> obtingut amb el programa NTSYS®.	101
<b>Figura 21.</b>	Dendrograma simplificat amb els huit <i>phena</i> obtinguts al 89 % $S_{SM}$ .	103
<b>Figura 22.</b>	Alanina deshidrogenasa.	111
<b>Figura 23a.</b>	Catecol 1,2-dioxigenasa.	111
<b>Figura 23b.</b>	Catecol 1,2-dioxigenasa.	112
<b>Figura 24.</b>	Catecol 2,3-dioxigenasa.	112
<b>Figura 25.</b>	Esterasa 1.	113

<b>Figura 26.</b>	GOT.	113
<b>Figura 27.</b>	Esterases 1 i 2.	114
<b>Figura 28.</b>	Leucina aminopeptidasa.	114
<b>Figura 29a.</b>	Hexoquinasa.	115
<b>Figura 29b.</b>	Hexoquinasa.	115
<b>Figura 30.</b>	Indofenol oxidasa.	116
<b>Figura 31a.</b>	Isocitrat deshidrogenasa.	116
<b>Figura 31b.</b>	Isocitrat deshidrogenasa.	117
<b>Figura 32.</b>	Lactat deshidrogenasa 1.	117
<b>Figura 33.</b>	Lactat deshidrogenases 1 i 2.	118
<b>Figura 34a.</b>	Malat deshidrogenasa.	118
<b>Figura 34b.</b>	Malat deshidrogenasa.	119
<b>Figura 35.</b>	Enzim màlic.	119
<b>Figura 36.</b>	Dendrograma de la relació genètica entre els 79 ETs.	127
<b>Figura 37.</b>	Distribució del nombre de no coincidències entre els 79 ETs estudiats.	131
<b>Figura 38.</b>	Diversitat genètica mitjana ( $H$ ) de les espècies d' <i>Aeromonas</i> estudiades.	152
<b>Taula 1.</b>	Principals factors de virulència en el gènere <i>Aeromonas</i> .	7
<b>Taula 2.</b>	Classificació del gènere <i>Aeromonas</i> .	15
<b>Taula 3.</b>	Diferenciació fenotípica de les espècies del complex fenotípic <i>A. hydrophila</i> .	16
<b>Taula 4.</b>	Característiques diferencials de les subespècies psicròfiles d' <i>A. salmonicida</i> .	18
<b>Taula 5.</b>	Proves fenotípiques útils en la diferenciació de les espècies o complexos fenotípics mesòfils del gènere <i>Aeromonas</i> .	25
<b>Taula 6.</b>	Perfils dels fragments de DNA de diferents <i>Aeromonas</i> spp. obtinguts aplicant la tècnica RFLP.	30
<b>Taula 7.</b>	Soques tipus i de referència incloses en l'estudi taxonòmic.	47
<b>Taula 8.</b>	Altres soques proporcionades i incloses en l'estudi taxonòmic.	48
<b>Taula 9.</b>	Concentracions d'antibiòtics i diàmetres (mm) de la zona d'inhibició.	61
<b>Taula 10.</b>	Composició dels gels de poliacrilamida.	67
<b>Taula 11.</b>	Soques seleccionades per medi de cultiu i tipus de mostra.	84
<b>Taula 12.</b>	<i>Aeromonas</i> aïllades per medi de cultiu i tipus de mostra.	85-86
<b>Taula 13.</b>	Percentatges d' <i>Aeromonas</i> aïllades per tipus de mostra en els medis AD i ADA.	88



---

<b>Taula 14.</b>	Proves clau per a la identificació fenotípica de les espècies d' <i>Aeromonas</i> mesòfiles.	90
<b>Taula 15.</b>	Distribució i identificació de les <i>Aeromonas</i> aïllades per tipus de mostra.	93
<b>Taula 16.</b>	Característiques fenotípiques dels <i>phena</i> i de les soques no agrupades.	98-99
<b>Taula 17.</b>	Distribució de les soques per tipus de mostres i <i>phena</i> .	108
<b>Taula 18.</b>	Marcadors fenotípics de patogenicitat.	109
<b>Taula 19.</b>	Perfil al·lèlic dels ETs.	121-124
<b>Taula 20.</b>	Diversitat genètica dels 15 loci.	125-126
<b>Taula 21.</b>	Distribució de les soques per font d'aïllament en els grups formats en el dendrograma de la relació genètica entre ETs.	129
<b>Taula 22.</b>	Anàlisi del desequilibri de lligament multilocus.	130
<b>Taula 23.</b>	MLEE <i>versus</i> identificació fenotípica.	131
<b>Taula 24.</b>	Al·lels més freqüents en les principals espècies estudiades.	133
<b>Taula 25.</b>	Taula resum dels estudis taxonòmic i de MLEE.	134-136
<b>Taula 26.</b>	Comparació dels estudis de la tècnica MLEE aplicada al gènere <i>Aeromonas</i> .	150
<b>Taula 27.</b>	Diversitat genètica mitjana ( <i>H</i> ) d'alguns gèneres i espècies bacterians.	151
<b>Taula 28.</b>	Distribució de les espècies del gènere <i>Aeromonas</i> en el dendrograma dels diferents estudis on s'ha aplicat la tècnica MLEE.	154



## 8.6. Abreviacions.

**AD:** agar dextrina.

**ADA:** agar dextrina - ampicil·lina.

**ADH:** alcohol deshidrogenasa.

**ADH:** arginina deshidrolasa.

**ADP:** adenosina difosfat.

**AFLP:** polimorfisme de fragments llargs amplificats.

**ALD:** alanina deshidrogenasa.

**AP:** aigua de peptona.

**APS:** persulfat amònic.

**APW:** aigua de peptona alcalina.

**Asp:** aspartat.

**ATCC:** Col·lecció Americana de Cultius-Tipus.

**ATP:** adenosina trifosfat.

**BBF:** solució blau de bromofenol.

**bv.:** biovar.

**C12O:** catecol 1,2-dioxigenasa.

**C23O:** catecol 2,3-dioxigenasa.

**CECT:** Col·lecció Espanyola de Cultius-Tipus.

**Cys:** cisteïna.

**DNA:** àcid desoxiribonucleic.

**EST:** esterasa.

**ET:** tipus electroforètic.

**FAME:** èsters metilats dels àcids grassos.

**FUM:** fumarasa.

**G+C:** guanina i citosina.

**G6P:** glucosa-6-fosfat deshidrogenasa.

**GD1:** glutamat deshidrogenasa depenent de NAD.

**Glu:** glutamat.

**GOT:** glutamat-oxalacetat transaminasa.

**GP1:** gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa depenent de NAD.

**GP2:** gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa depenent de NADP.

**h:** diversitat genètica.

**H:** diversitat genètica mitjana.

**HEX:** hexoquinasa.

- HG:** grup d'hibridació DNA-DNA.
- I<sub>A</sub>:** índex d'associació.
- IDH:** isocitrat deshidrogenasa.
- IPO:** indofenol oxidasa.
- LAP:** leucina aminopeptidasa.
- LDC:** lisina descarboxilasa.
- LDH:** lactat deshidrogenasa.
- LMG:** Col·lecció Belga de Cultius-Tipus
- LPS:** lipopolisacàrid.
- MDH:** malat deshidrogenasa.
- ME:** enzim màlic.
- MLEE:** electroforesi d'enzims multilocus.
- MTT:** bromur 3-(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5-difeniltetrazole.
- NAD:** β-nicotinamida adenina dinucleòtid.
- NADP:** β-nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat.
- NAGA:** *n*-acetil glucosamina.
- NSP:** nucleòsid fosforilasa.
- NTSYS:** sistema d'anàlisi en taxonomia numèrica.
- O/129:** 2,4-diamino-6,7-di-iso-propilpteridina fosfat.
- OAA:** oxalacetat.
- ODC:** ornitina descarboxilasa.
- O/F:** medi basal per a l'oxidació i la fermentació de carbohidrats.
- ONPG:** orto-nitrofenil-β-D-galacto-piranosà.
- PCR:** reacció en cadena de la polimerasa.
- PFGE:** electroforesi de camp polsant.
- PGI:** fosfoglucoisomerasa.
- PGM:** fosfoglucomutasa.
- PM:** massa molecular.
- PMS:** fenazina metasulfat.
- r:** coeficient de correlació.
- RAPD:** amplificació a l'atzar de DNA polimòrfic.
- RFLP:** polimorfisme de fragments llargs de restricció.
- RNA:** àcid ribonucleic.
- rRNA:** RNA ribosòmic.
- SD:** desviació estàndard.
- SIM:** agar sulfhídric-indole-mobilitat.

**sp.:** espècie.

**spp.:** espècies.

**S<sub>SM</sub>:** coeficient de concordança simple de Sokal-Michener.

**STB:** caldo de tolerància salina.

**subsp.:** subespècie.

**TCBS:** agar tiosulfat - citrat - bilis - sacarosa.

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.

**THD:** treonina deshidrogenasa.

**Thr:** treonina.

**T<sub>m</sub>:** temperatura de fusió.

**TSA:** agar triptona de soja.

**TSB:** caldo triptona de soja.

**UPGMA:** anàlisi de dades binàries per la mitjana aritmètica.

**V<sub>E</sub>:** variància esperada.

**V<sub>O</sub>:** variància observada.

**VP:** Voges-Proskauer.

**VPRM:** caldo Voges-Proskauer i roig de metil.



# Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain

D. Miñana-Galbis, M. Farfán, J.G. Lorén and M.C. Fusté

Departament Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Divisió IV, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

2002/58: received 8 February 2002, revised 29 April 2002 and accepted 13 May 2002

D. MIÑANA-GALBIS, M. FARFÁN, J.G. LORÉN AND M.C. FUSTÉ. 2002.

**Aims:** To study the phenotypic characteristics of *Aeromonas* spp. from environmental and clinical samples in Spain and to cluster these strains by numerical taxonomy.

**Methods and Results:** A collection of 202 *Aeromonas* strains isolated from bivalve molluscs, water and clinical samples was tested for 64 phenotypic properties; 91% of these isolates were identified at species level. *Aeromonas caviae* was predominant in bivalve molluscs and *Aerom. bestiarum* in freshwater samples. Cluster analyses revealed eight different phenotypes: three containing more than one DNA–DNA hybridization group but including strains that belong to the same phenospecies complex (*Aerom. hydrophila*, *Aerom. sobria* and *Aerom. caviae*), *Aerom. encheleia*, *Aerom. trota* and three containing unidentified *Aeromonas* strains isolated from bivalve molluscs.

**Conclusions:** *Aeromonas* spp. are widely distributed in environmental and clinical sources. A selection of 16 of the phenotypic tests chosen allowed the identification of most isolates (91%), although some strains remain unidentified, mainly isolates from bivalve molluscs, suggesting the presence of new *Aeromonas* species. Numerical taxonomy was not in total concordance with the identification of the studied strains.

**Significance and Impact of the Study:** Numerical taxonomy of *Aeromonas* strains isolated from different sources revealed the presence of potentially pathogenic *Aeromonas* spp., especially in bivalve molluscs, and phenotypes with unidentified strains that suggest new *Aeromonas* species.

## INTRODUCTION

The genus *Aeromonas* consists of ubiquitous, oxidase-positive, facultatively anaerobic, Gram-negative  $\gamma$ -proteobacteria autochthonous to aquatic environments. These bacteria are usual microbiota as well as primary or secondary pathogens of fish, amphibians and other exothermic animals and some motile species (mainly *Aeromonas caviae*, *Aerom. hydrophila* and *Aerom. veronii* bv. *sobria*) are opportunistic pathogens of humans (Janda and Abbott 1998).

Since the first DNA–DNA hybridization study performed in *Aeromonas* (Popoff *et al.* 1981) and the description of the genus with four phenospecies (*Aerom. caviae*, *Aerom.*

*hydrophila*, *Aerom. salmonicida* and *Aerom. sobria*) in Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology* (Popoff 1984), 17 hybridization groups (HGs) have been assigned: *Aerom. hydrophila* HG1, *Aerom. bestiarum* HG2, *Aerom. salmonicida* HG3, *Aerom. caviae* HG4, *Aerom. media* HG5, *Aerom. eucrenophila* HG6, *Aerom. sobria* HG7, *Aerom. veronii* bv. *sobria* HG8, *Aerom. jandaei* HG9, *Aerom. veronii* bv. *veronii* HG10, unnamed HG11, *Aerom. schubertii* HG12, unnamed HG13 (enteric group 501), *Aerom. trota* HG14, *Aerom. allosaccharophila* HG15, *Aerom. encheleia* HG16 and *Aerom. popoffii* HG17 (Allen *et al.* 1983; Farmer *et al.* 1986; Hickman-Brenner *et al.* 1987; Hickman-Brenner *et al.* 1988; Schubert and Hegazi 1988; Kuijper *et al.* 1989; Altwegg *et al.* 1990; Carnahan *et al.* 1991a; Carnahan *et al.* 1991b; Carnahan *et al.* 1991c; Martínez-Murcia *et al.* 1992; Esteve *et al.* 1995; Ali *et al.* 1996; Huys *et al.* 1997).

Correspondence to: Dr M.C. Fusté Munné, Departament Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Divisió IV, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n 08028 Barcelona, Spain (e-mail: mcfuste@farmacia.far.ub.es).

The sudden description of such a high number of genospecies in *Aeromonas* has meant that most laboratories (e.g. clinical) have not discriminated among the species that belong to the *Aerom. hydrophila*, *Aerom. caviae* and *Aerom. sobria* complex (Janda and Abbott 1998) because of the large number of phenotypic tests required for an accurate biochemical identification of all genospecies (Altwegg *et al.* 1990; Abbott *et al.* 1992; Kämpfer and Altwegg 1992; Janda *et al.* 1996; Oakey *et al.* 1996; Carson *et al.* 2001).

Although several numerical studies of *Aeromonas* strains have been performed (Kämpfer and Altwegg 1992; Carnahan and Joseph 1993; Esteve 1995; Noterdaeme *et al.* 1996; Kaznowski 1997), none of them included isolates from bivalve molluscs.

The present study was undertaken to identify *Aeromonas* strains isolated from different sources and to cluster them by numerical taxonomy.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains

A total of 220 strains was analysed. These included 101 *Aeromonas* isolated from six fresh water samples in Spain: 75 from drinking water springs (Montseny 1, Montseny 2 and Hostalets de Balenyà, Barcelona), 15 from a non-drinking water spring (El Preventori, Alcoi, Alacant), 10 from a pond pool (Hostalets de Balenyà, Barcelona) and an isolate from a

drinking water distribution system (kindly provided by Dr X. Lizana).

Eighty-eight *Aeromonas* strains were isolated from marine bivalve molluscs from different retail markets in Barcelona (Spain).

Thirteen *Aeromonas* strains were kindly donated from a variety of clinical sources: 11 by Dr G. Prats (Hospital de Sant Pau i la Santa Creu, Barcelona) and two by Dra C. Segura (Hospital Duran i Reynals, Barcelona). Finally, 18 type and reference strains from CECT (Spanish Type Culture Collection) were also included (Table 1).

### Phenotypic characterization

Each strain was tested for 64 phenotypic properties. Unless otherwise stated, incubations were performed at 25°C (Oakey *et al.* 1996) and all media contained 1% (w/v) NaCl, provided as such or supplemented at the laboratory (Holt *et al.* 1994).

Oxidase-positive, glucose-fermentative, Gram-negative rods with non-swarming production, no sodium requirements, absence of growth at 9% NaCl and resistance to vibriostatic agent O/129 were presumptively identified as Aeromonadaceae and stored in tryptone soy broth (TSB) with 20% (v/v) glycerol at -40°C until further analyses were carried out.

The KOH method (Fluharty and Packard 1967) was used to determine the Gram reaction, although Gram staining

**Table 1** Type or reference strains used in this study

Phenon	Taxon	Type or reference strains	Source of isolation
Ia	<i>Aerom. bestiarum</i>	CECT 4227 <sup>T</sup> = ATCC 51108 <sup>T</sup>	Fish
Id	<i>Aerom. hydrophila</i>	CECT 839 <sup>T</sup> = ATCC 7966 <sup>T</sup>	Tin of milk with fishy odour
II	<i>Aerom. encheleia</i>	CECT 4342 <sup>T</sup> = ATCC 51929 <sup>T</sup>	Healthy European eel
III	<i>Aerom. jandaiei</i>	CECT 4228 <sup>T</sup> = ATCC 49568 <sup>T</sup>	Human stool of patient with diarrhoea
III	<i>Aerom. sobria</i>	CECT 4245 <sup>T</sup> = ATCC 43979 <sup>T</sup>	<i>Cyprinus carpio</i> (carp)
IVb	<i>Aerom. caviae</i>	CECT 838 <sup>T</sup> = ATCC 15468 <sup>T</sup>	Epizootic of young guinea pig
IVb	<i>Aerom. eucrenophila</i>	CECT 4224 <sup>T</sup> = ATCC 23309 <sup>T</sup>	Fresh water fish
VIII	<i>Aerom. trola</i>	CECT 4255 <sup>T</sup> = ATCC 49657 <sup>T</sup>	Human stool
VIII	<i>Aerom. enteropelogenes</i>	CECT 4487 <sup>T</sup> = ATCC 49803 <sup>T</sup>	Human faeces
Unclustered strains:			
	<i>Aerom. allosaccharophila</i>	CECT 4199 <sup>T</sup> = ATCC 51208 <sup>T</sup>	Diseased elver of <i>Anguilla anguilla</i> (eel)
	<i>Aerom. media</i>	CECT 4232 <sup>T</sup> = ATCC 33907 <sup>T</sup>	Fish farm effluent
	<i>Aerom. salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 <sup>T</sup> = ATCC 33658 <sup>T</sup>	<i>Salmo salar</i> (Atlantic salmon)
	<i>Aerom. schubertii</i>	CECT 4240 <sup>T</sup> = ATCC 43700 <sup>T</sup>	Forehead abscess
	<i>Aerom. veronii</i> biovar <i>sobria</i>	CECT 4246 = ATCC 9071	Infected frog suffering from red-leg disease
	<i>Aerom. veronii</i> biovar <i>veronii</i>	CECT 4257 <sup>T</sup> = ATCC 35624 <sup>T</sup>	Sputum of drowning victim
	<i>Vibrio cholerae</i>	CECT 514 <sup>T</sup> = ATCC 14035 <sup>T</sup>	Human faeces
	<i>V. furnissii</i>	CECT 4203 <sup>T</sup> = ATCC 35016 <sup>T</sup>	Human faeces
	<i>Escherichia coli</i>	CECT 405 = ATCC 10536	

CECT, Spanish Type Culture Collection; ATCC, American Type Culture Collection; <sup>T</sup>, type strain.



(Hucker staining method) was performed when results were doubtful. The oxidation–fermentation test was performed in O/F basal medium (Difco) supplemented with 1% (w/v) glucose following Hugh and Leifson (1953).

The following tests were carried out as described elsewhere (Gerhardt *et al.* 1994): cell shape; cytochrome oxidase; catalase activity (methods 1 and 2); swarming motility on tryptone soy agar (TSA) and citrate utilization (Simmons' citrate agar, method 1) after 7 d; gas production from D-glucose (method 1) and  $\beta$ -haemolysis of sheep blood (method 1) after 48 h; indole production (method 2), methyl red and Voges–Proskauer reactions, esculin (but with 0.1% esculin and 0.1% ferric ammonium citrate) and starch hydrolyses after 72 h and DNase test (method 1) after 4 d.

Motility and hydrogen sulphide production from thiosulphate were tested on hydrogen sulphide indol motility (SIM) medium after 72 h. Motility was verified in overnight cultures in peptone water by microscopic examination when there were doubts.  $\beta$ -galactosidase activity was assessed following the manufacturer's instructions (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside [ONPG] discs; Oxoid).

The production of a brown diffusible pigment was visually determined after 7 d on TSA medium; growth at different temperatures was determined on TSB after 15 d at 4°C and after 24 h at 25, 36 and 45°C; growth at pH 4.5 and 9.0 was tested on TSB after 48 h; growth on MacConkey, aeromonas dextrin agar (AD) (m-*Aeromonas* selective agar base of Havelaar; Havelaar *et al.* 1987) and thiosulphate citrate bile salts sucrose agar (TCBS) media was examined after 48 h. Yellow colonies on AD medium were indicative of acid production from dextrin after 48 h.

The following tests were performed as described elsewhere (MacFaddin 1981): the nitrate reduction test was carried out in nitrate broth after 48 h, the urease test (Rustigian and Stuart's urea broth) after 48 h and the lysine (LDC) and ornithine (ODC) decarboxylases and arginine dehydrolase (ADH) tests in Falkow decarboxylase broth after 4 d. Arbutin hydrolysis was carried out as reported elsewhere (Janda *et al.* 1984).

The salt tolerance test [0, 1, 3, 6 and 9% (w/v) NaCl] was carried out following Twedt (1978) after 72 h. Acid production from 1% (w/v) of the following substrates (Twedt 1984), L-arabinose, D-lactose, D-mannose, D-mannitol, salicin, D-sorbitol and sucrose, was determined after 7 d.

The utilization of substrates as sole carbon sources was studied on M70 medium (Véron 1975; Popoff and Lallier 1984). The following substrates [0.2% (w/v) sugars, 0.1% (w/v) others] were filter sterilized: acetate, L-arabinose, L-arginine, L-histidine, L-lactate and D-mannitol. Bacterial growth was examined for 14 d. Hydrogen sulphide from cysteine after 4 d and elastase production after 15 d were

according to Popoff and Lallier (1984). Hydrolysis of xanthine after 15 d was determined following Phillips and Nash (1985).

Susceptibility to the vibriostatic agent O/129 (150  $\mu$ g; Oxoid) and the following antibiotics (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France): ampicillin (10  $\mu$ g), cephalothin (30  $\mu$ g), colistin (50  $\mu$ g), polymyxin B (300 U), streptomycin (10  $\mu$ g) and tetracyclin (30  $\mu$ g) was tested by the disc diffusion method (Jorgensen *et al.* 1999).

### Coding of data and computer analysis

Test results were classified as 1 for positive and 0 for negative. Data were analysed using the NTSYS<sup>®</sup> (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.8; Rohlf 1993) program. Similarities were calculated using the  $S_{SM}$  (simple matching coefficient) and clustered by UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean analysis). Results are expressed in a dendrogram (Fig. 1) and the co-phenetic correlation coefficient ( $r$ ) was calculated to validate the clustering of strains (Sneath and Sokal 1973).

### Test reproducibility

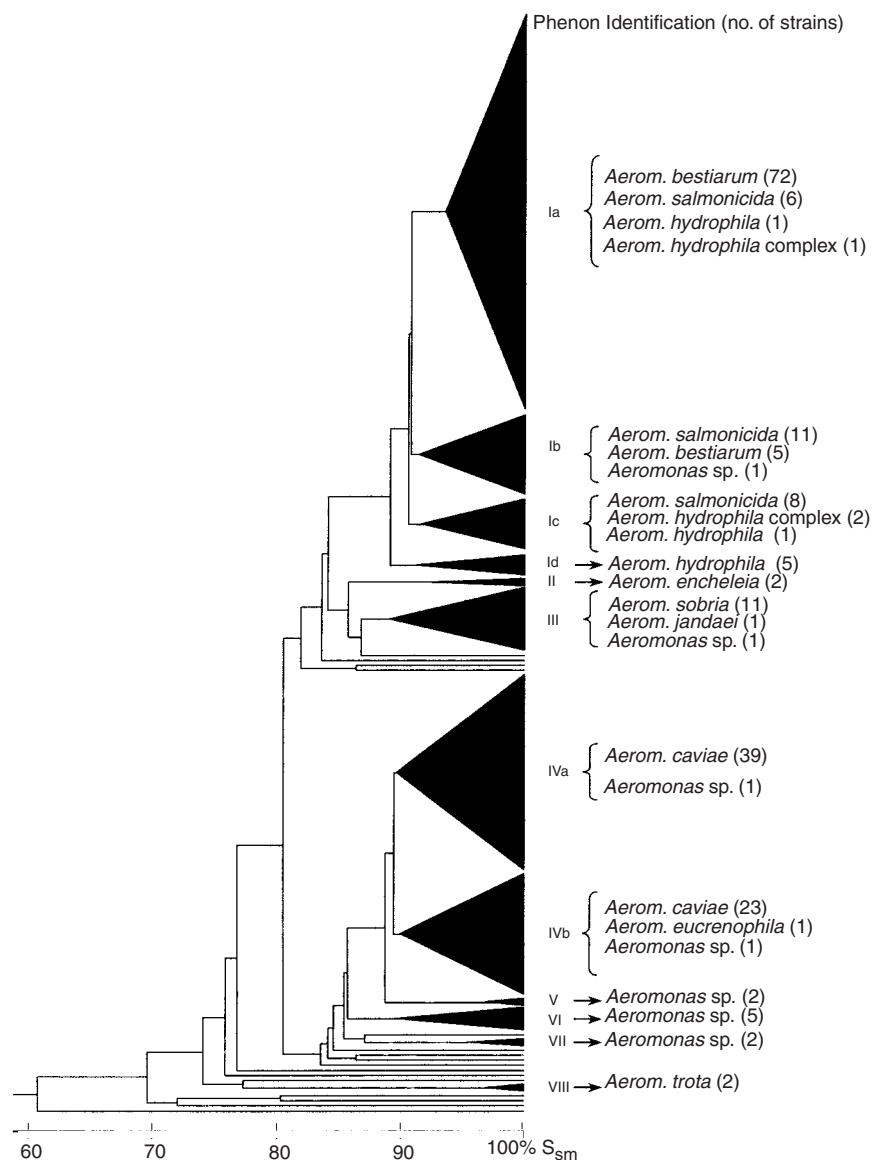
The test error was evaluated by examining 22 strains in duplicate (10% of the total strains) according to the method suggested by Sneath and Johnson (1972).

## RESULTS

### Identification and distribution of *Aeromonas* species

All *Aeromonas* strains were positive for rod morphology, glucose oxidation–fermentation, oxidase, O/129 resistance, nitrate reduction, growth at 0, 1 and 3% NaCl, growth at pH 9, 25 and 36°C (except *Aerom. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>), growth on AD agar and acid production from mannitol (except *Aerom. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup>) and negative for Gram reaction, growth at 9% NaCl, swarming motility, urea and xanthin hydrolysis. The results of the remaining tests are shown in Table 2.

A selection of 16 phenotypic tests (marked with an asterisk in Table 2) allowed the identification of HGs described in the genus *Aeromonas*. Most species were differentiated by three or more tests, although there were some exceptions. The species belonging to the *Aerom. hydrophila* complex (*Aerom. hydrophila* HG1, *Aerom. bestiarum* HG2 and *Aerom. salmonicida* HG3) were differentiated on the basis of sorbitol fermentation and lactate assimilation. *Aeromonas eucrenophila* (HG6) could be discriminated from *Aerom. caviae* (HG4) by gas production from glucose and from *Aerom.*



**Fig. 1** Simplified dendrogram at 89% S<sub>SM</sub> using UPGMA

*encheleia* (HG16) by LDC and arabinose fermentation. Sucrose fermentation allowed differentiation between *Aerom. sobria* (HG7) and *Aerom. jandaei* (HG9). *Aeromonas jandaei* was differentiated from *Aerom. popoffii* (HG17) on the basis of LDC and growth on lactate. Finally, arabinose fermentation and starch hydrolysis results were opposite in *Aerom. sobria* (HG7) and *Aerom. veronii* bv. *sobria* (HG8).

A high percentage (91.1%) of *Aeromonas* isolates was identified at species level. The distribution of *Aeromonas* species varied depending on the sample. In fresh water, all isolates were identified and the predominant species was *Aerom. bestiarum* (74.3%), followed by *Aerom. caviae* (18.8%) and *Aerom. salmonicida* (5%). In bivalve molluscs, the predominant species was *Aerom. caviae* (45.5%), followed by *Aerom. salmonicida* (22.7%) and *Aerom. sobria*

(6.8%). In this case, 19.3% of isolates remained unidentified. Clinical isolates were identified as *Aerom. caviae* (30.8%), *Aerom. hydrophila* (30.8%) and *Aerom. sobria* (30.8%) and an isolate could not be identified.

### Structure of the dendrogram

Eight clusters, comprising at least two strains each, were defined at 89% S<sub>SM</sub> while 16 strains remained unclustered (Fig. 1).

Phenon I, defined at 89% S<sub>SM</sub>, contained 113 strains, including two type strains (*Aerom. hydrophila* CECT 839<sup>T</sup> and *Aerom. bestiarum* CECT 4227<sup>T</sup>). All strains belonged to the *Aerom. hydrophila* complex (*Aerom. hydrophila*, *Aerom. bestiarum* and *Aerom. salmonicida* species), except an

**Table 2** Phenotypic characteristics of phena and unclustered strains analysed in this study

	Phena											
	I	Ia	Ib	Ic	Id	II	III	IV	IVa	IVb	V	VI
	HG†											
		2	3	3	1	16	7		4	4	–	–
No. of strains												
	113	80	17	11	5	2	13	65	40	25	2	5
Motility	+					+	+	89	83	+	+	+
Brown soluble pigment*	–					–	–	–			–	20
Catalase	99	+	+	91	+	+	+	+			+	+
Gas from glucose*	99	+	94	+	+	+	+	2	–	4	+	–
ONPG	+					+	+	97	95	+	+	+
Methyl red	68	81	41	36	20	50	31	+			+	+
Voges–Proskauer*	96	+	82	91	+	50	+	–			+	–
Arginine dihydrolase	+					+	+	65	70	56	+	60
Lysine decarboxylase*	+					+	+	2	–	4	+	–
Ornithine decarboxylase*	–					–	–	–			–	–
Production of:												
Indole*	99	+	94	+	+	+	+	98	98	+	+	–
H <sub>2</sub> S from thiosulphate	93	99	76	73	+	+	+	42	15	84	50	–
H <sub>2</sub> S from L-cysteine*	99	+	94	+	+	+	+	15	3	36	–	–
Growth:												
6% NaCl	1	1	–	–	–	–	–	5	8	–	–	–
4 °C	96	+	+	+	20	+	+	95	95	96	+	+
45 °C	7	9	–	–	20	+	–	5	5	4	–	–
MacConkey	99	99	+	+	+	+	+	+			+	+
TCBS	99	99	+	+	+	+	92	68	53	92	+	80
pH = 4.5	1	1	–	–	–	–	–	–			–	–
Hydrolysis of:												
Arbutin*	+					+	–	95	98	92	+	+
DNA	+					+	+	98	98	+	+	+
Elastin*	82	79	88	91	+	–	–	–			–	–
Erythrocytes	93	99	65	91	+	50	92	17	20	12	–	40
Esculin*	+					+	8	98	98	+	+	+
Starch*	+					+	+	+			+	40
Acid from:												
Arabinose*	98	+	+	+	60	–	23	98	98	+	+	+
Dextrin	99	+	+	91	+	+	+	+			+	40
Lactose	9	–	18	64	–	–	15	75	80	68	+	–
Mannitol*	+					+	+	+			+	+
Mannose	+					+	+	91	85	+	+	+
Salicin	88	89	82	82	+	+	8	94	95	92	+	20
Sorbitol*	25	8	71	91	–	–	–	8	13	–	–	–
Sucrose*	+					+	92	+			+	+
Utilization of:												
Acetate	98	+	94	+	80	50	85	95	98	92	+	80
Arabinose	97	+	+	+	40	–	15	97	95	+	+	+
Arginine	99	+	94	+	+	+	+	+			+	+
Citrate	73	70	82	82	80	–	85	66	83	40	+	+
Histidine	+					+	+	+			+	+
L-lactate*	8	1	–	27	+	–	8	58	95	–	50	40
Mannitol	+					+	+	98	98	+	+	+
Resistance to:												
Ampicillin	+					+	92	98	98	+	+	80

**Table 2** Continued

	Phena											
	I	Ia	Ib	Ic	Id	II	III	IV	IVa	IVb	V	VI
	HG†											
		2	3	3	1	16	7		4	4	-	-
	No. of strains											
	113	80	17	11	5	2	13	65	40	25	2	5
Cephalothin	+					50	15	92	88	+	+	60
Colistin	58	79	-	18	20	-	8	2	-	4	-	-
Polymyxin B	48	64	-	18	20	-	8	-			-	-
Streptomycin	50	48	82	-	80	-	46	43	33	60	-	-
Tetracyclin	1	-	6	-	-	-	-	3	5	-	-	-

	Phena									
	VII	VIII	95M	290T	292C	899T	912T	924O	A15CL	
	HG†									
	-	14	-	-	-	-	-	-	-	4
	No. of strains									
	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
Motility	50	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Brown soluble pigment*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Gas from glucose*	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methyl red	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Voges-Proskauer*	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Lysine decarboxylase*	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
Ornithine decarboxylase*	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Production of:										
Indole*	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
H <sub>2</sub> S from thiosulphate	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
H <sub>2</sub> S from L-cysteine*	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Growth:										
6% NaCl	+	50	+	+	+	-	+	-	-	-
4 °C	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
45 °C	50	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TCBS	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
pH = 4.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of:										
Arbutin*	+	50	+	+	+	+	-	-	-	+
DNA	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Elastin*	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Erythrocytes	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin*	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Starch*	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Acid from:										
Arabinose*	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+

Table 2 Continued

	Phena								
	VII	VIII	95M	290T	292C	899T	912T	924O	A15CL
	HG†								
	–	14	–	–	–	–	–	–	4
	No. of strains								
	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Dextrin	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Lactose	–	–	–	–	+	–	–	–	+
Mannitol*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	–	+	+	+	–	+	+	+	+
Salicin	+	–	+	–	+	+	+	–	–
Sorbitol*	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Sucrose*	+	–	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of:									
Acetate	+	+	+	+	+	–	+	+	–
Arabinose	+	–	+	+	+	–	+	+	–
Arginine	+	+	+	+	+	+	+	–	–
Citrate	+	+	+	+	+	–	+	+	–
Histidine	+	+	+	+	+	+	+	–	+
L-lactate*	+	+	–	+	+	–	+	+	–
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Resistance to:									
Ampicillin	+	–	+	+	–	+	+	+	–
Cephalothin	50	+	+	+	+	+	+	–	–
Colistin	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Polymyxin B	–	–	–	–	–	–	+	–	–
Streptomycin	–	+	–	–	–	+	–	–	–
Tetracyclin	–	–	+	–	–	–	–	–	–

\*The 16 basic tests used to identify mesophilic *Aeromonas* species.

†The most representative hybridization group (HG) of each phenon.

+, All strains positive; –, all strains negative; numbers indicate percentage of positive strains; ONPG, o-nitrophenyl- $\beta$ -d-galacto-pyranoside; TCBS, thiosulphate citrate bile salts sucrose agar.

*Aeromonas* sp. isolate (strain 51C from carpet-shells). This phenon was divided into four subgroups (Fig. 1) and the principal differences among them were sorbitol fermentation and growth on lactate (Table 2). This differentiation allowed us to assign subgroup Ia to *Aerom. bestiarum*, Ib and Ic to *Aerom. salmonicida* and Id to *Aerom. hydrophila*. The main subgroup, Ia (80 strains), clustered 72 *Aerom. bestiarum* strains (including CECT 4227<sup>T</sup>), six *Aerom. salmonicida* strains, an *Aerom. hydrophila* isolate and an isolate belonging to the *Aerom. hydrophila* complex that could not be ascribed to any genospecies. Subgroup Ib (17 strains) consisted of 11 *Aerom. salmonicida*, five *Aerom. bestiarum* and an *Aeromonas* sp. strain. Subgroup Ic included 11 strains, mainly *Aerom. salmonicida* strains (eight), but also *Aerom. hydrophila* (one) and two isolates belonging to the *Aerom. hydrophila* complex but which could not be ascribed

to any genospecies. Finally, subgroup Id clustered five *Aerom. hydrophila* strains, including CECT 839<sup>T</sup> strain.

Phenon II, defined at 92% S<sub>SM</sub>, included a large oyster isolate and the type strain CECT 4342<sup>T</sup>, both in agreement with the current description of *Aerom. encheleia* (Esteve *et al.* 1995), except for the positive response in the lysine decarboxylase test and the use of arginine as sole carbon source.

Phenon III, defined at 89% S<sub>SM</sub>, contained 13 strains, 11 identified as *Aerom. sobria* (including the type strain CECT 4245<sup>T</sup>), an *Aeromonas* sp. isolate (strain A20CL from clinical sample) and the type strain *Aerom. jandaei* CECT 4228<sup>T</sup> (Carnahan *et al.* 1991a). The profile of the *Aerom. sobria* strains corresponded to the description of this species (Popoff 1984), except for their assimilation of arginine and histidine, so this phenon was assigned to the *Aerom. sobria*

species. All of these strains hydrolysed starch and most of them grew on citrate (10 of 11) but did not produce acid from arabinose (nine of 11).

Between phenon III and IV there were strain 899T, isolated from wedge-shells, and the type or reference strains *Aerom. veronii* bv. *sobria* CECT 4246, *Aerom. allosaccharophila* CECT 4199<sup>T</sup> and *Aerom. veronii* bv. *veronii* CECT 4257<sup>T</sup>. The phenotypic profile of 899T hindered its identification (Table 2). CECT 4246, identified as *Aerom. veronii* bv. *sobria*, was positive for the arabinose fermentation test and negative for starch hydrolysis and citrate assimilation. CECT 4199<sup>T</sup> (*Aerom. allosaccharophila*) was in agreement with its description (Martínez-Murcia *et al.* 1992), except for starch hydrolysis, and CECT 4257<sup>T</sup> (*Aerom. veronii* bv. *veronii*) with the description of *Aerom. veronii* bv. *veronii* (Hickman-Brenner *et al.* 1987).

Phenon IV, defined at 89%  $S_{SM}$ , contained 65 strains, including the type strains *Aerom. caviae* CECT 838<sup>T</sup> and *Aerom. eucrenophila* CECT 4224<sup>T</sup>. The latter was consistent with the description of *Aerom. eucrenophila* (Schubert and Hegazi 1988), except for arbutin hydrolysis. Two strains (963N from razor-shells and 739E from cockles) could not be identified at species level. The remaining strains were identified as *Aerom. caviae*, although 40% did not grow on lactate, 11% produced H<sub>2</sub>S from cysteine (including the type strains) and 65% were positive for the ADH test. This phenon was assigned to the *Aerom. caviae* species and was divided into two subgroups (Fig. 1), IVa (40 strains) and IVb (25 strains, including both type strains). The main difference between both subgroups was growth on lactate (Table 2). Moreover, strains of phenon IV isolated from molluscs (41 isolates) were placed mainly in subgroup IVa (36) and strains isolated from freshwater (19 isolates) in subgroup IVb (18).

Phenon V, defined at 97%  $S_{SM}$ , included two strains, 88 M isolated from mussels and 709OP from large oysters. These isolates could not be identified at species level. Phenotypic characteristics of this phenon are shown in Table 2.

Phenon VI, defined at 90%  $S_{SM}$ , contained five strains isolated from molluscs (848T and 849T from wedge-shells, 93M from mussels, 431E from cockles and 869N from razor-shells), none of which could be identified at species level. All five strains were negative for indole production (Table 2).

A strain isolated from mussels, 95M, was placed between phenon VI and VII. It was not identified and showed atypical biochemical reactions such as growth at 6% NaCl, resistance to tetracyclin and negative results for dextrin fermentation and starch hydrolysis (Table 2).

Phenon VII, defined at 95%  $S_{SM}$ , contained two *Aeromonas* sp. strains, 665N and 868E, isolated from razor-shells and cockles, respectively. These strains grew at 6% NaCl and did not produce acid from mannose (Table 2).

Between phenon VII and VIII were seven single strains, three type strains (*V. furnissii* CECT 4203<sup>T</sup>, *Aerom. media* CECT 4232<sup>T</sup> and *Aerom. schubertii* CECT 4240<sup>T</sup>) and four isolates from molluscs (290T and 912T from wedge-shells, 924O from oysters and 292C from carpet-shells). These isolates were aeromonads of uncertain taxonomic affiliation, except 292C identified as *Aerom. caviae* (Table 2). CECT 4232<sup>T</sup> was in agreement with the description of *Aerom. media* (Allen *et al.* 1983) but it was motile and negative for the ONPG and arginine dehydrolase tests. CECT 4240<sup>T</sup> matched the description of *Aerom. schubertii* (Hickman-Brenner *et al.* 1988).

Phenon VIII, defined at 97%  $S_{SM}$ , included the type strains *Aerom. trota* CECT 4255<sup>T</sup> and *Aerom. enteropelogenes* CECT 4487<sup>T</sup>. These strains were identified as *Aerom. trota* and were consistent with Carnahan *et al.* (1991b).

Finally, four strains were placed below phenon VIII, A15CL (*Aerom. caviae* strain ampicillin sensitive, isolated from a clinical sample), *V. cholerae* CECT 514<sup>T</sup>, *Aerom. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup> and *Escherichia coli* CECT 405. CECT 894<sup>T</sup> was in agreement with the current description of *Aerom. salmonicida* subsp. *salmonicida* (Popoff 1984), except for arabinose and histidine assimilation.

### Clustering of strains by numerical taxonomy

The co-phenetic correlation coefficient ( $r$ ) between the similarity matrix and the corresponding dendrogram derived from  $S_{SM}$  was 0.88. It falls in the range 0.74–0.90 of the most frequently occurring co-phenetic correlators reported by Sneath and Sokal (1973).

### Test reproducibility

The average probability ( $P$ ) of an erroneous result was 0.67%, calculated from the pooled variance ( $S^2 = 0.0067$ ) of all of the unit characters scored for the duplicate strains. All values of  $S_i^2$  scored below 0.1. These values were acceptable according to the criteria of Sneath and Johnson (1972).

## DISCUSSION

### Distribution of *Aeromonas* species

Aeromonads are detected in a wide range of samples such as fresh waters (Araujo *et al.* 1991; Hänninen and Siitonen 1995; Huys *et al.* 1995; Huys *et al.* 1996; Hänninen *et al.* 1997; Borrell *et al.* 1998; Fiorentini *et al.* 1998), vegetables (Neyts *et al.* 2000), meats and milk products (Borrell *et al.* 1998; Melas *et al.* 1999), fish (Hänninen *et al.* 1997; Wang and Silva 1999; Neyts *et al.* 2000), shellfish, seawater

(Borrell *et al.* 1998; Croci *et al.* 2001) and clinical (Moyer 1987; Kuijper *et al.* 1989; Altwegg *et al.* 1990; Hänninen and Siitonen 1995; Borrell *et al.* 1998). The *Aeromonas* species most frequently isolated from these sources belong to the *Aerom. caviae* (*Aerom. caviae* HG4 and *Aerom. media* HG5), *Aerom. hydrophila* (*Aerom. hydrophila* HG1, *Aerom. bestiarum* HG2 and *Aerom. salmonicida* HG3) and *Aerom. sobria* (*Aerom. sobria* HG7 and *Aerom. veronii* bv. *sobria* HG8) complexes.

In this study, a high percentage (91%) of *Aeromonas* isolates were identified at species level. In fresh water, *Aerom. bestiarum* was the predominant species. *Aeromonas bestiarum* has also been reported as the most predominant *Aeromonas* species in water samples by Hänninen and Siitonen (1995) and Borrell *et al.* (1998), together with *Aerom. salmonicida* by Huys *et al.* (1995) and Hänninen *et al.* (1997). However, *Aerom. caviae* was predominant in bivalve molluscs followed by *Aerom. salmonicida*, in concordance with Borrell *et al.* (1998). *Aeromonas caviae* has also been described as the most frequent *Aeromonas* species in clinical samples (Moyer 1987; Kuijper *et al.* 1989; Altwegg *et al.* 1990) and has been associated with sewage and polluted waters (Araujo *et al.* 1991; Fiorentini *et al.* 1998). In this study, the same percentage of *Aerom. caviae*, *Aerom. hydrophila* and *Aerom. sobria* was obtained from clinical samples.

The highest percentage of unidentified *Aeromonas* isolates was found in bivalve samples (19.3%), where few studies have been performed, suggesting that bivalve molluscs could be a source of new *Aeromonas* species.

### **Aeromonas classification**

The mesophilic *Aeromonas* species were identified with 16 phenotypic tests (Table 2). All of these tests, except starch hydrolysis, have also been used for the purpose of identification in other studies (Abbott *et al.* 1992; Martínez-Murcia *et al.* 1992; Esteve *et al.* 1995; Huys *et al.* 1997). Starch hydrolysis was useful in the differentiation of *Aerom. sobria* and *Aerom. veronii* bv. *sobria*.

Rhamnose and sorbitol fermentation, lactate and urocanic acid assimilation and growth at 40.5°C were useful for the phenotypic differentiation of mesophilic *Aerom. hydrophila* complex members (Altwegg *et al.* 1990; Hänninen 1994; Hänninen and Siitonen 1995; Kaznowski 1997; Kaznowski 1998). We used sorbitol fermentation and growth on lactate for the differentiation of strains belonging to this complex. All members of the *Aerom. hydrophila* complex were included in phenon I. Within this phenon, we established four subgroups in which the different species that constitute this group were clearly separate: 94% of *Aerom. bestiarum* strains in phenon Ia, 76% of *Aerom. salmonicida* in phenon Ib and Ic and 71% of *Aerom. hydrophila* isolates in phenon Id

(Fig. 1). The only strain of this complex not included in phenon I was *Aerom. salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894<sup>T</sup>, but similar results have also been reported in other taxonomic studies (Esteve 1995; Noterdaeme *et al.* 1996).

It has been described that *Aerom. sobria* and *Aerom. veronii* bv. *sobria* are phenotypically indistinguishable except for the maximal growth temperature (Hänninen and Siitonen 1995; Huys *et al.* 1996). In our study, two tests, starch hydrolysis and arabinose fermentation, allowed us to separate *Aerom. sobria* strains and the *Aerom. veronii* bv. *sobria* type strain. In spite of these results, we believe that our isolates should be considered as *Aerom. veronii* bv. *sobria*, because *Aerom. sobria* has never been described from a clinical origin (Hänninen and Siitonen 1995; Huys *et al.* 1996). In this group, hybridization analyses are probably the only reliable way to ascribe isolates to a concrete species. Together with *Aerom. sobria*, phenon III included *Aerom. jandaei* CECT 4228<sup>T</sup>, a similar result to that described by Noterdaeme *et al.* (1996), showing the close phenotypic relationship between both species (Janda 1991).

The *Aerom. caviae* complex includes *Aerom. caviae* (HG4), *Aerom. media* (HG5) and *Aerom. eucrenophila* (HG6). In addition, some authors (Altwegg *et al.* 1990; Altwegg and Lüthy-Hottenstein 1991; Kämpfer and Altwegg 1992; Hänninen and Siitonen 1995) separate *Aerom. media* into two phenotypic subgroups, the clinical motile (HG5A) and the environmental non-motile (HG5B) isolates, although only the growth on lactate differentiated HG5A from HG4. However, growth on lactate is not always a useful test. In our study, *Aerom. caviae* isolates clustered in phenon IV, which was divided into two subgroups: IVa, which includes the lactate-positive strains, and IVb, which clusters the lactate-negative, but the last subgroup also includes the type strain *Aerom. caviae* CECT 838<sup>T</sup>. However, *Aerom. media* CECT 4232<sup>T</sup> was unclustered and distant from phenon IV, a similar result to that reported by Noterdaeme *et al.* (1996).

Further studies are needed on unidentified isolates, especially these from phenon V–VII, to determine whether they are new *Aeromonas* species.

In agreement with previous taxonomic studies (Kämpfer and Altwegg 1992; Carnahan and Joseph 1993; Esteve 1995; Noterdaeme *et al.* 1996; Kaznowski 1997), the results obtained with numerical taxonomy were not in total concordance with the identification of the species studied. Identification based on differences in one or two phenotypic characteristics does not reveal the real environmental diversity and allows mistaken identification when results obtained in different laboratories are compared. The present *Aeromonas* species designation needs reorganizing from a practical point of view because, in some cases, an HG includes strains phenotypically different (i.e. *Aerom. salmonicida* HG3 or *Aerom. media* HG5), in others genotyp-

ically identical strains were considered in two HGs because they are phenotypically different (i.e. *Aerom. veronii* bv. *sobria* HG8 and *Aerom. veronii* bv. *veronii* HG10) and, finally, some strains phenotypically indistinguishable were genotypically ascribed to different HG (i.e. *Aerom. sobria* HG7 and *Aerom. veronii* bv. *sobria* HG8) (Janda 1991; Janda and Abbott 1998).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr R. Montilla for his helpful assistance and Dr C. Segura, Dr G. Prats, Dr X. Lizana and CECT for the provision of some strains. This study was supported by a grant from the University of Barcelona (GRC-UB 02564).

## REFERENCES

- Abbott, S.L., Cheung, W.K.W., Kroske-Bystrom, S., Malekzadeh, T. and Janda, J.M. (1992) Identification of *Aeromonas* strains to the genospecies level in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1262–1266.
- Ali, A., Carnahan, A.M., Altwegg, M., Lüthy-Hottenstein, J. and Joseph, S.W. (1996) *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formerly genospecies DNA group 2 *A. hydrophila*), a new species isolated from non-human sources. *Medical Microbiology Letters* **5**, 156–165.
- Allen, D.A., Austin, B. and Colwell, R.R. (1983) *Aeromonas media*, a new species isolated from river water. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**, 599–604.
- Altwegg, M. and Lüthy-Hottenstein, J. (1991) Methods for the identification of DNA hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Experientia* **47**, 403–406.
- Altwegg, M., Steigerwalt, A.G., Altwegg-Bissig, R., Lüthy-Hottenstein, J. and Brenner, D.J. (1990) Biochemical identification of *Aeromonas* genospecies isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology* **28**, 258–264.
- Araujo, R.M., Arribas, R.M. and Parés, R. (1991) Distribution of *Aeromonas* species in waters with different levels of pollution. *Journal of Applied Bacteriology* **71**, 182–186.
- Borrell, N., Figueras, M.J. and Guarro, J. (1998) Phenotypic identification of *Aeromonas* genospecies from clinical and environmental sources. *Canadian Journal of Microbiology* **44**, 103–108.
- Carnahan, A.M., Behram, S. and Joseph, S.W. (1991c) Aerokey II: a flexible key for identifying clinical *Aeromonas* species. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 2843–2849.
- Carnahan, A.M., Chakraborty, T., Fanning, G.R., Verma, D., Ali, A., Janda, J.M. and Joseph, S.W. (1991b) *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 1206–1210.
- Carnahan, A.M., Fanning, G.R. and Joseph, S.W. (1991a) *Aeromonas jandaei* (formerly genospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 560–564.
- Carnahan, A.M. and Joseph, S.W. (1993) Systematic assessment of geographically and clinically diverse aeromonads. *Systematic and Applied Microbiology* **16**, 72–84.
- Carson, J., Wagner, T., Wilson, T. and Donachie, L. (2001) Miniaturized tests for computer-assisted identification of motile *Aeromonas* species with an improved probability matrix. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 190–200.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredini, E. and Toti, L. (2001) Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 57–61.
- Esteve, C. (1995) Numerical taxonomy of *Aeromonadaceae* and *Vibrionaceae* associated with reared fish and surrounding fresh and brackish water. *Systematic and Applied Microbiology* **18**, 391–402.
- Esteve, C., Gutiérrez, M.C. and Ventosa, A. (1995) *Aeromonas encheleia* sp. nov., isolated from european eels. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 462–466.
- Farmer, J.J. III, Hickman-Brenner, F.W., Fanning, G.R., Arduino, M.J. and Brenner, D.J. (1986) Analysis of *Aeromonas* and *Plesiomonas* by DNA-DNA hybridization and phenotype. In *1st International Workshop Aeromonas Plesiomonas 1986*. Abstract P-1. p. 49 Manchester, UK: IUMS.
- Florentini, C., Barbieri, E., Falzano, L., Matarrese, P., Baffone, W., Pianetti, A., Katouli, M., Kühn, I., Möllby, R., Bruscolini, F., Casiere, A. and Donelli, G. (1998) Occurrence, diversity and pathogenicity of mesophilic *Aeromonas* in estuarine waters of the Italian coast of the Adriatic Sea. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 501–511.
- Fluharty, D.M. and Packard, W.L. (1967) Differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria without staining. *American Journal of Veterinary Clinical Pathology* **1**, 31–35.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A. and Krieg, N.R. (1994) *Methods for General and Molecular Bacteriology* Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Hänninen, M.-L. (1994) Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of *Aeromonas hydrophila* complex isolated from different sources. *Journal of Applied Bacteriology* **76**, 455–462.
- Hänninen, M.-L., Oivanen, P. and Hirvelä-Koski, V. (1997) *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 17–26.
- Hänninen, M.-L. and Siitonen, A. (1995) Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. *Epidemiology and Infection* **115**, 39–50.
- Havelaar, A.H., During, M. and Versteegh, J.F.M. (1987) Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *Journal of Applied Bacteriology* **62**, 279–287.
- Hickman-Brenner, F.W., Fanning, G.R., Arduino, M.J., Brenner, D.J. and Farmer, J.J. III (1988) *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 1561–1564.
- Hickman-Brenner, F.W., Macdonald, K.L., Steigerwalt, A.G., Fanning, G.R., Brenner, D.J. and Farmer, J.J. III (1987) *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 900–906.
- Holt, J.C., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Stanley, J.Y. and Williams, S.T. (1994) Subgroup 2: Family *Vibrionaceae*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edn, pp. 190–274. Baltimore: Williams & Wilkins.



- Hugh, R. and Leifson, E. (1953) The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **66**, 24–26.
- Huys, G., Kampfer, P., Altwegg, M., Kersters, I., Lamb, A., Coopman, R., Luthy-Hottenstein, J., Vancanneyt, M., Janssen, P. and Kersters, K. (1997) *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 1165–1171.
- Huys, G., Kersters, I., Coopman, R., Janssen, P. and Kersters, K. (1996) Genotypic diversity among *Aeromonas* isolates recovered from drinking water production plants as revealed by AFLP<sup>TM</sup> analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 428–435.
- Huys, G., Kersters, I., Vancanneyt, M., Coopman, R., Janssen, P. and Kersters, K. (1995) Diversity of *Aeromonas* sp. in Flemish drinking water production plants as determined by gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMES). *Journal of Applied Bacteriology* **78**, 445–455.
- Janda, J.M. (1991) Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, 397–410.
- Janda, J.M. and Abbott, S.L. (1998) Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding Panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases* **27**, 332–344.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., Khashe, S., Kellogg, G.H. and Shimada, T. (1996) Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1930–1933.
- Janda, J.M., Reitano, M. and Bottone, E.J. (1984) Biotyping of *Aeromonas* isolates as a correlate to delineating a species-associated disease spectrum. *Journal of Clinical Microbiology* **19**, 44–47.
- Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D. and Washington, J.A. (1999) Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology*, 7th edn. ed. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. pp. 1526–1543. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Kämpfer, P. and Altwegg, M. (1992) Numerical classification and identification of *Aeromonas* genospecies. *Journal of Applied Bacteriology* **72**, 341–351.
- Kaznowski, A. (1997) Numerical taxonomy and DNA-DNA hybridizations of *Aeromonas* strains isolated from human diarrhoeal stool, fish and environment. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 458–467.
- Kaznowski, A. (1998) Identification of *Aeromonas* strains of different origin to the genomic species level. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 423–430.
- Kuijper, E.J., Steigerwalt, A.G., Schoenmakers, B.S.C.I.M., Peeters, M.F., Zanen, H.C. and Brenner, D.J. (1989) Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 132–138.
- MacFaddin, J.F. (1981) *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd edn. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Martínez-Murcia, A.J., Esteve, C., Garay, E. and Collins, M.D. (1992) *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters* **91**, 199–206.
- Melas, D.S., Papageorgiou, D.K. and Mantis, A.I. (1999) Enumeration and confirmation of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, and *Aeromonas sobria* isolated from raw milk and other milk products in Northern Greece. *Journal of Food Protection* **62**, 463–466.
- Moyer, N.P. (1987) Clinical significance of *Aeromonas* species isolated from patients with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* **25**, 2044–2048.
- Neyts, K., Huys, G., Uyttendaele, M., Swings, J. and Debevere, J. (2000) Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 359–363.
- Noterdaeme, L., Bigawa, S., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. and Ollevier, F. (1996) Numerical taxonomy and biochemical identification of fish associated motile *Aeromonas* spp. *Systematic and Applied Microbiology* **19**, 624–633.
- Oakey, H.J., Ellis, J.T. and Gibson, L.F. (1996) A biochemical protocol for the differentiation of current genomospecies of *Aeromonas*. *Zentralblatt für Bakteriologie* **284**, 32–46.
- Phillips, E. and Nash, P. (1985) Culture media. In *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edn. ed. Lennette, E.H., Balows, A. Jr, Hausler, W.J. and Shadomy, H.J. pp. 1051–1092. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Popoff, M. (1984) Genus III: *Aeromonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* ed. Krieg, N.R. and Holt, J.G. pp. 545–548. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Popoff, M.Y., Coynault, C., Kiredjian, M. and Lemelin, M. (1981) Polynucleotide sequence relatedness among motile *Aeromonas* species. *Current Microbiology* **5**, 109–114.
- Popoff, M. and Lallier, R. (1984) Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*. *Methods in Microbiology* **16**, 127–145.
- Rohlf, F.J. (1993) *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Version 1.80. New York: Exeter Software.
- Schubert, R.H.W. and Hegazi, M. (1988) *Aeromonas eucrenophila* species nova and *Aeromonas caviae*, a later and illegitimate synonym of *Aeromonas punctata*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. 1, Orig. A* **268**, 34–39.
- Sneath, P.H. and Johnson, R. (1972) The influence on numerical taxonomy similarities of errors in microbiological tests. *Journal of General Microbiology* **72**, 377–392.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) The principles and practice of numerical classification. In *Numerical Taxonomy* ed. Kenedy, D. and Park, R.B., pp. 278–280. San Francisco: Freeman.
- Twedt, R.M. (1978) Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. In *Bacteriological Analytical Manual*, pp. 1–13. Arlington: Food & Drug Administration, Association of Official Analytical Chemists.
- Twedt, R.M. (1984) Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios, In *Bacteriological Analytical Manual*, 6th edn. pp. 12.01–12.08. Arlington: Food & Drug Administration, Association of Official Analytical Chemists.
- Véron, M. (1975) Nutrition et taxonomie des *Enterobacteriaceae* et bactéries voisines. *Annales de Microbiologie* **126A**, 267–274.
- Wang, C. and Silva, J.L. (1999) Prevalence and characteristics of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. *Journal of Food Protection* **62**, 30–34.

