

ANEXO 9.2. COPIA DE DOCUMENTO DE
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS
MICROORGANISMOS UTILIZADOS:
*“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
(BIOINOCULANTE)”*

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS
INFORME DE RESULTADOS
LAMIC
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Bogotá D.C., 29 de diciembre de 2015

Doctor
LUCÍA ANA DIAZ
LAMIC
Pontifica Universidad Javeriana

Este análisis se hizo sobre cuatro aislamientos bacterianos recibidos el pasado 3 de diciembre y descritos en el formato 045-2015 adjunto a este informe:

Esencialmente los datos son:

Muestra #	Código CorpoGen	Nombre /Número
1	45-1	TgLGBDR285
2	45-2	TgLGBDR250
3	45-3	TgLGBDR248
4	45-4	TgLGBDR110

Para efectos de este informe las muestras están nombradas con los códigos de CorpoGen.

A estos aislamientos se les realizaron los siguientes procedimientos:

- ✓ Aislamiento y purificación del DNA.
- ✓ Amplificación por PCR de la región de 1465 pb del gen ribosomal 16S.
- ✓ Purificación de los fragmentos de PCR y secuenciación con los iniciadores 27F, 518F, 800R, y 1492R del gen ribosomal 16S.
- ✓ Limpieza manual de cada una de las secuencias de los fragmentos obtenidos.
- ✓ Ensamblaje de las secuencias y obtención de la secuencia problema.
- ✓ Análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada, mediante la comparación contra las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information), Greengenes (Laurence Berkeley National Laboratory) y RDP (Ribosomal Database Project).
- ✓ Alineamiento y generación de un árbol de distancias utilizando las secuencias con mayor similitud a la secuencia problema.
- ✓ Clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

Los resultados de tipificación de la muestra se resumen en la tabla de resultados, que incluye: número de la muestra, longitud de la secuencia ensamblada y resultados de las búsquedas en las bases de datos RDP, Greengenes y RefSeq.

TABLA DE RESULTADOS

Clasificación de las secuencias problema. Los valores de % de identidad y cubrimiento son calculados con respecto al mejor "hit" encontrado en las bases de datos.

MUESTRA CÓDIGO CORPOGEN		AISLAMIENTO 45_1	AISLAMIENTO 45_2	AISLAMIENTO 45_3	AISLAMIENTO 45_4
Longitud de la secuencia ensamblada		1483 pb	1481 pb	1478 pb	1481 pb
Resultados RefSeq Genomic- NCBI	Microorganismo	<i>Stenotrophomonas</i> <i>sp.</i> <i>Pseudomonas</i> <i>hibiscicola</i>	<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> <i>sp</i>	<i>Serratia</i> <i>proteamaculans</i>
	% de identidad	99,9	99,8	99,5	99,2
	% de cobertura	100	100	100	100
Resultados RDP		<i>Pseudomonas</i> <i>geniculata</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechei</i>	<i>Enterobacter</i> <i>absuriae</i>	<i>Serratia</i> <i>grimesii</i>
Resultados Greengenes		<i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i>	<i>Enterobacter</i> <i>hormaechei</i> <i>Enterobacter</i> <i>sp.</i>	<i>Enterobacter</i> <i>sp</i>	<i>Serratia</i> <i>proteamaculans</i>
CONCLUSIÓN	Género	-	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>
	Especie	-	-	-	-

Al final del informe se anexan los árboles filogenéticos y las secuencias ensambladas de los aislamientos.

ANÁLISIS DE RESULTADOS - AISLAMIENTO 45-1

El clasificador de RDP (Ribosomal Database Project) pudo determinar que se trata de una secuencia de un microorganismo perteneciente al género *Stenotrophomonas*, sin embargo el poder de resolución de este clasificador, no permite asignar una especie (Figura 1.1).

Figura 1.1. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra la base de datos RDP.

Classifier :: Hierarchy View

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.10, October 2014
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 14
Query File: classifier_seq_upload3118280607429076316.FASTA
Query Submit Date: Mon Dec 21 11:31:23 EST 2015

Display depth:

Confidence threshold:

CopyNumber Adjusted:

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

rootrank Root (1 sequences) [\[show assignment detail for Root only\]](#) [download entire hierarchy as text file](#)
» » domain Bacteria (1)
» » » phylum "Proteobacteria" (1)
» » » » class Gammaproteobacteria (1)
» » » » » order Xanthomonadales (1)
» » » » » » family Xanthomonadaceae (1)
» » » » » » » genus *Stenotrophomonas* (1)

La base de datos de secuencias tipo, del algoritmo Seqmatch-RDP (Figura 1.2) contra aislamientos cultivados indica que la secuencia problema ensamblada es muy similar en la mayoría de su longitud con las cepas tipo identificadas como *Pseudomonas geniculata* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

La búsqueda en la base de datos Greengenes indica que la secuencia problema es muy similar a secuencias de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Los resultados del análisis taxonómico de la secuencia problema ensamblada de 1483 pb contra la base de datos nr/nt del NCBI, indican que tiene un 99,9% de identidad en el 100% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S pertenecientes a *Pseudomonas hibiscicola* y *Stenotrophomonas sp.*

Figura 1.2. Resultado de la comparación de la secuencia problema contra SeqMatch-RDP

SeqMatch :: Detail Hierarchy

[Save selection and return to summary](#)

Query Sequence: seqmatch_seq, 1389 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More [help](#) is available.

Lineage:

```

+ rootrank Root (0/5/10132) (selected/match/total RDP sequences)
+ domain Bacteria (0/5/9729)
+ phylum "Proteobacteria" (0/5/3614)
+ class Gammaproteobacteria (0/5/1647)
+ order Xanthomonadales (0/5/139)
+ family Xanthomonadaceae (0/5/132)
+ genus Stenotrophomonas (0/5/15)
  ☐ S000007629 - not_calculated 0.963 1345 Pseudomonas geniculata (T); ATCC 19374; AB021404
  ☐ S000009493 - not_calculated 0.942 1388 Pseudomonas beteli (T); ATCC 19861; AB021406
  ☐ S000010261 - not_calculated 0.958 1400 Pseudomonas hibiscicola (T); ATCC 19867; AB021405
  ☐ S000824093 - not_calculated 0.963 1444 Stenotrophomonas maltophilia (T); IAM 12423; AB294553
  ☐ S001611233 - not_calculated 0.947 1392 Stenotrophomonas pavanii (T); ICB 89; FJ748683

```

El árbol de distancias (Figura 1.3) construido a partir de las 20 secuencias de microorganismos cultivables más cercanas, disponibles en la base de datos de RDP, muestra que la secuencia problema se agrupa con secuencias del género *Stenotrophomonas*, con un soporte de ramas del 95%.

De acuerdo con los anteriores resultados, la secuencia problema se puede clasificar como perteneciente al complejo de ***Stenotrophomonas maltophilia***, conformado por especies estrechamente relacionadas y que no son fácilmente diferenciables por 16s.

Una revisión de la literatura sobre *Stenotrophomonas maltophilia*, indica que las anteriores especies se agrupan formando el complejo de *Stenotrophomonas maltophilia*.

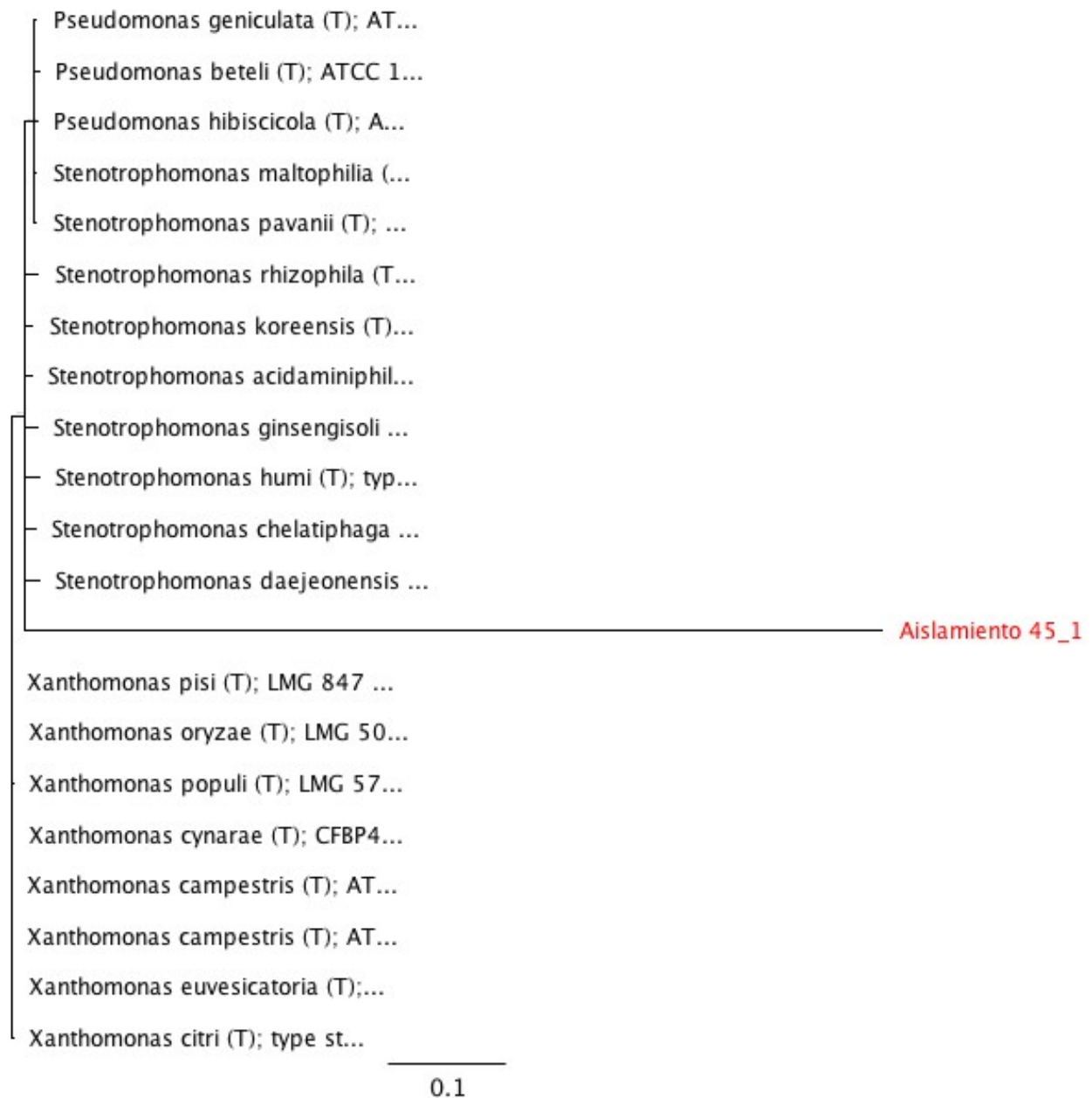
Por otra parte, se encontró que, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas hibiscicola* y *Pseudomonas beteli* son sinónimos heterotípicos, sugiriendo que la cepa tipo de *Pseudomonas beteli* (corríg.) es miembro de *Stenotrophomonas maltophilia*.

Referencias

¹ YOUNG (J.M.), SADDLER (G.S.), TAKIKAWA (Y.), DE BOER (S.H.), VAUTERIN (L.), GARDAN (L.), GVOZDYAK (R.I.) and STEAD (D.E.): Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *Review of plant pathology*, 1996, **75**, 721-763.

² Rhee, Ji-Young, et al. "Distinct groups and antimicrobial resistance of clinical *Stenotrophomonas maltophilia* complex isolates from Korea." *Journal of medical microbiology* 62.Pt 5 (2013): 748-753.

Figura 1.3 - Árbol filogenético - Aislamiento 45_1



Árbol de distancias construido a partir de los 20 mejores "hits" con respecto a la base de datos de RDP.

ANÁLISIS DE RESULTADOS - AISLAMIENTOS 45-2 y 45-3

El análisis de resultados de los aislamientos 45-2 y 45-3 son esencialmente los mismos. Se realizaron búsquedas en las mismas bases de datos mencionadas en la metodología y se encontró que ambas cepas pertenecen al complejo ***Enterobacter cloacae***.

E. cloacae ha mostrado heterogeneidad a nivel genómico y comprende seis especies: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* y *Enterobacter nimipressuralis*¹.

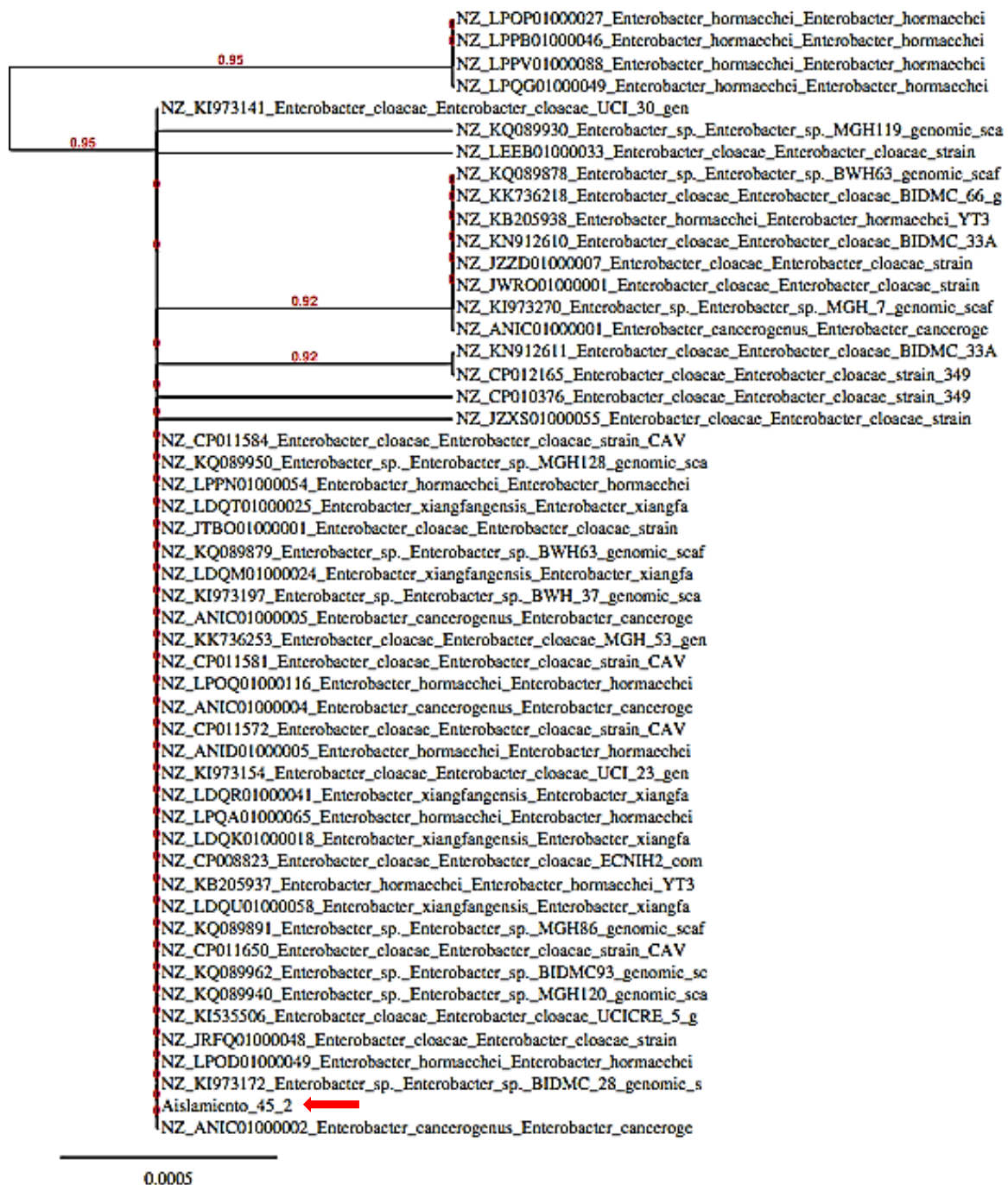
La identificación fenotípica de las especies pertenecientes a este taxón es usualmente difícil y no siempre es confiable, por eso se recurre a métodos moleculares prefiriendo la utilización simultánea de varios genes conservados².

Referencias

¹ Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887-902.

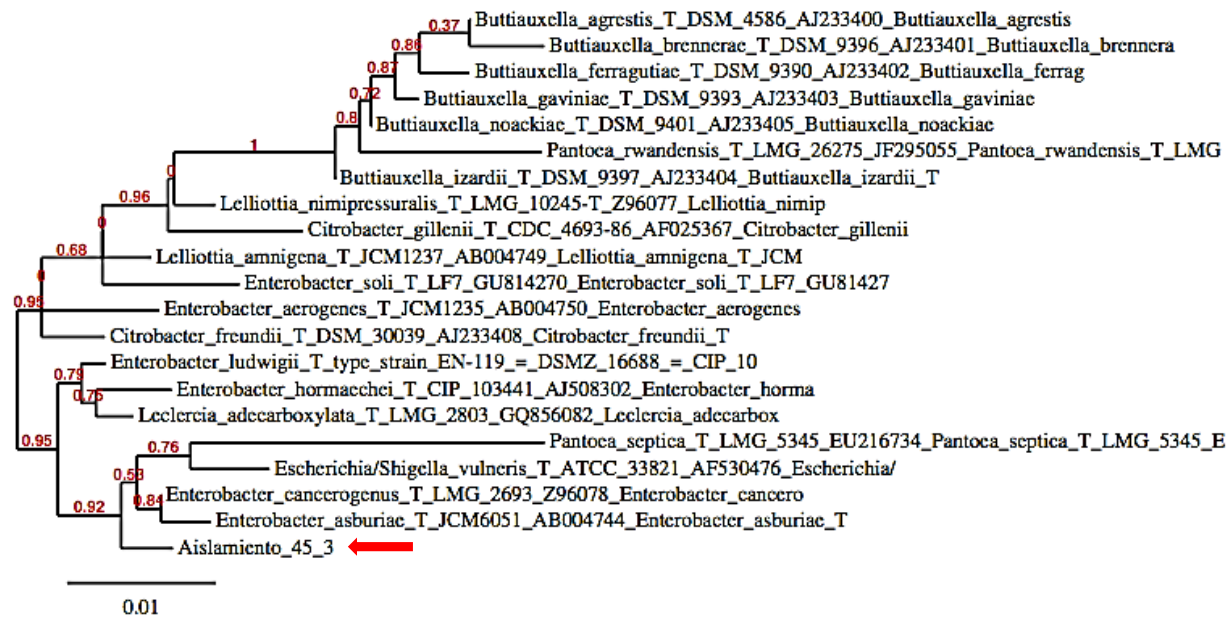
² Paauw, A., Caspers, M. P., Schuren, F. H., Leverstein-van Hall, M. A., Delétoile, A., Montijn, R. C., & Fluit, A. C. (2008). Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. *PLoS one*, 3(8), e3018-e3018.

Figura 1.4 - Árbol filogenético - Aislamiento 45-2



Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores "hits" con respecto a la base de datos de NCBI.

Figura 1.5 - Árbol filogenético - Aislamiento 45-3



Árbol de distancias construido a partir de los 50 mejores "hits" con respecto a la base de datos de NCBI.

ANÁLISIS DE RESULTADOS - AISLAMIENTO 45-4

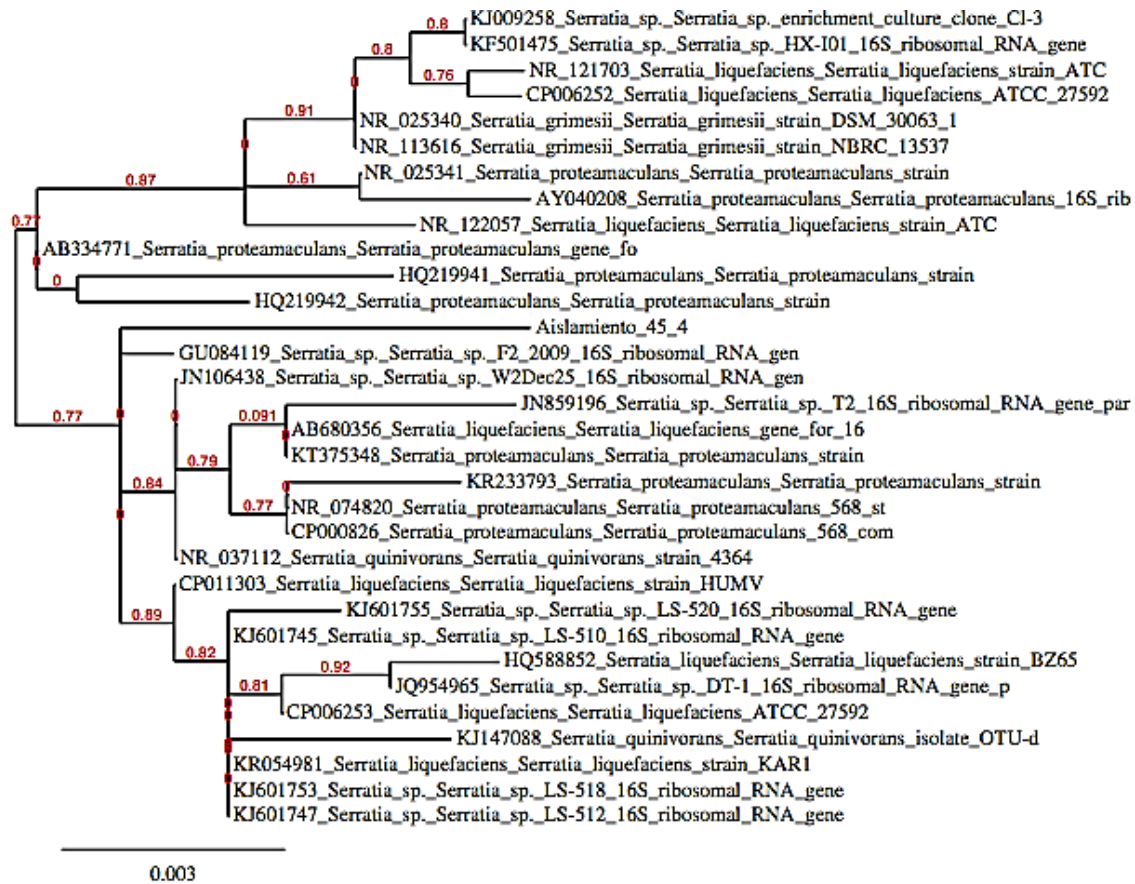
Los resultados de búsqueda del aislamiento 45-4 no logran clasificar hasta nivel de especie. Por su parte, el árbol de distancias no consiguió ubicar la secuencia problema con una especie específica. Debido a esto la secuencia problema se identifica como perteneciente al complejo de ***Serratia liquefaciens***.

El complejo *Serratia liquefaciens* está formado por cuatro especies estrechamente relacionadas: *Serratia liquefaciens sensu stricto*, *Serratia proteomaculans*, *Serratia quinivorans* y *Serratia grimesii*¹.

Referencias

¹ Mahlen, S. D. (2011). *Serratia* Infections: from Military Experiments to Current Practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 755–791. <http://doi.org/10.1128/CMR.00017-11>

Figura 1.6 - Árbol filogenético - Aislamiento 45-4



Árbol de distancias construido a partir de los 30 mejores "hits" con respecto a la base de datos de NCBI.

SECUENCIA ENSAMBLADA - AISLAMIENTO 45-1

5` -

ACGACTTCACCCCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAAGCGCCCTCCCGAAGGTTA
AGCTACCTGCTTCTGGTGCAACAACTCCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA
AGGCCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCAATGCTGATCTGCGATTACTAGCGATTCC
GACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGAAGTATGAGATAGGGTTTCTGGG
ATTGGCTTACCGTCGCCGGCTTGCAGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTG
TAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT
TGTCACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACTAAGGACAA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
GCCATGCAGCACCTGTGTTTCGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTT
CTCGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATA
CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGT
ACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTGCAC
CCAACATCCAGTTCGCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
TGCTCCCCACGCTTTCGTGCCTCAGTGTCAATGTTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGC
CATGGATGTTCTCCTGATCTCTACGCATTTCACTGCTACACCAGGAATTCCGCTAC
CCTCTACCACATTCTAGTCGCCCAGTATCCACTGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCAGG
GCTTTCACAACGGACTTAAACGACCACCTACGCACGCTTACGCCCAGTAATTCCG
AGTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTG
CTTATTCTTTGGGTACCGTCATCCCACCCGGGTATTAACCAGATGGATTTCTTTCCC
AACAAAAGGGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACCCACGCGGTATGGCTGGATC
AGGCTTGCGCCCATTTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGAC
CGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACGGATCGTCGC
CTTGGTGGGCCTTTACCCCGCCAACTAGCTAATCCGACATCGGCTCATTCAATCGC
GCAAGGTCCGAAGATCCCCTGCTTTCACCCGTAGGTCGTATGCGGTATTAGCGTAA
GTTTCCCTACGTTATCCCCACGACAGAGTAGATTCCGATGTATTCTCACCCGTC
CGCCACTCGCCACCCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGCTGCCGTTGCACTTGCATGT
GTTAGGCCTACCGCCAGCGTTCCTCTGAGCC

3`

SECUENCIA ENSAMBLADA - AISLAMIENTO 45-2

5` -

GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGG
AAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAA
CTGCCTGATGGAGGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTC
GCAAGACCAAAGAGGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT
GAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGT
GTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAA
GGTTAATAACCTTGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAAGTGCATTTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCA
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
CCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGA
GGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTCC
AGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT
TGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGT
GCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATA
AAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCCGTCACACCATGGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTT
CGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGGTGAAGTCGTA

3`

SECUENCIA ENSAMBLADA - AISLAMIENTO 45-3

5` -

CTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAACACAG
GGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACT
GCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGC
AAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGA
TTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGA
GAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTA
TGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGT
TAATAACCNTTGTGCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA
AGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGG
AACTGCATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCC
CCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGG
AGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCA
GAGATGCTTTGGTGCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTT
GTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGT
GCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATA
AAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGTAGATCAGAAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCCGTCACACCATGGGGAAATGGGGTTGCAAAAAAAGTAGGTAGCTTAACCT
TCCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGGTGAAGTC

3`

SECUENCIA ENSAMBLADA - AISLAMIENTO 45-4

5` -

TCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGG
AGAGCTTGCTCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACT
GCCTGATGGAGGGGGATACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCTT
CGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCCAGATGGG
ATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTG
AGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
GTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTGGTGT
GTTAATAGCACATCACATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGG
GAACTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGA
GGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGC
AAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTCGCT
AGAGATAGCTTAGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTT
TGTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACG
TGCTACAATGGCGTATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCAT
AAAGTACGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCCGTCACACCATGGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTC
GGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGGTGAAGTCGTACA

3`

CORPORACIÓN CORPOGEN
ÁREA DE PRODUCTOS Y SERVICIOS
SERVICIO DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS

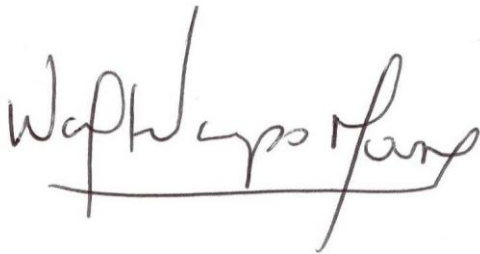
Procesamiento de las muestras – Luz Karime Afanador

Secuencia de ácidos nucleicos - MacroGen Inc. - Corea

Análisis bioinformático – Liliana Pinzón

Revisión general – Walter Ocampo Moure

Anexos - Archivo secuencias sin procesar

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Walter Ocampo Moure', with a horizontal line drawn underneath the name.

Walter Ocampo Moure
Jefe área de productos y servicios
Corporación CorpoGen

-----FIN DEL INFORME-----

ANEXO 9.3. COPIA DE DOCUMENTO DE REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA SOBRE LA NATURALEZA
COSMOPOLITA DE LOS MICROORGANISMOS
UTILIZADOS: “REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA,
DISTRIBUCIÓN DE GÉNEROS BIOINOCULANTES”

Revisión bibliográfica – Distribución de los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y *Stenotrophomonas*

Enterobacter spp

El género *Enterobacter* pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Sanders & Sanders, 1997). Los estudios filogenéticos los ubican en el phylum Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria y Orden Enterobacterales (Brenner et al., 2005).

El género *Enterobacter* fue propuesto por primera vez por Hormaeche y Edwards en 1960 para resolver inconsistencias taxonómicas en cepas anteriormente asignadas al género *Aerobacter* (Janda & Abbott, 2011, Grimont & Grimont, 2006). A pesar de años de investigación, la designación taxonómica de cepas en especies específicas dentro de las Enterobacteriaceae ha sido un tema de mucho debate y cambio. Esta reclasificación frecuente de organismos con importancia clínica puede generar confusión tanto para los microbiólogos como para las autoridades reguladoras responsables del monitoreo y control de dichos organismos (Forsythe et al, 2015).

Muchos de los géneros de Enterobacteriaceae están compuestos de grupos heterogéneos de especies bacterianas (Forsythe et al, 2015). En este contexto, se espera que las mejoras en el análisis basado en la secuencia de ADN, incluida la secuenciación del genoma completo, tengan una gran influencia en la taxonomía. La correlación entre las diferencias de secuencia para determinar los umbrales de definición de género y especie ha sido problemática en las Enterobacteriaceae, así como en los géneros fuera de esta familia. El uso de la secuenciación del genoma completo ha llevado al desarrollo de algunas alternativas *in silico* a la hibridación de DNA, como la identidad promedio de nucleótidos (Grimont & Grimont, 2006; Janda & Abbott, 2011; Forsythe et al, 2015).

Probablemente, ningún grupo de bacterias en la familia Enterobacteriaceae tenga más controversias taxonómicas no resueltas que el género *Enterobacter*. Además, las investigaciones filogenéticas adicionales que emplean la secuenciación de 16S rRNA o la secuencia del gen *gyrB* (DNA gyrase) (Dauga, 2002) indican que el género *Enterobacter* es polifilético, es decir, todas las especies no comparten una ascendencia común reciente (Janda & Abbott, 2011).

Actualmente hay 48 géneros y 219 especies reconocidas dentro de las Enterobacteriaceae y es probable que estos números aumenten en el futuro (ILSI, 2011). De manera específica, a la fecha se han encontrado 22 especies en el género *Enterobacter*: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae*, y *E. turicensis*. Dentro de estas especies, 7 se han agrupado dentro del complejo *Enterobacter cloacae*: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, and *E. nimipressuralis* (Davin-Regli,

2019). Las especies más comúnmente encontradas como patógenos humanos incluyen *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter sakazaki*, siendo *E. aerogenes* y *E. cloacae* son, las más frecuentemente encontradas como patógenos humanos entre el género *Enterobacter* (Sandres & Sandres, 1997).

El género *Enterobacter* está ampliamente disperso en la naturaleza. Las plantas, incluidos los cultivos y el suelo, a menudo albergan especies de *Enterobacter*, al igual que los nichos ecológicos íntimamente asociados con ambos hábitats, como las plántulas y la rizosfera microbiana. Al menos tres especies de *Enterobacter* son de naturaleza ubicua, y se pueden aislar fácilmente de muestras clínicas y ambientales, aunque la frecuencia relativa y la incidencia de cada especie varían considerablemente (Davin-Regli *et al*, 2019; Janda & Abbott, 2011).

Las especies de *Enterobacter* se pueden encontrar en muchos entornos, como el agua, el suelo, las aguas residuales y las verduras (Grimont & Grimont, 2006). Antes del uso generalizado de antibióticos, las especies de *Enterobacter* rara vez se encontraban como patógenos, pero estos organismos ahora se encuentran cada vez más en el tracto urinario y respiratorio, en pacientes hospitalizados, debido al uso de antibióticos (Grimont & Grimont, 2006).

Un estudio australiano que analizó el contenido gastrointestinal de más de 600 mamíferos encontró que *E. cloacae*, *E. cancerogenus*, *E. agglomerans* y *E. aerogenes* son especies entéricas comunes, con tasas de aislamiento generales de 9.1, 2.1, 1.9 y 1.3%, respectivamente (Gordon & FitzGibbon, 1999). Sin embargo, es de resaltar que *E. cloacae* se presenta como comensal en el agua, las aguas residuales, el suelo, la carne, los entornos hospitalarios, la piel y en los tractos intestinales de humanos y animales (Grimont & Grimont, 2006).

Bibliografía:

Brenner, D.J., Krieg, N.R. & Staley, J.R. (Eds). (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gamma proteobacteria. New York, Springer.

Davin-Regli A, Lavigne J-P & Pagès J-M. (2019). *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 32:e00002-19

Dauga, C. 2002. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 531–547

Forsythe, S. J., Abbott, S. L. & Pitout, J. (2015). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. En: Manual of Clinical Microbiology. Eleven Edition. Cap. 38. pp. 714-737. ISBN:9781555817374

Gordon, D. M. & FitzGibbon, F. (1999). The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. *Microbiology* 145:2661–2671

Grimont, F. & Grimont, P.A.D. (2015). *Enterobacter*. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. Bergey's Manual Trust. Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. doi: 10.1002/9781118960608.gbm01145.

Grimont, F. & Grimont, P.A.D. (2006) The Genus *Enterobacter*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) The Prokaryotes. Chapter 3.3.9. Springer, New York, NY

Janda, J & Abbott, S. (2011). The Genus *Enterobacter*, p 151-180. En: The Enterobacteria, Second Edition. Chapter 11. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555817541.ch11

Sanders Jr, W. E., & Sanders, C. C. (1997). *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 220–241

***Serratia* sp.**

Las especies de *Serratia* son bacterias clasificadas en la tribu Klebsiellae y la familia Enterobacteriaceae. Se han aislado nueve especies de muestras clínicas y de alimentos: *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia rubidaea* (también llamada *Serratia marinorubra*), *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthica*, *Serratia grimesii* y *Serratia proteamaculans* (Rafii, 2014).

A pesar de años de investigación, la designación taxonómica de cepas en especies específicas dentro de las Enterobacteriaceae ha sido un tema de mucho debate y cambio. Esta reclasificación frecuente de organismos con importancia clínica puede generar confusión tanto para los microbiólogos como para las autoridades reguladoras responsables del monitoreo y control de dichos organismos. Muchos de los géneros de Enterobacteriaceae están compuestos por grupos heterogéneos de especies bacterianas, la mayoría de los cuales se describieron originalmente en base a información morfológica y fenotípica hace varias décadas. En este contexto, se espera que las mejoras en el análisis basado en la secuencia de ADN, incluida la secuenciación del genoma completo, tengan una influencia importante en la taxonomía de esta familia (Forsythe et al, 2015).

A principios de este siglo (1904), se habían descrito más de 76 *nomen3 especies* con pigmentación roja o rosa, y 23 especies de *Serratia* se enumeraron en la primera edición

(1923) del Manual de Bergey's. Este número disminuyó progresivamente a cinco en la quinta edición del Manual de Bergey's (1957), y más tarde a una (1) especie: *S. marcescens*. La única especie de *Serratia* reconocida en la octava edición del Manual de Bergey (1974) fue *S. marcescens*. Luego, nuevos enfoques objetivos, como la taxonomía numérica y la relación de ADN aplicada a las cepas recuperadas de diversos hábitats, delinearon un número creciente de especies en el género *Serratia*. Cinco (5) y Siete (7) especies, respectivamente, fueron mencionadas en la primera edición de *The Prokaryotes* y en el *Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática* en 1984. Actualmente se sabe que diez especies pertenecen al género *Serratia* (Grimont & Grimont, 2006).

Las especies de *Serratia* no son miembros de las poblaciones bacterianas que se encuentran en el tracto intestinal humano (FDA, 2012). Los miembros del género *Serratia* se distribuyen en el plancton, suelo, el aire y agua dulce y salada (Golemi-Kotra, 2008; Hoff *et al*, 1984). Están asociados con un gran número de plantas y animales (incluidos insectos, mamíferos, aves y sus huevos) (Hoff *et al*, 1984). Algunos son patógenos de insectos, y otros producen agentes antimicóticos y antimicrobianos (Rafii, 2014; Grimont & Grimont, 2006). Mientras que las bacterias del género *Serratia* son de distribución cosmopolita, el nicho ecológico de los distintos miembros se confunde debido a problemas taxonómicos (Mahlen, 2011; Hoff *et al*, 1984).

Las cepas que producen el pigmento rojo parecen ser tóxicas para los protozoos, y esto puede ser una ventaja ecológica en el agua y el suelo. Sin embargo, parece que las bacterias pigmentadas se aíslan con mayor frecuencia del agua no contaminada (de manantiales o pozos) que del agua contaminada (agua de río, aguas abajo de las ciudades).

Algunas especies del género *Serratia* han sido reportadas como miembros comunes de la microflora intestinal de los murciélagos y aislados de uvas y vegetales de hoja. Así mismo han sido reportadas como bacterias predominantes en las primeras etapas de la producción de brotes de soja (Fusco *et al*, 2018). Quizás debido a que las especies de *Serratia* se encuentran en el suelo, varias están asociadas con plantas. *S. marcescens* y *S. liquefaciens* parecen ser las especies de *Serratia* más comúnmente vinculadas a las plantas y se han aislado de muchos tipos diferentes como pastos, tomates, cebollas verdes y otras verduras (Mahlen, 2011).

Respecto a *Serratia proteamaculans*, una Enterobacteriaceae, que se aisló como endófito de raíz de *Populus trichocarpa*. Se ha encontrado que *S. proteamaculans* promueve el crecimiento de las plantas, y se ha demostrado que esto ocurre a través de la producción de compuestos específicos, como los oligosacáridos de lipo-quitina, que se utilizan como señales específicas de bacterias a la planta. Las bacterias promotoras del crecimiento de plantas individuales producen mezclas de LCO estructuralmente diversas específicas, una bacteria común productora de este tipo de sustancias es *Rhizobium* sp. Los endófitos son bacterias que viven dentro del tejido de una planta sin dañarla sustancialmente. Pueden

ayudar a promover el crecimiento de las plantas de varias maneras, incluida la ayuda al huésped a superar los efectos tóxicos de la contaminación ambiental (Uniprot, 2020).

Bibliografía:

Forsythe, S. J., Abbott, S. L. & Pitout, J. (2015). *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. En: Manual of Clinical Microbiology. Eleven Edition. Cap. 38. pp. 714-737. ISBN:9781555817374

Golemi-Kotra, Dasantila. (2011). *Serratia, Edwardsiella and Morganella Infections*. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. 1-6. 10.1016/B978-008055232-3.63827-9.

Grimont, F. & Grimont, P.A.D. (2006). The Genus *Serratia*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (eds) The Prokaryotes. Chapter 3.3.11. Springer, New York, NY

Hoff, G.L., Frye, F. L. & Jacoson, E.R. (1984). Diseases of amphibians and reptiles. Plenum Press· New York and London. Pp. 59-67. ISBN-13: 978-1-4615-9393-5

Mahlen, S. D. (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev 24, 755–91.

Rafii, F. (2014). *Serratia*. Encyclopedia of Food Microbiology, Volume 3. 4. Batt. C. A. & Tortorello. M. L. (eds). Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00304-9>

UNIPROT. (2020). Proteomes - *Serratia proteamaculans*. <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000007074>

***Stenotrophomonas* sp**

El género *Pseudomonas* fue reorganizado taxonómicamente para ajustarse a la taxonomía moderna basada en filogenia. En este proceso de reclasificación, el género *Pseudomonas* se reorganizó en cinco grupos y el nombre *Pseudomonas* se limitó a los organismos del grupo I de homología de ARNr. *Pseudomonas maltophilia* representó al grupo V de homología de *Pseudomonas* rRNA V. En función de las características genotípicas y fenotípicas, se propuso su transferencia al género *Xanthomonas*, miembro de las gammaproteobacterias, y posteriormente al nuevo género *Stenotrophomonas* (Lipuma *et al*, 2015), en donde *Stenotrophomonas maltophilia*, es el único miembro del género *Stenotrophomonas* (Schaumann & Rodloff, 2003); sin embargo, Drancourt y colaboradores en 1997 propuso una nueva especie; *Stenotrophomonas africana*, que es bioquímicamente idéntico a *S. maltophilia*, excepto por su incapacidad para asimilar el *cis-aconitato*. Sin embargo, el análisis genotípico reveló solo un 35% de homología de ADN entre las dos

especies. (Palleroni, 2015; Denton & Kerr, 1998). Sin embargo, en la base de datos bacterio net (<https://www.bacterio.net/genus/stenotrophomonas>) se reportan 16 especies con nombre y clasificación taxonómica correcta.

Tanto la diversidad ecológica como metabólica de *S. maltophilia* sugiere que esta especie podría ser taxonómicamente heterogénea. La mayor parte de la literatura taxonómica sobre *S. maltophilia* trata de la posición de esta especie dentro o fuera del género *Xanthomonas*, pero hay pocos datos disponibles sobre las relaciones genómicas entre las cepas de este taxón diverso. Recientemente se han realizado estudios de tipificación molecular de *S. maltophilia*, pero solo se tratan con cepas de origen clínico (Hauben *et al.*, 1999).

Stenotrophomonas spp. son organismos ambientales que se encuentran en el agua, el suelo, la rizosfera y en y sobre plantas, incluidas frutas y verduras (Lipuma *et al.*, 2015). Tienen una distribución global incluida la Antártica (Denton & Kerr, 1998) que se ha aislado en el suelo, el agua, los vegetales y los animales, así como en diferentes ambientes hospitalarios (agua de grifos, humidificadores, jabones y desinfectantes, catéteres, etc.), incluidas las manos del personal sanitario (Corzo-Delgado & Gómez-Mateos, 2006). Los miembros de este género son ampliamente reconocidos como fitopatógenos, y muchas especies se describieron por primera vez en ese contexto. Debido a su capacidad para sobrevivir en ambientes acuáticos, estos organismos se han vuelto particularmente problemáticos como patógenos nosocomiales oportunistas en hospitales y entornos de atención médica (Lipuma *et al.*, 2015).

La bacteria también se ha recuperado de una variedad de ambientes de rizosfera de suelo y plantas, incluidos pastos, caña de azúcar y palmeras, de trigo, repollo, colza, mostaza, maíz, remolacha, plátanos, algodón, frijoles, tabaco, arrozales, plantas de cítricos, orquídeas, lirios, achicoria, girasoles, inoculantes de leguminosas que usan turba no estéril como portador y madera almacenada (Hauben *et al.*, 1999; Denton & Kerr, 1998). Se ha observado un predominio de *S. maltophilia* sobre otras pseudomonas en la rizosfera de varias plantas cultivadas, como la col, la colza, la mostaza, el maíz y la remolacha. Algunas de estas plantas tienen proteínas de alto contenido de azufre, y la abundancia de *S. maltophilia*, la cual requiere aminoácidos como la metionina, puede deberse a la excreción de dichos compuestos por las raíces (Palleroni, 2015).

Además de ser un patógeno oportunista relevante, las especies de *Stenotrophomonas* también se usan con frecuencia en microbiología y biotecnología aplicadas, por ejemplo, para la promoción del crecimiento de las plantas, así como en el control biológico de las enfermedades fúngicas de las plantas y en biorremediación. Las cepas de *Stenotrophomonas* son ubicuas, pero se han recuperado preferentemente de rizosferas de todo el mundo y de una amplia gama de fuentes nosocomiales.

Bibliografía:

Corzo-Delgado, J.E. & Gómez-Mateos J.M. (2006). *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*;24(1):1-3

Denton, M. & Kerr, K. G. (1998). Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 11:57–80.

Hauben, L., Vauterin, L., Moore, E. R. B., Hoste, B. & Swings, J. (1999). Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology* (1999), 49, 1749-1 760

Lipuma, J. J., Currie, B. J., Peacock, S. J. & Vandamme, P. (2015). *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Delftia*, and *Acidovorax*. En: *Manual of Clinical Microbiology*. Eleven Edition. Cap. 43. pp. 791-812. ISBN: 9781555817374

Palleroni, N. J. (2015). Genus *Stenotrophomonas*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–20. doi:10.1002/9781118960608.gbm01237

Schaumann, R & Rodloff, A. C. (2003). *Stenotrophomonas maltophilia* un patógeno bacteriano. Sociedad Iberoamericana de Información Científica.