

ANTEQUERA, JUNIO, 1990

UNIVERSIDAD DE
GRANADA

FACULTAD DE
FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

*COMPORTAMIENTO DE ENTEROBACTERIACEAE
A DISTINTAS CONCENTRACIONES
SALINAS
(CLORURO SÓDICO)*

Tesis Doctoral por :
ANGELES GIMENEZ MARIN

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

Curso de 1989 a 1990

Folio

Número

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D.^o ANGELES GIMENEZ MARIN, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "COMPORTAMIENTO DE ENTEROBACTERIACEAE A DISTINTAS CONCENTRACIONES SALINAS [CLORURO SODICO]"

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, éste le calificó de APTO CON LAUDE

Granada, 22 de Septiembre de 1990

El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

El Vocal,

Firma del Graduado,

El Vocal,

El Vocal,

INVESTIDURA . . } En el día de la fecha se ha conferido a D. _____ el Grado de Doctor en la Facultad de _____, conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada, de _____ de 19____

EL DECANO,

CERTIFICO: Que el Acta que antecede concuerda con la del expediente del interesado remitida a la Secretaría de la Universidad.

Granada, de _____ de 19____

El Catedrático Secretario,

V.º B.º
EL DECANO,

DIRECTOR

Prof. Dr. Don Alberto Ramos Cormenzana
Catedrático de Microbiología de la
Facultad de Farmacia de la Universidad
de Granada.



Memoria que presenta Doña Angeles
Giménez Marín para optar al grado
de Doctor en Farmacia por la
Universidad de Granada.



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor Don Alberto Ramos Cormenzana, quien me transmitió en mi periodo de estudiante, el cariño por la Microbiología, aceptó y confió desinteresadamente el proyecto de dirigirme la Tesis Doctoral; por su inestimable ayuda durante la elaboración de la misma y muy especialmente por la amistad que me ha brindado en todo momento.

A Esteban
y mis hijos Montse y Jose
a quienes arrebaté muchos dias de sus vidas

A mi madre

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

- I.1. SITUACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA
- I.2. FUENTES DE CONSULTA
- I.3. CONCEPTO DE ESPECIE
- I.4. CLASIFICACIÓN DE LA FAMILIA
- I.5. CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LA FAMILIA
- I.6. INTERÉS DE LA FAMILIA
- I.7. AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACION
- I.8. CONCEPTO DE HALOFILISMO
- I.9. RELACION DE LAS ENTEROBACTERIACEAE CON EL HALOFILISMO

II. OBJETIVOS

III. MATERIAL Y METODO

- III.1. CEPAS DE TRABAJO.
- III.2. MEDIOS DE AISLAMIENTO
- III.3. IDENTIFICACIÓN
- III.4. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE LA SAL

IV. RESULTADOS

- IV.1. GENERO CEDECEA
- IV.2. GENERO CITROBACTER
- IV.3. GENERO EDWARDSIELLA
- IV.4. GENERO ENTEROBACTER
- IV.5. GENERO ESCHERICHIA
- IV.6. GENERO EWINGELLA
- IV.7. GENERO HAFNIA
- IV.8. GENEROKLEBSIELLA
- IV.9. GENERO KLUYVERA
- IV.10. GENERO MORGANELLA
- IV.11. GENERO PROTEUS
- IV.12. GENERO PROVIDENCIA
- IV.13. GENERO SALMONELLA
- IV.14. GENERO SERRATIA
- IV.15. GENERO SHIGELLA
- IV.16. GENERO YERSINIA

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFIA

I.-INTRODUCCION

I.1 SITUACIÓN TAXONÓMICA DE LA FAMILIA

El nombre de la familia Enterobacteriaceae fue propuesto por Rahn en 1937, antes de que existiese el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias. Su denominación deriva de *Enterobacterium*, bacteria intestinal y -aceae, terminación que denota familia.

Cuando se publicó el primer Código, en 1948, el nombre hasta entonces utilizado se consideró ilegítimo porque no se ajustaba a algunos de los requisitos del mismo tal como que el nombre del género tipo debiera derivar del tronco de la propia nomenclatura. Sin embargo, el término Enterobacteriaceae llegó a ser tan ampliamente utilizado y aceptado que en 1958, el Comité Judicial (94) de Bacteriología Sistemática decide conservar el nombre y mantener como género tipo de la familia al género *Escherichia*. Esta decisión permaneció en la versión de 1975.

Años más tarde, en 1978, el Comité Judicial (95) decide cambiar de nuevo el nombre de la familia a "Enterobacteraceae" y el género tipo por el *Enterobacter* en base a las propias reglas del Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (112). Surge un conflicto que se agudiza cuando ninguno de los nombres Enterobacteriaceae ni Enterobacteraceae aparecen en las Listas de Nombres de Bacterias Aprobados (165), tan sólo a pie de página, lo que fue interpretado como que el nombre propuesto por Rahn no tenía lugar en la literatura científica y por tanto, la familia continuaba sin nombre.

Un año más tarde, Ewing, Farmer y Brenner reproponen el nombre Enterobacteriaceae lo que obliga a una nueva revisión por parte de la Comisión Judicial validando de nuevo el nombre propuesto por Rahn.

En todas las familias existe un representante considerado género tipo. En la familia Enterobacteriaceae, el género tipo es el *Escherichia*, nombre propuesto por Castellani y Chalmers en 1919 en honor al bacteriólogo alemán Escherich quien lo describió como un habitante de la flora del intestino humano.

I.2. FUENTES DE CONSULTA

Las fuentes principales de consulta para el estudio de las Enterobacteriaceae son el Manual de Bergey (24) que constituye el tratado más amplio de clasificación bacteriana en lo que se refiere a nomenclatura, cepas tipo, descripción taxonómica, etc.; el monumental trabajo realizado por Edwards y Ewing (39) posteriormente actualizado por Ewing en 1986 (45) y el International Journal of Systematic Bacteriology en el que deben describirse obligatoriamente todas las especies nuevas o hacer referencia a la publicación en que están descritas.

En el Manual de Bergey, las bacterias se ubican en el Reino Procariotes. Se subdividen en cuatro divisiones: Gracilicutes para paredes celulares gram negativas, Firmacutes para paredes celulares gram positivas, Tenericutes para organismos que carecen de pared celular y Mendosicutes para bacterias con pared celular defectuosa y en ocasiones carentes de algún glicopéptido. Dentro de la clasificación jerárquica hay una serie de subdivisiones en clases; dentro de cada clase hay órdenes y dentro de los órdenes están las familias o grupos morfológicos si no se dispone de nombre de familia que se subdividen, en géneros y especies.

En la anterior edición que entonces se llamaba Bacteriología Determinativa de Bergey (34), la familia Enterobacteriaceae se subdividía en tribus basándose en la fermentación de la D. glucosa con producción de ácido, reacción Rojo de Metilo, reacción Voges Proskauer y degradación de Urea y KCN.

En el Manual de Bergey (24), la familia Enterobacteriaceae se encuentra en el volumen I; aparece en enero de 1984 con cambios en la nomenclatura, nuevos géneros y muchas especies nuevas. Considera cuestionable el uso de tribus para la clasificación en base principalmente a los cambios habidos de la 7ª a la 8ª edición; a la escasas tribus que aparecen en las Listas de Nombres de Bacteria Aprobadas (165) (Erwinieae, Escherichieae, Proteeae, Salmonelleae y Serratieae) y, lo que es más importante, no considera que tengan significación diagnóstica.

Para Brenner (24), autor de la sección correspondiente a la familia Enterobacteriaceae del Manual de Bergey, las razones para que se produjeran estos cambios fueron:

a) Las contribuciones al capítulo de Enterobacteriaceae de la 8ª edición concluyeron en 1970, de modo que llevaban transcurridas casi dos décadas.

b) El descubrimiento de nuevas especies en el agua, insectos, nematodos, plantas, pescados y otros animales.

c) La aportación de nuevos criterios para la definición de especie.

I.3. CONCEPTO DE ESPECIE

El concepto de especie agrupa a microorganismos que tienen características muy semejantes entre sí en los rasgos más esenciales de su organización. El problema de esta definición estriba en la subjetividad que lleva implícita.

A menudo, las especies se definieron con los únicos criterios de base tales como amplitud de huésped, patogenicidad, test bioquímicos, modelos de resistencia a antibióticos, etc. No existe una fórmula de idear una única definición de especie que pudiera aplicarse a todos los grupos; lo que daba lugar a que los criterios a emplear dependieran del propio investigador utilizándose en muchos casos, de forma arbitraria. Así, para Fritz Kauffman (99), el concepto de especie lo define como un grupo de sero, bio, fagotipos afines; considerando la serología como el criterio supremo de la taxonomía.

Para Edwards y Ewing (39, 45), la clasificación e identificación de un organismo debe basarse en el conjunto de sus características morfológicas y bioquímicas. Estos investigadores, aplicaron la taxonomía numérica consistente en barajar un gran número de características bioquímicas, morfológicas y/o culturales para determinar el grado de semejanza entre los microorganismos. Para ello, las pruebas específicas de géneros y especies se identificaron por el método numérico y se introdujeron nuevas pruebas bioquímicas como posibles auxiliares de la identificación.

El monumental trabajo que realizaron condujo a que la taxonomía de las Enterobacteriaceae progresara notablemente influyendo de forma decisiva en los cambios acaecidos en la 8ª edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey.

Sin embargo, cuando se usa este criterio como base única para definir una especie, surgen varios problemas, ya que el mismo conjunto de reacciones definitivas no puede usarse para clasificar todos los grupos de microorganismos. No hay tampoco un número estándar de reacciones específicas que permita definir una especie. Los microorganismos se identifican por su fenotipo y desde un punto de vista taxonómico, la identificación a nivel de especie, basada únicamente en el fenotipo, está sujeta a error. De todos es

conocido que enzimas diferentes (codificadas por genes diferentes) pueden catalizar la misma reacción; del mismo modo que genes presentes pueden dar reacciones negativas por un fenómeno mutacional o por el contrario, la presencia de plásmidos metabólicos permiten que las cepas realicen reacciones imposibles en su ausencia.

Lo ideal para identificar especies bacterianas sería, separar los genes y comparar su secuencia nucleótida con la de una cepa de referencia conocida. En la práctica, existe un método para comparar el ADN total de un organismo con el de cualquier otro y es el denominado hibridación de ácidos nucleicos que nos mide la cantidad de secuencias de ADN que tienen en común dos organismos y por otro lado, también nos permite aproximarnos al porcentaje de divergencias o bases de nucleótidos no apareados dentro de las secuencias relacionadas de ADN.

De un modo escueto podemos decir que un organismo es de la misma especie cuando su ADN tiene un alto porcentaje de parentesco.

Desde un punto de vista genético, se emplean principalmente cinco parámetros para determinar las relaciones de ADN (22):

- 1.- Tamaño del genoma
- 2.- Contenido G+C que es específico para cada especie pero no exclusivo de ella.
- 3.- Relaciones de ADN en condiciones óptimas de reasociación (es una reacción específica que depende de la temperatura y para una especie bacteriana la constituyen cepas con un parentesco del 70 al 100%).
- 4.- Estabilidad térmica de las secuencias relacionadas (en la práctica, cepas con una relación igual o superior al 70% muestran una divergencia del 0 al 5%; mayor divergencia a la inestabilidad térmica se considera divergencias en la secuencia de nucleótidos).
- 5.- Relaciones de ADN en condiciones supraóptimas para la reasociación de ADN (a temperaturas no óptimas únicamente pueden reasociarse secuencias de ADN muy estrechamente relacionadas).

Aplicando estos cinco parámetros podemos llegar a una definición genética de especie: grupo de cepas con contenido G+C y tamaño del genoma similares, relación del 70% o más

con divergencia del 0 al 5% entre secuencias relacionadas y con un 55% o más de relación a temperaturas no óptimas de incubación.

Las relaciones de ADN permiten una definición de especie que puede aplicarse por igual a todos los organismos. No está sujeta a variaciones fenotípicas, mutaciones ni a la presencia o ausencia de plásmidos metabólicos u otros. Ello se debe a que mide una relación general del ADN y las reacciones bioquímicas atípicas, mutaciones y plásmidos afectan a un porcentaje muy pequeño del total de ADN. Esto se comprueba estudiando los datos de relación de ADN tras hibridación de gran número de cepas atípicas por ejemplo *E. coli* sulfhídrico positivas en las que no se han podido demostrar ningún gen cromosómico productor de sulfhídrico y que sin embargo, por estudios de hibridación resultaron ser genéticamente cepas de *E. coli* (22).

La figura 1 muestra el porcentaje de parentesco del ADN entre las Enterobacteriaceae como resultado de los estudios de hibridación de ADN realizados por Brenner (22, 24).

Los parámetros genéticos no son por ahora prácticos para los laboratorios clínicos. En la práctica el enfoque de la taxonomía bacteriana debe ser polifásico (45, 119); por un lado, agrupación fenotípica de cepas por reacciones bioquímicas y otras características de interés; por otro, conocer la homogeneidad o heterogeneidad genética y por último, comparar ambos para determinar los límites bioquímicos de cada grupo y las reacciones que tienen valor diagnóstico para el grupo.

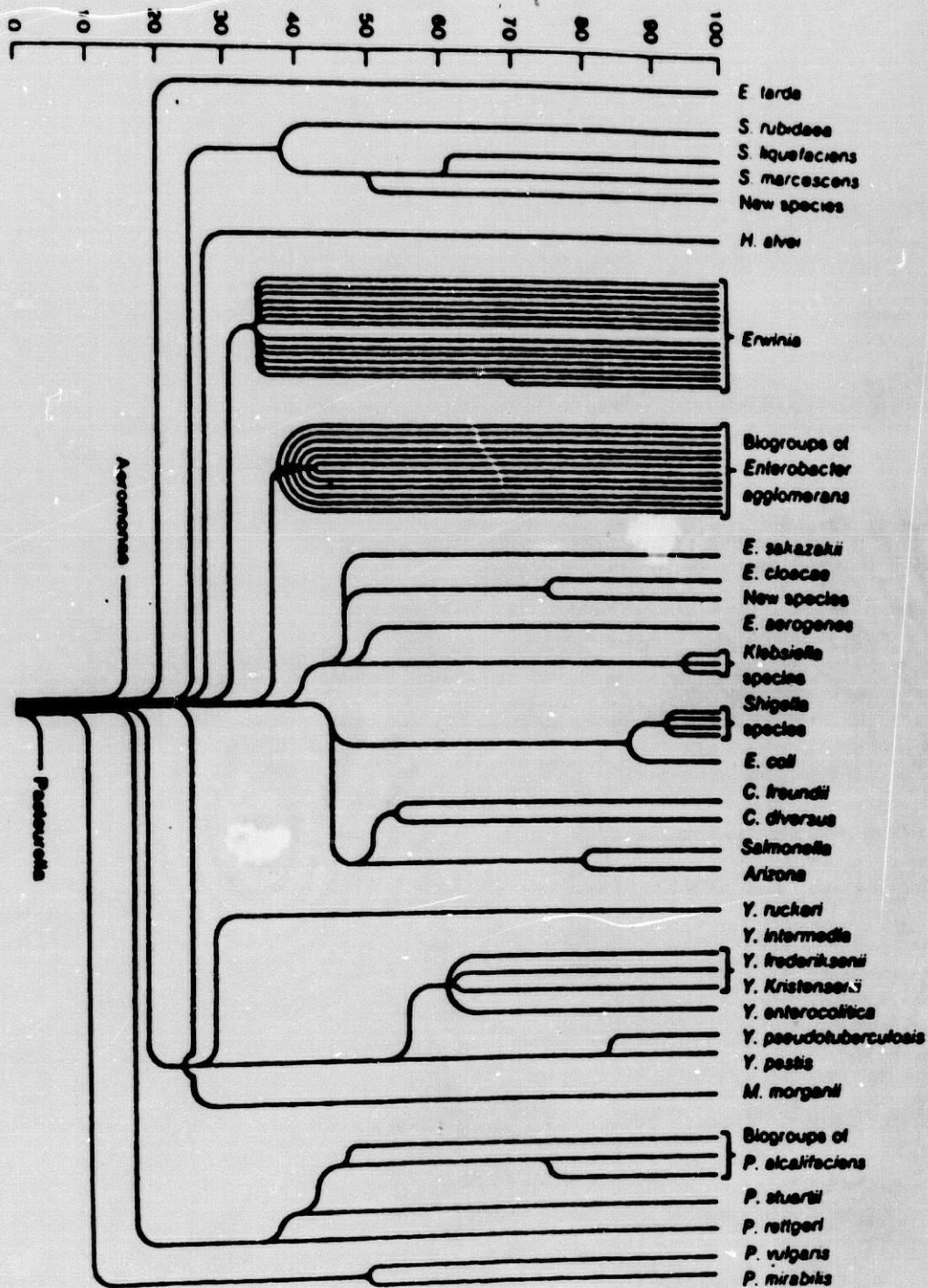


FIG.1.: PORCENTAJE DE PARENTESCO DEL ADN EN LAS
ENTEROBACTERIACEAE
 (Obtenido del Manual de Bergey)

I.4. CLASIFICACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIACEAE

En la tabla 1 se expone la clasificación actual de la familia según el Manual de Bergey (24) comparándola con la 8ª edición.

TABLA 1: CLASIFICACIÓN ACTUAL COMPARADA CON LA 8ª EDICIÓN

<u>CLASIFICACIÓN ACTUAL</u>	<u>8ª EDICIÓN M.D. BERGEY</u>
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>E. blattae</i>	NL
<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>S. dysenteriae</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>S. boydii</i>	<i>S. boydii</i>
<i>S. sonnei</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>E. tarda</i>
<i>E. ictaluri</i>	NL
<i>E. hoshinae</i>	NL
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>C. freundii</i>
<i>C. diversus</i>	<i>C. intermedius</i> biogroup b
<i>C. amalonaticus</i>	<i>C. intermedius</i> biogroup a
<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>S. cholerae-suis</i>
<i>S. hirschfeldii</i>	<i>S. hirschfeldii</i>
<i>S. typhi</i>	<i>S. typhi</i>
<i>S. paratyphi A</i>	<i>S. paratyphi A</i>
<i>S. schottmuelleri</i>	<i>S. schottmuelleri</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>
<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>
<i>S. gallinarum</i>	<i>S. gallinarum</i>
<i>S. salamae</i>	<i>S. salamae</i>
<i>S. arizonae</i>	<i>S. arizonae</i>
<i>S. houtenae</i>	<i>S. houtenae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
subsp. <i>pneumoniae</i>	
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>K. ozaenae</i>
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>
<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i> , indole-positive biogroup
<i>K. planticola</i>	NL
<i>K. terrigena</i>	NL
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>E. aerogenes</i>
<i>E. agglomerans</i>	<i>Erwinia herbicola</i> , <i>Erwinia stewartii</i> , and <i>Erwinia uredovora</i>
<i>E. gergoviae</i>	NL
<i>E. amnigenus</i>	NL
<i>E. sakazakii</i>	yellow-pigmented

CLASIFICACIÓN ACTUAL (2ª)

8ª EDICIÓN M.D. BERGEY

<i>E. sakazakii</i>	yellow-pigmented
<i>E. intermedium</i>	<i>E. cloacae</i>
<i>Hafnia alvei</i>	NL
<i>Serratia marcescens</i>	<i>H. alvei</i>
<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>S. rubideae</i>	NL
<i>S. plymuthica</i>	NL
<i>S. proteamaculans</i>	biogroup os <i>S. marcescens</i>
<i>S. odorifera</i>	NL
<i>S. fonticola</i>	NL
<i>S. ficaria</i>	NL
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>P. vulgaris</i>
<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>
<i>P. myxofaciens</i>	NL
<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Proteus inconstans</i>
	biogroup A
<i>P. stuartii</i>	<i>Proteus inconstans</i>
	biogroup B
<i>P. rettgeri</i>	<i>Proteus rettgeri</i>
<i>Morganella morganii</i>	<i>Proteus morganii</i>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pestis</i>
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
<i>Y. ruckeri</i>	NL
<i>Y. intermedia</i>	biogroup of
	<i>Y. enterocolitica</i>
<i>Y. frederiksenii</i>	biogroup of
	<i>Y. enterocolitica</i>
<i>Y. kristensenii</i>	biogroup of
	<i>Y. enterocolitica</i>
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>E. amylovora</i>
<i>E. salicis</i>	<i>E. salicis</i>
<i>E. tracheiphila</i>	<i>E. tracheiphila</i>
<i>E. nigrifluens</i>	<i>E. nigrifluens</i>
<i>E. quercina</i>	<i>E. quercina</i>
<i>E. rubrifaciens</i>	<i>E. rubrifaciens</i>
<i>E. herbicola</i>	<i>E. herbicola</i>
<i>E. stewartii</i>	<i>E. stewartii</i>
<i>E. uredovora</i>	<i>E. uredovora</i>
<i>E. carotovora</i>	<i>E. carotovora</i>
<i>E. chrysanthemy</i>	<i>E. chrysantemy</i>
<i>E. cypripedii</i>	<i>E. crypripedii</i>
<i>E. rhapontici</i>	<i>E. rhapontici</i>
<i>E. carnegieana</i>	NL
<i>E. mallotivora</i>	NL
<i>Obesumbacterium proteus</i>	NL
<i>Kluyvera ascorbata</i>	NL
<i>K. cryocrescens</i>	NL
<i>Cedecea lapagei</i>	NL
<i>C. davisae</i>	NL

CLASIFICACIÓN ACTUAL (3ª)	8ª EDICIÓN M.D. BERGEY
<i>Tatumella ptyseos</i>	NL
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	NL
<i>X. Luminescens</i>	NL
<i>Rahnella aquatilis</i>	NL

Erwing W. H. (45) por el contrario, decide mantener el empleo de tribus como un sistema útil para agrupar a aquellos microorganismos que presentan reacciones bioquímicas similares y que son de importancia diagnóstica.

Cada lista de especies representa un grupo de parentesco de ADN excepto *E. coli*, *Shigella* y *Klebsiella* en las que más de una especie está incluida en un grupo de parentesco de ADN. La especie *Enterobacter agglomerans* representa a trece grupos relacionados y en *Hafnia alvei*, dos especies están en un grupo de relación de ADN.

En la tabla 2 se expone el esquema que este autor realiza sobre la nomenclatura de la Familia Enterobacteriaceae

TABLA 2: NOMENCLATURA DE LA F. ENTEROBACTERIACEAE

Familia ENTEROBACTERIACEAE Rahn

Tribu I ESCHERICHIEAE Bergey, Breed y Murray

Género I

Escherichia Castellani y Chalmers

1. *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers.
2. *Escherichia blattae* Burgess, McDermott y Whiting.
3. *Escherichia hermannii* Brenner y col.
4. *Escherichia vulneris* Brenner y col.
5. *Escherichia fergusonii* Farmer y col.

Género II

Shigella Castellani y Chalmers

1. *Shigella dysenteriae* (Shiga) Castellani y Chalmers
2. *Shigella flexneri* Castellani y Chalmers
3. *Shigella boydii* Ewing
4. *Shigella sonnei* (Levin) Weldin

Tribu II EDWARDSIELLEAE Ewing y McWhorter

Género I

Edwardsiella Ewing y McWhorter

1. *Edwardsiella tarda* Ewing y McWhorter
2. *Edwardsiella hoshinae* Grimont y col.
3. *Edwardsiella ictaluri* Hawke y col.

Tribu III SALMONELLEAE Bergey, Breed y Murray

Género I

Salmonella Lignières

1. **Salmonella enterica subsp enterica** (Kauffmann y Edwardws) Le Minor, Veron y Popoff
2. **Salmonella enterica subsp salamae** Le Minor, Rohde y Taylor
- 3a. **Salmonella enterica subsp arizonae** Le Minor, Veron y Popoff
- 3b. **Salmonella enterica subsp diakizonae** Le Minor, Veron y Popoff
4. **Salmonella enterica subsp houtenae** Le Minor, Rhode y Taylor
5. **Salmonella enterica subsp bongori** Le Minor, Veron y Popoff

Tribu IV CITROBACTEREAE (trib. nov.)

Género I

Citrobacter Werkman and Guillen

1. **Citrobacter freundii** (Braak) Werkman y Gillen
2. **Citrobacter diversus** (Burkey) Werkman y Gillen
3. **Citrobacter amalonaticus** (Young) Brenner y Farmer

Tribu V KLEBSIELLEAE Trevisan

Género I

Klebsiella Trevisan

1. **Klebsiella pneumoniae** (Schroeter) Trevisan
2. **Klebsiella ozaenae**
3. **Klebsiella oxytoca** (Fluegge) Trevisan
4. **Klebsiella rhinoschleromatis** Trevisan
5. **Klebsiella planticola** Bagley, Seidler y Brenner
6. **Klebsiella terrigena** Izard y col.
7. **Klebsiella trevisanea** Ferragut y col.

Género II

Enterobacter Hormaeche y Edwards

1. **Enterobacter cloacae** (Jordan) Hormaeche y Edwards
2. **Enterobacter aerogenes** (Kruse) Hormaeche y Edwards
3. **Enterobacter agglomerans** (Beijerinck) Ewing y Fife
4. **Enterobacter sakazakii** Farmer y col.
5. **Enterobacter gergoviae** (sic) Richard y col.
6. **Enterobacter amnigenus** Izard y col.
7. **Enterobacter intermedium** (sic) Izard y col.
8. **Enterobacter taylori** Farmer y col.
9. **Enterobacter dissolvens** (Rosen) Burkholder
10. **Enterobacter nimipressuralis** (Carter) Dye

Género III

Hafnia Moeller

1. **Hafnia alvei** Moeller
2. **Hafnia**
3. **Hafnia**

Género IV

Serratia Bizio

1. **Serratia marcescens** Bizio
2. **Serratia liquefaciens** (Grimes y Henerty) Bascomb y col.
3. **Serratia rubidaea** (Stapp) Ewing, Davis y Fife
4. **Serratia fonticola** Gavini y col.
5. **Serratia odorifera** Grimont y col.
6. **Serratia ficaria** Grimont y col.
7. **Serratia grimesii** Grimont y col.
8. **Serratia plymuthica** (sic) (Lehman y Neumann) Bred, Murray y Hitchens
9. **Serratia proteamaculans** (Paine y Stansfield) Grimont, Grimont y Starr

Tribu VI PROTEAE Castellani y Chalmers

Género I

Proteus Hauser

1. **Proteus vulgaris** Hauser
2. **Proteus mirabilis** Hauser
3. **Proteus penneri** Hickman y col.
4. **Proteus myxofaciens** Cosenza y Podgwaite

Género II

Morganella Fulton

1. **Morganella morganii** (Winslow y Brenner y col)

Género III

Providencia Ewing

1. **Providencia alcalifaciens** (de Salles Gomes) Ewing
2. **Providencia stuartii** (Butiaux y col) Ewing
3. **Providencia rettgeri** (Hadley y col.) Brenner y col.
4. **Providencia rustigianii** Hickman-Brenner y col.

Tribu VII YERSINIEAE Martinevskij

Género I

Yersinia van Loghem

1. **Yersinia pseudotuberculosis** (Pfeiffer) Smith Thal
2. **Yersinia pestis** (Lehmann y Neumann)
3. **Yersinia enterocolitica** (Schleifstein y Coleman) Frederiksen
4. **Yersinia frederiksenii** Ursing y col.
5. **Yersinia kristensenii** Brenner y col.
6. **Yersinia intermedia** Bercovier y col.

7. *Yersinia ruckeri* Ewing y col.
8. *Yersinia aldovae* Bercovier y col.

Tribu VIII ERWINIEAE Winslow y col.

Género I

Erwinia Winslow y col

1. *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow y col.
2. *Erwinia carotovora* (Jones) Bergey y col.

El propio autor no considera perfecto este esquema pero opina que es lo más apropiado a una práctica ideal de la taxonomía.

I.5 CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LA FAMILIA

Son bacilos rectos de 0,3 - 1,0 x 1,0 - 6,0 mm. gram negativos, móviles por flagelos peritricos o no móviles. No producen endosporas, no ácido alcohol resistentes. Crecen en presencia y ausencia de oxígeno. Se cultivan bien en medios comunes a base de peptona, extracto de carne, etc.. Metabolismo tanto oxidativo como fermentativo, utilizan glucosa con producción de ácido y a menudo gas visible además de otros carbohidratos y alcoholes polihídricos.

Catalasa positiva excepto *Shigella dysenteriae* 0 grupo 1 (24), oxidasa negativa dato esencial para diferenciarlos de otros grupos de bacilos gram negativos fermentadores de glucosa. Reducen nitratos a nitritos excepto algunas especies de *Erwinia* y *Yersinia*. NO HALOFILOS (24, 100). Todas las especies excepto *Erwinia chrysanthemi*, tienen un antígeno común enterobacterial.

La familia contiene en la actualidad más de veinte géneros y más de cien especies.

I.6 INTERÉS DE LA FAMILIA

El término Enterobacteriaceae engloba a un gran número de microorganismos relacionados tanto bioquímica como genéticamente pero con una marcada heterogeneidad desde el punto de vista ecológico presentando una gran variedad de huéspedes y un potencial patógeno tanto al hombre como animales y plantas. Están distribuidos en todas partes: suelo, aguas, frutos, vegetales y animales.

Son muchas las especies consideradas de importancia económica por sus implicaciones en enfermedades tanto de plantas como de animales. Así por ejemplo, especies de *Erwinia* y *Peptobacterium* pueden causar plagas en cereales, patatas y piñas destruyendo importantes cantidades de cultivo (169).

La industria del pescado tropical se ve a menudo afectada por enfermedades causadas por Enterobacteriaceae. Criaderos de truchas y salmón pueden verse afectados por *Yersinia ruckeri*. *Edwardsiella tarda* es patógeno de peces tales como anguilas, barbos y carpa dorada (162).

La salmonelosis en las aves de corral es un problema mundial y altamente fatal tanto para el animal como para el hombre en tanto que puede actuar como vehículo portador de la enfermedad (179, 39). *Salmonella arizonae* causa un síndrome característico de diarrea principalmente en pavos que se conoce con el nombre de arizonosis; también es patógena para las culebras y otros reptiles. *Salmonella pullorum* afecta principalmente a huevos y pollos.

Otras especies de *Salmonella* pueden provocar desde partos prematuros hasta abortos y daño en la lana de las ovejas (92).

Más de 100 serotipos de *Salmonella* han sido aislados de cerdos, sin embargo, dos, *S. cholerae-suis* y *S. typhisuis* tienen como huésped primario al cerdo (7). En animales jóvenes, provoca a menudo septicemia mientras que en los adultos la infección suele manifestarse como una diarrea crónica. También algunas especies de *Salmonella* especialmente *S. typhimurium*, pueden causar epidemias de enteritis con elevada mortalidad en caballos (42). A menudo gatos y perros son afectados permaneciendo muchos de ellos

como portadores (42).

Especies toxigénicas de *E. coli* provocan diarrea en corderos, cerdos y ovejas. Especies de *Klebsiella* y *Citrobacter* se han visto implicadas en mastitis bovinas(92).

Algunos miembros de la familia Enterobacteriaceae tales como *Shigellas* y ciertos serotipos huésped adaptativos poseen un número de huéspedes limitado sin embargo otras especies como *E. coli* y *Yersinia* infectan o son portadas por una gran variedad de huéspedes desde insectos al hombre.

Desde un punto de vista sanitario, Las Enterobacteriaceae están asociadas con muchos tipos de infecciones humanas y, por su predominio de infectar al tracto gastrointestinal se les ha conocido como patógenos entéricos y no entéricos; de hecho, son un componente importante de la flora intestinal humana normal y relativamente infrecuente en otras áreas del organismo.

Históricamente los géneros que se consideraban patógenos de infecciones intestinales eran *Salmonella* y *Shigella*. El primero produce una gran variedad de enfermedades entéricas humanas; desde una gastroenteritis autolimitada con síntomas leves de escasa duración, hasta una acentuada gastroenteritis con o sin bacteriemia; o bien una fiebre tifoidea enfermedad severa y potencialmente fatal.

Las *Salmonellas* atraviesan la mucosa intestinal y se multiplican en la submucosa. Según la virulencia de las cepas y la respuesta del huésped pueden invadir y multiplicarse en el torrente circulatorio sanguíneo y/o linfático. *Salmonella typhi*, *S. paratyphi B* y *S. choleraesuis* son particularmente importantes debido a su asociación frecuente a producir enfermedad severa con bacteriemia; sin embargo, cada vez son más frecuentes los casos de otros serotipos de *Salmonella* que pueden causar bacteriemia.

Las especies del Género *Shigella* producen la clásica disentería bacilar caracterizada por severos dolores abdominales y diarrea con sangre y mucus. Estos organismos invaden las células de la mucosa causando la muerte y desprendimiento de las mismas hacia el lumen intestinal; sin embargo rara vez invaden más allá de la mucosa.

A finales de la década de 1940, un grupo de serotipos de *E. coli* se aislaron de muestras procedentes de una epidemia de diarrea infantil. En la actualidad, el *E. coli* se encuentra asociado a cuatro tipos de enfermedad entérica humana: enteropatogénica, enterotoxigénica, enteroinvasora y hemorrágica.

Las cepas enteropatógenas producen diarrea principalmente en lactantes por unos mecanismos no bien conocidos. Se identifican por técnicas serológicas utilizando antisueros específicos. Aunque existe un número limitado de serotipos específicos (120) su frecuencia ha ido decreciendo en los últimos años.

Las cepas enterotoxigénicas causan diarrea secretora debido a la elaboración de enterotoxinas termolábiles y/o termoestables (158). Aquí, los factores de adherencia a superficies son también importantes y parecen ser requeridos por los organismos para poderse fijar a la mucosa intestinal donde elaboran toxinas. Estas cepas producen diarrea líquida, a menudo implicada en casos de "diarrea del viajero".

Menos frecuentes, las cepas enteroinvasoras, causan una enfermedad disenteroide similar a la infección por *Shigella* (174). Estas cepas de *E. coli* invaden la célula de la mucosa intestinal causando su destrucción. Los pacientes infectados tienen deposiciones con sangre, mucus y leucocitos polimorfonucleares.

La colitis hemorrágica es una infección entérica debido a cepas de *E. coli* con un serotipo específico O157:H7. Estas cepas causan una diarrea severa con sangre en heces. Muchos casos descritos han sido adquiridos por el consumo de alimentos mal cocinados. Parece ser que estas cepas producen una citotoxina para las células Vero y Hela muy similar a la producida por *Shigella dysenteriae* dañando las células y produciendo una hemorragia hacia el lumen intestinal (97).

Se sabe que las enterotoxinas de *E. coli* son transmitidas por plásmidos y por lo tanto, no sería sorprendente encontrar enterotoxinas en otras especies (80).

En los últimos años, *Yersinia enterocolitica* ha sido demostrada claramente como causa significativa de gastroenteritis. Se considera principalmente como patógeno invasor y parece poseer factores de virulencia esenciales para producir enfermedad intestinal humana acompañada de la producción de una enterotoxina muy semejante a la de *E. coli* (141).

También se han aislado cepas toxigénicas de *Klebsiella pneumoniae* de enfermos con sprue tropical (104).

Las fuentes más comunes de transmisión de la enfermedad entérica son el agua y alimentos contaminados principalmente: leche, y derivados, carnes de ternera, cerdo y aves infectadas, huevos y pescado.

De acuerdo con los datos de que se disponen referentes a brotes sobre Infecciones e Intoxicaciones alimenticias notificadas de forma individualizada en el Boletín Epidemiológico Semanal (16) en España desde 1976, por los Servicios de Epidemiología de las distintas Comunidades Autónomas; de todos los agentes implicados, las *Salmonellas* siguen siendo las más frecuentes experimentando un marcado incremento desde el año 1981 y sorprendentemente mayor a partir del año 1983, 1984 (16). Del total de brotes estudiados en la serie (2652 brotes), el 58,45% corresponden a *Salmonellas* con un desplazamiento marcado del serotipo typhimurium al serotipo enteritidis (52,84%). El 1,06% corresponden a tox infecciones por *Shigellas* y el 1,51% a otros. Llama la atención el gran número de brotes en los cuales no se han podido implicar a ningún germen (30,35%). No hay que olvidar que algunas epidemias no se detectan y otras muchas no se informan. Para la *Salmonellas* se estima que cada caso informado representan 100 casos totales (16).

De los alimentos implicados en estos brotes, la mahonesa y otros alimentos que la contienen, sigue siendo el vehículo más frecuente de la infección (38,42%).

Desde el punto de vista del agua como vehículo transmisor de enfermedad entérica, los últimos datos globales de que se disponen son del año 1986 (15). La identificación del agente causal solo se ha podido realizar en un 32,50% de los brotes de los cuales 7, fueron producidos por *Shigella sonnei*, dos por *S. typhi*, uno por *S. enteritidis*, uno por *S. typhimurium* y otro por *Salmonella* sp.

A menudo se han referido a las especies de Enterobacteriaceae no asociadas a infecciones del tracto gastrointestinal como "no patógenas", denominación que dista mucho de la realidad. Excepto las especies *Shigella* que rara vez causan infecciones fuera del tracto gastrointestinal, la mayoría de las Enterobacteriaceae pueden estar implicadas en una gran variedad de infecciones extraintestinales; sin embargo tan sólo un pequeño número de especies dan cuenta de la mayoría de las mismas: *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp y *Serratia marcescens*.

Las infecciones más frecuentes en las que se ven implicadas son las del tracto urinario, principalmente cistitis, seguidas de las infecciones respiratorias y de heridas.

Las Enterobacteriaceae son responsables de más del 50% de las infecciones nosocomiales especialmente en aquellos huéspedes inmunocomprometidos, cateterizados, quemados y ancianos donde son más vulnerables de ser atacados por patógenos oportunistas.

I.7. AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN

Las Enterobacteriaceae pueden aislarse (8, 23, 91, 100, 163, 178) bien de las muestras obtenidas de cualquier parte del organismo tomando la precaución de que dicha muestra sea representativa de la lesión y no esté contaminada con tejidos, órganos o secreciones adyacentes. Resulta especialmente importante el que las muestras se siembren lo más rápidamente posible ya que la mayoría de las Enterobacterias se multiplican rápidamente. Alternativamente se pueden utilizar sistemas de conservación en aquellas situaciones en las que se demore el transporte de la muestra.

Crecen fácilmente en los medios comúnmente empleados en el laboratorio de microbiología (91, 100, 163, 178) y las muestras distintas de heces pueden cultivarse en agar sangre o agar chocolate si provienen de un sitio normalmente estéril del organismo.

En agar sangre todas producen un crecimiento similar: colonias grises, relativamente grandes y brillantes, hemolíticas o no. En agar tripticosa de soja, agar nutritivo o agar de infusión de carne, las colonias pueden variar de tamaño según el género pero generalmente se presentan blanco grisáceas, traslúcidas y ligeramente convexas. Algunas colonias son grandes y mucosas (*Klebsiella*, *Enterobacter aerógenes* y *Escherichia coli* tipo A). Es común la variación de las colonias que dan lugar a formas lisas y rugosas.

Generalmente se emplean medios selectivos (100, 158, 163) para aumentar su recuperación tales como McConkey o Eosina Azul de Metileno que ofrecen la ventaja adicional de diferenciar caracteres que permiten un agrupamiento preliminar de bacterias entéricas y otras gram negativas. Además puede ser importante la siembra en un caldo de enriquecimiento especialmente cuando la muestra contiene pequeño número de Enterobacterias. Las muestras de heces requieren técnicas especiales de cultivo en medios selectivos-diferenciales y caldo de enriquecimiento que permitan el desarrollo de patógenos entéricos e inhiba el de los microorganismos de la flora normal de las heces.

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae se identifican (39, 45, 163, 165, 167) principalmente mediante pruebas bioquímicas de las cuales, una batería de 28 pruebas es suficiente para diferenciar todas las actualmente reconocidas como clínicamente significativas. Una batería primaria de 14 pruebas que incluyen fermentación de adonitol, arginina hidrolasa, utilización de citrato, DNasa, gas a partir de glucosa, sulfuro de hidrógeno, producción de indol, lisina decarboxilasa, movilidad, ornitina decarboxilasa, fenilalanina desaminasa, fermentación de sacarosa, ureasa, y Voges. Proskauer es suficiente para la identificación de muchos a nivel de especie en el trabajo rutinario de un laboratorio. Se puede llevar a cabo otras 14 pruebas como batería suplementaria para aislamientos más difíciles que consiste principalmente en pruebas de fermentación de hidratos de carbono, hidrólisis de 0-nitrofenilgalactosido (ONPG) y desarrollo de KCN.

La confirmación serológica (91,99,100, 129) es una parte esencial de la identificación de algunas Enterobacteriaceae tales como *Salmonella*, *Shigella* y único medio de reconocer ciertas cepas patógenas de *E. coli* (129). La identificación serológica de estos organismos se lleva a cabo mediante técnicas de aglutinación en portaobjetos con sueros polivalentes o específicos para Antígeno O somático seguidas, en algunos casos, por pruebas con sueros individuales para identificación serotípica específica. Debido a la posibilidad de reacciones cruzadas, es esencial que los aislamientos estén previamente identificados por pruebas bioquímicas ambas serológicas son complementarias. Las reacciones son relativamente rápidas, sensibles y muy específicas.

De más reciente empleo en la identificación de bacterias son los métodos basados en el análisis del genoma por hibridación de ADN y determinación del contenido G+C (22, 135). Son muy válidos taxonómicamente pero no son por ahora prácticos para los laboratorios clínicos. Algunos de estos métodos han sido aplicados con éxito para la identificación de bacterias patógenas por ejemplo, detección de enterotoxinas de *E. coli* mediante sondas de ADN marcadas (161) que codifican para enterotoxinas termoestables. Igualmente se han empleado técnicas inmunológicas basadas en ensayos enzimáticos con inmunoabsorventes (ELISA) y métodos de aglutinación de partículas (173) ambos con una buena sensibilidad y especificidad comparadas con los tradicionales ensayos con cultivos de células pudiéndose realizar directamente en muestras de heces sin cultivo previo.

También se emplea el análisis molecular de plásmidos (89, 136) en forma amplia para identificar cepas epidémicas, éstas deben contener plásmidos y ser diferentes de los de las cepas no epidémicas y estas condiciones son satisfechas afortunadamente por la mayoría de las Enterobacteriaceae.

Otros métodos empleados incluyen la tipificación de bacteriófagos (6, 85, 121, 144, 154), serotipificación (3, 6, 36), y modelos de resistencia a antibióticos (3,6,124).

I.8. CONCEPTO DE HALOFILISMO

Los animales de sangre caliente necesitan en mayor o menor grado sal, de tal forma que su disponibilidad o escasez ha afectado a lo largo de la Historia en los modelos de asentamiento en las distintas áreas. Por el contrario, los microorganismos (hongos, bacterias y protozoos) presentan una amplia gama de respuesta a la sal.

La bacteria marina se ha distinguido de la terrestre por su requerimiento de cloruro sódico (126). Durante siglos, la sal ha supuesto el principal medio para la conservación de los alimentos y continúa siéndolo en muchas zonas. Para este propósito, la sal obtenida por evaporación de aguas saladas ha dado origen a una serie de organismos con una adaptación a concentraciones variables de la misma.

Los primeros intentos de búsqueda de organismos que nacían en ambientes salados, estaban motivados por el hecho de que pescados, bacon y otros alimentos conservados en salmuera, se estropeaban (68, 90).

El término halófilo significa "amante de la sal" y se aplica a aquellos organismos que requieren mayor concentración de cloruro sódico que la fisiológica para su crecimiento y supervivencia. La observación de que haya microorganismos que resistan la sal y otros que la requieran llevó a Flánnery (68), Ingram (90) y Larssen (113) a intentos para su clasificación.

MacLeod (125) descubrió el halofilismo de las bacterias marinas puesto que muchas si no la mayoría, requerían hasta un 3% de cloruro sódico para crecer y sobrevivir.

Los Halófilos moderados fueron primeramente descritos por Baxter y Gibbons (10) trabajando con bacterias procedentes de alimentos estropeados conservados en salmuera y que eran capaces de crecer a altas concentraciones de sal pero su óptimo de crecimiento no requiere elevadas concentraciones de la misma.

Buchanan y Gibbons (34) reservaron el término halófilo extremo para un grupo de bacterias que crecen a una concentración de sal del 3,5 M (20%) o superior pero cuyos

límites inferiores de requerimiento salino son del 12-15%.

Fue Kushner en 1978 (107, 108) y posteriormente en 1985 (109), basándose en clasificaciones anteriores, quien ha logrado a mi juicio, la hasta ahora más completa clasificación de los microorganismos en base a su respuesta a la sal (ver tabla 3).

TABLA 3: RESPUESTA A LA SAL DE LOS MICROORGANISMOS (KUSHNER, 1978)

Categoría	Reacción	Ejemplos
No halófilos	Mejor crecimiento en medios con menos del 0,2 M de sal	La mayoría de las eubacterias y microorganismos de agua dulce
Halófilos débiles	Mejor crecimiento en medios con 0,2-0,5 M de sal	Muchos microorganismos marinos
Halófilos moderados	Optimo crecimiento en medios con 0,5-2,5 M de sal. Si crecen en medios de 0,2 M se consideran halófilos moderados facultativos	Bacterias y algunas algas
Halófilos extremos débiles	Optimo crecimiento en medios con 1,5-4,0 M de sal	<i>Ectothiorospira halophila</i> <i>Actinopolyspora halophila</i>
Halófilos extremos	Optimo crecimiento en medios con 2,5-5,2 M de sal (saturación)	<i>Halobacterium</i> <i>Halococcus</i>
Halotolerantes	No halofilos que pueden tolerar la sal. Si crecen a más de 2,5 M de sal se consideran halotolerantes extremos	<i>Satphylococcus aureus</i> y otros <i>estafilococcus</i> ; hongos y levaduras halotolerantes

I.9. RELACION DE LAS ENTEROBACTERIAS CON EL HALOFILISMO

En este sentido, existen dos líneas de trabajo diferentes; por un lado su aislamiento en ambientes salinos; por otro, la influencia que la sal ejerce en la actividad, composición y estructura bacteriana.

Aislamiento en ambientes salinos

En principio, el grado de halofilismo está directamente relacionado con la concentración de sal ambiental; por lo tanto, el hábitat natural de las bacterias halófilas extremas y moderadas se encontrará en aguas y suelos con elevada concentración de sal por ejemplo, el Mar Muerto (177), el Lago Assal (33), el Gran Lago Salado (147), salinas de origen marino (155, 156, 149), barrizales y suelos (150, 151). También pueden aislarse de un gran número de alimentos y materiales perecederos a los que se ha añadido sal como conservante (68, 90, 113).

La mayoría de los estudios realizados en ambientes hipersalinos han estado dirigidos al aislamiento de bacterias halófilas moderadas y extremas; muy pocos se han ampliado a la búsqueda de bacterias no halófilas o débilmente halófilas. Así por ejemplo Post (147) en sus trabajos realizados en el Gran Lago Salado presumió que los microorganismos no halófilos, sencillamente no existían. Igualmente Volcani (177) en sus resultados tras estudiar la flora microbiana del Mar Muerto, sólo informa de la existencia de bacterias gram positivas formadoras de esporas como las únicas no halófilas presentes.

En 1963 Henis (84) analiza la microflora presente en suelos salinos próximos al Mar Rojo a diferentes profundidades introduciendo tres variables: pH, conductividad y contenido en sal. La mayor cantidad de microorganismos la obtiene en la superficie, donde la concentración de sal es mayor (25g%). El 90% pertenecen al género *Bacillus*, el resto al género *Micrococcus* y bacilos no esporulados; un 3% flora bacilar gram negativa. Considera que estos microorganismos no son capaces de multiplicarse en estos ecosistemas, se trata de habitantes pasivos posiblemente portados por el viento. A la vista de sus resultados considera cuestionable la presunción ampliamente extendida de que los hábitats

salinos están poblados por microorganismos halófilos.

Diez años más tarde, Brisou (33) estudia la flora de un lago con una concentración de sal superior a la del Mar Muerto (27,65% total de sales) situado en French Somaliland. Todas las bacterias aisladas fueron aerobias y anaerobias facultativas, ninguna anaerobia estricta. De las 164 cepas, 7 eran halófilas extremas, 11 halófilas moderadas, 2 no halófilas y la gran mayoría, 144 cepas, era euryhalinas de los cuales el género *Bacillus* era el más abundante 49,4%, seguido de bacilos gram negativos no esporulados 29,2% y cocos gram positivos 21,3%.

Sierburth (164) analiza la microbiótica del mar y aísla bacterias no halófilas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

En 1982 Quesada y col. (151) analizan e identifican la microbiótica de suelos salinos emplazados en las provincia de Alicante próximos a la costa Mediterránea con una concentración de sal entre 5 y 10,7%, no demasiado elevada si se compara con otros pero con la peculiaridad de mantener plantas vivas. Para ello, emplea medios de aislamiento a concentraciones variables de sal y obtiene 223 aislados, 13 de los cuales pertenecieron al grupo de las Enterobacteriaceae.

Rodríguez - Valera y col. (156) estudian la población microbiana de estanques salados relacionándola con la concentración de sal y algunas variaciones ambientales más notables como pH, temperatura y oxígeno. Los aislados más numerosos se obtuvieron entre un 10 y 15% de sal entre los que se encontraban los grupos *Pseudomonas*, *Alteromonas* y *Alcaligenes* con un 42,6%, seguidos de *Vibrio* con un 33,4%, cocos gram positivos (7,8%), bacilos gram positivos (1,9%) y Enterobacteriaceae con un 2,6%.

Marquez, M.C. y Col (123) analizan desde un punto de vista taxonómico, la población microbiana de unas salinas próximas a Huelva y , de un total de 564 aislados, 154 eran cepas no halófilas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Micrococcus*.

Harker, en 1989 (83) aísla del agua que abastece a una base de la Antártida obtenida por desalinización del agua del mar, coliformes, presumiblemente *E. Coli* aunque en pequeño número.

En la práctica, la búsqueda de Enterobacteriaceae en ambientes salinos se ha dirigido hacia el aislamiento de coliformes fecales en aguas marinas (115, 153) y más especialmente del *Escherichia coli* (5, 81, 115, 122) como indicadores microbiológicos de polución.

Influencia de la salinidad en la composición y estructura de la bacteria

La adaptación osmótica para la vida de las células es un problema por su impermeabilidad a la mayoría de los solutos citoplasmáticos. En un medio de baja osmolaridad, el agua tenderá a entrar dentro de la célula causando un hinchazón; por el contrario, en un medio con elevada osmolaridad, el agua contenida en el interior de la célula tenderá a salir al exterior. Los mamíferos han resuelto este problema desarrollando un sistema para regular la osmolaridad; las bacterias por el contrario, son capaces de crecer en ambientes con un amplio rango de la misma.

La mayoría de los trabajos realizados en función de la influencia que la sal ejerce sobre la composición y estructura de la bacteria se ha polarizado en las bacterias halófilas y halófilas moderadas (82,106,142,143). Se conoce la diferente composición y estructura de la envoltura de las bacterias halófilas (composición lipídica de la membrana y una pared de naturaleza protéica con un exceso de grupos ácidos y desprovista de glicopéptido (107, 108, 109, 113) y los mecanismos por los que estos microorganismos están adaptados a los ambientes hiperosmolares.

Simultáneamente al aislamiento de bacterias no halófilas en ambientes salinos, se inicia una línea de investigación sobre los procesos de adaptación que estas bacterias sufren al encontrarse en ambientes hipo e hiperosmolar.

Fué Kennedy, E.P. en 1982 (101) quién informó de la producción en el espacio periplásmico, de oligosacáridos derivados de la membrana (ODM) en la bacteria *Escherichia coli* cuando se sometía a un ambiente hipoosmolar y, como ésta síntesis está osmóticamente regulada.

Miller (134), siguiendo en esta línea, confirma la producción de ODM en las bacterias gram negativas *Agrobacterium* y *Rhizobium* obtenidas de diferentes ecosistemas; mostrando un énfasis particular en el papel que estos oligosacáridos ejercen en la adaptación osmótica de la bacteria.

Rotering y col. (66) han demostrado que mutantes de *E. coli* carentes de ODM muestran dañada su movilidad y quimiotaxis, menor número de flagelos, menos zonas de adhesión entre las dos membranas y una diferente estructura porosa.

Igualmente Miller (134) demuestra en mutantes de *Agrobacterium* y *Rizobium* carentes de CDM, que tienen afectada su movilidad y disminuida su capacidad infectiva en las plantas.

Simultáneamente a estos trabajos se observa en numerosos organismos, como desarrollan sofisticados mecanismos para vivir en un ambiente deficiente en agua aprovechable o lo que es lo mismo, en un ambiente hiperosmolar para evitar su deshidratación y lo hacen captando moléculas que equilibren el balance osmótico tales como : L-prolina, el compuesto glicina-betaina (145), dimetiletil (38) actuando por un mecanismo de transporte activo y específico siendo regulado a su vez, por la fuerza osmótica del medio.

Munro, P.M. y col. (137) demuestran cambios metabólicos en bacterias sometidas a elevadas concentraciones de sal y cómo influyen las condiciones fisicoquímicas y edad de las bacterias previas, a una posterior adaptación a ambientes salinos (69) .

Kennedy, E.P. (101) propuso la presencia de proteínas sensoras de la osmolaridad, presumiblemente localizadas en la membrana interna de la bacteria y que jugaban un papel en la regulación de los ODM.

Ramakrishnan, G. (152) en 1985 demuestra que proteínas de la membrana del *E. coli* provocan la expresión de genes como respuesta a cambios en la osmolaridad del medio de crecimiento.

Jovanovich, S.B. (93) en 1988 estudia los efectos de la expresión de genes osmorreguladores, en un ambiente hiperosmolar, activándose los mecanismos de transporte de L-prolina, glicina-betaina y de potasio.

Munro y col. (137) en 1989 empleando mutantes de *E. coli* faltos de componentes para una respuesta ante un stress osmótico, analizan la influencia que los mecanismos de captación de metabolitos osmorreguladores tienen sobre la supervivencia del *E. coli* en aguas marinas. Demuestran como al menos en parte, dicha supervivencia depende de que la bacteria posea ciertos genes capaces de regular la presión osmótica y cuya estimulación (por medio de nutrientes) se realice antes o después de su liberación al ambiente marino (69).

Por tanto, en los mecanismos fundamentales por los que la célula reconoce y responde a los cambios en la osmolaridad de su ambiente extracelular, están implicadas proteínas osmosensoras localizadas en las membranas de las bacterias que provocan a su vez la expresión de genes como reguladores de la osmolaridad.

II. - OBJETIVOS

En relación a lo anteriormente expuesto, es opinión generalizada dentro de los clínicos que las Enterobacteriaceae se conocen bien, son fáciles de aislar e identificar.

Llama poderosamente la atención, que hasta el momento, un grupo tan bien conocido como este, no haya sido estudiada su tolerancia a la sal. El Manual de Bergey (24) define a la familia como NO HALOFILA. La Sociedad Americana de Microbiología (119) en su cuarta edición del Manual de Clínica Microbiológica matiza algo más especificando que "NO REQUIEREN, NI SU DESARROLLO SE ACRECIENTA CON EL CLORURO SODICO".

De todos los géneros pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, *Serratia* (75,76), *Cedecea* (77) y *Yersinia* (24) son los únicos de los que se tienen referencias científicas de haber sido ensayados frente al cloruro sódico.

Partiendo de las anteriores consideraciones y de ensayos preliminares, se plantea como principal aspecto, el investigar el comportamiento de las Enterobacteriaceae a diferentes concentraciones de sal.

De un análisis correcto de los resultados se deducirán:

- A. - Si hay o no criterios homogéneos de grupo
- B. - Si pueden obtenerse aplicaciones prácticas tales como:
 - Pruebas bioquímicas en la caracterización a nivel de género y/o especie
 - Medios de cultivo para aislamientos selectivos
 - Influencia de la salinidad como inductor de propiedades metabólicas

III. - MATERIAL Y METODO

III.1. CEPAS DE TRABAJO

Se han estudiado 254 cepas de las cuales 44 fueron de referencia y 210 aisladas de muestras clínicas.

Cepas de referencia

Se emplearon 44 cepas de referencia procedentes de distintas colecciones, la mayoría canalizadas a través de la Colección Española de Cultivos Tipo excepto 5 cepas remitidas directamente de la ATCC y 4 cepas cedidas por el Dpto. de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Granada. En la tabla 4 expongo la relación de las cepas de referencia empleadas.

TABLA 4: CEPAS DE REFERENCIA

NUMERO	CEPA	PROCEDENCIA
842	<i>Cedecea davisae</i>	CECT
855	<i>Cedecea neteri</i>	CECT
401	<i>Citrobacter freundii</i>	CECT
856	<i>Citrobacter diversus</i>	CECT
863	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	CECT
849	<i>Edwardsiella tarda</i>	CECT
194	<i>Enterobacter cloacae</i>	CECT
684	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CECT
857	<i>Enterobacter gergoviae</i>	CECT
850	<i>Enterobacter agglomerans</i>	CECT
515	<i>Escherichia coli</i>	CECT
859	<i>Ewingella americana</i>	CECT
158	<i>Hafnia alvei</i>	CECT
860	<i>Klebsiella pneumoniae</i> var. <i>pneumoniae</i>	CECT
143	<i>Klebsiella oxytoca</i>	CECT
851	<i>K. pneumoniae</i> var. <i>ozaenae</i>	CECT
852	<i>K. pneumoniae</i> var. <i>rhinoscleromatis</i>	CECT
843	<i>Klebsiella planticola</i>	CECT
861	<i>Kluyvera ascorbata</i>	CECT
862	<i>Kluyvera cryocrecens</i>	CECT
173	<i>Morganella morganii</i>	ATCC
29906	<i>Proteus mirabilis</i>	CECT
484	<i>Proteus vulgaris</i>	CECT
864	<i>Proteus penneri</i>	CECT
866	<i>Providencia stuartii</i>	CECT
865	<i>Providencia rettgeri</i>	CECT
166	<i>Providencia alcalifaciens</i>	CECT
409	<i>Salmonella</i> ser. <i>typhi</i>	ATCC
13076	<i>Salmonella</i> ser. <i>enteritidis</i>	CECT
443	<i>Salmonella</i> ser. <i>typhimurium</i>	CECT

NUMERO	CEPA	PROCEDENCIA
915	<i>Salmonella ser. choleraesuis</i>	CECT
846	<i>Serratia marcescens</i>	CECT
483	<i>Serratia licuefaciens</i>	CECT
867	<i>Serratia odorifera</i>	CECT
868	<i>Serratia rubidaea</i>	CECT
853	<i>Shigella dysenteriae</i>	CECT
29903	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC
8700	<i>Shigella boydii</i>	ATCC
29930	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC
869	<i>Tatumella ptyseos</i>	CECT
7057	<i>Yersinia enterocolitica</i>	F.F. GRANADA
103	<i>Yersinia kristensenii</i>	F.F. GRANADA
7836	<i>Yersinia intermedia</i>	F.F. GRANADA
7723	<i>Yersinia frederiksenii</i>	F.F. GRANADA

Cepas aisladas

210 cepas cuyo origen fueron muestras clínicas remitidas al Laboratorio de Microbiología del Hospital Infanta Margarita de Cabra (Córdoba) repartidas entre los géneros siguientes: (ver tabla 5).

TABLA 5: CEPAS AISLADAS

GENEROS	Nº DE CEPAS
<i>Citrobacter</i>	12
<i>Edwardsiella</i>	1
<i>Enterobacter</i>	24
<i>Escherichia</i>	23
<i>Hafnia</i>	4
<i>Klebsiella</i>	21
<i>Morganella</i>	10
<i>Proteus</i>	30
<i>Providencia</i>	5
<i>Salmonella</i>	30
<i>Serratia</i>	22
<i>Shigella</i>	7
<i>Tatumella</i>	2
<i>Yersinia</i>	19

III.2. MEDIOS DE AISLAMIENTO

Como medio de aislamiento primario empleé el agar McConkey (OXOID CM7) y los medios selectivos agar SS (OXOID cm99) y agar Yersinia selectivo (OXOID CM653) suplementado con cefsulodina, novobiocina e Irgasán (OXOID SR 109).

III.3. IDENTIFICACION

Empleé dos sistemas de identificación bioquímica, uno manual SPECTRUM-10 y otro automático, AUTOSCAM.

SPECTRUM-10

Consiste en dos cubetas de poliestireno, cada una con 10 pocillos que contienen sustratos deshidratados. Dichos sustratos son reconstituidos cuando se inoculan con una suspensión del microorganismo en estudio en agua destilada esteril. Tras la inoculación, los microtubos correspondientes a las pruebas Arginina, Lisina, Ornitina, SH₂ y Urea, se cubren con aceite mineral. Tras una incubación de 18-24 horas a 35-37°C, se añaden reactivos para detectar desaminación de triptófano, indol y acetoina. Los resultados de las pruebas se convierten en un perfil de 7 dígitos utilizando el sistema octal de codificación. La identificación se realiza a través del Índice de Perfiles Analíticos mediante el uso del diagrama diferencial.

AUTOSCAM

Se basa en el empleo de un instrumento controlado por computadora para la lectura automática e interpretación de los paneles los cuales se presentan en placas. Los sustratos liofilizados se disponen en 18 pocillos destinados a la identificación bacteriana, disponibles separadamente o en combinación con paneles MIC. Tras la inoculación manual con una tapa de transferencia de 95 µas, con incubación de 18-24 horas a 35-37°. los paneles se insertan en el lector Autoscam que examina espectrofotométricamente todas las concavidades simultáneamente a seis diferentes longitudes de onda. El análisis e impresión de datos de las identificaciones más factibles con sus respectivos porcentajes de probabilidad, se lleva a cabo automáticamente.

III.4. CAPACIDAD DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE SAL

Se empleo como medio de cultivo CLED agar (Difco ref 0971-01-4) debido a que es un medio electrolíticamente deficiente y en el que crecen bien las Enterobacteriaceae. Su composición está reflejada en la tabla 6. Al medio se le añadía cloruro sódico en concentraciones seriadas de 0 hasta 10g%.

TABLA 6: COMPOSICION CLED AGAR (g/litro)

EXTRACTO DE CARNE	3
PEPTONA	4
TRIPTONA	4
L-CISTEINA	0,128
LACTOSA	10
AGAR	15
AZUL DE BROMOTIMOL	0,02

Las cepas se inoculan en cada serie de placas. Se incubaban guardadas en bolsas de plástico a 35°C durante 4 días.

Se interpretó la prueba como positiva (+) cuando hay un crecimiento visible a todo lo largo de la siembra; crecimiento variable (d) cuando hay una clara disminución del mismo y negativo(-) si hay ausencia total de crecimiento.

IV. - RESULTADOS

Los resultados obtenidos con las diferentes cepas ensayadas quedan reflejados en las tablas 7 a 24 y, de un modo gráfico, en sus histogramas correspondientes.

1981 **IV.1. GENERO CEDECEA.** Grimont Grimont, Farmer y Asbury

TABLA 7: CRECIMIENTO DEL GENERO CEDECEA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%
CT 842 C. davisae	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	
CT 855 C. neteri	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	

NOTA: el género **Cedecea** fue propuesto en 1980 y formalmente publicado en 1981 (77). Actualmente hay cinco especies en base a propiedades fenotípicas diferentes y test de hibridación de ADN.

Se han ensayado dos cepas de referencia correspondientes a las especies **C. davisae** y **C. neteri**. El crecimiento de ambas fue óptimo hasta el 6% de cloruro sódico. A 7 g% crecieron marcadamente inhibidas, por encima del cual, su crecimiento fue negativo. Ver figura 2.

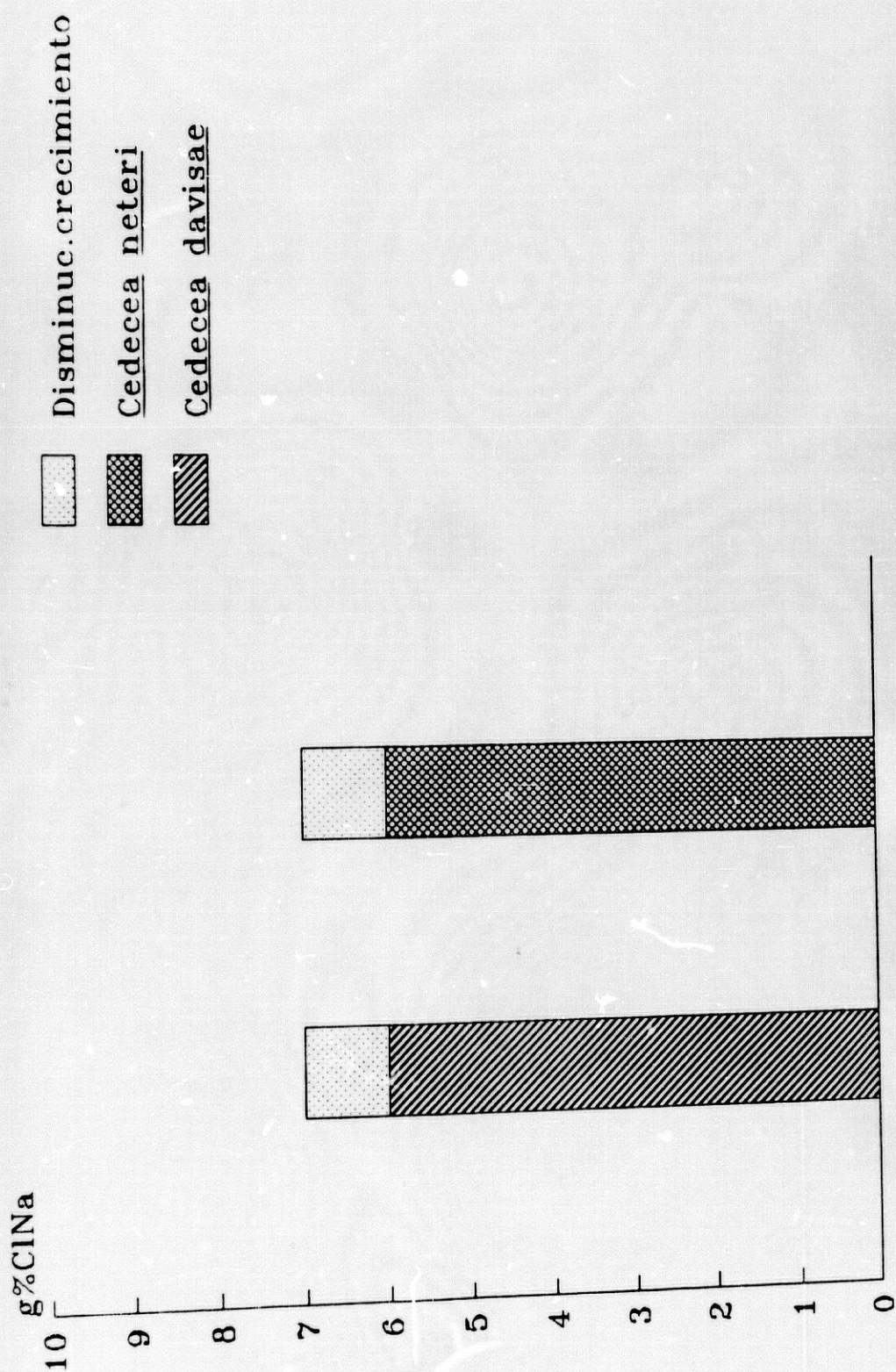


Fig. 2.- Tolerancia del G. CEDECEA al cloruro sodico

IV. GENERO CITROBACTER. Werkman y Gillen 1932

TABLA 8: CRECIMIENTO DEL GENERO CITROBACTER A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 %
CT 401	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
CT 856	<i>C. diversus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
CT 863	<i>C. amalonáticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
C ₁	<i>C. diversus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
C ₂	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
C ₃	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
C ₄	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
C ₅	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
C ₆	<i>C. diversus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
C ₇	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
C ₈	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
C ₉	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
C ₁₀	<i>C. freundii</i>	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
C ₁₁	<i>C. diversus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
C ₁₂	<i>C. amalonáticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

NOTA: En 1977 Brenner y col (30) propusieron que el organismo originariamente llamado *Levinea amalonáticus* pasara al género *Citrobacter* en base a pruebas de hibridación de ADN y contenido G + C. El género *Citrobacter* quedó así con tres especies: *C. freundii*, *C. diversus* y *C. amalonáticus* con un biogrupo dentro de esta última.

Se ensayaron 12 cepas de especies *Citrobacter* y tres de referencia correspondientes a las Cepas tipo. Como es observable en la figura 3, las especies *C. diversus* y *C. amalonáticus* soportan concentraciones de cloruro sódico ligeramente superiores a la especie *C. freundii*, concretamente 8 y 7% respectivamente.

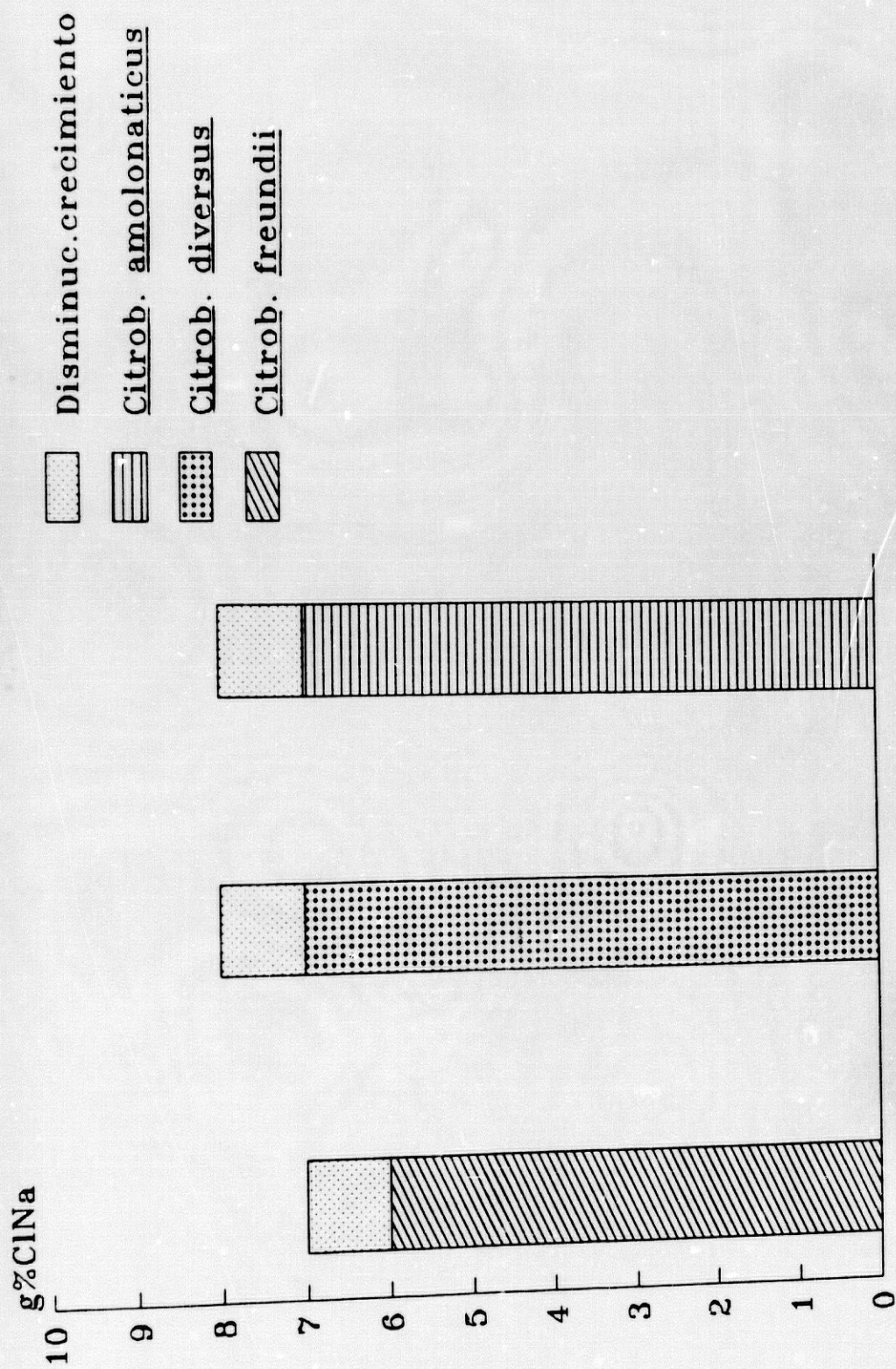


Fig. 3.- Tolerancia del G. CITROBACTER al cloruro sodico

GENERO EDWARDSIELLA Ewing y McWhorter 1965

TABLA 9: CRECIMIENTO DEL G. EDWARDSIELLA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

	g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CT 849 <i>Edwardsiella tarda</i>		+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-
E1 <i>Edwardsiella tarda</i>		+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: hasta 1981 la única especie descrita era la *E. tarda* (57), clinicamente significativa como agente causante de infecciones humanas extraintestinales. Actualmente se han descrito dos nuevas especies pero ninguna se ha visto involucrada en infecciones humanas.

Su tolerancia a la sal, como se observa en la figura 4 es muy baja, en CLED como medio base, apenas soporta concentraciones de 3g% de cloruro sódico.

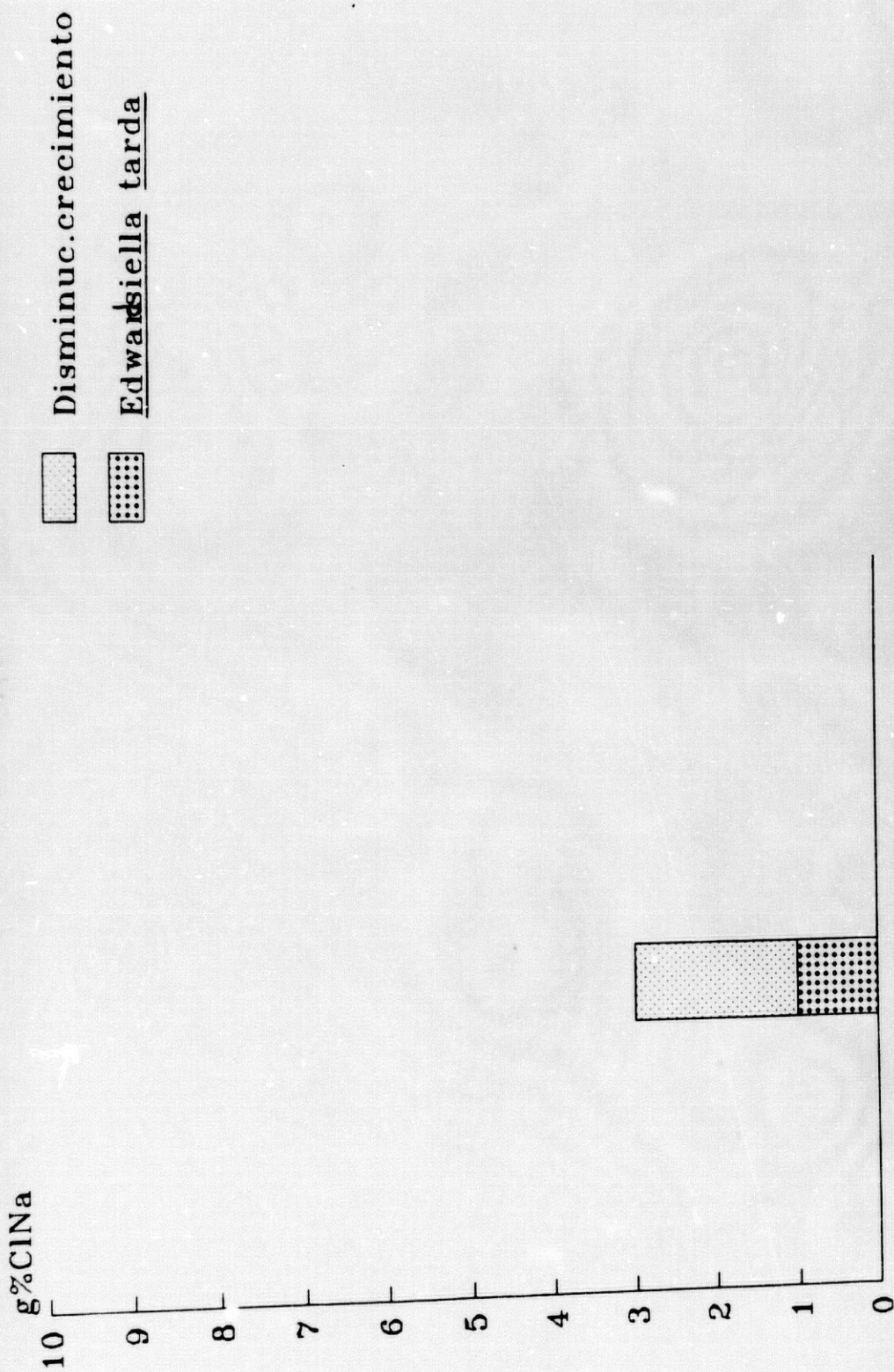


Fig. 4.- Tolerancia del G. EDWARDSIELLA al cloruro sodico

GENERO ENTEROBACTER Ewing y McWhorter 1965

TABLA 10: COMPORTAMIENTO DEL G. ENTEROBACTER A
DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CT 194	Enterobacter cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
CT 684	Enterobacter aerogenes		+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-
CT 857	Enterobacter gergoviae		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CT 858	Enterobacter sakazakii		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
CT 850	Enterobacter agglomerans		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₂	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₃	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₄	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-
E ₅	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-
E ₆	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₇	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₈	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-
E ₉	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-
E ₁₀	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₁	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₂	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
E ₁₃	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₄	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₅	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₆	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₇	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₈	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₁₉	E. aerógenes		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₂₀	E. cloacae		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₂₁	E. agglomerans		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₂₂	E. agglomerans		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₂₃	E. agglomerans		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
E ₂₄	E. agglomerans		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-

NOTA: En la 3ª Edición de Manual sobre Identificación de Enterobacteriaceae de Edward y Ewing (39) reconocían cuatro especies en el género **Enterobacter**: **E. cloacae**, **E. aerógenes**, **E. hafniae**, y **E. licuefaciens**: estas dos últimas pertenecen actualmente a otros dos géneros: **Hafnia** y **Serratia** respectivamente. Hasta la fecha se reconocen 8 especies

del género *Enterobacter* de las cuales 5 se describen clínicamente significativas en infecciones humanas: *E. cloacae*, *E. aerógenes*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii* y *E. agglomerans*; ésta última redefinida por Ewing y Fife (53) como cepas negativas a la triple decarboxilación de aminoácidos y pigmentación amarilla.

Se ensayaron 24 cepas y cinco de referencia. Como se observa en la figura 5, todas las especies toleraron concentración de 8g% de cloruro sódico con gran homogeneidad.

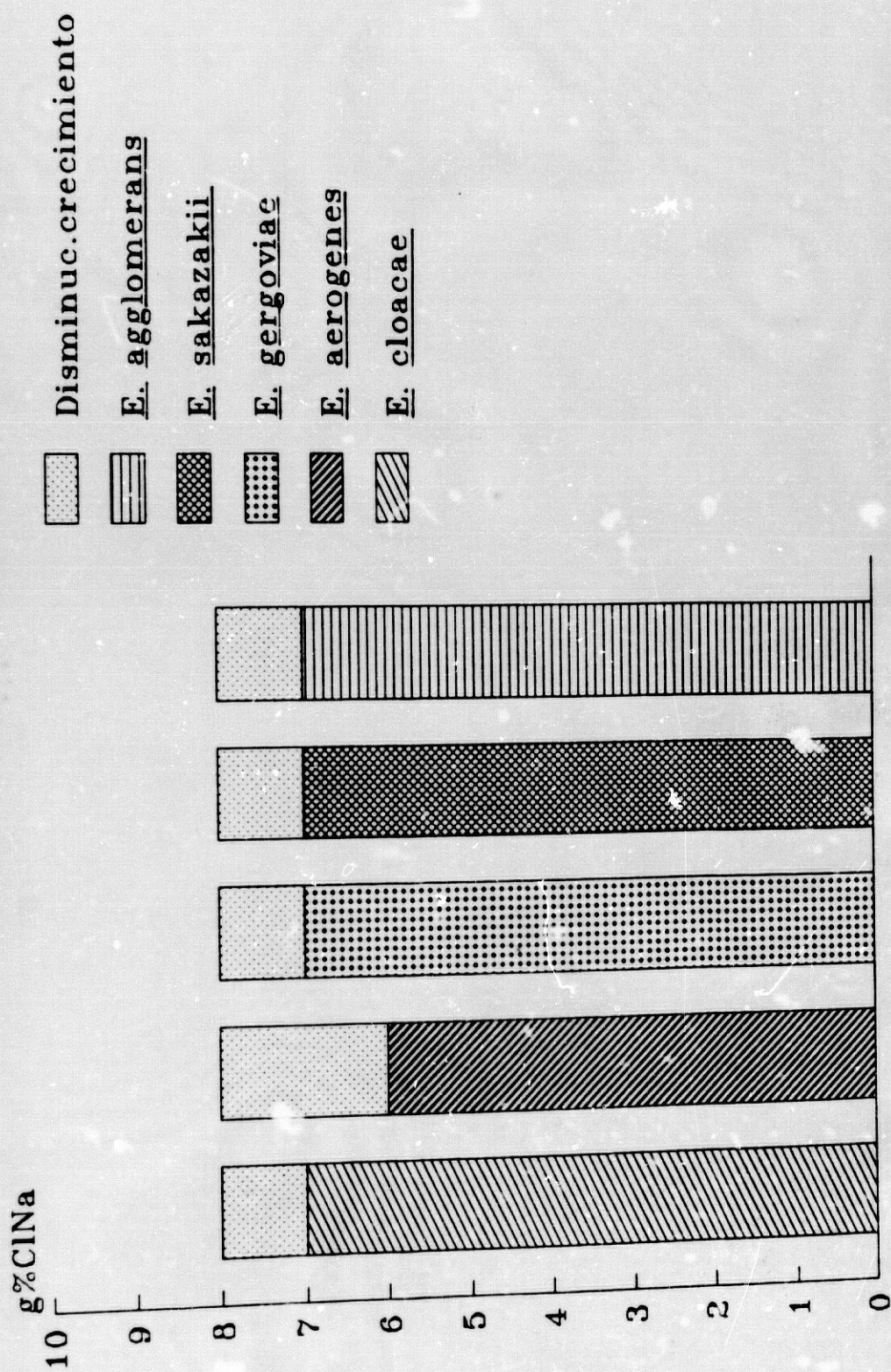


Fig. 5.- Tolerancia del *G. ENTEROBACTER* al cloruro sodico

GENERO ESCHERICHIA Castellani y Chalmers 1919

TABLA 11: COMPORTAMIENTO DEL G. ESCHERICHIA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

		g% Cl Na										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CT 515	<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₁	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₂	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₃	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₄	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₅	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₆	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₇	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₈	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₉	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₁₀	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₁₁	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₁₂	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
E ₁₃	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
E ₁₄	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₁₅	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₁₆	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₁₇	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
E ₁₈	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₁₉	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₂₀	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
E ₂₁	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₂₂	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
E ₂₃	- <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

NOTA: Es el género tipo de la familia y *E. coli*, la especie tipo siendo el organismo más estudiado y que ha sufrido mayor número de investigaciones. En base a estudios de hibridación de ADN, Brenner y col (28) formularon que las cuatro especies *Shigellas* y el género *Escherichia* están estrechamente emparentadas en más de un 80% y desde un punto de vista taxonómico deberían constituir una única especie con 5 subgrupos. Tan sólo se mantienen como dos

géneros separados por razones históricas y la profusión de su denominación dentro de la Microbiología Médica.

El género incluye además 4 especies de las cuales 3 estaban definidas por los **grupos entéricos 41, 11 y 1** en base a análisis de hibridación de ADN y propiedades fenotípicas se han clasificado dentro del género **Escherichia** con las denominaciones: **E. adecarboxylata, E. hermanii** y **E. vulneris** respectivamente pero aun se necesitan estudios adicionales para asegurar su posición. Una cuarta especie **E. blattae** ha sido aislada del intestino de cucarachas (28).

Se ensayaron 23 cepas de **E. coli** y su cepa de referencia. Como se observa en la figura 6, posee una tolerancia de hasta 7% de cloruro sódico.

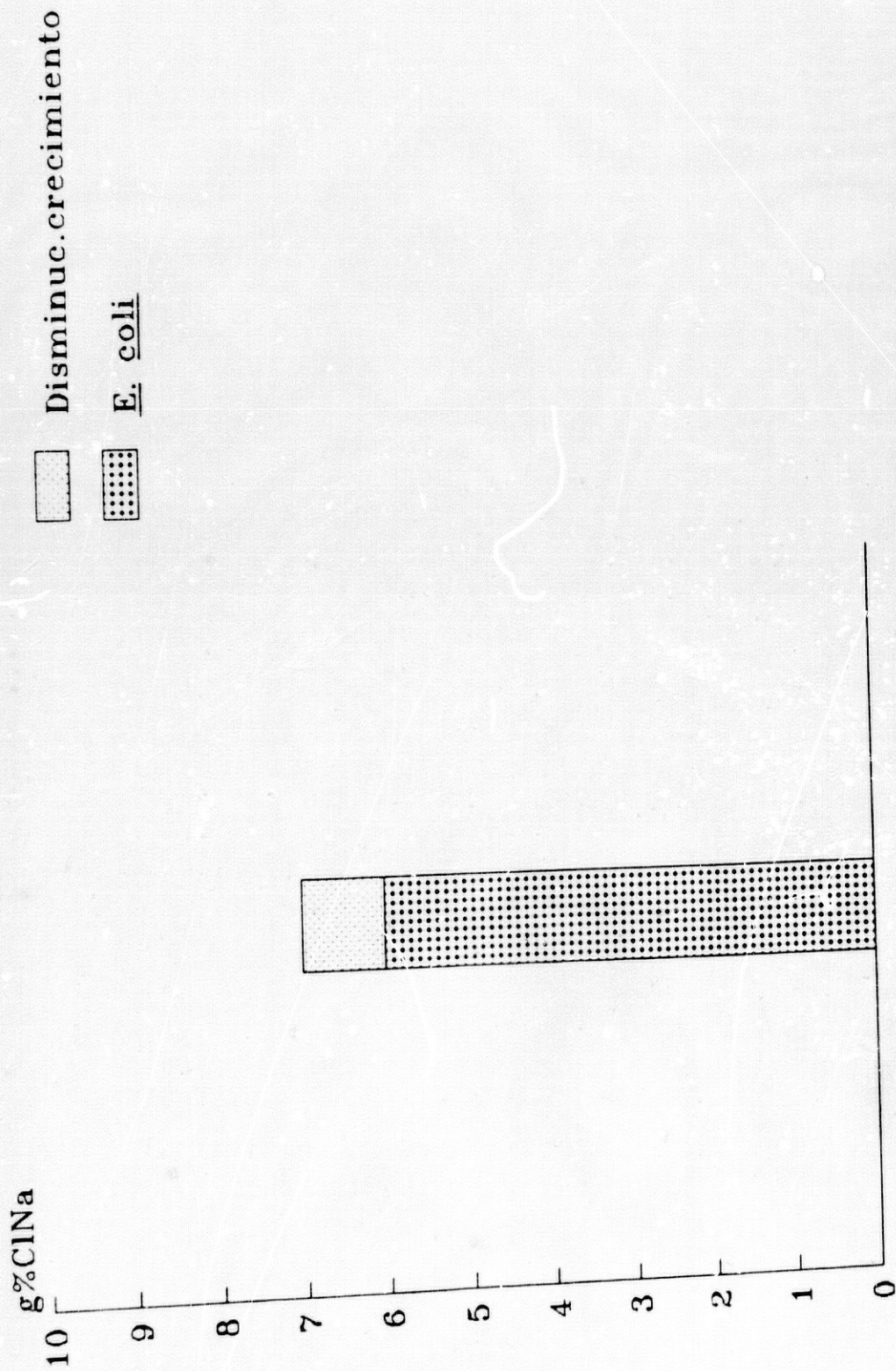


Fig. 6.- Tolerancia del G. ESCHERICHIA al cloruro sodico

GENERO EWINGELLA Grimont y col. 1983

TABLA 12: COMPORTAMIENTO DEL G. EWINGELLA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CT 859 <i>Ewingella americana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-

NOTA: Es un nuevo género recientemente propuesto por Grimont y col. (74) para un grupo de organismos que previamente se conocían como **Grupo Entérico 40** y que en base a estudios de hibridación de ADN, tan sólo presentaban un parentesco del 21% con otras especies de Enterobacteriaceae. Tan sólo hay descrita una especie: **E. americana**. Fenotípicamente es muy similar al **Enterobacter agglomerans**, es negativa a la decarboxilación de los tres aminoácidos. No posee pigmentación amarilla.

Como se observa en la figura 7, presenta una tolerancia al cloruro sódico de 8 g%.

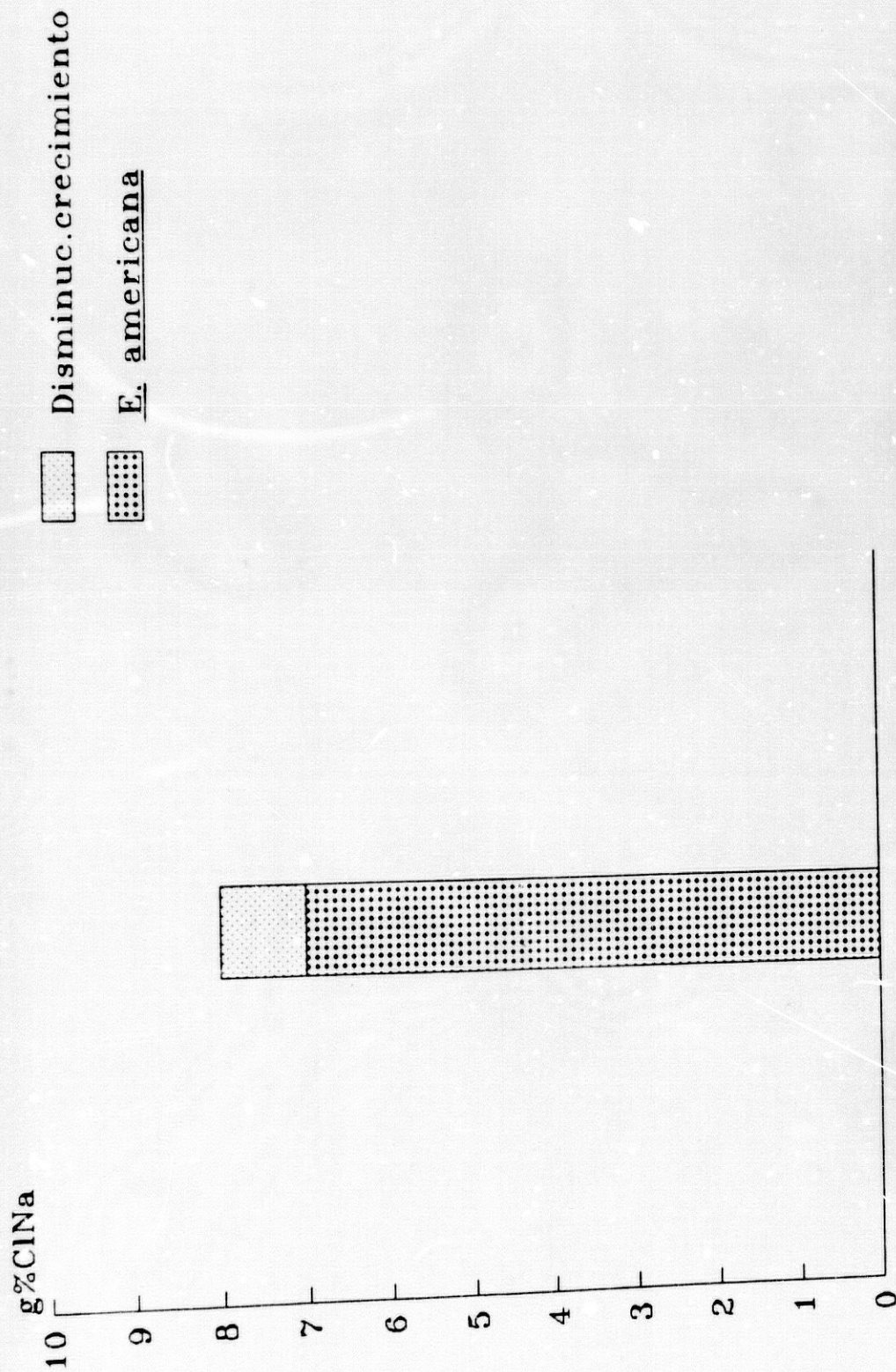


Fig. 7.- Tolerancia del G. EWINGELLA al cloruro sodico

GENERO HAFNIA Moller 1954

TABLA 13: CRECIMIENTO DEL G. HAFNIA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CT 158	Hafnia alvei		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
	H ₁ H.alvei		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
	H ₂ H.alvei		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
	H ₃ H.alvei		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
	H ₄ H.alvei		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-

NOTA: La bacteria **Hafnia** ha sido descrita bajo distintos nombres. Estudios de taxonomía numérica (71) indicaban que debía mantener una posición separada del género **Enterobacter** al que estaba incluido. Posteriormente, estudios de hibridación de ADN (172) confirmaron esta decisión mostrando que solamente un 11-26% guardaba parentesco con cepas de **Enterobacter** y **Klebsiella**. Se conoce una única especie **H. alvei** y 1 biogrupo.

Se ensayaron 4 cepas de **Hafnia** y la cepa de referencia CT 158; todas tuvieron una tolerancia máxima del 5% de cloruro sódico.

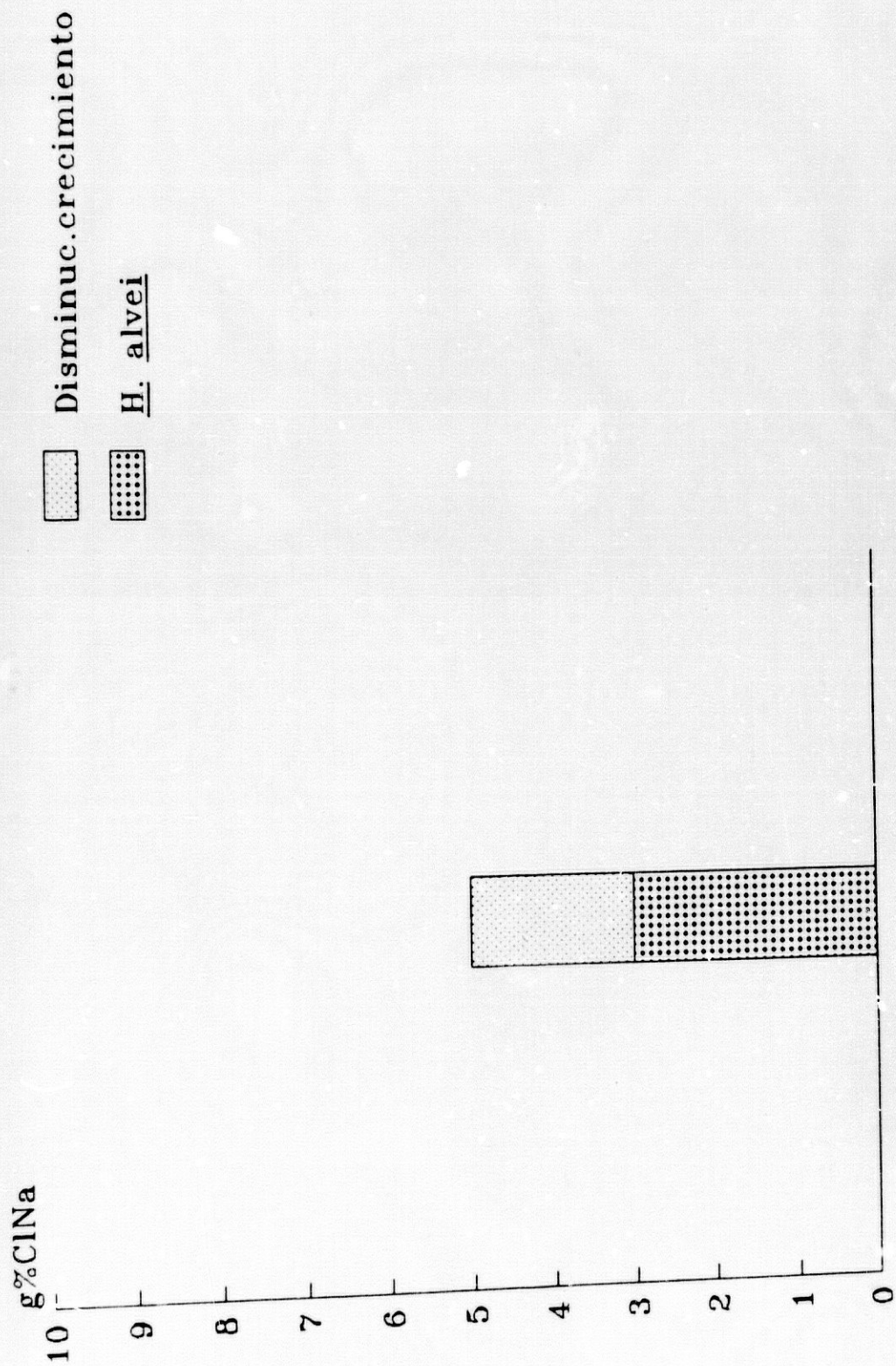


Fig. 8.- Tolerancia del G. HAFNIA al cloruro sodico

GENERO KLEBSIELLA Trevisan 1885

TABLA 14: COMPORTAMIENTO DEL G. KLEBSIELLA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CT 860	<i>Klebsiella oxytoca</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
CT 143	<i>Klebsiella pneumoniae</i>												
	subsp. <i>pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
CT 851	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozonae</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
CT 852	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
CT 843	<i>K. planticola</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
	K ₁ - <i>K. oxytoca</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
	K ₂ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	K ₃ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₄ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₅ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₆ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	K ₇ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₈ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	K ₉ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₁₀ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₁₁ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	K ₁₂ - <i>K. oxytoca</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-
	K ₁₃ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₁₄ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	K ₁₅ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	K ₁₆ - <i>K. oxytoca</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
	K ₁₇ - <i>K. pn</i> subsp. <i>ozaenae</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
	K ₁₈ - <i>K. oxytoca</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
	K ₁₉ - <i>K. pn</i> subsp. <i>ozaneae</i>		+	+	+	+	+	d	d	-	-	-	-
	K ₂₀ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	K ₂₁ - <i>K. pneumoniae</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

NOTA: Hasta época reciente el género *Klebsiella* se consideró poco complicado, compuesto por especies ubicuas de *K. pneumoniae* y dos especies raras, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*. Estudios de hibridación de ADN (32) mostraron que al menos las

dos últimas, no eran especies verdaderas sino cepas bioquímicamente inactivas de *K. pneumoniae*. En el Manual de Bergey nos la encontramos como subespecies de *K. pneumoniae*. *K. oxytoca* se describe como especie separada y de más reciente introducción, *K. planticola*, *K. terrigena* y *K. grupo trevisanii*.

El género tiene en cuanto a su tolerancia al cloruro sódico, una respuesta desigual: *K. oxytoca* es la más resistente a la sal (8%) mientras que *K. planticola* y las subespecies *K. rhinoscleromatis* y *K. ozaenae* las menos resistentes (6%). (ver figura 9)

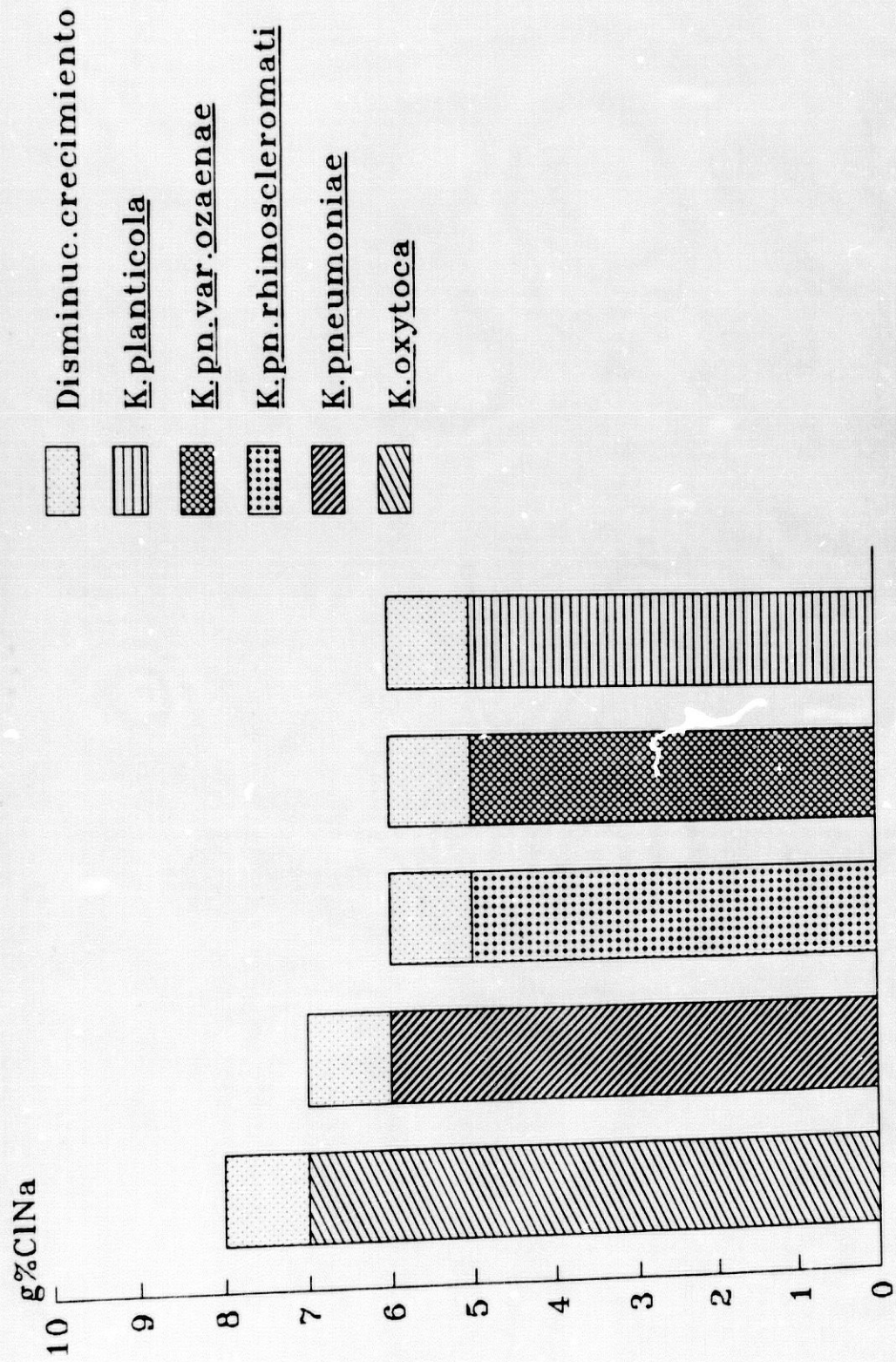


Fig. 9.- Tolerancia del G. KLEBSIELLA al cloruro sodico

GENERO KLUYVERA Farmer, Fanning, Hunthley-Carter, Holmes, Hickman, Richard y Brenner 1981

TABLA 15: COMPORTAMINETO DEL G. KLUYVERA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

	g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CT 861 Kluyvera ascorbata		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
CT 862 kluyvera criocrecens		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-

NOTA: **Kluyvera** es un género con una historia turbulenta. En 1956 fue descrito por Asai (4) con dos especies **K. citrophila** y **K. noncitrophila** sin embargo no fue considerado como tal y no apareció en las Listas Aprobadas de Nombres de Bacterias (165). En 1981 fue propuesto por Farmer y col (62) con dos especies **K. ascorbata** y **K. criocrecens**. Se aísla de especímenes clínicos pero su significación clínica está aun por determinar.

Como se muestra en la figura 10, **K. criocrecens** tolera concentraciones ligeramente superiores (7%) de cloruro sódico que **K. ascorbata** (6%).

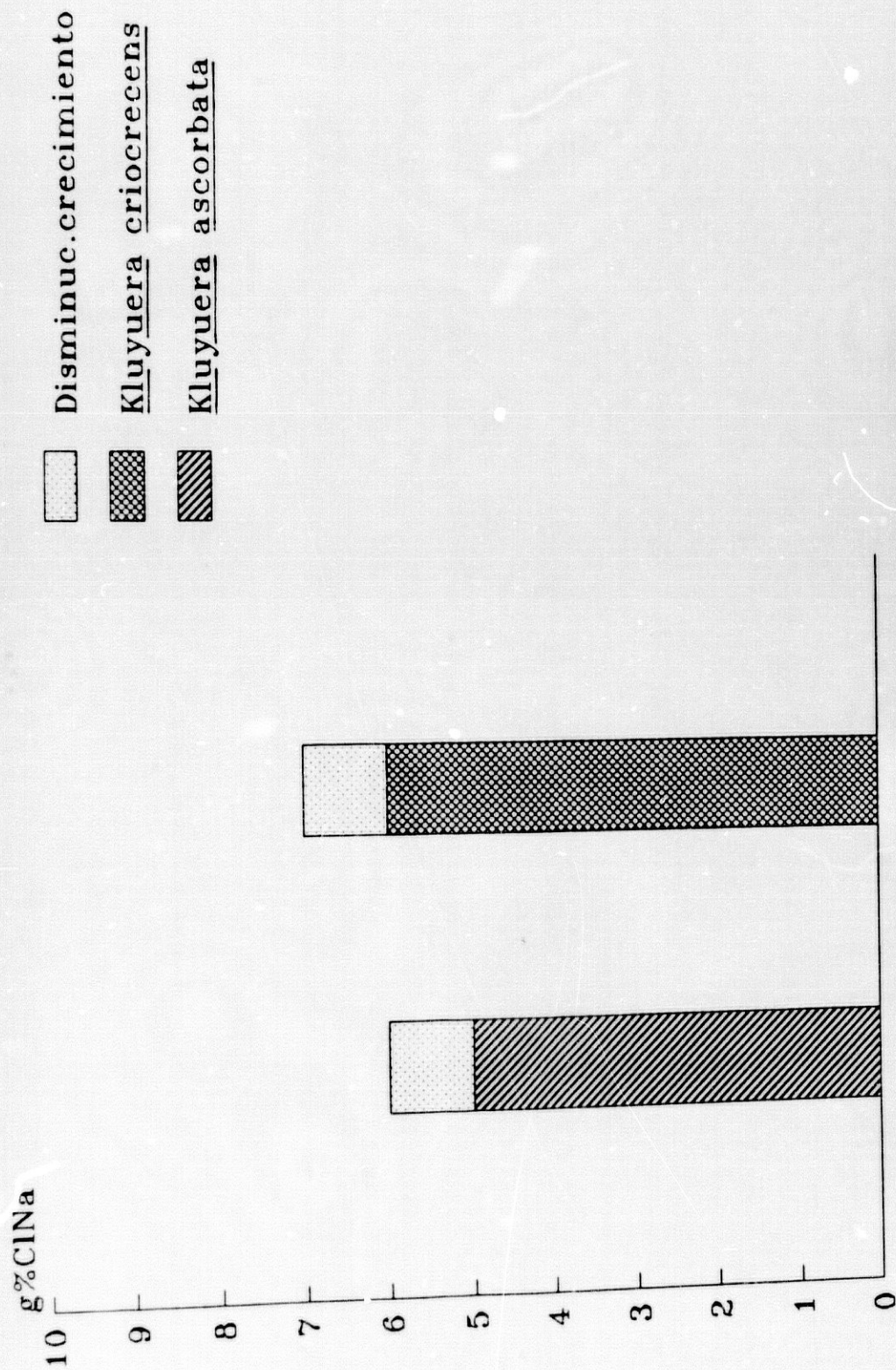


Fig. 10.- Tolerancia del G. KLUYUERA al cloruro sodico

GENERO MORGANELLA

TABLA 16: COMPORTAMIENTO DEL G. MORGANELLA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SODICO

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CT 173	<i>Morganella morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₁ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₂ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₃ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₄ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₅ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₆ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₇ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₈ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₉ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	M ₁₀ <i>M. morganii</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-

NOTA: *Morganella morganii* es el nombre empleado para definir al organismo que anteriormente se conocía como *Proteus morganii*. Se situó como género aparte en base a su contenido G + C, test de hibridación de ADN (29) y pruebas bioquímicas.

Se ensayaron 10 cepas de *M. morganii* con su correspondiente cepa tipo. El resultado de todas ellas fue muy homogéneo aceptando una concentración máxima de 7g% de cloruro sódico. (ver figura 11).



Fig. 11.- Tolerancia del G. MORGANELLA al cloruro sodico

GENERO PFOTEUS Hanser 1885

TABLA 17: COMPORTAMIENTO DEL G. PROTEUS A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ATCC 29906	<i>Proteus mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
CT 484	<i>Proteus vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
CT 864	<i>Proteus penneri</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-
	P ₁ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₂ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₃ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₄ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₅ - <i>P. penneri</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
	P ₆ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₇ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	P ₈ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	P ₉ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₁₀ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d
	P ₁₁ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₁₂ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
	P ₁₃ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₁₄ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₁₅ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₁₆ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₁₇ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d
	P ₁₈ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₁₉ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₂₀ - <i>P. vulgaris</i>			+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₂₁ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	P ₂₂ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₂₃ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
	P ₂₄ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
	P ₂₅ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	P ₂₆ - <i>P. vulgaris</i>		+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
	P ₂₇ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₂₈ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₂₉ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
	P ₃₀ - <i>P. mirabilis</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d

NOTA: *Proteus mirabilis* y *P. vulgaris* son dos especies bien conocidas del género *Proteus* (40). De más reciente introducción, están las especies *P. penneri* (87) y *P. myxofaciens*, ésta

última aislada de polillas y nunca de especímenes clínicos. En el Manual de Bergey (24) no aparece reseñada la especie *P. penneri* debido a que fue publicada con posterioridad al capítulo del género *Proteus* y corresponde al biogrupo 1 de *P. vulgaris*, indol, salicin y esculin negativos y resistente al cloranfenicol.

Se ensayaron las tres cepas tipo correspondientes a las especies implicadas clínicamente y 30 cepas aisladas de muestras clínicas. Como se observa en la figura 12 las tres especies muestran una tolerancia diferente a la sal: *P. mirabilis* soporta concentraciones de hasta 10 g% de cloruro sódico, *P. penneri* hasta 8 g% y *Proteus vulgaris* hasta 6-7 g%.

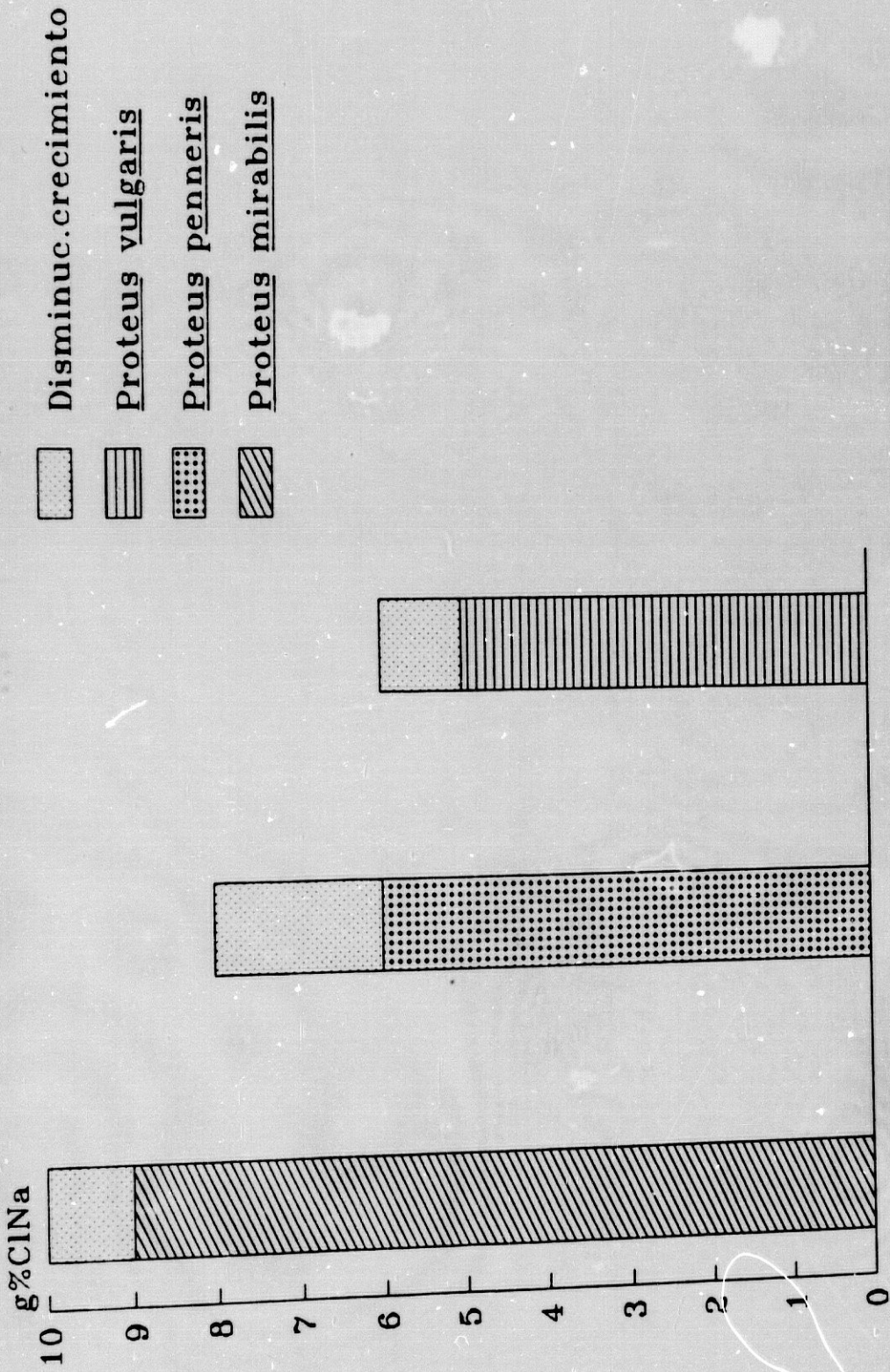


Fig. 12.- Tolerancia del *G. PROTEUS* al cloruro sodico

El género **Proteus**, en un medio sólido, forma unas colonias que se expanden por la superficie del medio como una membrana; es lo que se conoce con el nombre carácter invasor.

Se ha ensayado la inducción/inhibición de esta propiedad típica del género en función de la concentración de cloruro sódico. Para ello, empleando el mismo medio de CLED agar electrolíticamente deficitario, añadimos cloruro sódico en cantidad tal que nos quede una concentración final de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 g/100 ml de medio. Ensayamos 15 cepas y los resultados están expresados en la tabla 18.

TABLA 18: RESPUESTA DEL CARACTER INVASOR DEL G. PROTEUS A LA SAL

		0	0,5	1	2	3	4	5 g%	Cl	Na
P ₁	P. mirabilis	+	++	+	+	-	-	-		
P ₂	P. mirabilis	+	++	+	+	d	-	-		
P ₃	P. mirabilis	d	++	+	+	d	d	-		
P ₄	P. mirabilis	d	++	+	d	-	-	-		
P ₅	P. penneri	+	++	+	d	-	-	-		
P ₆	P. mirabilis	d	+	+	d	d	-	-		
P ₇	P. vulgaris	+	+	+	d	-	-	-		
P ₈	P. vulgaris	+	+	+	d	-	-	-		
P ₉	P. mirabilis	+	++	+	+	d	d	-		
P ₁₀	P. mirabilis	+	++	+	+	d	d	-		
P ₁₁	P. mirabilis	+	++	+	+	+	d	-		
P ₁₂	P. vulgaris	+	+	d	-	-	-	-		
P ₁₃	P. mirabilis	+	++	+	+	+	-	-		
P ₁₄	P. mirabilis	+	++	+	+	d	-	-		
P ₁₅	P. mirabilis	+	++	+	+	+	-	-		

Símbolos: + carácter invasor
 d carácter invasor débil
 - ausencia de carácter invasor

El carácter invasor se estimula con pequeñas cantidades de cloruro sódico, con un máximo entre 0,5 y 1 g% y es inhibido si seguimos aumentando la concentración de sal hasta 3 y 4 g%

GENERO PROVIDENCIA Ewing 1962

TABLA 19: COMPORTAMIENTO DEL G. PROVIDENCIA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Cl Na

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				---	---	---	---	---	---	---	---	---	
CT 866	<i>Providencia stewartii</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
CT865	<i>Providencia rettgeri</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
CT 166	<i>Providencia alcalifaciens</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	P ₁ <i>P. alcalifaciens</i>		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
	P ₂ <i>P. stewartii</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
	P ₃ <i>P. stewartii</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
	P ₄ <i>P. stewartii</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
	P ₅ <i>P. rettgeri</i>		+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-

NOTA: Los cambios realizados en la clasificación de los miembros de la hasta entonces tribu Proteae en el Manual de Bergey, han llevado a la creación del género *Providencia* con 3 especies y recientemente una cuarta *P. rustigianii* correspondiente a *P. alcalifaciens* biogrupo 3. Los datos fueron informados por Brenner y col. (29) y más recientemente por Penner (23).

Las tres especies ensayadas frente a distintas concentraciones de cloruro sódico muestran bastante homogeneidad en su respuesta con unos valores intermedios entre *P. vulgaris* y *P. mirabilis*. La especie *P. alcalifaciens* muestra una tolerancia ligeramente inferior. (ver figura 13).

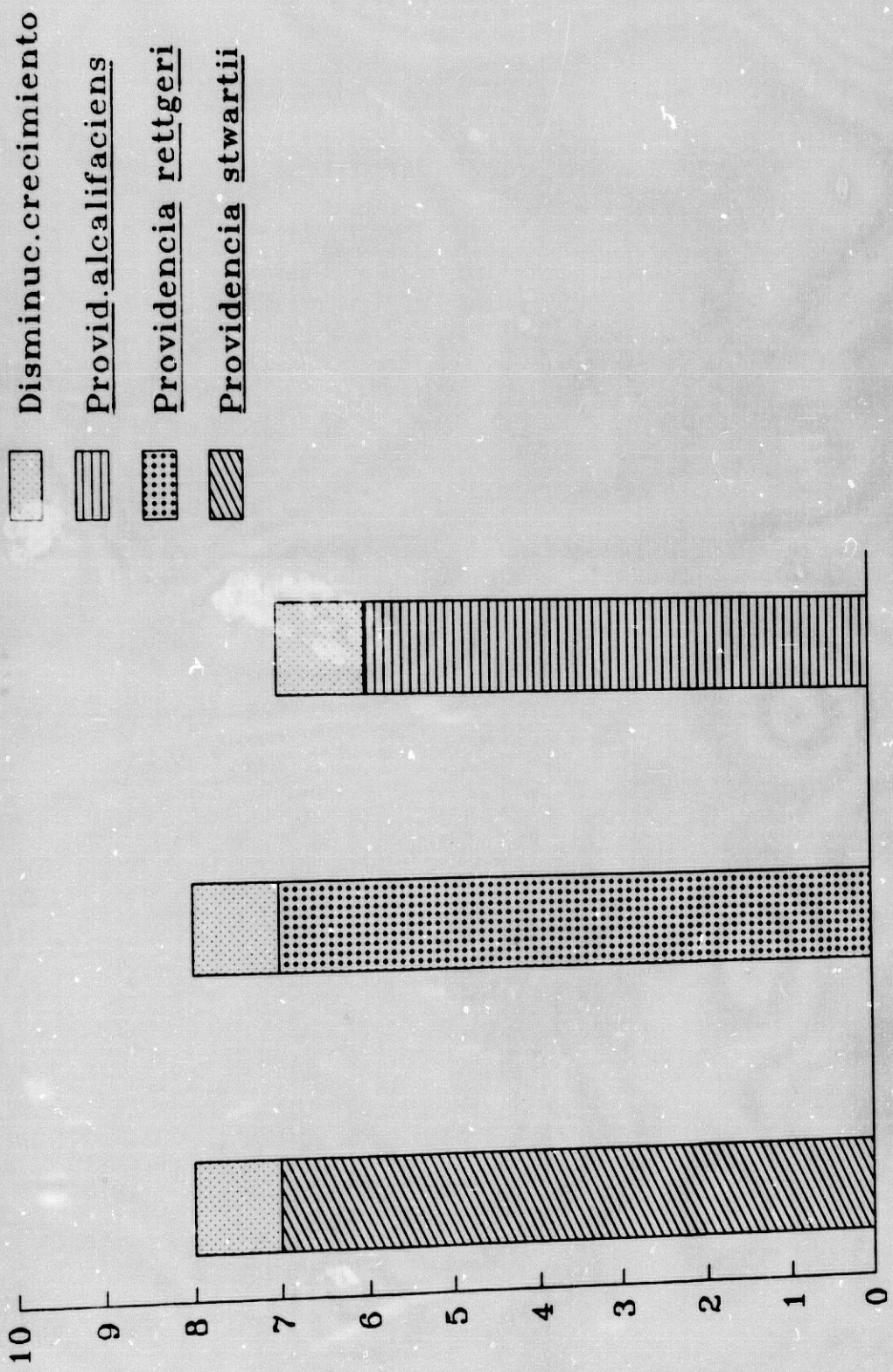


Fig. 13.- Tolerancia del G. PROVIDENCIA al cloruro sodico

GENERO SALMONELLA Ligni eres 1900

TABLA 20: COMPORTAMIENTO DEL G. SALMONELLA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SODICO

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CT 409	S. serotipo typhi		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
CT 443	S. serotipo typhimurium		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
ATCC 13076	S. serotipo enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
CT 915	S. serotipo cholerae suis		+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
S ₁	- S. ser. cholerae suis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₂	- S. ser cholerae suis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₃	- S. ser cholerae suis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₄	- S. ser cholerae suis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₅	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₆	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₇	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₈	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₉	- S. ser typhimurium		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₁₀	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₁₁	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₁₂	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₁₃	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₁₄	- S. ser typhimurium		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₁₅	- S. ser typhimurium		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₁₆	- S. ser typhimurium		+	+	+	+	+	d	+	-	-	-	-
S ₁₇	- S. ser typhimurium		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₁₈	- S. ser typhi		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₁₉	- S. ser typhi		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₂₀	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₂₁	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	d	+	-	-	-	-
S ₂₂	- S. ser cholerae suis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₂₃	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₂₄	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₂₅	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₂₆	- S. ser typhi		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₂₇	- S. ser typhi		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₂₈	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
S ₂₉	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-
S ₃₀	- S. ser enteritidis		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

NOTA: Si uno acepta que en principio, aquellas bacterias emparentadas en un 70% o m as, en base a estudios de hibridación de ADN, pertenecen a la misma especie, el género

Salmonella posee una única especie (37) con 5 subgrupos o subgéneros.

Se ensayaron 30 cepas de **Salmonella** y 4 de referencia correspondientes a los serotipos que más frecuentemente se aislan de especímenes humanos. Lo más destacable como se refleja en la figura 14 es que el serotipo **typhi** soporta menor cantidad de cloruro sódico ; a 7 g%, no crece mientras que el resto toleran dicha concentración.

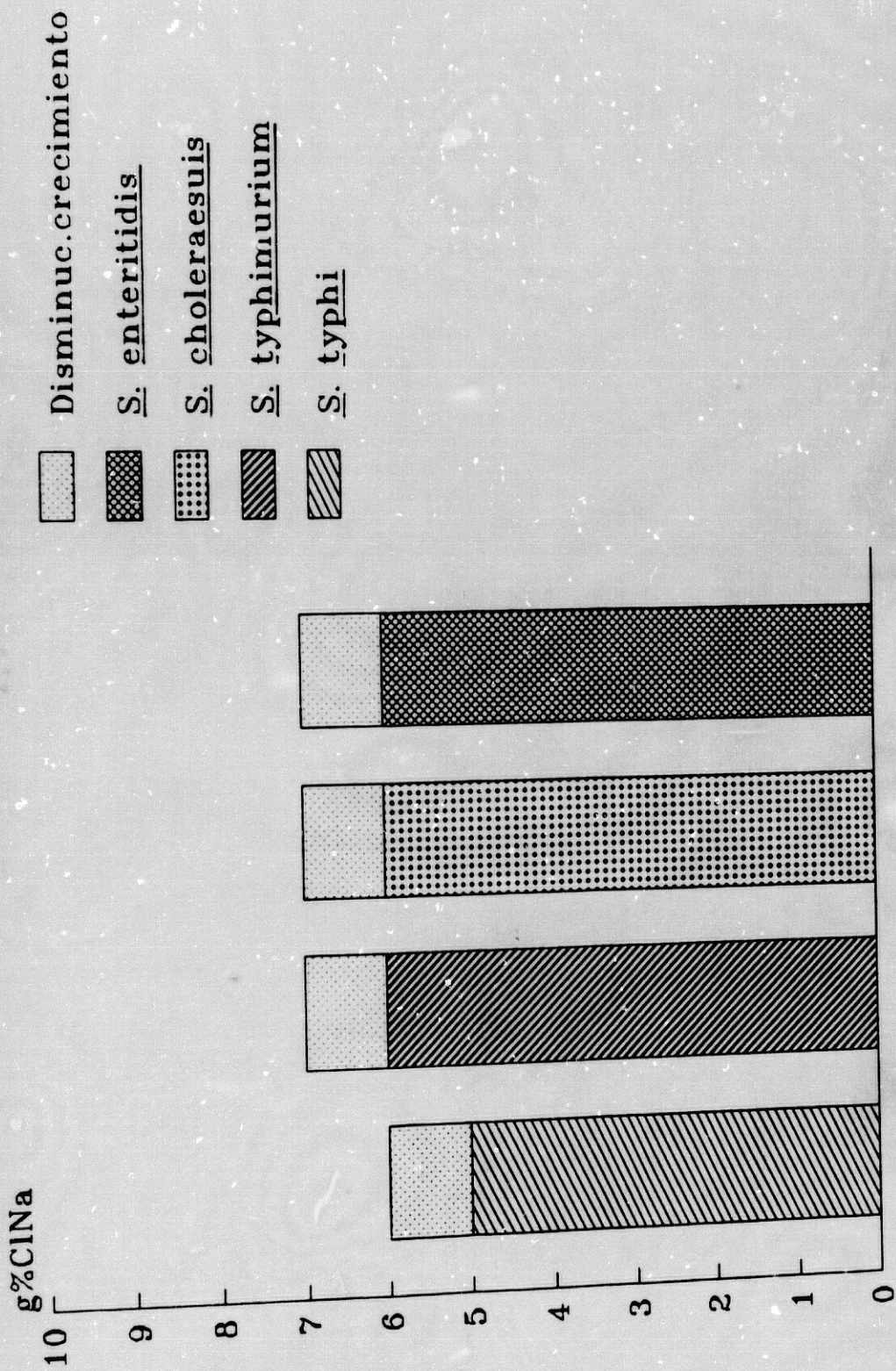


Fig. 14.- Tolerancia del G. SALMONELLA al cloruro sodico

GENERO SERRATIA Bizio 1823

TABLA 21: COMPORTAMIENTO DEL G. SERRATIA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SODICO

	g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CT 846	<i>Serratia marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
CT 483	<i>Serratia licuefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
CT 867	<i>Serratia odorifera</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-
CT 868	<i>Serratia rubidaea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
S ₁	<i>S. rubidaea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
S ₂	<i>S. rubidaea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d
S ₃	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₄	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₅	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₆	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₇	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₈	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₉	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₁₀	<i>S. licuefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-	-
S ₁₁	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	d	d	-	-	-
S ₁₂	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₁₃	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	d	-
S ₁₄	<i>S. licuefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₁₅	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₁₆	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₁₇	<i>S. licuefaciens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₁₈	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₁₉	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₂₀	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₂₁	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-
S ₂₂	<i>S. marcescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	d	-	-

NOTA: *Serratia* es uno de los géneros mejor conocido dentro de la familia Enterobacteriaceae y de recientes revisiones (23, 75). En la 8ª ed. del Manual de Bacteriología Determinativa, se le describía una sola especie, *S. marcescens*. Estudios de hibridación de ADN, han clarificado el status del género y en la actualidad hay descritas 7 especies nuevas las cuales la

más comúnmente aislada de especímenes humanos sigue siendo *S. marcescens*, seguida de *S. licuefaciens*. El resto, *S. odorífera*, *S. rubidaea*, *S. plymuthica*, *S. fontícola* y *S. ficaria* se han encontrado de forma aislada y con dudosa implicación clínica.

Se ensayaron 22 cepas aisladas del laboratorio y 4 cepas de referencia. Se observa en la figura 15 una marcada diferencia según la especie. De forma secuencial *S. licuefaciens* es la menos tolerante a la sal creciendo a concentraciones de 7 g% seguida de *S. marcescens* a 8 g%, *S. odorífera* hasta 9 g% y *S. rubidaea* 10 g%.

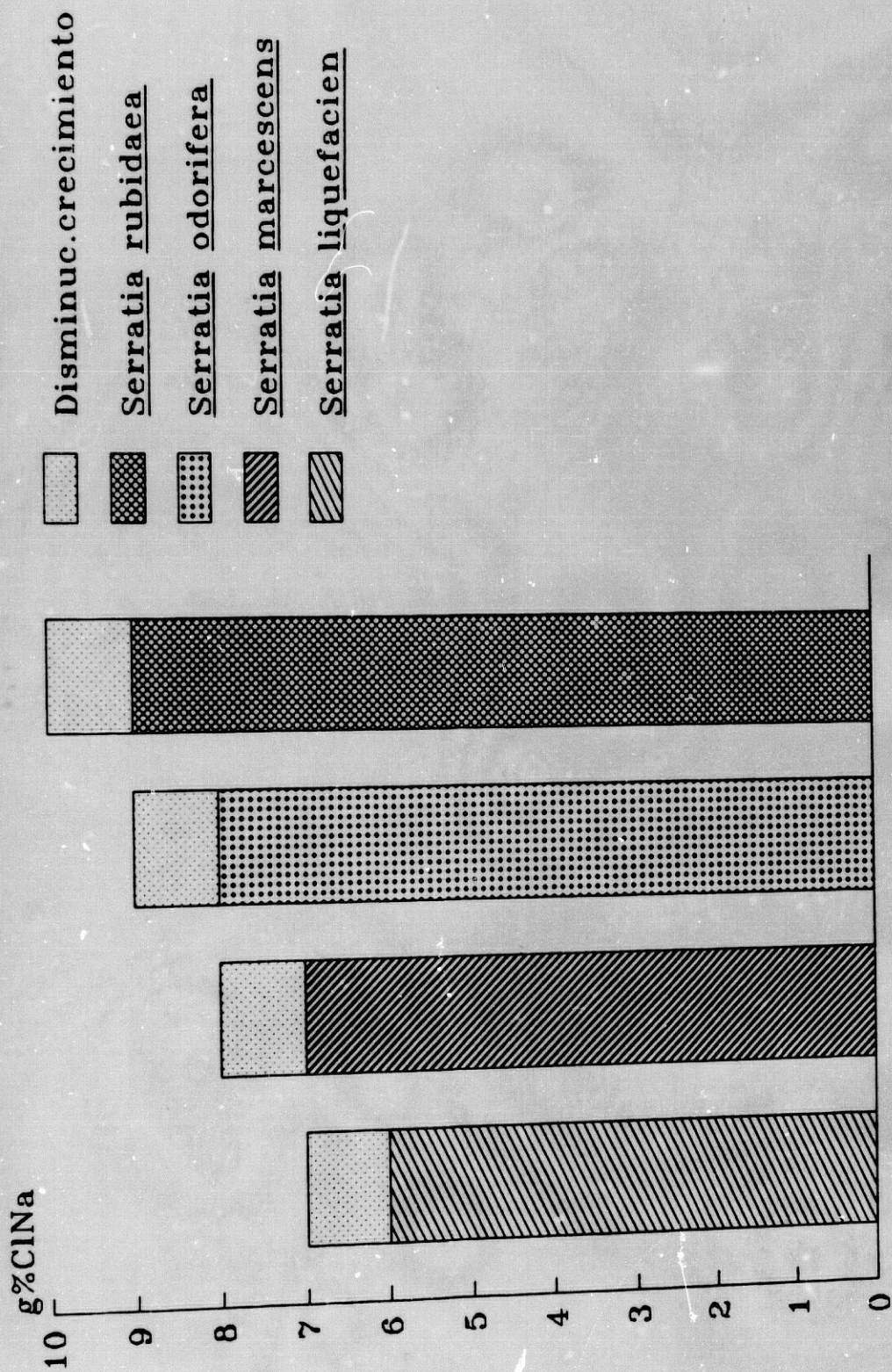


Fig. 15.- Tolerancia del *G. SERRATIA* al cloruro sodico

GENERO SHIGELLA Castellani y Chalmers 1919

TABLA 22: CRECIMIENTO DEL G. SHIGELLA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SODICO

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CT 853	<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 29930	<i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
ATCC 8700	<i>Shigella boydii</i>	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
ATCC 29903	<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
Sh ₁	<i>S. sonnei</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
Sh ₂	<i>S. sonnei</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
Sh ₃	<i>S. sonnei</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
Sh ₄	<i>S. sonnei</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
Sh ₅	<i>S. boydii</i>	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-	-	-
Sh ₆	<i>S. flexneri</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
Sh ₇	<i>S. flexneri</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-

NOTA: *Shigella* es un antiguo género bien conocido por los microbiólogos clínicos como causante de la disentería bacilar. Estudios de hibridación de ADN realizados por Brenner (23) mostraron que las cuatro especies de *Shigella* y *Escherichia coli* son una sola especie y se mantienen separadas por su profusión dentro de la Microbiología médica y en base a características epidemiológicas: las *Shigella* causan disentería bacilar mientras que la mayoría de las cepas de *E. coli* no.

Se ha ensayado 7 cepas de *Shigella* aisladas de muestras clínicas. Todas coinciden en cuanto a su tolerancia a la sal con sus cepas tipo correspondientes: *S. dysenteriae* y *S. boydii* crecen hasta 3 g% mientras que *S. sonnei* y *S. flexneri* lo hacen hasta 5 g% de cloruro sódico.

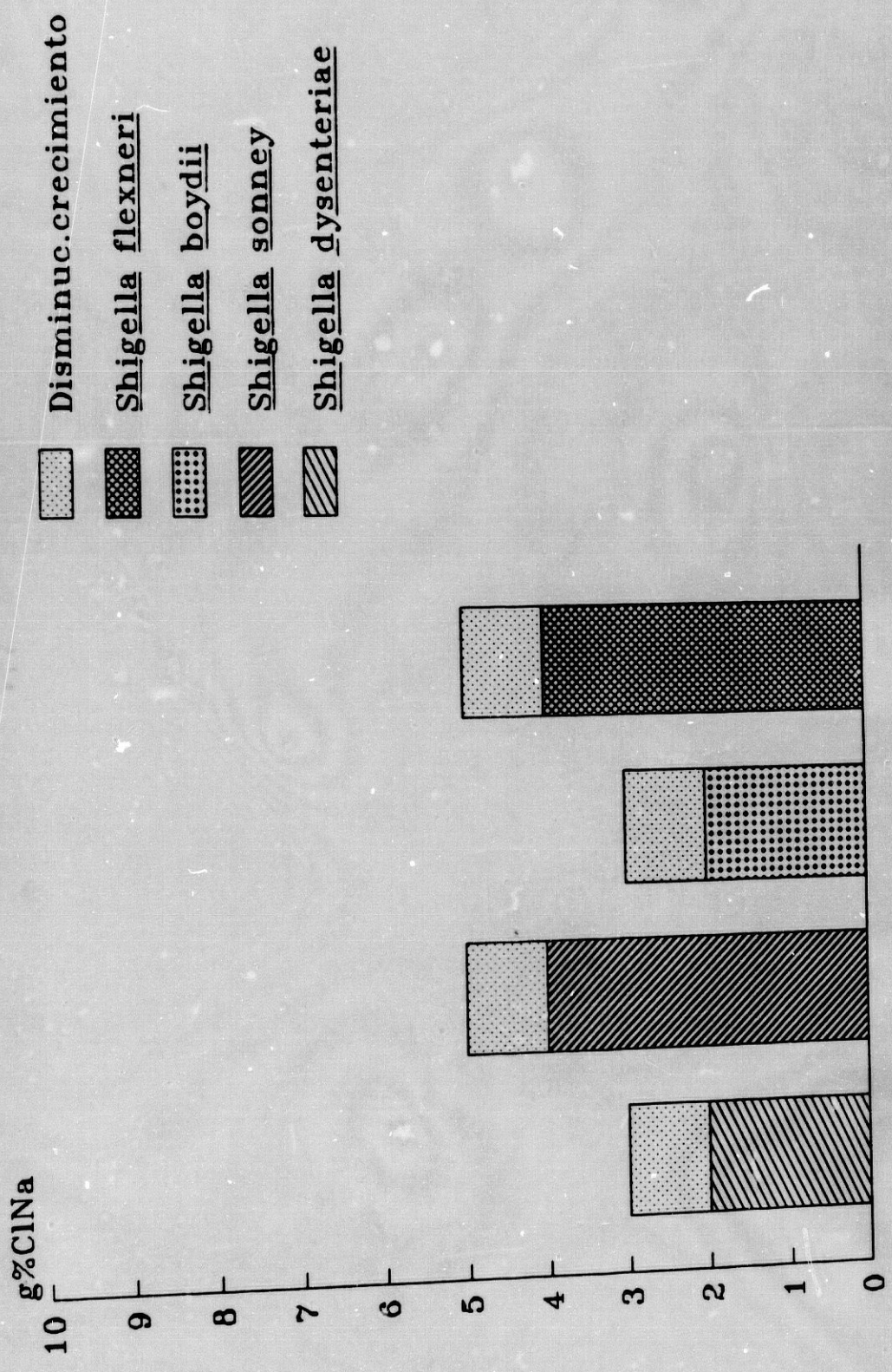


Fig. 16.- Tolerancia del G. SHIGELLA al cloruro sodico

GENERO TATUMELLA Hollis, Hickman y Fanning 1982

TABLA 23: COMPORTAMIENTO DEL G. TATUMELLA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SODICO

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				---	---	---	---	---	---	---	---	---	
CT 869	Tatumella ptyseos		+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-
	T ₁ T. ptyseos		+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-
	T ₂ T. ptyseos		+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: El nombre **Tatumella** fue propuesto por Hollis y col (88) para un grupo de organismos que se conocían como grupo **EF-9** y que por estudios de hibridación de ADN se demostró estaban estrechamente emparentados e inferior al 40% respecto a otros taxones de Enterobacteriaceae lo que concluyó con la proposición de un nuevo género: **Tatumella** con una única especie **T. ptyseos**.

Es un organismo con una tolerancia a la sal baja, mostrando valores límites de 3 g% (Ver figura 17).

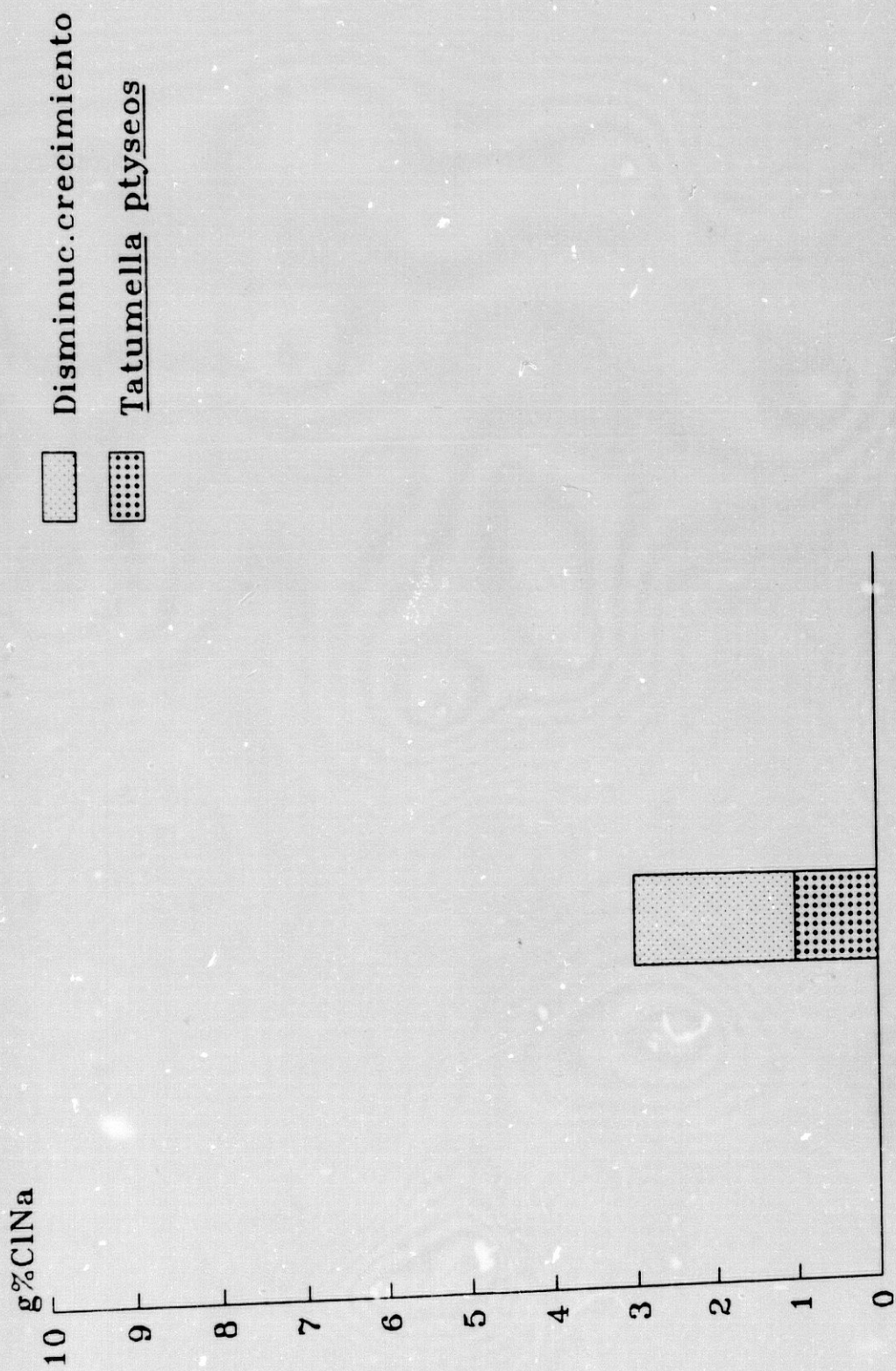


Fig. 17.- Tolerancia del G. TATUMELLA al cloruro sodico

GENERO YERSINIA Van Loghem 1944

TABLA 24: COMPORTAMIENTO DEL G. YERSINIA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CLORURO SODICO

		g% Cl Na	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				---	+	---	+	---	+	---	+	---	+
CR 7057	<i>Yersinia enterocolitica</i>		+	+	d	d	-	-	-	-	-	-	-
CR 103	<i>Y. kristensenii</i>		+	+	+	d	d	-	-	-	-	-	-
CR 7836	<i>Y. intermedia</i>		+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
CR 7723	<i>Y. frederiksenii</i>		+	+	+	d	d	-	-	-	-	-	-
Y ₁	<i>Y. frederiksenii</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₂	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₃	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₄	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₅	<i>Y. kristensenii</i>		+	+	+	+	d	-	-	-	-	-	-
Y ₆	<i>Y. intermedia</i>		+	+	+	d	d	-	-	-	-	-	-
Y ₇	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₈	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₉	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₀	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₁	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₂	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₃	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₄	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₅	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₆	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₇	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₈	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-
Y ₁₉	<i>Y. enterocolitica</i>		+	+	+	+	d	d	-	-	-	-	-

NOTA: El género comienza con el trasvase de las especies *Pasteurella pesti* y *P. pseudotuberculosis* al género *Yersinia* y éste a la familia Enterobacteriaceae. Se introduce una tercera especie *Y. enterocolitica* (17). En 1980 estudios de hibridación de ADN (12, 25) mostraron que las cepas *Y. enterocolitica* eran un grupo heterogéneo y se propusieron tres especies nuevas: *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* y *Y. kristensenii*.

Se ensayaron 19 cepas de *Yersinia* aisladas de muestras

clínicas y 4 cepas procedentes de la colección del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Granada correspondientes a las especies: *Y. enterocolitica*, *Y. kristensenii*, *Y. intermedia* y *Y. frederiksenii*.

Como se observa en la figura 18, la tolerancia al cloruro sódico es baja comparando con otras Enterobacteriaceae alcanzando un máximo de 5 g% para la especie *Y. enterocolitica* mientras que el resto quedaron inhibidas a 4 g% no creciendo a 5 g%.

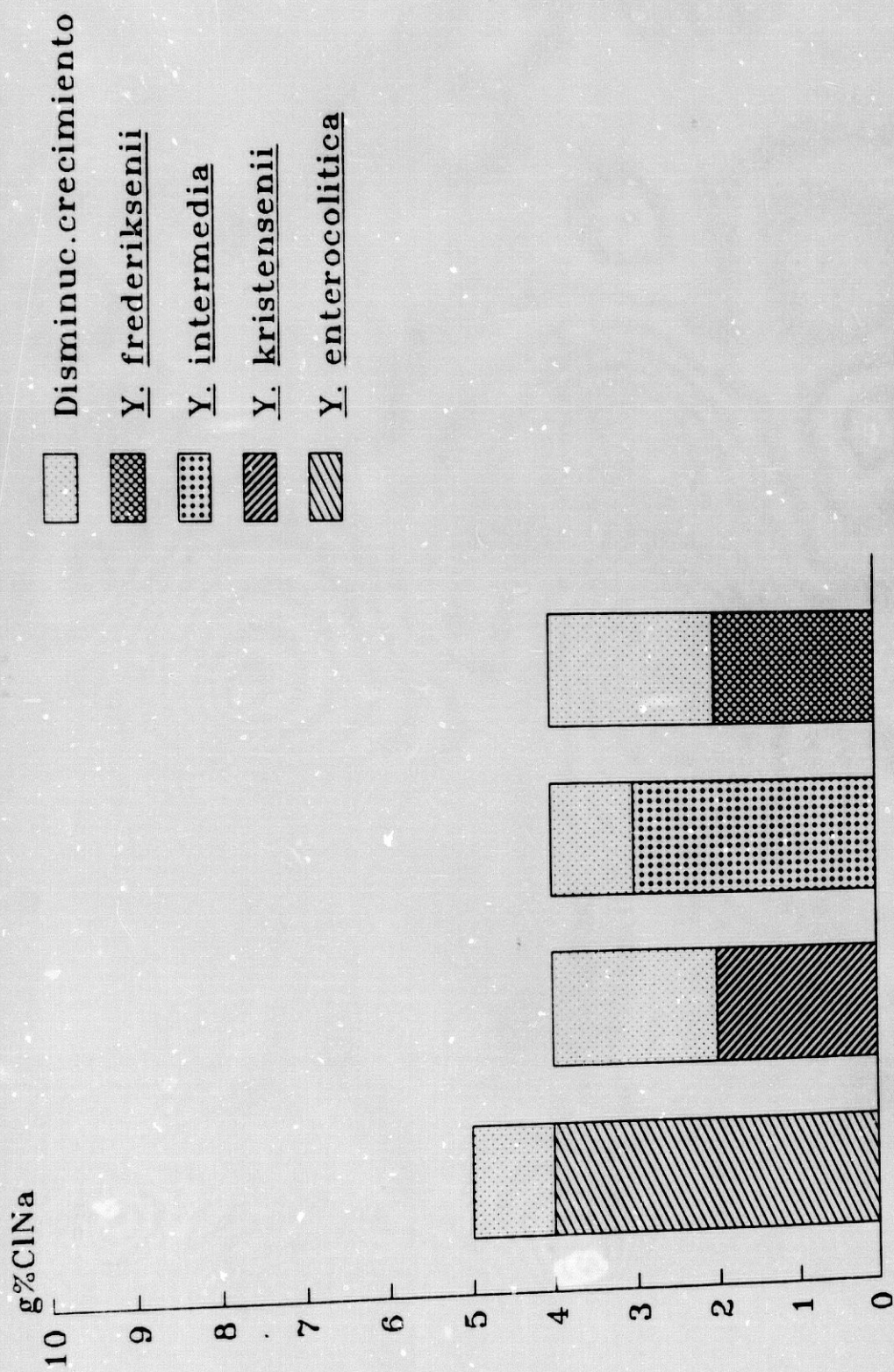


Fig. 18.- Tolerancia del *G. YERSINIA* al cloruro sodico

V. - DISCUSSION.

Durante muchos años, la identificación de las Enterobacteriaceae se ha basado principalmente en el análisis de los resultados de pruebas bioquímicas y serológicas. Se introducen nuevas técnicas de diagnóstico que aumentan la precisión en la identificación y de su resulta, se proponen nuevos géneros, nuevas especies y numerosos cambios en la identificación.

Una de las principales observaciones ha sido la casi total ausencia de investigación de la tolerancia de las Enterobacteriaceae frente al cloruro sódico.

Dentro de la familia, son pocos los géneros incapaces de crecer por encima del 5% de cloruro sódico: *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Tatumella* y *Yersinia*. La gran mayoría, alcanzan una tolerancia entre 6 y 8%: *Cedecea*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Ewingella*, *Providencia* y *Serratia*. Ningún género crece por encima del 8%, tan sólo las especies *Serratia rubidaea*, *Serratia odorifera* y *Proteus mirabilis*.

Se observa que aquellos géneros clásicamente considerados poco activos metabólicamente (*Edwardsiella*, *Hafnia*, *Tatumella* y *Yersinia*) toleran mal la sal y por el contrario, aquellos otros más activos, soportan mayores concentraciones de cloruro sódico. Por tanto, el grado de tolerancia guarda relación con la actividad metabólica del organismo.

La capacidad de tolerar mayor o menor concentración de sal puede ser aprovechada para la identificación presuntiva de aquellos géneros que guardan entre sí un gran parentesco bien fenotípica o genotípicamente. El género *Edwardsiella* guarda una cierta semejanza bioquímica con los géneros *Escherichia*, *Salmonella* y grupo *Proteus*; produce gas a partir de glucosa, es SH₂ e indol positivas, decarboxila los aminoácidos Lisina y ornitina. Su escasa tolerancia a la sal le hace fácilmente diferenciable a la vez que apoya las divergencias filogenéticas de la *Edwardsiella* de estos grupos.

Posee además una elevada resistencia intrínseca a la colistina (139) hecho que fue utilizado por Edward y Ewing (39) proponiendo un medio a base de agar, peptona y hierro al que añaden colistina para un diagnóstico predictivo de crecimiento de *Edwardsiella* (colonias SH₂ positivas). Otras Enterobacteriaceae son resistentes a la colistina: grupo *Proteus* y *Serratia* pero ninguna de ellas queda inhibida a 3 g% de cloruro sódico, motivo por el cual, se sugiere como técnica de aislamiento el empleo de un medio base como el propuesto por Edward y Ewing preparado en una placa petri doble en la que una de las mitades lleva incorporada 3g% de cloruro sódico. La presencia de colonias sulfhídrico positivas en la mitad sin sal, inhibidas en el medio con sal, nos permitirá una identificación presuntiva.

Los géneros *Salmonella* y *Shigella* son patógenos entéricos. La búsqueda de colonias lactosa negativas y lactosa negativas sulfhídrico positivas es obligada en todos los cultivos de heces. La prueba de tolerancia al Cl Na de estos dos géneros (*Shigella* no crece a 5,5%) puede emplearse con carácter taxonómico como ayuda para la identificación presuntiva.

Además de estos dos géneros, la flora que se aísla de unas heces puede ser amplísima (*Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Escherichia*, etc.) , en muchos casos con una clara significación clínica llegando a crear verdaderas dificultades para obtener un informe final. Se propone para el cultivo de heces el uso adicional de una placa de medio de enriquecimiento para Enterobacteriaceae al que se añade 5g por 100 ml de medio con el propósito de inhibir una flora cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal y por comparación con otra placa sin sal, facilitar la identificación presuntiva. Se necesitan estudios adicionales para comprobar su efectividad.

Shigella y *Escherichia* constituyen genéticamente una sola especie. El *E. coli* representa una elevada proporción de los aislamientos de muestras clínicas; su identificación, rara vez causa problemas. Es típicamente positivo para la producción de gas a partir de la glucosa, Indol, ONPG, LDC y fermentación de L. arabinosa, manitol,

trehalosa y D-xilosa; sin embargo, estudios genéticos muestran *E. coli* fenotípicamente variables. A la espera del destino que sufrirán estos dos taxones, la marcada diferencia en cuanto a su tolerancia a la sal, constituye una prueba definitiva para su identificación.

A nivel de especie, los géneros *Cedecea* y *Enterobacter* tienen una gran homogeneidad en su respuesta a la sal.

Grimont y col (77) ensayaron 9 cepas de *C. davisae* y *C. lapagei* frente al cloruro sódico mostrando una tolerancia máxima del 7%. En nuestro ensayo obtenemos idénticos resultados con las cepas *C. davisae* y *C. neteri* ensayadas.

Por otra parte, todas las cepas ensayadas de especies *Enterobacter* y las cepas tipo, tuvieron una respuesta máxima del 8%.

Las especies de los géneros *Citrobacter*, *Providencia* y *Kluyvera*, han mostrado discretas diferencias en sus respuestas a la sal. Así vemos que *Citrobacter freundii* tolera hasta 7% incluso con una cierta irregularidad que puede interpretarse en base a la existencia de cepas descritas en la literatura científica que muestran reacciones bioquímicas intermedias y necesitan estudios de ADN; las especies *C. diversus* y *C. amalonaticus* crecen hasta 8 g% de Cl Na. Las dos especies descritas del género *Kluyvera* están estrechamente relacionadas y son difíciles de diferenciar por test bioquímicos; *K. criocrecens* tolera concentraciones ligeramente superiores que *K. ascorbata*, 7 y 6 respectivamente. Por último, del género *Providencia*, la especie *P. alcalifaciens* crece hasta 7% mientras que *P. stewartii* y *P. rettgeri* lo hacen hasta 8%.

Las especies de los géneros *klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* y *Yersinia* tienen una marcada diferencia de respuesta a la sal con respecto a otras especies pertenecientes al mismo género constituyendo un carácter taxón de gran ayuda para su identificación.

Así observamos dentro del género *klebsiella*, que las especies y subespecies menos activas metabólicamente (*k. planticola*,

K. subsp. rhinoscleromatis y *K. subsp. ozaenae*)
crecen hasta 6%; *K. pneumoniae* a 7% y *k.*
oxytoca hasta 8%

Del género *Proteus*, la especie *P. vulgaris* crece hasta 6%, *P. penneri* a 8% y *P. mirabilis* alcanza los 10 g% de Cl Na.

La mayoría de las *Salmonellas* que se aíslan de especímenes clínicos pertenecen al subgrupo I, el cual es bastante uniforme en sus reacciones bioquímicas y para su identificación se recurren a reacciones serológicas. De ellas, el serotipo *S. typhi* es bioquímicamente el menos activo y tolera concentraciones de hasta 6%, mientras que el resto de los serotipos ensayados soportan concentraciones de sal de hasta el 7%.

Grimont y Grimont (75, 76) estudiaron la tolerancia de las especies del género *Serratia* frente al cloruro sódico. En nuestro ensayo, se obtienen resultados idénticos con los siguientes valores: 7% para *S. liquefaciens*, 8% para *S. marcescens*, 9% para *S. odorifera* y 10% para *S. rubidaea*.

La identificación bioquímica del género *Shigella* resulta complicada por tratarse de organismos metabólicamente poco activos. Las únicas reacciones positivas que muestran son la fermentación de la glucosa con producción de ácido y la reacción Rojo de Metilo; el resto de las comunmente empleadas, negativas o variables. Farmer y col (60), en su tabla de identificación de las especies del género *Shigella*, agrupa por un lado a los serogrupos A, B y C y por otro *S. sonnei* (ornitina positiva) en base a la falta de test bioquímicos para diferenciar a los tres serogrupos, necesitando para ello, métodos serológicos. En nuestro ensayo, las cuatro especies *Shigella* son fácilmente diferenciables dos a dos por su distinto comportamiento frente al cloruro sódico:

-Crecen hasta 3%

S. dysenteriae (subgrupo A)

S. boydii (subgrupo C)

- Crecen hasta 5%

S. flexneri (subgrupo B)

S. sonnei (subgrupo D)

Las especies *Yersinia* son fenotípicamente similares y difíciles de diferenciar por test bioquímicos; dan negativas o variablemente, la mayoría de las pruebas comúnmente utilizadas: Voges Proskauer SH₂, ADH, LDC, ODC, Gelatina, KCN, malonato y escasa actividad fermentativa sobre hidratos de carbono. Bzin estudia la tolerancia a la sal de especies de *Yersinia* y expone que pueden crecer en ausencia de cloruro sódico pero con una tolerancia máxima del 3,5 % las especies de *Y. pesti* y *Y. pseudotuberculosis*; mientras que el resto de las especies lo hacían hasta 5%. En nuestro ensayo, tan solo la especie *Y. enterocolitica* alcanza una tolerancia del 5%; el resto, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia* y *Y. kristensenii*, no crecen a esa concentración.

Un segundo descubrimiento de gran interés ha sido la observación de diversas propiedades metabólicas inducidas por la sal en determinados organismos.

Las colonias del género *Proteus* en un medio de cultivo sólido, presentan una morfología típica conocida como carácter invasor(180) debido a una migración en periodos cíclicos que da lugar a zonas concéntricas alrededor del punto de inoculación, o bien se esparcen sobre la superficie húmeda del medio a modo de una membrana.

Este carácter hace difícil aislar otras especies de bacterias que crecen conjuntamente en el medio de cultivo por tanto, los medios de aislamiento en los laboratorios entéricos se han diseñado para inhibir este carácter invasor y seleccionar patógenos conocidos. Para ello se han formulado la incorporación de sales biliares, detergentes, aumento de la concentración de agar hasta un 4 a 7% o reducción de la concentración de cloruro sódico. (100)

Al estudiar la tolerancia a la sal del

género *Proteus* se observó que el carácter invasor se estimulaba efectivamente con pequeñas cantidades de sal, con un óptimo entre 0,5 y 1%; pero además, en nuestro ensayo se observa que un aumento progresivo de sal conduce igualmente, a una inhibición del mismo, concretamente entre los 3 y 4 g de cloruro sódico por 100 ml. de medio, de lo que se deduce que el grado de inducción e inhibición del carácter invasor guarda relación con el óptimo de sal para su crecimiento.



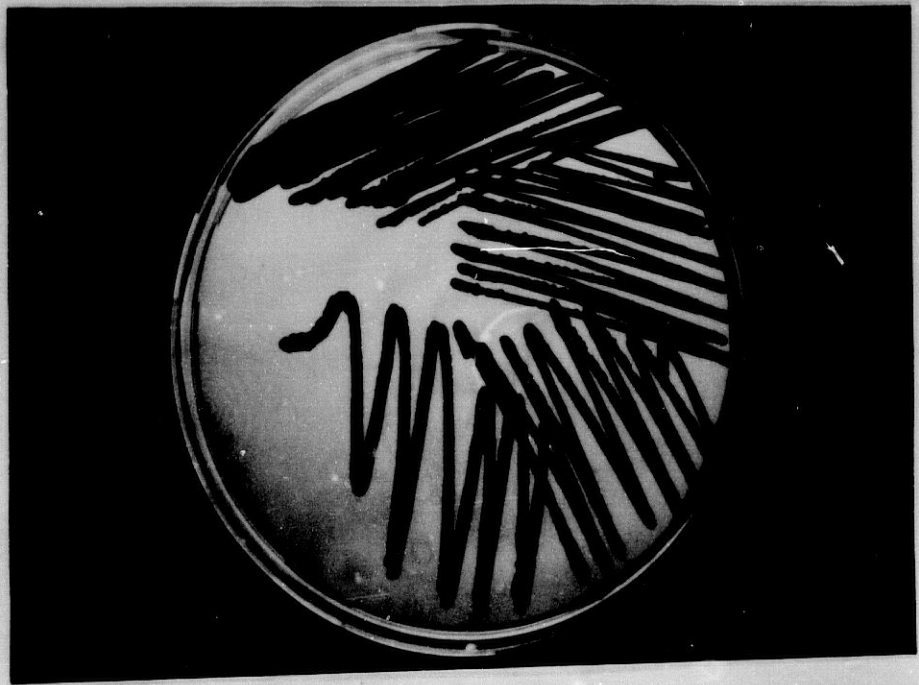
FOTOGRAFIA 1 : *Proteus mirabilis* 1% Cl Na
FOTOGRAFIA 2 : *Proteus mirabilis* 3% Cl Na

Algunas especies y biotipos del género *Serratia* producen dos tipos de pigmentos; uno insoluble en agua, no difusible denominado prodigiosina y que le da a la colonia una coloración roja y un segundo pigmento soluble en el agua, difusible, provocando una coloración del medio mientras la colonia permanece blanca o rosácea se le conoce con el nombre de pirimina. El primero lo produce los biogrupos A₁ y A₂ de *Serratia marcescens* y las especies *S. plymutica* y *S. rubidaea*, el segundo, algunas cepas de *S. marcescens* biotipo A₄.

Se sabe que la producción de prodigiosina depende de las condiciones del cultivo en cuanto a su composición, pH iones orgánicos y temperatura (182, 183), sin embargo no se ha estudiado bajo la influencia de cloruro sódico.

Se ensayaron cuatro cepas pigmentadas de *S. marcescens* (1 cepa tipo CT 846 y tres aisladas de muestras clínicas) y tres cepas de *S. rubidaea* (1 cepa tipo 868 y dos aisladas de muestras clínicas). Se obtuvieron unos resultados congruentes con el óptimo de requerimiento salino para su formación. Las cuatro cepas de *S. marcescens* pigmentadas perdían su coloración al aumentar la concentración de cloruro sódico (4%) mientras que las tres cepas de *S. rubidaea* debilmente coloreadas a 0% de sal, mostraron una coloración roja intensa a partir del 2% y la mantuvo hasta los 10 g%.



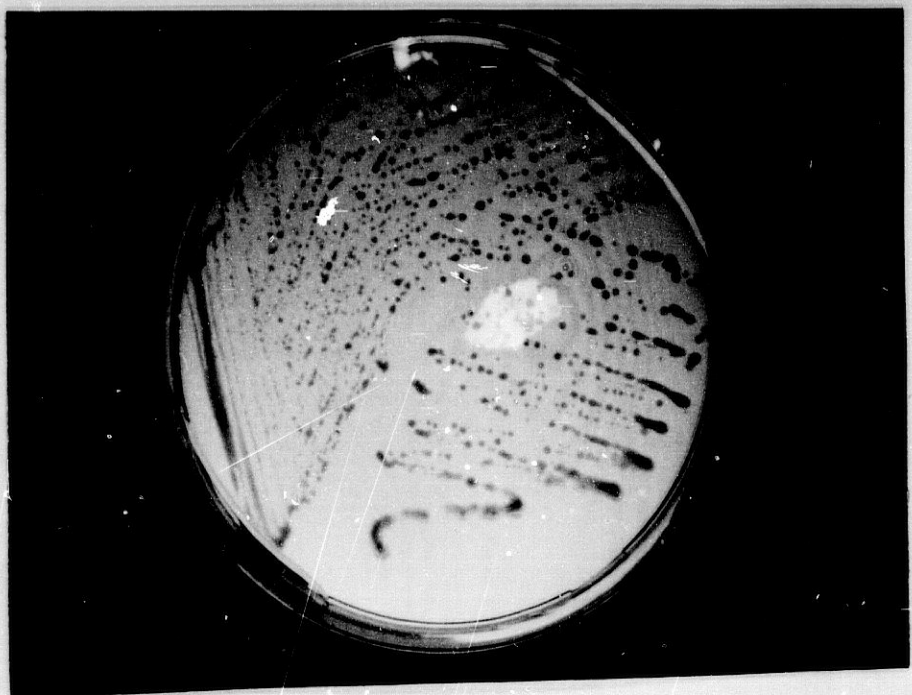
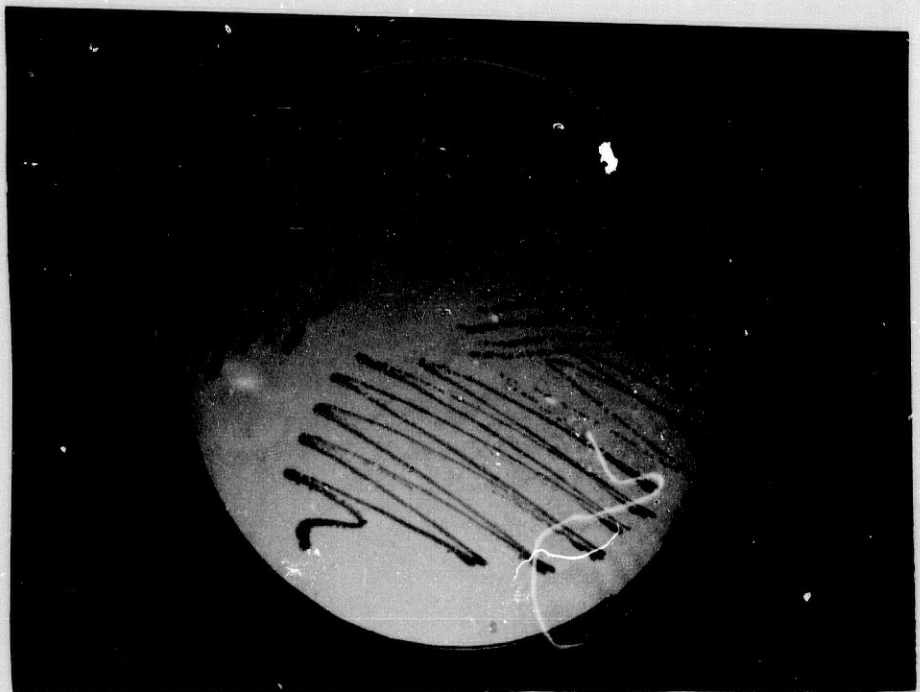


FOTOGRAFIA 3 : *Serratia rubidaea* 0% Cl Na
FOTOGRAFIA 4 : *Serratia rubidaea* 2% Cl Na
FOTOGRAFIA 5 : *Serratia rubidaea* 4% Cl Na

Inducción de la transformación del *Escherichia coli* de fase lisa a fase mucosa por acción del cloruro sódico ¿un efecto adaptativo?

Como expuse en la introducción al hablar de la relación entre Enterobacteriaceae y halofilismo, una de las líneas de investigación más interesantes llevadas a cabo en los últimos años se basan en la influencia que el cloruro sódico ejerce en la composición y estructura de las bacterias no halófilas. Concretamente, en los estudios llevados a cabo con la especie *Escherichia coli* se ha observado la producción de oligosacáridos derivados de la membrana en el espacio periplásmico como efecto adaptativo a un ambiente hipoosmolar y como estos procesos de osmorregulación, al menos en parte, están mediados por genes los cuales se expresan por la presencia de determinados nutrientes.

En nuestro ensayo, al analizar la tolerancia del *E. coli* a distintas concentraciones de sal, se observa la inducción fenotípica gradual de la transformación de cepas lisas a cepas mucosas, manifiestamente marcada a partir de 5 g%. Las cepas *E. coli* tipo A₁, muestran mayor mucosidad y una tolerancia ligeramente inferior al cloruro sódico. En un futuro, habría que profundizar a nivel genético del porqué de esta inducción.



FOTOGRAFIA 6: *Escherichia coli* 0% Cl Na
FOTOGRAFIA 7: *Escherichia coli* 6% Cl Na

VI.- CONCLUSIONES

1. Se confirma que la familia Enterobacteriaceae NO ES HALÓFILA, en tanto que no necesita sal para poder crecer. No obstante, la mayoría de los organismos, mejoran su desarrollo si se añaden pequeñas cantidades de sal del orden de 0,5 a 1%

2. Algunas especies de la familia Enterobacteriaceae, en lo que se refiere a su tolerancia a la sal, se muestran HALOTOLERANTES por su capacidad de crecer en un medio con sal, incluso comportarse como HALÓFILOS DÉBILES en cuanto a que crecen mejor con un 1 a 3% de cloruro sódico. Tal es el caso de las especies *Serratia odorifera*, *Serratia rubidaea* y *Proteus mirabilis*.

3. El grado de tolerancia guarda relación con la actividad metabólica del organismo. Aquellos con baja actividad metabólica toleran mal la sal.

4. El grado de tolerancia al cloruro sódico se puede aplicar para la identificación presuntiva de géneros que guardan entre sí un gran parentesco fenotípico y/o genotípico: *Edwardsiella* - *Proteus* sp; *Escherichia coli* -

Shigella sp; *Hafnia alvei* - *Proteus* sp;
Salmonella - *Shigella* sp.

5. Existen marcadas diferencias en la respuesta a la sal de especies pertenecientes al mismo género constituyendo un carácter taxonómico: *klebsiella oxytoca* de otras *klebsiellas* de baja actividad metabólica; *Proteus mirabilis* - *P. penneri* - *P. vulgaris*; serotipo *Salmonella typhi* - serotipos *Salmonella* sp; *Serratia rubidaea* - *S. odorifera* - *S. marcescens* - *S. licuefaciens*; *Shigella* subgrupos A y C - *Shigella* subgrupo B y D; *Yersinia enterocolitica* - *Yersinia* sp.

6. El hecho de que *Edwardsiella tarda* sea resistente a la colistina e incapaz de crecer por encima del 3% de cloruro sódico sugiere la base de una técnica de aislamiento e identificación presuntiva por inhibición selectiva de este germen frente a otros resistentes a la colistina (grupo *Proteus* y *Serratia*).

7. Existe una inducción por acción del cloruro sódico de la transformación de cepas en

fase lisa (l) a fase mucosa (m) en el *Escherichia coli*.

8. Se sugiere como mecanismo para seleccionar patógenos conocidos, especialmente en muestras clínicas con abundante flora, la inhibición del carácter invasor del género *Proteus* por un aumento en la concentración de cloruro sódico del 3 al 4%.

9. La producción del pigmento prodigiosina en las especies y tipos del género *Serratia* depende de la concentración de cloruro sódico en el medio de cultivo.

10. Se propone el uso de la capacidad de desarrollo a distintas concentraciones de cloruro sódico como prueba para una mejor clasificación de géneros y especies dentro de la familia Enterobacteriaceae.

VII.— BIBLIOGRAFIA

1. ALONSO, J.M., J. BEJOT, H. BERCOVIER, H.H. MOLLARET. 1975. SUR UN GROUPE DE SOUCHES DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* FERMERTANT LE RHAMNOSE. MED. MAL. INFECTION. 10: 490 - 492
2. ALONSO, J.M., H. BERCOVIER. 1975. PREMIERS ISOLEMENTS EN FRANCE DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* CHEZ DES MICROMAMMIFERES SAUVAGES. MED. MAL. INFECTION. 5: 180 -181
3. ANDERSON, R.L. and F.B. ENGLE, JR. 1978. TYPING METHODS FOR *PROTEUS RETTGERI*: COMPARISON OF BIOTYPE, ANTIBIOGRAMS, SEROTYPE, AND BACTERIOCIN PRODUCTION. J. CLIN. MICROBIOL. 8: 715 - 724.
4. ASAI, T., S. OKUMURA and T. TSUNODE. 1956. ON A NEW GENUS, *KLUYVERA*. PROC. JPN - ACAD. 32: 488 -493
5. BALDINI, I. 1976. METODO SEMPLICE E RAPIDO PER LA COLIMETRIA FECALE DIRETTA IN ACQUE MARINE. BOLL IST SIFROTER MILAN, 55: 379 - 385
6. BAKER, P.M. and J.J. FARMER III. 1982. NEW BACTERIOPHAGE TYPING SYSTEM FOR *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, *YERSINIA KRISTENSENII*, *YERSINIA FREDERIKSENII* and *YERSINIA INTERMEDIA*: CORRELATION WITH SEROTYPING, BIOTYPING, AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY. J. CLIN. MICROBIOL. 15: 491 - 502.
7. BARNERS, D.M., D.K. SORENSEN, 1975. *SALMONELLOSIS*. pp 554 - 564. IN: DUNNE, H.W., A.D. LEMAN (eds). DISEASES OF SWINE, 4th ed. AMES: IOWA UNIVERSITY PRESS
8. BARTLETT, R.C., P.D. ELLNER and J.A. WASHINGTON II. 1974. CUMITECH 1, BLOOD CULTURES. COORDINATING ed. J.C. SHERRIS. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, D.C.
9. BASCOMB, S., S.P. LAPAGE and H.A. CURTIS. 1971. NUMERICAL CLASSIFICATION OF THE TRIBE *KLEBSIELLERE*. J. GEN. MICROBIOL. 66: 279 - 295
10. BAXTER, R.M., N.E. GIBBONS. 1956. CAN J. MICROBIOL. 2:599 - 606
11. BERCOVIER. H., J.M. ALONSO, Z.N. BENTAIBA, J. BRAULT, H.H. MOLLARET. 1979. CONTRIBUTION TO THE DEFINITION AND THE TAXONOMY OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA*. CONTR.

12. BERCOVIER, H., D.J. BRENNER, J. URSING, A.G. STEIGERWALT, G.R. FANNIG, J.M. ALONSO, G.P. CARTER, H.H. MOLLARET. 1980. CHARACTERIZATION OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* SENSU STRICTO. CURR. MICROBIOL 4: 201 - 206

13. BERCOVIER, H., H.H. MOLLARET, J.M. ALONSO, J. BRAULT, G.R. FANNING, A.G. STEIGERWALT and D.J. BRENNER, . 1980. INTRA- AND INTESPECIES RELATEDNESS OF *YERSINIA PESTI* BY DNA HYBRIDIZATION AND ITS RELATIONSHIP TO *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*. CURR. MICROBIOL. 4: 225 - 229

14. BERCOVIER, H., J. URSING, D.J. BRENNER, A.G. STEIGERWALT, R. FANNING, G.P. CARTER and H.H. MOLLARET. 1980. *YERSINIA KRISTENSENII*: A NEW SPECIES OF ENTEROBACTERIACEAE COMPOSED OF SUCROSE - NEGATIVE STRAINS (FORMERLY CALLED *YERSINIA ENTEROCOLITICA* OR *YERSINIA ENTEROCOLITICA* - LIKE). CURR. MICROBIOL. 4:219 - 224

15. BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL N° 1800. S. 3 - 4/1988. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

16. BOLETIN EPIDEMIOLOGICO SEMANAL N°1828. S. 7 - 8/1989. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO

17. BOTTONE, E.J. 1978. ATYPICAL *YERSINIA ENTEROCOLITICA*: CLINICAL AND EPIDEMIOLOGIA PARAMETERS. J. CLIN. MICROBIOL. 7: 562 - 567

18. BOTTONE, E.J., ROBIN, T. 1977. *YERSINIA ENTEROCOLITICA*: RECOVERY AND CHARACTERIZATION OF TWO UNUSUAL ISOLATES FROM A CASE OF ACUTE ENTERITIS. J. CLIN. MICROBIOL. 5: 341 -345

19. BRAUNSTEIN, H., M. TOMASULO, S. SCOTT and M.P. CHADWICK. 1980. A BIOTYPE OF ENTEROBACTERIACEAE INTERMEDIATE BETWEEN *CITROBACTER* AND *ENTEROBACTER*. AM. J. CLIN. PATHOL. 73: 114 - 116

20. BRENNER, D.J. 1973. DEOXYRIBONUCLEIC ACID REASSOCIATION IN THE TAXONOMY OF ENTERIC BACTERIA. INT. J. SYST. BACTERIOL. 23: 298 -307

21. BRENNER, D.J. 1974. DNA REASSOCIATION FOR THE CLINICAL DIFFERENTIATION OF ENTERIC BACTERIA. PUBLIC HEALTH LAB. 32: 118 -130

22. BRENNER, D.J. 1978. CHARACTERIZATION AND CLINICAL IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE BY DNA HYBRIDIZATION. PROG. CLIN. PATHOL. 7:71 -117

23. BRENNER, D.J. 1981. INTRODUCCION TO THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE pp. 1105 -1127. IN M. P. STARR, H. STOLP, H. G. TRUPER, A. BALOWS and H. G. SCHELEGEL (eds). THE PROKARYOTES. SPRINGER - VERLAG, BERLIN

24. BRENNER, D. J. 1984. FAMILY I, ENTEROBACTERIACEAE RAHN 1937, pp. 408 - 516. BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. VOL I. THE WILLIAMS AND WILKINS Co., BALTIMORE

25. BRENNER, D.J., BERCOVIER, H., J. URSING, J.M. ALONSO, A.G. STEIGERWALT, G.R. FANNING, G.P. CARTER and H.H. MOLLARET. 1980. *YERSINIA INTERMEDIA*: A NEW SPECIES OF ENTEROBACTERIACEAE COMPOSED OF RHAMNOSE - POSITIVE, RAFFINOSE - POSITIVE STRAINS (FORMELLY CALLED ATYPICAL *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O *YERSINIA ENTEROCOLITICA* - LIKE). CURR. MICROBIOL. 4: 207 -212

26. BRENNER, D.J. and S. FALKOW. 1971. MOLECULAR RELATIONSHIPS AMONG MEMBERS OF THE ENTEROBACTERIACEAE ADUAN. GENET. 16: 81 -118

27. BRENNER, D.J., G.R. FANNING, K.E. JOHNSON, R.V. CITARELLA and S.FALKOW. 1969. POLYNUCLEOTIDE SEQUENCE RELATIONSHIPS AMONG MEMBERS OF THE ENTEROBACTERIACEAE. J. BACTERIOL. 98: 637 - 650

28. BRENNER, D.J., G.R. FANNING, F.J. SKERMAN, S. FALKOW. 1972. POLINUCLEOTIDE SEQUENCE DIVERGENIC AMONG STRAINS OF *SCHERICHIA COLI* AND CLOSELY RELATED ORGANISMS. J. BACTERIOL. 109: 953 - 965

29. BRENNER, D.J., J.J. FARMER III, G.R. FANNING, A.G. STEIGERWALT, P. KLYKKEN, H.G. WATHEN, F.W. HICKMAN and W.H. EWING. 1978. DEOXYRIBONUCLEIC ACID RELATEDNESS IN SPECIES OF *PROTEUS* AND *PROVIDENCIA*. INT. J. SYST. BACTERIOL. 28: 269 -282

30. BRENNER, D.J., J.J.FARMER III, F.W. HICKMAN, M.A. ASBURY and A.G. STEIGERWALT. 1977. TAXONOMIC AND NOMENCLATURE CHANGES IN ENTEROBACTERIACEAE. CENTER FOR DISEASE CONTROL, ATLANTA, Ga.

31. BRENNER, D.J., C. RICHARD, A.G. STEIGERWALT, M.A. ASBURY and M. MENDEL. 1980. *ENTEROBACTER GERGOVIAE*. NOV: A NEW SPECIES OF ENTEROBACTERIACEAE FOUND IN CLINICAL SPECIMENS AND THE ENVIROMENT. INT. J. SYST. BACTERIOL. 30: 1 - 6

32. BRENNER, D.J., A.G. STEIGERWALT and G.R. FANNING. 1973. DIFFERENTIATION OF *ENTEROBACTER AEROGENES*. FROM *KLEBSIELLAE* BY DEOXYRIBONNUCLEIC ACID REASSOCIATION. INT. J. SYST. BACTERIOL. 22: 193 - 200

33. BRISOU, J., D. COURTOIS AND F. DENIS. 1974. MICROBIOLOGICAL STUDY OF A HYPERSALINE LAKE IN FRENCH SOMALILAND. APPLIED MICROBIOLOGY. 27: 819 -822

34. BUCHANAN, R.E., and N.E. GIBBONS (ed) 1974. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8th ed. pp. 269 - 273. THE WILLIAMS AND WILKINS, Co. BALTIMORE

35. BUESCHING, W.J., D.L. RHODEN, A.D, ESAIAS, P.B. SMITH, and J.A. WASHINGTON II. 1979. EVALUATION OF THE MODIFIED MICRO- ID SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE. J. CLIN. MICROBIOL. 10: 454 - 458

36. CRICHTON, P.B. and D.C. OLD. 1980. DIFFERNTIATION OF STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI*: MULTIPLE TYPING APPROACH. J. CLIN. MICROBIOL. 11: 635 - 640.

37. CROSA, J.H., D.J. BRENNER, W.H. EWING and S. FALKOW. 1973. MOLECULAR RELATIONSHIPS AMONG THE *SALMONELLEAE*. J. BACTERIOL. 115: 307 - 315

38. CHAMBERS, S.T., C.M. KUNIN, D. MILLER, and A. HAMADA. 1987. DIMETHYLTHETIN CAN SUBSTITUTE FOR GLYCINE BETAINE AS AN OSMOPROTECTANT MOLECULE FOR *ESCHERICHIA COLI*. J. BACTERIOL. 169:4845-4847

39. EDWARDS, P.R. and EWING, W.H.. 1972. IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE 3rd ed. MINNEAPOLIS. MINNESOTA: BURGESS PUBLISHING Co.

40. EWING, W.H. 1962. THE TRIBE **PROTEEEAE**: ITS NOMENCLATURE AND TAXONOMY. INT. BULL. BACTERIOL. NOMENCL. TAXON. 12: 93 -102
41. EWING, W.H. 1963. AN OUTLINE OF NOMENCLATURE FOR THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE. INT. BULL. BACTERIOL. NOMEN TAXON. 13: 95 - 110
42. EWING, W.H. 1969. EXCERPTS FROM: AN EVALUATION OF THE **SALMONELLA** PROBLEM. CENTER FOR DISEASE CONTROL PUBLICATION. ATLANTA. Ga
43. EWING, W.H. 1972. THE NOMENCLATURE OF **SALMONELLA**, ITS USAGE, AND DEFINITIONS FOR THE THREE SPECIES. CAN. J. MICROBIOL. 18: 1629 - 1637
44. EWING, W.H. 1973. DIFFERNTIATION OF ENTEROBACTERIACEAE, BY BIOCHEMICAL REACTIONS. REVISED. CENTERS FOR DISEASE CONTROL, ATLANTA. Ga
45. EWING, W.H. 1986. EDWARD, and EWING'S. IDENTIFICATION CF ENTEROBACTERIACEAE 4rd ed. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING Co, Inc, New York
46. EWING, W.H. and B.R. DAVIS. 1970. MEDIA AND TESTS FOR DIFFERNTIATION OF ENTEROBACTERIACEAE. CENTER FOR DISEASE CONTROL, ATLANTA.
47. EWING, W.H., and B.R. DAVIS. 1972. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF **SERRATIA MARCESCENS** PUBL. HEALTH LAB. 30: 211 - 226
48. EWING, W.H., B.R.DAVIS, M.A. FIFE and E.F. LESSEL. 1973. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF **SERRATIA LIQUEFACIENS** (GRIMES and HENNERTY) BASCOMB at al. (FORMELY **ENTEROBACTER LIQUEFACIENS** and **SERRATIA RUBIDAEA** (STAPP) COMB NOV AND DESIGNATION of TYPE AND NEOTYPE STRAIN. INT. J.SYST. BACTERIOL. 23: 217 - 225
49. EWING, W.H., B.R. DAVIS, and J.G. JOHNSON. 1962. THE GENUS **SERRATIA** ITS TAXONOMY AND NOMENCLATURE. INT. BULL. BACTERIOL. NOMENCL. TAXON. 12: 47 - 52
50. EWING, W.H., B.R.DAVIS, and S.V. SIKES. 1972. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF **PROVIDENCIA**. PUBLIC HEALTH LAB. 30: 25 -38

51. EWING, W.H., and P.R. EDWARDS. 1960. THE PRINCIPAL DIVISIONS AND GROUPS OF ENTEROBACTERIACEAE. INT. BULL. BACTERIOL. NOMENCL. TAXON. 10: 1 - 12

52. EWING, W.H., and M.A. FIFE. 1971. BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF **ENTEROBACTER AGGLOMERANS**. CENTER FOR DISEASE CONTROL, ATLANTA

53. EWING, W.H. and, A.M. FIFE. 1972 **ENTEROBACTER AGGLOMERANS** (BEIJERINCK) COMB. NOV (THE **HERBICOLA** - **LATHYRI BACTERIA**) INT. J. SYST. BACTERIOL. 22: 4 -11

54. EWING, W.H., A.C. McWHORTER, M.R. ESCOBAR, A.H. LUBIN. 1965. **EDWARDSIELLA**, A NEW GENUS OR ENTEROBACTERIACEAE BASED ON A NEW SPECIES **E. TARDA**. INT. BULL. BACTERIOL. NOMEN. TAXON. 15: 33 - 38

55. EWING, W.H., A.J. ROSS, D.J. BRANNER, and G.R.FANNING. 1978. **YERSINIA RUCKERII** sp. nov., THE REDMOUTH (Rm) BACTERIUM. INT J. SYST. BACTERIOL. 28: 37 - 44

56. FAINSTEIN, V., R.L. HOPFER, K. MILLS, and G.P. BODEY. 1982. COLONIZATION BY OR DIARRHEA DUE TO **KLUYVERA** SPECIES. J. INFECT. DIS. 145 -127

57. FARMER III, J.J., 1981. THE GENUS **EDWARDSIELLA**. IN STARR. STOLP, TRÜPER, BALOWS AND SCHLEGEL (eds). THE PROKARYOTES. SPRINGER VERLAG. NEW YORK. pp 1135 - 1139

58. FARMER III, J.J. 1981. STANDARDIZATION AND AUTOMATION IN BIOTYPING pp. 68 -97. IN A. BALOWS AND H. ISENBERG (ed) BIOTYPING IN THE CLINICAL MICROBIOLOGY LABORATORY. CHARLES C. THOMAS PUBLISHER, SPRINGFIELD. III.

59. FARMER III, J.J., M.A. ASBURY, F.W. HICKMAN, D.J. BRENNER, and ENTEROBACTERIACEAE STUDY GROUP. 1980. **ENTEROBACTER SAKAZAKII**: A NEW SPECIES OF ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS. INT. J. SYST. BACTERIOL. 30: 569 - 584

60. FARMER III, J.J., B.R.DAVIS, F.W. HICKMAN - BRENNER, A. McWHORTER, G.P. HUNTLEY-CARTER, M.A. ASBURY, RIDDLE, H.G. WATHEN-GRADY, C. ELIAS, G.R.FANNING, A.G. STEIGERWALT, C.M. O'HARA, G.K. MORRIS, P.B. SMITH and D.J. BRENNER. 1985. BIOCHEMICAL IDENTIFICATION OF NEW SPECIES AND BIOGROUPS OF ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM

61. FARMER III, J.J., P.A.D. GRIMONT, F. GRIMONT and M.A. ASBURY. 1980. CEDECFA: A NEW GENUS IN ENTEROBACTERIACEAE. ABSTR. ANNU. MTG. AMER. SOC. MICROBIOL. pp 295. ABSTRACT C 123

62. FARMER III, J.J., G.R. FANNING, G. P. HUNTLEY-CARTER, B. HOLME, F.W. HICKMAN, C. RICHARD and D.J. BRENNER, 1981. KLUYVERA, A NEW (REDEFINED) GENUS IN THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE: IDENTIFICATION OF KLUYVERA ASCORBATA sp. nov. and KLUYVERA CRYOCRESCENS sp. nov. IN CLINICAL SPECIMENS . J. CLIN. MICROBIOL. 13: 919 - 933

63. FARMER III, J.J., N.K. SHETH, J.A. HUDZINSKI, H.D. ROSE, and M.F. ASBURY. 1982. BACTERIEMIA DUE TO CEDECEA NETERI. sp. nov. J. CLIN. MICROBIOL. 16: 775 -778

64. FARMER III, J.J., J.G.WELLS, W. TERRANOVA, M.L. COHEN, and C.M.WEST. 1981. ENTEROBACTERIACEAE. pp 341 -392. IN A. DALOWS AND W.J. HAUSLER, Jr (ed) DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR BACTERIAL MYCOTIC AND PARASITIC INFECTIONS, 6th ed. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION . WASHINGTON, D.C.

65. FERRARO, M.J.B., M.A. EDELBLUT, and L.J. KUNZ. 1981. ACCURATE AUTOMATED IDENTIFICATION OF SELECTED ENTEROBACTERIACEAE FOUR HOURS. J. CLIN. MICROBIOL. 13: 151 - 157

66. FIEDLER, W., and H. ROTERING. 1988. J. BIOL. CHEM. 263: 14684 - 14689

67. FINKLEA P.J., M.S. COLE, and T.M. SODEMAN. 1976. CLINICAL EVALUATION OF THE MINITEK DIFFERENTIAL SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF ENTEROBACTERIACEAE. J. CLIN. MICROBIOL. 4: 400 - 404

68. FLANNERY, W.L. 1956. CURRENT STATUS OF KNOWLEDGE OF HALOPHILIC BACTERIA. BACTERIOL. REV 20: 49 -66

69. GAULTUIER M.J., P.M. MUNRO, V.A. BREITTMAYER. 1989. INFLUENCE OF PRIOR GROWTH CONDITIONS ON LOW NUTRIENT RESPONSE OF ESCHERICHIA COLI IN SEAWATER. CAN. J. MICROBIOL. 35: 379-383.

70. GAVINI, F., C. FERRAGUT, D. IZARD, P.A. TRINEL, H. LECLERC, B. LEFEBVRE, and D.A.A. MOSSEL. 1979. **SERRATIA FONTICOLA** A NEW SPECIES FROM WATER. INT J. SYST. BACTERIOL. 29: 92 - 101
71. GAVINI F., C. FERRAGUT, B. LEFEBVRE and H. LECLERC. 1976. ETUDE TAXONOMIQUE D'ENTEROBACTERIES APPARTENANT OU APPARENTEES AU GENRE **ENTEROBACTER**. ANN. MICROBIOL (INST. PASTEUR) 127B:317 - 335
72. GAVINI, F., D. IZARD, H. LECLERC, M. DESMONCEAUX, and J.P. GAYRAL. 1980. CARBON SOURCE ASSIMILATION TESTS: COMPARISON BETWEEN A CONVENTIONAL METHOD AND A MICROTCHNIC (API), IN STUDY OF ENTEROBACTERIACEAE. 7 bl BAKT. I. ABT. ORIG. C1: 182 - 187
73. GHOUL M., M. POMMEPUY, A. MOILLO-BATT, and M. CORMIER. 1989. EFFECT OF CARBONYL CYANIDE M-CHLORPPHENYLHYDRAZONE ON **ESCHERICHIA COLI** HALOTOLERANCE. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 55: 1040-1043.
74. GRIMONT, P.A.D., J.J FARMER III, M.A. ASBURY, D.J. BRENNER, and C. DEVAL. 1983. **EWINGELLA AMERICANA**. GEN. NOV. sp. nov. A NEW ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM SPECIMENS. ANN. MICROBIOL (Inst PASTEUR) 134A: 39 - 52
75. GRIMONT, P.A.D., and F. GRIMONT, 1978. THE GENUS **SERRATIA**. ANN. REV. MICROBIOL. 32: 221 - 248
76. GRIMONT, P.A.D., F. GRIMONT, H.L.C. DULONG DE ROSNAY, and P.H.A. SNEATH. 1977. TAXONOMY OF THE GENUS **SERRATIA**. J. GEN. MICROBIOL. 98: 39 - 66
77. GRIMONT, P.A.D., F. GRIMONT, J.J. FARMER III, and M.A. ASBURY. 1981. **CEDECEA DAVISAE** GEN. NOV. sp. NOV and **CEDECEA LAPAGEI** sp NOV., NEW ENTEROBACTERIACEAE FROM CLINICAL SPECIMENS. INT. J. SYST. BACTERIOL. 31: 317 - 326
78. GRIMONT, P.A.D., F. GRIMONT, C. RICHARD, B.R.DAVIS, A.G. STEIGERWALT, and D.J. BRENNER, 1978. DEOXYRIBONUCLEIC ACID RELATEDNESS BETWEEN **SERRATIA PLYMUTHICA** AND OTHER **SERRATIA** SPECIES, WITH A DESCRIPTION OF **SERRATIA ODORIFERA** sp. NOV. (TYPE STRAIN: ICPB 3995) INT. J. SYST. BACTERIOL. 28: 453 -463

79. GRIMONT, P.A.D., F. GRIMONT, C. RICHARD and R. SAKAZAKI. 1980 **EDWARDSIELLA HOSHINAE**. A NEW SPECIES OF ENTEROBACTERIACEAE. CURR. MICROBIOL, 4: 347 -351
80. GYLES C., SoM. S. FALKOW. 1974. THE ENTEROTOXIN PLASMIDS OF **ESCHERICHIA COLI**. J. INF, DISEASES. 130: 40 -49
81. HAGLER, A.N., L.C. MENDOCA-HAGLER, E.A. SANTOS, S. FARAGE, J.B. SILVA FILTRO, A. SCHRANK, and R.B. DE OLIVEIRA. 1986. MICROBIAL POLLUTION INDICATORS IN BRAZILIAN TROPICAL AND SUBTROPICAL MARINE SURFACE WATERS. SCI. TOTAL ENVIRON. 58: 151 -160
82. HANNA, K., C. BENGIS-GARBER, D.J. KUSHNER, M.KOGUT and M. KATES. 1984. THE EFFECT OF SALT CONCENTRATION ON THE PHOSPHOLIPID AND FATTY ACID COMPOSITION ON THE MODERATE HALOPHILE **VIBRIO COSTICOLA**. CAN, J. MICROBIOL. 30: 669 - 675
83. HARKER C. 1989. BACTERIOLOGICAL EXAMINATION OF THE WATER SUPPLY ON AN ANTARCTIC BASE. EPIDEMIOLOG. INFECT. 102: 105-112.
84. HENIS, Y. and J. EREN. 1963. PRELIMINARY STUDIES ON THE MICROFLORA OF A HIGH SALINE SOIL. CANADIAN J. MICROBIOL. 9:902 -904
85. HICKMAN, F.W. and J.J. FARMER III. 1976. DIFFERENTIATION OF **PROTEUS MIRABILIS** BY BACTERIOPHAGE TYPING AND THE DIENES REACTION. J. CLIN. MICROBIOL. 3:350 - 358.
86. HICKMAN F.W., J.J. FARMER III, A.G. STEIGERWALT and D.J. BRENNER. 1980. UNUSUAL GROUPS OF **MORGANELLA ("PROTEUS") MORGANII** ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS: LYSINE-POSITIVE AND ORNITHINE-NEGATIVE BIOGROUPS. J. CLIN. MICROBIOL 12: 88 - 94
87. HICKMAN F.W. , A.G. STEIGERWALT, J.J. FARMER III, and D.J. BRENNER. 1982. IDENTIFICATION OF **PROTEUS PENNERI** sp.NOV., FORMELY KNOWN AS **PROTEUS VULGARIS** INDOLE NEGATIVE OR AS **PROTEUS VULGARIS**. BIOGRUPO 1. J. CLIN. MICROBIOL. 15: 1097 -1102
88. HOLLIS, D.G., F.W. HICKMAN, D.J. FARMER III, R.E. WEAVER and D.J. BRENNER. 1981. **TATUMELLA PTYSEOS**. GEN NOV. SP NOV. A MEMBER OF THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE

FOUND IN CLINICAL SPECIEMENS. J. CLIN. MICROBIOL. 14: 79 -88

89. HOLMBERG, S.D., I.K. WASCHSMUTH, F.W. HICKMAN - BRENNER and M.L. COHEN. 1984. COMPARISON OF PLASMID PROFILE ANALYSIS, PHAGE TYPING, AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING IN CHARACTERIZING *SAMONELLA TYPHIMURIUM* ISOLATES FROM OUTBREAKS. J. CLIN MICROBIOL. 16: 129 - 134.

90. INGRAM, M. 1957, MICROORGANISMS RESISTING HIGHT CONCENTRATIONS OF SUGARS OR SALT. SYMP SOC. GEN. MICROBIOL. 7: 90 - 133

91. ISENBERG, H.D., F.D. SCHOENKNECHT, and A. VON GRAEVENITZ. 1979. CUMITECH 9, COLLECTION AND PROCESSING OF BACTERIOLOGICAL SPECIMENS. COORDINATING. ed, S.J. RUBIN. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, D.C.

92. JENSEN, R. 1974. DISEASES OF SHEEP. PHILDELPHIA: CEA AND FERBIGER

93. JOVANOVICH, S.B., M. MARTINELL, M.T. RECORD, JR., and R.R. BURGESS. 1988. RAPID RESPONSE TO OSMOTIC UPSHIFT BY OSMOREGULATED GENES IN *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA TYPHIMURIUM*. J. BACTERIOL. 170: 534-539.

94. JUDICIAL COMMISSION. 1958. OPINION 15. CONSERVATION OF THE FAMILY NAME ENTEROBACTERIACEAE, OF THE NAME OF THE TYPE GENUS AND DESIGNATION OF THE TYPE GENUS AND DESIGNATION OF THE TYPE SPECIES.

95. JUDICIAL COMMISSION. MINUTE 29. 1979. REJECTION OF THE FAMILY NAME ENTEROBACTERIACEAE. INT. J. SYST. BACTERIOL. 29: 267-269.

96. KAPLAN, S.L. 1983. ANTIGEN DETECTION IN CEREBROSPINAL FLUID - PROS AND CONS. AM. J. MED. 75: (Suppl. 1B)): 109 - 118.

97. KARMALI, M.A., M. PETRIC, C. LIM, P.C. FLEMING, and B.T. STEELE. 1983. *ESCHERICHIA COLI* CYTOTOXIN, HEMOLITIC UREMIC SYNDROME AND HEMORRHAGIC COLITIS. LANCET ii: 1299 -1300

98. KAUFFMAN, F. 1954. ENTEROBACTERIACEAE. 2nd. ed. COPENAGEN MUNKSGAARD

99. KAUFFMAN, F. 1966. THE BACTERIOLOGY OF ENTEROBACTERIACEAE. THE WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, Md. p 400

100. KELLY, M.T., D.J. BRENNER, J.J. FARMER III. 1985. ENTEROBACTERIACEAE. pp 336 -352 IN: LENNETTE E.H., E. H. SPAULDING, J.P. TRUANT (eds). MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 4^a ed. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON D.C.

101. KENNEDY E.P., 1982. OSMOTIC REGULATION AND THE BIOSYNTHESIS OF MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACCHARIDES: IN *ESCHERICHIA COLI*. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 79: 1092 - 1095.

102. KENNEDY E.P., and M.K. RUMLEY. 1988. OSMOTIC REGULATION OF BIOSYNTHESIS OF MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACCHARIDES IN *ESCHERICHIA COLI*. J. BACTERIOL. 170: 2457-2461

103. KING E.D. 1967, THE IDENTIFICATION OF UNUSUAL GRAM NEGATIVE BACTERIA. CENTER FOR DISEASE CONTROL. ATLANTA, Ga.

104. KLIPSTEIN, F.A., L.V. HOLDEMAN, J.J. CORCINO, W.E. MOORE. 1973. ENTEROTOXIGENIC INTESTINAL BACTERIA IN TROPICAL SPRUE. ANNALS OF INTERNAL MEDICINE. 79: 632 - 636.

105. KNAPP W., E. THAL., 1973. DIFFERENTIATION OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* BY BIOCHEMICAL REACTIONS. CONT. MICROBIOL. IMMUNOL. 2: 10 - 16.

106. KOGUT M. and N.J. RUSSELL. 1984, THE GROWTH AND PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF A MODERATELY HALOPHILIC BACTERIUM DURING ADAPTATION TO CHANGES IN SALINITY. CURR. MICROBIOL. 10:95 - 98.

107. KUSHNER, D.J.. 1968. HALOPHILIC BACTERIA. ADV. APPL. MICROBIOL 10: 73 - 99

108. KUSHNER, D.J.. 1978. LIFE IN HIGH SALT AND SOLUTE CONCENTRATION: HALOPHILIC BACTERIA. IN "MICROBIAL LIFE IN EXTREME ENVIRONMENTS" pp. 317 - 368. D.J. KUSHNER, (Ed). ACADEMIC PRESS, LONDON.

109. KUSHNER, D.J. 1985. THE HALOTOBACTERIACEAE. IN THE BACTERIA, VOL 8 pp 171 - 214. CR. WOESE AND R.S. WOLFE (eds). ACADEMIC PRESS, LONDON
110. LAPAGE S.P.. 1979. ENTEROBACTERIACEAE. INT. J. SYST. BACTERIOL. 29:265 - 266.
111. LAPAGE S.P., S. BASCOMB, W.R. WILLCOX, and M.A.CURTIS. 1973. IDENTIFICATION OF BACTERIA BY COMPUTER: GENERAL ASPECTS AND PERSPECTIVES. J. GEN. MICROBIOL. 77:273 - 290.
112. LAPAGE S.P., P.H.A. SNEATH, E.F. LESSEL, V.B.D. SKERMAN, H.P.R. SEELIGER, W.A. CLARK. 1975. INTERNATIONAL CODE OF NOMENCLATURE OF BACTERIA, 1975. REVISION. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON D.C.
113. LARSEN H. 1962. HALOPHILISM IN "THE BACTERIA". I.C. GUNSALUS AND R.Y. STANIER. (Eds) vol 4 pp 297 - 342. ACADEMIC PRESS. NEW YORK.
114. LARSEN H. 1984. FAMILY HALOTOBACTERIACEAE. IN BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY 9th. ed. vol I pp. 261 - 267. N.R. KRIEG WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE.
115. LARSEN J.L., P. WILLEBERG. 1984. THE IMPACT OF TERRESTRIAL AND ESTUARIAL FACTORS ON THE DENSITY OF ENVIROMENTAL BACTERIAS (VIBRIONACEAE) AND FAECAL COLIFORMS IN GOASTAL WATER. ZENTRALEB. BACTERIOL. MICROBIOL. HYG. 179: 308 - 323.
116. LECLERC, H. 1962. ETUDE BIOCHEMIQUE D' ENTEROBACTERIACEAE PIGMENTEES. ANN. INT. PASTEUR (PARIS) 102: 726 - 741.
117. LECLERC H. and R. BUTTIAUX. 1965. LES CITROBACTER. ANN. INT. PASTEUR (LILLE) 16: 67 - 74.
118. LE MINOR, L., M. VERON and M. POPOFF. 1982. TAXONOMIE DES SAMONELLA. ANN. MICROBIOL. (INT. PASTEUR) 133B: 223 - 243.
119. LENNETTE E.H., A. BALOWS, W.J. HAUSLER, H.J. SHADOMY (ed) 1985. MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 4th ed. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON D.C.

120. LEVINE, M.M., E.J. BEROQUIST, D.R. NALIN, D.H. WATERMAN, R.B. HORNICK, C.R. YOUNG, S. SATMAN, and B. ROWE. 1978. **ESCHERICHIA COLI** STRAINS THAT CAUSE DIARRHEA BUT DO NOT PRODUCE HEAT-LABILE OR HEAT-STABLE ENTEROTOXINS AND ARE NO-INVASIVE. LANCET i: 1119 - 1122

121. MARIK, F.J. and J.T. PARISI. 1971. BACTERIOPHAGE TYPES and O ANTIGEN GROUPS OF **ESCHERICHIA COLI** FROM URINE. APPL. MICROBIOL. 22; 26 - 31.

122. MATEA A., M. SCHAFFER. 1988. QUANTITATIVE DETERMINATION OF **ESCHERICHIA COLI** FROM FAECAL COLIFORMS IN SEAWATER. MICROBIOL 53: 161 -165.

123. MARQUEZ, M.C., A. VENTOSA and F. RUIZ-BERRAQUERO. 1987. A TAXONOMIC STUDY OF HETEROTROPHIC HALOPHILIC AND NON-HALOPHILIC BACTERIA FROM A SOLAR SALTERN. J. GEN. MICROBIOL. 133: 45-56.

124. MCHUGH, G.L., R.C. MOELLERING, C.C. HOPKINS and M.N. SWARTZ. 1975. **SALMONELLA TYPHIMURIUM** RESISTANT SILVER NITRATE, CHLORAMPHENICOL and AMPICILLIN. LANCET i: 235 - 239.

125. Mc LEOD, R.A. 1965. THE QUESTION OF THE EXISTENCE OF SPECIFIC MARINE BACTERIA. INT. BACTERIOL. REV. 29: 9 - 23.

126. Mc LEOD R.A., E. ONOFREY. 1957. J. CELL. COMP. PHYSIOL. 50: 389 - 401

127. MARMUR J., 1961. A PROCEDURE FOR ISOLATION OF DESOXIRIBONUCLEIC ACID FROM MICROORGANISMS. J. MOL. BIOL. 3: 208 - 218

128. MARMUR, J., S. FALKOW, and M. MENDEL 1963. NEW APPROACHES TO BACTERIAL TAXONOMY. ANNU REV. MICROBIOL. 17: 329 - 372

129. MERSON M.H., B. ROWE, R.E. BLACK, I. HUQ, R.J. GROSS, and A. EUSOF. 1980. USE OF ANTISERA FOR IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIGENIC **ESCHERICHIA COLI**. LANCET ii: 222 - 224.

130. MEYERS, B.R., E. BOTTONE, S.Z.HIRSCHMAN, and S.S. SCHNEIERSON. 1972. INFECTIONS CAUSED BY MICROORGANISMS OF THE GENUS **ERWINIA**. ANN. INTERN. MED. 76: 9 - 14

131. MILLER, K.J. 1985. EFFECTS OF TEMPERATURE AND SODIUM CHLORIDE CONCENTRATION ON THE PHOSPHOLIPID AND FATTY ACID COMPOSITIONS OF A HALOTOLERANT **PLANOCOCCUS**. SP. J. BACTERIOL. 162: 263 - 270

132. MILLER, K.J. 1989. DO PERIPLASMIC OLIGOSACCHARIDES PROVIDE A ROLE IN THE OSMOTIC ADAPTATION OF GRAM - NEGATIVE BACTERIA?. GENERAL AND APPLIED ASPECTS OF HALOPHILIC MICROORGANISMS. ABSTRAS. ALICANTE FEMS - NATO. ADVANCED RESERCH WORKSHOP.

133. MILLER, K.J. and E. P, KENNEDY. 1987. TRANSFER OF PHOSPHOETHANOLAMINE RESIDUES FROM PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE TO THE MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACHARIDES OF **ESCHERICHIA COLI**. J. BACTERIOL 169: 682 - 586

134. MILLER, K.J., E.P. KENNEDY, and U.N. REINHOLD. 1986. OSMOTIC ADAPTATION BY GRAM NEGATIVE BACTERIA: POSSIBLE ROLE FOR PERIPASMIC OLIGOSACCHARIDES SCIENCE. 231: 48 - 51.

135. MOSELEY S.L. , P. ECHEVARRIA, J. SERIWATANA, C. TIRAPAT, W. CHAICUMPA, T. SAKULDAIPEARA, and S. FALKOW. 1982. IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIGENIC **ESCHERICHIA COLI**. BY COLONY HYBRIDIZATION USING THREE ENTEROTOXIN GENEPROBES. J. INFECT. DIS. 145: 863 -869.

136. MOSELEY, S.L., I. HUQ, A.R.M.A.. ALIM, M.So., M. SAMADPOUR- MOTALEBI, AND S. FALKOW. 1980. DETECTION OF ENTEROTOXIGENIC **E. Coli** BY DNA COLONY HYBRIDIZATION. J. INFECT. DIS. 142: 892 -898.

137. MUNRO, P.M., M.J. BAUTHIER, F.M. LAUMOND. 1987. CHANGES IN **ESCHERICHIA COLI** CELLS STARUED IN SEAWATER OR GROWN IN SEAWATER-WASTEWATER MIXTURES. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. 53: 1476-1481.

138. MUNRO, P.M., M.J. GAUTHIER, V.A. BREITTMAYER, J. BONGIOVANNI. 1989. INFLUENCE OF OSMOREGULATION PROCESSES ON STARVATION SURVIVAL OF **ESCHERICHIA COLI** IN SEAWATER. APPL ENVIRO MICROBIOL. 55: 2017 - 2024.

139. MUYEMBE, T., J. VANDEPITTE, J. DESMYTER. 1973. NATURAL COLISTIN RESISTANCE IN *EDWARDSIELLA TARDA*. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY 4: 521 - 524.
140. NEMOY, N.J. and T.A. STAMEY. 1971. SURGICAL BACTERIOLOGICAL, AND BIOCHEMICAL MANAGEMENT OF "INFECTION" STONES. J. Am. Med. ASSOC. 215: 1470 - 1476.
141. NUNES, M.P., and I.D. RICCIARDI, 1981. DETECTION OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* HEAT - STABLE ENTEROTOXIN BY SUCKLING MOUSE BIOASSAY. J. CLIN MICROBIOL 13: 783 - 786
142. OHNO, Y., I. YANO, T. HIRAMATSU and M. MASUI. 1976. LIPIDS AND FATTY ACIDS OF A MODERATELY HALOPHILIC BACTERIUM No 101. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 424: 337 - 350.
143. OHNO, Y., I. YANO and M. MASUI. 1979. EFFECT OF Cl Na CONCENTRATION AND TEMPERATURE ON THE PHOSPHOLIPID AND FATTY ACID COMPOSITION OF A MODERATELY HALOPHILIC BACTERIUM. *PSEUDOMONAS HALOSACHAROLYTICA* J. BIOCHEM. 85: 413 - 421.
144. PENNER, J.L. and J.N. HENNESSY. 1979. APPLICATION OF O - SEROTYPING IN A STUDY OF *PROVIDENCIA RETTGERI* (*PROTEUS RETTGERI*) ISOLATED FROM HUMAN AND NONHUMAN SOURCES. J. CLIN. MICROBIOL. 10: 834 - 840.
145. PERROUD B., and D. LE RUDULIER. 1985. GLYCINE BETAINE TRANSPORT IN *ESCHERICHIA COLI* : OSMOTIC MODULATION. J. BACTERIOL. 161: 393-401.
146. PLATT, R. 1983. QUANTITATIVE DEFINITION OF BACTERIURIA. AM. J. MED. 75 (Suppl. 1B): 44 - 52.
147. POST, F.J. 1977. THE MICROBIAL ECOLOGY OF THE GREAT SALT LAKE. MICROBIAL ECOLOGY. 3: 145 - 165.
148. QADRI, S.M. and R.P. WILLIAMS. 1971. INCORPORATION OF METHIONINE INTO PFODIGIOSIN. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 330: 181 - 184.
149. QUESADA E., V. BEJAR, M.J. VALDERRAMA, A. VENTOSA and A. RAMOS -CORMENZANA. 1985. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MODERATELY HALOPHILIC NONMOTILE RODS FROM DIFFERENT SALINE HABITATS. MICROBIOLOGIA 1: 89 - 96.

150. QUESADA, E. A. VENTOSA, F. RODRIGUEZ - VALERA, L. MEJIAS, and A. RAMOS - CORMENZANA. 1983. NUMERICAL TAXONOMY OF MODERATELY HALOPHILIC GRAM - NEGATIVE BACTERIA ISOLATED FROM HYPERSALINE SOILS. J. GEN. MICROBIOL. 129: 2649 - 2657

151. QUESADA E., A. VENTOSA, F. RODRIGUEZ - VALERA and RAMOS - CORMENZANA. 1982, TIPS AND PROPERTIES OF SOME BACTERIA ISOLATED FROM HYPERSALINE SOIL. J. APPLIED BACTERIOL. 53: 155 - 161.

152. RAMAKRISNAN G., K. IKENAKA, and M. INOUE. 1985. UNCOUPLING OF OSMOREGULATION OF THE *ESCHERICHIA COLI* K-12 ompF GENE FROM ompB-DEPENDENT TRANSCRIPTION. J. BACTERIOL. 163: 82-87.

153. REALI D., G. CAROLI, E. LEVRE. 1975. SULLA PRESENZA DI *SAMONELLA*, DI *E. COLI* E DEI LORO FAGI OSMOLOGHI IN AQUE DI MARE. ANN SCLAVO, 17.

154. RENNIE, R.P., C.E. NORD, L. SJOBERG and I.B.R. DUNCAN. 1978. COMPARISON OF BACTERIOPHAGE TYPING, SEROTYPING, AND BIOTYPING AS AIDS IN EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF *KLEBSIELLA* INFECTIONS. J. CLIN. MICROBIOL. 8: 638 - 642.

155. RODRIGUEZ - VALERA, F., F. RUIZ - BERRAQUERO, and A. RAMOS CORMENZANA. 1981. CHARACTERISTICS OF THE HETEROTROPHIC BACTERIAL POPULATIONS IN HYPERSALINE ENVIRONMENTS OF DIFFERENT SALT CONCENTRATION. MICROBIAL ECOLOGY. 7: 235 - 243.

156. RODRIGUEZ - VALERA, F. A. VENTOSA, G. JUEZ, and J.F. IMHOFF. 1985. VARIATION OF ENVIRONMENTAL FEATURES AND MICROBIAL POPULATIONS WITH SALT CONCENTRATION IN A MULTI - POND SALTERN. MICROBIAL ECOLOGY 11 107 - 115.

157. ROTH, W.G., M.P. LECKIE, and D.N. DIETZLER. 1988. RESTORATION OF COLONY-FORMING ACTIVITY IN OSMOTICALLY STRESSED *ESCHERICHIA COLI* BY BETAINE. APPL. ENVIRON MICROBIOL. 54: 3142-3146.

158. SACK, R.B., R.C. TILTON, and A.S. WEISSFELD. 1980. CUMITECH 12, LABORATORY DIAGNOSIS OF BACTERIAL DIARRHEA COORDINATING ed. S.J. RUBIN. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON D.C.

159. SADOWSKI, P.L., B.C. PETERSON, D.N. GERDING, AND P.P. CLEARY. 1979. PHYSICAL CHARACTERIZATION OF THE R PLASMIDS OBTAINED FROM AN OUTBREAK OF NOSOCOMIAL *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*. ANTIMICROB. AGENTS. CHEMOTHER. 15: 616 - 624.
160. SCHENIDER, J.E., V.N. REINHOLD, M.K. RUMLEY and E.P. KENNEDY. 1979. STRUCTURAL STUDIES OF THE MEMBRANE-DERIVED OLIGOSACCHARIDES OF *ESCHERICHIA COLI*. J. BIOL. CHEM 254: 10135 - 10138.
161. SERIWATANA, J., P. ECHEVARRIA, J. ESCAMILLA, R. GLASS, I. HUQ, R. ROCKHILL AND B.J. STOLL. 1983. IDENTIFICATION OF ENTEROTOXIN GENE PROBES. INFECT. IMMUN. 42: 152 - 155.
162. SHOTTS, E.B., S.F. SNIESZKO. 1976. SELECTED BACTERIAL FISH DISEASE . pp 143 - 151. IN: PAGE, L.A. (ed) WILD LIFE DISEASES. NEW YORK: PLENUM.
163. SIDNEY M., and J. WILLIAM. 1982. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY 6ed THE C.V. MOSBY Co ST LOUIS - TORONTO. LONDON.
164. SIERBURTH J. McN 1979. SEAMICROBES. OXFORD AND NEW YORK: OXFORD UNIVERSITY PRESS.
165. SKERMAN V.B.D., V. Mc GOWAN, P.H.A. SNEATH (ed) 1980. APPROVED LISTS OF BACTERIAL NAMES, INT, J. SYST BACTERIOL. 30: 225 - 420.
166. SONNENWIRTH, A.C. 1979. COLLECTION AND CULTURE OF SPECIMENS AND GUIDES FOR BACTERIAL IDENTIFICATION, p. 1122 - 1169. IN: S. FRANKEL, S. REITMAN and A.C. SONNENWIRTH (ed).
167. STAMEY, T.A. and A. PFAN. 1970. URINARY INFECTIONS: A SELECTIVE REVIEW AND SOME OBSERVATIONS. CALIF. MED. 113: 16 - 35.
168. STAPP, C. 1940. *BACTERIUM RUBIDAEUM* NOV. SPEC. ZENTRALBL. BACTERIOL. PARASITENKD. INFektionsKR. HYG. ABT. 2. 102: 251 - 260.
169. STARR, M.P. and A.K. CHATTERSEE. 1972. THE GENUS *ERWINIA*: ENTEROBACTERIA PATHOGENIC TO PLANTS AND

ANIMALS. ANNU. REV. MICROBIOL. 26: 389 - 426.

170. STARR, M.P., P.A.D. GRIMONT, F. GRIMONT, and P.B. STARR. 1976. CAPRYLATE - THALLOUS AGAR MEDIUM FOR SELECTIVELY ISOLATING **SERRATIA** AND ITS UTILITY IN THE CLINICAL LABORATORY. J. CLIN. MICROBIOL. 4: 240 - 276

171. STEEL, K.J. 1962. THE PRACTICE OF BACTERIAL IDENTIFICATION. SYMP, SOC. GEN. MICROBIOL. 12:405 - 432.

172. STEIGERWALT, A.G., G.R. FANNING, M.A. FIFE, and D.J. BRENNER. 1976. DNA RELATEDNESS AMONG SPECIES OF **ENTEROBACTER** AND **SERRATIA**. CAN J. MICROBIOL. 22: 121 - 137.

173. SVENNERHOLM, A.M. AND G. WIKLUND. 1983.. RAPID GM1 - ENZYME - LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WITH VISUAL READING FOR IDENTIFICATION OF **ESCHERICHIA COLI** HEAT - LABILE ENTEROTOXIN. J. CLIN. MICROBIOL. 17: 596 - 600.

174. TULLOCK, E.F. Jr, K.J. RYAN, S.B. FORMAL, and F.A. FRANKLIN. 1973. INVASIVE ENTEROPATHOGENIC **ESCHERICHIA COLI** DYSENTERY. ANN. INTERN. MED. 79: 13 - 17.

175. URSING, J., D.J. BRENNER, H. BERCOVIER, G.R. FANNING, A.G. STEIGERWALT, J. BRAULT, H.H.MOLLARET. 1980. **YERSINIA FREDERIKSENII**: A NEW SPECIES OF ENTEROBACTERIACEAE COMPOSED OF RHAMNOSE - POSITIVE STRAINS (FORMELY CALLED ATYPICAL **YERSINIA ENTEROCOLITICA** OR **YERSINIA ENTEROCOLITICA** - LIKE). CURR. MICROBIOL. 4: 213 - 218.

176. VERON, M. 1975. NUTRITION ET TAXONOMIE DES ENTEROBACTERIACEAE ET BACTERIES VOISINES. I. METHODE D' ETUDE DES AUXANOGRAMMES. ANN. MICROBIOL. 126A: 267- 274.

177. VOLCANI, B.E. 1940. STUDIES ON THE MICROFLORA OF THE DEAD SEA. DOCTORAL THESIS, JERUSALEM: HEGREW UNIVERSITY.

178. WASHINGTON J.A.II. 1981. LABORATORY PROCEDURES IN CLINICAL MICROBIOLOGY. SPRINGER - VERLAG, NEW YORK.

179. WILLIAMS, J.E. 1965. **PARATYPHOID** AND **ARIZONA** INFECTIONS. PP 260 - 328. IN: BIESTER, H.E., L.H. SCHWARTE (EDS). DISEASES OF POULTRY, 5th ed. AMES IOWA:

IOWA STATE UNIVERSITY PRESS.

180. WILLIAMS , F.D., 1978. NATURE OF THE SWARMING PHENOMENON IN *PROTEUS*. ANNV. REV. MICROBIOL. 32: 101 - 122.

181. WEED, L.A. 1954. MICROBIOLOGIC METHODOS IN SURGICAL PATHOLOGY. MAYO CLIN. PROC. 29: 393 - 399.

182. WILLIAMS R.P., C.L. GOTT and S.M. QADRI 1971. INDUCTION OF PIGMENTATION IN NONPROLIFERATING CELLS OF *SERRATIA MARCESCENS* BY ADDITION OF SINGLE AMINOACIDS. J. BACTERIOL. 106: 444 - 448.

183. WILLIAMS, R.P. , C.L. GOTT, S.M. QADRI and R.H. SCOTT. 1971. INFLUENCIA OF TEMPERATURE OF INCUBATION AND TYPE OF GROWTH MEDIUM ON PIGMENTATION IN *SERRATIA MARCESCENS*. J. BACTERIOL. 106: 438 - 443.

184. WOOLFREY, B.F., R.T. LALLY and C.O. QUALL. 1983. EVALUATION OF THE AUTOSCAN - 3. AND SECEPTOR SYSTEMS FOR ENTEROBACTERIACEAE IDENTIFICATION. J. CLIN. MICROBIOL. 17: 807 - 813.

185. YOUNG, V.M., D.M. KENTON, B.J. HOBBS, and M.R. MOODY. 1971. *LEVINEA* A NEW GENUS OF THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE. INT. J. SYST. BACTERIOL. 21: 58 - 63.